

*На правах рукописи*



СЕМИЛЕТ ТАТЬЯНА ВЯЧЕСЛАВОВНА

**Генетический анализ и таксономическая идентификация образцов  
карбонизированных зерновок, найденных на территории  
археологического памятника в Псковской области (XII век)**

Специальность 1.5.7. - Генетика

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург — 2025

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» (ВИР)

**Научный  
руководитель:**

**Швачко Наталия Альбертовна**

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией постгеномных исследований ВИР, г. Санкт-Петербург

**Официальные  
оппоненты:**

**Давоян Эдвард Румикович**

доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующий отделом биотехнологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Национальный центр зерна имени П.П. Лукьяненко», г. Краснодар

**Шнеер Виктория Семеновна**

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, лаборатории биосистематики и цитологии Ботанического института им. В.Л. Комарова Российской академии наук, г. Санкт-Петербург

**Ведущая  
организация**

«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск

Защита состоится «\_\_» 2025 года в часов на заседании диссертационного совета Д 24.1.235.01, созданного на базе ФИЦ «Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» (ВИР), по адресу: 190031, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, д. 44, телефон: 8(812) 312-51-61; факс: 8(812) 570-47-70.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова и на сайте института: [www.vir.nw.ru](http://www.vir.nw.ru).

Автореферат разослан «\_\_»\_\_\_\_\_2025 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор биологических наук

Рогозина Елена Вячеславовна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Вопросы возникновения и доместикации культурных растений в силу сложности и многоэтапности эволюционных процессов являются не до конца изученными, оставляя пробелы в понимании культуры и быта наших предков. Огромное внимание истории земледелия уделял Николай Иванович Вавилов, комплексно исследуя очаги мирового разнообразия культурных растений и территории современного на тот момент растениеводства (Вавилов, 1924; 1927). Собранная Н.И. Вавиловым и его соратниками коллекция позволила охарактеризовать существующее агробиоразнообразие и пролить свет на происхождение многих таксонов. Помимо мирового генофонда культурной флоры, сохраняемого в живом и загербаризированном виде, важными артефактами, позволяющими уточнять филогенетические взаимоотношения, происхождение и пути распространения растений, служат археоботанические находки, найденные на территориях древних поселений. Первые работы, посвященные изучению остатков культурных растений, были проведены в 1826 году. Археоботаник С. Kunth описал материал из гробниц Древнего Египта. Затем из свайных построек Швейцарии О. Neer был изучен перечень видов культурных и сорных растений (Jane, 1973). В дальнейшем палеоэтноботанические исследования продолжилось зарубежными и отечественными учеными (Янушевич, 1976). Однако зачастую идентифицировать археоботанические находки невозможно из-за внешнего повреждения. Поэтому с идентификацией древнего материала по морфологическим признакам, все чаще применяются методы молекулярной генетики (Blatter et al., 2002; Elbaum et al., 2006; Hansson et al., 2008; Kistler et al., 2015; Filatova et al., 2021; Perez-Escobar et al., 2022). Исследования исторических памятников широко проводятся на территории Дуги плодородия и в ряде других очагов мирового земледелия (Fuller et al., 2007; Brown et al., 2009; Bilgic et al., 2016). Вместе с тем пути распространения культурных растений в северные широты и, в том числе, связанная с этим история земледелия в ранние века становления нашего отечества, до настоящего времени исследовалась лишь при помощи методов идентификации по морфологическим признакам. Анализ древней ДНК образцов растений, найденных на территории России, до настоящей работы не был известен. Вместе с тем все новые археологические находки представляют интерес для комплексных исследований, включая методы палеогенетики. Большое количество растительных остатков было обнаружено археологами в 2019 году на территории городища Усвяты в Псковской области. В результате исследования Усвятского городища, датированного XII веком, и анализа почвенного слоя было найдено скопление карбонизированных зерновок. Первичный морфологический анализ выявил особенность находки – высокую долю зерновок (около 28 тыс.), относящихся к роду *Hordeum* L. (ячмень), в сравнении с родами *Triticum* L. (пшеница) и *Secale* L. (рожь). Однако, морфологический анализ не позволил уточнить видовую и внутривидовую

принадлежность ячменя. Кроме того, в находке были обнаружены и поврежденные зерновки, которые невозможно было однозначно идентифицировать с точностью до рода. Поэтому, кроме морфологического метода потребовалось применение современных палеогенетических подходов для уточнения таксономической принадлежности артефактов. А с учетом расположения Усвят на территории пересечения древних торговых путей, интерес представляло сравнение с образцами ячменя различного географического происхождения, сохраняемыми в живом виде в коллекции ВИР.

**Цель исследования** – на основе анализа макроскопических признаков зерновок и современных палеогенетических подходов провести таксономическую идентификацию карбонизированных остатков ячменя из раскопок Усвятского городища.

**Задачи.**

1) С помощью анализа макроскопических признаков зерновок определить видовую и подвиговую принадлежность ископаемых остатков ячменя из раскопок Усвятского городища (XII век)

2) На основе модификации методов выделения древней ДНК (дДНК) разработать и валидировать протокол получения препаратов дДНК зерновых культур для дальнейшего проведения ПЦР и секвенирования по Сэнгеру.

3) Разработать подход для молекулярно-генетической идентификации карбонизированных зерновок ячменя среди древних археоботанических находок, степень разрушенности которых не позволяет определить их видовую принадлежность по морфологическим признакам.

4) Определить возможность использования результатов секвенирования ген-специфичных ампликонов для сравнительной оценки генетического сходства древних и современных образцов ячменя.

5) При помощи анализа полиморфизма нуклеотидных последовательностей фрагментов генов *Nud*, *Vrs1*, *Btr1* и *Btr2* современных образцов реконструировать морфологию колоса ископаемых ячменей, выявленных при раскопках Усвятского городища.

**Методология и методы исследования.** Методология исследования основана на современных естественно-научных подходах, анализе теории и поиске новых разработок, применяемых в биологии. Использован ряд методов: морфологический анализ (анализ формы и поверхности зерновок), молекулярно-генетические методы (изолирование современного и древнего генетического материала, проверка качества препаратов спектрофотометрическим методом, рефрагментация дДНК, постановка ПЦР, проверка результатов амплификации электрофоретическим методом, элюция фрагментов гена и секвенирование по методу Сэнгера), аналитический (*in silico* анализ полногеномных баз данных: поиск аннотированных референсных последовательностей и мутаций в генах интереса, конструирование праймеров, выравнивание прочтений и поиск идентичных участков последовательностей нуклеиновых кислот).

