

УДК 581.6:58.082+577.2.08

Гербарные коллекции в молекулярно-генетических исследованиях

Н. А. Фомина¹, О. Ю. Антонова¹, И. Г. Чухина¹, Т. А. Гавриленко^{1,2*}

¹ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова (ВИР), ул. Большая Морская, д. 42, 44, г. Санкт-Петербург, 190000, Россия. *E-mail: tatjana9972@yandex.ru

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» (СПбГУ), биологический факультет, Университетская набережная, д. 7/9, г. Санкт-Петербург, 199034, Россия

*автор для переписки

Ключевые слова: генетическое разнообразие растений, гербарные коллекции, ДНК маркеры, деградированная ДНК, NGS.

Аннотация. В мире существует более 3400 научных гербариев, насчитывающих около 390 миллионов образцов, собранных за последние 400 лет, которые документируют растительное разнообразие Земли. Информация, хранящаяся в виде гербарных коллекций, не устаревает со временем и создает фундамент для проведения исследований по биоразнообразию. Настоящим прорывом в методологии изучения гербарных образцов в последние два десятилетия явилось привлечение ДНК-технологий, что стало возможным благодаря разработке все более совершенных методов выделения ДНК, ПЦР-анализа и секвенирования. Все чаще гербарные образцы становятся объектом комплексных исследований по систематике и филогении, изменению генетической структуры популяций в различные исторические периоды, изучению генофонда и истории интродукций отдельных видов растений как с использованием классических ботанических методов, так и с привлечением методов молекулярной генетики. Для изучения исторических эпифитотий и ко-эволюции системы патоген-хозяин проводятся параллельные исследования гербарных растений и сохранившихся на них вредных организмов. В данном обзоре рассмотрены перечисленные выше направления исследований гербарных коллекций, выполненные с привлечением молекулярно-генетических методов.

Молекулярно-генетические исследования гербарных образцов сопряжены с рядом методических трудностей. Анализ литературных данных указывает, что изменения ДНК могут быть вызваны различными причинами и факторами, связанными как с гербаризацией растений, так и с длительным хранением гербарных образцов. В ряде работ показана зависимость качества выделенной ДНК от возраста гербарного образца, а также от состояния сохраняемых растений. При этом скорость фрагментации ядерной и пластидной ДНК у гербарных растений может различаться. Использование модифицированных методик, направленных на удаление окисленных полифенолов и выделение даже небольших фрагментов, позволяет преодолевать проблемы загрязнения препаратов и потерь значительных фракций деградированной ДНК при выделении. Рассмотрены перспективы исследований гербарных коллекций с использованием методов секвенирования нового поколения (NGS-анализа), которое снимает многие методические ограничения.

Herbarium collections in molecular genetic studies

N. A. Fomina¹, O. Yu. Antonova¹, I. G. Chukhina¹, T. A. Gavrilenko^{1,2}

¹ N. I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), B. Morskaya Str., 42, St. Petersburg, 190000, Russian Federation

² Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Saint-Petersburg State University”, Biological Faculty, University Embankment, 7/9, St. Petersburg, 199034, Russian Federation

Keywords: DNA markers, degraded DNA, herbarium collections, NGS, plant genetic diversity.

Summary. There are more than 3400 scientific herbaria in the world, with about 390 million specimens collected over the past 400 years, which document the Earth's plant diversity. Information stored in the herbarium collections is not out of date over time and creates the basis for conducting and developing biodiversity research. The real breakthrough in the methodology of studying herbarium specimens over the past two decades has been the use of DNA technology, which has become possible due to the development of more advanced methods of DNA extraction, PCR analysis and sequencing. More often, herbarium specimens are becoming the object of comprehensive studies on systematics and phylogeny, changes in the genetic structure of populations in different historical periods and on the analysis of the gene pool and in studying the history of the introduction of plant species, using both classical botanical methods and involving modern methods of molecular genetics. At the same time, parallel studies of herbarium plants and pathogenic organisms preserved on them are carried out to study historical epiphytotic and the joint evolution of the pathogen-host system. Present review summarizes the recent results of molecular genetic studies of the herbarium collections.

Molecular genetic studies of herbarium specimens are associated with a number of methodological difficulties. Analysis of the literature indicates that DNA changes can be caused by various reasons and factors associated with both plant herbarization and with long-term storage of herbarium specimens. In a number of studies, the dependence of the quality of isolated DNA on the age of the herbarium specimen, as well as on the state of the stored plants, has been demonstrated. Moreover, the rate of fragmentation of nuclear and plastid DNA in herbarium plants may vary. The use of modified techniques aimed at the removal of oxidized polyphenols and the extraction of even small fragments allows to overcome the problems of drug contamination and the loss of significant fractions of the degraded DNA during isolation. The prospects for studies of herbarium collections using NGS analysis, which removes many methodological limitations, are considered.

Введение

В начале XVIII века Жозеф Турнефор (Joseph Pitton de Tournefort) предложил использовать термин «гербарий» для обозначения коллекций сухих растений. Значительно раньше профессор ботаники университета Болоньи Лучо Гини (Luca Ghini) начал высушивать растения под прессом и монтировать их на бумаге для длительного хранения (Bridson, Forman, 1995). По состоянию на 1 декабря 2017 г. в мире существует более 3400 гербариев, зарегистрированных в базе данных Index Herbariorum и насчитывающих около 390 миллионов образцов, которые собраны за последние 400 лет и документируют растительное разнообразие Земли (Thiers, 2008+). Гербарные коллекции включают в себя не только образцы ныне существующих и доступных для исследований растений, но и материал от редких и уже вымерших видов и популяций (Thiers, 2008+). Информация, которая хранится в виде гербарных коллекций, не устаревает со временем и создает фундамент для проведения исследований по биоразнообразию.

В число крупнейших гербариев мира входят коллекции:

- Королевского ботанического сада Кью (К, г. Ричмонд, Великобритания) – 8,5 миллионов образцов;
- Национального музея естественной истории (Р, г. Париж, Франция) – около 8 миллионов

образцов, из них около 6 миллионов образцов семенных растений;

- Нью-Йоркского ботанического сада (NY, г. Нью-Йорк, США) – более 7,8 миллионов образцов (6 миллионов образцов семенных растений);
- Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН (LE, г. Санкт-Петербург, Россия) – около 7,18 миллионов листов (6 млн образцов сосудистых растений);
- Центра биоразнообразия Naturalis (L, г. Лейден, Нидерланды) – 5 миллионов листов (Thiers, 2008+).

Огромную историческую и научную ценность представляют коллекции Карла Линнея (около 13000 гербарных листов), хранящиеся в Лондонском Линнеевском Обществе (LINN, Linnean Society of London). Значительная часть коллекции К. Линнея сохранилась также в гербариях Швеции (GB, S, SBT, UPS).

Всего в России зарегистрировано более 170 гербариев, и, таким образом, наша страна занимает шестое место в мире по общему объему гербарных коллекций (Gureyeva, 2010). Старейшей гербарной коллекцией на территории Российской Федерации является Гербарий имени Д. П. Сырейщикова биологического факультета Московского государственного университета (MW). Объем основных фондов составляет более 1 миллиона образцов, собранных на территории бывшего СССР – из Европейской части, с Кавказа, Сибири и Дальнего Востока, Сред-

ней Азии, Казахстана, а также из ряда зарубежных стран (Index Herbariorum Rossicum. URL: <https://www.binran.ru/resources/current/herbaria/herbariums/146-detail.html>).

Крупнейшей российской гербарной коллекцией мирового значения по праву считается Гербарий Ботанического института им. В. Л. Комарова (ЛЕ, г. Санкт-Петербург), в фондах которого сохраняются более 7 миллионов гербарных образцов, что составляет примерно 40 % всех гербарных фондов нашей страны (Geltman, 2012). В коллекциях БИН наиболее полно представлены гербарные материалы из Евразии, однако хранятся и ценные коллекции из других регионов Земного шара (Vascular Plants Herbarium of the Botanical Institute. URL: <https://www.binran.ru/resources/current/herbaria/herbariums/136-detail.html>).

Гербарий культурных растений, их диких родичей и сорных растений Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова (WIR, Санкт-Петербург) – специализированная гербарная коллекция мирового значения, которая в настоящее время насчитывает около 380000 гербарных листов культурных растений и их диких родичей, собранных в различных регионах земного шара (Smekalova et al., 2012).

Ценность фондов гербарных коллекций в значительной степени определяет наличие типовых (аутентичных) гербарных образцов, на основании которых были описаны новые таксоны. Эта часть гербарных коллекций имеет не только важнейшее национальное, но и международное значение. Так, например, в гербарии WIR хранятся 730 номенклатурных типов таксонов, описанных Н. И. Вавиловым, П. М. Жуковским, С. М. Букасовым, С. В. Юзепчуком, Е. Н. Синской, О. Н. Коровиной (Бондаренко), П. Н. Богушевским, В. Д. Кобылянским, Т. Н. Ульяновой и многими другими исследователями не только ВИР, но и сотрудниками других организаций (Smekalova et al., 2012).

