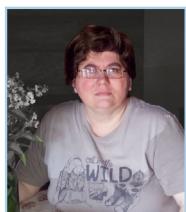


ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ



УДК 577.2.08:902

DOI: 10.30901/2658-3860-2025-3-o2

**А. В. Буракова***автор, ответственный за переписку: a.burakova@vir.nw.ru*Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова,  
Санкт-Петербург, Россия**Т. В. Семилет**Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова,  
Санкт-Петербург, Россия**А. М. Камнев**Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова,  
Санкт-Петербург, Россия**М. Е. Лапкасов**Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова,  
Санкт-Петербург, Россия**Л. Ю. Шипилина**Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова,  
Санкт-Петербург, Россия**И. Г. Чухина**Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова,  
Санкт-Петербург, Россия



## Эффективность молекулярно-генетических методов исследования гербарных и археоботанических образцов

В работе представлены результаты молекулярно-генетического анализа гербарных образцов из коллекции ВИР и археоботанических находок из раскопа житного двора Свято-Троицкой Сергиевой Лавры (XV век). Рассмотрены особенности работы с генетическим материалом, полученным из гербарных образцов и растительных остатков. Отмечается ряд сложностей при экстракции фрагментов ДНК. При проведении молекулярно-генетических исследований апробировано несколько протоколов выделения нуклеиновых кислот из гербарных и ископаемых образцов растений. Проведена амплификация с праймерами к участкам пластидных спейсеров *psbK-psbI* и *trnL-trnF*. У культур, хранящихся в гербарном фонде ВИР, выявлены продукты амплификации различных размеров. При сравнении результатов ПЦР выявлены идентичные по размеру продукты амплификации у засушенных растений и древних образцов ДНК одного вида. Таким образом, данное исследование свидетельствует о возможности проведения дальнейшей работы с древней ДНК из археоботанических образцов XV века.

**Ключевые слова:** древняя ДНК, спейсеры, пластидный геном, D-Plants, DiamondDNA

**Благодарности:** Работа выполнена в рамках темы НИР № FGEM-2024-0002 «Исследование растительных биоресурсов в пространственном и временном аспекте с применением современных цифровых и генетических технологий». Коллектив авторов выражает благодарность заместителю директора Института археологии РАН по науке, заведующей отдела сохранения археологического наследия, кандидату исторических наук Асе Викторовне Энговатовой за предоставленную возможность работать с интересным археоботаническим материалом.

**Для цитирования:** Буракова А.В., Семилет Т.В., Камнев А.М., Лапкасов М.Е., Шипилина Л.Ю., Чухина И.Г. Эффективность молекулярно-генетических методов исследования гербарных и археоботанических образцов. *Vavilovia*. 2025;8(3):39-52. DOI: 10.30901/2658-3860-2025-3-02

© Буракова А.В., Семилет Т.В., Камнев А.М., Лапкасов М.Е., Шипилина Л.Ю., Чухина И.Г., 2025



ORIGINAL ARTICLE

DOI: 10.30901/2658-3860-2025-3-o2

## Anna V. Burakova, Tatiana V. Semilet, Anton M. Kamnev, Mikhail E. Lapkasov, Liliya Yu. Shipilina, Irena G. Chukhina

N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

*corresponding author:* Anna V. Burakova, [a.burakova@vir.nw.ru](mailto:a.burakova@vir.nw.ru)

### The effectiveness of molecular genetic methods in the study of herbarium and archeobotanical specimens

This paper presents the results of molecular genetic analysis of herbarium specimens from the VIR Herbarium collection (WIR) and archaeobotanical finds from the excavation of the grain yard of the St. Sergius Trinity Lavra (15th century). The specifics of working with genetic material samples obtained from herbarium specimens and plant remains are considered. A number of difficulties in extracting DNA fragments are noted. Several protocols for nucleic acid extraction from herbarium and fossil plant samples have been tested and approved during the molecular genetic research. Amplification was performed with primers for the chloroplast spacer regions *psbK-psbI* and *trnL-trnF*. Amplification products of various sizes were detected in the crop plants preserved in the VIR herbarium. A comparison of the PCR results revealed amplification products of identical size in dried plants and ancient DNA samples of the same species. Therefore, this study demonstrates the feasibility of further work with ancient DNA from 15th-century archaeobotanical samples.

**Keywords:** ancient DNA, spacers, chloroplast genome, D-Plants, DiamondDNA

**Acknowledgment:** this work was carried out within the framework of the research project No. FGEM-2024-0002 "Study of plant bioresources in spatial and temporal aspects using modern digital and genetic technologies". The team of authors expresses gratitude to Asya Viktorovna Engovatova, Cand. Sci. (History), Deputy Director for Science of the Institute of Archaeology of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department for the Preservation of the Archaeological Heritage, for providing us an opportunity to work with interesting archaeobotanical material.

**For citation:** Burakova A.V., Semilet T.V., Kamnev A.M., Lapkasov M.E., Shipilina L.Yu., Chukhina I.G. The effectiveness of molecular genetic methods in the study of herbarium and archeobotanical specimens. *Vavilovia*. 2025;8(3):39-52. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-3860-2025-3-o2

© Burakova A.V., Semilet T.V., Kamnev A.M., Lapkasov M.E., Shipilina L.Yu., Chukhina I.G., 2025



## Введение

Современные генетические технологии открывают возможности для поиска генов, ассоциированных с хозяйственно-ценными признаками, а также изучить процессы доместикации и происхождение растений. Эти знания необходимы для успешного проведения селекционного процесса и создания новых сортов. Данные о возделывании староместных форм и произрастании диких родичей являются хорошим подспорьем для получения высокопродуктивных, устойчивых к болезням растений. Поэтому учёные всё чаще обращаются к гербарным коллекциям и археоботаническим находкам (Brown et al., 2015; Gavrilenko, Chukhina, 2020; Gavrilenko et al., 2023; Agakhanov et al., 2024; Chukhina et al., 2024). Современные молекулярно-генетические подходы позволяют разработать эффективные методы выделения генетического материала из гербарных и археологических материалов, устранив трудности при изучении древней ДНК, связанные с её фрагментированностью, контаминацией, низкой эффективностью ПЦР и т.д. (Lister et al., 2008; Särkinen et al., 2012; Drabkova, 2014; Fomina et al., 2019; Antonova et al., 2020; Bakker et al., 2020; Carey et al.; 2023; Gouker et al., 2023; Semilet et al., 2024 a, b).