**Научная новизна.** Впервые проведено комплексное палеогенетическое исследование исторического материала ячменя из археоботанической находки, используемого в XII веке на Северо-Западе Руси. Предложен новый метод (ПЦР-тест) для идентификации остатков растительного материала, относящегося к роду *Hordeum*. Проведено сравнение генетического сходства современных и древних ячменей из раскопа археологического памятника XII века. Впервые на основе изучения аллельного состояния «генов доместикиции» (*Nud*, *Vrs1*, *Btr1*, *Btr2*) карбонизированных зерновок реконструирована морфология колоса ископаемых остатков ячменя. В результате установлено, что в хозяйственной деятельности изучаемого городища в XII веке использовался компонент смеси, представленный зерновками двурядного пленчатого ломкоколосого ячменя, таксономическая принадлежность которого указывает на «завозной» (с более южных территорий) характер.

**Теоретическая и практическая значимость.** Результаты проведенного комплексного палеогенетического исследования, указывают на происхождение скопления зерен ячменя, найденного при раскопках Усвятского городища XII века и характеризуют биологические особенности найденного материала, а именно – сходство с *Hordeum spontaneum* С. Koch по морфологии колоса, имеют теоретическое значение для выявления деталей традиций ведения хозяйства и логистических связей Усвят с южными регионами, для уточнения таксономических и биологических особенностей ячменей из археологических раскопок; для развития междисциплинарных исследований на стыке археологии и генетики культурных растений в целом.

Разработанные в ходе исследования протокол получения препаратов ДНК зерновых культур, метод ПЦР-тестирования для установления таксономической принадлежности, а также способ сравнительной оценки генотипов древних и современных образцов ячменя имеют практическое значение для дальнейшего развития работ по палеогенетике культурных растений.

Полученные результаты используются в образовательных программах магистратуры в Университете «Сириус» и в курсах дополнительных образовательных программ ВИР.

#### **Положения, выносимые за защиту**

- 1) Разработанный ПЦР-тест “HORDEL” позволяет определить принадлежность разрушенных карбонизированных остатков, не пригодных к морфологическому анализу зерновок, к роду *Hordeum* L.
- 2) Ископаемый материал Усвятского городища (XII век) принадлежит, согласно данным молекулярного анализа генов *Nud*, *Vrs1*, *Btr1* и *Btr2*, ячменю, имеющему двурядный ломкий колос с пленчатыми зерновками.

#### **Степень достоверности и апробация результатов.**

Достоверность результатов обеспечена проведением исследований с использованием классических и современных методик, согласно правилам и требованиям работы с древней ДНК, а также использованием

высокотехнологичного оборудования. Результаты подтверждаются их воспроизводимостью в ходе эксперимента. Интерпретация данных, научные положения и сформулированные выводы подкреплены иллюстративным материалом, таблицами и рисунками. Результаты исследования опубликованы в международных и отечественных изданиях, рекомендованных высшей аттестационной комиссией РФ (ВАК).

Результаты диссертационного исследования представлены на международных конференциях: XXXV научная конференция «Новгород и Новгородская земля. История и археология», посвященной 80-летию А.С. Хорошева (г. Великий Новгород, 26-29 января, 2021 г.); V International Conference «Modern problems of genetics, radiobiology and evolution (2021)» dedicated to N.W. Timofeeff-Ressovsky and his scientific school (Армения, 5-9 октября, 2021); Plantgen (г. Казань, 10-15 июня, 2023 г.); научный семинар «Палеогенетика» (г. Санкт-Петербург, 30 ноября, 2023 г.); заседание Русского ботанического общества (г. Санкт-Петербург, 25 апреля, 2024 г.); IV Международный биотехнологический форум BioAsia Altai2024 (г. Барнаул, 23-28 сентября, 2024 г.); ВИР-130 Генетические ресурсы растений (г. Санкт-Петербург, 05-09 ноября, 2024 г.); Всероссийская научная конференция Колчинские чтения - II. Археобиология (г. Москва, 12-13 марта, 2025 г.)

**Публикации.** Результаты исследования опубликованы в четырех статьях в журналах, рекомендованных ВАК, и входящих в международные системы цитирования Scopus и Web of Science.

**Благодарности.** Автор выражает огромную благодарность своему научному руководителю и коллегам, способствовавшим реализации исследования. Автор глубоко признателен научному консультанту к.б.н. Шипиловой Л.Ю. и сотрудникам отдела агроботаники и *in situ* сохранения генетических ресурсов растений. Автор выражает благодарность к.и.н., Еремееву И.И. с.н.с. отдела славяно-финской археологии ИИМК РАН за предоставленный материал.

**Личный вклад автора.** Основная часть исследовательской работы выполнена автором самостоятельно. Некоторые работы выполнены в сотрудничестве с другими научными сотрудниками, что отражено в совместных публикациях. Работы, связанные с выполнением задач по определению архитектоники колоса (исследование генов доместикации *Nud*, *Vrs1*, *Btr1*, *Btr2*) древних ячменей XII века, осуществлялись совместно с магистром Санкт-Петербургского государственного университета – Смирновой Н.В. под руководством автора. Морфологический анализ зерновок ячменя выполнен самостоятельно в отделе агроботаники и *in situ* сохранения генетических ресурсов растений под руководством сотрудников к.б.н. Шипиловой Л.Ю. и к.б.н. Чухиной И.Г. Основная часть работы проведена самостоятельно в лаборатории постгеномных исследований ВИР в соответствии с темой НИР № 0481-2022-0007 «Выявление новых генетических маркеров селекционно-значимых свойств и новых аллельных вариантов

хозяйственно ценных генов в генофонде культурных растений и их диких родичей при помощи геномных и постгеномных технологий».

**Структура и объем диссертации.** Работа состоит из введения, основной части, содержащей 10 таблиц и 35 иллюстраций, заключения, списка литературы (включает 195 наименований из них 165 на иностранном языке) и 4 приложений. Общий объем диссертации 135 страниц.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Глава 1. Обзор литературы**

В обзоре литературе приведены сведения о палеогенетических исследованиях органических остатков животных и растений. Представлена информация об основных этапах возникновения и распространения зерновых культур. Основное внимание уделено генам доместикиции ячменя, их структуре и функциям. Также рассмотрены гены фотопериодизма и биосинтеза флавоноидных соединений, повышающие адаптивный потенциал ячменя. Подробно изложены возможности использования кодирующих последовательностей для выявления SNP и изучения генетического сходства живых организмов. Описаны особенности работы с древней ДНК и условия организации лабораторных помещений.

### **Глава 2. Материалы и методы исследования**

#### **2.1 Материалы исследования**

Предметом исследования явилось крупное скопление семян растений, найденное в 2019 году при раскопе городища Усвяты на Северо-Западе России, датированном XII веком. Пробы получены в результате анализа культурного слоя. Основную часть находки составляли карбонизированные зерновки представителей семейства Poaceae. Высушенные и карбонизировавшиеся зерновки древних растений XII века любезно предоставлены с.н.с. института Истории материальной культуры к.и.н. Еремеевым Иваном Игоревичем. Общее число семян растений разных групп составил около 34 тыс. В данной работе изучались карбонизированные зерновки ячменя (80 проб), каждая из которых содержала несколько зерновок (2-3 шт.).

