

УДК 577.21;615.322

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИЯ И ДНК-ФИНГЕРПРИНТИНГА ДЛЯ АНАЛИЗА КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

© 2019 г. Е. В. Жохова^{1,*}, А. В. Родионов^{2,3}, М. Н. Пovyдыш¹, М. Ю. Гончаров¹, Я. А. Протасова¹, Г. П. Яковлев¹

¹Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Россия

²Ботанический институт им. В.Л. Комарова, Санкт-Петербург, Россия

³Биологический факультет Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: elena.zhohova@pharminnotech.com

Поступила в редакцию 24.05.2018 г.

После доработки 20.06.2018 г.

Принята к публикации 12.07.2018 г.

Представлен обзор использования в мировой практике молекулярно-генетических методов (ДНК-штрихкодирования и ДНК-фингерпринтинга) для установления подлинности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов. Показано, что наиболее эффективным ДНК-штрихкодом для растительных объектов является ITS2. Данный маркер позволяет идентифицировать и сильно деградированную ДНК, что особенно актуально в случае фитопрепаратов и биологически активных добавок к пище. Основная проблема традиционного ДНК-штрихкодирования в фармакогнозии с использованием метода секвенирования по Сэнгеру – невозможность прочтения штрихкода без предварительного клонирования амплификата, если в растительной смеси присутствует большое число разнородных примесей и наполнителей растительного происхождения, из-за наложения нескольких или многих видоспецифичных хроматограмм друг на друга. По этой причине для ДНК-штрихкодирования растительных смесей наиболее предпочтительным является метод секвенирования ITS2-ампликонов с использованием технологии секвенирования нового поколения NGS. Этот метод позволяет работать с сильно деградированной ДНК в составе многокомпонентных растительных смесей и дает возможность определить видовую принадлежность всех ингредиентов многокомпонентных фитопрепаратов. Из методов ДНК-фингерпринтинга рассмотрены: RFLP, RFLP-PCR, RAPD, RAPD-SCAR, AFLP-PCR и ISSR.

Ключевые слова: ДНК-штрихкодирование, ДНК-фингерпринтинг, ДНК-штрихкод, ITS2, секвенирование по Сэнгеру, NGS, лекарственное растительное сырье, фитопрепарат

DOI: 10.1134/S0042132419010095

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время во всем мире возрастают масштабы использования лекарственных средств традиционной медицины, наблюдается настоящий бум в фитотерапии и индустрии биологически активных добавок (БАД). Растущая популярность фитопрепаратов приводит к повышенному спросу на лекарственное растительное сырье. В этих условиях надежная идентификация исходного сырья, его аутентичность и отсутствие чужеродных примесей являются непременными требованиями, закрепленными в законодательстве всех ведущих стран (Parveen et al., 2016; Barnes et al., 2016; Sammons et al., 2016; Teng et al., 2016; Job et al., 2016; Enioutina et al., 2017; Simmler et al., 2017).

Современный фармакогностический анализ включает несколько разных методов установления подлинности лекарственного растительного сырья. Там, где возможно, используются традиционные для ботаников методы идентификации растений по морфологии (образу) растений, по особенностям их пыльцы, возможна фитохимическая идентификация материала в образце с помощью методов аналитической химии, хроматографии и метаболомного анализа (Simmler et al., 2017). Следует, однако, отметить, что примеси и заменители лекарственного сырья часто трудно отличить от аутентичного материала по химическому составу, а использование морфолого-анатомических характеристик для определения видовой принадлежности растений зачастую за-

°	•	◦◦	◦◦◦	◦◦◦◦	◦◦◦◦◦	◦◦◦◦◦◦	128
256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768
65K	131K	262K	524K	1M	2M	4M	8M
16M	33M	67M	134M	268M	536M	1G	2G
4G	8G	17G	34G	68G	137G	274G	549G

Рис. 1. Полимеразная цепная реакция как эффективный способ получения препаративного количества ДНК для определения видовой принадлежности растительного материала в растительных смесях.

труднительно или вообще невозможно, когда приходится иметь дело с тонкоизмельченными порошками, а именно в таком виде поступают на рынок многие виды лекарственного сырья. Между тем, случаи фальсификации дорогостоящих компонентов и замены их на морфологически сходные, но более дешевые виды растительного сырья не редкость в фармацевтической практике.

Приведем конкретный недавний пример. В Великобритании популярны как антидепрессанты элеутерококк колючий *Eleutherococcus senticosus*, продающийся под наименованием “сибирский женьшень”, и золотой корень *Rhodiola rosea*. Проверка 25 коммерческих образцов сибирского женьшеня и 10 образцов золотого корня, поставленных из Китая, показала, что все образцы, продаваемые как сибирский женьшень, содержали растительный материал этого вида, но 9 образцов кроме того имели в своем составе материал других видов *Eleutherococcus*: *E. sessiliflorus*, *E. divaricatus* или *E. seoulensis*. Что касается родиолы розовой, то в пяти образцах содержалась только родиола розовая, в одном образце смесь состояла из *Rhodiola rosea* и других видов этого рода, в четырех образцах *R. rosea* не определялась, но выявлялась смесь других видов рода *Rhodiola* (Ruhsam, Hollingsworth, 2018). Типичный пример, характеризующий состояние проблемы на международном рынке лекарственного растительного сырья.

В описанном случае наличие или отсутствие контаминации в торговом образце устанавливали с помощью ДНК-баркодинга (ДНК-штрихкодирования). Это один из самых современных и эффективных методов определения подлинности

лекарственного растительного сырья (Повыдыш и др., 2007; Simmler et al., 2017).

Основу ДНК-баркодинга и всех иных эффективных современных молекулярно-генетических методов определения видовой принадлежности состава растительных смесей, применяемых для производства лекарств, составляет метод полимеразной цепной реакции PCR (polymerase chain reaction) (рис. 1). Специфика ДНК-баркодинга в фармакогнозии состоит в том, что заготовители растительного сырья, поставляющие его для фармацевтической индустрии, не имеют цели сохранить ДНК в образце для последующего анализа. Собранные ими растения через какое-то время после сбора подвергаются предварительной технологической обработке: высушиванию (иногда при высокой температуре), измельчению и т.д. На всех этапах материал подвергается повреждающим воздействиям, приводящим к деградации ДНК: УФ-излучение, свет, высокая температура, влажность, бактерии, грибы... Ненадлежащая технология сбора и хранения материала может стать причиной перекрестной контаминации другими образцами, что приводит к искажению результатов ДНК-тестирования. При производстве настоек и экстрактов используются методы, включающие, кроме термической обработки, фильтрацию, экстрактивную дистилляцию или сверхкритическую флюидную экстракцию, что может приводить к разрушению или полному удалению ДНК (Novak et al., 2007; Harnly et al., 2016). Кроме того, вторичные метаболиты растений: полисахариды, флавоноиды, полифенолы и терпеновые лактоны, могут препятствовать изоляции ДНК (Porebski et al., 1997; Barnwell et al., 1998; Khanuja et al., 1999; Sahu et al., 2012). И только благодаря PCR удается на основе немногих сохранившихся относительно коротких молекул ДНК амплифицировать и секвенировать или изучить с помощью иных методов, таких как AFLP, IRRS, SSR и др., маркерную ДНК, хранящую информацию о составе растительной смеси, поставленной на рынок.

МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА УСТАНОВЛЕНИИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ НУКЛЕОТИДОВ ПРИ СЕКВЕНИРОВАНИИ ПО СЭНГЕРУ И ПРИ СЕКВЕНИРОВАНИИ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

Стандартный ДНК-штрихкод для животных – 5'-фрагмент гена субъединицы 1 цитохром с оксидазы (CO1) – не может быть использован как штрихкод для растений из-за очень низкой изменчивости (Hollingsworth et al., 2011), не используется он и в работе по ДНК-штрихкодированию растительного сырья для фармакогнозии (De Vover et al., 2015; Parveen et al., 2016).

Рабочая группа по растениям консорциума “Штрихкод жизни” рекомендовала несколько маркерных участков, а именно: *matK*, *rbcL*, *psbA-trnH*, ITS (ITS2) (CBOL, 2009). Но проводимые в настоящее время исследования свидетельствуют о том, что ставить точку в процессе поиска адекватных ДНК-сегментов для ДНК-штрихкодирования растений еще рано. С этой целью молекулярные биологи используют несколько разных локусов или комбинаций локусов для идентификации растительных материалов.

