



УДК 582.734.4+575.174.015.3

## Универсальные ПЦР-праймеры для идентификации видов рода *Sanguisorba* и других представителей семейства Rosaceae

А. М. Колтунова<sup>1</sup>, М. Г. Куцев<sup>1,2\*</sup>, Р. А. Муртазалиев<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Алтайский государственный университет, пр. Ленина, д. 61, г. Барнаул, 656049, Россия.  
E-mail: koltunova.anas@yandex.ru; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-3753-7958>

<sup>2</sup> Сибирский федеральный университет, пр. Свободный, д. 79, г. Красноярск, 660041, Россия.  
E-mail: m\_kucev@mail.ru; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-2284-6851>

<sup>3</sup> Прикаспийский институт биологических ресурсов Дагестанского ФИЦ РАН, ул. М. Гаджиева, д. 45, г. Махачкала, 367000, Россия. E-mail: murtazaliev.ra@yandex.ru; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-2895-213X>

\* Автор для переписки

**Ключевые слова:** видоспецифичные праймеры, кровохлебка, пластидный геном, филогенетический анализ.

**Аннотация.** Разработано семь пар праймеров для амплификации некодирующих участков ДНК хлоропластов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для выяснения универсальности праймеров мы использовали их для амплификации фрагментов ДНК различных видов растений семейства Rosaceae. Праймеры являются пригодными для генотипирования видов рода *Sanguisorba* и некоторых видов семейства Rosaceae. С помощью данных праймеров возможно амплифицировать некодирующие полиморфные области хлоропластной ДНК, а значит, они могут быть использованы при выявлении межвидовых различий и в популяционной генетике растений.

## Universal PCR primers for identifying species of the genus *Sanguisorba* and other members of the family Rosaceae

A. M. Koltunova<sup>1</sup>, M. G. Kutsev<sup>1,2</sup>, R. A. Murtazaliev<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Altai State University, Lenina Pr., 61, Barnaul, 656049, Russian Federation

<sup>2</sup> Siberian Federal University, Svobodny Pr., 79, Krasnoyarsk, 660041, Russian Federation

<sup>3</sup> Caspian Institute of Biological Resources, Dagestan FRC RAS, M. Gadzhieva St., 45, Makhachkala, 367000, Russian Federation

**Keywords:** plastid genome, phylogenic analysis, *Sanguisorba*, species-specific primers.

**Summary.** Seven primers for the amplification of non-coding regions of chloroplast DNA via the polymerase chain reaction (PCR) have been designed. In order to find out whether these primers were universal, we used them in an attempt to amplify DNA fragments from various plant species of Rosaceae. Primers worked for species of the genus *Sanguisorba* and some species of the family Rosaceae. The fact that they amplify chloroplast DNA non-coding regions over a wide taxonomic range means that these primers may be used to study the population biology and evolution of plants.

## Введение

Семейство Rosaceae Juss. (розоцветные) в современной систематике включает около 100 родов и 3000 видов, распространенных по всем континентам (Potter et al., 2007). Многие виды являются хозяйственно-ценными, декоративными, лекарственными растениями. Несмотря на всестороннюю изученность данного семейства, главными признаками для решения систематических вопросов остаются число хромосом и тип плода. Но и эти признаки могут противоречить друг другу (Morgan, 1994). Виды, входящие в состав сем. Rosaceae, в зависимости от автора, делят на четыре (Schulze-Menz, 1964) и двенадцать (Takhtajan, 1997) подсемейств. Сложная таксономия и ограниченные морфологические характеристики этого семейства затрудняют определение видов некоторых родов.

Род *Sanguisorba* L., кровохлебка, (подтриба *Sanguisorbinae* Torr. et A. Gray, триба *Sanguisorbeae* DC., подсемейство *Rosoideae* Juss. ex Arn.) насчитывает около 30 видов, распространенных преимущественно в северных и средних широтах (Xiang-Xiao et al., 2018). На территории России род представлен 7 видами, большинство из которых обладают широким фитоценотическим спектром. Растения можно встретить в лесах, лугах, по берегам рек и озёр. Представители этого рода – многолетние корневищные травы с непарноперистыми листьями и головчатым соцветием (Li et al., 2003). Идентификация видов затруднена из-за морфологического сходства и симпатрического распространения *Sanguisorba officinalis* L. и его близких родственников (Inkyu et al., 2021). Этот вид традиционно используют в качестве вяжущего и кровоостанавливающего средства. Имеются исследования и других видов рода, которые проявляют разную фармакологическую активность, в том числе противовоспалительную (Su et al., 2018; Guo et al., 2019; Yasueda et al., 2020) и противораковую (Liu et al., 2016; Nam et al., 2017; Tan et al., 2019), участвуют в антипероксидации липидов (Zhang et al., 2012; Romojaro et al., 2013; Kim et al., 2018), проявляют антибактериальные (Su et al., 2019; Zhu et al., 2020), антидиабетические (Kuang et al., 2011; Son et al., 2015) и гепатопротекторные свойства (Meng et al., 2020) и эффективны против ожирения (Jung et al., 2016; Im et al., 2017; Ji et al., 2018). На сегодняшний день в растениях рода *Sanguisorba* идентифицировано более 270 химических компонентов, включая флавоноиды, три-

терпеноиды, стероиды, лигнаны, органические кислоты и т. д. (Zhao et al., 2017; Jang et al., 2018). Поэтому исследования данного рода являются перспективными не только в ботанических целях, но и для отечественной фармацевтики.

Близкородственный таксон *Poterium* L. изначально был признан отдельным родом (Linnaeus, 1753). Однако затем *Sanguisorba* и *Poterium* не раз объединялись многими авторами из-за схожести в строении цветка и плодов. Тем не менее, в настоящий момент современная систематика разделяет *Sanguisorba* и *Poterium* на два самостоятельных рода (Lee et al., 2011).

Хлоропластный геном представителей рода *Sanguisorba* имеет длину 100–150 т. п. н. и содержит большое количество эволюционной информации, которая может быть использована для выявления филогенетических отношений между видами или их идентификации (Hong et al., 2017; Freitas et al., 2018), а также в филогенетической эволюции и исследованиях, связанных с геной инженерией (Leister, Pesaresi, 2018; Mader et al., 2018). Несмотря на то, что технология высокопроизводительного секвенирования стала более доступной, молекулярно-генетических исследований представителей рода *Sanguisorba* всё ещё очень мало. Китайскими учёными (Xiang-Xiao, 2018) с помощью платформы Illumina HiSeq X была произведена сборка, аннотация и структурный анализ хлоропластного генома четырёх таксонов рода *Sanguisorba* (*S. officinalis*, *S. filiformis* (Hook. f.) Hand.-Mazz., *S. stipulata* Raf. и *S. tenuifolia* var. *alba* Trautv. et C. A. Mey.), другой группой учёных (Inkyu et al., 2021) – ещё двух видов (*S. sitchensis* C. A. Mey. и *S. hakusanensis* Makino).