При проведении исследования в работе использовались современные пленчатые и голозерные, двурядные и шестирядные образцы культурного ячменя различного эколого-географического происхождения, а также образцы ломкоколосых диких ячменей из коллекции генетических ресурсов растений Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР). Всего изучено 58 образцов: 2 образца *Hordeum. spontaneum* C. Koch (Дагестан, Сирия); 1 образец *Hordeum murinum* L. (Азербайджан); 55

образцов *Hordeum vulgare* L. (Финляндия, Канада, США, Армения, Алжир, Дагестан, Швеция, Япония, Перу, Польша, Турция, разные регионы России). Для проверки работы ПЦР-теста «HORDEL F» дополнительно были использованы образцы других видов культурных растений: *Pisum sativum* L. (к-6933), *Triticum aestivum* L. (к-37178), *Avena sativa* L. (к-14516), *Secale cereale* L. (к-11814).

## 2.2 Методы исследования

При изучении карбонизированных семян и современных образцов ячменя нами применены морфологические и молекулярно-генетические методы исследования.

**Морфологический анализ** включал в себя изучение внешней структуры зерновок: формы, цвета, поверхности. Часть материала потеряла свой исходный внешний вид в результате действия природных и антропогенных факторов и была частично или полностью разрушена

**In silico анализ.** Поиск современных данных о последовательностях генов у *H. vulgare* осуществлен с помощью алгоритма BLAST в базах данных NCBI (National Centre for Biotechnology Information <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и Phytozome13 (The plant genomics resource <https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>). Выравнивание последовательностей нуклеотидов осуществлялось в программе MEGA v.7.0.26. Дизайн праймеров и подбор условий для ПЦР (температуры отжига, вероятность образования шпилек между прямым и обратным праймером и т.д.) выполнен с использованием программ Integrated DNA (https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer) и программы Oligo Primer Analysis Software v. 6.71 на основе последовательностей, обнаруженных в базе NCBI.

### **Молекулярно-генетические методы исследования.**

**Изолирование древней и современной ДНК.** Молекулярно-генетические исследования древних зерновок ячменя проведены в лаборатории постгеномных исследований ВИР. При осуществлении работы с ископаемыми остатками зерновок растений соблюдались условия, опубликованные ранее зарубежными исследователями. Бокс для работы с древней ДНК состоит из нескольких помещений с плотно прилегающими дверями. В первом располагается чистый комплект одежды и обуви для предотвращения контаминации с современной ДНК. Вторая комната содержит ламинар-бокс, оснащенный УФ лампой, в котором находятся чистые инструменты, дозаторы переменного объема и расходные материалы (стерильные наконечники для дозаторов с фильтрами, пробирки 1,5-2 мл, ПЦР-пробирки, штативы для пробирок). Все используемые инструменты обрабатываются стерилизующим агентом (более 5 %, но менее 15% NaClO и более 30% очищенной воды) и затем 96% этанолом перед и после изоляции дДНК. На столах с поверхностью из керамической плитки располагается отдельный парк техники (амплификатор, центрифуга с охлаждением, вортекс).



Выделение древней ДНК проведено с помощью набора DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Германия), согласно протоколу производителя. Перед процедурой экстракции нуклеиновых кислот предварительно подготавливались растворы буферов: AW1, AW2 и AP1 (разбавление этанолом). Геномная ДНК выделена из древних карбонизированных зерен ячменя. Выборка включает в себя 80 проб, в каждой из которых был пул (в количестве 2-3 шт.) зерновок. ДНК современных образцов использована в качестве положительного контроля.

Экстракция ДНК из проростков образцов растений мировой коллекции ВИР осуществлялась в отдельных лабораторных помещениях (вне бокса для выделения древней ДНК). На первом этапе зерновки проращивали в стерильных стеклянных чашках Петри на световых установках в течение 5-7 дней. Затем вегетативная часть проростков была зафиксирована и заморожена при температуре -80°C. Для выделения ДНК брали навеску до 100 мг зеленой массы и гомогенизировали в жидком азоте. Выделение ДНК осуществлялось наборами DNeasy Plant Mini Kit в соответствии с протоколом фирмы изготовителя QIAGEN.

Концентрацию ДНК измеряли спектрофотометрическим методом на приборе NanoPhotometer NanoDrop (Implen, Германия). Этап рефрагментации (обогащения) древней ДНК проводили с использованием набора Sigma-Aldrich GenomePlex Complete Whole Genome Amplification (WGA kit, Великобритания).

**Амплификацию ДНК** проводили с видоспецифичными праймерами в 20 мкл ПЦР-смеси по протоколу Touch down с повышением температурного оптимума для отжига праймеров (ступенчатая ПЦР). Наличие ампликонов определяли методом электрофореза в 1% горизонтальном агарозном геле. Амплифицированные фрагменты изолировали из агарозного геля с использованием набора реагентов для элюции diaGene (Россия), согласно инструкции производителя. **Выделенные фрагменты ДНК секвенировали методом Сэнгера** на капиллярном генетическом анализаторе 3500 Applied Biosystems (США) с использованием набора реагентов Thermo Fisher для секвенирования BigDye Terminator 3.1 Cycle sequencing kit).

### Глава 3. Результаты исследования

#### 3.1. Морфологический анализ семян XII века. Определение их видовой принадлежности

В результате анализа почвенных проб из Усвятского городища выделены остатки растительного происхождения – семена XII века. В ходе первичного анализа и разбора карбонизированных семян, обнаружены зерновки культурных и семена сорных растений. В результате разбора образцов были определены по морфологическим признакам остатки растений, принадлежащих к родам *Hordeum* (ячмень), *Avena* (овес), *Triticum* (пшеница), *Secale* (рожь), а также семена сорных растений семейств Polygonaceae Juss.

(Гречишные), Chenopodiaceae Vent. (Маревые) и Fabaceae Lindl. (Бобовые) (таблица 1).

Таблица 1 – Таксономическая принадлежность древних семян

| №     | Родовая принадлежность семян | Число семян в процентном соотношении | Количество семян в находке археологического памятника |
|-------|------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| 1     | <i>Hordeum</i>               | 28825                                | 85%                                                   |
| 2     | <i>Avena</i>                 | 3339                                 | 6%                                                    |
| 3     | <i>Triticum</i>              | 412                                  | 2,8%                                                  |
| 4     | <i>Secale</i>                | 1296                                 | 4%                                                    |
| 5     | <i>Rumex</i>                 | 226                                  | Менее 1%                                              |
| 6     | <i>Chenopodium</i>           | 2                                    | Менее 1%                                              |
| 7     | <i>Pisum</i>                 | 1                                    | Менее 1%                                              |
| 8     | Разрушенные зерновки         | Около 50                             | Менее 1%                                              |
| Итого |                              | 34101                                | 100%                                                  |

Большую часть находки составляли зерновки ячменя (около 85%). Форма зерновок удлинненно-эллиптическая, относительно плоская, веретенообразная, заостренная к обоим концам. Наблюдались остатки пленок. Из древних образцов ячменя с сохранившейся формой зерновки, а также из разрушенных семян была экстрагирована ДНК для уточнения таксономической принадлежности и реконструкции внешнего облика растений, возделываемых древними земледельцами на территории Древней Руси.