В период с 2005 г. по 2017 г. включительно опубликовано около 150 статей, посвященных ДНК-штрихкодированию лекарственных растений. В этих работах было использовано 17 участков последовательности ДНК в качестве штрихкода – *matK*, *rbcL*, ITS (ITS1, ITS2), *psbA-trnH*, *atpF-atpH*, *ycf5*, *psbKI*, *psbM*, *trnD*, *rps16*, *coxI*, *nad1*, *trnL-F*, *rpoB*, *rpoC1*, *atpF-atpH*, *rps16* (Kress, Erickson, 2007; Chen et al., 2010; Pang et al., 2012; Gere et al., 2013; Techen et al., 2014; Bolson et al., 2015; Parveen et al., 2016; Raclariu et al., 2018). В частности, предложен (Newmaster et al., 2006) многоуровневый подход, который включает использование в качестве базового уровня легко усиливаемой и выровненной области *rbcL*, а на другом уровне – применение данных из сильно изменяющихся некодирующих областей, таких как ITS2 или область *psbA-trnH*. С использованием такого многоуровневого подхода примерно 75–80% тестируемых растений были штрихкодированы (Newmaster et al., 2006; Burgess et al., 2011). Было выполнено масштабное исследование по ДНК-штрихкодированию лекарственных растений (Chen et al., 2010). Для идентификации более 6600 образцов лекарственных растений и их близкородственных видов (материал: свежие листья) были оценены семь областей ДНК: *psbA-trnH*, *matK*, *rbcL*, *rpoC1*, *ycf5*, ITS (ITS1 и ITS2) и ITS2. Наибольшую эффективность показал участок ITS2, с его помощью было идентифицировано 92.7% исследуемых видов. Это позволило предложить ITS2 в качестве основного штрихкода для лекарственных растений (Chen et al., 2010). Вскоре 46 исследовательских лабораторий Китая в совместной работе еще раз протестировали разные варианты ДНК-штрихкодов растений. Ими были сопоставлены результаты по пяти основным кандидатам на роль ДНК-штрихкода растений – *rbcL*, *matK*, *psbA-trnH*, ITS1-5.8S рДНК-ITS2 и отдельно ITS2. Эти последовательности были секвенированы у 6286 образцов растений, относящихся к 1757 видам 75 разных семейств (China Plant BOL Group, 2011). Из работы следовало, что полноразмерный район ITS только незначительно уступает хлоропластному маркеру по успешности использования для амплификации с помощью универсальных праймеров (79% против 87–93%), но превосходит по возможности дискриминировать виды (у ITS по-

казатель силы дискриминации был самым высоким – 67.2%, у ITS2 – 54.6%, а у *rbcL* самым низким – 26.4%). Среди особенно подробно исследованных родов, из которых в анализ было взято не менее 50 видов, в роде *Primula* 88% видов различались по ITS и только 42.5% видов по *rbcL*. В тибетской и монгольской медицине используются 22 вида рода *Pedicularis* (Гаммерман, Семичов, 1963; Хайдав и др., 1985). Из этого рода по ITS различались 86% видов, по *rbcL* – 46%. 38 видов рода *Rhododendron* используются в традиционной медицине (Popescu, Корр, 2013). В нем 15% видов различались по последовательностям ITS, а по *rbcL* таких было 10% (China Plant BOL Group, 2011).

Дополнительные исследования по различным группам растений подтвердили эффективность ITS2 для идентификации лекарственных видов, они уверенно идентифицировали 24 вида растений из семейства Fabaceae, используемых в китайской медицине, и 66 других видов, которые встречаются как примеси в сборах лекарственных трав. При анализе 1507 последовательностей Fabaceae, имеющихся в Genbank и отнесенных к 1126 видам, подсчитано, что по последовательностям ITS2 различаются 80.0% всех видов и 100% родов, что, конечно, очень хороший показатель для штрихкодирования растений (Gao et al., 2010).

Затем с использованием двулокусного подхода – последовательности ITS2 и *psbA-trnH* – была создана (Chen, 2011) база данных “Traditional Chinese Medicine Database”, содержащая штрихкоды более чем 23000 видов лекарственных растений и известных примесей.

С успехом использован (Sun, Chen, 2013) штрихкод ITS2 для идентификации 19 видов лекарственного растительного сырья, относящихся к морфологической группе “кора” и включенных в Китайскую фармакопею. Локус ITS2 был рекомендован (Zhu et al., 2015) для идентификации корней *Glehniae* – маркер позволял отличить *Glehniae* от возможных примесей.

Проведен сравнительный анализ возможных кандидатов на роль ДНК-штрихкода для видов рода *Uncaria*. Сравнивали (Zhang et al., 2015) целесообразность использования в качестве растительных штрихкодов ITS, ITS2, *matK*, *rbcL*, *psbA-trnH* и показали наибольшую эффективность ITS2. Эти же маркеры были использованы для идентификации видов рода *Artemisia*, и получен аналогичный результат: в качестве штрихкода может быть использован ITS2 (Wang et al., 2016). ITS2 как потенциальный штрихкод использовался для разделения видов ревеня *Rheum officinale* Baill., *Rh. palmatum* L. и *Rh. tanguticum* (Maxim. ex Regel) Maxim. ex Balf., взятых из всего ареала произрастания, и его примесей (Zhou et al., 2017).

В Индии было проведено исследование по штрихкодированию популярного растения *Boer-*

havia diffusa (*Punarnava*), используемого в одном из направлений традиционной медицины Индии — Аюрведе — для лечения заболеваний печени. В качестве потенциальных штрихкодов были рассмотрены четыре области: ITS1-5.8S рДНК-ITS2, ITS1, ITS2, *psbA-trnH*. Полученные результаты показали, что ITS и ITS1 могут быть использованы в качестве потенциальных регионов-кандидатов для идентификации *Boerhavia diffusa* и для отличия данного вида от примесей (Selvaraj et al., 2012). Была создана справочная библиотека штрихкодов ДНК API-RDBL (Ayurvedic Pharmacopoeia of India — Reference DNA Barcode Library) с высококачественными и аутентичными штрихкодами *rbcL* для идентификации лекарственных растений, включенных в Аюрведическую фармакопею Индии (Vassou et al., 2016). Проверка лекарственного растительного сырья, представленного на рынках Индии, показала, что только 79% образцов сырья были достоверными, а остальные 21% — фальсифицированными. Кроме того, было установлено, что фальсификация была значительно выше, если сырье было порошкованным (около 25%), у морфологической группы “семена” фальсификация составила около 5% (Shanmughanandhan et al., 2016).

Основное преимущество ITS2 в качестве штрихкода для идентификации растительного материала в лекарственных смесях и в сырье для получения БАДов — его короткая длина, в среднем 200–230 п.н., так как в большинстве фитопрепаратов и сырье для БАДов ДНК сильно разрушена и представлена фрагментами длиной менее 500 п.н. По этой причине универсальные штрихкоды длиной от 600 до 800 п.н. для целей фармакогнозии и контроля качества сырья для БАДов не подходят (Costa et al., 2015).

Еще одним преимуществом ITS2 как последовательности-мишени для ДНК-штрихкодирования, является то, что праймеры, используемые для его амплификации и секвенирования, амплифицируют и район ITS2 геномов грибов-эндифитов и микоризных симбионтов (Rodriguez et al., 2009; Ivanova et al., 2016). ITS2 грибов имеет иные размеры, другую подвижность при электрофорезе, легко отделяется от фрагментов ITS2 растений, что позволяет выявлять загрязнение образца грибами даже лучше при последующем секвенировании образца по Сэнгеру, чем обнаруживать загрязнение другими видами растений, где иногда не обойтись без клонирования.

Особенность ITS2 и района ITS1-5.8S рДНК-ITS2, которая вызывает теоретическое затруднение, связана с тем, что в геноме растений, как правило, несколько тысяч копий этих последовательностей, причем располагаться они могут на нескольких разных хромосомах (Родионов и др., 2016). Пиросеквенирование показывает, что

в каждый момент в геноме многих видов присутствует в той или иной степени гетерогенный набор в разной степени схожих между собой генов 35S рРНК и, в частности, разных ITS (Song et al., 2012). При этом последовательности ITS каким-то образом гомогенизируются. Предполагается, что это происходит путем конверсии или, что более вероятно, благодаря механизму гомогенизации “рождение—и—смерть” (Eickbush, Eickbush, 2007). Гомогенизация последовательностей рДНК и, в частности ITS2, приводит к тому, что в большинстве случаев при секвенировании ITS-последовательностей по Сэнгеру на хроматограммах не видно сопоставимых по высоте двойных пиков, говорящих о внутригеномном полиморфизме (Родионов и др., 2016). Исключения бывают, например, пионы (Пунина и др., 2012), но редко. Таким образом, несмотря на множественность ITS-последовательностей, широкое распространение гибридизации и полиплоидии, благодаря механизмам гомогенизации, ITS-последовательности могут использоваться в качестве штрихкодов.

Секвенируя ITS-последовательности по Сэнгеру, мы видим только самые массовые, гомогенизированные последовательности (Sanger et al., 1977). Практика показывает, что филогенетические гипотезы, построенные на основании сравнения таких последовательностей, как правило, выглядят вполне правдоподобно с точки зрения классических систематиков при сравнении на межвидовом и межродовом уровнях или при изучении групп организмов, имеющих более высокие таксономические ранги (Шнеер, 2009; Hershkovitz, Zimmer, 1996; Song et al., 2012). Иными словами, по непонятным причинам, дивергенция последовательностей ITS1 и ITS2 у растений, несмотря на распространение межвидовой гибридизации и полиплоидии, идет так, что коррелирует с направлением и темпами морфологической дивергенции таксонов, а значит, ITS2 может использоваться как ДНК-штрихкод в фармакогнозии.

Поскольку, как сказано выше, ДНК в растительных смесях, используемых в медицине, часто представлена короткими фрагментами, недавно предложено использовать для идентификации растительных ингредиентов в сырье для производства БАДов и лекарственных растительных препаратов так называемые мини-штрихкоды. Мини-штрихкоды — это короткие (<200 п.н.) последовательности ДНК из определенных относительно изменчивых участков генов *matK* и *rbcL*. Успешное использование их показано при идентификации видов в растительных смесях, которые по технологии должны были содержать *Serenoa repens*, *Ginkgo biloba*, *Harpagophytum procumbens*, *H. zeyheri* и были представлены на фармацевтическом рынке Северной Америки (Little, Jeanson, 2013; Little, 2014; Parveen et al., 2016).