Важным моментом при регистрации названий сортов (культурваров), групп сортов культурных растений является назначение номенклатурного стандарта. В соответствии с разделом V Международного кодекса номенклатуры культурных растений, номенклатурным стандартом предпочтительно является гербарный образец, который неразрывно связан с названием сорта и должен храниться в научном гербарии (International Code ..., 2016). Номенклатурные стандарты име-

ют большое значение для предотвращения путаницы в работе с исходным материалом, ошибок в документировании растительного материала и для сохранения авторских прав создателей сортов.

Хорошим правилом стало при проведении различных специальных исследований: кариологических, биохимических, молекулярно-генетических – документировать их ваучерными гербарными образцами, которые подтверждают таксономическую принадлежность изучаемых объектов.

Примеры исследований исторических гербарных образцов

К историческим принято относить гербарные коллекции, собранные, как правило, до начала XX в. и изученные выдающимися учеными ботаниками. В данном обзоре важным признаком для понимания гербарного образца как исторического является его возраст. Историческое значение имеет весь материал гербарного листа, в том числе информация гербарной этикетки, включающая оригинальное название образца (согласно гербарной этикетке), географический пункт сбора, характеристику конкретных условий произрастания, дату сбора и автора(-ов) сбора – коллектора(-ов), а также полевой номер образца. Информация из гербарных этикеток о месте и дате сбора образца позволяет анализировать биоразнообразие в различные исторические периоды (Bebber et al., 2010; Wieringa, Sosef, 2011; Meineke et al., 2018), пути интродукции генетического материала (Delisle et al., 2003; Chauvel et al., 2006), а также фиксировать изменения, вызванные сменой климата (Sparks, Carey, 1995; Primack et al., 2004; Davis et al., 2015; Fazlioglu, 2018). Например, на основании историко-географического анализа метаданных у 1200 гербарных образцов сорного растения амброзии полыннолистной (*Ambrosia artemisiifolia* L.), собранных во Франции и в других европейских странах, была получена информация о времени появления этого сорного растения в Европе и путях его интродукции. По мнению авторов, семена сорняка были завезены во Францию из США в конце XIX–начале XX в. вместе с импортируемыми культурными растениями, такими как картофель, пшеница и семена клевера (Chauvel et al., 2006).

Записи гербарных этикеток могут быть ценным источником информации о реакции различ-

ных видов растений на изменение климата. В 2004 г. D. Primack с соавторами, используя информацию этикеток 372 гербарных листов 229 растений – представителей 37 родов, произрастающих в Дендрарии Арнольда Гарвардского университета с 1885 г., продемонстрировали для ряда видов существенный сдвиг к более ранним срокам цветения, который в период с 1980 по 2002 гг. в среднем достиг 8 дней. Данное явление авторы объяснили повышением средней весенней температуры воздуха на 1,5 °C в районе города Бостон за исследуемый период (Primack et al., 2004). Подобное исследование по оценке влияния климатических изменений на сроки цветения растений было проведено F. Fazlioglu (2018), который проанализировал 7146 гербарных листов 142 видов растений, произрастающих в Субарктике, и продемонстрировал значительный сдвиг к более ранним срокам цветения в течение последних 100 лет. В зависимости от вида сдвиг варьировал от 8 до 26 дней. По мнению автора, это смещение связано с климатическими изменениями, а также со значительно более ранним периодом таяния снега (Fazlioglu, 2018).

Настоящим прорывом в методологии изучения гербарных образцов явилось привлечение ДНК-технологий. Хотя возможность использования ДНК, выделяемой из гербарных растений, была показана более 30 лет назад (Rogers, Bendich, 1985), массовый молекулярно-генетический анализ стал широко использоваться в изучении гербарных коллекций в последние два десятилетия, что связано с разработкой все более совершенных методов выделения ДНК, ПЦР-анализа и секвенирования (Bieker, Martin, 2018; Inglis et al., 2018).

Чаще всего в молекулярных исследованиях используют многокопийные последовательности внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS1 и ITS2) ядерных генов рРНК, а также гены и межгенные спейсеры пластидной и митохондриальной ДНК (*ndhN*, *rbcL*, *matK*, *trnL/trnF*, др.). Это объясняется сильной деградированностью ДНК гербарных растений; данная проблема будет рассмотрена ниже.

Такие исследования проводятся методами ПЦР (Ames, Spooner, 2008; Erkens et al., 2008), ДНК-чипирования (SNP) (Yoshida et al., 2015; Lundstrom et al., 2018) и секвенирования (Saltonstall, 2002), а в последнее время активно используются методы NGS (Hart et al., 2016; Weiss et al., 2016; Magwe-Tindo et al., 2018).

С развитием методов ДНК-маркирования появилась возможность включать гербарные образ-

цы в филогенетические исследования, а также проводить исследования генетического разнообразия видов, изменений генетической структуры популяций в различные исторические периоды, изучать историю интродукций (Saltonstall, 2002; Ames, Spooner, 2008). Изучение полиморфизма различных последовательностей ДНК, выделенной из типового гербарного образца – первичного материала, послужившего основой для описания таксонов, открывает возможности для прояснения спорных вопросов филогении и систематики.

Показательно исследование G. Chomicki и S. S. Renner (2014), которые провели молекулярно-филогенетический анализ видов арбуза, относящихся к роду *Citrullus* Schrad. ex Ecklon et C. Zeyh. и представителей других родов семейства тыквенных, включив в анализ помимо образцов арбуза из современных сборов в Бенине, Марокко, Намибии и ЮАР, типовой гербарный образец *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. et Nakai, собранный в 1773 г. близ Кейптауна (ЮАР) учеником Карла Линнея Карлом Петером Тунбергом (С. Р. Thunberg), из Гербария UPS (Museum of Evolution, Sweden, Uppsala). У отобранных для исследований образцов авторы секвенировали высокоизменчивые участки ядерной ДНК – последовательности рДНК (ITS1, 5,8S рДНК, ITS2) и участки 10 генов и межгенных спейсеров пластидного генома (*trnL* (интрон), *trnL/trnF*, *rpl20/rps12*, *trnR/atpA*, *trnG/trnS*, *Ycf9/trnG*, *Ycf6/PsbM*, *ndhF*, *rbcL* и *matK*). Результаты анализа полиморфизма последовательностей ядерной и пластидной ДНК с использованием методов молекулярной филогении предоставили убедительные доказательства независимой доместикации разных видов рода *Citrullus* в Южной и в Западной Африке, а также показали, что типовой образец *C. lanatus*, собранный К. П. Тунбергом в Южной Африке, не является близким родичем возделываемого арбуза. Этот типовой образец оказался генетически наиболее близок к *Citrullus amarus* Schrad., который был окультурен в Южной Африке, а также к дикорастущему виду *Citrullus ecirrhosus* Griffin, известному как «дыня тсамма» – южно-африканскому эндемику, растущему в полупустыне Калахари. Апоморфным признаком южно-африканских видов рода *Citrullus* является делеция 30 п. о. в межгенном спейсере *trnS-trnG* хлДНК, выявленная и в типовом гербарном образце 1773 г. В то время как одомашненные арбузы (*Citrullus lanatus* subsp. *vulgaris* (Schrad.) Fursa), культивируемые в настоящее время и не имеющие этой

делеции, формировали на филогенетическом древе отдельную кладу совместно с образцами *C. lanatus* из Бенина, Западная Африка, образуя сестринскую кладу с западно-африканским видом *Citrullus mucosospermus* – слизисто-семянным арбузом, также произрастающим в Западной Африке от Нигерии до Сенегала. Ошибочная синонимизация южноафриканского *Citrullus lanatus* с *Citrullus vulgaris* Schrad. произошла в 1930-х гг. (Bailey, 1930, цит. по: Chomicki, Renner, 2014), что впоследствии было зафиксировано в многочисленных публикациях. Авторы статьи полагают, что в сложившейся ситуации лучшим решением является выбор нового типового образца для *C. lanatus* (Chomicki, Renner, 2014).

Гербарные образцы привлекались в филогеографические исследования, выполненные молекулярно-генетическими методами (Roullier et al., 2013; De Castro et al., 2015; Hardion et al., 2017), в том числе отечественными учеными. Так, в работе Г. Гусаровой с коллегами образцы из разных мировых гербариев, наряду с образцами из собственных сборов авторов, были использованы для исследования филогеографии циркумполярного вида – смолевки бесстебельной (*Silene acaulis* L.). Результаты анализа генетической структуры *S. acaulis*, выполненного с использованием мультилокусных AFLP маркеров и данных секвенирования ряда последовательностей хлДНК (*psbD-trnT*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF*, *trnL-intron*), позволили выявить две основные филогеографические линии *S. acaulis*: европейскую и американо-берингийскую (Gussarova et al., 2015). Т. Синицына с соавторами изучили полиморфизм двух межгенных спейсеров хлДНК (*trnQ-rps16*, *trnL-rpl32*) и ядерных районов ITS 1, ITS 2 у гербарных образцов рода *Allium* L. из секции *Rhizirideum* G. Don ex W. D. J. Koch. Результаты исследований указывают на произошедшее в плиоцене четкое разделение секции *Rhizirideum* на «азиатскую» и «европейскую» географические группы, граница разделения которых проходит восточнее Уральских гор, приблизительно вдоль 70 меридиана (Sinitsyna et al., 2016).