### 3.2. Получение препаратов древней ДНК. Постановка рефрагментации образцов древней ДНК

На первом этапе исследования проводился анализ данных *in silico* и конструирование праймеров для постановки ПЦР и секвенирования. Праймеры сконструированы для кодирующих частей генов *Nud*, *Btr1*, *Btr2*, *Vrs1*, *Chi*, *Elf3*, *DFR*, *F3H* и фланкируют короткие фрагменты до 300 п.н. Необходимость работы с короткими фрагментами обусловлена высокой степенью деградации древней ДНК и невозможностью амплифицировать длинные участки нуклеотидных последовательностей. Всего сконструировано 48 пар праймеров: *Nud* (*Nudum*, 6 пар), *Btr1* (*Non-brittle rachis* 1, 4 пары), *Btr2* (*Non-brittle rachis* 2, 4 пары), *Vrs1* (*Six-Rowed Spike*, 10 пар), *Chi* (*Chalcone-flavanone isomerase*, 3 пары), *Elf3* (*Early flowering* 3, 11 пар), *DFR* (*Dihydroflavonol reductase*, 5 пар), *F3H* (*Flavanone-3-hydroxylase*, 5 пар) для постановки ПЦР и секвенирования по Сэнгеру. Одна из пар праймеров к гену *Elf3*: F-CACCAGAGACACAGACCCTT, R-GCCATGCTCACTCACTCA (продукт 288 п.н.) использована в качестве таксон-специфичного теста (HORDEL) для разрушенных древних зерновок. Данная пара расположена на

консервативных фрагментах гена, характерных только для представителей рода *Hordeum*.

Изолирование древней ДНК осуществлялось согласно протоколу производителя QIAGEN с помощью набора DNeasy Plant Mini Kit (Germany). В протокол внесены некоторые модификации: инкубация в морозильной камере (-23°C) от 1-2 часа, уменьшение объема буфера для промывки ДНК на колонке (400 мкл, вместо 500 мкл), один этап элюции ДНК. Выборка состояла из 80 проб древних зерновок ячменя. Каждая проба состояла из пула семян (2-3 шт.). Перед постановкой полимеразной цепной реакции осуществлялось измерение концентрации ДНК с помощью спектрофотометра Nanodrop. Концентрация древней ДНК до рефрагментации варьировалась в диапазонах от  $1.45 \pm 0.01$  (нг/мкл) до  $2.00 \pm 0.02$  (нг/мкл).

Полученные концентрации препаратов ДНК не позволяют проводить дальнейшие исследования, поэтому нами добавлен этап рефрагментации ДНК. Технология обогащения путем целевой гибридизации дает возможность накопить пул фрагментов ДНК для повышения точности сборки протяженных областей генома. После проведения обогащения, качество препаратов повышалось, и концентрация ДНК в среднем составила  $208.80 \pm 2.09$  (нг/мкл).

Подтверждение наличия генетического материала получено при постановке амплификации с праймерами к последовательности гена *factor elongation 1α* (ген домашнего хозяйства) для семейства Poaceae (рисунок 1).

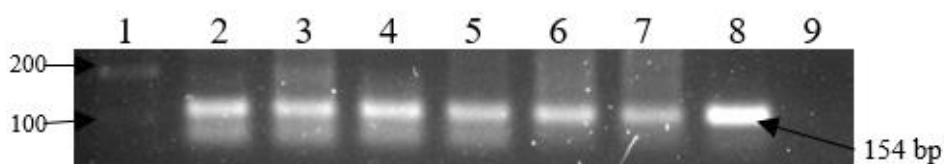


Рисунок 1 – Электрофоретические спектры продуктов амплификации современных и древних образцов ДНК ячменя к кодирующему участку гена домашнего хозяйства (1- Маркер молекулярной массы St 100 (Биолабмикс, Россия); 2-4 – образцы древней ДНК ячменя; 5-6 – образцы ДНК, разрушенных зерновок; 7 – образец ДНК современных голозерных ячменей; 8 – образец ДНК современных пленчатых ячменей; 9 – отрицательный контроль) (Semilet et al., 2023)

Для определения таксономической принадлежности фрагментированных древних зерновок нами разработана тест-система «HORDELF». Разработанная тест-система с таксон-специфичными праймерами позволяет определять принадлежность растительного материала к роду *Hordeum*. Для разработки системы ПЦР-тестирования выбран ген *Elf3* (*Early flowering 3*), расположенный на хромосоме 1Н. Ген кодирует локализованный в ядре белок ELF3-like protein 2, важный для восприятия продолжительности светового периода и регуляции экспрессии генов циркадных ритмов. С помощью алгоритма BLAST (NCBI) проведен поиск уникальных участков гена *Elf3* у разных однодольных и двудольных растений.

В результате анализа *Elf3* найдены участки, специфичные для рода *Hordeum*, и при этом консервативные внутри рода (положения 33-53 п.н. и 303-320 п.н.). Таким образом, разработана тест-система «HORDELf» с таксон-специфичными праймерами. При проверке работы HORDELf взяты современные образцы зерновых и зернобобовых культур из коллекции ВИР: *Pisum sativum* (к-6933), *Triticum aestivum* (к-37178), *Avena sativa* (к-14516), *Secale cereale* (к-11814), *Hordeum spontaneum* (w-610), *Hordeum vulgare* (к-27605). Постановка ПЦР с парой праймеров к консервативной области гена *Elf3* подтвердила специфичность амплификации у образцов рода *Hordeum* (Семилет и др., 2024 в) (рисунок 2).

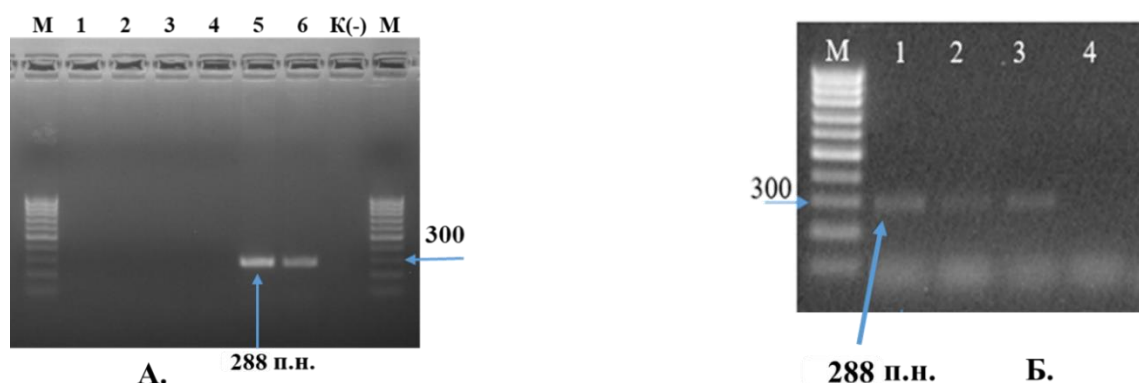


Рисунок 2 – Электрофоретические спектры продуктов амплификации с праймерами тест-системы HORDELf: А – современных образцов ДНК зерновых (1 – *P. sativum*; 2 – *T. aestivum*; 3 – *A. sativa*; 4 – *S. cereale*; 5 – *H. vulgare*; 6 – *H. spontaneum*; К – отрицательный контроль; М – Маркер молекулярной массы St100, Биолабмикс (Россия)) и Б – дДНК из разрушенных остатков семян (1 – 3 образцы древней ДНК; 4 – Отрицательный контроль, М– Маркер молекулярной массы St100, Биолабмикс (Россия))

