

*С. А. Галкина, А. Г. Демин, А. В. Пантелеев,
А. С. Дружкова, В. А. Трифонов, Н. В. Григорьева*

Кости домашней курицы из археологических раскопок на территории Северо-Запада России: анализ ископаемой ДНК

*S. A. Galkina, A. G. Demin, A. V. Panteleev, A. S. Druzhkova, V. A. Trifonov,
N. V. Grigorieva.* Domestic Chicken Bones from Archaeological Excavations
in the North-West of Russia: Analysis of Fossil DNA

Abstract. 12 sequences of D-loop of mt DNA from the fossil specimens found on the territory of archaeological sites in Pskov, Staraya Ladoga, Veliky Novgorod and Saint-Petersburg are decoded for the first time. The reconstruction of genetic relations is done and a diagram of relationship between the discovered fossil samples from Western, Central and Southern Europe, as well as representatives of the modern populations of chickens is obtained. It is shown that most of the studied samples have similar mitochondrial haplotype that is relevant in the modern classification to version E1.1. This version can be called typical for the populations of chickens that inhabited the North-Western territory of modern Russia from the 9th to the 18th c.c.

Ключевые слова: птицы, *Gallus Gallus domesticus*, одомашнивание, митохондриальная ДНК, молекулярная археология.

Keywords: poultry, *Gallus Gallus domesticus*, domestication, mitochondrial DNA, molecular archaeology.

Введение. Использование методической базы молекулярной биологии и популяционной генетики в применении к органическим находкам различного происхождения (останки человека и животных, пыльца и семена растений) дает возможность реконструировать и эффективно исследовать структуру ископаемой ДНК возрастом до 40 000 лет, в том числе из сильно загрязненных и подвергшихся термической обработке образцов (*Paabo, 1986; Fu et al., 2013; Дружкова и др., 2015*). Применение методов молекулярной археологии позволяет точно идентифицировать таксономическую принадлежность останков, анализировать родственные связи, выявлять специфические мутации,

связанные с фенотипическим проявлением значимых признаков и детальнее изучать процессы формирования современного разнообразия животных и растительных видов. Установление родственных связей и, как следствие, построение маршрутов миграций особенно существенно при изучении любых одомашненных видов животных и растений, распространение которых невозможно без участия человека. Таким образом, domesticiрованные виды животных и растений могут служить биологическими маркерами сельскохозяйственных, торговых и культурных контактов между человеческими сообществами, наряду с предметами материальной культуры. До недавнего времени не представлялось возможным связать ископаемые останки животных с их потенциальными предковыми популяциями из центров одомашнивания, однако методы молекулярной археологии в совокупности с огромным объемом накопленных данных о геногеографии современных животных позволяют заполнить этот пробел. К настоящему моменту выполнены работы по молекулярной археологии собак (*Druzhkova et al., 2013; Frantz et al., 2016*), лошадей (*Schubert et al., 2014; Orlando et al., 2013*), свиней (*Ottoni et al., 2013*), коров (*Scheu et al., 2015*), верблюдов (*Mohandesan et al., 2016*).

Несмотря на имеющиеся находки костей птиц, этот ценный научный материал зачастую остается невостребованным. Между тем, наличие домашних видов птиц и анализ их соотношения с промысловыми видами – важный показатель уровня развития хозяйственной деятельности общества. Так, содержание птиц в северных широтах требует определенных навыков хозяйствования (наличия зерна в количестве, достаточном для появления кормовых излишков, технологии длительного хранения зерна, строительства птичников).