Точное определение видов растений по морфологическим признакам не всегда возможно. Например, определение вида спорно, а в некоторых случаях невозможно, когда используются только отдельные органы растений (Casper, Jackson, 1997; Taggart et al., 2011). Методы молекулярной биологии, основанные на различиях в геноме растений между видами, являются одним из инструментов решения данной проблемы (Linder et al., 2000; Agarwal et al., 2008).

Молекулярные маркеры активно используют для решения экологических и эволюционных задач, для оценки инвазивных или исчезающих видов, в таксономических и филогенетических исследованиях (Valentini et al., 2009). Наиболее распространенный подход – ДНК-баркодинг, основанный на секвенировании стандартизованного участка ДНК для точной и быстрой иден-

тификации видов (Hebert et al., 2003). Однако этот подход является дорогостоящим, особенно при обработке большого количества образцов. Диагностическая ПЦР с использованием специфических праймеров предлагает более быстрый метод идентификации конкретных таксонов растений. Альтернативой является разработка праймеров для амплификации участков ДНК разной длины и дальнейшей детекции с помощью капиллярного или агарозного электрофореза (King et al., 2008; Wallinger et al., 2012).

Целью нашего исследования стала разработка универсальных праймеров для видовой идентификации представителей рода *Sanguisorba*, а также тестирование их на других родах из семейства розоцветные.

### Материалы и методы

Материалом для исследования послужили 8 видов рода *Sanguisorba*: *S. minor* Scop., *S. baicalensis* Poplawska, *S. tenuifolia*, *S. parviflora* Takeda, *S. canadensis* L., *S. officinalis*, *S. azovtsevii* Pshenich. et Krasnob., *S. alpina* Bunge; 2 разновидности: *S. officinalis* var. *polygama* F. Nyl., *S. officinalis* var. *glandulosa* (Kom.) Worosch.; 2 вида рода *Poterium* L.: *P. polygamum* Waldst. et Kit., *P. lasiocarpum* Boiss. et Hausskn.; и некоторые виды из семейства розоцветные гербария ALTB (табл. 1).

Выделение тотальной ДНК осуществлялось с помощью набора Diamond DNA Plant kit (ООО «Алтайбиотех», Россия) по протоколу производителя. Реакцию амплификации проводили с применением готовой ПЦР смеси БиоМастер HS-Taq ПЦР (Биолабмикс, Россия) в объёме 15 мкл и конечной концентрацией праймеров 400 нМ. Для анализа использовались праймеры, синтезированные ООО «Евроген» (Россия). Амплификация проводилась в термоциклере MyCycler по следующей программе: денатурация 95 °С – 60 с, отжиг праймеров 57 °С – 30 с, элонгация 72 °С – 30 с (всего 33 цикла). Разделение и визуализацию продуктов амплификации проводили с помощью капиллярного электрофореза с использованием автоматической станции QIAxcel Advenced (Qiagen, Германия) и набора реагентов QIAxcel DNA High Resolution Kit в соответствии с инструкцией производителя (программа электрофореза OL 800, время инъекции образца 10 с). На основе матрицы Евклидовых расстояний построена дендрограмма, а значение Fst рассчитывали посредством анализа главных координат в программе NTSYSpc (Rohlf, 2018). Для подсчёта статистических данных применялась программа PopGene версия 4.7 (Raymond, Rousset, 1995; Rousset, 2008).

Таблица 1

Гербарные образцы, взятые для молекулярно-генетического анализа

№	Вид	Места сбора образцов
1	<i>Agrimonia pilosa</i> Ledeb.	Россия, Алтайский край, Курьинский р-н, окр. с. Бугрышиха.
2	<i>Cotoneaster melanocarpus</i> G. Lodd.	Россия, Алтайский край, Курьинский р-н.
3	<i>Filipendula vulgaris</i> Moench	Россия, Алтайский край, Курьинский р-н, долина р. Белая в 3 км выше с. Бугрышиха, левый берег, пойма.
4	<i>Fragaria viridis</i> Weston	Алтайский край, Ребрихинский р-н, трасса А321, между пос. Подстепное и пос. Кадникова.
5	<i>Geum urbanum</i> L.	Россия, Алтайский край, Курьинский р-н, долина р. Белая в 3 км выше с. Бугрышиха, левый берег, пойма.
6	<i>Geum virale</i> L.	Россия, Алтайский край, Курьинский р-н, долина р. Белая в 3 км выше с. Бугрышиха, левый берег, пойма.
7	<i>Potentilla argentea</i> L.	Алтайский край, Романовский р-н, вост. побережье оз. Горькое.
8	<i>Potentilla canescens</i> Besser	Алтайский край, Ребрихинский р-н, трасса А321, между пос. Подстепное и пос. Кадникова.
9	<i>Poterium lasiocarpum</i> Boiss. et Hausskn. ( <i>Sanguisorba minor</i> ssp. <i>lasiocarpa</i> (Boiss. et Hausskn.) Nordborg)	Казахстан, Южно-Казахстанская область, село Бостандык, травянистый склон по берегу реки.
10	<i>Poterium polygamum</i> Waldst. et Kit. (10 образцов)	Дагестан. Окр. г. Махачкала, гора Тарки-Тау, вост. склон с кустарником, 200 м над ур. м./
11	<i>Rosa majalis</i> Herrm.	Алтайский край, Ребрихинский р-н, трасса А321, между пос. Подстепное и пос. Кадникова.

Таблица 1 (продолжение)

12	<i>Sanguisorba alpina</i> Bunge (10 образцов)	Россия, Республика Алтай, Семинский перевал.
13	<i>Sanguisorba azovtsevii</i> Pshenich. et Krasnob. (10 образцов)	Россия, Республика Алтай, Семинский перевал.
14	<i>Sanguisorba baicalensis</i> Poplawska	Россия, Забайкальская область, Баргузинск, у. Песчаная дюны у берега Байкал, близ устьев р.Турки.
15	<i>Sanguisorba canadensis</i> L.	Япония, Хоккайдо, Куширо-ши.
16	<i>Sanguisorba minor</i> Scop.	Россия, Северное предгорье Алайского хребта, Кишпак Туран, по руслу Сая.
17	<i>Sanguisorba officinalis</i> L. (10 образцов)	Россия, Республика Алтай, Семинский перевал.
18	<i>Sanguisorba officinalis</i> var. <i>glandulosa</i> (Kom.) Worosch.	Монголия, г. Богдо-ула, дл. р. Урги, вершина горы
19	<i>Sanguisorba officinalis</i> var. <i>polygama</i> F. Nyl.	Россия, Якутия, низовья р. Лены, окр. пос. Чай-Тумус.
20	<i>Sanguisorba parviflora</i> (Maxim.) Takeda	КНР, провинция Хэйгунцзян, верхнее течение, близко с. Малуньчань, березово-лиственно-сосновый лес с дубом.
21	<i>Sanguisorba tenuifolia</i> Fisch. var. <i>alba</i> Trautv. et Mey	Япония, Хоккайдо, Куширо-ши.
22	<i>Spiraea hypericifolia</i> L.	Россия, Алтайский край, Курьинский р-н, окр. с. Бутрышиха.
23	<i>Spiraeae trilobata</i> L.	Россия, Алтайский край, Курьинский р-н, окр. с. Бутрышиха.