Таким образом, проведенные нами морфологические и молекулярно-генетические исследования позволили установить систематическую принадлежность древних зерновок, что подтверждает возможность применения палеогенетических методов для решения подобных задач.

### 3.3. Поиск и анализ однонуклеотидного полиморфизма для оценки генетического сходства древних и современных образцов ячменя

При изучении полиморфизма ДНК древних семян, найденных в ходе археологических раскопок, и сравнении их с современными образцами можно либо находить следы адаптации форм, используемых в древности, к неблагоприятным условиям окружающей среды, либо уточнять происхождение образцов. В зависимости от эволюционной значимости/нейтральности выявляемых отличий возможно получать дополнительные свидетельства о торгово-экономических связях между регионами в разные эпохи.

В нашем исследовании поиск и сравнение коротких фрагментов генома у древних и староместных образцов мировой коллекции ВИР различного

географического происхождения позволили выявить идентичные районы генов и уточнить некоторые особенности ячменя XII века. На первых этапах осуществлялась постановка ПЦР с разработанными праймерами и секвенирование по Сэнгеру участков генов *Nud*, *Btr1*, *Btr2*, *Vrs1*, *Elf3*, *Chi*, *DFR*, *F3H* у староместных образцов коллекции ВИР. Анализ последовательностей выявил большое количество SNP у генов *Elf3* и *Chi*.

Так, например, в последовательностях гена *Elf3* у изученного материала выявлено 8 SNP, а в гене *Chi* – 10. У образцов древнего ячменя удалось амплифицировать области, несущие 7 SNP: 3 SNP в гене *Elf3* и 4 SNP в гене *Chi* (таблица 2). Проведенный *in silico* анализ выявленных SNP показал, что они являются нейтральными и не приводят к изменению в структуре белка, поэтому могут использоваться для сравнительного анализа происхождения образцов.

Таблица 2 – Аллельные варианты генов *Elf3* и *Chi*, и их характеристики

| Ген         | Позиция (пн) | SNP образцов ячменя ВИР | SNP у древнего ячменя | Нейтральность замены | Современные образцы с аллелем, одинаковым с древним ячменем         |
|-------------|--------------|-------------------------|-----------------------|----------------------|---------------------------------------------------------------------|
| <i>Elf3</i> | 735          | T/C                     | NA                    | NA                   | NA                                                                  |
|             | 752          | T/C                     | NA                    | NA                   | NA                                                                  |
|             | 765          | T/C                     | NA                    | NA                   | NA                                                                  |
|             | 2297         | T/C                     | C                     | S                    | к-27605                                                             |
|             | 2345         | A/G                     | G                     | S                    | к-27605                                                             |
|             | 3372         | T/C                     | NA                    | NA                   | NA                                                                  |
|             | 3502         | A/G                     | A                     | S                    | к-15541; к-20455; к-7510                                            |
|             | 3619         | A/G                     | NA                    | NA                   | NA                                                                  |
| <i>Chi</i>  | 6072         | T/C                     | C                     | S                    | к-15541; к-17442; к-18532; к-6683; к-20279; w-610                   |
|             | 6078         | G/C                     | NA                    | NA                   | NA                                                                  |
|             | 6094         | A/G                     | NA                    | NA                   | NA                                                                  |
|             | 6129         | C/A                     | NA                    | NA                   | NA                                                                  |
|             | 6168         | T/C                     | NA                    | NA                   | NA                                                                  |
|             | 6111         | T/C                     | C                     | S                    | к-15541; к-17442; к-18532; к-6683; к-20279; w-610; w-843            |
|             | 6207         | G/C                     | G                     | S                    | все, кроме <i>H. murinum</i>                                        |
|             | 6274         | C/A                     | C                     | S                    | к-15541; к-17442; к-18532; к-20455; к-27605; к-6683; к-29209; w-610 |
|             | 6279         | C/A                     | NA                    | NA                   | NA                                                                  |
|             | 6327         | G/T                     | NA                    | NA                   | NA                                                                  |

\*Примечание: NA – фрагмент, несущий данный SNP-локус не удалось амплифицировать у образцов древней ДНК, S – синонимичная замена; Образцы *H. vulgare* коллекции ВИР к-27605 (Белоруссия), к-15541 (Швеция), к-17442 (Дания), к-18532 (Великобритания), к-6683 (Армения), к-20279 (Япония), к-20455 (Швеция); *H. spontaneum*, w-610 (Дагестан); *H. murinum*, w-843 (Азербайджан).

Таким образом, ген-специфичные ампликоны в результате секвенирования по Сэнгеру являются информативным источником SNP, которые могут являться частью сравнительной оценки генетического сходства древних и современных образцов ячменя.

### 3.4. Изучение у древнего ячменя XII века генов доместикации, ассоциированных с архитектурой колоса

Дикий предок ячменя *H. spontaneum* обладает морфологическими признаками, которые способствуют распространению и защите зерновки от неблагоприятных факторов окружающей среды и патогенных организмов. Ломкий колос позволяет активно расселяться и произрастать на новых территориях. Наличие цветковых чешуй в составе оболочек зерновок обеспечивают созревание и сохранность зерна. Однако все эти признаки неблагоприятны для хозяйственной деятельности. При морфологическом анализе карбонизированных остатков ячменя нам удалось выявить наличие отдельных фрагментов пленок у зерновок, что дало нам возможность определить пленчатую форму ячменя. Проведенные палеогенетические исследования карбонизированных зерновок ячменя позволили восстановить морфологию колоса. При постановке ступенчатой ПЦР были использованы праймеры, фланкирующие небольшие участки генов (до 300 п.н.) генов доместикации (*Nud*, *Btr1*, *Btr2*, *Vrs1*).

