

## DNA assays as a tool in archaeozoology

Dylewska M.<sup>1</sup>, Listos P.<sup>2</sup>, Dudzińska E.<sup>3</sup>, Gryzińska M.<sup>1</sup>, Department of Biological Basis of Animal Production, Faculty of Biology and Animal Breeding<sup>1</sup>, Department of Pathological Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine<sup>2</sup>, University of Life Sciences in Lublin, Chair of Public Health, Faculty of Nursing and Health Sciences, Medical University in Lublin<sup>3</sup>

The aim of this article was to present the current techniques in the field of molecular genetics used now in archaeozoology. The data obtained from the DNA, both mitochondrial and nuclear, analysis greatly speed up the development of the knowledge on the evolution of species, phylogenetics and phylogeography. Moreover, DNA database provides information concerning the process of domestication and the causes of species extinction.

**Keywords:** ancient DNA – aDNA, archaeozoology.

Zwierzęta stanowią integralny element życia człowieka od samego początku jego istnienia, pełniąc różne funkcje, które zmieniały się na przestrzeni kolejnych epok. Pierwotnie postrzegano je jako źródło pożywienia, konkurentów w zdobywaniu pokarmu, jak i drapieżników stanowiących nieustanne zagrożenie. Relacje te przybrały inną formę m.in. w neolicie (ok. 4 tys. lat temu), kiedy to *Homo sapiens* porzucił koczowniczy tryb życia i zajął się hodowlą zwierząt, otaczając je szczególną opieką i troską (1). Poza interakcjami między światem ludzi i zwierząt przynoszącymi wymierne korzyści dla tych pierwszych, należy wspomnieć również o innym aspekcie zwierzęcości w pradziejach. Już w okresie paleolitu (ok. 15 tys. lat temu) można doszukiwać się początków totemizmu, czyli wierzeń w mistyczną więź jaka łączy człowieka z otaczającą go fauną (2). W świetle tych przekonań zwierzęta uznawano za przodków i opiekunów danej społeczności, istoty nadrzędne, które należało chronić i czcić. O koegzystencji i roli świata zwierzęcego w kształtowaniu dziejów ludzkości świadczą odnajdywane w stanowiskach archeologicznych szczątki, głównie kostne. Te liczące niekiedy setki tysięcy lat ślady minionego życia są przedmiotem badań archeozoologii, interdyscyplinarnej dziedziny wiedzy łączącej humanistów z przedstawicielami nauk przyrodniczych. Celem prowadzonych w ramach tej dyscypliny badań jest odtworzenie dawnych relacji: człowiek – zwierzę wraz z ich konsekwencjami dla obu stron. Archeozoologia określa zatem znaczenie fauny w rozwoju kulturowym człowieka, jak i wpływ jednostki ludzkiej na cechy biologiczne zwierząt, przede

## Wykorzystanie badań DNA w archeozoologii

Małgorzata Dylewska<sup>1</sup>, Piotr Listos<sup>2</sup>, Ewa Dudzińska<sup>3</sup>, Magdalena Gryzińska<sup>1</sup>

z Katedry Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt<sup>1</sup> i Katedry Anatomii Patologicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej<sup>2</sup> Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie oraz Katedry Zdrowia Publicznego Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Lublinie<sup>3</sup>

wszystkim udomowionych (3). Za ojca tej dyscypliny uznaje się szwajcarskiego anatoma Ludwiga Rüttimeyera, którego pierwsza praca traktująca o zwierzęcych szczątkach pojawiła się w 1860 r. Podwaliny pod rozwój polskiej archeozoologii położył Godfryd Ossowski, publikując w 1881 r. wyniki ekspertyz materiałów faunistycznych odnalezionych w kamiennych grobach kultury pomorskiej (3, 4).

### Przedmiot badań archeozoologicznych

Domeną archeozoologii, jak już wcześniej wspomniano, są szczątki zwierzęce, a przede wszystkim kości, muszle, pancerze oraz tkanki keratynowe tj.: kopyta, pazury, rogi, skóry, sierść. W przypadku najczęściej odkrywanych szczątków ssaczy dokonuje się ich kwalifikacji, biorąc pod uwagę znaczenie, jakie stanowiły dla ówczesnego człowieka. Najlicniejszą grupę stanowią szczątki pokonsumpcyjne, charakteryzujące się silną fragmentacją, obecnością śladów wskazujących na obróbkę mięsa (np. filetowanie, rąbanie, skórowanie tuszy) oraz zróżnicowaniem anatomicznym i gatunkowym (3, 5). Znaczenie rzadziej odnajdywane, bo mniej liczne są szczątki zwierząt ofiarnych. Wyjątkowość, powtarzalność, brak uzasadnień praktycznych oraz znamiona działania nieprzypadkowego to cechy pozwalające na odróżnienie zwierzęcych pochówków od szkieletów będących pozostałością po zwierzętach padłych w następstwie choroby, które to zakopywano ze względów higienicznych (3, 6). Odrębną kategorię materiałów faunistycznych stanowią wyroby z surowców pochodzenia zwierzęcego. Z kości oraz poroży wykonywano ozdoby (amulety, tarczki do zawieszania na szyi), narzędzia pracy i broń (groty włóczni, siekiery, topory), przedmioty codziennego użytku (igły, łyżki, wieszaki, grzebienie), jak i te związane z rozrywką (kości do gry, instrumenty) czy przemieszczaniem się (łyżwy, płozy do sanek). Większość tych wyrobów była wytwarzana z surowca kościanego zwierząt dzikich, co wynikało z większej ich twardości w porównaniu z kośćmi zwierząt domowych. Z wyjątkiem kręgów, mostka i miednicy

wykorzystywano niemalże każdy element zwierzęcego szkieletu (3).

