

Краткое сообщение

УДК 575.1:575.2:561:631.5

DOI: 10.30901/2658-6266-2024-4-07



## ПЦР-тест для установления принадлежности разрушенных остатков карбонизированных семян к роду *Hordeum* L.

Т. В. Семилет, Л. Ю. Шипилина, Е. К. Хлесткина, Н. А. Швачко

Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия

**Автор, ответственный за переписку:** Семилет Татьяна Вячеславовна, t.semilet@vir.nw.ru

Археологи во время раскопок исторических памятников находят разнообразные артефакты, свидетельствующие о жизни и быте наших далеких предков. Особое внимание уделяется останкам живых организмов. Они свидетельствуют не только о хозяйственной деятельности древних земледельцев, но и помогают выявлять филогенетические взаимоотношения и процессы доместики в мировых центрах разнообразия. Зачастую из-за длительного нахождения палеообъектов в условиях, не способствующих их сохранности, они разрушаются и становится невозможным определить их видовую принадлежность. Поэтому археологи все чаще прибегают к помощи палеогенетиков. В России известны работы по изучению древней ДНК (дДНК) из останков человека и животных. Однако, палеогенетические исследования ископаемых остатков растений, таких как пыльца, семена, древесина, немногочисленны. На территории Усвяцкого городища (Псковская область) в 2019 году были найдены карбонизированные зерновки зерновых культур. Находка датируется XII веком. В результате морфологического анализа смеси семян были обнаружены зерновки, степень разрушенности которых не позволяет определить видовую принадлежность по анализу микрорельефа. Поэтому целью данного исследования послужила разработка таксон-специфичных праймеров, дающих короткий продукт амплификации, для анализа фрагментированной дДНК разрушенных зерновок ячменя. В результате был разработан ПЦР-тест HORDEL, который рекомендуется к использованию при идентификации растительных остатков (карбонизированных семян), принадлежащих роду *Hordeum* L.

**Ключевые слова:** *Elf3*, *Hordeum*, Усвяты, древняя ДНК, палеогенетика

**Благодарности:** Работа выполнена в рамках государственного задания ВИР согласно тематическому плану НИР по теме FGEM-2024-0002 «Исследование растительных биоресурсов в пространственном и временном аспекте с применением современных цифровых и генетических технологий».

**Для цитирования:** 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*. 2024;7(4):105-113. DOI: 10.30901/2658-6266-2024-4-07

Прозрачность финансовой деятельности: Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы. Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы.

© Семилет Т.В., Шипилина Л.Ю., Хлесткина Е.К., Швачко Н.А., 2024

## Brief communication

DOI: 10.30901/2658-6266-2024-4-o7

## PCR test to determine whether the destroyed remains of carbonized seeds belong to the genus *Hordeum* L.

Tatiana V. Semilet, Liliya Yu. Shipilina, Elena K. Khlestkina, Natalia A. Shvachko

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

**Corresponding author:** Tatiana V. Semilet, t.semilet@vir.nw.ru

During excavations of historical monuments, archaeologists find various artifacts that testify to the existence and everyday life of our distant ancestors. Particular attention is paid to the remains of living organisms. They not only provide evidence of the economic activity of ancient farmers, but also help to identify phylogenetic relationships and domestication processes in the world's centers of diversity. Due to the long-term presence of paleontological objects in the environment that is not conducive to preservation, they often get destroyed and it becomes impossible to determine which species they belong to. Therefore, archaeologists increasingly resort to the help of paleogeneticists. The works on studies of ancient DNA (aDNA) from human and animal remains are known in Russia. However, paleogenetic studies of fossil plant remains such as pollen, seeds, and timber are few. In 2019, carbonized grains of cereal crops were found on the territory of the Usvyaty settlement in Pskov Region. The findings date back to the 12th century. The morphological analysis of the seed mixture resulted in finding grains, the degree of destruction of which prevented determination of the species they belong to by analyzing their microrelief. Therefore, the aim of this study was to develop taxon-specific primers that yield a short amplification product for the analysis of fragmented aDNA from the destroyed barley caryopses. As a result, a PCR test named HORDELFL was developed, which is recommended for the identification of plant residues (carbonized seeds) belonging to the genus *Hordeum* L.

