

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ И ИХ ДИКИХ РОДИЧЕЙ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ И ПРИКЛАДНЫХ ПРОБЛЕМ

Научная статья

УДК 633.34:581.543(470.311)

DOI: 10.30901/2227-8834-2024-3-199-209



Восстановление архитектоники колоса древнего ячменя из раскопа Усвятского городища XII века

Т. В. Семилет¹, Н. В. Смирнова¹, Н. А. Швачко¹, О. Н. Ковалева¹, Е. К. Хлесткина^{1, 2}

¹ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия

² Научно-технологический университет «Сирiuс», Центр генетики и наук о жизни, Краснодарский край, Россия

Автор, ответственный за переписку: Наталия Альбертовна Швачко, n.shvachko@vir.nw.ru

Актуальность. В статье приводятся данные об архитектонике колосьев древнего ячменя XII века, найденного при раскопках Усвятского городища в 2019 г. Используя современные молекулярно-генетические подходы, были изучены гены доместикации (*Btr1*, *Btr2*, *Vrs*) древних и современных образцов ячменя коллекции ВИР.

Материалы и методы. Исследованы карбонизированные зерновки, найденные археологами при раскопках Усвят. Осуществлен дизайн праймеров генов доместикации и поставлены ПЦР с современными и древними зерновками ячменя. Работы по изучению древних зерновок выполняли согласно правилам организации палеогенетической лаборатории, исключающим контаминацию с современной ДНК. Фрагменты генов доместикации современных и древних образцов ячменя секвенировали по Сэнгеру.

Результаты исследования. Выполнено выделение древней ДНК и дальнейшее ее обогащение. Анализ последовательностей генов доместикации позволил восстановить особенности строения колоса древнего ячменя.

Заключение. Восстановлена архитектоника древних злаковых. Выявлено, что древний ячмень являлся двурядным и ломкоколосым.

Ключевые слова: древняя ДНК, *Btr1*, *Btr2*, *Vrs*, *Hordeum vulgare* L.

Благодарности: работа выполнена в рамках государственного задания согласно тематическому плану ВИР по проекту № FGEM-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».

Авторы выражают огромную благодарность сотрудникам отдела агроботаники и *in situ* сохранения генетических ресурсов растений ВИР канд. биол. наук И. Г. Чухиной и канд. биол. наук Л. Ю. Шипилиной за предоставление материалов для палеогенетических работ и обсуждение результатов. Рисунки к публикации выполнены художником Е. А. Чарушиной-Капустиной.

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

Для цитирования: 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. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2024;185(3):199-209. DOI: 10.30901/2227-8834-2024-3-199-209

IDENTIFICATION OF THE DIVERSITY OF CULTIVATED PLANTS AND THEIR WILD RELATIVES FOR SOLVING FUNDAMENTAL AND APPLIED PROBLEMS

Original article

DOI: 10.30901/2227-8834-2024-3-199-209

Restoration of the spike architectonics in ancient barley excavated at the twelfth-century settlement of Usvyaty

Tatyana V. Semilet¹, Natalia V. Smirnova¹, Nataliya A. Shvachko¹, Olga N. Kovaleva¹, Elena K. Khlestkina^{1,2}

¹ N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, Russia

² Sirius University of Science and Technology, Research Center of Genetics and Life Sciences, Krasnodar Territory, Russia

Corresponding author: Nataliya A. Shvachko, n.shvachko@vir.nw.ru

Background. The data are presented on the architectonics of ancient barley spikes from the 12th century, excavated in 2019 at Usvyaty Settlement. Modern molecular genetics approaches were used to study domestication genes (*Btr1*, *Btr2*, and *Vrs*) in ancient and contemporary barleys (germplasm accessions preserved at VIR).

Materials and methods. The carbonized kernels found by archaeologists during the excavations at Usvyaty were analyzed. Primers for domestication genes were designed, and PCR was performed on contemporary and ancient barley grains. Ancient kernels were studied in accordance with the rules established for organizing a paleogenetics laboratory, which excluded any contamination with contemporary DNA. Fragments of domestication genes from contemporary and ancient barley grain samples underwent Sanger sequencing.

Results. Ancient DNA was isolated and enriched. The analysis of domestication gene sequences made it possible to reconstruct the ancient barley spike's features.

Conclusion. The ancient cereal crop architectonics was restored to ascertain a brittle two-row spike of ancient barley.

Keywords: ancient DNA, *Btr1*, *Btr2*, *Vrs*, *Hordeum vulgare* L.

Acknowledgements: the research was performed within the framework of the state task according to the theme plan of VIR, Project No. FGEM-2022-0007 "Identifying new genetic markers of significant traits for breeding and new allelic versions of agronomically important genes in the genetic diversity of cultivated plants and their wild relatives using genomic and post-genomic technologies".

The authors express their deep gratitude to Drs. Irena G. Chukhina and Liliya Yu. Shipilina, staff members of the Department of Agrobotany and *In Situ* Conservation of Plant Genetic Resources, VIR, for providing the material for paleogenetic studies and discussing the results. Illustrations to the publication were made by the artist Evgeniya A. Charushina-Kapustina.

The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work.

For citation: Semilet T.V., Smirnova N.V., Shvachko N.A., Kovaleva O.N., Khlestkina E.K. Restoration of the spike architectonics in ancient barley excavated at the twelfth-century settlement of Usvyaty. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2024;185(3):199-209. DOI: 10.30901/2227-8834-2024-3-199-209

Введение

Самые ранние достижения в области селекции растений принадлежат древним земледельцам, выделившим комплекс видов из флористических регионов земного шара. Эти растения послужили основой для первых культур, которые стали выращивать при определенных условиях и осуществлять примитивные формы отбора, направленного на выделение и закрепление хозяйственно значимых признаков (Goncharov, Kondratenko, 2008). Данные, полученные археологами при раскопках древних исторических памятников, свидетельствуют о том, что злаки первыми подверглись доместикации (Hillman, 1978; Goloubinoff et al., 1993; Brown et al., 1994; Blatter et al., 2002; Bilgic et al., 2016; Pankin, von Korff, 2017; Lister et al., 2018). Появление культурных форм приурочено к Юго-Западной Азии, которую впоследствии стали называть «Дуга плодородия» (Badr et al., 2000; Riehl et al., 2014). В древних текстах, найденных в Азии, Африке и Европе, ячмень упоминается как важный компонент пищевого рациона. Данная культура возделывалась в Сирии, Палестине, Месопотамии и по площади занимала лидирующее положение, по сравнению с другими культурами (Newman C.W., Newman R.K., 2006). Несмотря на то что во время раскопок находят множество растительных остатков, у археоботаников остается много вопросов об этапах доместикации диких предков рода *Hordeum* L. Пролить свет на данный аспект возможно путем изучения качественных (пленчатость или голозерность ячменя, ломкоколосость) и количественных признаков (рядковость) ископаемых остатков растений с помощью современных палеогенетических методов.