В работе К. Saltonstall (2002) был изучен процесс вытеснения местных аборигенных популяций тростника *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. образцами неопределенного происхождения. Автор провела секвенирование последовательностей межгенных спейсеров пластидной ДНК *trnT-trnL* и *rbcl-psaI* для исторических гербарных образцов *P. australis*, собранных в раз-

ных географических пунктах США за 150-летний период. Образцы, собранные до 1910 г., относились к 27 гаплотипам хлДНК. Однако уже в последующие 20 лет (с 1920 по 1940 гг.) аборигенные гаплотипы были полностью вытеснены одним гаплотипом «М». Быстрое распространение гаплотипа М по всему Атлантическому побережью США могло произойти в результате приобретения им селективных преимуществ, чему могли способствовать антропогенные изменения в ландшафте или другие неизвестные причины (Saltonstall, 2002).

Примером привлечения гербария для исследований истории интродукций является работа С. Roullier с соавторами (2013), проведенная на современных образцах из разных генбанков и на исторических гербарных образцах батата (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) из гербариев: BISH, BM, K, L, собранных в период с XVII до начала XX в. в различных областях Неотропики (Южная и Центральная Америки и острова Карибского бассейна), Океании (включая Меланезию, Полинезию), Юго-Восточной Азии и Мадагаскара. Изучив полиморфизм пластидных и ядерных микросателлитов у 1245 образцов, авторы выявили различные, четко дифференцированные гаплотипы в северных и южных регионах Неотропики как у гербарных, так и у современных образцов. Анализ исторического гербарного материала показал, что *I. batatas* был интродуцирован в Полинезию из Южной Америки (с территории современных Эквадора-Перу), возможно, еще в доколумбовские времена. При этом подавляющее большинство современных полинезийских образцов *I. batatas* несут хлоритипы, не найденные в исторических гербарных образцах, собранных в этом же регионе. Среди современных полинезийских образцов преобладают гаплогруппы, характерные для северных регионов Неотропики. Таким образом, более поздние реинтродукции батата в Полинезию заместили начальные популяции, завезенные из Южной Америки. Напротив, в Юго-Восточной Азии и на Мадагаскаре генетическая структура популяций батата оставалась стабильной – и у гербарных, и у современных образцов *I. batatas* доминируют гаплогруппы, характерные для северных районов Неотропики, откуда батат был интродуцирован изначально (вероятно, с территории современной Мексики или Карибских островов) (Roullier et al., 2013).

Для получения информации о таксономическом и генетическом разнообразии чилийских

видов картофеля Т. А. Гавриленко с соавторами (Gavrilenko et al., 2017) провели молекулярно-генетические исследования уникальных аутентичных образцов из гербария WIR, собранных на территории Чили в первой трети XX в. На основе этих образцов отечественные систематики описали ряд таксонов картофеля (Bukasov, 1933; Juzerczuk, 1937) и предложили гипотезы полицентрической доместикиции (Juzerczuk, Bukasov, 1929). После эпифитотии, затронувшей Чили в середине XX в., разнообразие аборигенного чилийского картофеля в значительной степени было утрачено (Correll, 1962), поэтому имеющиеся гербарные образцы, собранные в 1920–1930-х гг. являются едва ли не единственными материалами, фиксирующими это разнообразие. В работе был изучен полиморфизм 15 пластидных микросателлитов у 116 гербарных образцов чилийского культурного картофеля (*S. chilotanum*) и образцов *S. leptostigma*, *S. molinae*, *S. ochoanum*, *S. zykini*, рассматриваемых отечественными систематиками в качестве предшественников *S. chilotanum* (из них 74 листа – лектотипы, 15 – голотипы, 6 – синтип). Полученные результаты указывают на единообразие образцов Южного Чили, относящихся к 5 таксонам, и свидетельствует в пользу аллохтонного происхождения картофеля в Южном Чили (Gavrilenko et al., 2017).

Важно отметить, что типовой материал уникален и незаменим, поэтому изоляция ДНК из типовых образцов должна быть минимизирована. В связи с этим S. Lehtonen, M. Christenhusz (2010) отмечают, что отбор фрагмента ткани для молекулярных исследований должен быть ограничен гербарными образцами, для которых имеется достаточное количество растительного материала, а также несколько изотипов (от которых отбор ткани предпочтителен). Когда типовой образец недоступен, авторы рекомендуют использовать материал из того же места сбора (*locus classicus*), откуда происходит типовой гербарный образец (Lehtonen, Christenhusz, 2010).

Изучение гербарных образцов картофеля из 11 европейских гербариев (AAU, BM, G, K, L, LD, LY, MANCH, S, UPS, Z) позволило проследить историю интродукций картофеля в Европу и ответить на вопрос, из каких регионов Южной Америки был завезен картофель в разные исторические периоды (Ames, Spooner, 2008). Известно, что чилийские и андийские аборигенные сорта картофеля отличаются по типам пластидной ДНК. Для чилийского культурного

картофеля характерен Т-тип (около 90% проанализированных образцов), который детектируется по наличию специфической делеции 241 п. о. в межгенном спейсере *trnV-UAC/ndh C* хлДНК, выявляемой в ПЦР анализе с парой праймеров H1 (Hosaka, 2002); тогда как у андийских культурных видов частота чилийского Т-типа не превышает 5 %. Эти данные были получены в исследованиях живых растений – южноамериканских аборигенных сортов картофеля, сохраняемых в полевых генбанках разных стран (Hosaka, 2002, 2004; Gavrilenko et al., 2013; Spooner et al., 2014). M. Ames и D. M. Spooner (2008) провели ПЦР анализ (с парой праймеров H1) гербарных образцов картофеля, собранных в разных европейских странах с 1700 по 1910 гг. Согласно полученным в этой работе результатам, у образцов ранних интродукций XVIII века чилийский Т-тип хлДНК отсутствовал, в этот период интродукция была связана с андийскими аборигенными сортами. Первые образцы с чилийским Т-типом пластидной ДНК (с делецией 241 п.о.) появились на европейском континенте после 1811 года, во второй половине XIX в. их частота достигла 50 %, а с начала XX в. Т-тип цитоплазмы имели все изученные гербарные образцы картофеля. Авторы полагают, что причина исчезновения интродуцированных в XVIII в. андийских аборигенных сортов связана с первой эпифитотией фитофтороза в Европе в 1845–1849 гг., вызванной патогенным оомицетом *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary.

При изучении гербарных образцов растений молекулярными методами предоставляется также возможность параллельного исследования сохранившихся на них патогенных организмов. В связи с этим, в настоящее время появилась специальная практика целенаправленной фиксации патогена на закладываемом в гербарий образце растения-хозяина (All-Russian institute of plant protection. URL: <http://vizrspb.ru/struktura-instituta/research/mikologii-i-fitopatologii/mikologicheskij-gerbarij-laboratorii-mikologii-i-fitopatologii-vizr.html>).

Отдельного внимания заслуживает использование гербария для изучения исторических эпифитотий и совместной эволюции системы патоген-хозяин (Malmstrom et al., 2007; O’Gorman et al., 2008; Telle, Thines, 2008; Martin et al., 2013, 2015; Yoshida et al., 2013, 2014, 2015; Saville et al., 2016). Изучение патогенов на гербарных образцах, собранных в различных регионах в разные исторические периоды, по-

зволяет проследить пути появления и распространения болезней. Кроме того, может быть исследована динамика изменений структуры популяций патогена в разные периоды в различных регионах. Интересны работы по изучению генетической структуры популяций *P. infestans* – возбудителя фитофтороза картофеля, родиной которого считается территория современной Мексики. Несколько лабораторий с использованием методов молекулярной филогенетики и сравнительной геномики провели анализ современных изолятов *P. infestans*, а также образцов патогена, сохранившихся на гербарных растениях, собранных в XIX в. в разных европейских странах, хранящихся в исторических коллекциях гербариев K, BPI, UPS (May, Ristaino, 2004; Martin et al., 2013; Yoshida et al., 2013, 2014). Самый старый гербарный образец культурного картофеля относился к 1845 г. – времени первой эпифитотии фитофтороза в Северной Европе. По результатам исследований удалось выявить 120359 SNP в кодирующих участках ядерной ДНК, по которым различались геномы штаммов *P. infestans*, сохранившихся на исторических гербарных образцах, и штаммов из современных изолятов патогена (Martin et al., 2013). Кроме того, выявлены различия в спектрах *Avr* генов, определяющих (а)вирулентность *P. infestans* и их аллелей. При сравнении «старых» образцов патогена, сохранившихся на гербарных растениях, с современными штаммами *P. infestans* также зафиксировано изменение ploидности от диплоидной к триплоидной (Yoshida et al., 2013, 2014). Полученные результаты позволили реконструировать историю интродукций *P. infestans*. По мнению авторов, эволюция *P. infestans* сопровождалась сменой хозяина, то есть переходом от диких мексиканских видов на культурный картофель (Martin et al., 2015). Примерно в 1842–1843 гг. *P. infestans* была перенесена из Мексики в Северную Америку, откуда вскоре попала в Европу (Martin et al., 2013; Yoshida et al., 2013, 2014). Историческая эпифитотия фитофтороза в Северной Европе в 1845–1849 гг. была вызвана появлением RFLP-генотипа HERB-1 (mtDNA гаплотип Ia) *P. infestans*, который, однако, появился за пределами Мексики (в Северной Америке) и сохранился в Европе на протяжении последующих 50 лет. В начале XX в. в Европе HERB-1 был вытеснен родственным RFLP-генотипом US-1 (mtDNA гаплотип Ib) (Martin et al., 2013, 2015; Yoshida et al., 2013, 2014). Эта гипотеза, однако, была оспорена в работе А. С. Saville с соавтора-

ми, предположившими множественные интродукции патогена в Европу (Saville et al., 2016).