**Keywords:** *Elf3*, *Hordeum*, Usvyaty, ancient DNA, paleogenetics

**Acknowledgements:** The work was carried out within the framework of the State Assignment of VIR in accordance with the thematic plan of research on the topic FGEM-2024-0002 «Study of plant bioresources in spatial and temporal aspects using modern digital and genetic technologies»

**For citation:** 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*. 2024;7(4):105-113. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2024-4-o7

Financial transparency: The authors have no financial interest in the presented materials or methods. The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work. The journal's opinion is neutral to the presented materials, the authors, and their employers.

© Semilet T.V., Shipilina L.Yu., Khlestkina E.K., Shvachko N.A., 2024

## Введение

Исследователи во время археологических раскопок находят растительные остатки (пыльцу, семена, древесину) разной степени целостности. При хорошей сохранности внешней структуры возможно проанализировать внешний облик – форму, поверхность, цвет, и установить родовую и, редко, видовую принадлежность древних растений (Bouby, 2001). Много трудностей возникает при идентификации фрагментированного материала. Фрагментированный материал сложно изучать с применением морфологических методов из-за поверхностного повреждения и размытости видоспецифических признаков растений (Jacomet, 2006). В связи с этим, наряду с идентификацией по морфологическим признакам, сегодня для исследования археологических находок растительного происхождения все чаще применяют методы молекулярной генетики (Pollmann et al., 2005; Fernandez et al., 2013; Bilgic et al., 2016; Semilet et al., 2023). Раскопки исторических памятников активно ведутся за рубежом, на территории Плодородного полумесяца, и в ряде других очагов мирового земледелия (Helback, 1959; Charles, Vogaard, 2011; Lister et al., 2013; Riehl et al., 2014). Распространение культурных растений в ранние века и историю земледелия в северных широтах до настоящего времени исследовали лишь при помощи методов идентификации, основанных на изучении морфологических признаков найденных растительных остатков. Анализ древней ДНК растений, найденных на территории России, не получил своего распространения, однако все новые археологические находки представляют интерес для комплексных исследований.

При работе с древней ДНК растений необходимо учитывать качество материала и подбирать методы исследования. Качество экстрагированного генетического материала зависит прежде всего от условий, из которых были изъяты образцы. На основании современных археологических находок ученые отмечают, что семена сохраняются при высушивании, заболачивании, полном или частичном обугливание, при этом семена «консервируются» в результате пожаров природного или антропогенного происхождения, и минерализации, а точнее кальцификации (Fernandez et al., 2013; Wales, Kistler, 2019).

При помощи сравнительного анализа данных о геноме разных таксонов растений осуществляют поиск таксон-специфичных участков генома – от различий в одну пн (Khlestkina et al., 2009; Benito et al., 2010) до крупных делеций/ инсерций (Wang et al., 2005; Khlestkina, Shoeva, 2014). Такие подходы к идентификации растительного материала, основанные на удобных методах лабораторного анализа, применяют при изучении отдаленных гибридов и интрогрессивных линий. Например, Адонина и соавторы (Adonina et al., 2011) для уточнения хромосомного состава генома гибридных растений, полученных от пшеницы и ржи, применяли в качестве таксон-специфичных маркеров микросателлиты и маркеры, разрабо-

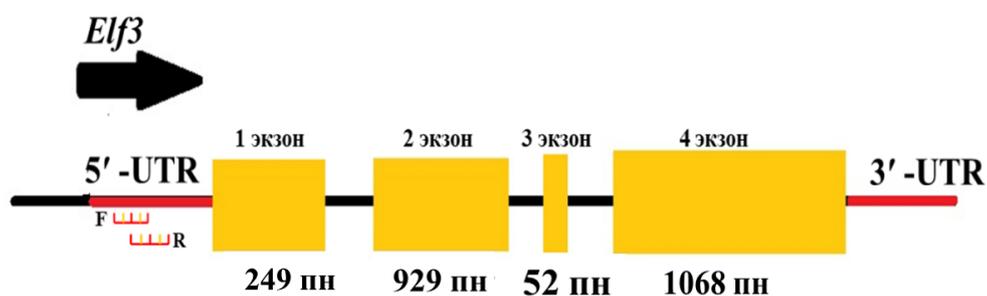
танные на основе нуклеотидных последовательностей генов. Удобными маркерами для дифференциации геномного материала в гибридах зерновых культур считаются микросателлитные маркеры (Khlestkina et al., 2004; Benito et al., 2010). Для идентификации родов и видов наиболее широко используют методы ДНК-штрихкодирования (Kress, Erickson, 2012; Li et al., 2015; Grazina et al., 2020; Antil et al., 2023).