Архитектоника соцветия ячменя уникальна и разнообразна. Соцветие представлено сложным колосом, у которого два боковых и центральный одноцветковые колоски располагаются на одном уступе колосового стержня. На основе фертильности и стерильности боковых колосков ячмень подразделяется на двурядный и шестирядный (Koppolu et al., 2013). В геноме ячменя известно пять локусов гена *Vrs* (*Six-rowed spike*), которые ассоциированы с рядностью колоса: *vrs1*, *vrs2*, *vrs3*, *vrs4* и *vrs5* (Komatsuda et al., 2004; Ramsay et al., 2011; Koppolu et al., 2013; Bull et al., 2017; Van Esse et al., 2017; Youssef et al., 2017). Потеря функции любого из этих генов приводит к разному количеству фертильных и стерильных простых колосков (Komatsuda et al., 2004; Ramsay et al., 2011). У дикого ячменя так же, как и у современных сортов, колос может быть двурядным и шестирядным.

Еще одним хозяйственно важным признаком в селекции ячменя является ломкоколосость. Дикие предки рода *Hordeum* имели ломкий колос, что облегчало распространение растений и расселение на новые территории. Для человека такие формы усложняли сбор урожая, так как при созревании колос рассыпался и это приводило к потере урожая. Поэтому древние земледельцы отбирали растения с прочным колосом. Молекулярно-генетические методы исследования ячменя с ломким и неломким колосом выявили два гена, *Btr1* (*Non-brittle rachis 1*) и *Btr2* (*Non-brittle rachis 2*) (Takahashi, Hayashi, 1964), которые регулируют наличие мелкоклеточной зоны в месте перехода верхнего членика в нижний, развитие большого участка пазушной ткани в основании верхнего членика. Выявленные гены располагаются на хромосоме 3Н и являются взаимодополняющими. М. Pourkheiran-

dish et al. (2015) показали, что несмотря на схожую структуру и расположение на одной хромосоме, *Btr1* и *Btr2* отличаются на уровне нуклеиновых кислот и кодируют разные пептиды.

Сравнение ископаемых остатков зерновок и колосьев древнего ячменя с дикими и современными культурными формами свидетельствует об отборе, направленном на изменение архитектуры колоса. По сравнению с диким предком ячменя *H. spontaneum* (K. Koch) Thell., процесс доместикации существенно изменил внешний вид культурных растений, наделив их признаками, необходимыми для успешного возделывания и сбора урожая, – голозерностью, прочностью колоса и многорядностью. Раскопки древнего поселения Джармо в Ираке показали масштабное возделывание ячменя уже в 7000–6500 до н. э. В больших количествах двурядный голозерный ячмень выращивался на территории южной Иордании, в то время как шестирядный голозерный ячмень впервые упоминается в памятниках Али-Кош (Ali Kosh), Гаджилар (Hacilar) и Чатал Хююк (Catal Huyuk) возрастом 7000–6000 лет до н. э. (Harlan, 1979).

На сегодняшний день остаются актуальными вопросы, затрагивающие процесс доместикации ячменя, который возделывался на территории Северо-Запада России. Ранее Т. Semilet et al. (2023) при изучении древней ДНК (дДНК) карбонизированных зерновок установили, что в Усвятском городище (Псковская область) в XII веке выращивали пленчатые формы. Однако остались вопросы о строении колоса и определении рядности и ломкости колоса. Целью данного исследования являлось восстановление архитектуры колосьев древних злаков, произраставших на территории Древней Руси в XII веке, с помощью современных молекулярно-генетических методов.

Объекты исследования

Материалом для исследования послужили карбонизированные зерновки ячменя, которые были найдены при раскопках Усвятского городища XII века (Псковская область, Россия). Воздействие высоких температур на территории Усвят законсервировало семена, сохранив у большинства внешние видоспецифические признаки. Общее количество семян составило 34 000. По результатам морфологического анализа зерновок ячменя насчитывалось 28 825. Выборка карбонизированных зерновок рода *Hordeum* состояла из 20 повторностей (образцов). Современные сорта из мировой коллекции ВИР (к-24634, к-27605, к-31522) и 3 образца дикого ячменя (w-610, w-909, w-843) использовали в качестве положительных контролей.

Палеогенетические методы изучения древней ДНК

На первом этапе исследования дДНК ячменя проводили *in silico*-анализ генов, ассоциированных с ломкоколосостью (*Btr*) и рядностью простых колосков (*Vrs*) ячменя. При работе в геномных базах данных (NCBI, Phytozome) были подобраны последовательности нуклеотидов и выявлены мутации (вставки, делеции), которые приводили к изменению экспрессии генов и возникновению неломкоколосых шестирядных форм соцветий. К данным участкам были подобраны пары праймеров для дальнейшей постановки ПЦР и проведения секвенирования (таблица).

Таблица. Список праймеров, использованных в работе**Table. List of the primers used in the study**

Название	Прямой праймер	Обратный праймер	Продукт, пн	NCBI accession No.
HvVrs1	GATCGGAAAGCACTCAGCC	GAGCAAGCATACCTCGTTCTC	801	AB489121.1
HvVrs4	GAGATGGACGGAGGAGGG	GAGCAAGCATACCTCGTTCTC	282	AB489121.1
HvBtr-1a	CCGCAATGGAAGGCGATGTA	ATGGAGCACCAGGAGCT	240	LT727735.1
HvBtr-1b	ATAGTCAGCGTGGTGGTGG	CGTGGAGCTGCTCTTCCAT	255	LT727735.1
HvBtr-2	TCGTAGCTTGACCTACATCA	AGAGGGAGAAGACGTTGC	233	LT727760.1
HvBtr-2a	ATGGAGGTTTGGAGGAAGAC	AGAGGGAGAAGACGTTGC	271	LT727760.1
HvBtr-2b	GCAACGTCTTCTCCCTCT	TCAGCCATGCAGAAGCAT	328	LT727760.1

Выделение, амплификацию и секвенирование дДНК осуществляли по общепринятым правилам работы с древней ДНК, опубликованным ранее (Pääbo et al., 1989; Poinar, 2001; Semilet et al., 2023). Работы вели в специально оборудованном помещении (рис. 1).

Для изолирования ДНК использовали коммерческий набор DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Германия). Процесс выделения ДНК осуществлялся согласно протоколу производителя. Преимущество данного набора состоит в том, что благодаря двухэтапной очистке ДНК на колонках, генетический материал выделяется без примеси веществ. Стадию рефрагментации (обогащения) дДНК проводили с использованием набора Sigma-Aldrich GenomePlex Complete Whole Genome Amplification (WGA, США). Технология обогащения фрагментов ДНК посредством направленной гибридизации позволяет накапливать пул фрагментов ДНК для повышения точности сборки расширенных участков генома. Концентрацию ДНК измеряли спектрофотометрическим методом на приборе NanoPhotometer NanoDrop.