Исследования ископаемых останков птиц сконцентрированы вокруг изучения домашней курицы, как наиболее многочисленного и важного объекта сельского хозяйства в современном мире. Изучение ископаемой ДНК кур, населявших Полинезию, Микронезию и западное побережье Южной Америки позволило уточнить пути расселения человека по островам Тихого океана (*Storey et al., 2007, 2012; Gongora et al., 2008; Thomson et al., 2014*), а также историю птицеводческого хозяйства населения острова Пасхи (*Gering et al., 2015*). В Европе исследования ископаемых кур проводились лишь одной группой исследователей и затрагивали популяции Западной и Южной Европы (*Flink et al., 2014*). Считается, что появление кур в Европе было связано со стремительным распространением потомков всего одной популяции, начиная с III в. до н. э. (*Flink et al., 2014*).

Что касается территории Древней Руси, то наиболее вероятны три пути расселения кур – с запада (из Европы), с востока (из Персии, Индии, Китая) и с юга (через Боспорское царство, Византию) (*Петров, 1962, цит. по: Мусеева, 2006*). Птицеводство, в частности разведение кур, было широко распространено в античных государствах Северного Причерноморья середины I тысячелетия до н. э. – середины I тысячелетия н. э. (*Уманская, 1972*), при раскопках кости домашних птиц во множестве находили в помещениях, в мусорных свалках, в погребениях. Нередко встречается и хорошо сохранившаяся скорлупа куриных яиц (*Гайдукевич, 1949; Ливеров, 1959; Кругликова, 1984*).

Точных данных о времени и путях распространения кур по территории северной Евразии в настоящее время нет. Вместе с тем, при остеологическом анализе костного материала археологических памятников выясняется, что курообразные представлены на большинстве ключевых памятниках Русской равнины. Изучение видового состава птиц, соотношение одомашненных и промысловых видов, а также истории формирования и преобразования популяции домашней курицы, актуально для понимания региональных особенностей сложения системы хозяйственной деятельности населения. С целью реконструкции путей распространения домашних кур в эпоху Средневековья и Нового времени на Северо-Западе, была выделена ДНК из ископаемых костей кур, обнаруженных при археологических раскопках Псковского Кремля, Рюрикова городища, Староладожской крепости, Летнего сада и расшифрована последовательность фрагментов D-петли митохондриальной ДНК (мтДНК), что позволило выделить типовой генотип мтДНК в популяциях домашней курицы разновременных памятников региона.

Методика работы

Остеологическая идентификация ископаемых костей кур. Материалом для работы послужили хорошо сохранившиеся бедренные, локтевые и плечевые кости кур, обнаруженные при раскопках на территории Псковского Кремля, Рюрикова городища, Староладожской крепости и Летнего сада (г. Санкт-Петербург) (табл. 1). Идентификацию костей проводили с помощью сравнительной остеологической коллекции лаборатории орнитологии и герпетологии Зоологического института РАН (Санкт-Петербург). Датирование ископаемых объектов определялось стратиграфически, а также, в некоторых случаях, методом радиоуглеродного анализа (на базе Центра коллективного пользования «Геохронология кайнозоя» СО РАН (Новосибирск) и лаборатории AMS Университета Аризоны (США).

Выделение ДНК из ископаемых костей кур. Выделение ДНК из ископаемых костей кур выполнялась с учетом всех мер предупреждения возможной контаминации современной ДНК и с соблюдением критериев аутентичности древней ДНК (Hofreiter et al., 2001; Willerslev, Cooper, 2005) на базе лаборатории сравнительной геномики Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН (Новосибирск). Около 0,5 г костного порошка, полученного механическим истиранием фрагментов от каждого образца, промывали раствором 0,5 М ЭДТА с 0,5% лауроилсаркозином натрия, а затем инкубировали 2,5 часа при 55 °С в лизирующем буфере (0,5 М ЭДТА, 0,5% лауроилсаркозин натрия, 5 нг/мл протеиназы К). Не поддающиеся лизису фрагменты отделяли длительным центрифугированием при 7 500 об/мин. Избирательную сорбцию ДНК из надосадочной жидкости проводили с помощью силикатных шариков и коммерческих буферов SiBB и SiWB (ThermoFisher Scientific, UK). С поверхности силикатных шариков ДНК экстрагировали коммерческим буфером EB для элюции (ThermoFisher Scientific, UK). Полученный раствор ДНК в дальнейшем подвергали дополнительной очистке с использованием коммерческого