Гербарный материал – ценный генетический ресурс и источник информации о таксономическом разнообразии растений. Гербарный фонд является важным источником данных при сравнительно-морфологическом анализе таксонов, исследовании биоразнообразия и изменений окружающей среды. Кроме того, изучение гербарных образцов с помощью молекулярно-генетических методов дает возможность отследить эволюционный процесс, становление и развитие флористических регионов, а также изучить динамику генома, что делает гербарный материал особо ценным. В настоящее время проводится изучение гербария в сравнении

с современными образцами возделываемых культур. Эти исследования позволяют идентифицировать аллели генов, контролирующих хозяйственно ценные признаки. Однако возникает ряд трудностей, которые связаны с выделением нуклеиновых кислот из фиксированных растений на разных этапах (Doyle, Dickson, 1987; Srinivansan et al., 2002; Zvyagin, 2010; Fomina et al., 2019; Kates et al., 2021; Marinček et al., 2022):

- разрушение ядерного и пластидного геномов вследствие естественного старения (Doyle., Dickson, 1987; Fomina et al., 2019);
- плохая сохранность, связанная с закладкой гербария и последующей обработкой (Srinivansan et al., 2002; Fomina et al., 2019);
- классические методы сушки и фиксации растений (например, с использованием высоких температур или химических консервантов) приводят к фрагментации ДНК, что затрудняет ПЦР-амплификацию (Staats et al., 2013; Fomina et al., 2019).
- содержащиеся следы химической обработки, фенолы, дубильные вещества подавляют ферментативные реакции (Fomina et al., 2019);
- воздействие генетического материала грибов и бактерий (Särkinen et al., 2012);
- сложный дизайн видоспецифических праймеров к генам интереса для более точного секвенирования и исключения артефактов;
- ограниченное количество материала, так как при работе с типовыми образцами в целях максимального сохранения всех систематически важных признаков авторы вынуждены отбирать минимальное количество растительной ткани, что значительно снижает выход ДНК (Krinitzyna et al., 2015; Gavrilenko et al., 2023).

На данный момент успешно выделены и изучены фрагменты ДНК из гербарных образцов картофеля с целью реконструкции эволюции генетического разнообразия и выяснения происхождения культурных форм картофеля (Ames,



Spooner, 2008; Gavrilenko et al., 2023), гибридов тополя для восстановления утраченных элитных гибридных сортов-клонов (Lebedeva et al., 2016), культурного арбуза для уточнения его филогенетического положения и пути одомашнивания (Chomicki, Renner, 2015), некоторых представителей рода *Allium* L. (лук) для изучения его распространения (Sinitsyna et al., 2016). Эти исследования подтверждают значение гербарных коллекций как ценных источников генетической информации о видах и их распространении.

Особый интерес в этом контексте представляют археоботанические находки, которые, подобно гербарным образцам, служат уникальным ресурсом для изучения доместикации, распространения растений. Однако из-за биотических и абиотических факторов, а также из-за и длительного хранения в почвенном слое материал повреждается, и точная идентификация видовой принадлежности становится невозможной. Исходя из этого, к археоботаническим находкам, кроме морфологического анализа, всё чаще стали применять палеогенетические методы исследования (Blatter et al., 2002; Elbaum et al., 2006; Hansson, Foley, 2008; Kistler et al., 2015; Filatova et al., 2021; Perez-Escobar et al., 2022). При соблюдении установленных норм создаются лаборатории для работы с древней ДНК, в которых соблюдаются все условия для предотвращения контаминации современной ДНК организмов (Brown et al., 2015; Farrer et al., 2021). На сегодняшний день учёными изучены фрагменты древней ДНК различных культурных растений из археологических памятников Старого и Нового Света. Выделены и секвенированы фрагменты древней ДНК из ископаемых остатков виноградных

косточек и лоз (Malenica et al., 2014; Wales et al., 2016), проведено высокопроизводительное секвенирование древних образцов ДНК рода *Gossypium* L. (Palmer et al., 2012). Особое внимание удалено изучению ископаемых остатков зерновых культур: пшеницы (Bilgic et al., 2016), ячменя (Badr et al., 2000; Lister et al., 2018), кукурузы (Goloubinoff et al., 1993), ржи (Filatova et al., 2021), которые стали первыми возделываться древними земледельцами при переходе от кочевого образа жизни к оседлому.

В настоящее время остается много вопросов о истории земледелия и возделывания культурных растений на территории России. Археологи, проводя раскопки на территории нашей страны, зачастую находят много уникального материала, который возможно идентифицировать и изучить с помощью морфологических и палеогенетических методов исследования. Целью данного исследования является изучение растительных остатков, найденных на территории житного двора Свято-Троицкой Сергиевой Лавры (г. Сергиев Посад, Московская область) с помощью молекулярно-генетических методов. Приводятся данные о подборе метода работы с древней ДНК и результаты сравнительного анализа с контрольными гербарными образцами.