Амплификацию дДНК проводили по протоколу Touch down с повышением и понижением температурного режима отжига праймеров. Реакционная смесь общим объемом 20 мкл содержала 200 нг матричной ДНК (после рефрагментации), 2,5 мМ dNTP, 1х ПЦР-буфер (67 мМ TrisHCl, pH 8,8, 10 мМ dNTPs, 0,01% Твин-20), 12 мМ MgCl₂, 5 ед/мкл Taq-Polymerase, по 0,5 мкМ каждого из праймеров. Амплификацию проводили при следующих условиях: предденатурация в течение 2 мин при 94°C; 13 циклов, состоящих из денатурации 15 сек при 94°C, отжига 30 сек при 65°C (со снижением температуры 0,7°C/цикл) и полимеризации 45 сек при 72°C; 24 цикла, состоящие из предденатурации 15 сек при 94°C, отжига 30 сек при 56°C, полимеризации 45 сек при 72°C и финальной элонгации 10 мин при 72°C. Продукты ПЦР разделяли в 1,5–2-процентном горизонтальном агарозном геле, приготовленном на 1хТАЕ-буфере (40 мМ трис-НСl, 20 мМ ацетат натрия, 1 мМ ЭДТА, pH 8.4; «Евроген»). Фрагменты ДНК окрашивали бромидом этидия с последующей визуализацией ультрафиолетовым светом с ис-

**Рис. 1. Изоляция древней ДНК в лаборатории ВИР****Fig. 1. Isolation of ancient DNA in the VIR laboratory**

пользованием системы гель-документирования Gel Doc XR+ (Bio-Rad).

Секвенирование образцов по Сэнгеру проводили на генетическом анализаторе 3500xl (Applied Biosystems®, США). Амплифицированные фрагменты ДНК элюировали из 1-процентного агарозного геля с использованием набора diaGene, согласно протоколу производителя («Диа-М», Россия). Очищенную ДНК-матрицу использо-

становке полимеразной цепной реакции были получены короткие фрагменты гена *Btr1* современного (рис. 2, а) и древнего генетического материала ячменя (см. рис. 2, б). Выборка современных образцов ячменя включала дикорастущие виды – *H. spontaneum* (w-610, w-909), *H. murinum* L. (w-843) с ломким колосом – и культурные формы *H. vulgare* L. (к-24634, к-27605) с неломким колосом.

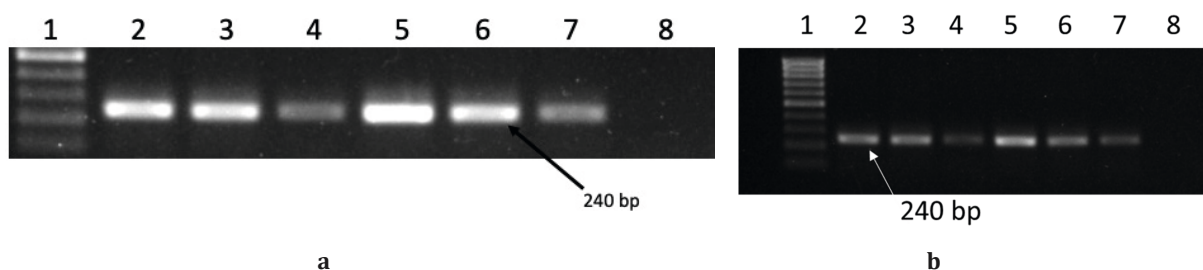


Рис. 2. Электрофореграммы продуктов амплификации образцов ДНК с праймером HvBtr1b, продукт амплификации 240 пн: а – современные образцы ДНК ячменя (1 – маркер молекулярного веса St 100; 2 – w-610; 3 – к-31522; 4 – w-843; 5 – к-24634; 6 – к-27605; 7 – w-909; 8 – отрицательный контроль); б – образцы ДНК древнего ячменя (1 – маркер молекулярного веса St 100; 2–7 – древняя ДНК; 8 – отрицательный контроль)

Fig. 2. Electrophoretic patterns of DNA amplification products obtained with the primer HvBtr1b, product size 240 bp: а – contemporary barley DNA samples (1 – molecular weight marker St 100; 2 – w-610; 3 – k-31522; 4 – w-843; 5 – k-24634; 6 – k-27605; 7 – w-909; 8 – negative control); б – ancient barley DNA samples (1 – molecular weight marker St 100; 2–7 – ancient DNA; 8 – negative control)

вали для секвенирующей реакции, которая протекала в 15 мкл смеси (содержащей 90 нг ДНК-матрицы, 10 пмоль праймера, 1,5 мкл 5X Big Dye 3.1 и 3 мкл 5X буфера) при следующих условиях: предцикл – 5 мин при 95°C; денатурация – 40 сек при 95°C; отжиг – 30 сек при 55°C; полимеризация – 4 мин при 60°C; число циклов – 25. Продукты реакции секвенирования очищали методом осаждения этанолом с последующей сушкой при комнатной температуре и растворением в 10 мкл формамида Hi-Di™ (Thermo FS, США) с целью денатурации матричной ДНК. Обработку полученных секвенограмм проводили с использованием программного обеспечения UGENE v.40.0 (Okonechnikov et al., 2012).

Результаты исследования

Для изучения архитектоники колоса древнего ячменя XII века и реконструкции внешнего облика растений применяли современные молекулярно-генетические подходы. Изучаемая выборка карбонизированных зерновок рода *Hordeum* состояла из 20 образцов. При работе с дДНК проводили дополнительно рефрагментацию для получения качественных фрагментов генетического материала. В качестве положительных контролей использовали современные сорта ячменя из мировой коллекции ВИР.

Ломкоколосый фенотип был определен при изучении аллельного состояния генов *Btr1* и *Btr2*. При по-

лученные продукты амплификации были элюированы из агарозного геля и секвенированы. На первом этапе осуществлялось секвенирование современных образцов ячменя и выравнивание относительно референсной последовательности гена *Btr1* (LT727735.1) (рис. 3). Данный этап необходим для определения возможных мутаций в гене, приводящих к возникновению неломко-колосых форм ячменя.