### Standardowe metody badawcze archeozoologii

Badania zwierzęcych szczątków kostnych prowadzone są wieloetapowo. W pierwszej kolejności wykonywana jest analiza makroskopowa, obejmująca identyfikację zoologiczną (gatunkową) i anatomiczną, szacowanie wieku osobniczego, określenie płci, a niekiedy także pory roku zabicia zwierzęcia. Ponadto dokonuje się identyfikacji zmian patologicznych kości i zębów, będących wynikiem wad wrodzonych (np. wielorożność u owiec), chorób (np. stan zapalny okostnej), a także urazów mechanicznych (złamania, pęknięcia kości) o charakterze naturalnym, jak i antropogenicznym (np. ślady po przebicciu kości strzałą). Odrębną grupą anomalii widocznych na kośćcu są ślady działalności człowieka związane z obróbką rzeźniczą i kulinarną, konsumpcją mięsa, aktywnością rękodzielniczą oraz praktykami kultowymi. W przypadku kości spalonych, znacznie pofragmentowanych lub wręcz rozdrobnionych, ocena makroskopowa staje się bezużyteczna i ustępuje miejsca technikom mikroskopowym (preparatyka histologiczna szlifów kostnych). W kolejnych etapach ekspertyzy archeozoologicznej wykorzystywane są metody osteometryczne – pomiary kości (długościowe, szerokościowe, średnice, ciężki) oraz wagowe (3, 7). Dopełnienie przedstawionej metodyki stanowią techniki obrazowania, takie jak fluorescencja rentgenowska (X-ray fluorescence – XRF), analiza dyfrakcji rentgenowskiej (X-ray diffraction – XRD) czy tomografia komputerowa (8, 9). Różnorodność informacji możliwych do uzyskania za pomocą wymienionych metod badawczych ujęto w **tabeli 1**.

Nieustanny proces rozwoju problematyki badań archeozoologicznych stawia coraz to nowe zadania. Oprócz tradycyjnej metodyki ukształtowanej w fundamentach archeologii, niezbędne stało się interdyscyplinarne spojrzenie na zwierzęce szczątki. Stąd narodziła się współpraca archeozoologii z genetyką. Materiały

faunistyczne odnajdywane podczas wykopalisk archeologicznych bądź będące elementami zbiorów muzealnych z końcem XX wieku zaczęły trafiać do laboratoriów, gdzie za pomocą technik genetyki molekularnej zaczęto uzyskiwać z nich informacje zaszyfrowane w postaci sekwencji nukleotydów DNA. Russel Higuchi, przeprowadzając w 1984 r. pionierską izolację DNA z tkanki skórnej kwagi (wymarły podgatunek zebry stepowej), stworzył zupełnie nową perspektywę badań archeozoologicznych (10).

### Charakterystyka kopalnego DNA

DNA w kontekście archeozoologii, a więc izolowany *post mortem* ze zwierzęcych szczątków określane jest mianem kopalnego lub antycznego (ancient DNA – aDNA). Jego analiza jest znacznie trudniejsza i dużo bardziej wymagająca pod względem metodycznym niż praca z materiałem genetycznym pochodzącym z żywych komórek. Wynika to z zachodzących tuż po śmierci organizmu procesów degradacji kwasów nukleinowych. W pierwszej kolejności dochodzi do zmian ciągłości łańcucha DNA pod wpływem uwalniania z lizosomów endonukleaz, które hydrolizują wiązania fosfodiesterowe (11). Rozkład ten wspierają z czasem mikroorganizmy (bakterie, grzyby) oraz drobne bezkręgowce glebowe. Innego typu efektem degradacji są zmiany zachodzące w DNA wskutek procesów biochemicznych – hydrolitycznych i oksydacyjnych. W przypadku tych pierwszych, dochodzi do pęknięcia wiązania N-glikozydowego łączącego cukier (deoksyrybozę) z zasadą azotową, w następstwie czego dochodzi do oderwania puryny lub pirymidyny (rzadziej). Powstające w ten sposób tzw. miejsca AP (apurinic/aprimidinic) mogą być przyczyną utraty ciągłości łańcucha DNA (12, 13). Pod wpływem cząsteczek wody dochodzi również do rozrywania wiązania pomiędzy grupą aminową i pierścieniem zasady azotowej, co prowadzi do jej deaminacji. Większą wrażliwość na tego typu modyfikacje wykazują pirymidyny – cytozyna i jej pochodna 5-metylocytozyna (12). Z kolei uszkodzenia oksydacyjne DNA wynikają z destrukcyjnego charakteru cząsteczek tlenu. Jego reaktywne formy, tj. nadtlenek wodoru, anion nadotlenkowy oraz jon hydroksylowy, atakują wiązania w obrębie pierścienia piranozowego cukru oraz purynowego i pirymidynowego zasady azotowej, prowadząc do ich fragmentacji (14). Wśród zmian, jakim ulegają cząsteczki DNA *post mortem*, należy wymienić także sieciowanie wewnątrz i międzycząsteczkowe. Zjawisko to polega na tworzeniu wiązań krzyżowych typu DNA – DNA lub DNA – białko, w efekcie czego powstają nietypowe struktury

przestrzenne, uniemożliwiające polimerazie dostęp do matrycy (15).