Однако методы, разработанные для анализа свежего материала или высушенных растительных остатков, далеко не всегда подходят для изучения разрушенной древней ДНК (дДНК) из карбонизированного материала (Wales et al., 2014).

В последние годы для анализа дДНК, в том числе сильно фрагментированной, широко применяют методы NGS (англ. New Generation Sequencing). Однако только для цели уточнения таксономической принадлежности поврежденных остатков карбонизированных семян из скоплений, которые содержат заведомо узкий перечень искомым таксонов, применение NGS с последующим анализом будет более трудоемким и избыточным. В этих случаях наиболее удобным подходом было бы ПЦР-тестирование. Разработка такого подхода требует наличия праймеров для получения коротких продуктов амплификации с учетом того, что ДНК-матрица фрагментирована (Bunning et al., 2012; Pérez-Escobar et al., 2022).

В данном исследовании показана возможность использования ПЦР-теста для идентификации разрушенных зерновок XII века, предположительно являющихся ячменем. В качестве референса и разработки тест-системы был выбран ген *Elf3*, расположенный на хромосоме 1Н (Hemming et al., 2012; Boden et al., 2014; Deng et al., 2015; Huang et al., 2017). На сегодняшний день хорошо изучена роль *Elf3* в формировании ответа на длину светового дня у ячменя и переходом к раннему колошению. Ген кодирует локализованный в ядре белок ELF3-like protein 2, важный для восприятия продолжительности светового периода и регуляции экспрессии генов циркадных ритмов (Boden et al., 2014). *Elf3* (HORVU. MOREX.r3.1HG0095050) состоит из четырех экзонов и трех интронов общей длиной 4417 (Phytozome 13, 2024). На основании известных данных о строении гена, аллельных вариантов, связанных с формированием ответа на длину светового дня и консервативных участков, встречающихся у разных форм растений рода *Hordeum*, *Elf3* был выбран в качестве тест-системы (Faure et al., 2012; Zakhrebekova et al., 2012; Boden et al., 2014; Hill et al., 2016) (рис.1).

Поэтому целью данного исследования является разработка подхода для молекулярно-генетической идентификации карбонизированных остатков ячменя среди ископаемых растительных материалов, степень разрушенности которых не позволяет определить видовую принадлежность по анализу микрорельефа зерновок.



**Рис. 1. Схема гена *Eif3* *Hordeum vulgare***  
5'-UTR и 3'-UTR – нетранслируемые области; F – прямой праймер;  
R – обратный праймер тест-системы HORDEL F

**Fig. 1. Diagram of *Eif3* gene of *Hordeum vulgare***  
5'-UTR and 3'-UTR – untranslated regions; F – forward primer;  
R – reverse primer of the HORDEL F test system

## Материалы и методы

**Объектами исследования** послужили карбонизированные зерновки XII века, найденные в 2019 году при раскопке Усвятского городища (Псковская область). Выделение древней ДНК (дДНК) осуществляли из пула семян (в каждую пробирку помещали три зерновки). Для сравнения в исследование включена выборка современных образцов зерновых и зернобобовых растений из мировой коллекции ВИР: *Pisum sativum* L. (к-6933), *Triticum aestivum* L. (к-37178), *Avena sativa* L. (к-14516), *Secale cereale* L., *Hordeum spontaneum* (K. Koch) Thell. (w-610), *Hordeum vulgare* L. (к-27605).

**Методы исследования.** Молекулярно-генетические исследования осуществляли в одном из лабораторных помещений ВИР – изолированном боксе для работы с дДНК, оснащённом УФ-лампами, в котором были соблюдены все условия, исключающие контаминацию современным генетическим материалом. Выделение дДНК осуществляли с помощью набора DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Германия). В протокол внесены некоторые модификации: инкубация в морозильной камере (–23°C) до 2 часов, уменьшение объема буфера для промывки ДНК на колонке (400 мкл, вместо 500 мкл), один этап элюции ДНК. Концентрацию ДНК измеряли спектрофотометрическим методом на приборе NanoPhotometer NanoDrop (IMPLEN, Германия). Для повышения количества ДНК была проведена рефрагментация с последующей амплификацией дДНК с использованием набора Sigma-Aldrich GenomePlex Complete Whole Genome Amplification (WGA kit, Великобритания). Коммерческий набор для обогащения включает реактивы (ферменты) и универсальные олигонуклеотидные праймеры, позволяющие достроить ДНК по принципу ком-

плементарности и накопить пул фрагментов для использования обогащенной ДНК в последующем анализе, в том числе для повышения точности сборки исследуемых областей генома.