Изучение признака пленчатости / голозерности современного и древнего ячменя проведено при помощи анализа гена *Nud*. Фрагменты данного гена были амплифицированы у древней и современной ДНК и подготовлены для секвенирования по методу Сэнгера. Полученные прочтения нуклеотидов выравнивались относительно референсной последовательности гена *Nud* из базы NCBI (KP245804.1). При выравнивании опубликованные ранее мутации не были обнаружены. В одной позиции (643 п.н.) выявлен SNP (замена аденина на тимин), который не менял строение белка (рисунок 3).

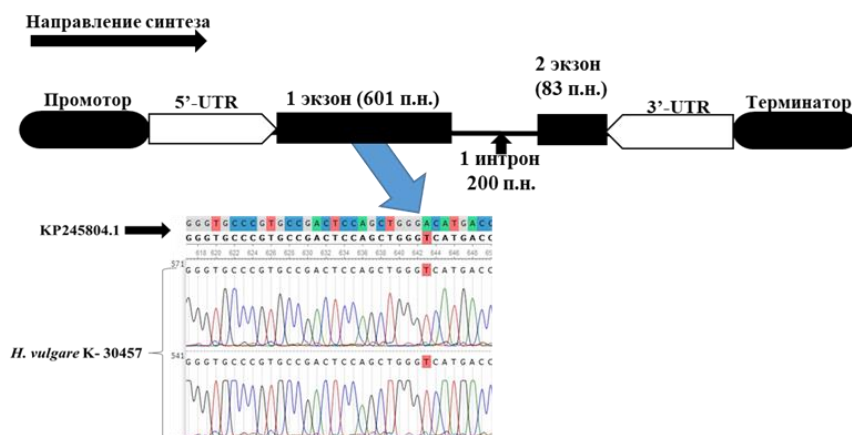


Рисунок 3 – Выравнивание фрагментов последовательностей нуклеотидов современного ячменя к-30457 относительно референсной последовательности гена *Nud* из базы NCBI (KP245804.1)

Таким образом полученные нами данные подтверждают наличие доминантного аллеля *Nud* у древних образцов ячменя и наличие признака пленчатости (Semilet et al., 2023; Семилет и др., 2024 б).

На следующем этапе осуществлялось изучение аллельного состояния генов, ассоциированных с ломкоколосостью. При постановке ПЦР были получены продукты амплификации фрагментов генов *Btr1* и *Btr2* из современных и древних образцов. Анализ данных секвенирования фрагментов генов подтвердил отсутствие «мутаций доместикации» в генах *Btr1* (рисунок 4) и *Btr2* у образцов диких ломкоколосых ячменей (w-909 и w-610), и наличие аннотированных мутаций (делеций) у культурных неломкоколосых форм ячменя к-27605 и к-24634.

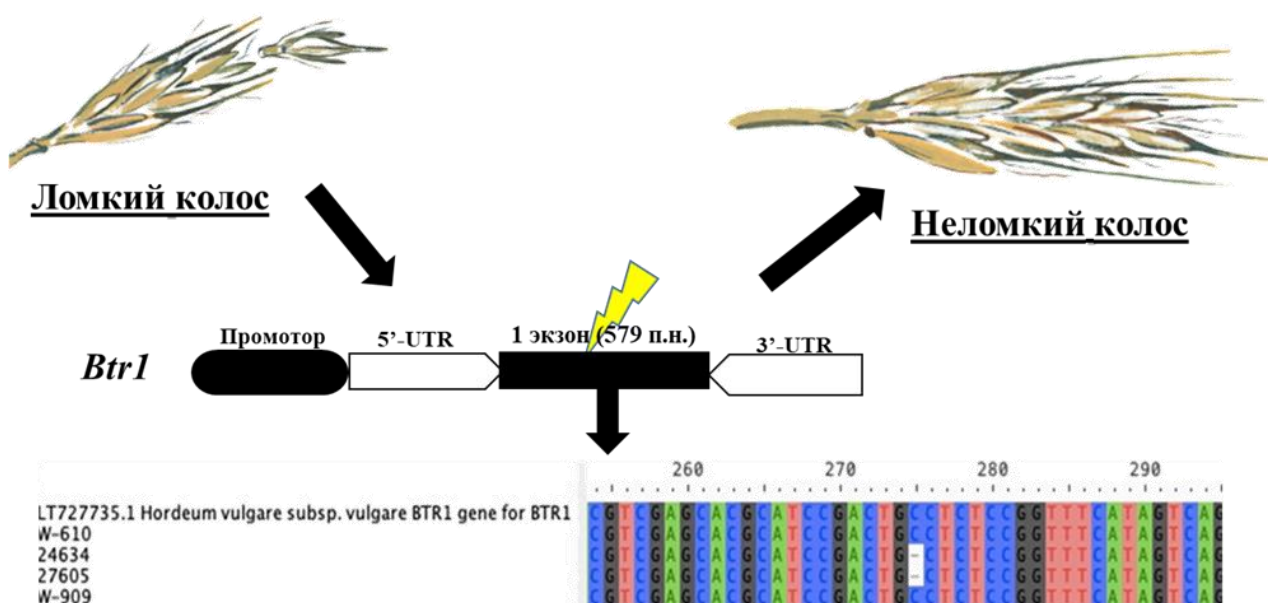


Рисунок 4 – Выравнивание последовательностей фрагментов генов современных образцов ячменя из коллекции ВИР относительно референсной последовательности из базы NCBI (LT727735.1). Выявление аннотированных делеций в гене *Btr1*

Таким образом, секвенирование участков генов *Btr1* и *Btr2* у древних образцов ячменя не выявило делеций, связанных с синдромом доместикации. Это позволило предположить, что изучаемые артефакты XII века принадлежали растениям ячменя, имевшим ломкий колос.

Исследование рядности колоса древнего ячменя определено с помощью исследования аллельного состояния *Vrs1*. На основе анализа последовательности полученных фрагментов гена *Vrs1* древних образцов ячменя при сравнении их с контрольными образцами (двурядные w-610, w-909, к-27605 и шестирядный к-24634) из коллекции ВИР, перестроек в генетическом материале, приводящих к шестирядности колоса, выявлено не было (Семилет и др., 2024 б) (рисунок 5).



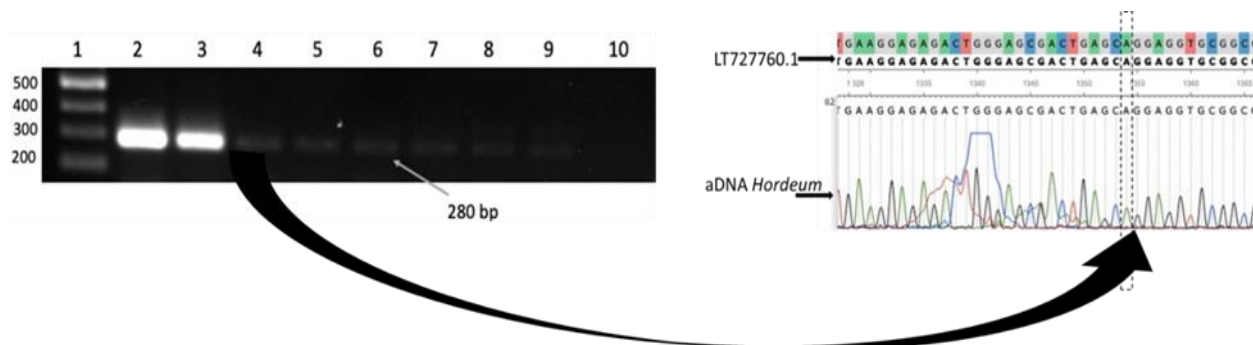


Рисунок 5 – Выравнивание прочтений фрагмента гена *Vrs1* древних образцов ячменя относительно референсной последовательности из базы данных NCBI (LT727760.1)

Таким образом, на основе полученных нами данных установлено, что найденные в раскопках зерновки ячменя принадлежали растениям с двурядным ломким колосом и пленчатым зерном.