Преимущества мини-штрихкодов – это легкий поиск ДНК-маркеров даже из переработанных материалов из-за малой длины их ампликона, а также способность различать близкородственные виды из-за родо/видоспецифичности (Parveen et al., 2016).

Примеры использования ДНК-штрихкодирования для установления подлинности лекарственного растительного сырья представлены в таблице 1.

Основные техники штрихкодирования используют универсальные праймеры для быстрой идентификации видов растений (Kress et al., 2005; Lahaye et al., 2005; Burgess et al., 2011; Hollingsworth et al., 2011). Универсальные наборы праймеров, рекомендованные для штрихкодирования растений, выбирают для амплификации ДНК из четырех геномных областей, а именно: ITS (ITS2) – из ядерного генома и *matK*, *rbcL* и *psbA-trnH* – из хлоропластного генома (табл. 2).

Если фитопрепарат содержит несколько видов растений или, кроме лекарственного растительного сырья, одно или несколько вспомогательных веществ, то происходит совместная амплификация штрихкодирующих последовательностей из-за универсального характера используемых праймеров (Parveen et al., 2016). В случае если в смеси представлены близкие виды растений, это может приводить к получению множественных/перекрывающихся пиков при секвенировании, и, как следствие, последовательность ДНК-штрихкода у искомого компонента растительной смеси и последовательность ДНК загрязнителя не может быть определена. Плохое качество расшифровки последовательности ДНК может быть улучшено на этапах, предшествующих секвенированию, например, путем клонирования последовательностей из амплификата. Затем несколько (около 10 или более) клонов секвенируют для идентификации различных последовательностей ДНК (Aird et al., 2011).

Специфическая проблема ДНК-штрихкодирования в фармакогнозии и при контроле качества материалов для производства БАДов связана с веществами-наполнителями растительных смесей. Использование вспомогательных веществ, полученных из пшеницы, риса и сои в качестве основы широко распространено в производстве БАДов и в фармацевтической промышленности (Costa et al., 2015). Множественные нуклеотидные последовательности могут быть получены при секвенировании ДНК, выделенного из сырья для БАДов, если растительный продукт содержит более одного вида растительного сырья, что бывает достаточно часто. Как выход из данной ситуации был предложен и апробирован метод цифровой PCR (polymerase chain reaction, ПЦР, полимеразная цепная реакция). В данном методе образцы

выделенной ДНК разбавляют в соотношении от 1 : 5 до 1 : 50000 в подходящем буфере до такой степени, что имеется приблизительно одна молекула ДНК-матрицы на 1 мкл (Parveen et al., 2016).

Цель состоит в том, чтобы разбавить ДНК до такой степени, что несколько образцов содержат только молекулы малонасыщенной ДНК. Термин “малонасыщенная ДНК” относится к ДНК, которая получена из лекарственного растительного сырья, присутствующего совместно с большим количеством ДНК из вспомогательных веществ (например рисовой муки), либо к ДНК, полученной из небольших количеств примесного растительного материала. Проведение нескольких PCR с использованием единичных молекул ДНК в качестве матрицы, делает возможным амплификацию молекулы малонасыщенной ДНК и, следовательно, ее обнаружение. Данный метод был использован (Little, 2014) для идентификации *Ginkgo biloba* в БАДах.

Для преодоления ограничений секвенирования по методу Сэнгера для ДНК-штрихкодирования многокомпонентных образцов был использован метод высокопроизводительного секвенирования NGS (next generation sequencing) (Kircher, Kelso, 2010). Технология NGS позволяет проводить параллельное секвенирование нескольких фрагментов ДНК из различных участков ДНК в одной реакции (Kircher, Kelso, 2010). Данный метод дает возможность генерировать до миллиона последовательностей ДНК, которые имеют длину до 700 оснований в одном сеансе секвенирования, хотя базовая длина сильно варьирует в зависимости от используемой платформы/технологии NGS. Метод включает независимую амплификацию каждой индивидуальной последовательности в смеси, что исключает наложение пиков последовательностей, характерное для секвенирования по методу Сэнгера, и, следовательно, облегчает расшифровку ДНК-штрихкодов, что дает возможность определить подлинность ингредиентов многокомпонентных фитопрепаратов, анализируя штрихкоды (Ivanova et al., 2016; Sarwat, Yamdagni, 2016). Примеры использования NGS представлены в таблице 3.

Важным шагом в обеспечении надежности результатов любого аналитического метода является валидация. Соответственно, данная процедура должна быть разработана и для ДНК-штрихкодирования в фармакогнозии. Необходимо оценить степень вариации используемой последовательности (штрихкода) у лекарственного вида, а также возможность ее выявления в смеси. Так как метод ДНК-штрихкодирования должен давать возможность отличить официальные виды от примесей, а также выявить предел их обнаружения, то это подразумевает приготовление смесей идентифицируемого вида с известными количествами всех видов возможных примесей. Необхо-

Таблица 1. Использование метода ДНК-штрихкодирования для идентификации лекарственного растительного сырья

Лекарственное растение	Используемая часть	Медицинское применение	Примесь/маркерный участок	Автор исследования
<i>Sida cordifolia</i>	Трава, листья	Антиоксидантное, противодиабетическое, противодиабетическое средство	<i>Sida spinosa</i> , <i>S. alnifolia</i> , <i>S. scabrida</i> , <i>S. ravii</i> , <i>Abutilon</i> sp., <i>Ixonanthes</i> sp., <i>Terminalia</i> sp., <i>Fagonia</i> sp., <i>Tephrosia</i> sp./ <i>psbA-trnH</i> и <i>ITS2</i>	Vassou et al., 2015
Indirubin (<i>Isatis tinctoria</i> , <i>Polygonum tinctorium</i> , <i>Strobilanthes cusia</i>)	Листья	Лечение хронической миелоцитарной лейкемии	<i>Polygonum hydropiper</i> , <i>P. chinense</i> , <i>Clerodendrum cyrtophyllum</i> , <i>Indigofera tinctoria</i> , <i>S. dimorphotricha</i> , корни производящего растения/ <i>ITS2</i>	Hu et al., 2015
<i>Peucedanum praecurpatorium</i>	Трава	Отхаркивающее средство	<i>Anthriscus sylvestris</i> (L.) Hoffm./ <i>ITS</i>	Zhou et al., 2014
<i>Ginkgo biloba</i>	Листья	Лечение дегенеративных заболеваний мозга, деменции; средство для замедления развития болезней Паркинсона и Альцгеймера	Нет/ <i>matK</i>	Little, 2014
<i>Phoenix dactylifera</i>	Плоды	Антимутагенное и антиоксидантное средство	Нет/ <i>matK</i> и <i>rpoC1</i>	Enan, Ahamed, 2014
<i>Piper nigrum</i>	Плоды	Антибактериальное, антиоксидантное, противодиабетическое и антитоксическое средство	<i>Carica papaya</i> L./ <i>psbA-trnH</i> , <i>rbcL</i> , <i>rpoC1</i>	Parvathy et al., 2014
<i>Lonicera japonica</i>	Листья, цветки	Жаропонижающее, выводящее токсины, противодиабетическое средство	<i>L. japonica</i> var. <i>chinensis</i> , <i>L. similis</i> , <i>L. acuminata</i> / <i>psbA-trnH</i> и <i>ITS2</i>	Hou et al., 2013
<i>Gentiana scabra</i> , <i>G. triflora</i> , <i>G. manshurica</i> , <i>G. rigescens</i>	Листья, корни	Лечение болезней печени; защита печени от острого поражения при приеме парацетамола	<i>Gentiana rhodantha</i> и <i>Podophyllum hexandrum</i> / <i>matK</i> и <i>rbcL</i>	Wong et al., 2013
<i>Croton bonplandianum</i>	Семена	Лечение желтухи, асциты, внутренних абсцессов	Нет/ <i>matK</i>	Chandramohan et al., 2013
<i>Asparagus racemosus</i>	Корни	Лечение диспепсии; лактогонное, противодиарейное, антисептическое, мочегонное средство	<i>Asparagus gonoclados</i> Baker/ <i>ITS2</i>	Rai et al., 2012
<i>Scutellaria baicalensis</i>	Корни	Лечение гепатита, желтухи, диареи, воспалений	<i>S. amoena</i> , <i>S. rehderiana</i> , <i>S. viscidula</i> / <i>matK</i> , <i>rbcL</i> , <i>psbA-trnH</i>	Guo et al., 2011
<i>Ruta graveolens</i>	Листья, стебли, цветки	Регуляция фертильности; лечение менструальных, ушных и головных болей, носовых кровотечений; репеллент	<i>Euphorbia dracunculoides</i> Lam./ <i>ITS</i>	Al-Qurainy et al., 2011
<i>Taxillus chinensis</i>	Ветви, листья	Укрепление почек, сухожилий и костей; облегчение симптомов ревматизма; предотвращение выкидышей	<i>Thuja sutchuenensis</i> , <i>Scurrula parasitica</i> , <i>Scurrula parasitica</i> var. <i>graciliflora</i> / <i>psbA-trnH</i>	Li et al., 2010
<i>Cinnamomum osmophloeum</i>	Листья	Противодиабетическое, противодиабетическое, вяжущее и мочегонное средство	Нет/ <i>ITS2</i>	Lee et al., 2010

Таблица 2. Универсальные праймеры и условия ПЦР для геномных областей – кандидатов в шрихкоды