В двух образцах (к-24634 и к-27605) выявлена делеция одного нуклеотида (цитозина) в экзоне (положение 275 пн). Это подтверждает, что в гене *Btr1* произошла мутация, и сорта ячменя несут рецессивный аллель *btr1*, определяющий неломкий колос (культурный фенотип). У дикорастущих ломкоколосых форм не выявлено делеции в данном положении. Полученный результат свидетельствует о том, что молекулярно-генетические методы могут быть использованы для характеристики образцов ячменя по признаку «ломкоколосость». Далее осуществлялось секвенирование продуктов амплификации дДНК (рис. 4)

На следующем этапе проводили анализ гена *Btr2*, так как перестройки в его последовательности также вызывают возникновение неломкоколосых форм. Для определения аллельного состояния гена *Btr2* проводили амплификацию с видоспецифичными праймерами (см. таблицу). Полученные продукты амплификации (размер 271 пн) современной ДНК были проанализированы при

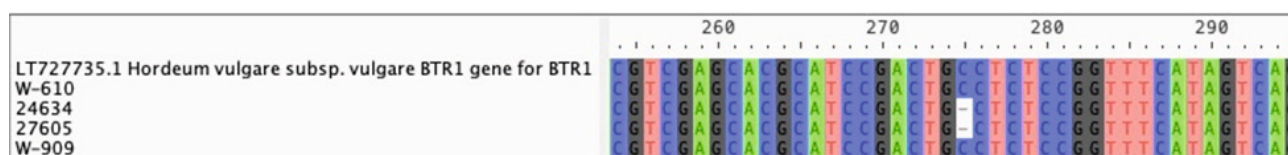


Рис. 3. Выравнивание полученных последовательностей гена *Btr1* современных образцов ячменя из коллекции ВИР относительно референсной последовательности гена из базы NCBI (LT727735.1)

Fig. 3. Alignment of the *Btr1* gene sequences from contemporary barley accessions preserved at VIR against the reference gene sequence from the NCBI database (LT727735.1)

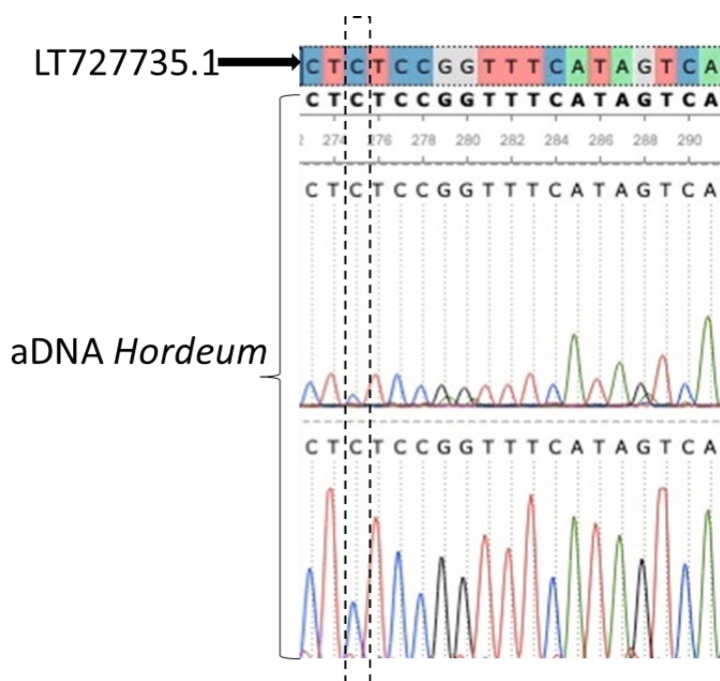


Рис. 4. Выравнивание полученных секвенограмм относительно референсной последовательности гена *Btr1* из базы NCBI (LT727735.1) и образцов древней ДНК ячменя. На рисунке фрагмент, где возможно наличие однонуклеотидной делеции, отвечающей за неломкоколосый фенотип

Fig. 4. Alignment of the obtained sequencing patterns against the reference *Btr1* gene sequence from the NCBI database (LT727735.1) and ancient barley DNA samples. The figure shows a fragment where there may be a single-nucleotide deletion responsible for the non-brittle spike phenotype

помощи секвенирования и выравнивания с референсной последовательностью из базы NCBI (LT727769.1) (рис. 5).

Результаты анализа секвенограмм образцов ячменя с неломким колосом показали отсутствие делеции в 12 пн в экзоне (285–295 пн). У дикого ячменя *H. spontaneum* (образцы w-909 и w-610) отсутствие перестроек в генах *Btr1* и *Btr2* определяет фенотипический признак – ломкоколосость. У культурных форм ячменя к-27605 и к-24634 выпадение участка в гене *Btr1* и отсутствие изменений *Btr2* связаны с возникновением неломкоколосого фенотипа. Секвенирование участка *Btr2* у древних образцов ячменя не выявило мутаций в гене.

Рядность колоса ячменя – еще один важный фенотипический признак, который определяет урожайность растений. Определение двурядности/шестирядности ячменя осуществлялось при помощи анализа аллельного состояния гена *Vrs1*. При анализе последовательностей гена из базы данных NCBI были определены три различных аллеля (*Vrs1.a1*, *Vrs1.a2*, *Vrs1.a3*). Мутации в данном гене приводят к появлению шестирядных форм.

Перед секвенированием гена *Vrs1* мы получили продукты амплификации размером около 801 пн на современных образцах двурядного (w-610, w-909, к-27605)

и шестирядного ячменя (к-24634) из коллекции ВИР (рис. 6).

После реакции секвенирования по Сэнгеру с праймерами к гену *Vrs1* получили нуклеотидные последовательности, которые с использованием программы UGENE v.40.0 (Okonechnikov et al., 2012) и программы AliView (v.1.27) выравнивали относительно референсной последовательности гена *Vrs1* из базы NCBI (AB489121.1). На основе выравнивания ресеквенированных последовательностей гена *Vrs1* была выявлена делеция в 1354-м нуклеотиде (аллель *vrs1.a*) у образца к-24634, которая приводит к сдвигу рамки считывания и является одной из наиболее распространенных мутаций, приводящих к шестирядности колоса (рис. 7).

Перед секвенированием последовательности гена *Vrs1* древних образцов ячменя провели ПЦР с перекрывающимися праймерами, которые охватывают всю последовательность гена *Vrs1*. В результате получили продукты амплификации размером до 300 пн на древних образцах ячменя (рис. 8).

На основе анализа полученных фрагментов последовательности гена *Vrs1* древних образцов ячменя мы не выявили ожидаемых перестроек в генетическом материале, приводящих к шестирядности колоса (рис. 9).