#### Глава 4. Обсуждение результатов

До настоящего времени для палеонаходок применялся в основном морфологический анализ внешнего строения (форма, структура, цвет образца), который позволял сделать вывод о таксономической принадлежности древнего организма. Однако зачастую, в результате длительного хранения и при проведении археологических работ, нарушается форма, структура объектов и сохраняются отдельные фрагменты растительных остатков. Поэтому к найденным артефактам становится невозможно применять морфологические методы и чаще в исследования стали привлекать современные естественнонаучные подходы. В свою очередь это способствовало развитию новой дисциплины - палеогенетики.

В нашем исследовании смесь семян включала образцы с хорошо сохранившейся формой и отдельные фрагменты зерновок. Из общего числа семян (34101 шт), менее 1% зерновок были с сильными повреждениями и морфологические методы анализа оказались неэффективными. Однако большинство зерновок ячменя сохранили форму и остатки пленок, что позволило нам применить современные молекулярно-генетические методы, освоить основные этапы работы с древней ДНК и подтвердить результаты морфологического анализа.

В нашем исследовании осуществлялись работы с карбонизированными остатками семян. Начальным этапом стал поиск протокола для экстракции максимально возможного количества фрагментов нуклеиновых кислот. При выделении ДНК из древних зерновок было опробовано несколько коммерческих наборов и протоколов производителей:

- ДНК Экстран - 3– («Синтол», Россия);
- Выделение при помощи СТАВ-буфера;
- DiamondDNA Plant kit (Россия);



- DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Германия)

Из перечисленных выше протоколов, наиболее оптимальным для нашего объекта стал коммерческий набор DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Германия). После изоляции древней ДНК были поставлены дополнительные реакции обогащения, которые позволяли повысить концентрацию в результате наработки пула нуклеотидов для дальнейшей постановки амплификации и секвенирования по методу Сэнгера. При работе с древней ДНК были соблюдены правила организации лаборатории и учитывались все рекомендации по обработке помещений и инструментов для работы с древней ДНК. В результате были получены достоверные данные о нуклеотидном полиморфизме и архитектонике колоса древних ячменей XII века. Разработанный в ходе исследования ПЦР-тест со специфичными праймерами, показывает возможность получать короткие фрагменты дДНК, и определять таксономическую принадлежность разрушенных зерновок.

Анализ древней ДНК может способствовать оценке эволюционной близости палеонаходок и современных форм. Особое внимание следует уделить участкам с высокой изменчивостью с однонуклеотидным полиморфизмом (SNP). Участки с однонуклеотидным полиморфизмом у современного и древнего генетического материала дает возможность выявить генетическое сходство и сформулировать предположения об этапах формирования адаптивного потенциала к экологическим факторам, приуроченным к определенной территории.

Для определения предполагаемого места происхождения изучаемых форм древнего ячменя нами был проведен поиск SNP путем секвенирования ген-специфичных ампликонов (для генов *Nud*, *Btr1*, *Btr2*, *Vrs1*, *Elf3*, *Chi*, *DFR*, *F3H*), из них информативными для этой задачи оказались ампликоны генов *Elf3* и *Chi* (в кодирующих частях генов). Современная выборка образцов включала в себя староместные сорта, контрастные по регионам возделывания. Секвенирование высоко изменчивых выбранных генов позволило выявить аллельные варианты - 8 SNP *Elf3* и 10 SNP *Chi*. У образцов древнего ячменя удалось амплифицировать области, несущие 7 SNP: 3 SNP в гене *Elf3* и 4 SNP в гене *Chi*. Проведенный *in silico* анализ выявленных SNP показал, что они являются нейтральными и не приводят к изменению в структуре белка, поэтому могут использоваться для сравнительного анализа происхождения образцов (Семилет и др., 2024 б).

Установленный в ходе исследований гаплотип ячменя XII века из раскопа по выявленным SNP не совпадает полностью ни с одним из изученных гаплотипов современных образцов из коллекции ВИР. Однако варианты последовательности *Elf3*, в которых найдены замены, встречаются только у ячменя XII века и у сорта, районированного в Белорусской ССР в 1987 году (к-27605, «Криничный»).

В гене *Chi* замена гуанина на цитозин (611 п.н.) встречается у всех исследуемых современных и древних образцов, кроме *H. murinum*. Остальные пять SNP были найдены среди образцов коллекции ВИР разного

географического происхождения. По данному гену можно видеть сходство усвятского ячменя со среднеспелыми образцами из Швеции и Дании, скороспелым сортом из Армении и диким видом *H. spontaneum* (Семилет и др., 2024 б).

Распространение культурных форм на новые территории сопровождалось возникновением адаптаций к условиям окружающей среды. Выявленное сходство усвятского ячменя с белорусским сортом «Криничный» по аллелю гена *Elf3*, делает в перспективе интересным сравнительное изучение широкого спектра SNP в генах, связанных с адаптацией к длине светового дня, не только эволюционно нейтральных, но и ассоциированных с функционально значимыми изменениями.

Устойчивость к неблагоприятным факторам окружающей среды обуславливают флавоноидные соединения. Раннее проведенные исследования структурных генов биосинтеза флавоноидов подтверждают высокое давление отбора. Вероятно, с этим связаны эволюционно нейтральные SNP у древнего и современных ячменей. Однако именно нейтральные полиморфные локусы могут использоваться для сравнительного анализа и уточнения происхождения мало изученного генетического материала, к которому относится древний ячмень Усвятского городища.

Таким образом, изученные артефакты эволюционно значимых полиморфных локусов, найденные при раскопках, потенциально дают возможность обнаружить следы адаптации генотипов к неблагоприятным условиям окружающей среды, происходивших в древности. Исследование эволюционно нейтральных SNP перспективно для уточнения происхождения образцов и выявления дополнительных свидетельств о торгово-экономических связях между разными регионами в разные эпохи.