Таблица 1

Ископаемые кости кур, использованные для выделения ДНК

Археологический сайт	Кость, № образца	Датировка
Великий Новгород, Рюриково городище, черный слой (раскопки 2009 г.)	ulna, 1	Стратиграфия: IX–XII вв. Радиоуглерод: 829 ± 45 г. cal. В.П. 1σ calibration; NSF Arizona AMS Facility, no. 00737
Санкт-Петербург, Летний сад (раскопки 2010–2011 гг.)	humerus, 3	Стратиграфия: XVIII в. Радиоуглерод: 1752 ± 29 г. cal. В.П. 1σ calibration; NSF Arizona AMS Facility, no. 00738
Старая Ладога, Земляное городище (раскопки 1939 г.)	humerus, 23	Стратиграфия: X–XII вв.
	ulna, 6s	- // -
Старая Ладога, Раскатная башня (раскопки 2015 г.)	humerus, 1s	Стратиграфия: кон. IX – нач. XII в.
	ulna, 2s	- // -
	humerus, 3s	- // -
	humerus, 4s	- // -
	humerus, 5s	- // -
Псков (раскопки 1994–2004 гг.)	humerus, 2	Стратиграфия: XVIII в. Радиоуглерод: 1757 ± 25 г. cal. В.П. 1σ calibration; NSF Arizona AMS Facility, no. 00736
	ulna, 7s	Стратиграфия: XVIII в.
	femur, 10s	- // -

набора реактивов «PCR purification kit» согласно протоколу фирмы-изготовителя (Qiagen, USA).

Амплификация и секвенирование гипервариабельного участка D-петли митохондриальной ДНК. Полиморфизм последовательностей ДНК в настоящее время широко используется для исследования генетического разнообразия и происхождения одомашненных животных. В молекулярной археологии это, главным образом, высоко вариабельные последовательности D-петли мтДНК, которые предпочтительны для идентификации предполагаемых диких предков одомашненных видов, числа материнских линий и их географического происхождения.

Амплификацию гипервариабельного участка D-петли мтДНК из ископаемых костей кур мы проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием высокоточной полимеразы Phusion (ThermoFisher Scientific, UK) и праймеров, подобранных к перекрывающимся районам фрагмента 141–559 пар нуклеотидов от начала D-петли (Storey et al., 2007, 2012, наши данные):

141F: 5'ACCCATTATATGTATACGGGCATТАА,
 316R: 5'AACCATTTCATAGTTAGGAGACTTGTT,
 419R: 5'GTTGCTGATCTCTCGTGAGGT;
 221F: 5'CATTCACCSTCCCCATAGACAG,
 368R: 5'CGAGCATAACCAAATGGGTTAGA;
 316F: 5'AACAAGTCACСТААСТАТGAATGGTTAC,
 533R: 5'AGTTATGCATGGGATGTGCCTGACCGA.

ПЦР проводили в термоциклере MJ Mini (BioRad, США) по протоколу: 98°C – 3 мин; (98°C – 10 сек, 58°C – 25 сек, 72°C – 10 сек) \times 30 циклов;

72 °С – 10 мин. Полученные фрагменты D-петли секвенировали, используя набор BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) и секвенатор 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

Таким образом были расшифрованы последовательности гипервариабельного района D-петли мтДНК из 12 ископаемых образцов. Выравнивание первичных последовательностей ДНК проводили в программе BioEdit v.7.1.3.0 (Hall, 1999); для поиска сходных нуклеотидных последовательностей были использованы приложение BLAST и открытые базы данных Национального центра биотехнологической информации (США, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Расшифрованные нами последовательности были внесены в базу данных NCBI GenBank (## KP307147-KP307150) и включены в филогенетический анализ.