Маркер	Название праймера	Последовательность 5'-3'	Условия реакции ПЦР
ITS2	S2F S3R	ATGCGATACTTGGTGTGAAT GACGCTTCTCCAGACTACAAT	1) 94°C 5 мин; 2) 94°C 30 с, 56°C 30 с, 72°C 45 с, 40 циклов; 3) 72°C 10 мин
<i>rbcL</i>	1f 724r	ATGTCACCACAAACAGAAAC TCGCATGTACCTGCAGTAGC	1) 95°C 2 мин; 2) 94°C 1 мин, 55°C 30 с, 72°C 1 мин, 34 цикла; 3) 72°C 7 мин
<i>psbA-trnH</i>	fwd PA rev TH	GTTATGCATGAACGTAATGCTC CGCGCATGGTGGATTACAATCC	1) 94°C 5 мин; 2) 94°C 1 мин, 55°C 1 мин, 72°C 1.5 мин, 30 циклов; 3) 72°C 7 мин
<i>matK</i>	390F 1326R	CGATСТАТТСАТТСААТАТТТС ТСТАGСАCAGAAAGTСGAAGT	1) 94°C 5 мин; 2) 94°C 1 мин, 48°C 30 с, 72°C 1 мин, 26 циклов; 3) 72°C 7 мин

Таблица 3. Применение NGS в исследованиях лекарственных растений

Лекарственное растение	Активность	Использованная платформа NGS	Автор исследования
<i>Ocimum sanctum</i>	Лечение кашля, простуды, бронхита; отхаркивающее средство	Illumina HiSeq2000	Rastogi et al., 2015
<i>Beta vulgaris</i>	Лечение лихорадки, запора, заболеваний ВДП и инфекций	Illumina HiSeq2000	Dhom et al., 2014
<i>Panax ginseng</i>	Иммуностимулирующее, противоопухолевое и холестеринснижающее средство	Illumina HiSeq	Jayakodi et al., 2014
<i>Elaeis guineensis</i>	Слабительное и мочегонное средство; лечение гонореи, меноррагий и бронхита	Roche/454	Singh et al., 2013
<i>Curcuma longa</i>	Противомалярийное, противовоспалительное, противоопухолевое средство	Illumina GAIIx	Annadurai et al., 2013
<i>Catharanthus roseus</i>	Противоопухолевое средство	Illumina HiSeq2000	van Moerkercke et al., 2013
<i>Withania somnifera</i>	Тонизирующее, антистрессовое средство; вспомогательное средство при психических заболеваниях; афродизиак	454-GS FLX sequencing (454 Life Sciences, Roche, USA)	Gupta et al., 2013
<i>Azadirachta indica</i>	Успокаивающее, обезболивающее, противоэпилептическое, гипертензивное средство	Pyro-sequencing	Krishnan et al., 2012
<i>Cannabis sativa</i>	Галлюциногенное, снотворное, успокаивающее, обезболивающее и противовоспалительное средство	Illumina, Roche	van Bakel et al., 2011
<i>Populus trichocarpa</i>	Жаропонижающее, обезболивающее и противовоспалительное средство	Expressed sequence tag based methods	Tuskan et al., 2006

димо учитывать, что ДНК-штрихкодирование не позволяет определить анализируемую часть растения (морфологическую группу сырья). Однако проводить валидацию становится сложнее, когда оцениваются готовые продукты. Методы ДНК-штрихкодирования чаще всего разрабатываются с использованием свежего или высушенного необработанного растительного материала, чтобы определить, можно ли амплифицировать выбранную область ДНК и дифференцировать от родственных видов (Newmaster et al., 2013; Palhares et al., 2015). Поэтому анализ ДНК-штрихкода фитопрепарата должен проводиться с учетом того, что способы обработки могут изменять или исключать ДНК, что на экстракцию и амплификацию ДНК могут влиять вспомогательные вещества и вторичные метаболиты, а присутствие ДНК вспомогательных компонентов может привести к ошибочным результатам (Parveen et al., 2016).

В случае фитопрепаратов очень важна стадия, на которой должен выполняться анализ ДНК-штрихкода. Например, в случае переработанного растительного сырья молекулярный анализ является более успешным, если он проводится на начальном этапе во время сбора сырья, из которого производится фитопрепарат (Parveen et al., 2016).

Рассматривая ограничения и перспективы ДНК-штрихкодирования для определения подлинности лекарственного растительного сырья, следует отметить следующее: ДНК-штрихкодирование не дает возможности определить различные ткани (органы) одного и того же вида. Например, в случае женьшеня *Panax ginseng* корни часто смешиваются или полностью замещаются листьями. Корни и листья содержат высокий уровень панаксозидов, но имеют разный химический профиль. С помощью ДНК-штрихкодирования данную фальсификацию не обнаружить. Также ДНК-штрихкодирование не будет определять “исчерпанный материал”, то есть сырье, из которого активные компоненты были проэкстрагированы (удалены), а также сырье, собранное в неправильный сезон, что снижает содержание действующих веществ, а, следовательно, снижается и фармакологическая активность. Чтобы преодолеть эти ограничения анализа на основе ДНК, для идентификации растительных продуктов следует применять химическое профилирование, а также макро- и микроскопический анализ. Другим ограничением штрихового кодирования ДНК является сродство универсальных праймеров к ДНК наполнителей и фальсифицирующих или замещающих видов, а учитывая, что наполнители добавляют после завершения обработки растительного материала, ДНК наполнителя остается нетронутой. Следовательно, праймеры предпочтительно амплифицируют ДНК наполнителя, приводя к ложноотрицательному результату. Данный недостаток может быть преодолен с

помощью NGS, цифровой PCR или клонирования. Кроме того, предпочтительно создание мини-штрихкодов. Одной из проблем ДНК-штрихкодирования для идентификации лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов является отсутствие справочной библиотеки мини-штрихкодов или штрихкодов, содержащей все аутентичные эталонные штрихкоды, связанные с соответствующими таксономически подтвержденными гербарными ваучерами (Mishra et al., 2016).

МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА В РАСТИТЕЛЬНЫХ СМЕСЯХ, ОСНОВАННЫЕ НА ФРАГМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ ДНК (ДНК-ФИНГЕРПРИНТИНГ)

Из этой группы наиболее часто применяется RFLP-метод (restriction fragment length polymorphism – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов), который заключается в обработке ДНК, выделенной из заведомо подлинного образца сырья (стандарта), ферментом рестриктазой. Полученные фрагменты разделяют в агарозном геле путем электрофореза и затем переносят на нитроцеллюлозную мембрану с сохранением взаиморасположения разделенных участков (процесс Саузерн-блоттинга). Затем проводят реакцию гибридизации нуклеиновых кислот, используя в качестве радиоактивно меченного зонда, например, микросателлиты. Затем мембрану накладывают на рентгеновскую пленку и получают радиоавтограф, на котором можно определить размеры фрагментов ДНК, содержащих последовательно, гомологичные зонду. Далее сравнивают паттерны рестрикции у возможно более разнообразных по происхождению растений этого вида. Неодинаковые длины фрагментов свидетельствуют о различиях на уровне последовательности ДНК – динамических мутациях, связанных с изменениями повторяемости микросателлитной последовательности, об инсерциях и о делециях в участках генома между соседними сайтами рестрикции, о мутациях в районе рестрикционных сайтов, о делециях, захватывающих рестрикционные сайты (Повыдыш и др., 2007; Матвеева и др., 2011). Подобрав ДНК-зонды, которые дают видоспецифичные комбинации фрагментов на радиоавтографах, можно отличить тестируемый объект от близких видов и фальсификатов. После этого сравнивают размеры этих фрагментов в стандартном образце и тестируемом материале. ДНК-зонды могут быть мечены не только радиоактивно, но и флуорохромами.

К недостаткам метода можно отнести его многоэтапность (рестрикция, электрофорез, перенос на мембрану, гибридизация, экспозиция и проявление рентгенограмм), невозможность

Таблица 4. Использование методов RFLP и PCR-RFLP для идентификации лекарственного растительного сырья

Лекарственное растение	Используемая часть	Медицинское применение	Примесь	Автор исследования
<i>Dracocephalum moldavica</i> L.	Целое растение	Лечение болезней сердечно-сосудистой системы; обезболивающее средство	<i>Melissa officinalis</i> L., <i>Nepeta cataria</i> L.	Horn et al., 2014
<i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex Reissek	Листья	Лечение язвы желудка, гастрита, нарушений пищеварения	<i>Sorocea bonplandii</i> (Baill.) Burger, Lanj. & Wess. Boer	Nakamura et al., 2013
<i>M. aquifolia</i> Mart.	Листья, цветки			
<i>Paris polyphylla</i> Smith var. <i>yunnanensis</i>	Клубни	Противоопухолевое, обезболивающее, противовоспалительное, противогрибковое средство	Нет	Liu, Ji, 2012
<i>Fallopia multiflora</i> (Thunb.) Haraldson	Корни	Лечение карбункулов; средство, препятствующее развитию токсичности; средство, расслабляющее гладкую мускулатуру внутренних органов	<i>Cynanchum auriculatum</i> Royle ex Wight	Zheng et al., 2012
<i>Eleutherococcus senticosus</i> (Rupr. & Maxim.) Maxim.	Корень, стебель, листья	Адаптоген; лечение многих видов рака	<i>Periploca sepium</i> Bunge	Zhu et al., 2011

автоматизации процесса и необходимость наличия большого количества ДНК для анализа (2–5 мкг); к достоинствам – относительную легкость интерпретации результатов (Ganie et al., 2015). С помощью RFLP-метода изучены видоспецифичные ДНК-маркеры *Capsicum annuum*.