Procesy degradacyjne kopalnego DNA kształtowane są przez liczne czynniki fizykochemiczne środowiska. Autorzy wielu prac wskazują, iż czynniki te mają zdecydowanie większy wpływ na stopień uszkodzenia aDNA, aniżeli czas, jaki minął od momentu śmierci organizmu (16, 17, 18). Kluczowe znaczenie dla jakości antycznego DNA ma temperatura (19). Im niższe jej wartości, tym w lepszym stanie zachowany jest materiał genetyczny. Dane literaturowe wskazują, iż skuteczną izolację aDNA uzyskuje się w przypadku 50–80% próbek pobranych ze szczątków pochodzących z wiecznej zmarzliny, 23–67% z obszarów o umiarkowanych warunkach atmosferycznych, a jedynie 2–4% z terenów o gorącym i suchym klimacie (20). Oprócz niskiej temperatury, czynnikami spowalniającymi proces degradacji kwasów nukleinowych jest: wysokie stężenie soli, niska zawartość kwasów humusowych i fulwowych w glebie oraz raptowne osuszenie środowiska zalegania zwłok, a następnie szczątków zwierzęcia (21, 22). Natomiast niekorzystnie na czas przetrwania matrycy DNA wpływa promieniowanie UV odpowiedzialne za tworzenie wiązań krzyżowych między resztami tyminy oraz wspomniane wcześniej mikroorganizmy, cząsteczki wody i tlenu (21, 23). Nie bez znaczenia dla jakości aDNA są czynności związane z wydobywaniem i przechowywaniem szczątków. Melanie Pruvost, przeprowadzając analizę genetyczną dwóch fragmentów tej samej kości wydobytych z wykopaliska w znacznym odstępie czasu (60 lat), udowodniła, że lepszej jakości, a więc lepiej zachowany jest DNA poddawany analizie tuż po wydobyciu szczątków z ziemi niż izolowany z przechowywanych przez lata zbiorów archeozoologicznych (24). Doświadczenie Pruvost oraz innych badaczy (25) wskazują zatem na konieczność deponowania szczątków w stałej, niskiej temperaturze, podobnie jak ma to miejsce w warunkach naturalnych, w ziemi.

### Analiza aDNA

Analiza genetyczna materiałów archeozoologicznych w większości przypadków dotyczy mitochondrialnego DNA (mtDNA; 26). Znacznie większa liczba jego kopii w porównaniu z DNA jądrowym daje większą szansę wyizolowania namnażalnych fragmentów kopalnej matrycy (27). Ponadto cząsteczki tego organellowego kwasu deoksyrybonukleinowego chronione są przed działaniem czynników degradacyjnych błoną mitochondrialną, co zapewnia jego lepszą jakość. Istotną cechą mtDNA, zwłaszcza dla badań populacyjnych i ewolucyjnych jest jego dziedziczenie wyłącznie w linii żeńskiej, bez rekombinacji. Ze względu na brak wymiany mitochondrialnego materiału genetycznego, mogłoby wydawać się, że sekwencje mtDNA są wysoce konserwatywne, a tymczasem charakteryzują się one znacznym zróżnicowaniem (27, 28). Cząsteczki mtDNA wykazują około dziesięciokrotnie wyższe tempo mutacji w porównaniu z jądrowym DNA, a uwarunkowane jest to aktywnością reaktywnych form tlenu (RFT) powstających w łańcuchu oddechowym, brakiem białek historycznych oraz niską wydajnością systemów naprawy DNA w mitochondriach (29, 30). Substytucje nukleotydowe występujące najliczniej w obrębie regionu kontrolnego (control region – CR) pozwalają na charakterystykę zmienności wewnątrzgatunkowej, natomiast te pojawiające się w konserwatywnych sekwencjach genów kodujących białka (np. cytochrom b, oksydaza cytochromowa I) odzwierciedlają zróżnicowanie międzygatunkowe. Genom mitochondrialny stanowi zatem cenne narzędzie analiz filogenetycznych, jak i filogeograficznych (31, 32), przy czym pozwala on na odtwarzanie jedynie genealogii żeńskiej. Natomiast do śledzenia rodowodów ojcowskich wykorzystywany jest niepodlegający rekombinacji mejozytycznej chromosom Y, przekazywany przez ojców wyłącznie męskim potomkom (33). Identyfikacja polimorfizmu markerów tego heterosomu

**Tabela 1.** Informacje uzyskane w wyniku zastosowania określonej metody badawczej zwierzęcych szczątków kostnych (opracowanie własne na podstawie 7, 8)

Metoda	Uzyskane dane
Makroskopowa	struktura gatunkowa hodowanych zwierząt, struktura pogłowia i tuszy, wiek oraz płeć ubijanych zwierząt, sezon ubijania zwierząt, rodzaje schorzeń/chorób, wiedza pradawnych społeczeństw z zakresu zoohigieny i weterynarii, proces udomowienia zwierząt, techniki kulinarne, rękodzielnicze oraz zachowania kultowe
Mikroskopowa	identyfikacja gatunkowa, rozróżnianie zwierząt udomowionych i dzikich, zmiany chorobowe, struktura wiekowa hodowanych zwierząt
Osteometryczna	struktura płci w stadzie, wielkość ciała, wysokość w kłębie, morfotyp
Wagowa	masa ciała zwierząt, wielkość produkcji mięsnej
Obrazowania – rentgenografia, tomografia komputerowa	zmiany patologiczne, identyfikacja gatunkowa, struktura wiekowa, gęstość kości – zmiany zachodzące podczas procesów tafonomicznych

stanowi jeden z aspektów analizy aDNA zlokalizowanego w jądrze komórkowym. Innym celem, dla którego przeprowadza się izolację jądrowego DNA z materiałów archeozoologicznych, jest identyfikacja płci (chromosom X i Y u ssaków, W i Z u ptaków), co ma szczególne znaczenie w przypadku kości zwierząt młodych, o niezaznaczonym jeszcze dymorfizmie lub w znacznym stopniu pofragmentowanych, których ocena makroskopowa jest utrudniona lub niemożliwa (34, 35).