Для дизайна праймеров использовались полногеномные хлоропластные последовательности 3 видов: *Sanguisorba officinalis*, *S. filiformis*, *S. stipulata* (Xiang-Xiao et al., 2018). Выравнивание и анализ последовательностей производились в программе MEGA X (Kumar et al., 2018). Первоначально были выделены области делеций, потенциально пригодных для видовой идентификации. Прямые и обратные праймеры были сконструированы с использованием программного обеспечения Primer3 (Koressaar et al., 2018) и PrimerBlast (Ye et al., 2012). Выбирались локусы, которые не входят в область кодирующих участков генов. Всего было синтезировано 24 праймера, среди которых были отобраны 7 пар праймеров, дающих стабильно амплифицированные фрагменты путём постановки пробных амплификаций. Локализация амплифицированных областей и структура праймеров представлена на примере последовательности K10M200901001889 *Sanguisorba stipulata* (Xiang-Xiao et al., 2018) (рис. 1–7).

### Результаты и их обсуждение

Разработанные пары праймеров были протестированы на некоторых представителях семейства розоцветные (табл. 2). Наиболее информативными оказались участки, амплифицированные с парами праймеров Sang1 и Sang4, которые потенциально могут быть использова-

ны для ДНК-баркодинга родов семейства розоцветные, т. к. длины ампликонов отличаются на 5 и более нуклеотидных пар. Здесь следует заметить, что по результатам амплификации с некоторыми праймерами различаются и виды, следовательно, эти праймеры могут быть применимы и внутри родов. Однако остальные пары праймеров не показали значительного полиморфизма длин ампликонов между родами и не могут быть применимы для видовой идентификации.

Далее все 7 пар праймеров были протестированы на 8 видах и двух разновидностях рода *Sanguisorba* (табл. 3). Получены результаты размеров аллелей по 7 праймерам 12 таксонов рода *Sanguisorba*. Наиболее консервативные регионы относятся к четырем парам праймеров Sang1, Sang2, Sang3 и Sang7. Они не подходят для идентификации видов рода *Sanguisorba*, т. к. колебание размеров длин амплифицированных участков находятся в пределах ошибки метода  $\pm 3$  пары нуклеотидов. В качестве праймеров для видовой идентификации возможно использование Sang5 и Sang6, которые стабильно показывали разные длины для всех 12 видов и могут быть использованы для уточнения видовой принадлежности образца. Пара праймеров Sang4 не показала результатов в отношении нескольких таксонов, таких как *S. tenuifolia*, *S. officinalis* var. *glandulosa*, *S. canadensis*. Возможно, у них отсутствует данный регион хлоропластной последовательности.

Таблица 2

Размер аллелей представителей семейства Rosaceae по 7 локусам, пар нуклеотидов

№	Пара праймеров	Вид	Sang1	Sang2	Sang3	Sang4	Sang5	Sang6	Sang7
1	<i>Agrimonia pilosa</i> Ledeb.		190	224	179	849	354	468	233
2	<i>Cotoneaster melanocarpus</i> G. Lodd.		197	239	185	1039	366	453	231
3	<i>Filipendula vulgaris</i> Moench		195	212	150	777	350	481	230
4	<i>Fragaria viridis</i> Weston		180	323	183	560	345	477	221
5	<i>Geum urbanum</i> L.		186	212	153	261	354	478	235
6	<i>Geum virale</i> L.		198	212	153	256	354	480	235
7	<i>Potentilla argentea</i> L.		127	203	158	911	367	474	235
8	<i>Potentilla canescens</i> Besser		125	203	151	926	369	474	230
9	<i>Rosa majalis</i> Herrm.		191	238	183	708	340	477	231
10	<i>Spiraea hypericifolia</i> L.		207	212	154	567	354	480	231
11	<i>Spiraea trilobata</i> L.		169	223	148	594	352	474	232

Таблица 3

Размер аллелей видов *Sanguisorba* по 7 локусам, пар нуклеотидов

№	Пара праймеров	Вид	Sang1	Sang2	Sang3	Sang4	Sang5	Sang6	Sang7
1	<i>Sanguisorba officinalis</i> var. <i>polygama</i> F. Nyl.		263	213	171	733	381	539	234
2	<i>Sanguisorba minor</i> Scop.		261	222	170	673	361	472	222
3	<i>Sanguisorba baicalensis</i> Poplawska		261	212	169	749	400	539	232
4	<i>Sanguisorba tenuifolia</i> Fisch. ex Link		263	211	169	–	378	526	232
5	<i>Sanguisorba officinalis</i> var. <i>glandulosa</i> (Kom.) Worosch.		265	211	169	–	384	534	232
6	<i>Sanguisorba parviflora</i> (Maxim.) Takeda		263	211	170	716	397	536	231
7	<i>Sanguisorba canadensis</i> L.		263	213	178	–	378	552	322
8	<i>Sanguisorba azovtsevii</i> Pshenich. et Krasnob. (10 образцов)		263	218	169	665	370	531	232
			261	220		663	368	527	230
			259	216		668		534	231
						647		536	
						654		529	
						664			
9	<i>Sanguisorba officinalis</i> L. (10 образцов)		253	211	169	714	397	525	230
			264	213	171	717	394	538	232
						730	392	542	229
						744		522	
						728			
						723			
10	<i>Sanguisorba alpina</i> Bunge (10 образцов)		262	216	168	646	368	523	228
			261	218	170	635	371	526	232
			264			638		531	230
						662		534	
11	<i>Poterium lasiocarpum</i> (Boiss. et Hausskn.)		261	221	169	643	359	475	223
12	<i>Poterium polygamum</i> Waldst. et Kit. (10 образцов)		282	222	169	629	399	477	222
			275	220	171	620	358	474	231
			279	224		627	356	472	224
			280			621		469	
						616			
						625			