В настоящее время этот метод обычно используется в сочетании с методами, основанными на PCR (Повыдыш и др., 2007). Например, шесть видов лекарственных растений, а именно, *Desmodium gangeticum*, *Aegle marmelos*, *Solanum xanthocarpum*, *Solanum indicum*, *Tribulus terrestris*, *Oroxylum indicum* были идентифицированы методом PCR-RFLP, в котором в качестве области для амплификации был выбран ITS (праймеры: ITS1 (F) и ITS4 (R)) (Biswas, Biswas, 2013). Этот же метод был применен для *Boerhavia diffusa* L., для которой участок ITS (700 п.н.) был амплифицирован с помощью PCR, затем обработан ферментом рестриктазой MspI, после чего были получены четыре уникальных фрагмента, которые позволили отличить исследуемый вид от *Trianthema portulacastrum* и *T. monogyna* (Biswas et al., 2013). Данный метод предложен (Feng et al., 2010) для идентифи-

кации *Angelica sinensis* и отличия данного вида от семи различных примесных видов. Важно подчеркнуть, что этот метод, как правило, используется с короткоцепящими рестриктазами и позволяет выявлять только контаминацию филогенетически достаточно далекими растениями. Близкие виды (или роды) чаще всего не различимы. Другие примеры использования методов RFLP и PCR-RFLP в анализе лекарственного растительного сырья представлены в табл. 4.

МЕТОДЫ ФРАГМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДНК, ОСНОВАННЫЕ НА PCR

В анализе растительного сырья наиболее часто используются методы RAPD-PCR (random amplified polymorphic DNA-PCR) и AFLP-PCR (amplified fragment length polymorphism PCR) (Повыдыш и др., 2007). RAPD-PCR-метод часто используют для выявления генетической вариабельности растений как внутри видов, так и между близкими видами. RAPD-анализ предполагает амплификацию определенных участков ДНК с помощью PCR с использованием в качестве затравки для синтеза ДНК коротких (длиной около 10 нуклеотидов)

праймеров. Продукты амплификации разделяются методом электрофореза на агарозном геле, окрашиваются флуорохромами, после чего на геле можно видеть и фотографировать весь спектр амплифицированных фрагментов (Матвеева и др., 2011; Ganie et al., 2015).

Метод достаточно прост, позволяет использовать малое количество ДНК (15–30 нг), не требует использования каких-либо меток. Эти преимущества особенно важны при идентификации высушенного растительного материала, так как он обычно содержит малые количества ДНК, что затрудняет процесс секвенирования. Метод нашел применение для идентификации лекарственного растительного сырья, например, для идентификации сырья видов рода женьшень, имеющих разную коммерческую стоимость: *Panax ginseng* С.А. Mey, *P. quinquefolius* L., *P. notoginseng* (Burkill) F.N. Chen ex C.Y. Wu & K.M. Feng и примесей к ним. Кроме того, RAPD-анализ используется для установления подлинности сырья *Juniperus communis* L., *Melissa officinalis* L., *Capsicum annuum* L., а также медицинских видов родов *Glycyrrhiza*, *Echinacea*, *Curcuma*, *Scutellaria* и ряда других растений, применяющихся в традиционной китайской и индийской медицине.

Несмотря на популярность метода, он имеет ряд недостатков, связанных с зависимостью от условий проведения PCR (Повыдыш и др., 2007). Вследствие недостаточной воспроизводимости RAPD сложно использовать в межлабораторных исследованиях. Вследствие вышеупомянутого, значимость получаемых результатов и их интерпретация могут подвергаться сомнению (Ganie et al., 2015). На основе полученных с использованием случайных праймеров RAPD бэндов, их разделения, экстрагирования, клонирования и секвенирования и дизайна специфических праймеров разработан тип маркеров SCAR (sequence characterized amplified region), развитие и использование которых экспоненциально растет с начала 1990-х гг. Так, разрабатываются специфические SCAR-маркеры, позволяющие дискриминировать определенные молекулярные фенотипы различных видов одного рода, используемые в таксономии дискриминирования экотипов, в выявлении уникальных соматональных вариантов и молекулярных событий, сопряженных с вариабельностью соматоклонов (Матвеева и др., 2011). Метод RAPD-SCAR находит применение и для идентификации лекарственного растительного сырья (табл. 5).

Обстоятельный обзор возможностей использования RAPD-анализа для проверки содержимого растительных смесей “RAPD-анализ лекарственного растительного сырья” был сделан В.М. Боевой (Боева, 2009). В Японии статья “Испытание чистоты лекарственного сырья с использованием

генетической информации” включена в фармакопею, начиная с XV издания (The Japanese Pharmacopoeia, 2006).

Применение метода AFLP-PCR позволяет в значительной степени избежать недостатков RAPD-анализа. Суть метода заключается в использовании двух специфических рестриктаз с дальнейшим лигированием продуктов рестрикции с определенными нуклеотидными последовательностями (адаптерами) и последующей селективной амплификацией с мечеными праймерами. Аналитическое значение имеет электрофоретическая подвижность продукта PCR в сравнении со стандартным образцом сырья (табл. 6).

ISSR-маркеры (inter simple sequence repeats) были разработаны как альтернатива RAPD. Данный метод основан на амплификации последовательностей, ограниченных двумя микросателлитными повторами в присутствии праймера, комплементарного к последовательности данного микросателлита (4–12 единицам повтора) и несущего на одном из концов последовательность из двух–четырех произвольных нуклеотидов (так называемый якорь) (Матвеева и др., 2011). Такие праймеры позволяют амплифицировать фрагменты ДНК, которые находятся между двумя достаточно близко расположенными микросателлитными последовательностями (как правило, это уникальная ДНК). В результате амплифицируется большое число фрагментов, представленных на электрофореграмме дискретными полосами (ISSR-фингерпринтинг). Полученные паттерны PCR-продуктов в значительной степени видоспецифичны, кроме того, они значительно надежнее RAPD-маркеров (табл. 7).

Помимо вышеописанных методов, иногда применяются их производные – метод DAF (DNA amplification fingerprinting), AP-PCR (arbitrary primed PCR) (Повыдыш и др., 2007).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенный обзор показывает востребованность и актуальность применения молекулярно-генетических методов в анализе лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов. Наибольшие перспективы имеют методы, основанные на секвенировании, особенно на секвенировании нового поколения. Технологии секвенирования ДНК для идентификации видов лекарственных растений в растительных продуктах и пищевых добавках являются высоконадежным и перспективным инструментом в определенных условиях: правильная стадия анализа, когда ДНК может быть обнаружена, сродство праймеров для успешной PCR и отсутствие загрязнений ДНК. Важно применять наиболее подходящий метод для эффективного обна-

Таблица 5. Использование методов RAPD и RAPD-SCAR для идентификации лекарственного растительного сырья

Лекарственное растение	Используемая часть	Медицинское применение	Примесь	Автор исследования
<i>Litchi chinensis</i> Sonn.	Плоды	Противоопухолевое, противогрибковое, антивирусное, антиоксидантное, антиагрегантное, противодиабетическое средство	Нет	Cheng et al., 2015
<i>Akebia quinata</i>	Стебли	Противовоспалительное, мочегонное, обезболивающее средство	<i>Akebia trifoliata</i> , <i>Aristolochia manshuriensis</i> , <i>Clematis armandii</i>	Moon et al., 2015
<i>Cissampelos pereira</i>	Целое растение	Лечение болей в желудке, лихорадки, кожных заболеваний, болей в сердце	<i>Cyclea peltata</i> , <i>Stephania japonica</i>	Vijayan et al., 2013
<i>Podophyllum hexandrum</i> Royle	Трава, корневища	Противоопухолевое средство	<i>Podophyllum peltatum</i> L.	Al-Shaqha et al., 2014
<i>Fritillariae cirrhosae</i>	Клубни	Противокашлевое, отхаркивающее средство	<i>Bulbus Fritillariae pallidiflorae</i> (Yibeimu), <i>B. Fritillariae thunbergii</i> (Zhebeimu), <i>B. Fritillariae hupehensis</i> (Hubeibeimu), <i>B. Fritillariae ussuriensis</i> (Pingbeimu)	Xin et al., 2014
<i>Angelica acutiloba</i> Kitagawa var. <i>acutiloba</i> Kitagawa	Трава	Лечение гинекологических заболеваний	<i>A. acutiloba</i> Kitagawa var. <i>sugiyamae</i> Hikino	Matsubara et al., 2013
<i>Кнema andamanica</i>	Целое растение	Антибактериальное средство	Нет	Sheeja et al., 2013
<i>Schisandra chinensis</i>	Плоды	Вяжущее, противодиарейное средство; средство, предотвращающее повышенное потоотделение	<i>S. sphenanthera</i>	Lee et al., 2013
Shankhpushpi (<i>Convolvulus pluricaulis</i>)	Целое растение	Средство, улучшающее память	<i>Cansicora decussata</i> , <i>Clitoria tematea</i> , <i>Evolvulus alsinoides</i>	Ganie et al., 2012
<i>Ipomoea mauritiana</i>	Корни	Афродизиак; кардиотоническое, успокоительное, мочегонное, жаропонижающее и лактогонное средство	<i>Pueraria tuberosa</i> (Roxb. ex Willd.) DC, <i>Adenia hondala</i> (Gaertn.) de Wilde, pith of <i>Cycas circinalis</i> L.	Devaiah et al., 2011

Таблица 6. Использование метода AFLP-PCR для идентификации лекарственного растительного сырья