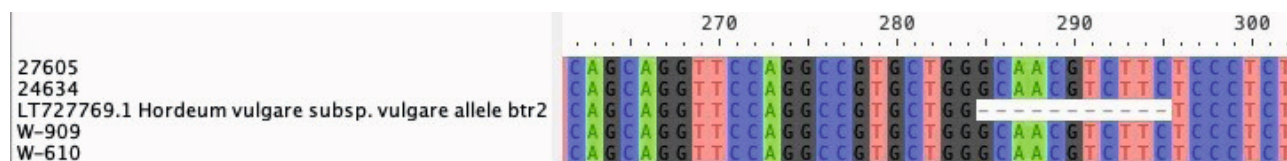


Рис. 5. Выравнивание полученных последовательностей гена *Btr2* современных образцов ячменя относительно референсной последовательности гена *btr2* из базы NCBI (LT727769.1)

Fig. 5. Alignment of the *Btr2* gene sequences obtained from contemporary barley accessions against the reference *btr2* gene sequence from the NCBI database (LT727769.1)

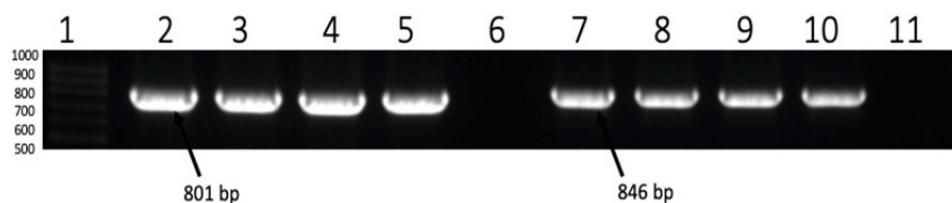


Рис. 6. Электрофоретические спектры продуктов амплификации современных образцов ДНК ячменя с праймером HvVrs1 (1 – Маркер молекулярного веса St 100; 2 – к-27605; 3 – к-24634; 4 – w-610; 5 – w-909; 6 – отрицательный контроль)

Fig. 6. Electrophoretic patterns of DNA amplification products from contemporary barley accessions with the primer HvVrs1 (1 – molecular weight marker St 100; 2 – k-27605; 3 – k-24634; 4 – w-610; 5 – w-909; 6 – negative control)

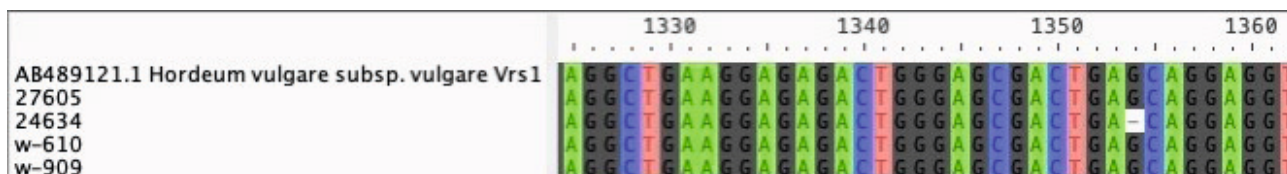


Рис. 7. Выравнивание последовательностей гена *Vrs1* современных образцов ячменя относительно референсной последовательности из базы данных NCBI (AB489121.1)

Fig. 7. Alignment of the *Vrs1* gene sequences from contemporary barley accessions against the reference gene sequence from the NCBI database (AB489121.1)

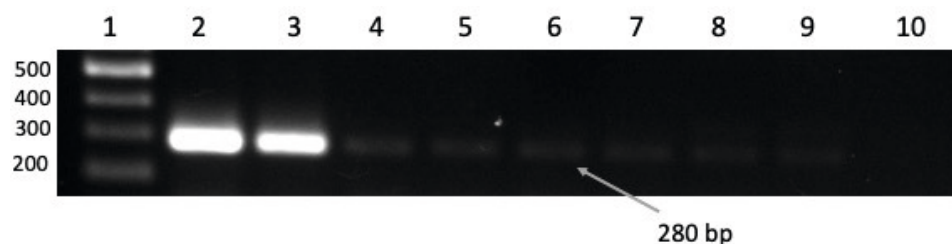


Рис. 8. Электрофоретические спектры продуктов амплификации древних образцов ДНК ячменя с праймером HvVrs4 (1 – Маркер молекулярного веса St 100; 2–9 – образцы древней ДНК ячменя; 10 – отрицательный контроль)

Fig. 8. Electrophoretic patterns of DNA amplification products from ancient barley with the primer HvVrs4 (1 – molecular weight marker St 100; 2–9 – ancient DNA samples; 10 – negative control)

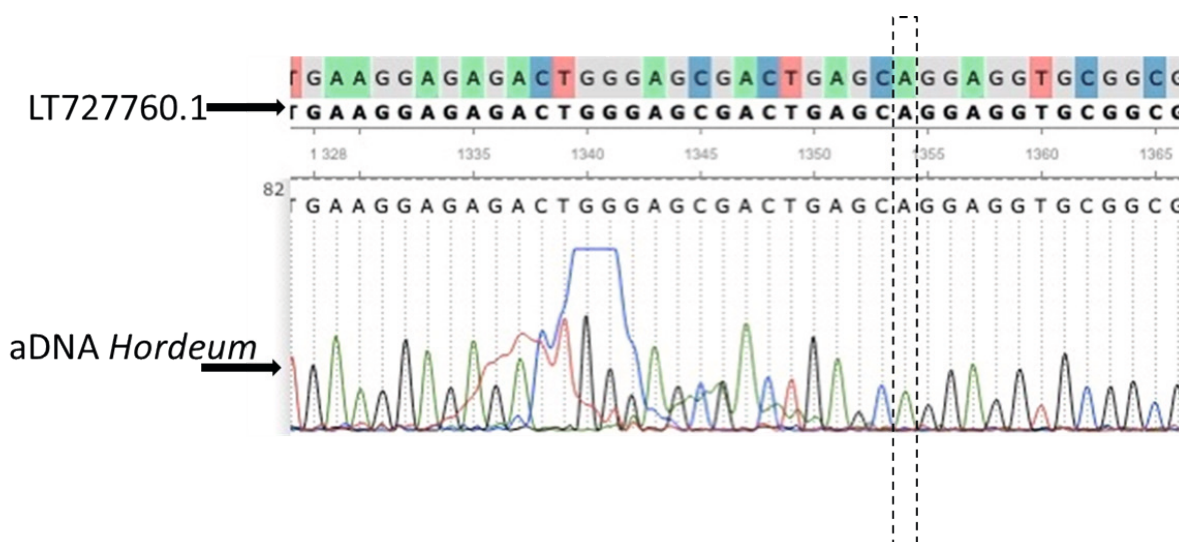


Рис. 9. Выравнивание полученных прочтений гена *Vrs1* древних образцов ячменя относительно референсной последовательности из базы данных NCBI (AB489121.1)

Fig. 9. Alignment of the obtained *Vrs1* gene reads from ancient barley against the reference sequence from the NCBI database (AB489121.1)

На основе полученных нами данных мы предполагаем, что древний ячмень обладал двурядным ломким колосом. Однако не исключен вариант, что у ячменя XII века, найденного на территории Усвятского городища, могли быть и другие перестройки в геноме, которые не удалось изучить из-за фрагментарности ДНК.