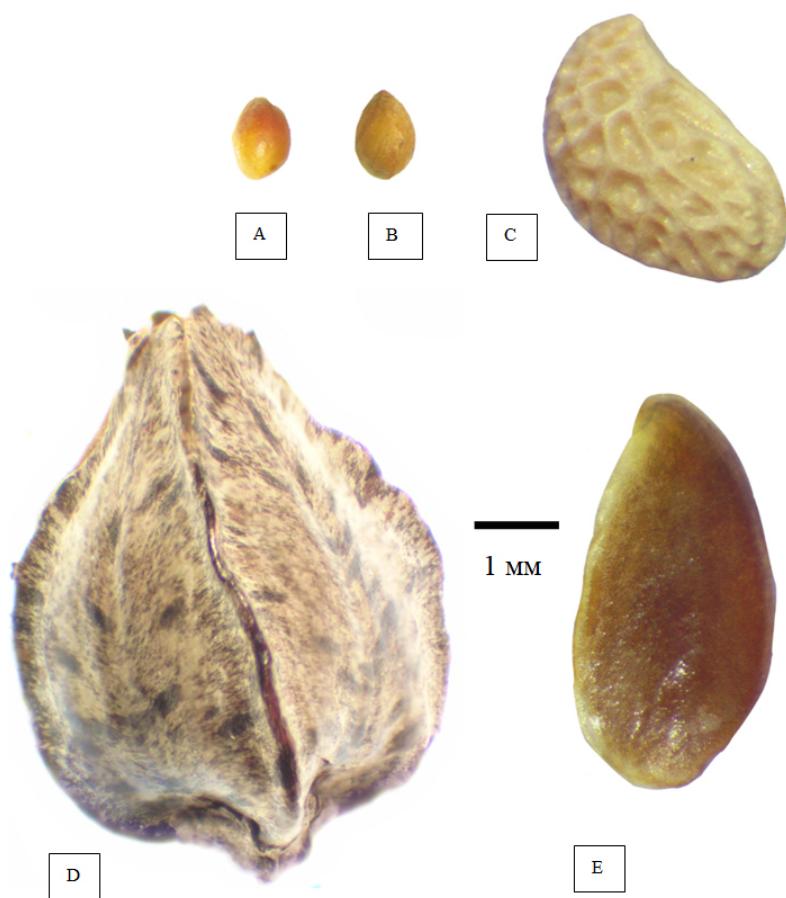
### Материалы и методы исследования

Объектом исследования стали растительные остатки представителей родов *Fragaria* L., *Rubus* L., *Cucumis* L., *Fagopyrum* Mill., *Linum* L. (рис. 1). Карнологический материал был обнаружен в ходе археологических раскопок на территории Свято-Троицкой Сергиевой Лавры (г. Сергиев Посад, Московская область).



**Рис. 1. Семена, обнаруженные при археологических раскопках в Свято-Троицкой Сергиевой Лавре: А) *Fragaria* sp.; В) *Rubus* sp.; С) *Fagopyrum* sp.**

**Fig. 1. Seeds discovered during archaeological excavations of the St. Sergius Trinity Lavra: A) *Fragaria* sp.; B) *Rubus* sp.; C) *Fagopyrum* sp.**



**Рис. 2. Семена из гербарных образцов: А) *Fragaria vesca* L.; В) *Fragaria viridis* Weston; С) *Rubus idaeus* L.; Д) *Fagopyrum esculentum* Moench.; Е) *Linum usitatissimum* L.**

**Fig. 2. Seeds from herbarium specimens: A) *Fragaria vesca* L.; B) *Fragaria viridis* Weston; C) *Rubus idaeus* L.; D) *Fagopyrum esculentum* Moench.; E) *Linum usitatissimum* L.**



**Таблица 1. Гербарный материал, использованный в исследовании**  
**Table 1. Herbarium material used in the study**

Номер гербариев / Herb.Cat.No.	Вид / Species	Место сбора / Collection site	Дата сбора / Collection date
WIR-25550	<i>Cucumis sativus</i>	Не указано	1962
WIR-25312	<i>Fragaria vesca</i>	Не указано	1968
WIR-35276	<i>Fragaria viridis</i>	Закарпатская обл. склон горы вблизи с. Холлицы, разнотравный луг	1975
WIR-43092a	<i>Rubus idaeus</i>	Старая Ладога (археологический раскоп, IX век)	2018
WIR-0083342	<i>Fagopyrum esculentum</i>	Украина, Харьковская обл.	1930
WIR-32028	<i>Linum usitatissimum</i>	Воронежская обл.	1920

Нами были отобраны гербарные образцы из коллекции Гербария культурных растений мира, их диких родичей и сорных растений (WIR) Все-российского института генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, включающие *Cucumis sativus* L. (WIR-25550), *Fragaria vesca* L. (WIR-25312), *F. viridis* L. (WIR-35276), *Rubus idaeus* L. (WIR-43092a), *Fagopyrum esculentum* L. (WIR-0083342), *Linum usitatissimum* L. (WIR-32028). Семена *Rubus idaeus* L. были дополнительно представлены из археологического раскопа Земляного городища в Старой Ладоге.

Гербарный материал перечисленных культурных растений различался по дате и месту сбора (табл. 1), что объясняется доступностью материала. Разброс дат сбора позволяет оценить влияние возраста на качество выделенной ДНК. Археологические образцы были выбраны в качестве контрольной группы для сравнения с более ранними гербарными образцами.

При молекулярно-генетических исследованиях была выявлена эффективность отечественных наборов при экстракции ДНК из семян образцов гербария.

Для выделения ДНК из материала Свято-Троицкой Сергиевой Лавры и гербария из фонда ВИР были выбраны отечественные наборы D-Plants («Биолабмикс», Россия) и DiamondDNA (ООО «НПФ «Алтайбиотех» Россия). Выделение ДНК осуществляло согласно протоколам производителей. Выбранные наборы отличаются этапами экстракции и степенью очистки ДНК. При выделении набором D-Plants Биолабмикс применяются спин-колонки, на которых происходит осаждение ДНК, очистка и последующая элюция. Протокол набора Diamond подразумевает применение селективного сорбента вместо спин-колонок. Количество экстрагируемой ДНК определяли спектрофотометрическим методом на приборе NanoPhotometer NanoDrop (Implen, Германия).

На следующем этапе с полученными препаратами ДНК ставили пробную ПЦР с праймерами, разработанными для хлоропластной (пластидной) ДНК, являющихся межгенными участками (спейсерами): *psbK-psbI* и *trnL-trnF* (табл. 2).



**Таблица 2. Праймеры для проверки способности амплификации гербарной и древней ДНК, разработанные для пластидных спейсеров *psbK-psbI* (Fazekas et al., 2008) и *trnL-trnF* (Yang, Pak, 2006)**

**Table 2. Primers for testing the amplification ability of herbarium and ancient DNA, designed for plastid spacers *psbK-psbI* (Fazekas et al., 2008) and *trnL-trnF* (Yang, Pak, 2006).**

Пластидный спейсер / Plastid spacer	Прямой праймер / Direct primer	Обратный праймер / Reverse primer	Tm	GenBank NCBI вид / species	Размер ампликона (пп) / Amplicon size (bp)
<i>psbK-psbI</i>				OR972717.1 <i>Rubus idaeus</i> L.	296
				NC_015206.1 <i>Fragaria vesca</i> ssp. <i>vesca</i>	302
				NC_007144.1 <i>Cucumis sativus</i> L.	429
	TTAGCCCTTGTTGGCAAG	AGAGTTTGAGAGTAAGCAT	53	NC_064334.1 <i>Fagopyrum esculentum</i>	385
				PP596894.1 <i>Linum usitatissimum</i> L.	477
				OR972717.1 <i>Rubus idaeus</i> L.	480
<i>trnL-trnF</i>				NC_015206.1 <i>Fragaria vesca</i> ssp. <i>vesca</i>	508
	AGGGTTCAAGTCCCTATCCC	GATTGAACTGGTGACACGAGG	50	NC_007144.1 <i>Cucumis sativus</i> L.	452
				NC_064334.1 <i>Fagopyrum esculentum</i>	427
				PP596894.1 <i>Linum usitatissimum</i> L.	-