Методические трудности в исследованиях гербарных образцов

Несмотря на все перспективы работы с гербарными коллекциями, существует ряд методических трудностей в исследованиях гербарных образцов, на которых мы остановимся подробнее.

В тканях гербарных образцов возможны различные деструктивные процессы, приводящие к фрагментации молекул ДНК и к различным повреждениям, ингибирующим работу полимераз и негативно влияющих на корректное включение нуклеотидов при проведении ПЦР (Staats et al., 2011; Weiss et al., 2016). Изменения ДНК могут быть вызваны различными причинами. На первых стадиях гербаризации, в процессе сушки растений, повреждения ДНК обусловлены в основном действием нуклеаз, высвобождающихся при гибели клеток, а также микробными нуклеазами, выделяемыми микроорганизмами, заселяющими растение. При длительном хранении гербарных образцов повреждения ДНК индуцируют гидролитические и окислительные реакции, которые происходят с гораздо меньшей скоростью, чем на первых стадиях (Staats et al., 2011).

Наиболее распространенные повреждения гербарной ДНК – это двухцепочечные разрывы, которые происходят в момент гербаризации растений (Staats et al., 2011; Weiss et al., 2016; Bakker, 2017). Гербаризация вызывает гибель клеток от абиотического стресса, вызванного нехваткой влаги и высокими температурами (60–70 °C), при которых часто высушиваются гербарные образцы. Клеточный стресс способствует активации окислительных процессов; одновременно высвобождаются АФК, нуклеазы и другие ферменты, действие которых приводит к фрагментации молекул ДНК (Reape et al., 2008). При таких повреждениях ДНК уже не репарируется, как это происходит в живых растениях (Roldan-Arjona, Ariza, 2009). Разрывы цепей происходят в основном в месте нахождения пуринов, где происходит спонтанная депуринизация с последующим гидролизом сахарофосфатного остова ДНК путем β-элиминации, что показано для различных организмов (Lindahl, Andersson, 1972; Lindahl, Nyberg, 1972; Paabo, Wilson, 1991; Lindahl, 1993; Dabney et al., 2013; Weiss et al., 2016) (прил. 1, см.

сайт журнала). Действительно, при щелочной обработке ДНК, выделенной из древних тканей, обнаруживаются фрагменты с терминальными 5'-фосфатными группами и 3'-альдегидными группами, типичные для β -элиминации (Jones et al., 1968).

Сильная степень фрагментированности гербарной ДНК указывает на то, что растительный материал высушивался слишком медленно и что растение переносило абиотический стресс в течение длительного периода подготовки гербария. Поэтому для получения качественного гербарного материала необходимо принимать меры по сокращению продолжительности стресса от нехватки влаги и использовать методы, обеспечивающие быстрое высыхание растительных тканей (Chase, Hills, 1991). Наиболее пригодными и распространенными при приготовлении гербария являются высушивание растительного материала силикагелем и его прессование между листами бумаги (Harris, 1993).

При гербаризации и в процессе хранения образцы обрабатываются различными химическими веществами. Раньше частой практикой подготовки растений, особенно в тропиках, была фиксация материала смесью этилового спирта с добавлением метанола или при помощи 30%-го формальдегида (Pyle, Adams, 1989). Многие используемые при этом реагенты: этанол, метанол, формалин, хлороформ и другие химические вещества производят необратимое разрушающее действие на ДНК уже через 24 часа после замачивания растений (Pyle, Adams, 1989). Кроме того, обработка растений этанолом снижает общий выход выделяемой из них ДНК по сравнению с растениями, высушенными на воздухе (Sarkinen et al., 2012). К сильной деградации ДНК в клетке приводят также консерванты, используемые для анатомических или цитологических исследований (Doyle, Dickson, 1987; Srinivansan et al., 2002).

При длительном хранении гербарных образцов на стабильность молекул ДНК воздействуют различные факторы окружающей среды, такие как температура, влажность и pH. В гербариях чаще всего создаются условия для поддержания постоянной температуры и влажности, но до сих пор огромное количество образцов гербария закреплены на кислотной бумаге, которая может увеличивать скорость депуринизации (Weiss et al., 2016).

Помимо двухцепочечных разрывов, в ДНК, выделяемой из гербария обнаруживаются сшив-

ки, которые могут образовываться между нитями ДНК, между различными фрагментами ДНК или между ДНК и другими молекулами (Staats et al., 2011; Weiss et al., 2016; Bakker, 2017). Также возникают абазические нуклеотиды и иные структурные изменения. Эти повреждения ДНК-молекул препятствуют движению ДНК-полимераз по матрице, ингибируя амплификацию и секвенирование (Hansen, 2006).

Еще одним видом повреждений ДНК, изолированной из гербарных образцов, сохраняемых длительное время или в ненадлежащих условиях, являются однонуклеотидные замены. На концах фрагментов ДНК отмечается увеличение замен цитозина на тимин. Эти особенности возникают из-за самопроизвольного дезаминирования остатков цитозина до урацилов, которые впоследствии считываются полимеразой как тимин (прил. 2, см. сайт журнала). M. Staats с коллегами, изучив гербарный материал в возрасте от 65 до 114 лет определили скорость замен $C \rightarrow T/G \rightarrow A$ в пластидной ДНК как $1,53 \times 10^{-6}$ на нуклеотид в год хранения (Staats et al., 2011). Переходы $C \rightarrow T/G \rightarrow A$ являются наиболее распространенной типом мутаций и в древней ДНК из ископаемых останков животных (Briggs et al., 2007; Brotherton et al., 2007; Dabney et al., 2013).

Поскольку повреждения ДНК гербарных образцов могут быть вызваны действием многих факторов, оценить влияние продолжительности периода хранения гербария на деградацию ДНК достаточно трудно. Однако связь между степенью фрагментации ДНК и продолжительностью хранения образца была установлена на основании изучения кинетики индуцирования двунитевых разрывов ДНК, происходящих за счет депуринизации. В растительном гербарном материале скорость фрагментации оценивается как $1,66 \times 10^{-4}$ нуклеотидов в год (Weiss et al., 2016), что значительно быстрее, чем скорость деградации древней ДНК в костных останках (Allentoft et al., 2012).

Зависимость качества выделенной ДНК от возраста гербарного образца хорошо прослеживается в работе N. de Vere с соавторами (2012). Авторы провели ДНК-штрих-кодирование для 3607 образцов разных сроков сбора из гербария Welsh National Herbarium (NMW). В анализ были вовлечены участки генов пластидной ДНК – *rbcL* и *matK*, последовательности которых были амплифицированы и секвенированы. При этом успешность результатов напрямую зависела от времени хранения гербария. Для выборки све-

жезаложенных гербарных образцов (1999–2008 гг.) получены амплификационные продукты более чем в 80 % ПЦР-реакций. У старых образцов (1899–1908 гг.) амплификация локуса *rbcL* была успешна лишь в 25 % случаях, а локуса *matK* – менее чем в 10 % (de Vere et al., 2012). В соответствии с доступной нам информацией, одним из самых старых гербарных образцов, успешно исследованных при помощи молекулярных методов, можно считать образцы из гербария The Natural History Museum (BM), датированные 1600 годом (Roullier et al., 2013).

По данным S. Lehtonen, M. Christenhusz (2010), помимо возраста гербарных образцов, отбираемых для исследования, следует обращать внимание и на цвет тканей растений. Так, при использовании ДНК препаратов, выделенных из зеленых гербарных растений, успешные результаты секвенирования спейсеров *trnL-trnF* (470 п.о.) и *trnS^{GGA}-rps4* (800 п.о.) хлДНК получены в 97,1 и 54,3 % случаев, соответственно. В то время как результаты амплификации и секвенирования этих же локусов у побуревших гербарных растений образцов составили 28,4 и 9 % (Lehtonen, Christenhusz, 2010).

Скорость фрагментации ядерной и пластидной ДНК у гербарных образцов различается.