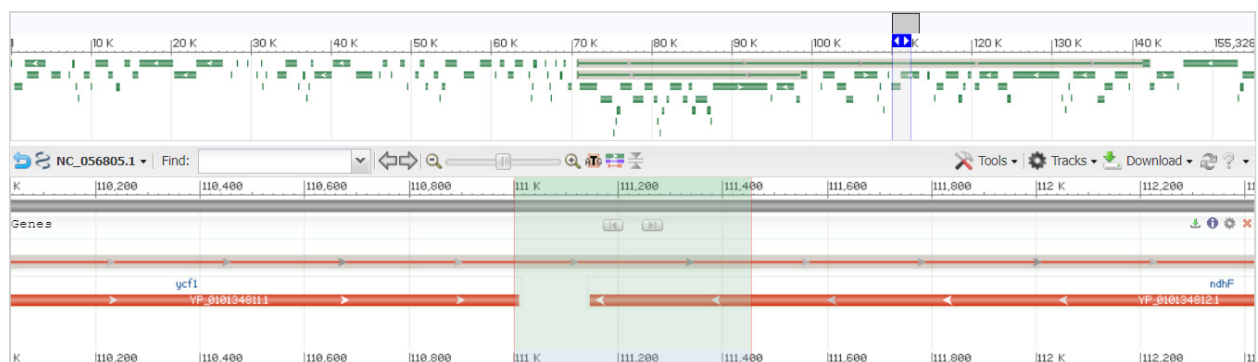


Рис. 1. Расположение амплифицированной области с использованием праймеров: Sang1F AGATCTCTCCGATTTGAAAA, Sang1R AGGGGGCGGTCTGAATTT.

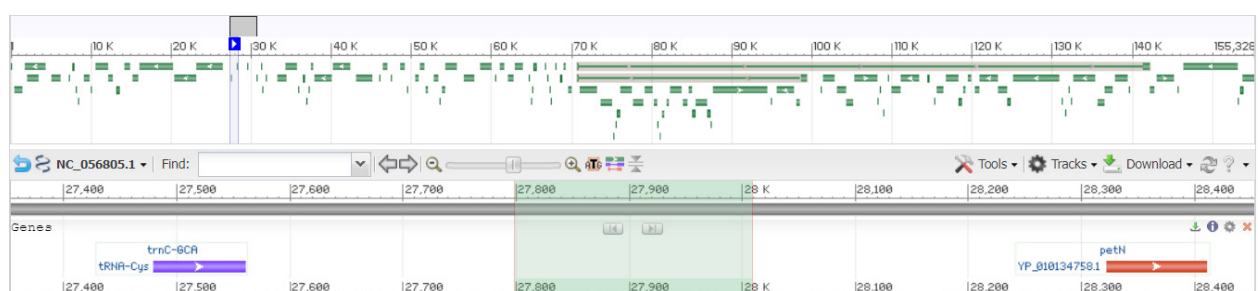


Рис. 2. Расположение амплифицированной области с использованием праймеров: Sang2F CGTCTTGAGTACTCCGGCA, Sang2R TAGATCACTACCCGGCCAT.

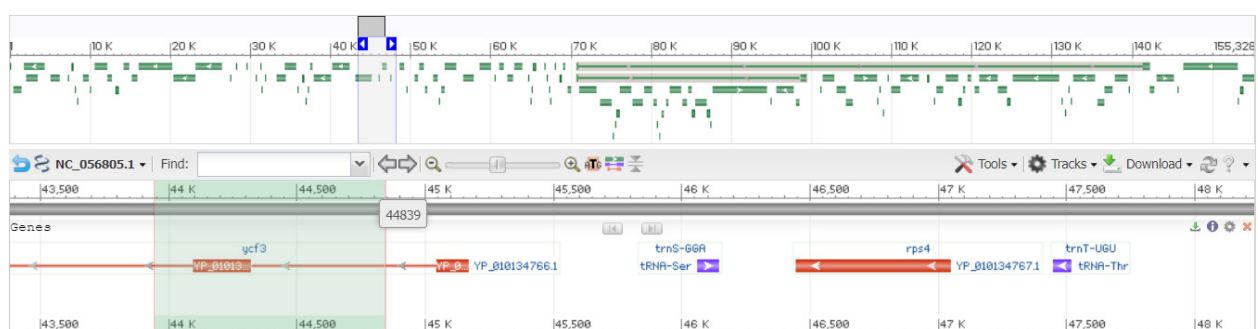


Рис. 3. Расположение амплифицированной области с использованием праймеров: Sang3F CCTTGCTACAGCTGATAAAAATCGT, Sang3R GGCCGTGATCTGTTCATTACG.

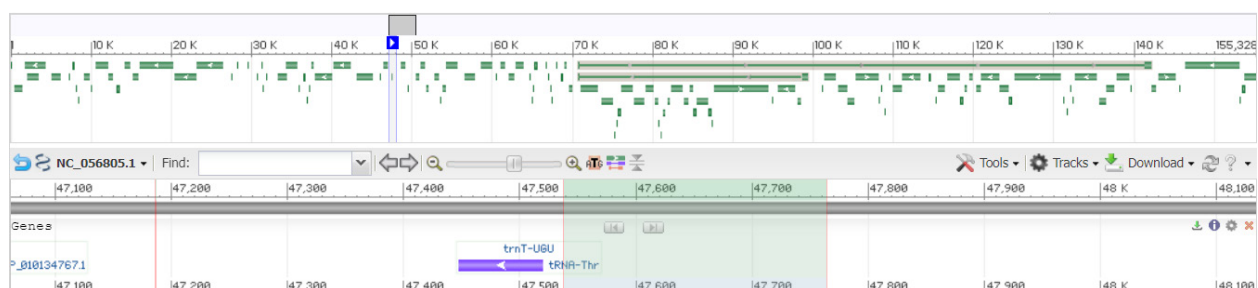


Рис. 4. Расположение амплифицированной области с использованием праймеров: Sang4F ACAAATGCGAT-GCTCTAACCT, Sang4R TGACCTGGATTGCACTTTTCTC.

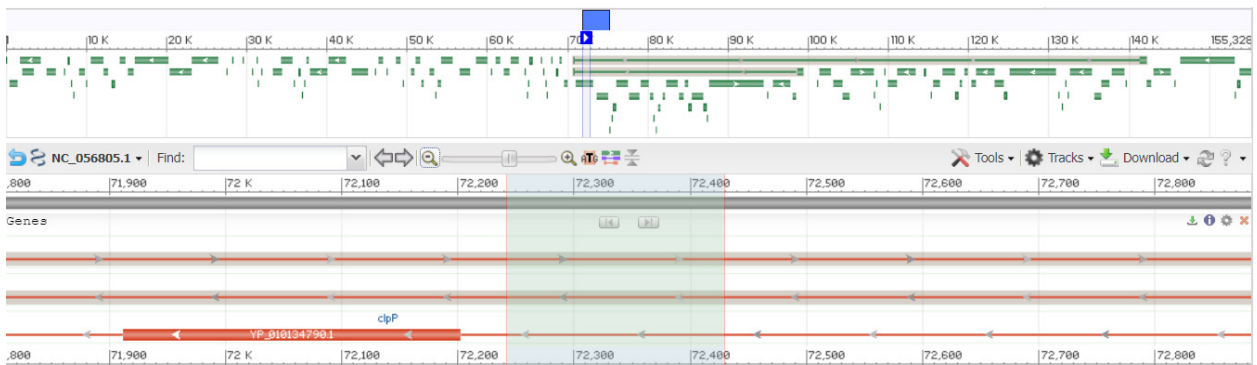


Рис. 5. Расположение амплифицированной области с использованием праймеров: Sang5F CCCTTCGAAACCGTACATGC, Sang5R ATCGGGCGGATCTTTACTCG.