Амплификацию ДНК проводили реакционной смеси объемом 25 мкл, включавшей 17,6 мкл очищенной от нуклеаз  $H_2O$ , 2,5 мкл ПЦР-буфера (10Х), 2,5 мкл  $MgCl_2$  (25 мМ), 1 мкл dNTP, 0,13 мкл прямого и обратного праймера, 0,12 мкл Таq-полимеразы (4 е.а.), 1 мкл ДНК. Программа полимеразной цепной реакции состояла из следующих этапов: 1 – предварительная денатурация при 95°C в течение 3 мин 30 с; 37 циклов: денатурация при 95°C в течение 45 с, отжиг праймеров при 53°C 1 мин, полимеризация при 72°C – 1 мин 30 с, и завершение реакции при 72°C – 10 мин.

После ПЦР разделение фрагментов осуществлялось методом гель-электрофореза в 1%-ном агарозном геле. Для оценки размеров ампли-

фицированных фрагментов ДНК применяли маркёр молекулярного веса «ДНК Step100 bp» («Биолабмикс», Россия). Визуализацию проводили ультрафиолетовым светом с использованием системы гель-документирования Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США).

## Результаты исследования

Выделение ДНК из гербарных образцов ВИР и археологического материала осуществляли при помощи наборов для выделения: Биолабмикс и Diamond в соответствии с протоколами производителей. После выделения ДНК проводилась оценка концентрации нуклеиновых кислот методом спектрометрии (табл. 3).

**Таблица 3. Результаты выделения ДНК из гербарных и археологических образцов**

**Table 3. Results of DNA extraction from herbarium and archaeological samples**

Тип образца/ Sample type	Таксономическая принадлежность/ Taxonomic affiliation	Концентрация ДНК, нг/мкл во фракциях, выделенных с помощью разных наборов/ DNA concentration, ng/µl in fractions isolated using different kits	
		D-Plants Биолабмикс	DiamondDNA ООО «НПФ «Алтайбиотех»
Археологический	<i>Rubus</i> sp.	0,85±0,008	2,1±0,021
Археологический	<i>Fragaria</i> sp.	2,3±0,023	7,75±0,077
Археологический	<i>Cucumis</i> sp.	3,6±0,036	0,7±0,007
Археологический	<i>Fagopyrum</i> sp.	0,1±0,001	0,3±0,003
Археологический	<i>Fagopyrum</i> sp.	0,05±0,0005	–
Археологический	<i>Linum</i> sp.	0,015±0,00015	1,4500±0,0145
Гербарный	<i>Cucumis sativus</i>	133,5±1,335	108,6±1,086
Гербарный	<i>Fragaria vesca</i>	10,9±0,109	3,5±0,035
Гербарный	<i>Fragaria viridis</i>	12,65±0,126	10±0,1
Гербарный	<i>Rubus idaeus</i>	80,1±0,801	18±0,18
Гербарный	<i>Fagopyrum esculentum</i>	144,6±1,446	277,5±2,775
Гербарный	<i>Linum usitatissimum</i>	15,2±0,152	125±1,25

Так как концентрация ДНК, выделенной из части использованных археологических образцов (*Fagopyrum* sp., *Linum* sp.), показала критически низкие значения, эти образцы были исключены из дальнейшего ПЦР-исследования. Для остальных образцов, концентрация ДНК в которых оказалась достаточной, была проведена амплификация с использованием праймеров к межгенным

спейсерам *psbK-psbI* и *trnL-trnF*. Выбранные олигонуклеотиды – фрагменты пластидной ДНК, которая в свою очередь является более стабильной в сравнении с ядерной и менее изменчива в ходе эволюции. Продукты амплификации представляли собой фрагменты различной длины, которые были разделены по длине. Полученные фрагменты имели длину от 253 до 477 пар нуклеотидов. (рис. 3, 4).

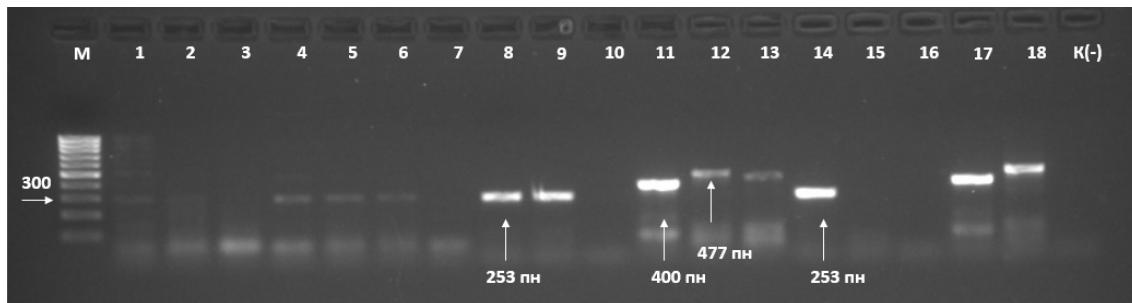


Рис. 3. Электрофоретические спектры продуктов амплификации археологической и гербарной ДНК (межгенный спайсер *psbK-psbI*): М – маркер молекулярного веса Step100 (Биолабмикс); археологические образцы: 1 – *Rubus* sp., 2 – *Fragaria* sp., 3 – *Cucumis* sp., 4 – *Rubus* sp., 5 – *Fragaria* sp., 6 – *Cucumis* sp.; гербарные образцы: 7 – *Cucumis sativus*, 8 – *Fragaria vesca*, 9 – *Fragaria viridis*, 10 – *Rubus idaeus*, 11 – *Fagopyrum esculentum*, 12 – *Linum usitatissimum*, 13 – *Cucumis sativus*, 14 – *Fragaria vesca*, 15 – *Fragaria viridis*, 16 – *Rubus idaeus*, 17 – *Fagopyrum esculentum*, 18 – *Linum usitatissimum*