При сопоставлении результатов секвенирования исторических и современных гербарных образцов скорость деградации хлДНК была оценена как $1,29 \times 10^{-4}$ п.о./год, а ядерной ДНК – $1,66 \times 10^{-4}$ п.о./год, то есть скорость распада ядерной ДНК была в 1,3 раза выше (Weiss et al., 2016). Относительно небольшая скорость распада ДНК органелл может быть следствием ее кольцевой структуры, что делает ДНК менее доступной для эндонуклеаз (Shapiro, Hofreiter, 2014). Кроме того, геномы пластид отличаются многокопийностью – число копий хлДНК у разных видов может достигать нескольких тысяч (Bendich, 1987), деградация в разных копиях происходит не одновременно, и какая-то часть молекул остается неповрежденной. Поэтому именно пластидная ДНК чаще всего используется для молекулярно-генетических исследований гербарных образцов, особенно при применении методов ПЦР-анализа (Savolainen et al., 1995; Saltonstall, 2002; Ames, Spooner, 2008; Erkens et al., 2008; De Vere et al., 2012; Roullier et al., 2013). Кроме того, при работе с ДНК гербарных образцов анализируют короткие последовательности митохондриальных генов (CBOL Plant Working Group, 2009) и некоторые участки ядерной ДНК

(Erkens et al., 2008; Roullier et al., 2013; Chomicki, Renner, 2014; Weiss et al., 2016; Couvreur et al., 2019). Наиболее часто используемые ДНК маркеры и методы анализа гербарных растений представителей различных семейств рассмотрены в работе С. Bieker и М. D. Martin (2018).

Помимо изменения самой структуры молекул ДНК, при работе с гербарными образцами существенной проблемой является присутствие в растениях большого количества полисахаридов и накопление окисленных вторичных метаболитов, таких как окисленные полифенолы. На загрязнение препаратов окисленными полифенолами указывает желтый или коричневый цвет раствора ДНК, а также низкие значения отношения A_{260}/A_{280} при спектрофотометрическом анализе (Inglis et al., 2018). Эти соединения препятствуют нормальной работе полимераз и рестриктаз, и загрязненная ими ДНК малоприспособна для дальнейшего молекулярного анализа (Savolaine et al., 1995; Inglis et al., 2018).

В связи с вышеизложенным, экстракция ДНК из гербарных образцов требует применения специальных подходов, направленных на выделение даже коротких деградированных фрагментов и удаление загрязняющих веществ. В настоящее время разработано большое число методик выделения ДНК из высушенного материала. В основе большинства методов лежит экстракция при помощи бромиды цетилтриметиламмония (ЦТАБ) с различными модификациями (Drabkova et al., 2002; Zvyagin, 2010; Drabkova, 2013; Healey et al., 2014; Inglis et al., 2018). Эффективной модификацией ЦТАБ-метода является введение этапа предварительной промывки тканей растения сорбитолом. Образцы ткани замачиваются на некоторое время в промывочном буфере на основе сорбитола, в состав которого входят также поливинилпирролидон (PVP-40) и β -меркаптоэтанол (Inglis et al., 2018). Данный буфер не вызывает лизиса клеток, промывка в нем способствует связыванию полифенолов на поливинилпирролидоне, дополнительно β -меркаптоэтанол как восстановитель ингибирует их окисление. После удаления надосадочной жидкости проводят экстракцию по стандартному ЦТАБ протоколу. Этап предварительной промывки буфером с сорбитолом добавляет всего 10–20 минут к стандартному протоколу ЦТАБ, при этом препараты ДНК имеют хорошие спектральные характеристики (соотношение A_{260}/A_{280}) и успешно амплифицируются (Inglis et al., 2018). Данный подход был с успехом применен для изучения

гербарных растений видов рода *Lafoensia* spp., а также живых растений, накапливающих в тканях большое количество полифенолов (Inglis et al., 2018).

Хорошие результаты были получены при использовании для ДНК-экстракции буфера на основе N-фенацилтиазолий бромида (РТВ) с добавлением дитиотреитола (ДТТ) (Gutaker et al., 2017). РТВ разрушает связи в молекулах гликопротеидов и может улучшить освобождение ДНК от полисахаридов. ДТТ разрушает дисульфидные мостики, освобождая ДНК от связанных с ней белковых комплексов (Kistler, 2011). Экстракция в буфере РТВ способствовала извлечению самых малых фрагментов ДНК – средний размер фрагментов оказался на 35 % меньше по сравнению с обычным методом ЦТАБ (соответственно 88 п.о. и 57 п.о.). Кроме того, молекулы ДНК, выделенные методом РТВ-экстракции, имели на 5'-концах значимо больше замен С→Т (t-тест, $P = 1,2 \times 10^{-6}$) по сравнению с ЦТАБ-методом, что свидетельствовало о выделении даже поврежденных фрагментов (Gutaker et al., 2017).

Улучшению качества препаратов ДНК гербарных образцов способствует их очистка с помощью мембран с диоксидом кремния или магнитных частиц (Sarkinen et al., 2012). При использовании доочистки на магнитных частицах происходит увеличение содержания в препаратах фрагментов ядерной ДНК размером >300 п.о. Выделение более длинных фрагментов положительно сказывается на результатах амплификации целевых последовательностей. Данный эффект особенно заметен на сильно поврежденных образцах, изначально содержащих очень фрагментированную геномную ДНК (Krinitsina et al., 2015). Колонки с сорбентом из диоксида кремния доступны в коммерческих наборах для выделения ДНК. Следует, однако, иметь в виду, что эффективность выделения из гербарных образцов ДНК-препаратов приемлемого качества при использовании наборов разных фирм различна, в некоторых случаях по выходу ДНК и по ее спектрофотометрическим характеристикам коммерческие наборы оказываются не способны превзойти результаты экстракции по стандартному ЦТАБ протоколу (Sarkinen et al., 2012; Gutaker et al., 2017; Omelchenko et al., 2019).

Наряду с особыми методами выделения, работа с гербарной ДНК часто требует модификации условий проведения ПЦР. В частности, показана большая эффективность ПЦР-буферов

с высокой концентрацией бычьего сывороточного альбумина (Sarkinen et al., 2012). Кроме того, рекомендуют использовать полимеразы, не обладающие 3'-5' корректирующей способностью (Savolainen et al., 1995).

Практически все сложные моменты работы с гербарными образцами позволяет решить привлечение в исследования методов секвенирования нового поколения (NGS). Характерная для древней ДНК фрагментированность является даже положительным фактором, поскольку большинство NGS подходов использует в качестве матрицы не протяженные интактные молекулы ДНК, а короткие фрагменты размером 100–400 п.о. При NGS-анализе исследователей больше не ограничивают проблемы нестабильной амплификации поврежденных последовательностей или загрязненных ДНК-препаратов. При наличии референсной последовательности могут быть изучены даже низкокопийные гены (Besnard et al., 2014). Кроме того, перестает быть проблемой относительно небольшое число локусов, доступное для ПЦР-анализа у немодельных организмов, что особенно актуально для гербарных образцов (Staats et al., 2013; Hart et al., 2016; Zeng et al., 2018).

При работе с данными NGS-анализа гербарных образцов необходимо учитывать возможность того, что некоторые SNP не являются характерными отличиями определенных образцов, а возникли уже после гибели растения в процессе деградации ДНК. Для преодоления этих методических проблем специально для работы с деградированными молекулами ДНК разработаны специальные пакеты программ (например, MapDamage, Jonsson et al., 2013) и программные конвейеры PALEOMIX (Schubert et al., 2014), EAGER (Peltzer et al., 2016), ATLAS (Link et al., 2017).

Уже сегодня все большее число авторов с успехом использует NGS-анализ для исследования самых разных объектов (Zeng et al., 2018). Предложены различные методические подходы для приготовления библиотек ДНК гербарных образцов и сборки геномов (Staats et al., 2013; Hart et al., 2016; Sanchez Barreiro et al., 2016; Zeng et al., 2018). Например, в работе F. Sanchez Barreiro с соавт. (Sanchez Barreiro et al., 2016) разработан метод REALbaits, позволяющий применять для деградированной гербарной ДНК технологию RRL (Reduced Representation Library Sequencing), которая включает этап расщепления ДНК рестриктазами и, следовательно, требует

наличия высокополимерной ДНК. На примере гербарных образцов амброзии полыннолистной (собранных в период с 1835 по 1913 гг.) авторы показали, что при секвенировании полученных библиотек глубина покрытия таргетных локусов возрастает во много раз (от 21 до 174 раз) по сравнению с методом «дробовика» (shotgun) (Sanchez Barreiro et al., 2016).

NGS-анализ гербарной ДНК начинают использовать для изучения генетической структуры популяций, динамики ее изменения и дрейфа генов, а также решения спорных вопросов филогении с привлечением представителей различных семейств: Asteraceae (Sanchez Barreiro et al.,

2016), Brassicaceae (Exposito-Alonso et al., 2018), Fabaceae (Hart et al., 2016), Poaceae (Besnard et al., 2014; Olofsson et al., 2016). Очевидно, NGS-анализ в будущем станет практически обязательным для изучения гербарных коллекций.

Благодарности

Работа выполнена в рамках тематического плана № 0481-2019-0002 «Изучение генетических ресурсов культурных растений, их диких родичей и форм собственной селекции при помощи комплекса современных методов ДНК-диагностики».

REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

- Allentoft M. E., Collins M., Harker D., Haile J., Oskam C. L., Hale M. L., Campos P. F., Samaniego J. A., Gilbert M. T. P., Willerslev E., Zhang G., Scofield R. P., Holdaway R. N., Bunce M.** 2012. The half-life of DNA in bone: measuring decay kinetics in 158 dated fossils. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279(1748): 4724–4733. DOI: 10.1098/rspb.2012.1745
- All-Russian institute of plant protection (FSBSI VIZR).* URL: <http://vizrspb.ru/struktura-instituta/research/mikologii-i-fitopatologii/mikologicheskij-gerbarij-laboratorii-mikologii-i-fitopatologii-vizr.html> (Accessed 07 July 2019).
- Ames M., Spooner D. M.** 2008. DNA from herbarium specimens settles a controversy about origins of the European potato. *American Journal of Botany* 95(2): 252–257. DOI: 10.3732/ajb.95.2.252
- Bailey L. H.** 1930. Three discussions in Cucurbitaceae. *Gentes Herbarum* 2: 175–186.
- Bakker F. T.** 2017. Herbarium genomics: skimming and plastomics from archival specimens. *Webbia* 72(1): 35–45. DOI:10.1080/00837792.2017.1313383
- Bebber D. P., Carine M. A., Wood J. R. I., Wortley A. H., Harris D. J., Prance G. T., Davidse G., Paige J., Pennington T. D., Robson N. K. B., Scotland R. W.** 2010. Herbaria are a major frontier for species discovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(51): 22169–22171. DOI: 10.1073/pnas.1011841108
- Bendich A. J.** 1987. Why do chloroplasts and mitochondria contain so many copies of their genome? *BioEssays* 6(6): 279–282. DOI: 10.1002/bies.950060608
- Besnard G., Christin P.-A., Male P.-J. G., Lhuillier E., Lauzeral C., Coissac E., Vorontsova M. S.** 2014. From museums to genomics: old herbarium specimens shed light on a C3 to C4 transition. *Journal of Experimental Botany* 65(22): 6711–6721. DOI: 10.1093/jxb/eru395
- Bieker V. C., Martin M. D.** 2018. Implications and future prospects for evolutionary analyses of DNA in historical herbarium collections. *Botany Letters* 165(3–4): 409–418. DOI: 10.1080/23818107.2018.1458651
- Bridson D., Forman L.** 1995. *Гербарное дело: Справочное руководство. Русское издание* [Herbarium: Reference Manual. Russian Edition]. Korolevskiy botanicheskiy sad Publ., Kew, 341 pp. [In Russian]. (**Бридсон Д., Форман Л.** Гербарное дело: Справочное руководство. Русское издание. Кью: Королевский ботанический сад, 1995. 341 с.).
- Briggs A. W., Stenzel U., Johnson P. L. F., Green R. E., Kelso J., Prufer K., Meyer M., Krause J., Ronan M. T., Lachmann M., Paabo S.** 2007. Patterns of damage in genomic DNA sequences from a Neandertal. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(37): 14616–14621. DOI: 10.1073/pnas.0704665104
- Brotherton P., Endicott P., Sanchez J. J., Beaumont M., Barnett R., Austin J., Cooper A.** 2007. Novel high-resolution characterization of ancient DNA reveals C > U-type base modification events as the sole cause of *post mortem* miscoding lesions. *Nucleic Acids Research* 35(17): 5717–5728. DOI: 10.1093/nar/gkm588
- Bukasov S. M.** 1933. The potatoes of South America and their breeding possibilities. *Supplement 58-th to the Bulletin of applied botany, of genetics and plant-breeding* 153 pp. [In Russian] (**Букасов С. М.** Картофели Южной Америки и их селекционное использование // Приложение 58 к Трудам по прикладной ботанике, генетике и селекции, 1933. 153 с.).
- CBOL Plant Working Group.** 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(31): 12794–12797. DOI: 10.1073/pnas.0905845106
- Chase M. W., Hills H. H.** 1991. Silica Gel: An Ideal Material for Field Preservation of Leaf Samples for DNA Studies. *Taxon* 40(2): 215–220. DOI: 10.2307/1222975

Chauvel B., Dessaint F., Cardinal-Legrand C., Bretagnolle F. 2006. The historical spread of *Ambrosia artemisiifolia* L. in France from herbarium records. *Journal of Biogeography* 33(4): 665–673. DOI: 10.1111/j.1365-2699.2005.01401.x

Chomicki G., Renner S. S. 2014. Watermelon origin solved with molecular phylogenetics including Linnaean material: another example of museomics. *New Phytologist* 205(2): 526–532. DOI: 10.1111/nph.13163

Correll D. S. 1962. The potato and its wild relatives. *Contributions of the Texas Research Foundation, Botanical Studies*. Texas Research Foundation, Renner, Texas, 606 pp.

Couvreur T. L. P., Helmstetter A. J., Koenen E. J. M., Bethune K., Brandao R. D., Little S. A., Erkens R. H. J. 2019. Phylogenomics of the Major Tropical Plant Family Annonaceae Using Targeted Enrichment of Nuclear Genes. *Frontiers in Plant Science* 9: 1941. DOI: 10.3389/fpls.2018.01941

Dabney J., Meyer M., Paabo S. 2013. Ancient DNA Damage. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5(7): a012567. DOI: 10.1101/cshperspect.a012567

Davis C. C., Willis C. G., Connolly B., Kelly C., Ellison A. M. 2015. Herbarium records are reliable sources of phenological change driven by climate and provide novel insights into species' phenological cueing mechanisms. *American Journal of Botany* 102(10): 1599–1609. DOI: 10.3732/ajb.1500237

De Castro O., Gargiulo R., Del Guacchio E., Caputo P., De Luca P. 2015. A molecular survey concerning the origin of *Cyperus esculentus* (Cyperaceae, Poales): two sides of the same coin (weed vs. crop). *Annals of Botany* 115(5): 733–745. DOI: 10.1093/aob/mcv001

Delisle F., Lavoie C., Jean M., Lachance D. 2003. Reconstructing the spread of invasive plants: taking into account biases associated with herbarium specimens. *Journal of Biogeography* 30(7): 1033–1042. DOI: 10.1046/j.1365-2699.2003.00897.x

De Vere N., Rich T. C. G., Ford C. R., Trinder S. A., Long C., Moore C. W., Satterthwaite D., Davies H., Al-languillaume J., Ronca S., Tatarinova T., Garbett H., Walker K., Wilkinson M. J. 2012. DNA barcoding the native flowering plants and conifers of Wales. *PLoS ONE* 7(6): e37945. DOI: 10.1371/journal.pone.0037945

Doyle J. J., Dickson E. E. 1987. Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis. *Taxon* 36(4): 715–722. DOI: 10.2307/1221122

Drabkova L., Kirschner J., Vlcek C. 2002. Comparison of seven DNA extraction and amplification protocols in historical herbarium specimens of Juncaceae. *Plant Molecular Biology Reporter* 20(2): 161–175. DOI: 10.1007/bf02799431

Drabkova L. Z. 2013. DNA extraction from herbarium specimens. *Molecular Plant Taxonomy* 1115: 69–84. DOI: 10.1007/978-1-62703-767-9_4

Erkens R. H. J., Cross H., Maas J. W., Hoenselaar K., Chatrou L. W. 2008. Assessment of age and greenness of herbarium specimens as predictors for successful extraction and amplification of DNA. *Blumea – Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants* 53(2): 407–428. DOI: 10.3767/000651908x608052

Exposito-Alonso M., Becker C., Schuenemann V. J., Reiter E., Setzer C., Slovak R., Brachi B., Hagemann J., Grimm D. G., Chen J., Busch W., Bergelson J., Ness R. W., Krause J., Burbano H. A., Weigel D. 2018. The rate and potential relevance of new mutations in a colonizing plant lineage. *PLoS Genet* 14(2): e1007155. DOI: 10.1371/journal.pgen.1007155

Fazlioglu F. 2018. Tracing phenology of subarctic plants over the last century. *Polish Polar Research* 39(3): 413–424. DOI: 10.24425/118754

Gavrilenko T., Antonova O., Shuvalova A., Krylova E., Alpatyeva N., Spooner D., Novikova L. 2013. Genetic diversity and origin of cultivated potatoes based on plastid microsatellite polymorphism. *Genetic Resources and Crop Evolution* 60(7): 1997–2015. DOI: 10.1007/s10722-013-9968-1

Gavrilenko T. A., Chukhina I. G., Antonova O. Yu., Klimenko N. S., Novikova L. Yu. 2017. On the origin of Chilean cultivated potato (*Solanum* sect. *Petota* Dumort.). In: *Taxonomy and evolutionary morphology of plants: Materials of the Conference dedicated to 85 anniversary of Tikhomirov V. N. (January 31 – February 3, 2017, Moscow)* Moscow, 136–140 pp. [In Russian]. (Гавриленко Т. А., Чухина И. Г., Антонова О. Ю., Клименко Н. С., Новикова Л. Ю. О происхождении чилийского культурного картофеля (*Solanum* sect. *Petota* Dumort.) // Систематика и эволюционная морфология растений: Материалы конференции, посвященной 85-летию со дня рождения Тихомирова В. Н. (31 января – 3 февраля 2017 г., Москва). М., 2017. С. 136–140).

Geltman D. V. 2012. Russian science and scientific collections. *Troitskiy variant – nauka* 22(116): 3 [In Russian] (Гельтман Д. В. Российская наука и научные коллекции // Троицкий вариант – наука, 2012. № 22 (116). С. 3).

Gureyeva I. I. 2010. The world herbarium fund and its allocation. *Bot. Zhurn. (Moscow & St. Petersburg)* 95(11): 1658–1667 [In Russian]. (Гуреева И. И. Мировой гербарный фонд и его распределение // Бот. журн., 2010. Т. 95, № 11. С. 1658–1667).