Podstawowym narzędziem w rękach genetyków zajmujących się kopalnym DNA jest opracowana przez Mullisa i Faloona w 1987 r. łańcuchowa reakcja polimerazy. PCR umożliwia amplifikację wybranych fragmentów DNA nawet ze śladowych jego ilości zachowanych w kopalnym materiale (36). Długość amplifikowanych fragmentów aDNA mieści się zwykle w przedziale 100–150 par zasad, co nie reprezentuje znacznej wartości poznawczej. W przypadku dobrze zachowanych próbek DNA i zastosowania starterów do zachodzących na siebie fragmentów, możliwe jest jednak uzyskanie dłuższych sekwencji (37). Ze względu na niewielką ilość otrzymywanych matryc kopalnego DNA, konieczne jest zastosowanie większej liczby cykli PCR w porównaniu z amplifikacją współczesnego materiału genetycznego (35). Istotną kwestią jest dobranie odpowiedniej polimerazy DNA, która mimo licznych uszkodzeń cząsteczek aDNA powinna wykazywać wysoką dokładność odtwarzania informacji genetycznej (38). Nie bez znaczenia jest również właściwe zaprojektowanie starterów, co wymaga znajomości konkretnych fragmentów genomu. W przypadku wymarłych gatunków zwierząt startery dobrane są do sekwencji genów organizmów najbliższych z nimi spokrewnionych (28). Przełomem w badaniach kopalnego DNA było zastosowanie zmodyfikowanej reakcji amplifikacji DNA w postaci multiplex PCR. Ta nowa technika, polegająca na namnażaniu wielu różnych fragmentów DNA

podczas jednej reakcji, umożliwiła otrzymywanie dłuższych amplikonów w porównaniu z konwencjonalnym (simplex) PCR (26). Dzięki zastosowaniu multiplex PCR możliwe stało się uzyskanie sekwencji całych genomów mitochondrialnych, takich jak pierwszy mitogenom plejstocenijskiego mamuta, mastodonta (39, 40) czy niedźwiedzia jaskiniowego (41).

O ile PCR jest rutynową i łatwą pod względem technicznym metodą analizy DNA żyjących współcześnie organizmów, to w przypadku kopalnych matryc jej zastosowanie jest znacznie trudniejsze i wymaga szczegółowej wiedzy oraz doświadczenia ze strony badacza. Wynika to z dwóch faktów. Po pierwsze, cząsteczki aDNA ulegają procesom degradacyjnym, które prowadzą do fragmentacji uniemożliwiającej ich powielenie lub modyfikacji zmieniającej strukturę chemiczną zasad DNA, czego skutkiem jest błędne odczytanie pierwotnej sekwencji (np. w wyniku hydrolitycznej deaminacji cytozyna ulega zmianie do uracylu, a więc podczas amplifikacji pojawia się tranzycja G → A; 18). Po drugie, polimeraza DNA podczas amplifikacji znacznie łatwiej powieliła nawet nieznaczne ilości współczesnego, niezdegradowanego materiału genetycznego niż DNA kopalnego. Stąd też przeprowadzanie reakcji PCR antycznego DNA wiąże się z wysokim ryzykiem kontaminacji (42). Zanieczyszczeniem analizowanych prób może być ludzki materiał genetyczny pochodzący od archeozoologów zajmujących się wydobywaniem i badaniem odnalezionych szczątków oraz genetyków analizujących je już w laboratorium (43). W przypadku materiałów faunistycznych większy jednak problem stanowi egzogeny DNA zwierząt współczesnych, reprezentujących badany gatunek (44). Kontaminacja obcym DNA jest równoznaczna z uzyskaniem fałszywych wyników, dlatego też praca z kopalnym materiałem wymaga skrupulatnego przestrzegania regulaminu, który obejmuje zarówno warunki

techniczne, jakie powinno spełniać laboratorium aDNA (fizyczne odseparowanie od laboratorium współczesnego DNA, oddzielne pomieszczenie dla każdego etapu pracy z aDNA, wyposażenie m.in. w system wentylacji, lampy UV, filtry HEPA), jak i wytyczne dotyczące personelu (obowiązek noszenia odzieży ochronnej – kombinezony, maseczki, rękawiczki; przemieszczanie się pomiędzy poszczególnymi pracowniami antycznego DNA wraz z rosnącym gradientem stężenia aDNA) oraz specjalnego przygotowania sprzętu laboratoryjnego i odczynników (16, 45). Należy zaznaczyć, że wymogi przeciwdziałające zanieczyszczeniu kopalnego DNA skierowane są nie tylko do laborantów, ale i osób mających jako pierwsze kontakt z przeznaczonymi do badań szczątkami. Uważa się, że częściej do kontaminacji dochodzi właśnie podczas ich wydobywania, aniżeli w trakcie analiz laboratoryjnych (46). Wdrażanie wyżej wymienionych zasad do praktyki pracy z aDNA nie gwarantuje sukcesu w postaci wiarygodnych wyników. W związku z tym niedozwolnym etapem badań kopalnych matryc DNA jest weryfikacja autentyczności uzyskanych sekwencji, czemu służą sprezywane kryteria (tab. 2).

Powielone w wyniku reakcji PCR fragmenty DNA stanowią materiał wyjściowy dla dalszych analiz. Zasadniczym etapem badań aDNA jest poznanie jego sekwencji nukleotydowej. Pierwsze cząsteczki kopalnego DNA poddawano sekwencjonowaniu metodą terminacji łańcucha, zwaną również metodą Sangera. Technika ta charakteryzuje się jednak niską przepustowością, co przy odczytywaniu większych części genomu jest równoznaczne z wysokimi kosztami. Ponadto sam proces przygotowania próbek do analizy, szczególnie w przypadku aDNA, jest zwykle mało wydajny i czasochłonny (27). Wprowadzenie bardziej efektywnych technik sekwencjonowania nowej generacji (next generation sequencing – NGS) było punktem przełomowym w historii badań kopalnego DNA.