Fig. 3. Electrophoretic bands of amplification products of archaeological and herbarium DNA (*psbK-psbI*). M – Molecular weight marker St 100 (Biolabmix); archaeological samples:

1 – *Rubus* sp., 2 – *Fragaria* sp., 3 – *Cucumis* sp., 4 – *Rubus* sp., 5 – *Fragaria* sp.,  
6 – *Cucumis* sp.; herbarium specimens: 7 – *Cucumis sativus*, 8 – *Fragaria vesca*, 9 – *Fragaria viridis*,  
10 – *Rubus idaeus*, 11 – *Fagopyrum esculentum*, 12 – *Linum usitatissimum*, 13 – *Cucumis sativus*,  
14 – *Fragaria vesca*, 15 – *Fragaria viridis*, 16 – *Rubus idaeus*, 17 – *Fagopyrum esculentum*,  
18 – *Linum usitatissimum*

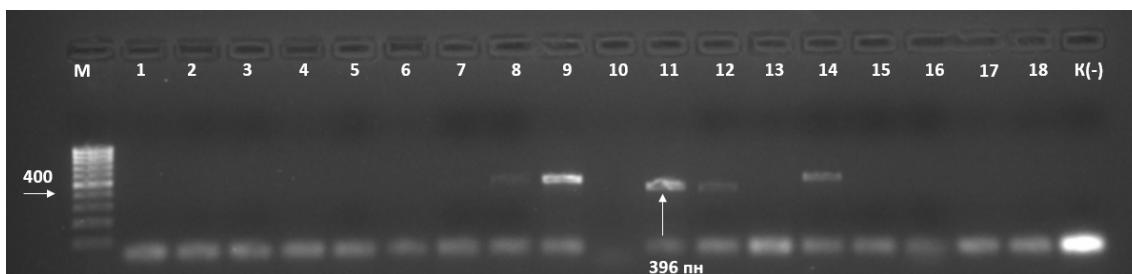


Рис. 4. Электрофоретические спектры продуктов амплификации археологической и гербарной ДНК (локус *trnL-trnF*): М – маркер молекулярного веса ДНК Step 100 (Биолабмикс); археологические образцы: 1 – *Rubus* sp., 2 – *Fragaria* sp., 3 – *Cucumis* sp., 4 – *Rubus* sp., 5 – *Fragaria* sp., 6 – *Cucumis* sp.; гербарные образцы: 7 – *Cucumis sativus*, 8 – *Fragaria vesca*, 9 – *Fragaria viridis*, 10 – *Rubus idaeus*, 11 – *Fagopyrum esculentum*, 12 – *Linum usitatissimum*, 13 – *Cucumis sativus*, 14 – *Fragaria vesca*, 15 – *Fragaria viridis*, 16 – *Rubus idaeus*, 17 – *Fagopyrum esculentum*, 18 – *Linum usitatissimum*

Fig. 4. Electrophoretic bands of amplification products of archaeological and herbarium DNA (locus *trnL-trnF*): M – Molecular weight marker St 100 (Biolabmix); archaeological samples: 1 – *Rubus* sp., 2 – *Fragaria* sp., 3 – *Cucumis* sp., 4 – *Rubus* sp., 5 – *Fragaria* sp., 6 – *Cucumis* sp.; herbarium specimens:  
7 – *Cucumis sativus*, 8 – *Fragaria vesca*, 9 – *Fragaria viridis*, 10 – *Rubus idaeus*,  
11 – *Fagopyrum esculentum*, 12 – *Linum usitatissimum*, 13 – *Cucumis sativus*, 14 – *Fragaria vesca*,  
15 – *Fragaria viridis*, 16 – *Rubus idaeus*, 17 – *Fagopyrum esculentum*, 18 – *Linum usitatissimum*

Таким образом, результаты ПЦР демонстрируют схожие продукты амплификации у археологических и гербарных образцов по двум различным межгенным спайсерам (*psbK-psbI* и *trnL-trnF*), что подтверждает эффективность применяемых методов анализа. Межгенный

спайсер *psbK-psbI* показал значительный разброс размеров длин амплифицируемых фрагментов между разными видами, в то время как *trnL-trnF*, напротив, демонстрирует более узкий диапазон длин продуктов амплификации (390–396 пн.). В обоих случаях контроль отри-



цательный, что свидетельствует об отсутствии неспецифических продуктов амплификации (контаминации). Несмотря на возраст археоботанической находки и условий «погребения», успешные результаты экстракции и амплификации говорят о сохранности генетической информации и возможности дальнейшего изучения изучение фрагментов древней ДНК.

Полученные результаты открывают перспективу для сравнительного анализа древних и гербарных образцов, поскольку доказаны эффективность применяемых методов выделения и амплификации ДНК.

### Обсуждение результатов

Нам удалось подобрать методы выделения ДНК из археоботанических находок и гербарного материала из коллекции ВИР, а также продемонстрировать возможность дальнейшей работы с генетическим материалом путём постановки ПЦР с праймерами к участкам пластидного генома.

Использованные при выделении с помощью набора D-Plants спин-колонки позволяют ДНК связаться с силикатной мембраной. Через мембрану осуществляется отмыкация нуклеиновых кислот от компонентов-ингибиторов (белки, полисахариды, фенольные соединения) и дальнейшая элюция. Данный метод показал себя наиболее успешным при выделении древней ДНК из карбонизированных зерновок ячменя (*Hordeum vulgare L.*) археологического памятника городища Усвяты XII века и позволило определить архитекторику колосьев (Semilet et al., 2024 a).

В основе протокола Diamond лежит использование сорбента, который при контакте с растительным материалом положительно влияет на количество выделенной ДНК. Этот набор показал наибольшую в сравнении с другими образцами эффективность при экстракции древней ДНК для большинства археологиче-

ских образцов (*Rubus sp.*, *Fragaria sp.*).

При использовании протокола выделения ДНК на спин-колонках набора D-Plants (Биолабмикс) наибольшее количество ДНК получено при экстракции из гербарных и археологических образцов рода *Cicutis*. Проведение ПЦР в молекулярно-генетических исследованиях археологических и гербарных образцов позволяет, во-первых, оценить эффективность амплификации, во-вторых, доказать пригодность образцов для дальнейшего молекулярно-генетического исследования (Fernandez et al., 2013; Milanesi et al., 2016; Semilet et al., 2024 a, b.). В результате амплификации двух участков пластидной ДНК из гербарных и археоботанических образцов разных видов были получены фрагменты ожидаемого размера.