Палеогенетические исследования древних зерновок позволяют реконструировать внешний облик растений и решить актуальные вопросы происхождения и распространения культурных форм ячменя. При исследовании древней ДНК, выделенной из зерновок ячменя XII века (Усвятское городище), нам удалось реконструировать архитектуру колоса (Семилет и др., 2024 а, б). Изученные гены доместикации *Btr1*, *Btr2*, *Nud*, *Vrs1* ассоциированы главным образом с качественными признаками и влияют на урожайность растений. При экстракции и секвенировании фрагментов выбранных генов у древней ДНК и сравнении с аналогичными участками современных образцов не были обнаружены аннотированные мутации, которые несли за собой перестройки в последовательности нуклеотидов и возникновении нового фенотипа. Древний ячмень по морфологии колоса был ближе к дикому предку *H. spontaneum* и характеризовался ломким, двурядным колосом, имеющим пленчатые зерновки (Семилет и др., 2024 а, б). Полученные нами данные позволяют предположить принадлежность древнего ячменя к виду *H. spontaneum* и группе разновидностей *H. spontaneum* subsp. *spontaneum* L.

Морфологические и молекулярно-генетические исследования многообразия форм современных образцов ячменя коллекции ВИР и древних зерновок позволили определить генетическое родство ячменя XII века с современными формами. Предполагается, что ячмень из Усвят близок к подвиду *spontaneum* – ось стержня ломкая, при созревании распадается по членикам. Колос двурядный – на каждом уступе стержня три одноцветковых колоска (только средние фертильные, боковые бесплодные). Зерновки пленчатые (рисунок 6).



Рисунок 6 – Реконструкция колоса древнего ячменя XII века (Усвятское городище)

Таким образом, современные палеогенетические методы исследования дают возможность реконструировать внешний облик растения. Применяемые методы морфологического анализа и молекулярно-генетические подходы показали наличие пленок у зерновок ячменя XII века. Эти результаты исследований подтверждают возможность использования новых методов при изучении ископаемых остатков растений.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые проведено комплексное палеогенетическое исследование остатков культурных растений, используемых в XII веке на Северо-Западе Руси. Разработан и валидирован протокол для получения древней ДНК из карбонизированных зерновок, пригодной для постановки ПЦР и секвенирования по Сэнгеру. На основе кодирующих участков ДНК, выделенной из древних семян, при сравнении с генами образцов из коллекции ВИР реконструирована архитектура растений ячменя, используемых в хозяйственной деятельности XII века городища Усвяты (на территории современной Псковской области). На основе исследования аллельного состояния генов доместикации *Nud*, *Btr1*, *Btr2*, *Vrs1* установлено, что в изучаемой археологической находке представлены семена от растений двурядного пленчатого ломкоколосого ячменя, близкого к *H. spontaneum* subsp. *spontaneum*. Кроме анализа генов, отвечающих за морфологию растения, были изучены гены древних и современных образцов, связанные с адаптацией ячменя к условиям окружающей среды – *Elf3* и *Chi*. Выявленные отличия эволюционно нейтральны. Вероятно, формирование земледельческих традиций в данной местности в XII веке находилось в процессе становления, а особенности географического положения могли содействовать появлению здесь семенного материала, принесенного издалека и не прошедшего отбор и адаптацию к местным условиям. Предположительно, ячмень был привезен в XII веке на территорию Усвятского городища, о чем свидетельствует сочетание результатов первичного морфологического анализа и молекулярно-генетической идентификации найденного в исследуемой археологической находке ячменя как *H. spontaneum*, ареал произрастания которого ограничен территорией Передней Азии, Закавказья и южных регионов современной России. Развитие работ по палеогенетике культурных растений перспективно для выявления деталей земледельческих традиций, торговых связей древнерусских городов, уточнения таксономических и биологических особенностей археологического растительного материала.

## ВЫВОДЫ

1. На основе первичного морфологического анализа микрорельефа зерновок определена таксономическая принадлежность карбонизированных семян XII века. Большую часть материала (почти 85%) из раскопа Усвятского городища составляли семена ячменя. Часть зерен была разрушена, что затруднило идентификацию с применением морфологических методов.

2. На основе модификации методов выделения древней ДНК разработан и валидирован протокол получения препаратов дДНК зерновых культур, пригодных для дальнейшего проведения ПЦР и секвенирования по Сэнгеру.

3. Показана возможность молекулярно-генетической идентификации карбонизированных остатков ячменя (на основе ПЦР-теста “HORDELF”, специфичного для рода *Hordeum*) среди ископаемых растительных материалов, степень разрушенности которых не позволяет определить видовую/родовую принадлежность по анализу микрорельефа зерновок.

4. В результате секвенирования ген-специфичных ампликонов ячменя установлен гаплотип, изучаемого древнего ячменя (по 7 SNP), сравнение которого с гаплотипами современных образцов:

- не выявило полного совпадения ни с одним из изучаемых образцов *Hordeum* из коллекции ВИР;
- по часто встречающимся аллелям выявило сходство с *H. spontaneum* и отдельными образцами *H. vulgare* разного происхождения;
- по редко встречающимся аллелям - сходство с белорусским сортом ‘Криничный’.

5. На основе анализа генов *Nud*, *Btr1*, *Btr2* и *Vrs1* дДНК реконструирована морфология колоса ископаемых растений ячменя, выявленных при раскопках Усвятского городища: ломкоколосый двурядный фенотип с пленчатыми зерновками, характерный для *H. spontaneum* subsp. *spontaneum*.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. **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 / T. Semilet, N. Shvachko, N. Smirnova, L. Shipilina, E. Khlestkina // Biological Communications. – 2023 – №68/1 – P.3–9. DOI: 10.21638/spbu03.2023.101
2. **Семилет, Т.В.**, Швачко, Н.А., Ковалева, О.Н., Шипилина, Л.Ю., Хлесткина, Е.К. Полиморфизм ДНК в локусах, связанных с адаптацией ячменя к условиям окружающей среды, при сравнении выборок семян из археологических раскопов XII века с образцами из коллекции ВИР различного географического происхождения / Т.В. Семилет, Н.А. Швачко, О.Н. Ковалева, Л.Ю. Шипилина, Е.К. Хлесткина // Биотехнология и селекция растений. – 2024а – №7/2 – С. 67 – 74. DOI: 10.30901/2658-6266-2024-2-06
3. **Семилет Т.В.**, Смирнова Н.В., Швачко Н.А., Ковалева О.Н., Хлесткина Е.К. Восстановление архитектоники колоса древнего ячменя из раскопа Усвятского городища XII века / Т.В. Семилет, Н.В. Смирнова, Н.А. Швачко, О.Н. Ковалева, Е.К. Хлесткина// Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2024б – №185/3. С. 199–209. DOI: 10.30901/2227-8834-2024-3-199-209
4. **Семилет Т.В.**, Шипилина Л.Ю., Хлесткина Е.К., Швачко Н.А. ПЦР-тест для установления принадлежности разрушенных карбонизированных остатков к роду *Hordeum* L. // Биотехнология и селекция растений. 2024в - №4. DOI: 10.30901/2658-6266-2024-4-07