Лекарственное растение	Используемая часть	Медицинское применение	Примесь	Автор исследования
<i>Zanthoxylum acanthopodium</i> , <i>Z. oxyphyllum</i>	Целое растение	Лечение заболеваний желудка; средство для очищения крови, уменьшения проявлений лейкодермы	Нет	Gupta, Mandi, 2014
<i>Zingiber officinale</i>	Корневище	Антиоксидантное, противовоспалительное, противорактовое, противовоспалительное средство	<i>Z. montanum</i> , <i>Z. zerumbet</i>	Ghosh et al., 2011
<i>Swertia chirayita</i>	Семена	Лечение астмы и заболеваний печени	<i>Andrographis paniculata</i> , <i>Exacum tetragonum</i> , <i>E. pedunculatum</i> , <i>Slevolgia orientalis</i> , <i>S. alata</i> , <i>S. angustifolia</i> , <i>S. bimaculata</i> , <i>S. ciliata</i> , <i>S. densifolia</i> , <i>S. elegans</i> , <i>S. lawii</i> , <i>S. minor</i> , <i>S. paniculata</i> , <i>S. multiflora</i> , <i>S. cordata</i>	Misra et al., 2010a
<i>Aconitum heterophyllum</i>	Корни, стебли	Лечение боли в желудке и лихорадки	<i>Cyperus rotundus</i>	Misra et al., 2010b

Таблица 7. Использование метода ISSR-маркеров для идентификации лекарственного растительного сырья

Лекарственное растение	Используемая часть	Медицинское применение	Примесь	Автор исследования
<i>Scrophularia ningpoensis</i>	Корни	Лечение воспалений, ларингита, тонзиллита, абсцессов, карбункулов	Нет	Chen et al., 2011
<i>Rheum officinale</i> Baill., <i>R. palmatum</i> L., <i>R. tanguticum</i> Maxim. ex Balf.	Корневища, корни	Слабительное, противовоспалительное, антибактериальное, жаропонижающее, противоопухолевое, антимуагенное средство; лечение заболеваний почек	<i>R. hotaoense</i> , <i>R. compactum</i> , <i>R. undulatum</i> , <i>R. emodi</i>	Wang, 2011

ружения и идентификации анализируемого сырья или переработанного материала. Тем не менее, ограничения, присущие методам ДНК-штрихкодирования (невозможность определить анализируемую часть растения и фазу заготовки), делают его непригодным в качестве автономного инструмента для идентификации лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов (Parveen et al., 2016). Более целесообразным представляется совместное применение молекулярно-генетических методов с существующими методами фармакогностического анализа.

анализа лекарственного растительного сырья” в соответствии с основным научным направлением ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России “Разработка технологий производства, методов анализа, стандартизации и фармакологической оценки новых или модифицированных фармацевтических субстанций и препаратов” № 01201252028, а также при поддержке программы Президиума РАН № 41 “Биоразнообразие природных систем и биологические ресурсы России”. Экспериментальная часть работы частично финансировалась из средств гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 18-04-01040.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения РФ “Разработка молекулярно-генетических методов

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Баева В.М. Фармакогностическое изучение лекарственных растений с использованием молекулярно-биологических методов: Дис. ... д. фарм. наук. М.: ММА им. И.М. Сеченова, 2009. 221 с.
- Гаммерман А.Ф., Семичов Б.В. Словарь тибетско-латинских названий лекарственного растительного сырья, применяемого в тибетской медицине. Улан-Удэ: БКНИИ АН СССР, 1963. 162 с.
- Матвеева Т.В., Павлова О.А., Богомаз Д.И. и др. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений // Экол. генетика. 2011. Т. 9. № 1. С. 32–43.
- Повыдыш М.Н., Гончаров М.Ю., Яковлев Г.П., Родионов А.В. Молекулярно-генетические методы в фармакогнозии // Фармация. 2007. № 5. С. 61–71.
- Пунина Е.О., Мачс Э.М., Крапивская Е.Е. и др. Межвидовая гибридизация в роде *Raeonia* (Raeoniaceae): полиморфные сайты в транскрибируемых спейсерах генов 45S рРНК как индикаторы происхождения природных и искусственных гибридов пионов // Генетика. 2012. Т. 48. №7. С. 812–826.
- Родионов А.В., Гнутиков А.А., Коцинян А.Р. и др. Последовательность ITS1-5.8S рДНК-ITS2 в генах 35S рРНК как маркер при реконструкции филогении злаков (сем. Poaceae) // Успехи соврем. биол. 2016. Т. 136. № 5. С. 419–438.
- Хайдав Ц., Алтанчимэг Б., Варламова Т.С. Лекарственные растения в монгольской медицине. Улан-Батор: Госиздат, 1985. 390 с.
- Шнеер В.С. ДНК-штрихкодирование – новое направление в сравнительной геномике растений // Генетика. 2009. Т. 54. № 11. С. 1436–1448.
- Aird D., Ross M.G., Chen W.S. et al. Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries // Genome Biol. 2011. V. 12. R18.
- Al-Qurainy F., Khan S., Tarroum M. et al. Molecular authentication of the medicinal herb *Ruta graveolens* (Rutaceae) and an adulterant using nuclear and chloroplast DNA markers // Genet. Mol. Res. 2011. V. 10. № 4. P. 2806–2816.
- Al-Shaqha W.M., Khan M., Chaudhary A.A. SCAR molecular markers for identification and authentication of medicinal plants *Podophyllum hexandrum* Royle // As. J. Biochem. Pharm. Res. 2014. V. 4. P. 66–75.
- Annadurai R.S., Neethiraj R., Jayakumar V. et al. De novo transcriptome assembly (NGS) of *Curcuma longa* L. Rhizome reveals novel transcripts related to anticancer and antimicrobial terpenoids // PLoS One. 2013. V. 8. № 3. P. e56217.
- Barnes J., McLachlan A.J., Sherwin C.M., Enioutina E.Y. Herbal medicines: challenges in the modern world. Pt 1. Australia and New Zealand // Exp. Rev. Clin. Pharmacol. 2016. V. 9. № 7. P. 905–915.
- Barnwell P., Blanchard A.N., Bryant J.A. et al. Isolation of DNA from the highly mucilaginous succulent plant *Sedum telephium* // Plant Mol. Biol. Rep. 1998. V. 16. P. 133–138.
- Biswas K., Biswas R. Identification of medicinal plants using PCR-RFLP in Dasamula – an Ayurvedic drug // J. Pharm. BioSci. 2013. V. 3. P. 94–99.
- Biswas K., Kapoor A., Biswas R. Authentication of herbal medicinal plant – *Boerhavia diffusa* L. using PCR-RFLP // Curr. Trends Biotechnol. Pharm. 2013. V. 7. P. 116–124.
- Bolson M., Smidt Ed.C., Brotto M.L., Silva-Pereira V. ITS and *trnH-psbA* as efficient DNA barcodes to identify threatened commercial woody Angiosperms from southern Brazilian atlantic rainforests // PLoS One. 2015. V. 10. № 12. P. e0143049.
- Burgess K.S., Fazekas A.J., Kesanakurti P.R. et al. Discriminating plant species in a local temperate flora using the *rbcL* + *matK* DNA barcode // Meth. Ecol. Evol. 2011. V. 2. P. 333–340.
- CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants // PNAS USA. 2009. V. 106. P. 12794–12797.
- Chandramohan A., Divya S.R., Dhanarajan M.S. *MatK* gene based molecular characterization of medicinal plant – *Croton bonplandianum* Baill // Int. J. Biosci. Res. 2013. V. 2. P. 1–7.
- Chen C., Duan L.N., Zhou X.L. et al. Molecular authentication of geauthentic *Scrophularia ningpoensis* // J. Zhejiang Univ. Sci. B. 2011. V. 12. P. 393–398.
- Chen C.Y.C. TCM Database@Taiwan: The world's largest traditional chinese medicine database for drug screening *in silico* // PLoS One. 2011. V. 6. № 1. P. e15939.
- Chen S., Yao H., Han J. et al. Validation of ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species // PLoS One. 2010. V. 5. № 1. P. e8613.
- Cheng J., Long Y., Khan M.A. et al. Development and significance of RAPD-SCAR markers for the identification of *Litchi chinensis* Sonn. by improved RAPD amplification and molecular cloning // Electron. J. Biotechnol. 2015. V. 18. P. 35–39.
- China Plant BOL Group. Comparative analysis of a large dataset indicates that ITS should be incorporated into the core barcode for seed plants // PNAS USA. 2011. V. 108. P. 19641–19646.
- Costa J., Amaral J.S., Fernandes T.J.R. et al. DNA extraction from plant food supplements: influence of different pharmaceutical excipients // Mol. Cell Probes. 2015. V. 29. P. 473–478.
- De Boer H.J., Ichim M.C., Newmaster S.G. DNA barcoding and pharmacovigilance of herbal medicines // Drug safety. 2015. V. 38. № 7. P. 611–620.
- Devaiah K., Balasubramani S.P., Venkatasubramanian P. Development of randomly amplified polymorphic DNA based SCAR marker for identification of *Ipomoea mauritiana* Jacq (Convolvulaceae) // Evid.-Bas. Compl. Altern. Med. 2011. V. 2011. P. 1–6.
- Dhom J.C., Minoche A.E., Holtgräwe D. et al. The genome of the recently domesticated crop plant sugar beet (*Beta vulgaris*) // Nature. 2014. V. 505. P. 546–549.
- Eickbush T.H., Eickbush D.G. Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes // Genetics. 2007. V. 175. № 2. P. 477–485.