Филогенетический анализ. Выделение типового гаплотипа мтДНК

Конструирование филогенетической сети (рис. 1) для оценки эволюционных взаимосвязей между исследуемыми гаплотипами выполнялось в программе Network 4.6 (<http://www.fluxus-engineering.com/index.htm>) способом медианного объединения (Median Joining) (Bandelt et al., 1999). Для создания матрицы нуклеотидных последовательностей использовалась программа MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013). Для построения сети, помимо полученных нами последовательностей ископаемой ДНК, были использованы данные о структуре D-петли мтДНК представителей ряда традиционных пород кур: орловская, юрловская, павловская, узбекская, русская белая и голошейная – всего 83 последовательности (Dyomin et al., 2016), а также 32 последовательности, относящиеся к типовым митохондриальным гаплотипам кур, представляющим гаплогруппы А, В, С1, С2, С3, D, E1, E2, E3, D, G, F, H, I, X, W по международной классификации, предложенной Миао с соавторами (Miao et al., 2013).

Дополнительно в анализ было включено 80 последовательностей D-петли, полученных из ископаемых образцов курицы с территории Великобритании, Германии, Греции и Австрии (Flink et al., 2014). Образцы, использованные в данной работе, относятся ко II в. до н. э. – XVIII в. н. э.

На полученной схеме (рис. 1) исследованные гаплотипы формируют 15 основных узлов, соответствующих различным гаплогруппам мтДНК кур. За исключением единственного образца из Пскова (относится к гаплогруппе С1), все проанализированные ископаемые последовательности принадлежат гаплогруппе E1 и представлены четырьмя близкими гаплотипами. При этом подавляющее число образцов из Пскова и Старой Ладogi относятся к гаплотипу E.1.1. Этот вариант мтДНК кур является наиболее распространенным в Европе и отмечается со II в. до н. э. Остальные гаплотипы отличаются от него одной или двумя мутациями. Большинство изученных нами образцов ископаемых костей кур относятся к IX–XII вв. Их генетическое сходство указывает на существование в это время в пределах северо-западных территорий популяции кур, представленной генетически родственными особями, что является признаком их устойчивого самовоспроизведения, возможного только при ведении птицеводческого хозяйства.

Заключение. На основании анализа 12 секвенированных последовательностей D-петли мтДНК ископаемых костей, обнаруженных на разновременных памятниках, можно заключить, что гаплотип E1.1 является типовым для популяции