**Tabela 2.** Kryteria brane pod uwagę podczas weryfikacji autentyczności wyników badań aDNA (opracowanie własne na podstawie 47)

Kryterium	Ocena
Fizyczne odseparowanie laboratorium aDNA od laboratoriów współczesnego materiału genetycznego	tak
Kontrola negatywna dla izolacji i amplifikacji DNA	tak
Analiza wielkości otrzymanych produktów PCR	sekwencje > 1000 pz wskazują na obecność egzogenego DNA
Określanie liczby kopii aDNA za pomocą real-time PCR	początkowa liczba cząsteczek < 1000 może świadczyć o kontaminacji
Lionowanie produktów PCR w wektorach bakteryjnych + sekwencjonowanie uzyskanych klonów	umożliwia określenie ilości sekwencji endo- i egzogenych oraz liczby zmian będących następstwem uszkodzeń aDNA
Powtarzalność wyników	analiza aDNA pochodzącego od tego samego osobnika, przeprowadzona w dwóch niezależnych ośrodkach powinna dać identyczne wyniki
Określenie stopnia racemizacji aminokwasów jako pośrednia metoda oceny stopnia zachowania DNA	tak
Sens filogenetyczny analizowanych sekwencji	tak

Jedną z pierwszych technologii NGS została opisana w 2005 r. i niemal natychmiast wdrożono ją do laboratoriów aDNA. Jako pierwszy rezultaty swojej pracy z zastosowaniem NGS przedstawił Poinar i wsp. (48), publikując wyniki sekwencjonowania DNA jądrowego mamuta włochatego. Uzyskany genom (13 mln p.z.) był 480 razy większy w porównaniu z ówczesnymi osiągnięciami – 27 tys. p.z. DNA niedźwiedzia jaskiniowego (49). Obecnie istnieje kilka komercyjnie dostępnych platform do sekwencjonowania, spośród których zastosowanie w badaniach antycznego DNA znalazła platforma Roche (454) FLX oraz Illumina (Solexa; 27). Wykorzystano je m.in. do odczytania sekwencji genomu tura (50), tygrysa tasmańskiego (51) oraz nowozelandzkiego moa (52). Techniki te, w przeciwieństwie do konwencjonalnej metody Sangera, umożliwiając jednoczesne sekwencjonowanie nawet miliona fragmentów DNA (53).

### Jakich informacji dostarcza analiza genetyczna zwierzęcych szczątków?

Skoncentrowani na analizie materiałów faunistycznych archeozoologowie dzięki implementacji technik genetyki molekularnej w ramy dotychczas stosowanej metodyki, pokonali szereg problemów, z którymi tradycyjne metody (anatomiczno-morfologiczne) nie były w stanie się uporać. Co więcej, analiza DNA wymarłych zwierząt znacznie przyspieszyła rozwój wiedzy z zakresu ewolucji gatunków, filogenetyki czy filogeografii. Porównując wyniki sekwencjonowania najstarszego genomu, należącego do konia z wczesnego środkowego plejstocenu, z sekwencjami DNA konia: Przewalskiego, ze środkowego plejstocenu, współczesnego, jak i osła, odtworzono przebieg ewolucji rodzaju *Equus* (54). Genom koni (54, 55), jak i owiec (56), świń (57) czy psów (58, 59) niejednokrotnie poddawany jest analizom mającym na celu wyjaśnienie zagadnienia, jakim jest proces udomowienia zwierząt. Równie dużo uwagi poświęca się przedstawicielom plejstoceńskiej megafauny, m.in. mamutom i nosorożcom włochatym, bizonom oraz wółom piżmowym (60). Oprócz dociekania przyczyn wielkiego plejstoceńskiego wymierania, genetycy próbują odtworzyć historię ewolucyjną tych zwierząt. Analiza sekwencji pełnych genomów mitochondrialnych pozyskanych ze zlokalizowanych w różnych częściach świata szczątków mamuta, ujawniła istnienie w przeszłości jego dwóch podgatunków, a także udowodniła bliskie pokrewieństwo *Mammuthus primigenius* ze współcześnie żyjącym słoniem indyjskim (42, 61, 62). Na podstawie mtDNA udało się zrekonstruować zależności filogenetyczne również

takich wymarłych ssaków, jak niedźwiedź jaskiniowy (63), lemur olbrzymi (64), leńwiec naziemny (65) czy tygrys kaspijski (66). Kolejną grupą danych, jakie skrywa aDNA, są informacje na temat zmienności genetycznej dawnych populacji, ich liczebności oraz poziomu migracji. Na podstawie tej wiedzy można wnioskować i przewidywać losy współcześnie żyjących zwierząt, co jest szczególnie istotne w przypadku gatunków zagrożonych wyginięciem. Analiza kopalnego DNA stanowi zatem nie tylko narzędzie poznawania historii minionego świata ożywionego, ale również źródło wskazówek dla ochrony współczesnego środowiska naturalnego (42).