Gussarova G., Allen G. A., Mikhaylova Y., McCormick L. J., Mirré V., Marr K. L., Hebda R. J., Brochmann C. 2015. Vicariance, long-distance dispersal, and regional extinction-recolonization dynamics explain the disjunct circumpolar distribution of the arctic-alpine plant *Silene acaulis*. *American Journal of Botany* 102(10): 1703–1720. DOI: 10.3732/ajb.1500072

- Gutaker R. M., Reiter E., Furtwangler A., Schuenemann V. J., Burbano H. A.** 2017. Extraction of ultrashort DNA molecules from herbarium specimens. *BioTechniques* 62(2): 76–79. DOI: 10.2144/000114517
- Hansen A. J.** 2006. Crosslinks rather than strand breaks determine access to ancient DNA sequences from frozen sediments. *Genetics* 173(2): 1175–1179. DOI: 10.1534/genetics.106.057349
- Hardion L., Verlaque R., Vorontsova M. S., Combroux I., Chen C.-W., Takamizo T., Vila B.** 2017. Does infra-specific taxonomy match species evolutionary history? A phylogeographic study of *Arundo formosana* (Poaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 183(2): 236–249. DOI: 10.1093/botlinnean/bow006
- Harris S. A.** 1993. DNA analysis of tropical plant species: an assessment of different drying methods. *Plant Systematics and Evolution* 188(1–2): 57–64. DOI: 10.1007/bf00937835
- Hart M. L., Forrest L. L., Nicholls J. A., Kidner C. A.** 2016. Retrieval of hundreds of nuclear loci from herbarium specimens. *Taxon* 65(5): 1081–1092. DOI: 10.12705/655.9
- Healey A., Furtado A., Cooper T., Henry R. J.** 2014. Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. *Plant Methods* 10(1): 21. DOI: 10.1186/1746-4811-10-21
- Hosaka K.** 2002. Distribution of the 241 bp deletion of chloroplast DNA in wild potato species. *American Journal of Potato Research* 79: 119–123. DOI: 10.1007/BF02881520
- Hosaka K.** 2004. Evolutionary pathway of T-type chloroplast DNA in potato. *American Journal of Potato Research* 81(2): 153–158. DOI: 10.1007/bf02853613
- Index Herbariorum Rossicum.* URL: <https://www.binran.ru/resources/current/herbaria/herbariums/146-detail.html> (Accessed 07 July 2019).
- Inglis P. W., Marilia de Castro R. P., Resende L. V., Grattapaglia D.** 2018. Fast and inexpensive protocols for consistent extraction of high quality DNA and RNA from challenging plant and fungal samples for highthroughput SNP genotyping and sequencing applications. *PLoS ONE* 13(10): e0206085. DOI: 10.1371/journal.pone.0206085
- International Code of Nomenclature for Cultivated Plants, Ninth Edition (ICNCP).* 2016. Eds. C. D. Brickell, C. Alexander, J. J. Cubey, J. C. David, M. H. A. Hoffman, A. C. Leslie, V. Malecot, X. Jin. *Scripta Horticulturae* 18: 190 pp.
- Jones A. S., Mian A. M., Walker R. T.** 1968. The alkaline degradation of deoxyribonucleic acid derivatives. *Journal of the Chemical Society C: Organic* 2042–2044. DOI: 10.1039/j39680002042
- Jonsson H., Ginolhac A., Schubert M., Johnson P. L. F., Orlando L.** 2013. mapDamage2.0: fast approximate Bayesian estimates of ancient DNA damage parameters. *Bioinformatics* 29(13): 1682–1684. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt193
- Juzepczuk S. W.** 1937. New species of *Solanum* L. genus from the group *Tuberarium* Dun. *Izvestiya AN SSSR, seriya biologiya* [Bulletin de l'Academie des Sciences de l'URSS, Serie Biologique] 2: 295–331 [In Russian]. (**Юзенчук С. В.** Новые виды рода *Solanum* из группы *Tuberarium* Dun. // Изв. АН СССР, сер. биол., 1937. № 2. С. 295–331).
- Juzepczuk S. W., Bukasov S. M.** 1929. A contribution to the question of the origin of the potato. In: *Proceedings of the USSR Congress of Genetics, Plant- and Animal-Breeding* 3: 593–611 [In Russian]. (**Юзенчук С. В., Букасов С. М.** К вопросу о происхождении картофеля // Труды Всесоюзного съезда по генетике, селекции, семеноводству и племенному животноводству. 1929. Т. 3. С. 593–611).
- Kistler L.** 2011. Ancient DNA Extraction from Plants. *Methods in Molecular Biology* 840: 71–79. DOI: 10.1007/978-1-61779-516-9_10
- Krinitsina A. A., Sizova T. V., Zaika M. A., Speranskaya A. S., Sukhoruko A. P.** 2015. A rapid and cost-effective method for DNA extraction from archival herbarium specimens. *Biochemistry (Moscow)* 80(11): 1478–1484. DOI: 10.1134/S0006297915110097
- Lehtonen S., Christenhusz M.** 2010. Historical herbarium specimens in plant molecular systematics — an example from the fern genus *Lindsaea* (Lindsaeaceae). *Biologia* 65(2): 204–208. DOI: 10.2478/s11756-010-0008-8
- Lindahl T.** 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362(6422): 709–715. DOI: 10.1038/362709a0
- Lindahl T., Andersson A.** 1972. Rate of chain breakage at apurinic sites in double-stranded deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 11(19): 3618–3623. DOI: 10.1021/bi00769a019
- Lindahl T., Nyberg B.** 1972. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 11(19): 3610–3618. DOI: 10.1021/bi00769a018
- Link V., Kousathanas A., Veeramah K., Sell C., Scheu A., Wegmann D.** 2017. ATLAS: Analysis Tools for Low-depth and Ancient Samples. *bioRxiv*: 105346. DOI: 10.1101/105346
- Lundstrom M., Forsberg N. E. G., Heimdahl J., Hagenblad J., Leino M. W.** 2018. Genetic analyses of Scandinavian desiccated, charred and waterlogged remains of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Archaeological Science* 22: 11–20. DOI: 10.1016/j.jasrep.2018.09.006
- Magwe-Tindo J., Wieringa J. J., Sonke B., Zapfack L., Vigouroux Y., Couvreur T. L. P., Scarcelli N.** 2018. Guinea yam (*Dioscorea* spp., Dioscoreaceae) wild relatives identified using whole plastome phylogenetic analyses. *Taxon* 67(5): 905–915. DOI: 10.12705/675.4