Анализ последовательности генов осуществляли в публичных базах данных нуклеотидных последовательностей (GeneBank NCBI, 2024; Phytozome13, 2024). На основе найденных последовательностей сконструированы праймеры для ПЦР-тестирования в программе Oligo Primer Analysis Software v. 6.71 (Offerman, 2003).

При создании праймеров учитывали следующие условия:

- специфичность ПЦР-теста должна быть подтверждена на генетическом материале современных растений;
- продукт отжига не должен превышать размер в 300 пн. Работа с короткими фрагментами обусловлена повреждением структуры, характерным для дДНК.

Данные условия необходимо выполнять для последующего использования праймеров при постановке ПЦР с дДНК и секвенирования по методу Сенгера.

Амплификацию дДНК проводили по протоколу ступенчатой ПЦР. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 200 нг матричной ДНК после рефрагментации; 2,5 мМ dNTP; 1× ПЦР-буфер – 67 мМ TrisHCl, pH=8,8, 10 мМ dNTPs, 0,01% Твин-20; 12 мМ MgCl<sub>2</sub>; 5 ед/мкл Taq-Polymerase; по 1 мкМ прямого и обратного праймеров. Протокол ступенчатой ПЦР включал следующие стадии: денатурация в течение 2 мин при 94°C; 13 циклов, состоящих из денатурации 15 с при 94°C, отжига 30 с при 65°C (со снижением температуры на 0,7°C/цикл) и полимеризации 45 с при 72°C; 24 цикла, состоящие из денатурации 15 с при 94°C, отжига 30 с при 56°C, полимеризации 45 с при 72°C и финальной элонгации 10 мин при 72°C. Продукты ПЦР разделяли в 1,5% горизонтальном агарозном геле, который был окрашен бромидом этидия. Результат анализировали в ультрафиолетовом свете с использова-

нием системы гель-документирования Gel Doc XR<sup>+</sup> (BioRad, США) (Semilet et al., 2023).

## Результаты и обсуждение

На первом этапе в результате BLAST анализа у ячменя в базе данных Phytozome13 были найдены консервативные последовательности *Elf3* HORVU. MOREX. r3.1HG0095050 в положениях 33-53 пн и 303-320 пн и разработан ПЦР-тест HORDEL F с праймерами, дающими

короткий продукт амплификации. Также с помощью данного алгоритма был проведен локальный поиск участков гомологов гена *Elf3* у разных зерновых (рожь, пшеница, овес), зернобобовых культур (горох), который показал отсутствие идентичных фрагментов (рис. 2).

Тест-система позволяет с высокой вероятностью определять принадлежность растительного материала к роду *Hordeum*. Последовательности праймеров, температуры отжига и размер продукта ПЦР приведены в таблице.



Рис. 2. Выравнивание гомологов гена *Elf3* у зерновых  
Красными рамками обозначены последовательности праймеров

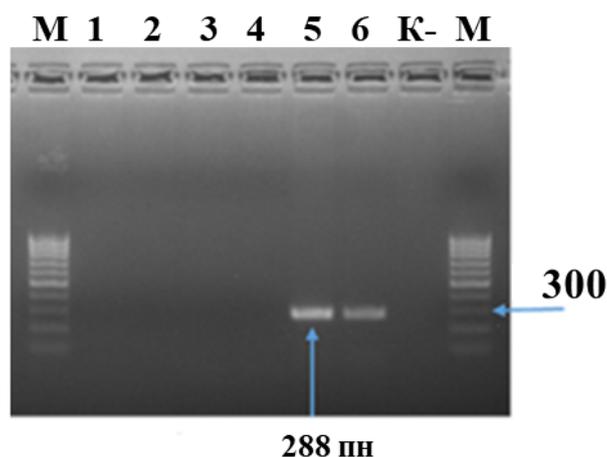
Fig. 2. Alignment of homologs of *Elf3* gene in cereals  
Primer sequences are framed in red

Таблица. Праймеры, использованные для определения принадлежности образца к роду *Hordeum*  
Table. Primers used to identify the sample as belonging to the genus *Hordeum*

Название/ Marker name	Прямой праймер/ Forward primer sequence (5'→ 3')	t°C	Обратный праймер/ Reverse primer sequence (5'→ 3')	t°C	Продукт, пн/ fragment size, bp
HORDEL F	CACCAGAGACACAGACCCTT	56,5	GCCATGCTCACTCACTCA	54,9	288