### Piśmiennictwo

- Houszka M.: Człowiek i zwierzę – dwoistość natury ludzkiej. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2006, **15**, 4, 747–750.
- Szafrański W.: *Prahistoria religii na ziemiach polskich*. Zakład Narodowy im. Ossolińskich, 1987.
- Lasota-Moskalewska A. (red.): *Archeozoologia. Ssaki*. Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa 2008.
- Bartosiewicz L.: People and animals: the archaeozoologist's perspective. W: Laszlovszky J., Szabó P. (edit.): *People and nature in historical perspective*. Budapest: Central European University Department of Medieval Studies and Archaeologia, 2003, 23–34.
- Chrószcz A., Janeczek M.: Wstępna ocena szczątków kostnych zwierząt ze stanowiska archeologicznego przy ulicy Katedralnej 4 na Ostrowie Tumskim we Wrocławiu. *Wratislavia Antiqua* 2012, **17**, 205–222.
- Wegrzynowicz T.: *Szczątki zwierzęce jako wyraz wierzeń w czasach ciałopalenia zwłok*. PMA, Warszawa, 1982.
- Makowiecki D.: Możliwości poznawcze i niektóre problemy polskiej archeozoologii. W: Nauki przyrodnicze i fotografia lotnicza w archeologii. *Biblioteka Fontes archaeologici* Poznanienses 1998, **7**, 77–95.
- Baker P., Worley F.: *Animal Bones and Archaeology: Guidelines for Best Practice*. *English Heritage* 2014.
- Bertrand L.: Synchrotron Imaging for Archaeology, Art History, Conservation, and Palaeontology. W: Creagh D., Bradley D. (edit.): *Physical Techniques in the Study of Art, Archaeology and Cultural Heritage*. Elsevier 2007, **2**, 97–114.
- Higuchi R., Bowman B., Freiberg M., Ryder O.A., Wilson A.C.: DNA sequences from the quagga, an extinct member of horse family. *Nature* 1984, **312**, 282–284.
- Graham E.A.M.: DNA reviews: Ancient DNA. *Forensic Sci. Med. Pathol.* 2007, **3**, 221–225.
- Lindahl T.: Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 1993, **362**, 709–715.
- Hofreiter M., Serre D., Poinar H.N., Kuch M., Paabo S.: Ancient DNA. *Nature Rev. Genet.* 2001, **2**(5), 353–359.
- Lamers R., Hayter S., Matheson C.D.: Postmortem Microscopic Lesions in Sequence Analysis of Human Ancient Mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 2009 **68**: 40–55.
- Pääbo S., Poinar H., Serre D., Jaenicke-Despres V., Hebler J., Rohland N., Kuch M., Krause J., Vigilant L., Hofreiter M.: Genetic analyses from ancient DNA. *Annu. Rev. Genet.* 2004, **38**, 645–679.
- Willerslev E., Cooper A.: Ancient DNA. *P. Roy. Soc. Lond. B. Biol.* 2005, **272**, 3–16.
- Hebsgaard M.B., Philips M., Willerslev E.: Geologically ancient DNA: fact or artifact? *Trends Microbiol.* 2005, **13**, 212–220.
- Witas H.: Kopalny DNA źródłem informacji w badaniach archeologicznych. *Archeologia Polski* 2007, **52**, 15–34.
- Smith C.I., Chamberlain A.T., Riley M.S., Stringer C., Collins M.J.: The thermal history of human fossils and the likelihood of successful DNA amplification. *J. Hum. Evol.* 2003, **45**, 203–217.
- Słomski R., Dzieduszycki A.M., Lipiński D., Szalata M., Wielgus K., Zeyland J., Smorąg Z., Frąckowiak H., Ryba M.S.: Archeologia molekularna. W: Słomski R.: *Analiza DNA – teoria i praktyka*. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2011, 383–389.
- Burger J., Hummel S., Herrmann B., Henke W.: DNA preservation: A microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains. *Electrophoresis* 1999, **20**, 1722–1728.

- Witas H.: Analiza kopalnego DNA (aDNA). W: Lasota-Moskalewska A. (red.): *Archeozoologia. Ssaki*. Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa 2008, 201–213.
- Sensabaugh G.F.: DNA Typing of Biological Evidence Material. W: Herrmann B., Hummel S.: *Ancient DNA: Recovery and Analysis of Genetic Material from Paleontological, Archaeological, Museum, Medical, and Forensic Specimens*. Springer-Verlag 1994, 141–143.
- Pruvost M., Schwarz R., Correia V.B., Champlot S., Brauguier S., Morel N., Fernandez-Jalvo Y., Grange T., Geigl E.A.: Freshly excavated fossil bones are best for amplification of ancient DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007, **104**, 739–744.
- Shapiro B., Hofreiter M.: Ancient DNA: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*, 840, Springer Protocols. Humana Press, 2012.
- Hunter P.: Ancient DNA research goes nuclear. *EMBO reports* 2006, **7**, 2, 136–139.
- Rizzi E., Lari M., Gigli E., De Bellis G., Caramelli D.: Ancient DNA studies: new perspectives on old samples. *Genet Sel. Evol.* 2012, **44**, 21.
- Ho S.Y.W., Gilbert M.T.P.: Ancient mtgenomics. *Mitochondrion* 2010, **10**, 1–11.
- Fernandez-Silva P., Enriquez J.A., Montoya J.: Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp. Physiol.* 2003, **88**, 41–56.
- Vallone P.M., Just R.S., Coble M.D., Butler J.M., Parsons T.J.: A multiplex allelespecific primer extension assay for forensically informative SNPs distributed throughout the mitochondrial genome. *Int. J. Legal Med.* 2004, **118**, 147–157.
- Bruford M.W., Bradley D.G., Luikart G.: DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Rev.* 2003, **4**, 900–910.
- Stojak J.: Filogeografia ssaków w Europie — koncepcja badań i wybrane zagadnienia. *Kosmos* 2014, **63**, 77–85.
- Prusak B., Głażewska I., Gralak B.: Nierekombinujące markery DNA jako nowe narzędzia analiz w hodowli zwierząt (cz. 1). *Przegląd Hodowlany* 2014, **1**, 1–2.
- Svensson E.M.: Detecting Sex and Selection in Ancient Cattle Remains Using Single Nucleotide Polymorphisms. *Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology* 748, 2010. Dostępny w internecie: <https://uu.diva-portal.org/smash/get/diva2:313884/FULLTEXT01.pdf>
- Matisoo-Smith E., Horsburgh K.A.: *DNA for archaeologists*. Left Coast Press Inc. 2012, 32–48.
- Paabo S., Higuchi R.G., Wilson A.C.: Ancient DNA and the Polymerase Chain Reaction. *J. Biol. Chem.* 1989, **264**, 9709–9712.
- Sarkissian C., Allentoft M.E., Ávila-Arcos M.C., Barnett R., Campos P.F., Cappellini E., Ermini L., Fernández R., Rute da Fonseca, Ginolhac A., Hansen A.J., Jónsson H., Korneliusson T., Margaryan A., Martin M.D., Moreno-Mayar J.V., Raghavan M., Rasmussen M., Sandoval Velasco M., Schroeder H., Schubert M., Seguin-Orlando A., Wales N., Gilbert M.T.P., Eske Willerslev E., Orlando L.: Ancient genomics. *Phil. Trans. R. Soc. B* 2015, **370**: 20130387.
- d'Abbadie M., Hofreiter M., Vaisman A., Alexandra, Lokes D., Gasparutto D., Cadet J., Woodgate R., Pääbo S., Holliger P.: Molecular breeding of polymerases for amplification of ancient DNA. *Nat. Biotechnol.* 2007, **25**, 939–943.
- Krause J., Dear P.H., Pollack J.L., Slatkin M., Spriggs H., Barnes I., Lister A.M., Ebersberger I., Pääbo S., Hofreiter M.: Multiplex amplification of the mammoth mitochondrial genome and the evolution of Elephantidae. *Nature* 2006, **439**, 724–727.
- Rohland N., Malaspina A.-S., Pollack J.L., Slatkin M., Mathews P., Hofreiter M.: Proboscidean mitogenomics: chronology and mode of elephant evolution using mastodon as outgroup. *PLoS Biol.* 2007, **5**, e207.
- Krause J., Unger T., Noçon A., Malaspina A.S., Kolokotronis S.O., Stiller M., Soibelman L., Spriggs H., Dear P.H., Briggs A.W., Bray S.C.E., O'Brian S.J., Rabeder G., Mathews P., Cooper A., Slatkin M., Pääbo S., Hofreiter M.: Mitochondrial genomes reveal an explosive radiation of extinct and extant bears near the Miocene-Pliocene boundary. *BMC Evol. Biol.* 2008, **8**, 220.
- Gajewska M., Bogdanowicz W.: Kopalny DNA czyli lekcja z przeszłości. *Kosmos* 2006, **55**, 117–128.
- Hummel S.: *Ancient DNA typing. Methods, Strategies and Applications*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 2003.
- Yang D.Y., Cannon S.R., Saunders S.R.: DNA species identification of archaeological salmon bone from the Pacific Northwest Coast of North America. *J. Archaeol. Sci.* 2004, **31**, 619–631.