Обсуждение результатов

Проведение палеогенетических исследований ископаемых остатков растений и животных имеет свою специфику, поскольку при изучении древней ДНК высока вероятность контаминации искомой последовательности с генетическим материалом бактерий, микроорганизмов и/или современных растительных объектов. Небольшие объемы экстрагированной ДНК позволяют работать лишь с отдельными фрагментами генома (Hagelberg, Hofreiter, 2015; Semilet et al., 2023). Имеющиеся современные методологические достижения и развитие новых технологий изучения древней ДНК решают многие проблемы при постановке эксперимента (Druzhkova et al., 2015; Fulton et al., 2019).

Начало работы с дДНК было положено 40 лет назад, когда группа ученых выделила генетический материал из ископаемых останков южноафриканской лошади и установила их близкое филогенетическое родство с зебрами (Higuchi, 1984). Сегодня в качестве объектов дДНК для палеогенетических исследований могут служить кости человека и животных, копролиты, мягкие ткани, волосы, микроорганизмы и растительные остатки. Современные исследователи изучают дДНК человека, млекопитающих (Poinar et al., 2001; Poinar et al., 2006; Leonard et al., 2007; Campos et al., 2010; Reich et al., 2010; Dabney et al., 2013; Weyrich et al., 2015), а также бактерий (Willerslev et al., 2004).

Работы, связанные с палеогенетическими исследованиями растений, немногочисленны. Наиболее ценным объектом исследования являются древние семена и пыльца (Blatter et al., 2002; Bennett, Parducci, 2006). Примечательно, что качество экстрагированной дДНК зависит от условий, из которых был изъят материал. На основании современных археологических находок ученые отмечают, что семена сохраняются при высушивании, заболачивании, полном или частичном обугливания (семена «консервируются» в результате пожаров природного или антропогенного происхождения) и минерализации (кальцификации) (Fernandez et al., 2013; Wales et al., 2019). Лучше всего генетический материал сохраняется в высохших останках, так как из-за быстрой потери воды и предотвращения реакций гидролиза ДНК меньше фрагментируется. Анализ ДНК, которая экстрагирована из обугленного материала, свидетельствует о наихудшей сохранности генетического материала с низкой вероятностью восстановления (Fernandez et al., 2013). Обугленные семена серого цвета свидетельствуют о том, что исследуемые образцы перенесли очень высокую температуру по сравнению с черными (Bilgic et al., 2016).

Большая часть исследований дДНК осуществляется с образцами, полученными при раскопках на территории «Дуги плодородия» – региона на Ближнем Востоке, где большинство находок составляют зерновки и колосья злаковых. Это не удивительно, так как это область, где начался сбор диких видов и появление первых одомашненных форм в керамическом неолите (Riehl et al., 2014).

Поэтому многие работы по палеогенетике связаны с изучением ископаемого материала злаковых, найденных в западной части Центральной Азии, на юге Туркменистана (Charles, Bogaard, 2010), в Южной Азии (Costantini, 1984), и самых ранних находок возрастом около 9 тыс. лет в раскопе памятника Али Кош в Хузестане (Helback, 1959; Lister et al., 2013). На территории России палеогенетических работ с растительным материалом практически не проводилось.

Объектом для данного исследования послужили карбонизированные зерновки ячменя XII века, найденные при раскопках древнейшего города Северо-Запада России – Усвят. Ранее Т. Semilet et al. (2023) выполнили постановку и отработку методики работы с обугленным ископаемым материалом и провели палеогенетические исследования. Удалось установить один из признаков доместикизации древних ячменей – наличие дополнительных чешуй у зерновок, ассоциированное с геном *Nud*. По результатам первичного морфологического и молекулярно-генетических анализов был установлен пленчатый фенотип изучаемых образцов. Данный признак приближает древний ячмень к дикому фенотипу *H. spontaneum*. В представленном исследовании мы продолжили изучение архитектуры колоса древнего ячменя. Для реконструкции внешнего облика были выбраны гены *Btr1*, *Btr2*, *Vrs1*, ассоциированные с хозяйственно ценными признаками. Возникновение мутаций в генах *Btr1*, *Btr2* ассоциировано с появлением неломкого колоса, что облегчает уборку урожая, предотвращая потери зерна. Делеции в последовательности гена *Vrs1* определяют шестирядность ячменей, что в свою очередь связано с повышением урожайности культуры.

Изолирование дДНК, постановка амплификации с видоспецифичными праймерами, секвенирование по Сэнгеру и выравнивание с известными последовательностями из базы данных NCBI показали:

- возможность работы с ископаемым материалом, подвергшимся горению;
- пригодность видоспецифичных праймеров для выявления признаков архитектуры колоса древних ячменей XII века;
- отсутствие делеций в генах *Btr1* и *Btr2* и ломкоколодый фенотип древнего ячменя;
- отсутствие перестроек в гене *Vrs1*, ассоциированных с шестирядным фенотипом.

Перспективы использования анализа ДНК для уточнения характеристик древних «сортов» растений имеют гораздо больший потенциал. Молекулярно-генетические методы работы с дДНК, использованные в данной работе, возможно применить для изучения аллельного состояния других генов, ассоциированных с хозяйственно ценными признаками ячменя и/или других растительных объектов. Идентификация видов, происхождение, доместикизация, распространение культурных растений и реконструкция популяций, населявших в прошлом определенную территорию, – вопросы, на которые невозможно ответить только с помощью морфологических археоботанических исследований.

Таким образом, по совокупности результатов настоящего исследования на основе анализа генов *Btr1*, *Btr2*, *Vrs*, а также ранее проведенного нами изучения гена *Nud* (Semilet et al., 2023) можно заключить, что в хозяйственной деятельности XII века в городище Усвят использовали семена от растений двурядного пленчатого ломко-колосого ячменя (рис. 10).



Рис. 10. Реконструкция архитектуры колоса ячменя на основе анализа дДНК
Fig. 10. Reconstruction of the barley spike architectonics based on the aDNA analysis

Заключение

Представленные в данной статье результаты палеогенетических исследований древней ДНК ячменя XII века позволили восстановить архитектуру колоса и понять степень схожести древних форм с культурными и дикими предками рода *Hordeum*. Несмотря на процессы карбонизации древних зерновок, нам удалось выделить фрагменты дДНК и реконструировать внешний облик растения. Наличие ломкого колоса и двурядность позволяет нам сделать вывод о том, что древний ячмень, выращивавшийся нашими далекими предками, был по фенотипу и генотипу ближе к дикому виду *H. spontaneum*. Однако остаются нерешенными вопросы о возникновении ячме-

ня на территории Усвят. Как указывалось, *H. vulgare* был одомашнен на территории Дуги плодородия. Растения при размещении на новых территориях меняют свой адаптивный потенциал в связи с воздействием факторов окружающей среды конкретного региона, что влечет за собой изменения в работе генов, ассоциированных со временем вегетации и генеративным развитием (McClung et al., 2021). Это являлось решающим фактором распространения ячменя на новые территории – от Дуги плодородия до северных широт. Необходимо в дальнейшем продолжить исследование древней ДНК для определения очага возникновения и распространения древних ячменей XII века.