Перед амплификацией осуществляли проверку концентрации ДНК на спектрофотометре Nanodrop. До рефрагментации концентрация ДНК варьировала в диапазонах от 1,45±0,0145 (нг/мкл) до 2,0±0,02 (нг/мкл). После обогащения качество препаратов повышалось, и концентрация ДНК в среднем составила 200,8±2,01 (нг/мкл). Для проверки работы ПЦР-теста были взяты современные об-

разцы зерновых и зернобобовых культур из коллекции ВИР: *Pisum sativum*, *Triticum aestivum*, *Avena sativa*, *Secale cereale*, *Hordeum spontaneum*, *Hordeum vulgare* (рис. 3). Постановка ПЦР с парами праймеров к гену *Elf3* подтвердила специфичность амплификации у образцов рода *Hordeum*.



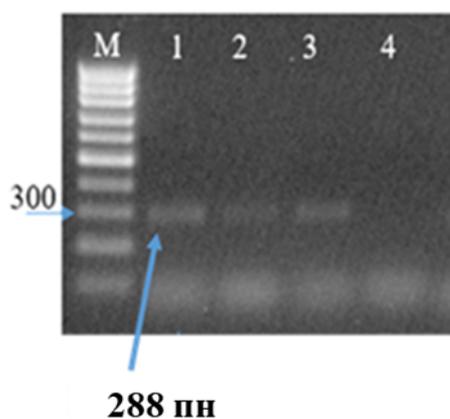
**Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации современных образцов ДНК зерновых и зернобобовых культур с геном *Eif3* по результатам ПЦР-теста HORDELF**

**Fig. 3. Electropherogram of amplification products of modern DNA samples from cereal and leguminous crops with *Eif3* gene based on the results of the PCR test HORDELF**

1 – *Pisum sativum*; 2 – *Triticum aestivum*; 3 – *Avena sativa*; 4 – *Secale cereale*;  
5 – *Hordeum vulgare*; 6 – *H. spontaneum*; М – Маркер молекулярного веса st100;  
К – отрицательный контроль/ М – Molecular weight marker st100; К – negative control.

На следующем этапе ПЦР-тест с полученными прай-мерами HORDELF применялся для определения принад-

лежности разрушенных карбонизированных остатков к роду *Hordeum* L. (рис. 4).



**Рис. 4. Электрофореграмма продуктов амплификации дДНК из остатков семян с геном *Eif3* (ПЦР-тест HORDELF)**

1-3 – образцы древней ДНК, 4 – отрицательный контроль, М – маркер молекулярного веса St100

**Fig. 4. Electropherogram of amplified DNA products from remains of seeds with *Eif3* gene (PCR test HORDELF)**

1-3 – ancient DNA samples, 4 – negative control, М – molecular weight marker St100

При работе с дДНК особое внимание уделяют высоко вариативным участкам с короткими tandemными повторами – STR – и с наличием однонуклеотидного полиморфизма – SNP (Schubert et al., 2014). При секвенировании и сравнении этих участков возможно не только выявить генетическое сходство с современными организмами, но и определить внешний облик образца, найденного в регионе проведения археологических раскопок, и предположить его происхождение, (Pérez-Escobar et al., 2022; Richards et al., 2022; Sadler et al., 2023; Vallebuena-Estrada et al., 2023; Pavlik et al., 2024). Однако, эти маркеры не всегда возможно применить к сильно разрушенным, фрагментированным находкам. Современные методы секвенирования – NGS – и ДНК-штрихкодирования достаточно затратны, требуют много времени для проведения анализа и не всегда оправданы при небольшом количестве материала.

Для более оперативного определения таксономической принадлежности поврежденных карбонизированных образцов можно разработать и применять ПЦР-тесты. В данной работе показана возможность проведения молекулярно-генетических исследований разрушенных от времени зерновок. ПЦР-тест HORDELF, применённый к фрагменту гена *Elf3*, доказал свою эффективность на выборке современных образцов культурных растений из коллекции ВИР. Дальнейшее применение теста к древним, разрушенным зерновкам позволило определить их принадлежность к роду *Hordeum*.

### Заключение

В работе показана возможность молекулярно-генетической идентификации карбонизированных остатков зерновок на основе ПЦР-теста HORDELF, специфичного для рода *Hordeum*, среди ископаемых растительных материалов, степень разрушенности которых не позволяет определить видовую принадлежность по анализу микрорельефа зерновок.