### Выводы

При выборе протокола выделения ДНК из гербарных и археологических образцов важно учитывать степень сохранности материала и видоспецифические особенности растений. Полученные данные подтверждают необходимость использования индивидуального подхода при подборе метода выделения ДНК. Нам удалось экстрагировать древнюю ДНК из образцов, полученных при раскопках Свято-Троицкой Сергиевой Лавры. Несмотря на определённые сложности в работе, из гербарного материала коллекции ВИР выделена ДНК хорошей концентрации, пригодная для ПЦР. При постановке амплификации с праймерами к участкам пластидного генома получены ампликоны одинаковых размеров у археоботанического материала и гербариев ВИР. Представленные результаты дают возможность предположить, что дальнейшие палеогенетические исследования образцов из Свято-Троицкой Сергиевой Лавры позволят выявить генетическое сходство с современными возделываемыми растениями.



## References / Литература

- Agakhanov M.M., Bagmet L.V., Tikhonova N.G., Erastenkova M.V., Kislin E.N., Ukhatova Yu.V., Khlestkina E.K. The plant germplasm and herbarium (WIR) collections maintained at VIR as contributors to grape genetic diversity conservation, expansion and utilization. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2024;185(1):191-211. [in Russian] (Араканов М.М., Багмет Л.В., Тихонова Н.Г., Ерастенкова М.В., Кислин Е.Н., Ухатова Ю.В., Хлесткина Е. К. Коллекция ВИР и гербарий ВИР (WIR) для сохранения, расширения и использования генетического разнообразия винограда. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2024;185(1):191-211. DOI: 10.30901/2227-8834-2024-1-191-211)
- Ames M., Spooner D.M. DNA from herbarium specimens settles a controversy about origins of the European potato. *American Journal of Botany*. 2008;95(2):252-257. DOI: 10.3732/ajb.95.2.252
- Antonova O.Yu., Klimenko N.S., Rybakov D.A., Fomina N.A., Zheltova V.V., Novikova L.Yu., Gavrilenco T.A. SSR analysis of modern Russian potato varieties using DNA samples of nomenclatural standards. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2020;3(4):77-96. [in Russian] (Антонова О.Ю., Клименко Н.С., Рыбаков Д.А., Фомина Н.А., Желтова В.В., Новикова Л.Ю., Гавриленко Т.А. SSR-анализ современных российских сортов картофеля с использованием ДНК номенклатурных стандартов. *Биотехнология и селекция растений*. 2020;3(4):77-96. DOI: 10.30901/2658-6266-2020-4-o2)
- Badr A., Müller K., R. Schäfer-Pregl, El Rabey H., Effgen S., Ibrahim H.H., Pozzi C., Rohde W., Salamini F. On the origin and domestication history of barley (*Hordeum vulgare*). *Molecular biology and evolution*. 2000;17(4):499-510. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026330
- Bakker F.T., Bieker V.C., Martin M.D. Herbarium collectionbased plant evolutionary genetics and genomics. *Frontiers in Ecology and Evolution*. 2020;8:603948. DOI: 10.3389/fevo.2020.603948
- Bilgic H., Hakki E.E., Pandey A., Khan M.K., Akkaya M.S. Ancient DNA from 8400 year-old Catalhöyük wheat: implications for the origin of neolithic agriculture. *PLoS One*. 2016;11(3):1-18. DOI: 10.1371/journal.pone.0151974
- Blatter R.H.E., Jacomet S., Schlumbaum A. Little evidence for the preservation of a single-copy gene in charred archaeological wheat. *Ancient Biomolecules*. 2002;4(2):65-77. DOI: 10.1080/1358612021000010677
- Brown T.A., Cappellini E., Kistler L., Lister D.L., Oliveira H.R., Schlumbaum A., Wales N. Recent advances in ancient DNA research and their implications for archaeobotany. *Vegetation History and Archaeobotany*. 2015;24(1):207-214. DOI: 10.1007/s00334-014-0489-4
- Carey S.J., Becklund L.E., Fabre P.P., Schenk J.J. Optimizing the lysis step in CTAB DNA extractions of silica-dried and herbarium leaf tissues. *Applications in plant sciences*. 2023;11(3):1-8. DOI: 10.1002/aps3.11522
- Chomicki G., Renner S.S. Watermelon origin solved with molecular phylogenetics including Linnaean material: another example of museomics. *New Phytologist*. 2015;205(2):526-532. DOI: 10.1111/nph.13163
- Chukhina I.G., Bagmet L.V., Dorofeyev V.I., Shmakov A.I., Ukhatova Yu.V. Herbarization of extra valuable specimens included into the National Catalogue of Plant Genetic Resources. *Vavilovia*. 2024;7(4):34-45. [in Russian] (Чухина И.Г., Багмет Л.В., Дорофеев В.И., Шмаков А.И., Ухатова Ю.В. Гербаризация особо ценных образцов, включаемых в национальный каталог генетических ресурсов растений. *Vavilovia*. 2024;7(4):34-45. DOI: 10.30901/2658-3860-2024-4-o1)
- Doyle J.J., Dickson E.E. Preservation of plant species for DNA restriction endonuclease analysis. *Taxon*. 1987;36(4):715-722. DOI: 10.2307/1221122
- Drabkova L.Z. DNA extraction from herbarium specimens. *Molecular plant taxonomy: methods and protocols*. 2014;1115:69-84. DOI: 10.1007/978-1-62703-767-9\_4
- Elbaum R., Melamed-Bessudo C., Boaretto E., Galili E., Lev-Yadun S., Levy A.A., Weiner S. Ancient olive DNA in pits: preservation, amplification and sequence analysis. *Journal of Archaeological Science*. 2006;33(1):77-88. DOI: 10.1016/j.jas.2005.06.011
- Farrer A.G., Wright S.L., Skelly E., Eisenhofer R., Dobney K., Weyrich L.S. Effectiveness of decontamination protocols when analyzing ancient DNA preserved in dental calculus. *Scientific reports*. 2021;11(1):7456. DOI: 10.1038/s41598-021-86100-w
- Fazekas A.J., Burgess K.S., Kesaniakurti P.R., Graham S.W., Newmaster S.G., Husband B.C., Percy D.M., Hajibabaei M., Barrett S.C.H. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS One*. 2008;3(7):1-12. DOI: 0.1371/journal.pone.0002802
- Fernandez E., Thaw S., Brown T.A., Arroyo-Pardo E., Buxó R., Serret M.D., Araus J.L. DNA analysis in charred grains of naked wheat from several archaeological sites in Spain. *Journal of Archaeological Science*. 2013;40(1):659-670. DOI: 10.1016/j.jas.2012.07.014
- Filatova S., Claassen B., Torres G., Krause-Kyora B., Holtgrewe Stukenbrock E., Kirleis W. Toward an investigation of diversity and cultivation of rye (*Secale cereale* ssp. *cereal* L.) in Germany: Methodological Insights and First Results from Early Modern Plant Material. *Agronomy*. 2021;11(12):2451. DOI: 10.3390/agronomy11122451
- Fomina N.A., Antonova O.Yu., Chukhina I.G., Gavrilenco T.A. Herbarium collections in molecular genetic studies. *Turczaninowia*. 2019;22(4):104-118. [in Russian] (Фомина Н.А., Антонова О.Ю., Чухина И.Г., Гавриленко Т.А. Гербарные коллекции в молекулярно-генетических исследованиях. *Turczaninowia*. 2019;22(4):104-118). DOI: 10.14258//turczaninowia.22.4.12
- Gavrilenco T.A., Chukhina I.G. Nomenclatural standards of modern Russian potato cultivars preserved at the VIR Herbarium (WIR): a new approach to cultivar genepool registration in a genebank. *Plant biotechnology and breeding*. 2020;3(3):6-17. [in Russian] (Гавриленко Т.А., Чухина И.Г. Номенклатурные стандарты современных российских сортов картофеля, хранящиеся в гербарии ВИР (WIR): новые подходы к регистрации сортового генофонда в генбанках. *Биотехнология и селекция растений*. 2020;3(3):6-17. DOI: 10.30901/2658-6266-2020-3-o2)
- Gavrilenko T.A., Chukhina I.G., Antonova O.Yu., Krylova E.A., Shipilina L.Yu., Oskina N.A., Kostina L.I. Comparative analysis of the genetic diversity of Chilean cultivated potato based on a molecular study of authentic herbarium specimens and present-day gene bank accessions. *Plants*. 2023;12(1):174. DOI: 10.3390/plants12010174
- Goloubinoff P., Pääbo S., Wilson A.C. Evolution of maize inferred from sequence diversity of an *Adh2* gene segment from archaeological specimens. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1993;90(5):1997-2001. DOI: 10.1073/pnas.90.5.1997
- Gouker F.E., Guo Y., Svoboda H.T., Pooler M.R. Optimizing efficient PCR-amplifiable DNA extraction from herbarium specimens. *Applications in Plant Sciences*. 2023;11(3):e11521. DOI: 10.1002/aps3.11521
- Hansson M.C., Foley B.P. Ancient DNA fragments inside classical Greek amphoras reveal cargo of 2400-year-old shipwreck. *Journal of Archaeological Science*. 2008;35(5):1169-1176. DOI: 10.1016/j.jas.2007.08.009
- Kates H.R., Doby J.R., Folk R.A., Guralnick R.P., LaFrance R., Siniscalchi C.M., Soltis D.E., Soltis P.S. The effects of