45. Knapp M., Clarke A.C., Horsburgh K.A., Matisoo-Smith E.A.: Setting the stage – Building and working in an ancient DNA laboratory. *Ann. Anat.* 2011, **194**, 3–6.
46. Sampietro M.L., Gilbert M.T., Lao O., Caramelli D., Lari M., Bertranpetit J., Laluzea-Fox C.: Tracking down human contamination in ancient human teeth. *Mol. Biol. Evol.* 2006, **23**, 1801–1807.
47. Poinar H.N.: *The Top Ten List: criteria of authenticity for DNA from ancient and forensic samples*. International Congress Series, 2003, 1239, 575–579.
48. Poinar H.N., Schwarz C., Qi J., Shapiro B., MacPhee R.D.E., Buigues B., Tikhonov A., Huson D.H., Tomsho L.P., Auch A., Ramm P., Miller W., Schuster S.C.: Metagenomics to paleogenomics: Large-scale sequencing of mammoth DNA. *Science* 2006, **311**, 392–394.
49. Noonan J.P., Hofreiter M., Smith D., Priest J.R.; Rohland N., Rabeeder G., Krause J., Dettler J.C., Pääbo S., Rubin E.M.: Genomic sequencing of Pleistocene cave bears. *Science* 2005, **309**, 597–600.
50. Lari M., Rizzi E., Mona S., Corti G., Catalano G., Chen K., Vernesi C., Larson G., Boscato P., De Bellis G., Cooper A., Caramelli D., Bertorelle G.: The complete mitochondrial genome of an 11450-year-old auroch (Bos primigenius) from Central Italy. *BMC Evol. Biol.* 2011, **11**, 32.
51. Miller W., Drautz D.I., Janecka J.E., Lesk A.M., Ratan A., Tomsho L.P., Packard M., Zhang Y., McClellan L.R., Qi J., Zhao F., Gilbert M.T., Dalén L., Arsuaga J.L., Ericson P.G., Huson D.H., Helgen K.M., Murphy W.J., Götherström A., Schuster S.C.: The mitochondrial genome sequence of the Tasmanian tiger (Thylacinus cynocephalus). *Genome Res.* 2009, **19**, 213–220.
52. Allentoft M., Schuster S.C., Holdaway R., Hale M., McLay E., Oskam C., Gilbert M.T., Spencer P., Willerslev E., Bunce M.: Identification of microsatellites from an extinct moa species using high-throughput (454) sequence data. *Bio-techniques* 2009, **46**, 195–200.
53. Millar C.D., Huynen L., Subramanian S., Mohandesan E., Lambert D.M.: New developments in ancient genomics. *Trends Ecol. Evol.* 2008, **23**, 386–393.
54. Orlando L., Ginolhac A., Zhang G., Froese D., Albrechtsen A., Stiller M., Schubert M., Cappellini E., Petersen B., Moltke I., Johnson P.L., Fumagalli M., Vilstrup J.T., Raghavan M., Korneliusen T., Malaspina A.S., Vogt J., Szklarczyk D., Kelstrup C.D., Vinther J., Dolocan A., Stenderup J., Velazquez A.M., Cahill J., Rasmussen M., Wang X., Min J., Zazula G.D., Seguin-Orlando A., Mortensen C., Magnussen K., Thompson J.E., Weinstock J., Gregersen K., Røed K.H., Eisenmann V., Rubin C.J., Miller D.C., Antczak D.F., Bertelsen M.E., Brunak S., Al-Rasheid K.A., Ryder O., Andersson L., Mundy J., Krogh A., Gilbert M.T., Kjær K., Sicheritz-Ponten T., Jensen L.J., Olsen J.V., Hofreiter M., Nielsen R., Shapiro B., Wang J., Willerslev E.: Recalibrating Equus evolution using the genome sequence of an early Middle Pleistocene horse. *Nature* 2013, **499**, 74–78.
55. Ludwig A., Pruvost M., Reissmann M., Benecke N., Brockmann G.A., Costanos P., Cieslak M., Lippold S., Llorente L., Sappo-Malaspina A., Slatkin M., Hofreiter M.: Coat Color Variation at the Beginning of Horse Domestication. *Science* 2009, **324**, 485.
56. Cai D., Tang Z., Yu H., Han L., Ren X., Zhao X., Zhu H., Zhou H.: Early history of Chinese domestic sheep indicated by ancient DNA analysis of Bronze Age individuals. *J. Archaeol. Sci.* 2011, **38**, 896–902.
57. Larson G., Albarella U., Dobney K., Rowley-Conwy P., Schibler J., Tresselt A., Vigne J.D., Edwards C.J., Schlumbaum A., Dinu A., Bălăşescu A., Dolman G., Tagliacozzo A., Manaseryan N., Miracle P., Van Wijngaarden-Bakker L., Marco Masseti M., Bradley D.G., Cooper A.: Ancient DNA, pig domestication, and the spread of the Neolithic into Europe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, **104**, 15276–15281.