### References/Литература

Adonina I.G., Orlovskaya O.A., Tereshchenko O.Yu., Korenb L.V., Khotyleva L.V., Shumnyaya V.K., Salina E.A. Development of commercially valuable traits in hexaploid *Triticale* lines with *Aegilops* introgressions as dependent on the genome composition. *Russian Journal of Genetics*. 2011;47(4):453-461. DOI: 10.1134/S1022795411040028

Antil S., Abraham J.S., Sripoorna S., Maurya S., Dagar J., Makhija S., Bhagat P., Gupta R., Sood U., Lal R., Toteja R. DNA barcoding, an effective tool for species identification: a review. *Molecular Biology Reports*. 2023;50(1):761-775. DOI: 10.1007/s11033-022-08015-7

Benito C., Silva-Navas J., Fontecha G., Hernandez-Riquer M.V., Eguren M., Salvador N., Gallego F.J. From the rye *Alt3* and *Alt4* aluminum tolerance loci to orthologous genes in other cereals. *Plant Soil*. 2010;327:107-120.

Bilgic H., Hakki E.E., Pandey A., Khan M.K., Akkaya M.S. Ancient DNA from 8400 year-old Çatalhöyük wheat: implications for the origin of neolithic agriculture. *PLOS ONE*. 2016;11(3):e0151974. DOI: 10.1371/journal.pone.0151974

Boden S.A., Weiss D., Ross J.J., Davies N.W., Trevaskis B.,

Chandler P.M., Swain S.M. *EARLY FLOWERING 3* regulates flowering in spring barley by mediating gibberellin production and *FLOWERING LOCUS T* expression. *The Plant Cell*. 2014;26(4):1557-1569. DOI: 10.1105/tpc.114.123794

Bouby L. Lorge à deux range (*Hordeum distichum*) dans l'agriculture Gallo-Romaine: données archéobotaniques. *Revue Archéométrie*. 2001;25:35-44. [in French]

Bunning S.L., Jones G., Brown T.A. Next generation sequencing of DNA in 3300-year-old charred cereal grains. *Journal of Archaeological Science*. 2012;39(8):2780-2784. DOI: 10.1016/j.jas.2012.04.012

Charles M., Bogaard A. Charred plant macro-remains from Jeitun: implications for early cultivation and herding practices in western Central Asia. In: D.R. Harris (ed.) *Origins of agriculture in western Central Asia. An environmental-archaeological study*. Philadelphia: University of Pennsylvania Museum of Archaeology and Anthropology. 2011:150-165. DOI: 10.9783/9781934536513

Deng W., Clausen J., Boden S., Oliver S.N., Casao M.C., Ford B., Anderssen R.S., Trevaskis B. Dawn and dusk set states of the circadian oscillator in sprouting barley (*Hordeum vulgare*) seedlings. *PLoS One*. 2015;10(6):1-18. DOI: 10.1371/journal.pone.0129781

Faure S., Turner A.S., Gruszka D., Christodoulou V., Davis S.J., Korffet von M., Laurie D. Mutation at the circadian clock gene *Early maturity 8* adapts domesticated barley (*Hordeum vulgare*) to short growing seasons. *PNAS*. 2012;109(21):8328-8333. DOI: 10.1073/pnas.1120496109

Fernandez E., Thaw S., Brown T.A., Arroyo-Pardo E., Buxo 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

GeneBank NCBI, National Center for Biotechnology Information; 2024. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/> [accessed Dec. 3, 2024].

Grazina L., Amaral J.S., Mafra I. Botanical origin authentication of dietary supplements by DNA-based approaches. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2020;19:1080-1109. DOI: 10.1111/1541-4337.12551

Helback B.H. Domestication of food plants in the old world: joint efforts by botanists and archeologists illuminate the obscure history of plant domestication. *Science*. 1959;130(3372):365-372. DOI: 10.1126/science.130.3372.365

Hemming M.N., Walford S.A., Fieg S., Dennis E.S., Trevaskis B. Identification of high-temperature-responsive genes in cereals. *Plant Physiology*. 2012;158:1439-1450. DOI: 10.1104/pp.111.192013

Hill C.B., Li C. Genetic Architecture of Flowering Phenology in Cereals and Opportunities for Crop Improvement. *Frontiers in Plant Science*. 2016;19(7):1-23. DOI: 10.3389/fpls.2016.01906

Huang H., Gehan M.A., Huss S.E., Alvarez S., Lizarraga C., Gruebbling E.L., Gierer J., Naldrett M.J., Bindbeutel R.K., Evans B.S., Mockler T.C., Nusinow D.A. Cross-species complementation reveals conserved functions for *EARLY FLOWERING 3* between monocots and dicots. *Plant Direct*. 2017;1(14). DOI: 10.1002/pld3.18

Jacomot S. Identification of cereal remains from archaeological sites. Basel: Basel University, Archaeobotany Lab IPAS; 2006.