- herbarium specimen characteristics on short-read NGS sequencing success in nearly 8000 specimens: old, degraded samples have lower DNA yields but consistent sequencing success. *Frontiers in plant science*. 2021;12:1-13. DOI: 10.3389/fpls.2021.669064
- Kistler L., Newsom L.A., Ryan T.M., Clarke A.C., Smith B.D., Perry G.H. Gourds and squashes (*Cucurbita* spp.) adapted to megafaunal extinction and ecological anachronism through domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;11(49):15107-15112. DOI: 10.1073/pnas.1516109112
- Krinitzyna A.A., Sizova T.V., Zaika M.A., Speranskaya A.S., Sukhorukov A. P. A rapid and cost-effective method for DNA extraction from archival herbarium specimens. *Biochemistry*. 2015;80(11):1698-1706. [in Russian] (Криницына А.А., Сизова Т.В., Заика М.А., Сперанская А.С., Сухоруков А.П. Простой и быстрый метод выделения ДНК из гербарных образцов долгого срока хранения. *Биохимия*. 2015;80(11):1698-1706.)
- Lebedeva M.V., Levkoev E.A., Volkov V.A., Fetisova A.A., Navalikhin S.V., Shabunin D.A., Danilov Yu.I., Zhigunov A.V., Potokina E.K. The recovering of breeding achievements of *Populus × leningradensis* bogd. and *Populus × newensis* bogd. Based on microsatellite analysis. *Russian journal of genetics*. 2016;52(10):1046-1055. DOI: 10.1134/S1022795416100069
- Lister D.L., Bower M.A., Howe C.J., Jones M.K. Extraction and amplification of nuclear DNA from herbarium specimens of emmer wheat: a method for assessing DNA preservation by maximum amplicon length recovery. *Taxon*. 2008;57(1):254-258. DOI: 10.2307/25065966
- Lister D.L., Jones H., Oliveira H.R., Petrie C.A., Liu X., Cockram J., Kneale C.J., Kovaleva O.N., Jones M.K. Barley heads east: Genetic analyses reveal routes of spread through diverse Eurasian landscapes. *PloS One*. 2018;13(7):1-29. DOI: 10.1371/journal.pone.0196652
- Malenica N., Maletic E., Simon S., Pejic I. Grapevine variety determination from herbarium and archeological specimens. In: *ISHS Acta Horticulturae 1046: X International Conference on Grapevine Breeding and Genetics*; 2014 Jule 20; Geneva, New York, USA; 2014. p.603-608. DOI: 10.17660/ActaHortic.2014.1046.83
- Marinček P., Wagner N.D., Tomasello S. Ancient DNA extraction methods for herbarium specimens: When is it worth the effort? *Applications in Plant Sciences*. 2022;10(3):e11477. DOI: 10.1002/aps3.11477
- Milanese C., Scali M., Vignani R., Cambi F., Dugerdil L., Faleri C., Cresti M. Archaeobotanical reconstructions of vegetation and report of mummified apple seeds found in the cellar of a first-century Roman villa on Elba Island. *Comptes Rendus Biologies*. 2016;339(11-12):487-497. DOI: 10.1016/j.crvi.2016.09.003
- Palmer S.A., Clapham A.J., Rose P., Freitas F.O., Owen B.D., Beresford-Jones D., Moore J.D., Kitchen J.L., Allaby R.G. Archaeogenomic evidence of punctuated genome evolution in *Gossypium*. *Molecular Biology and Evolution*. 2012;29(8):2031-2038. DOI: 10.1093/molbev/mss070
- Perez-Escobar O.A., Tusso S., Przelomska N.A.S., Wu S., Ryan P., Nesbitt M., Silber M.V., Preick M., Fei Z., Hofreiter M., Chomicki G., Renner S.S. Genome Sequencing of up to 6,000-Year-Old *Citrullus* Seeds Reveals Use of a Bitter-Fleshed Species Prior to Watermelon Domestication. *Molecular biology and evolution*. 2022;39(8):msac168. DOI: 10.1093/molbev/msac168
- Särkinen T., Staats M., Richardson J.E., Cowan R.S., Bakker F.T. How to Open the Treasure Chest? Optimising DNA Extraction from Herbarium Specimens. *PLoS One*. 2012;7(8):e43808. DOI: 10.1371/journal.pone.0043808
- Semilet T.V., Shipilina L.Yu., Khlestkina E.K., Shvachko N.A. PCR test to determine whether the destroyed remains of carbonized seeds belong to the genus *Hordeum* L. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2024a;7(4):105-113. [in Russian] (Семилет Т.В., Шипилина Л.Ю., Хлесткина Е.К., Швачко Н.А. ПЦР-тест для установления принадлежности разрушенных остатков карбонизированных семян к роду *Hordeum* L. *Биотехнология и селекция растений*. 2024a;7(4):105-113.) DOI: 10.30901/2658-6266-2024-4-o7
- Semilet T.V., Shvachko N.A., Kovaleva O.N., Shipilina L.Yu., Khlestkina E.K. DNA polymorphism in loci associated with the adaptation of barley to environmental conditions, when comparing seed samples from archaeological excavations of the 12th century with the VIR collection accessions of different geographical origin. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2024b;7(2):67-74. [in Russian] (Семилет Т.В., Швачко Н.А., Ковалева О.Н., Шипилина Л.Ю., Хлесткина Е.К. Полиморфизм ДНК в локусах, связанных с адаптацией ячменя к условиям окружающей среды, при сравнении выборок семян из археологических раскопов XII века с образцами из коллекции ВИР различного географического происхождения. *Биотехнология и селекция растений*. 2024b;7(2):67-74.) DOI: 10.30901/2658-6266-2024-2-06
- Sinitsyna T.A., Herden T., Friesen N. Dated phylogeny and biogeography of the Eurasian *Allium* section *Rhizirideum* (Amaryllidaceae). *Plant Systematics and Evolution*. 2016;302(9):1311-1328. DOI: 10.1007/s00606-016-1333-3
- Srinivasan M., Sedmak D., Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *American Journal of Pathology*. 2002;161(6):1961-1971. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64472-0
- Staats M., Erkens R.H.J., Bakker F.T., Geml J., Kraaijeveld K., Richardson J.E., Stielow B., van de Vossenberg B., Wieringa J.J. Genomic treasure troves: complete genome sequencing of herbarium and insect museum specimens. *PLoS One*. 2013;8(7):1-9. DOI: 10.1371/journal.pone.0069189
- Wales N., Ramos Madrigal J., Cappellini E., Carmona Baez A., Samaniego Castruita J.A., Romero-Navarro J.A., Caroe C., Avila-Arcos M.C., Penalosa F., Moreno-Mayar J.V., Gasparian B., Zardaryan D., Bagoyan T., Smith A., Pinhasi R., Bosi G., Fiorentino G., Grasso A.M., Celant A., Bar-Oz G., Tepper Y., Hall A., Scalabrin S., Miculan M., Morgante M., Di Gaspero G., Gilbert M.T.P. The limits and potential of paleogenomic techniques for reconstructing grapevine domestication. *Journal of Archaeological Science*. 2016;72:57-70. DOI: 10.1016/j.jas.2016.05.014
- Yang J.Y., Pak J.H. Phylogeny of Korean *Rubus* (Rosaceae) based on its (nrDNA) and trnL/F intergenic region (cpDNA). *Journal of Plant Biology*. 2006;49(1):44-54.
- Zvyagin A.S. Extraction of DNA from herbarium leaves *Vitis vinifera* L. *Polythematic online scientific journal of Kuban State Agrarian University*. 2010;58(4):436-447. [in Russian] (Звягин А.С. Выделение ДНК из гербарных листьев *Vitis vinifera* L. *Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета*. 2010;58(4):436-447.)