58. Malmström H., Vilà C., Gilbert M.T.P., Storå J., Willerslev E., Holmlund G., Götherström A.: Barking up the wrong tree: Modern northern European dogs fail to explain their origin. *BMC Evol. Biol.* 2008, **8**, 71.
59. Thalman O., Shapiro B., Cui P., Schuenemann V.J., Sawyer S.K., Greenfield D.L., Germonpre M.B., Sablin M.V., Lopez-Giraldez F., Domingo-Roura X., Napierala H., Uerpman H-P., Loponte D.M., Acosta A.A., Giemsch L., Schmitz R.W., Worthington B., Buikstra J.E., Druzhkova A., Grahodatsky A.S., Ovodov N.D., Wahlberg N., Freedman A.H., Schweizer R.M., Koepfli K.-P., Leonard J.A., Meyer M., Krause J., Pääbo S., Green R.E., Wayne R.K.: Complete mitochondrial genomes of ancient Canids suggest a European origin of domestic dogs. *Science* 2013, **342**, 871–874.
60. Lorenzen E.D., Nogue's-Bravo D., Orlando L., Weinstock J., Binladen J., Marske K.A., Ugan A., Borregaard M.K., Gilbert M.T.P., Nielsen R., Ho S.Y.W., Goebel T., Graf K.E., Byers D., Stenderup J.T., Rasmussen M., Campos P.F., Leonard J.A., Koepfli K.P., Froese D., Zazula G., Stafford Jr T.W., Aaris-Sorensen K., Batra P., Haywood A.M., Singarayer J.S., Valdes P.J., Boeskorov G., Burns J.A., Davydov S.P., Haile J., Jenkins D.L., Kosintsev P., Kuznetsova T., Lai X., Martin L.D., McDonald H.G., Mol D., Meldgaard M., Munch K., Stephan E., Sablin M., Sommer R.S., Sipko T. E., Scott E., Suchard M.A., Tikhonov A., Willerslev R., Wayne R.K., Cooper A., Hofreiter M., Sher A., Shapiro B., Rahbek C., Willerslev E.: Species-specific responses of Late Quaternary megafauna to climate and humans. *Nature* 2011, **479**, 359–364.
61. Miller W., Drautz D.I., Ratan A., Pusey B., Qi J., Lesk A.M., Tomsho L.P., Packard M.D., Zhao F., Sher A., Tikhonov A., Raney B., Patterson N., Lindblad-Toh K., Lander E.S., Knight J.R., Irzyk G.P., Fredrikson K.M., Harkins T.T., Sheridan S., Tom Pringle T., Schuster S.C.: Sequencing the nuclear genome of the extinct woolly mammoth. *Nature* 2008, **456**, 387–390.
62. Gilbert M.T.P., Drautz D.I., Lesk A.M., Ho S.Y.W., Qi J., Ratan A., Hsu C.H., Sher A., Dalen L., Götherström A., Tomsho L.P., Rendulic S., Packard M., Paula F. Campos P.F., Tatyana V., Kuznetsova T.V., Shidlovskiy F., Alexei Tikhonov A., Eske Willerslev E., Lacumin P., Bernard Buigues B., Ericson Per G.P., Germonpre M., Kosintsev P., Nikolaev V., Nowak-Kemp M., James R., Knight J.R., Irzyk G.P., Perbost C.S., Fredrikson K.M., Harkins T.T., Sheridan S., Miller W., Schuster S.C.: Intraspecific phylogenetic analysis of Siberian woolly mammoths using complete mitochondrial genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, **105**, 8327–8332.
63. Hänni C., Laudet V., Stéhelin D., Taberlet P.: Tracking the origins of the cave bear (*Ursus spelaeus*) by mitochondrial DNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, **91**, 12336–12340.
64. Orlando L., Calvignac S., Schnebelen C., Douady C.J., Godfrey L.R., Hänni C.: DNA from extinct giant lemurs links archaeolemurids to extant indriids. *BMC Evol. Biol.* 2008, **8**, 121.
65. Greenwood A.D., Castresana J., Feldmaier Fuchs G., Pääbo S.: A molecular phylogeny of two extinct sloths. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2001, **18**, 94–103.
66. Driscoll C.A., Yamaguchi N., Bar-Gal G.K., Roca A.L., Luo S., Macdonald D.W., O'Brien S.J.: Mitochondrial phylogeography illuminates the origin of the extinct Caspian tiger and its relationship to the amur tiger. *PLoS One* 2009, **4**, e4125.