Khlestkina E.K., Than M.H., Pestsova E.G., Röder M.S., Malyshev S.V., Korzun V., Börner A. Mapping of 99 new microsatellite-derived loci in rye (*Secale cereale* L.) including 39 expressed sequence tags. *Theoretical and Applied Genetics*. 2004;109:725-732. DOI: 10.1007/s00122-004-1659-z

Khlestkina E.K., Tereshchenko O.Y., Salina E.A. Anthocyanin biosynthesis genes location and expression in wheat-rye hybrids. *Molecular Genetics and Genomics*. 2009;282:475-485. DOI: 10.1007/s00438-009-0479-x

Khlestkina E.K., Shoeva O.Y. Intron loss in the chalcone-flavanone isomerase gene of rye. *Molecular Breeding*. 2014;33(4):953-959. DOI: 10.1007/s11032-013-0009-8

Kress W.J., Erickson D.L. DNA Barcodes Methods and Protocols. In: Kress W., Erickson D. (eds). *DNA Barcodes. Methods in Molecular Biology*. Vol 858. Humana Press, Totowa, NJ. Humana

- Press; 2012. p. 3-8. DOI: 10.1007/978-1-61779-591-6\_1
- Li X., Yang Y., Henry R.J., Rossetto M., Wang Y., Chen S. Plant DNA barcoding: from gene to genome. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 2015;90(1):157-66. DOI: 10.1111/brv.12104
- Lister D.L., Jones H., Jones M.K., O'Sullivan D.M., Cockram J. Analysis of DNA polymorphism in ancient barley herbarium material: validation of the KASP SNP genotyping platform. *Taxon*. 2013;62(4):779-89. DOI: 10.12705/624.9
- Pavlik B.M., del Rio A., Bamberg J., Louderback L.A. Evidence for human-caused founder effect in populations of *Solanum jamesii* at archaeological sites: II. Genetic sequencing establishes ancient transport across the Southwest USA. *American Journal of Botany*. 2024;111(7):e16365. DOI: 10.1002/ajb2.16365
- Pérez-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
- Phytozome 13, The Plant Genomic Resource; 2024. Available from: [https://phytozome-next.jgi.doe.gov/report/transcript/HvulgareMorex\\_V3/HORVU.MOREX.r3.3HG0292270.1](https://phytozome-next.jgi.doe.gov/report/transcript/HvulgareMorex_V3/HORVU.MOREX.r3.3HG0292270.1) [accessed Dec. 3, 2024]
- Pollmann B., Jacomet S., Schlumbaum A. Morphological and genetic studies of waterlogged *Prunus* species from the Roman *vicus Tasgetium* (Eschenz, Switzerland). *Journal of Archaeological Science*. 2005;32(10):1471-1480. DOI: 10.1016/j.jas.2005.04.002
- Richards S.M., Li L., Breen J., Hovhannisyann N., Estrada O., Gasparyan B., Gilliam M., Smith A., Cooper A., Zhang H. Recovery of chloroplast genomes from medieval millet grains excavated from the Areni-1 cave in Southern Armenia. *Scientific reports*. 2022;12(1). DOI: 10.1038/s41598-022-17931-4
- Riehl S., Pustovoytov K.E., Weippert H., Klett S., Hole F. Drought stress variability in ancient Near Eastern agricultural systems evidenced by  $\delta^{13}\text{C}$  in barley grain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(34):12348-12353. DOI: 10.1073/pnas.1409516111
- Sadder M., Brake M., Ayoub S., Abusini Y., Al-Amad I., Haddad N. Complete mitochondrial genome sequence of historical olive (*Olea europaea* Linnaeus 1753 subsp. *europaea*) cultivar Mehras in Jordan. *Mitochondrial DNA Part B: Resources*. 2023;8(11):1205-1208. DOI: 10.1080/23802359.2023.2275828
- Semilet T., Shvachko N., Smirnova N., Shipilina L., Khlestkina E. Using DNA markers to reconstruct the lifetime morphology of barley grains from carbonized cereal crop remains unearthed at Usvyaty Settlement. *Biological Communications*. 2023;68(1):3-9. DOI: 10.21638/spbu03.2023.101
- Schubert M., Ermini L., Sarkissian C., Jónsson H., Ginolhac A., Schaefer R., Martin M.D., Fernández R., Kircher M., McCue M., Willerslev E., Orlando L. Characterization of ancient and modern genomes by SNP detection and phylogenomic and metagenomic analysis using PALEOMIX. *Nature Protocols*. 2014;9:1056-1082. DOI: 10.1038/nprot.2014.063
- Vallebuena-Estrada M., Hernandez-Robles G.G., González-Orozco E., Lopez-Valdivia I., Rosales Tham T., Vasquez Sanchez V., Swarts K., Dillehay T.D., Vielle-Calzada J.P., Montiel R. Domestication and lowland adaptation of coastal preceramic maize from Paredones, Peru. *Elife*. 2023;12:e83149. DOI: 10.7554/eLife.83149. Erratum in: *Elife*. 2023;12:e91314.
- Wang X., Zhao X., Zhu J., Wu W. Genome-wide investigation of intron length polymorphisms and their potential as molecular markers in rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Research*. 2005;12(6):417-427. DOI: 10.1093/dnares/dsi019
- Wales N., Andersen K., Cappellini E., Ávila-Arcos M.C., Gilbert M.T.P. Optimization of DNA recovery and amplification from non-carbonized archaeobotanical remains. *PLoS ONE*. 2014;9(1):e86827. DOI: 10.1371/journal.pone.0086827
- Wales N., Kistler L. Extraction of ancient DNA from plant remains. *Methods Molecular Biology*. 2019:45-55. DOI: 10.1007/978-1-4939-9176-1\_6
- Zakhrabekova S., Gough S.P., Braumann I., Müller A.H., Lundqvist J., Ahmannet K., Dockter C., Matyszczyk I., Kurowska M., Druka A., Waugh R., Graner A., Stein N., Steuernagel B., Lundqvist U., Hansson M. Induced mutations in circadian clock regulator *Mat-a* facilitated short-season adaptation and range extension in cultivated barley. *PNAS USA*. 2012;109(11):4326-4331. DOI: 10.1073/pnas.1113009110