References / Литература

- Badr A., Sch K.M.R., El Rabey H., Effgen S., Ibrahim H.H., Pozzi C. et al. On the origin and domestication history of barley (*Hordeum vulgare*). *Molecular Biology and Evolution*. 2000;17(4):499-510. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026330
- Bennett K.D., Parducci L. DNA from pollen: principles and potential. *The Holocene*. 2006;16(8):1031-1034. DOI: 10.1177/0959683606069383
- Bilgic H., Hakki E.E., Pandey A., Khan M.K., Akkaya M.S. Ancient DNA from 8400 year-old Çatalhöyük wheat: implications for the origin of neolithic agriculture. *PLoS One*. 2016;11(3):e0151974. DOI: 10.1371/journal.pone.0151974
- Blatter R.H.E., Jacomet S., Schlumbaum A. Little evidence for the preservation of a single-copy gene in charred archaeological wheat. *Ancient Biomolecules*. 2002;4(2):65-77. DOI: 10.1080/1358612021000010677
- Brown T.A., Allaby R.G., Brown K.A., O'Donoghue K., Sallares R. DNA in wheat seeds from European archaeological sites. *Experientia*. 1994;50(6):571-575. DOI: 10.1007/bf01921727
- Bull H., Casao M.C., Zwirek M., Flavell A.J., Thomas W.T.B., Guo W. et al. Barley *SIX-ROWED SPIKE3* encodes a putative Jumonji C-type H3K9me2/me3 demethylase that represses lateral spikelet fertility. *Nature Communications*. 2017;8(1):936. DOI: 10.1038/s41467-017-00940-7
- Campos P.F., Willerslev E., Sher A., Orlando L., Axelsson E., Tikhonov A. et al. Ancient DNA analyses exclude humans as the driving force behind late Pleistocene musk ox (*Ovibos moschatus*) population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(12):5675-5680. DOI: 10.1073/pnas.0907189107
- Charles M., Bogaard A. Section 9.6. Charred plant macroremains from Jeitun: implications for early cultivation and herding practices in western Central Asia. In: D.R. Harris (ed.). *Origins of Agriculture in Western Central Asia: an Envi-*

- ronmental-Archaeological Study. Philadelphia, PA: University of Pennsylvania Museum of Archaeology and Anthropology; 2010. p.150-165.
- Costantini L. The beginning of agriculture in the Kachi plain: the evidence of Mehrgarh. In: B. Allchin (ed.). *South Asian Archaeology 1981: Proceedings of the Sixth International Conference of the Association of South Asian Archaeologists in Western Europe; Cambridge University; 5–10 July 1981*. Cambridge: Cambridge University Press; 1984. p.29-33.
- Dabney J., Knapp M., Glocke I., Gansauge M.T., Weihmann A., Nickel B. et al. Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(39):15758-15763. DOI: 10.1073/pnas.1314445110
- Druzhkova A.S., Vorobieva N.V., Trifonov V.A., Graphodatsky A.S. Ancient DNA: results and prospects (the 30th anniversary). *Russian Journal of Genetics*. 2015;51(6):627-643. [in Russian] (Дружкова А.С., Воробьева Н.В., Трифонов В.А., Графодатский А.С. Древняя ДНК: итоги и перспективы (к 30-летию начала исследований). *Генетика*. 2015;51(6):627-643). DOI: 10.1134/S1022795415060046
- Fernandez E., Thaw S., Brown T.A., Arroyo-Pardo E., Buxó R., Serret M.D. et al. DNA analysis in charred grains of naked wheat from several archaeological sites in Spain. *Journal of Archaeological Science*. 2013;40(1):659-670. DOI: 10.1016/j.jas.2012.07.014
- Fulton T.L., Shapiro B. Setting up an ancient DNA laboratory. In: B. Shapiro, A. Barlow, P.D. Heintzman, M. Hofreiter, J.L.A. Paijmans, A.E.R. Soares (eds). *Ancient DNA: Methods and Protocols*. New York, NY: Humana; 2019. p.1-13. DOI: 10.1007/978-1-4939-9176-1_1
- Goloubinoff P., Pääbo S., Wilson A.C. Evolution of maize inferred from sequence diversity of an *Adh2* gene segment from archaeological specimens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(5):1997-2001. DOI: 10.1073/pnas.90.5.1997
- Goncharov N.P., Kondratenko E.Ja. Wheat origin, domestication and evolution. *The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists*. 2008;12(1-2):159-177. [in Russian] (Гончаров Н.П., Кондратенко Е.Я. происхождение, domestикация и эволюция пшениц. *Информационный вестник ВОВУС*. 2008;12(1-2):159-177).
- Hagelberg E., Hofreiter M., Keyser C. Introduction. Ancient DNA: the first three decades. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 2015;370(1660):20130371. DOI: 10.1098/rstb.2013.0371
- Harlan J.R. On the origin of barley. In: *Barley: Origin, Botany, Culture, Winter Hardiness, Genetics, Utilization, Pests*. USDA Agriculture Handbook 338. Washington, DC: USDA; 1979. p.10-36.
- Helback H. Domestication of food plants in the Old World: joint efforts by botanists and archeologists illuminate the obscure history of plant domestication. *Science*. 1959;130(3372):365-372. DOI: 10.1126/science.130.3372.365
- Higuchi R. Genetic study on the congenital dislocation of the hip. *The Bulletin of Tokyo Medical and Dental University*. 1984;31(4):195-207.
- Hillman G. On the origins of domestic rye – *Secale cereale*: the finds from aceramic Can Hasan III in Turkey. *Anatolian Studies*. 1978;28:157-174. DOI: 10.2307/3642748
- Komatsuda T., Tanno K. Comparative high resolution map of the six-rowed spike locus 1 (*vrs1*) in several populations of barley, *Hordeum vulgare* L. *Hereditas*. 2004;141(1):68-73. DOI: 10.1111/j.1601-5223.2004.01820.x
- Koppolu R., Anwar N., Sakuma S., Tagiri A., Lundqvist U., Pourkheirandish M. et al. Six-rowed spike4 (*Vrs4*) controls spikelet determinacy and row-type in barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(32):13198-13203. DOI: 10.1073/pnas.1221950110
- Leonard J.A., Shanks O., Hofreiter M., Kreuz E., Hodges L., Ream W. et al. Animal DNA in PCR reagents plagues ancient DNA research. *Journal of Archaeological Science*. 2007;34(9):1361-1366.
- Lister D.L., Jones H., Jones M.K., O'Sullivan D.M., Cockram J. Analysis of DNA polymorphism in ancient barley herbarium material: validation of the KASP SNP genotyping platform. *Taxon*. 2013;62(4):779-789. DOI: 10.12705/624.9
- Lister D.L., Jones H., Oliveira H.R., Petrie C.A., Liu X., Cockram J. et al. Barley heads east: Genetic analyses reveal routes of spread through diverse Eurasian landscapes. *PLoS One*. 2018;13(7):e0196652. DOI: 10.1371/journal.pone.0196652
- McClung C.R. Circadian clock components offer targets for crop domestication and improvement. *Genes (Basel)*. 2021;12(3):374. DOI: 10.3390/genes12030374
- Newman C.W., Newman R.K. A brief history of barley foods. *Cereal Foods World*. 2006;51(1):4-7. DOI: 10.1094/CFW-51-0004
- Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012;28(8):1166-1167. DOI:10.1093/bioinformatics/bts091
- Pääbo S., Higuchi R.G., Wilson A.C. Ancient DNA and the polymerase chain reaction. The emerging field of molecular archaeology. *The Journal of Biological Chemistry*. 1989;264(17):9709-9712.
- Pankin A., von Korff M. Co-evolution of methods and thoughts in cereal domestication studies: a tale of barley (*Hordeum vulgare*). *Current Opinion in Plant Biology*. 2017;36:15-21. DOI: 10.1016/j.cpb.2016.12.001
- Poinar H.N., Kuch M., Sobolik K.D., Barnes I., Stankiewicz A.B., Kuder T. et al. A molecular analysis of dietary diversity for three archaic Native Americans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(8):4317-4322. DOI: 10.1073/pnas.061014798
- Poinar H.N., Schwarz C., Qi J., Shapiro B., Macphee R.D., Buigues B. et al. Metagenomics to paleogenomics: large-scale sequencing of mammoth DNA. *Science*. 2006;311(5759):392-394. DOI: 10.1126/science.1123360
- Pourkheirandish M., Hensel G., Kilian B., Senthil N., Chen G., Sameri M. et al. Evolution of the grain dispersal system in barley. *Cell*. 2015;162(3):527-539. DOI: 10.1016/j.cell.2015.07.002
- Ramsay L., Comadran J., Druka A., Marshall D.F., Thomas W.T.B., Macaulay M. et al. INTERMEDIUM-C, a modifier of lateral spikelet fertility in barley, is an ortholog of the maize domestication gene TEOSINTE BRANCHED 1. *Nature Genetics*. 2011;43(2):169-172. DOI: 10.1038/ng.745
- Reich D., Green R.E., Kircher M., Krause J., Patterson N., Durand E.Y. et al. Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia. *Nature*. 2010;468(7327):1053-1060. DOI: 10.1038/nature09710
- Riehl S., Pustovoytov K.E., Weippert H., Klett S., Hole F. Drought stress variability in ancient Near Eastern agricultural systems evidenced by $\delta^{13}\text{C}$ in barley grain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(34):12348-12353. DOI: 10.1073/pnas.1409516111