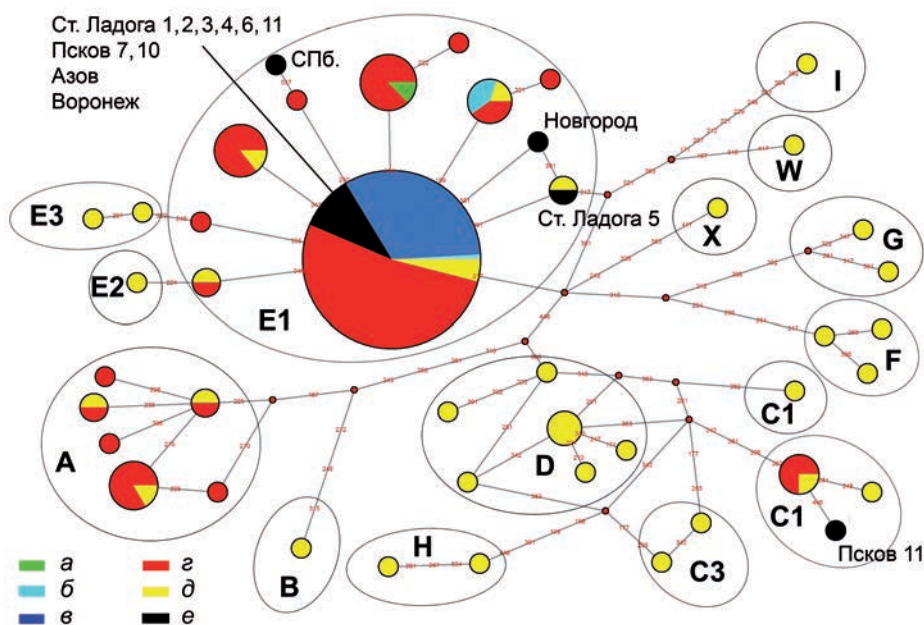


Рис. 1. Генетическая сеть, демонстрирующая связь ископаемых и современных гаплотипов домашней курицы. А, В, С1, С2, С3, D, E1, E2, E3, D, G, F, H, I, X, W – гаплогруппы мтДНК кур по международной классификации, предложенной Миао с соавторами (Miao et al., 2013). Диаметр кругов пропорционален числу образцов с данным гаплотипом, длина ветвей – количеству мутаций между ними. Цифрами обозначены позиции мутаций относительно начала D-петли. Условные обозначения: а – ископаемые образцы: Великобритания, 1500–1800 н.э. (Flink et al., 2014); б – ископаемые образцы: Великобритания, 1000–1400 н.э. (Flink et al., 2014); в – ископаемые образцы: Германия, Австрия, Великобритания, 200 до н.э. – 400 н.э. (Flink et al., 2014); z – представители современных российских пород кур; д – последовательности мтДНК, маркирующие современные гаплогруппы кур; е – ископаемые образцы кур европейской части России

кур, распространенной на территории Северо-Запада России с IX по XVIII вв. Наблюдаемое распределение гаплотипов позволяет аргументировано предположить, что генофонд популяций кур в исторический период формировался на базе генетически гомогенной популяции, представленной носителями гаплотипа E1.1. На территории современного Северо-Запада России, Западной, Центральной и Южной Европы данная популяция распространилась не позднее IX в. н.э. Экспансия других вариантов гаплогруппы E1, а также гаплогруппы C1 в генофонды популяций кур Северо-Запада России началась позже и связана с налаживанием активных торговых связей с Юго-Восточной Азией, а также началом целенаправленной селекции пород в России и странах Западной Европы.

Благодарности: Авторы выражают признательность сотрудникам ресурсных центров «ЦКП Хромас», «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Научного парка Санкт-Петербургского государственного университета, а также «Геохронология кайнозоя» СО РАН (Новосибирск).