- Malmstrom C. M., Shu R., Linton E. W., Newton L. A., Cook M. A.** 2007. Barley yellow dwarf viruses (BYDVs) preserved in herbarium specimens illuminate historical disease ecology of invasive and native grasses. *Journal of Ecology* 95:1153–1166. DOI: 10.1111/j.1365-2745.2007.01307.x
- Martin M. D., Cappellini E., Samaniego J. A., Zepeda M. L., Campos P. F., Seguin-Orlando A., Wales N., Orlando L., Ho S. Y. W., Dietrich F. S., Mieczkowski P. A., Heitman J., Willerslev E., Krogh A., Ristaino J. B., Gilbert M. T. P.** 2013. Reconstructing genome evolution in historic samples of the Irish potato famine pathogen. *Nature Communications* 4(1): 2172. DOI: 10.1038/ncomms3172
- Martin M. D., Vieira F. G., Ho S. Y. W., Wales N., Schubert M., Seguin-Orlando A., Ristaino J. B., Gilbert M. T. P.** 2015. Genomic characterization of a South American *Phytophthora* hybrid mandates reassessment of the geographic origins of *Phytophthora infestans*. *Molecular Biology and Evolution* 33(2): 478–491. DOI: 10.1093/molbev/msv241
- May K. J., Ristaino J. B.** 2004. Identity of the mtDNA haplotype(s) of *Phytophthora infestans* in historical specimens from the Irish Potato Famine. *Mycol. Res.* 108(5): 471–479. DOI: 10.1017/s0953756204009876
- Meineke E. K., Davies T. J., Daru B. H., Davis C. C.** 2018. Biological collections for understanding biodiversity in the Anthropocene. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 374(1763): 20170386. DOI: 10.1098/rstb.2017.0386
- O’Gorman D. T., Sholberg P. L., Stokes S. C., Ginns J.** 2008. DNA sequence analysis of herbarium specimens facilitates the revival of *Botrytis mali*, a postharvest pathogen of apple. *Mycologia* 100(2): 227–235. DOI: 10.3852/mycologia.100.2.227
- Olofsson J. K., Bianconi M., Besnard G., Dunning L. T., Lundgren M. R., Holota H., Vorontsova M. S., Hidalgo O., Leitch I. J., Nosil P., Osborne C. P., Christin, P.-A.** 2016. Genome biogeography reveals the intraspecific spread of adaptive mutations for a complex trait. *Molecular Ecology* 25(24): 6107–6123. DOI: 10.1111/mec.13914
- Omelchenko D. O., Speranskaya A. S., Ayginin A. A., Khafizov K., Krinitsina A. A., Fedotova A. V., Pozdyshev D. V., Shtratnikova V. Y., Kupriyanova E. V., Shipulin G. A., Logacheva M. D.** 2019. Improved protocols of ITS1-based metabarcoding and their application in the analysis of plant-containing products. *Genes* 10(2): 12. DOI: 10.3390/genes10020122
- Paabo S., Wilson A. C.** 1991. Miocene DNA sequences – a dream come true? *Current Biology* 1(1): 45–46. DOI: 10.1016/0960-9822(91)90125-g
- Peltzer A., Jager G., Herbig A., Seitz A., Kniep C., Krause J., Nieselt K.** 2016. EAGER: efficient ancient genome reconstruction. *Genome Biology* 17: 60. DOI: 10.1186/s13059-016-0918-z
- Primack D., Imbres C., Primack R. B., Miller-Rushing A. J., Del Tredici P.** 2004. Herbarium specimens demonstrate earlier flowering times in response to warming in Boston. *American Journal of Botany* 91(8): 1260–1264. DOI: 10.3732/ajb.91.8.1260
- Pyle M. M., Adams R. P.** 1989. *In situ* preservation of DNA in plant specimens. *Taxon* 38(4): 576–581. DOI: 10.2307/1222632
- Reape T. J., Molony E. M., McCabe P. F.** 2008. Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. *Journal of Experimental Botany* 59(3): 435–444. DOI: 10.1093/jxb/erm258
- Rogers S. O., Bendich A. J.** 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Molecular Biology* 5(2): 69–76. DOI: 10.1007/bf00020088
- Roldan-Arjona T., Ariza R. R.** 2009. Repair and tolerance of oxidative DNA damage in plants. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 681(2–3): 169–179. DOI: 10.1016/j.mrrrev.2008.07.003
- Roullier C., Benoit L., McKey D. B., Lebot V.** 2013. Historical collections reveal patterns of diffusion of sweet potato in Oceania obscured by modern plant movements and recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(6): 2205–2210. DOI: 10.1073/pnas.1211049110
- Saltonstall K.** 2002. Cryptic invasion by a non-native genotype of the common reed, *Phragmites australis*, into North America. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(4): 2445–2449. DOI: 10.1073/pnas.032477999
- Sanchez Barreiro F., Vieira F. G., Martin M. D., Haile J., Gilbert M. T. P., Wales N.** 2016. Characterizing restriction enzyme-associated loci in historic ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) voucher specimens using custom-designed RNA probes. *Molecular Ecology Resources* 17(2): 209–220. DOI: 10.1111/1755-0998.12610
- Sarkinen T., Staats M., Richardson J. E., Cowan R. S., Bakker F. T.** 2012. How to open the treasure chest? Optimising DNA extraction from herbarium specimens. *PLoS ONE* 7(8): e43808. DOI: 10.1371/journal.pone.0043808
- Saville A. C., Martin M. D., Ristaino J. B.** 2016. Historic late blight outbreaks caused by a widespread dominant lineage of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *PLOS ONE* 11(12): e0168381. DOI: 10.1371/journal.pone.0168381
- Savolainen V., Cuenoud P., Spichiger R., Martinez M. D. P., Crevecoeur M., Manen J.-F.** 1995. The use of herbarium specimens in DNA phylogenetics: evaluation and improvement. *Plant Systematics and Evolution* 197(1–4): 87–98. DOI: 10.1007/bf00984634
- Schubert M., Ermini L., Sarkissian C. D., Jonsson H., Ginolhac A., Schaefer R., Martin M. D., Fernández R., Kircher M., McCue M., Willerslev E., Orlando L.** 2014. Characterization of ancient and modern genomes by SNP

detection and phylogenomic and metagenomic analysis using PALEOMIX. *Nature Protocols* 9(5): 1056–1082. DOI: 10.1038/nprot.2014.063

Shapiro B., Hofreiter M. 2014. A paleogenomic perspective on evolution and gene function: new insights from ancient DNA. *Science* 343(6169): 1236573. DOI: 10.1126/science.1236573

Silva C., Besnard G., Piot A., Razanatsoa J., Oliveira R. P., Vorontsova M. S. 2016. Museomics resolve the systematics of an endangered grass lineage endemic to north-western Madagascar. *Annals of Botany* 119(3): 339–351. DOI: 10.1093/aob/mcw208

Sinitsyna T. A., Herden T., Friesen N. 2016. Dated phylogeny and biogeography of the Eurasian *Allium* section *Rhizirideum* (Amaryllidaceae). *Plant Systematics and Evolution* 302(9): 1311–1328. DOI: 10.1007/s00606-016-1333-3

Smekalova T. N., Bagmet L. V., Chukhina I. G. 2012. VIR (N. I. Vavilov institute of plant industry) herbarium (WIR) and its role in decision of plant genetic resources mobilization, conservation and studying problems. *Proceedings on applied botany, genetics and breeding* 169: 180–192 [In Russian]. (Смекалова Т. Н., Багмет Л. В., Чухина И. Г. Гербарий ВИР им. Н. И. Вавилова (WIR) и его роль в решении проблем мобилизации, сохранения и изучения генетических ресурсов растений // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции, 2012. Т. 169. С. 180–192).

Sparks T. H., Carey P. D. 1995. The responses of species to climate over two centuries: an analysis of the Marsham phenological record, 1736–1947. *The Journal of Ecology* 83(2): 321–329. DOI: 10.2307/2261570

Spooner D. M., Ghislain M., Simon R., Jansky S. H., Gavrilenko T. 2014. Systematics, diversity, genetics, and evolution of wild and cultivated potatoes. *The Botanical Review* 80(4): 283–383. DOI: 10.1007/s12229-014-9146-y

Srinivasan M., Sedmak D., Jewell S. 2002. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *The American Journal of Pathology* 161(6): 1961–1971. DOI: 10.1016/s0002-9440(10)64472-0

Staats M., Cuenca A., Richardson J. E., Vrieling-van Ginkel R., Petersen G., Seberg O., Bakker F. T. 2011. DNA damage in plant herbarium tissue. *PLoS ONE* 6(12): e28448. DOI: 10.1371/journal.pone.0028448

Staats M., Erkens R. H. J., van de Vossen B., Wieringa J. J., Kraaijeveld K., Stielow B., Geml J., Richardson J. E., Bakker F. T. 2013. Genomic treasure troves: complete genome sequencing of herbarium and insect museum specimens. *PLoS ONE* 8(7): e69189. DOI: 10.1371/journal.pone.0069189

Telle S., Thines M. 2008. Amplification of *cox2* (~620 bp) from 2 mg of up to 129 years old herbarium specimens, comparing 19 extraction methods and 15 polymerases. *PLoS ONE* 3(10): e3584. DOI: 10.1371/journal.pone.0003584

Thiers B. 2008+ [continuously updated]. *Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff*. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. URL: <http://sweetgum.nybg.org/science/ih> (Accessed 07 July 2019).

Vascular Plants Herbarium of the Komarov Botanical Institute. URL: <https://www.binran.ru/resources/current/herbaria/herbariums/136-detail.html> (Accessed 07 July 2019).

Weiss C. L., Schuenemann V. J., Devos J., Shirsekar G., Reiter E., Gould B. A., Stinchcombe J. R., Krause J., Burbano H. A. 2016. Temporal patterns of damage and decay kinetics of DNA retrieved from plant herbarium specimens. *Royal Society Open Science* 3(6): 160239. DOI: 10.1098/rsos.160239

Wieringa J. J., Sosef M. S. M. 2011. The applicability of Relative Floristic Resemblance to evaluate the conservation value of protected areas. *Plant Ecology and Evolution* 144(3): 242–248. DOI: 10.5091/plecevo.2011.588

Yoshida K., Burbano H. A., Krause J., Thines M., Weigel D., Kamoun S. 2014. Mining herbaria for plant pathogen genomes: back to the future. *PLoS Pathogens* 10(4): e1004028. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004028

Yoshida K., Sasaki E., Kamoun S. 2015. Computational analyses of ancient pathogen DNA from herbarium samples: challenges and prospects. *Frontiers in Plant Science* 6: 771. DOI: 10.3389/fpls.2015.00771

Yoshida K., Schuenemann V. J., Cano L. M., Pais M., Mishra B., Sharma R., Lanz C., Martin F. N., Kamoun S., Krause J., Thines M., Weigel D., Burbano H. A. 2013. The rise and fall of the *Phytophthora infestans* lineage that triggered the Irish potato famine. *eLife* 2: e01108. DOI: 10.7554/elife.00731

Zeng C.-X., Hollingsworth P. M., Yang J., He Z.-S., Zhang Z.-R., Li D.-Z., Yang J.-B. 2018. Genome skimming herbarium specimens for DNA barcoding and phylogenomics. *Plant Methods* 14(1): 43. DOI: 10.1186/s13007-018-0300-0

Zvyagin A. S. 2010. Extraction of DNA from leaves of *Vitis vinifera* L. *Scientific Journal of KubSAU* 58(04): 336–347 [In Russian]. (Звягин А. С. Выделение ДНК из гербарных листьев *Vitis vinifera* L. // Научный журнал КубГАУ, 2010. № 58(04). С. 336–347).