- Enan M.R., Ahamed A. DNA barcoding based on plastid *matK* and RNA polymerase for assessing the genetic identity of date (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars // Genet. Mol. Res. 2014. V. 13. № 2. P. 3527–3536.
- Enioutina E.Y., Salis E.R., Job K.M. et al. Herbal medicines: challenges in the modern world. Pt 5. Status and current directions of complementary and alternative herbal medicine worldwide // Exp. Rev. Clin. Pharmacol. 2017. V. 10. № 3. P. 327–338.
- Feng T., Liu S., He X.J. Molecular authentication of the traditional Chinese medicinal plant *Angelica sinensis* based on internal transcribed spacer of nrDNA // Electron. J. Biotechnol. 2010. V. 13. № 1. P. 1–10.
- Ganie S.H., Srivastava P.S., Narula A. et al. Authentication of shankpushpi by RAPD markers // EurAsia J. BioSci. 2012. V. 6. P. 39–46.
- Ganie S.H., Upadhyay P., Das S., Sharma M.P. Authentication of medicinal plants by DNA markers // Plant Gene. 2015. V. 4. P. 83–99.
- Gao T., Yao H., Song J. et al. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2 // J. Ethnopharmacol. 2010. V. 130. P. 116–121.
- Gere J., Kowiyou Y., Daru B. et al. Incorporating *trnH-psbA* to the core DNA barcodes improves significantly species discrimination within southern african Combretaceae // ZooKeys. 2013. V. 365. P. 129–147.
- Ghosh S., Majumdar P.B., Sen M.S. Species-specific AFLP markers for identification of *Zingiber officinale*, *Z. montanum* and *Z. zerumbet* (Zingiberaceae) // Genet. Mol. Res. 2011. V. 10. P. 218–229.
- Guo X., Wang X., Su W. et al. DNA barcodes for discriminating the medicinal plant *Scutellaria baicalensis* (Lamiaceae) and its adulterants // Biol. Pharmac. Bull. 2011. V. 34. № 8. P. 1198–1203.
- Gupta P., Goel R., Pathak S. et al. De novo assembly, functional annotation and comparative analysis of *Withania somnifera* Leaf and root transcriptomes to identify putative genes involved in the withanolides biosynthesis // PLoS One. 2013. V. 8. P. e62714.
- Gupta D.D., Mandi S.S. Species specific AFLP markers for authentication of *Zanthoxylum acanthopodium* & *Zanthoxylum oxyphyllum* // J. Med. Plants. Stud. 2013. V. 1. № 6. P. 1–9.
- Harnly J., Chen P., Sun J. et al. Comparison of flow injection MS, NMR and DNA sequencing: methods for identification and authentication of black cohosh (*Actaea racemosa*) // Planta Medica. 2016. V. 82. № 3. P. 250–262.
- Hershkovitz M.A., Zimmer E.A. Conservation patterns in angiosperm rDNA ITS2 sequences // Nucl. Acids Res. 1996. V. 24. P. 2857–2867.
- Hollingsworth P.M., Graham S.W., Little D.P. Choosing and using a plant DNA barcode // PLoS One. 2011. V. 6. P. e19254.
- Horn T., Völker J., Rühle M. et al. Genetic authentication by RFLP versus ARMS? The case of Moldavian dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) // Eur. Food Res. Technol. 2014. V. 238. № 1. P. 93–104.
- Hou D., Song J., Shi L. et al. Stability and accuracy assessment of identification of traditional Chinese materia medica using DNA barcoding: a case study on Flos *Lonicerae Japonicae* // BioMed. Res. Int. 2013. V. 2013. P. 1–8.
- Hu Z., Tu Y., Xia Y. et al. Rapid identification and verification of indirubin-containing medicinal plants // Evid.-Bas. Complem. Altern. Med. 2015. V. 2015. P. 1–9.
- Ivanova N.V., Kuzmina M.L., Braukmann T.W.A. et al. Authentication of herbal supplements using next-generation sequencing // PLoS One. 2016. V. 11. P. e0156426.
- Jayakodi M., Lee S.C., Park H.S. et al. Transcriptome profiling and comparative analysis of *Panax ginseng* adventitious roots // J. Ginseng Res. 2014. V. 38. № 4. P. 278–288.
- Job K.M., Kiang T.K., Constance J.E. et al. Herbal medicines: challenges in the modern world. Pt 4. Canada and United States // Exp. Rev. Clin. Pharmacol. 2016. V. 9. № 12. P. 1597–1609.
- Kircher M., Kelso J. High-throughput DNA sequencing-concepts and limitations // Bioessays. 2010. V. 32. P. 524–536.
- Khanuja S.P.S., Shasany A.K., Darokar M.P., Kumar S. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils // Plant Mol. Biol. Rep. 1999. V. 17. P. 1–7.
- Kress W.J., Wurdack K.J., Zimmer E.A. et al. Use of DNA barcodes to identify flowering plants // PNAS USA. 2005. V. 102. № 23. P. 8369–8374.
- Kress W.J., Erickson D.L. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region // PLoS One. 2007. V. 2. P. e508.
- Krishnan N.M., Pattnaik S., Jain P. et al. A draft of the genome and four transcriptomes of a medicinal and pesticidal angiosperm *Azadirachta indica* // BMC Genomics. 2012. V. 13. № 1. P. 1–13.
- Lahaye R., van der Bank M., Bogarin D. et al. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots // PNAS USA. 2005. V. 105. P. 2923–2928.
- Lee Y.M., Cheol M.B., Yunui J. et al. Development of RAPD-derived SCAR markers and multiplex-PCR for authentication of the *Schisandrae Fructus* // Kor. J. Med. Crop. Sci. 2013. V. 3. P. 165–173.
- Lee S.C., Chiou S.J., Yen J.H. et al. DNA barcoding *Cinnamomum osmophloeum* Kaneh. based on the partial non-coding ITS2 region of ribosomal genes // J. Food Drug Anal. 2010. V. 18. № 2. P. 128–135.
- Li Y.H., Ruan J.L., Chen S.L. et al. Authentication of *Taxillus chinensis* using DNA barcoding technique // J. Med. Plant Res. 2010. V. 4. № 24. P. 2706–2709.
- Little D.P. Authentication of *Ginkgo biloba* herbal dietary supplements using DNA barcoding // Genome. 2014. V. 57. № 9. P. 513–516.
- Little D.P., Jeanson M.L. DNA barcode authentication of saw palmetto herbal dietary supplements // Sci Rep. 2013. V. 3. P. 1–6.
- Liu T., Ji Y. Molecular authentication of the medicinal plant *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Melanthiaceae) and its related species by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) // J. Med. Plants Res. 2012. V. 6. № 7. P. 1181–1186.
- Matsubara K., Shindo S., Watanabe H., Ikegami F. Authentication and genetic origin of medicinal *Angelica acuti-*