Литература

- Гайдукевич В. Ф., 1949. Боспорское царство. М.; Л.: Изд-во АН СССР.
- Дружкова А., Воробьева Н., Трифонов В. и др., 2015. Древняя ДНК: итоги и перспективы: (к 30-летию начала исследований) // Генетика. Т. 51. № 6. С. 627.
- Кругликова И. Т., 1984. Сельское хозяйство и промыслы // Античные государства Северного Причерноморья. М. С. 154–161. (Археология СССР).
- Ливеров П. Д., 1959. К вопросу о времени одомашнивания курицы // СА. № 2. С. 232.
- Моисеева И. Г., 2006. Породы кур и их генофонды // Генофонды сельскохозяйственных животных: генетические ресурсы животноводства России. М. С. 229–388, 411–432, 462–467.
- Петров С. Г., 1962. Происхождение и эволюция сельскохозяйственной птицы // Сельскохозяйственная птица. Т. 1. М. С. 800–810.
- Уманская А. С., 1972. Домашние птицы из археологических памятников Украины // Природная обстановка и фауны прошлого. Вып. 6. Киев. С. 71–95.
- Bandelt H.-J., Forster P., Rohlf A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evol. № 16. P. 37–48.
- Druzhkova A. S., Thalmann O., Trifonov V. A. et al., 2013. Ancient DNA analysis affirms the canid from Altai as a primitive dog // PLoS One. Vol. 8. e57754.
- Dyomin A. G., Danilova M. I., Mwacharo J. M. et al., 2016. Mitochondrial DNA D-loop haplogroup contributions to the genetic diversity of East European domestic chickens from Russia // J. Anim. Breed Genet. doi: 10.1111/jbg. 12248.
- Flink L. G., Allen R., Barnett R. et al., 2014. Establishing the validity of domestication genes using DNA from ancient chickens // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Vol. 111. P. 6184–6189.
- Frantz L. A., Mullin V. E., Pionnier-Capitan M. et al., 2016. Genomic and archaeological evidence suggest a dual origin of domestic dogs // Science. Vol. 352. № 6290. P. 1228–1231.
- Fu Q., Mittnik A., Johnson P. L. et al., 2013. A revised timescale for human evolution based on ancient mitochondrial genomes // Cur. Biol. Vol. 23. № 7. P. 553–559.
- Gongora J., Rawlence N. J., Mobegi V. A. et al., 2008. Indo-European and Asian origins for Chilean and Pacific chickens revealed by mtDNA // Proc. Nat. Acad. Sci. Vol. 105. № 30. P. 10308–10313.
- Gering E., Johnsson M., Willis P. et al., 2015. Mixed ancestry and admixture in Kauai's feral chickens: invasion of domestic genes into ancient Red Junglefowl reservoirs // Mol. Ecol. Vol. 24. № 9. P. 2112–2124.
- Hall T. A., 1999. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucl. Acid. Symp. Ser. № 41. P. 95–98.
- Hofreiter M., Jaenicke V., Serre D. et al., 2001. DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA // Nucl. Acid. Res. Vol. 29. № 23. P. 4793–4799.
- Miao Y.-W., Peng M.-S., Wu G.-S. et al., 2013. Chicken domestication: an updated perspective based on mitochondrial genomes // Hered. (Edinb). № 110. P. 277–282.
- Mohandesan E., Speller C. F., Peters J. et al., 2016. Combined hybridization capture and shotgun sequencing for ancient DNA analysis of extinct wild and domestic dromedary camel // Mol. Ecol. Resour. doi: 10.1111/1755-0998.12551.
- Orlando L., Ginolhac A., Zhang G. et al., 2013. Recalibrating Equus evolution using the genome sequence of an early Middle Pleistocene horse // Nature. Vol. 499. № 7456. P. 74–78.
- Ottoni C., Flink L., Evin A. et al., 2013. Pig domestication and human-mediated dispersal in Western Eurasia revealed through ancient DNA and geometric morphometrics // Mol. Biol. Evol. Vol. 30. № 4. P. 824–832.

- Pääbo S.*, 1986. Molecular genetic investigations of ancient human remains // Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Vol. 51. P. 441–446.
- Scheu A., Powell A., Bollongino R.* et al., 2015. The genetic prehistory of domesticated cattle from their origin to the spread across Europe // BMC Genet. Vol. 16. № 54. doi: 10.1186/s12863-015-0203-2.
- Schubert M., Jónsson H., Chang D.* et al., 2014. Prehistoric genomes reveal the genetic foundation and cost of horse domestication // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Vol. 111. № 52. P. E5661–9.
- Storey A. A., Ramírez J. M., Quiroz D.* et al., 2007. Radiocarbon and DNA evidence for a pre-Columbian introduction of Polynesian chickens to Chile // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Vol. 104. P. 10335–10339.
- Storey A. A., Athens J. S., Bryant D.* et al., 2012. Investigating the global dispersal of chickens in prehistory using ancient mitochondrial DNA signatures // PLoS One. 7: e39171.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D.* et al., 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 // Mol. Biol. Evol. № 30. P. 2725–2729.
- Thomson V. A., Lebrasseur O., Austin J. J.* et al., 2014. Using ancient DNA to study the origins and dispersal of ancestral polynesian chickens across the pacific // Proc. Nat. Acad. Sci. Vol. 111. № 13. P. 4826–4831.
- Willerslev E., Cooper A.*, 2005. Review paper. ancient DNA // Proc. of the Royal Soc. of London. B: Biol. Sci. Vol. 272. № 1558. P. 3–16.