**Сведения об авторах**

- Анна Владимировна Буракова**, аспирант, младший научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, a.burakova@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0009-0005-1309-2615>
- Татьяна Вячеславовна Семилет**, научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская 42, 44, t.semilet@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7275-3878>
- Антон Михайлович Камнев**, младший научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская 42, 44, antonkamen@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8103-2191>
- Михаил Евгеньевич Лапкасов**, аспирант, младший научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, m.lapcasov@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0009-0006-0178-0805>
- Лилия Юрьевна Шипилина**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, l.shipilina@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7590-3173>
- Ирина Георгиевна Чухина**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, i.chukhina@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3587-6064>

**Information about the authors**

- Anna V. Burakova**, Graduate Student, Junior Researcher, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, a.burakova@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0009-0005-1309-2615>
- Tatiana V. Semilet**, Researcher, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, t.semilet@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7275-3878>
- Anton M. Kamnev**, Junior Researcher, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, antonkamen@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8103-2191>
- Mikhail E. Lapkasov**, Graduate Student, Junior Researcher, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, m.lapcasov@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0009-0006-0178-0805>
- Liliya Yu. Shipilina**, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, l.shipilina@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7590-3173>
- Irena G. Chukhina**, Cand. Sci. (Biology), Leading Research Scientist. N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, i.chukhina@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3587-6064>

**Вклад авторов:** все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

**Contribution of the authors:** the authors contributed equally to the article.

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interests:** the authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 25.07.2025; одобрена после рецензирования 05.09.2025; принятая к публикации 23.09.2025.

The article was submitted 25.07.2025; approved after reviewing 05.09.2025; accepted for publication 23.09.2025.