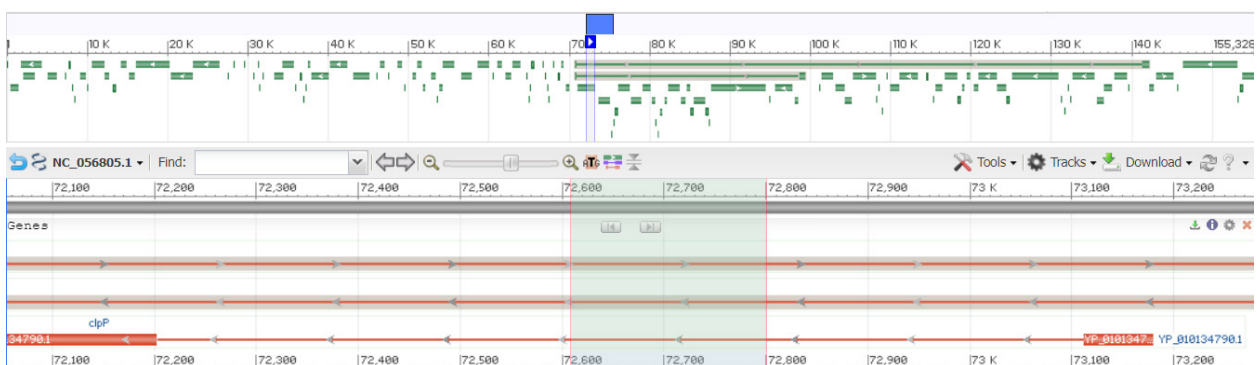


Рис. 6. Расположение амплифицированной области с использованием праймеров: Sang6F CTCGAGTAAAGATCCGCCC, Sang6R GGCATACGGTATTTCCCCGT.

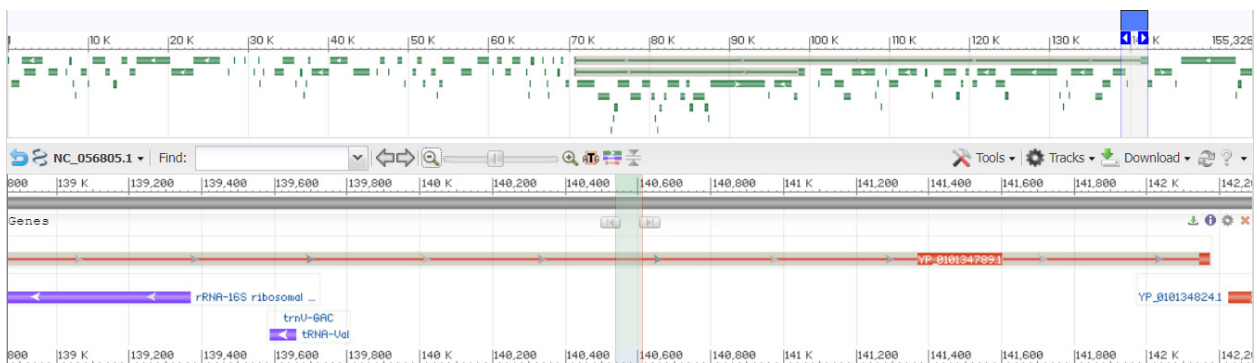


Рис. 7. Расположение амплифицированной области с использованием праймеров: Sang7F GCCAACAGTTCATCACGGAA, Sang7R CTTCGTGCTTTGGTGGGTC.

Кроме того, праймеры протестированы на популяциях трёх видов *Sanguisorba* (*S. azotvsevi*, *S. alpina* и *S. officinalis*) и одной популяции *Poterium polygatum* по 10 образцов в каждой для выявления внутривидового полиморфизма. Длины амплифицированных фрагментов указаны в таблице 3. На основе полученных длин ампликонов методом объединения соседних пар или ближайшего связывания Neighbor-Joining (NJ) была построена дендрограмма с использо-

ванием коэффициента DIST – среднее таксономическое расстояние (рис. 8). Вид *Agrimonia pilosa* Ledeb. выбран в качестве внешней группы.

Согласно дендрограмме, *Poterium* и *Sanguisorba* филогенетически разошлись давно и развивались самостоятельно. Вид *S. minor* стабильно уходит в кладу *Poterium*, возможно, его стоит рассматривать в системе рода *Poterium*. *S. minor* морфологически схож с видами рода *Poterium* округлыми листочками с зубчатыми кра-

ями и формой соцветия. Цветки собраны в головчатые соцветия шаровидно-овальной формы с длинными цветоносами, чашелистики окрашены в красновато-коричневый цвет.

Следует отметить и расположение вида *S. canadensis* на дендрограмме, чей ареал распространения захватывает области Северной Америки, Японии и Китая.

В одну кладу объединяются виды *S. baicalensis* (является синонимом вида *S. officinalis* (Govaerts, 2021)) и *S. parviflora*, которые сильно отличаются по морфологическим признакам (цвет и длина соцветия), однако по генетическим данным являются близкими видами, так что здесь нельзя исключать гибридизационные процессы.