- loba* using random amplified polymorphic DNA analysis // *Am. J. Plant. Sci.* 2013. V. 4. P. 269–273.
- Mishra P., Kumar A., Nagireddy A. et al. DNA barcoding: an efficient tool to overcome authentication challenges in the herbal market // *Plant Biotech. J.* 2016. V. 14. P. 8–21.
- Misra A., Shasany A.K., Shukla A.K., Darokar M.P. AFLP markers for identification of *Swertia* species (Gentianaaceae) // *Genet. Mol. Res.* 2010a. V. 9. P. 1535–1544.
- Misra A., Shukla A.K., Shasany A.K. et al. AFLP markers for identification of *Aconitum* species // *Med. Aromat. Plant Sci. Biotechnol.* 2010b. V. 4. P. 15–19.
- Moon B.C., Yunui J., Young M.L. et al. Authentication of *Akebia quinata* Decne. from its common adulterant medicinal plant species based on the RAPD-derived SCAR markers and multiplex-PCR // *Genes. Genomics.* 2015. V. 37. P. 23–32.
- Nakamura S.S., do Valle J.S., Jacomassi E. et al. Molecular authentication of *Maytenus* sp. by PCR-RFLP // *Semina.* 2013. V. 34. № 2. P. 627–634.
- Newmaster S.G., Fazekas A.J., Ragupathy S. DNA barcoding in land plants: evaluation of *rbcL* in a multigene tiered approach // *Botany.* 2006. V. 84. P. 335–341.
- Newmaster S.G., Grgruric M., Shanmughanandhan D. et al. DNA barcoding detects contamination and substitution in North American herbal products // *BMC Med.* 2013. V. 11. P. 222–234.
- Novak J., Grausgruber-Gröger S., Lukas B. DNA-based authentication of plant extracts // *Food Res Int.* 2007. V. 40. P. 388–392.
- Palhares R.M., Drummond M.G., Alves B.S. et al. Medicinal plants recommended by the World Health Organization: DNA barcode identification associated with chemical analyses guarantees their quality // *PLoS One.* 2015. V. 10. P. e0127866.
- Pang X., Liu C., Shi L. et al. Utility of the *trnH-psbA* intergenic spacer region AND ITS combinations as plant DNA barcodes: a meta-analysis // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 11. P. e48833.
- Parvathy V.A., Swetha V.P., Sheeja T.E. et al. DNA barcoding to detect chili adulteration in traded black pepper powder // *Food Biotechnol.* 2014. V. 28. № 1. P. 25–40.
- Parveen I., Gafner S., Techen N. et al. DNA barcoding for the identification of botanicals in herbal medicine and dietary supplements: strengths and limitations // *Planta Medica.* 2016. V. 82. № 14. P. 1225–1235.
- Popescu R., Kopp B. The genus *Rhododendron*: an ethnopharmacological and toxicological review // *J. Ethnopharmacol.* 2013. V. 147. № 1. P. 42–62.
- 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. Report.* 1997. V. 15. № 1. P. 8–15.
- Raclariu A.C., Heinrich M., Ichim M.C., De Boer H. Benefits and limitations of DNA barcoding and metabarcoding in herbal product authentication // *Phytochem. Anal.* 2018. V. 29. № 2. P. 123–128.
- Rai P.S., Bellampalli R., Dobriya R.M. DNA barcoding of authentic and substitute samples of herb of the family Asparagaceae and Asclepiadaceae based on the ITS2 region // *J. Ayurv. Integr. Med.* 2012. V. 3. № 3. P. 136–140.
- Rastogi S., Kalra A., Gupta V. et al. Unraveling the genome of holy basil: an “incomparable” “elixir of life” of traditional Indian medicine // *BMC Genomics.* 2015. V. 16. P. 1–14.
- Rodriguez R., White Jr.J., Arnold A., Redman R. Fungal endophytes: diversity and functional roles // *New Phytol.* 2009. V. 182. P. 314–330.
- Ruhsam M., Hollingsworth P.M. Authentication of *Eleutherococcus* and *Rhodiola* herbal supplement products in the United Kingdom // *J. Pharmac. Biomed. Anal.* 2018. V. 149. P. 403–409.
- Sahu S.K., Thangaraj M., Kathiresan K. DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol // *ISRN Mol. Biol.* 2012. V. 2012. P. 1–6.
- Sammons H.M., Gubarev M.I., Krepkova L.V. et al. Herbal medicines: challenges in the modern world. Pt 2. European Union and Russia // *Exp. Rev. Clin. Pharmacol.* 2016. V. 9. № 8. P. 1117–1127.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *PNAS USA.* 1977. V. 74. P. 5463–5467.
- Sarwat M., Yamdagni M.M. DNA barcoding, microarrays and next generation sequencing: recent tools for genetic diversity estimation and authentication of medicinal plants // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2016. V. 36. P. 191–203.
- Selvaraj D., Shanmughanandhan D., Sarma R.K. et al. DNA barcode ITS effectively distinguishes the medicinal plant *Boerhavia diffusa* from its adulterants // *Genom. Proteom. Bioinform.* 2012. V. 10. № 6. P. 364–367.
- Shanmughanandhan D., Ragupathy S., Newmaster S.G. et al. Estimating herbal product authentication and adulteration in India using a vouchered, DNA-based biological reference material library // *Drug Safety.* 2016. V. 39. № 12. P. 1211–1227.
- Sheeja T.E., Anju P.R., Shalini R.S., Krishnamoorthy B. RAPD, SCAR and conserved 18S rDNA markers for a red-listed and endemic medicinal plant species, *Knema andamanica* (Myristicaceae) // *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 2013. V. 19. P. 245–250.
- Simmler C., Graham J.G., Chen S.N., Pauli G.F. Integrated analytical assets aid botanical authenticity and adulteration management // *Fitoterapia.* 2017. V. 129. P. 401–414. DOI: 10.1016/j.fitote.2017.11.017
- Singh R., Ong-Abdullah M., Low E.T. et al. Oil palm genome sequence reveals divergence of interfertile species in Old and New worlds // *Nature.* 2013. V. 500. P. 335–339.
- Song J., Shi L., Li D. et al. Extensive pyrosequencing reveals frequent intra-genomic variations of internal transcribed spacer regions of nuclear ribosomal DNA // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 8. P. e43971.
- Sun Z.Y., Chen S.L. Identification of cortex herbs using the DNA barcode nrITS2 // *J. Nat. Med.* 2013. V. 67. P. 296–302.
- Techen N., Parveen I., Pan Z., Khan I.A. DNA barcoding of medicinal plant material for identification // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2014. V. 25. P. 103–110.
- Teng L., Zu Q., Li G. et al. Herbal medicines: challenges in the modern world. Pt 3. China and Japan // *Exp. Rev. Clin. Pharmacol.* 2016. V. 9. № 9. P. 1225–1233.
- The Japanese Pharmacopoeia. Fifteenth Edition. 2006. 1802 p.

- Tuskan G.A., Difazio S., Jansson S. et al. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray) // *Science*. 2006. V. 313. P. 1596–1604.
- van Bakel H., Stout J.M., Cote A.G. et al. The draft genome and transcriptome of *Cannabis sativa* // *Genome Biol.* 2011. V. 12. № 10. P. R102.
- van Moerkercke A., Fabris M., Polier J. et al. CathaCyc, a metabolic pathway database built from *Catharanthus roseus* RNA-Seq Data // *Plant Cell Physiol.* 2013. V. 54. P. 673–685.
- Vassou S.L., Kusuma G., Parani M. DNA barcoding for species identification from dried and powdered plant parts: a case study with authentication of the raw drug market samples of *Sida cordifolia* // *Gene*. 2015. V. 559. № 1. P. 86–93.
- Vassou S.L., Nithaniyal S., Raju B., Parani M. Creation of reference DNA barcode library and authentication of medicinal plant raw drugs used in ayurvedic medicine // *BMC Compl. Alternat. Med.* 2016. V. 16. № 1. P. 9–15.
- Vijayan D., Cheethaparambil A., Pillai G.S., Balachandran I. Developing RAPD markers for identification of three source plants of Ayurvedic raw drug “Patha” // *J. Phytomed. Relat.* 2013. V. 5. P. 55–58.
- Wang X.M. Inter-simple sequence repeats (ISSR) molecular fingerprinting markers for authenticating the genuine species of *Rhubarb* // *J. Med. Plant Res.* 2011. V. 5. P. 758–764.
- Wang X., Zheng S., Liu Y., Han J. ITS2, a better DNA barcode than ITS in identification of species in *Artemisia* L. // *Chin. Herb. Med.* 2016. V. 8. № 4. P. 352–358.
- Wong K.L., But P.P.H., Shaw P.C. Evaluation of seven DNA barcodes for differentiating closely related medicinal *Gentiana* species and their adulterants // *Chin. Med.* 2013. V. 8. P. 1–16.
- Xin G.Z., Lam Y.C., Maiwulanjiang M. et al. Authentication of bulbus *Fritillariae cirrhosae* by RAPD-derived DNA markers // *Molecules*. 2014. V. 19. P. 3450–3459.
- Zhang Z.L., Song M.F., Guan Y.H. et al. DNA barcoding in medicinal plants: testing the potential of a proposed barcoding marker for identification of *Uncaria* species from China // *Biochem. Syst. Ecol.* 2015. V. 60. P. 8–14.
- Zheng C.J., Sheng S.J., Zhao S.J. et al. Molecular authentication of *Fallopia multiflora* by PCR-RFLP based on the *trnL-trnF* analysis // *Zhong Yao Cai*. 2012. V. 35. P. 543–547.
- Zhou J., Wang W., Liu M., Liu Z. Molecular authentication of the traditional medicinal plant *Peucedanum praeruptorum* and its substitutes and adulterants by DNA-barcoding technique // *Pharmacogn. Mag.* 2014. V. 10. № 40. P. 385–390.
- Zhou Y., Du X.L., Zheng X. et al. ITS2 barcode for identifying the officinal *Rhubarb* source plants from its adulterants // *Biochem. Syst. Ecol.* 2017. V. 70. P. 177–185.
- Zhu S., Bai Y., Oya M. et al. Genetic and chemical diversity of *Eleutherococcus senticosus* and molecular identification of Siberian ginseng by PCR-RFLP analysis based on chloroplast *trnK* intron sequence // *Food Chem.* 2011. V. 129. № 4. P. 1844–1850.
- Zhu X., Zhang Y., Liu X. et al. Authentication of commercial processed *Glehniae radix* (Beishashen) by DNA barcodes // *Chin. Med.* 2015. V. 10. P. 35–43.

Current State and Prospects of Using DNA-barcoding and DNA-fingerprinting for Analysis of Plant Raw Material and Drugs of Plant Origin

E. V. Zhokhova^{1,*}, A. V. Rodionov^{2,3}, M. N. Povydysh¹,
M. Yu. Goncharov¹, Ya. A. Protasova¹, G. P. Yakovlev¹

¹Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, St. Petersburg, Russia

²Komarov Botanical Institute, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

³Biological Faculty, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

*E-mail: elena.zhohova@pharminnotech.com

Received May 24, 2018

Revised June 20, 2018

Accepted July 12, 2018

A review for the use of molecular genetic methods (DNA-barcoding and DNA-fingerprinting) for establishing the authenticity of medicinal plant material and herbal preparations is presented. The most effective DNA barcode for plant objects is shown to be ITS2. This marker allows identifying the highly degraded DNA, which is especially important in the case of phytopreparations and food supplements. The new generation sequencing (NGS) is the most useful sequencing method. It prevents the overlapping of sequence peaks, and thus facilitates the decoding of DNA barcodes in the determination of ingredients composing a multi-component phytopreparation. Such DNA-fingerprinting methods as RFLP, RFLP-PCR, RAPD, RAPD-SCAR, AFLP-PCR and ISSR are also considered.

Keywords: DNA-barcoding, DNA fingerprinting, DNA barcode, ITS2, Sanger sequencing, NGS, medicinal plant raw materials, herbal drugs