- Semilet T., Shvachko N., Smirnova N., Shipilina L., Khlestkina E. Using DNA markers to reconstruct the lifetime morphology of barley grains from carbonized cereal crop remains unearthed at Usvyaty Settlement. *Biological Communications*. 2023;68(1):3-9. DOI: 10.21638/spbu03.2023.101
- Takahashi R., Hayashi J. Linkage study of two complementary genes for brittle rachis in barley. *Berichte des Ohara Instituts für landwirtschaftliche Biologie, Okayama Universität*. 1964;12(2):99-105.
- Van Esse G.W., Walla A., Finke A., Koornneef M., Pecinka A., von Korff M. *Six-Rowed Spike3 (VRS3)* is a histone demethylase that controls lateral spikelet development in barley. *Plant Physiology*. 2017;174(4):2397-2408. DOI: 10.1104/pp.17.00108
- Wales N., Kistler L. Extraction of ancient DNA from plant remains. *Methods in Molecular Biology*. 2019;1963:45-55. DOI: 10.1007/978-1-4939-9176-1_6
- Weyrich L.S., Dobney K., Cooper A. Ancient DNA analysis of dental calculus. *Journal of Human Evolution*. 2015;79:119-124. DOI: 10.1016/j.jhevol.2014.06.018
- Willerslev E., Hansen A.J., Poinar H.N. Isolation of nucleic acids and cultures from fossil ice and permafrost. *Trends in Ecology and Evolution*. 2004;19(3):141-147. DOI: 10.1016/j.tree.2003.11.010
- Youssef H.M., Eggert K., Kopplu R., Alqudah A.M., Poursarebani N., Fazeli A. et al. *VRS2* regulates hormone-mediated inflorescence patterning in barley. *Nature Genetics*. 2017;49:157-161. DOI: 10.1038/ng.3717

Информация об авторах

Татьяна Вячеславовна Семилет, младший научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, t.semilet@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7275-3878>

Наталья Витальевна Смирнова, младший научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, n.smirnova@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9480-8737>

Наталья Альбертовна Швачко, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, n.shvachko@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1958-5008>

Ольга Николаевна Ковалева, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, o.kovaleva@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3990-6526>

Елена Константиновна Хлесткина, доктор биологических наук, профессор РАН, директор, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, руководитель направления «Биология и биотехнология растений», Научно-технологический университет «Сириус», Научный центр генетики и наук о жизни, 354340 Россия, Краснодарский край, федеральная территория «Сириус», пгт. Сириус, Олимпийский пр., 1, director@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8470-8254>

Information about the authors

Tatyana V. Semilet, Associate Researcher, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, t.semilet@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7275-3878>

Natalia V. Smirnova, Associate Researcher, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, n.smirnova@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9480-8737>

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

Olga N. Kovaleva, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, o.kovaleva@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3990-6526>

Elena K. Khlestkina, Dr. Sci. (Biology), Professor of the RAS, Director, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, Plant Biology and Biotechnology Research Manager, Sirius University of Science and Technology, Research Center of Genetics and Life Sciences, 1 Olimpiysky Ave., Sirius Settlement, Sirius Federal Territory, Krasnodar Territory 354340, Russia, director@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8470-8254>

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

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

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Статья поступила в редакцию 04.04.2024; одобрена после рецензирования 05.08.2024; принята к публикации 04.09.2024. The article was submitted on 04.04.2024; approved after reviewing on 05.08.2024; accepted for publication on 04.09.2024.