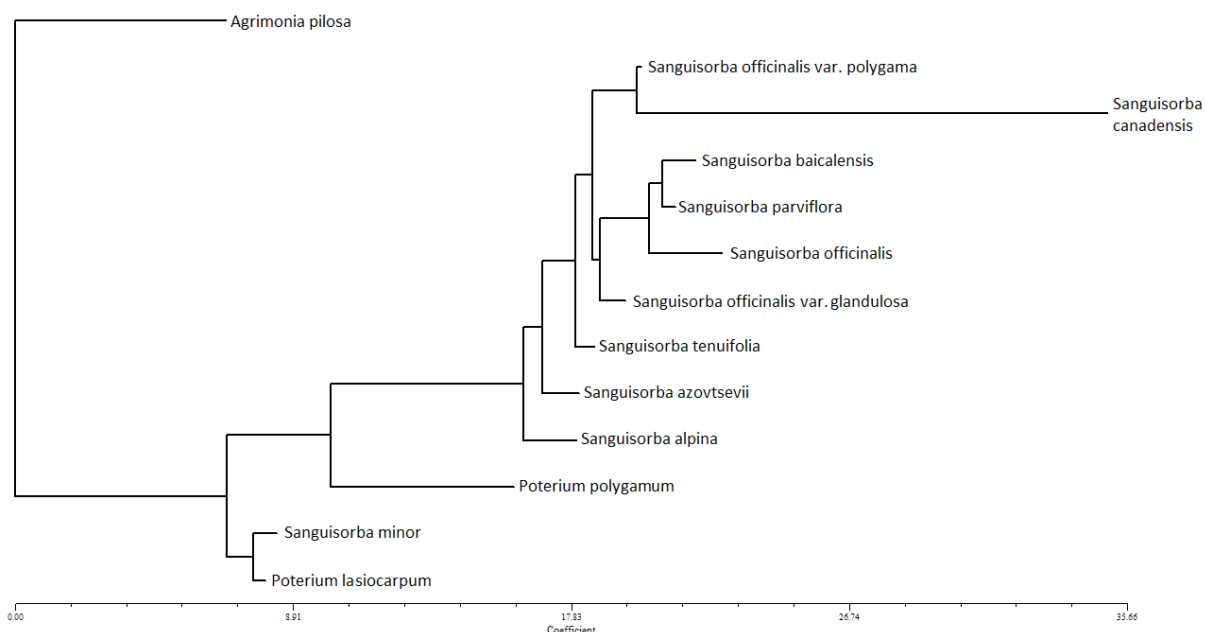


Рис. 8. Консенсусная дендрограмма NJ, построенная по 7 локусам с помощью программы NTSYSpc.

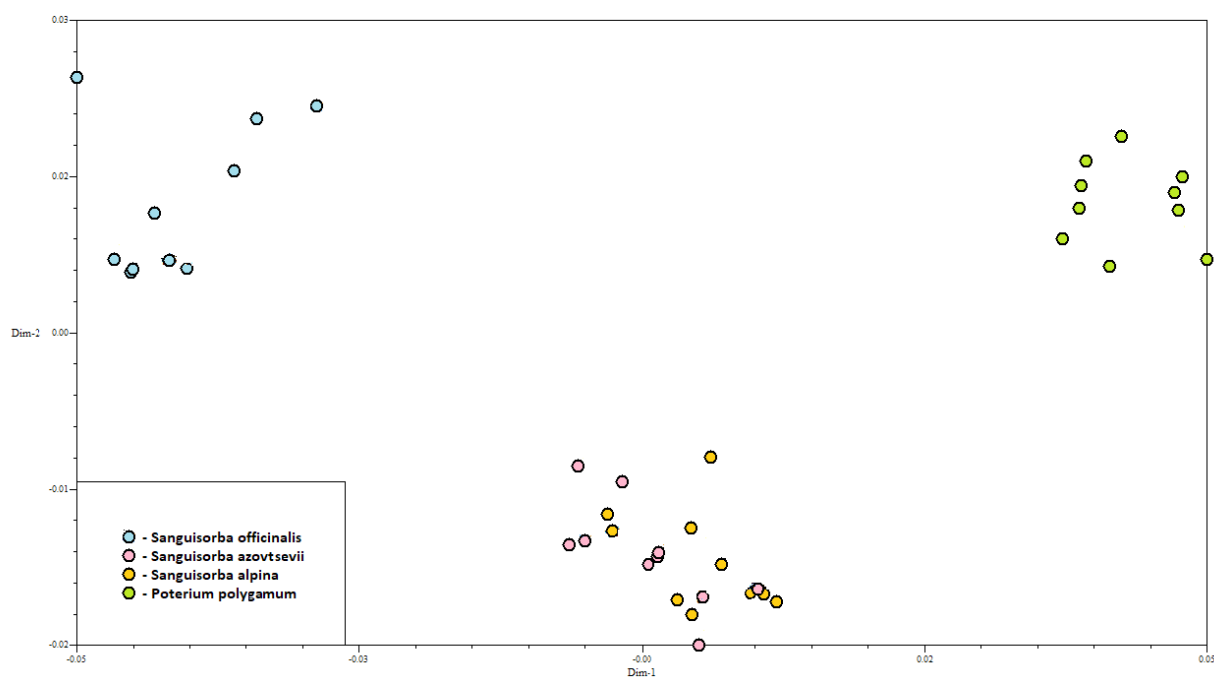


Рис. 9. Кластеризация 4 популяций на основе анализа двумерной матрицы признаков с помощью программы NTSYSpc.



Виды *S. officinalis*, *S. alpina* и *S. azovtsevii* были собраны на территории Семинского перевала, где были выявлены процессы гибридизации и описан новый эндемичный вид (Pshenichnaja, Krasnoborov, 1986). Ранее на основании RAF-анализа было высказано предположение касательно гибридного происхождения вида *S. azovtsevii* и представлен анализ родительских видов с Семинского перевала (Kutsev et al., 2013). Однако в данном исследовании не указывалось, какой именно вид является материнским. Поэтому вместе с построением филогенетического дерева была проведена оценка относительных эволюционных расстояний между представителями 4 видов.

Методом главных компонент в программе NTSYSpc на основе анализа двумерной матрицы признаков выявлена кластеризация 4 видов *Sanguisorba* (Smouse, 1986), при этом все образцы *S. officinalis* образуют общую группу, а *S. alpina* и *S. azovtsevii* – отдельный кластер, что указывает на наследование хлоропластной ДНК (рис. 9). На филогенетическом дереве *S. azovtsevii* и *S. alpina* относятся к общей кладе, что также подтверждает их генетическое родство.

Максимальные показатели внутривидового генетического разнообразия отмечены для популяции *Poterium* ( $P = 85,50\%$ ;  $H_e = 0,3522$ ;  $H_o = 0,5589$ ), *S. azovtsevii* ( $P = 87,50\%$ ;  $H_e = 0,4625$ ;  $H_o = 0,5399$ ), *S. officinalis* ( $P = 86,88\%$ ;  $H_e = 0,3663$ ;  $H_o = 0,5408$ ), *S. alpina* ( $P = 86,30\%$ ;  $H_e = 0,4522$ ;  $H_o = 0,5376$ ). Многолокусная оценка эффективности числа мигрантов (NM) составляет 0,424 при  $N = 10$ ; 0,255 при  $N = 25$ ; 0,190 при  $N = 50$  (Slatkin, 1985). Согласно D. L. Hartl и A. G. Clark (2007), значения  $F_{st}$  менее 0,05 свидетельствуют о незначительной, 0,05–0,15 – об умеренной,

0,15–0,25 – о значительной генетической дифференциации. В данном исследовании среднее значение показателей находилось в диапазоне  $F_{st} = 0,1392$ . Таким образом, результаты анализа показали невысокий уровень внутривидового полиморфизма.

### Заключение

Таким образом, разработаны новые праймеры, которые эффективны для идентификации родов из семейства Rosaceae, в особенности пары праймеров Sang1 и Sang4. Кроме того, полученные праймеры наиболее эффективны для ДНК-идентификации видов из рода *Sanguisorba* и применимы для изучения их популяционных характеристик.