## Информация об авторах

**Татьяна Вячеславовна Семилет**, младший научный сотрудник, лаборатория постгеномных исследований, 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](mailto:t.semilet@vir.nw.ru), <https://orcid.org/0000-0001-7275-3878>

**Лилия Юрьевна Шипилина**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, лаборатория мониторинга биоресурсов и археоботаники, 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](mailto:l.shipilina@vir.nw.ru), <https://orcid.org/0000-0001-7590-3173>

**Елена Константиновна Хлесткина**, доктор биологических наук, профессор РАН, директор, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, [director@vir.nw.ru](mailto:director@vir.nw.ru), <https://orcid.org/0000-0002-8470-8254>

**Наталья Альбертовна Швачко**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующая, лаборатория постгеномных исследований, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, [n.shvachko@vir.nw.ru](mailto:n.shvachko@vir.nw.ru), <https://orcid.org/0000-0002-1958-5008>

## Information about the authors

**Tatiana V. Semilet**, Junior Researcher, Laboratory of Postgenomic Research, 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](mailto:t.semilet@vir.nw.ru), <https://orcid.org/0000-0001-7275-3878>

**Liliya Yu. Shipilina**, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Bioresources Monitoring and Archaeobotany, 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](mailto:l.shipilina@vir.nw.ru), <https://orcid.org/0000-0001-7590-3173>

**Elena K. Khlestkina**, Dr. Sci. (Biology), Professor of the Russian Academy of Sciences (RAS), Director, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, [director@vir.nw.ru](mailto:director@vir.nw.ru), <https://orcid.org/0000-0002-8470-8254>

**Natalia A. Shvachko**, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, Head, Laboratory of Postgenomic Research, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, [n.shvachko@vir.nw.ru](mailto:n.shvachko@vir.nw.ru), <https://orcid.org/0000-0002-1958-5008>

---

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

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

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

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

Статья поступила в редакцию 01.11.2024; одобрена после рецензирования 18.12.2024; принята к публикации 24.12.2024.

The article was submitted on 01.11.2024; approved after reviewing on 18.12.2024; accepted for publication on 24.12.2024.