С помощью полиморфизма длин амплифицированных фрагментов построена дендрограмма, отображающая филогенетические связи между видами рода *Sanguisorba* на территории Евразийского континента. Найдены новые доказательства гибридного происхождения вида *S. azovtsevii*. Представлен анализ генетической идентичности и генетических дистанций между видами, который выявил наследование хпДНК *S. azovtsevii* по материнской линии от *S. alpina*.

### Благодарности

Исследование выполнено в рамках реализации Программы развития университета на 2021–2030 гг. в рамках реализации программы стратегического академического лидерства «Приоритет 2030», проект «Изучение биохимических, морфологических и молекулярно-генетических аспектов рода *Sanguisorba* на территории России».

### REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

- Agarwal M., Shrivastava N., Padh H. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep.* 27: 617–631.
- Casper B., Jackson R. 1997. Plant competition underground. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28: 545–570.
- Freitas A., da Anunciacao R., D' Oliveira-Matielo C., Stefenon V. 2018. Chloroplast DNA: A promising source of information for plant phylogeny and traceability. *J. Mol. Biol. Methods* 1, 1. DOI: 10.1007/978-1-4615-3276-7
- Govaerts R., Nic Lughadha E., Black N., Turner R., Paton A. 2021. The world checklist of vascular plants, a continuously updated resource for exploring global plant diversity. *Scientific Data* 8: 215. DOI: 10.1038/s41597-021-00997-6
- Guo D., Chen J., Tan L., Jin M., Ju F., Cao Z. 2019. Terpene glycosides from *Sanguisorba officinalis* and their anti-inflammatory effects. *Molecules* 24: 2906. DOI: 10.3390/molecules24162906
- Hartl D., Clark A. 2007. Principles of population genetics. *Sinauer Associates*: 37–63.
- Hebert P., Cywinska A., Ball S., Waard J. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270: 313–321.

- Hong S., Cheon K., Yoo K., Lee H., Cho K., Suh J., Kim S., Nam, J., Sohn H., Kim Y.** 2017. Complete chloroplast genome sequences and comparative analysis of *Chenopodium quinoa* and *C. album*. *Front. Plant Sci.* 8: 1696.
- Im S., Wang Z., Lim S., Lee O., Kang I.** 2017. Bioactivity-guided isolation and identification of anti-adipogenic compounds from *Sanguisorba officinalis*. *Pharm. Biol.* 55: 2057–2064. DOI: 10.1080/13880209.2017.1357736
- Inkyu P., Junho S., Sungyu Y., Goya C., Byeongcheol M.** 2021. A comprehensive study of the genus *Sanguisorba* (Rosaceae) based on the floral micromorphology, palynology, and plastome analysis. *Genes* 12: 1764. DOI: 10.3390/genes12111764
- Jang E., Kim S., Lee N., Kim H., Chae S., Han C.** 2018. *Sanguisorba officinalis* extract, ziyuglycoside I and II exhibit antiviral effects against hepatitis B virus. *Eur. J. Integr. Med.* 20: 165–172. DOI: 10.1016/j.eujim.2018.05.009
- Ji H., Ahn K., Cho H., Kim H., Kim Y., Kim O.** 2018. *Sanguisorba officinalis* L. extracts activate wnt/ $\beta$ -catenin pathway, and subsequently control adipo-osteogenic differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 504: 352–358. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.08.196
- Jung D., Lee O., Kang I.** 2016. *Sanguisorba officinalis* L. extracts exert antiobesity effects in 3t3-L1 adipocytes and c57bl/6j mice fed high-fat diets. *J. Med. Food* 19: 768–779. DOI: 10.1089/jmf.2016.3704
- Kim H., Jang E., Kim S., Choi, J., Lee N., Kim D.** 2018. Preclinical evaluation of *in vitro* and *in vivo* antiviral activities of kct-01, a new herbal formula against hepatitis b virus. evidence-based complement. *Altern. Med.* 2018: 1–9. DOI: 10.1155/2018/10735092018
- King R., Read D., Traugott M., Symondson W.** 2008. Molecular analysis of predation: a review of best practice for DNA-based approaches. *Molecular Ecology* 17: 947–963.
- Koressaar T., Lepamets M., Kaplinski L., Raime K., Andreson R., Remm M.** 2018. Primer3\_masker: integrating masking of template sequence with primer design software. *Bioinformatics* 34: 1937–1938.
- Kuang H., Li H., Wang Q., Yang B., Wang Z., Xia Y.** 2011. Triterpenoids from the roots of *Sanguisorba tenuifolia* var. *alba*. *Molecules* 16: 4642–4651. DOI: 10.3390/molecules16064642
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K.** 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35(6): 1547–1549.
- Kutsev M., Sinitsyna T., Kondo K.** 2013. Genetic diversity between three species of *Sanguisorba* L. from West Siberia based on Randomly Amplified DNA Fingerprints. *Turczaninowia* 16, 2: 134–136. [In Russian] (Жуцев М. Г., Синицына Т. А., Кондо К. Генетические различия между тремя видами *Sanguisorba* L. из Западной Сибири на основе на основе метода случайно амплифицированных фрагментов ДНК (RAF) // Turczaninowia, 2013. Т. 16, № 2. С. 134–137).
- Lee S., Heo Ki., Cho J., Lee C., Chen W., Kim S.** 2011. New insights into pollen morphology and its implications in the phylogeny of *Sanguisorba* L. (Rosaceae; Sanguisorbeae). *Plant Syst. Evol.* 291: 227–242. DOI: 10.1007/s00606-010-0384-0.
- Leister D., Pesaresi P.** 2018. The genomic era of chloroplast research. *Ann. Plant Rev.* 13: 1–29. DOI: 10.1002/9781119312994.apr0121
- Lenzi A., Orlandini A., Bulgari R., Ferrante A., Bruschi P.** 2019. Antioxidant and mineral composition of three wild leafy species: a comparison between microgreens and baby greens. *Foods* 8: 487. DOI: 10.3390/foods8100487
- Li C., Ikeda H., Ohba H.** 2003. *Sanguisorba* L. In: Z. Y. Wu, P. H. Rawen, D. Y. Hong (eds.). *Flora of China*. Vol. 9. Beijing: Science Press; St. Louis: Missouri Botanical Garden Press. Pp. 384–387.
- Linder C., Moore L., Jackson R.** 2000. A universal molecular method for identifying underground plant parts to species. *Molecular Ecology* 9: 1549–1559.
- Linnaeus C.** 1753. *Species plantarum*. Tomus 1: 116.
- Liu M., Liao M., Dai C., Chen J., Yang C.** 2016. *Sanguisorba officinalis* L. synergistically enhanced 5-fluorouracil cytotoxicity in colorectal cancer cells by promoting a reactive oxygen species-mediated, mitochondria-caspase-dependent apoptotic pathway. *Sci. Rep.* 6: 34245. DOI: 10.1038/srep34245
- Mader M., Pakull B., Blanc-Jolivet C., Paulini-Drewes M., Bouda Z., Degen B., Small I., Kersten B.** 2018. Complete chloroplast genome sequences of four meliaceae species and comparative analyses. *Int. J. Mol. Sci.* 19: 701.
- Meng X., Tang G., Liu P., Zhao C., Liu Q., Li H.** 2020. Antioxidant activity and hepatoprotective effect of 10 medicinal herbs on ccl4-induced liver injury in mice. *World J. Gastroenterol.* 26: 5629–5645. DOI: 10.3748/wjg.v26.i37.5629
- Morgan D., Soltis D., Robertson K.** 1994. Systematic and evolutionary implications of *rbcl* sequence variation in Rosaceae. *Am. J. Bot.* 81: 890–903.
- Nam S., Lkhagvasuren K., Seo H., Kim J.** 2017. Antiangiogenic effects of ziyuglycoside ii a major active compound of *Sanguisorba officinalis* L. *Phytother Res.* 31: 1449–1456. DOI: 10.1002/ptr.5874
- Potter D., Eriksson T., Evans R., Oh S., Smedmark J., Morgan D., Kerr M., Robertson K., Arsenault M., Dickinson T., Campbell C.** 2007. Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant Syst. Evol.* 266: 5–43. DOI: 10.1007/s00606-007-0539-9
- Pschenichnaja I. N., Krasnoborov I. M.** 1986. A new species of the genus *Sanguisorba* (Rosaceae) from Seminskij pass (Altai). *Izv. Sibir. otdel. Akad. nauk. Ser. Biol. Nauk* 18: 3–5. [In Russian] (Пшеничная И. Н., Красноборов

**И. М.** Новый вид рода *Sanguisorba* (Rosaceae) с Семинского перевала (Алтай) // Изв. Сиб. отдел. Акад. наук. Сер. Биол. наук, 1986. № 18. С. 3-5).

**Raymond M., Rousset F.** 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenism. *J. Heredity* 86: 248–249.

**Rohlf F.** 2018. NTSYSpc: Numerical Taxonomy System, ver. 2.21r. *Applied Biostatistics*: 16–39.

**Romojaro A., Botella M., Obon C., Pretel M.** 2013. Nutritional and antioxidant properties of wild edible plants and their use as potential ingredients in the modern diet. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 64: 944–952. DOI: 10.3109/09637486.2013.821695

**Rousset F.** 2008. Genepop'007: a complete reimplement of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resources* 8: 103–106. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x

**Schulze-Menz G.** 1964. Rosaceae. In: H. Melchior (ed.). *Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien II*. 12th ed. Berlin: Gebrüder Borntraeger. Pp. 209–218.

**Slatkin M.** 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236: 787–792. DOI: 10.1126/science.3576198

**Smouse P., Long G., Sokal R.** 1986. Multiple regression and correlation extensions of the mantel test of matrix correspondence. *Syst. Zool.* 35: 627–632.

**Son D., Hwang S., Kim M., Park U., Kim B.** 2015. Anti-diabetic and hepato-renal protective effects of ziyuglycoside II methyl ester in type 2 diabetic mice. *Nutrients* 7: 5469–5483. DOI: 10.3390/nu7075232

**Su X., Ali I., Arooj M., Koh Y., Yang S., Kim Y.** 2018. Chemical constituents from *Sanguisorba officinalis* L. and their inhibitory effects on lps-stimulated pro-inflammatory cytokine production in bone marrow-derived dendritic cells. *Arch. Pharm. Res.* 41: 497–505. DOI: 10.1007/s12272-018-1035-1

**Su X., Guo R., Yang S., Kim Y., Kim Y.** 2019. Anti-bacterial effects of components from *Sanguisorba officinalis* L. on vibrio vulnificus and their soluble epoxide hydrolase inhibitory activity. *Nat. Prod. Res.* 33: 3445–3449. DOI: 10.1080/14786419.2018.1478825

**Taggart J., Cahill J., McNickle G., Hall J.** 2011. Molecular identification of roots from a grassland community using size differences in fluorescently labelled PCR amplicons of three cpDNA regions. *Molecular Ecology Resources* 11: 185–195.

**Takhtajan A.** 1997. *Diversity and classification flowering plants*. New York: Columbia University Press. 643 pp.

**Tan Y., Shudo T., Yoshida T., Sugiyama Y., Si J., Tsukano C.** 2019. Ellagic acid, extracted from *Sanguisorba officinalis*, induces G1 arrest by modulating PTEN activity in B16F10 melanoma cells. *Genes Cells* 24: 688–704. DOI: 10.1111/gtc.12719

**Valentini A., Pompanon F., Taberlet P.** 2009. DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology et Evolution* 24: 110–117.

**Wallinger C., Juen A., Staudacher K., Schallhart N., Mitterutzner E., Steiner E.** 2012. Rapid plant identification using species and group-specific primers targeting chloroplast DNA. *PLoS ONE* 7: e29473. DOI: 10.1371/journal.pone.0029473

**Xiang-Xiao M., Yan-Fang X., Li X., Dong Z., Yu-Hua S., Ming-Li W., Gang-Qiang D., Siu-Po I., Zhi-Xiu L., Lan W., Wei S.** 2018. Complete chloroplast genomes from *Sanguisorba*: Identity and variation among four species. *Molecules* 23: 2137. DOI: 10.3390/molecules23092137

**Yasueda A., Kayama H., Murohashi M., Nishimura J., Wakame K., Komatsu K.** 2020. *Sanguisorba officinalis* L. derived from herbal medicine prevents intestinal inflammation by inducing autophagy in macrophages. *Sci. Rep.* 10: 9972. DOI: 10.1038/s41598-020-65306-4

**Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T.** 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13: 134.

**Zhang L., Koyyalamudi S., Jeong S., Reddy N., Smith P., Ananthan R.** 2012. Antioxidant and immunomodulatory activities of polysaccharides from the roots of *Sanguisorba officinalis*. *Int. J. Biol. Macromol.* 51: 1057–1062. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2012.08.019

**Zhao Z., He X., Zhang Q., Wei X., Huang L., Fang J.** 2017. Traditional uses, chemical constituents and biological activities of plants from the genus *Sanguisorba* L. *Am. J. Chin. Med.* 45: 199–224. DOI: 10.1142/S0192415X17500136

**Zhu L., Chen L., Bai C., Wu A., Liang S., Huang F.** 2020. A rapid and sensitive UHPLC-MS/MS method for the determination of ziyuglycoside I and its application in a preliminary pharmacokinetic study in healthy and leukopenic rats. *Biomed. Pharmacother.* 123: 109. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109756