DOI: 10.53737/2713-2021.2025.43.40.009

Р.Н. Календарь, О.Н. Хапилина, А.Т. Кулыясов, А.С. Жунисханов, А.И. Исин, А.К. Айткали

АРХЕОБОТАНИЧЕСКОЕ И МОЛЕКУЛЯРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЕМЯН ИЗ КУРГАНА № 2 МОГИЛЬНИКА КАРАТОБЕ*

В статье рассматриваются семена горца птичьего (*Polygonum aviculare* L.*),* обнаруженные в кургане № 2 могильника Каратобе, их успешное проращивание в культуре *in vitro*, а также результаты молекулярно-генетического исследования. Особое внимание уделено радиоуглеродному анализу, который показал, что семена были занесены в памятник в период 1950—1960-х гг. Эти данные демонстрируют необходимость осторожности при интерпретации подобных находок: обнаружение семян в погребальных комплексах возможно не всегда связано с их изначальным использованием в древности, поэтому обязательным является сопоставительный анализ костных и растительных остатков.

Ключевые слова: археология, могильник, курган, семена, молекулярно-генетическое исследование.

Сведения об авторах: Календарь Руслан Николаевич[1], кандидат биологических наук, Назарбаев Университет; Хапилина Оксана Николаевна[2], кандидат биологических наук, Национальный центр биотехнологии; Кулыясов Арман Табылович[3], кандидат химических наук, Национальный центр биотехнологии; Жунисханов Айдын Сенгалиевич[4], автор-корреспондент, Назарбаев Университет; Исин Амантай[5], кандидат исторических наук, профессор, Шәкәрім университет; Айткали Азат Калыевич[6], PhD, Шәкәрім университет.

Контактная информация: [1,4]010000, Казахстан, г. Астана, ул. Кабанбай батыра, 53, Назарбаев Университет, e-mail: [1]ruslan.kalendar@mail.ru, [4]aidyn.zhuniskhanov@nu.edu.kz; [2,3]010000, Казахстан, г. Астана, Коргальджинское шоссе, здание 13/5, Национальный центр биотехнологии, e-mail: [2]hapilina@biocenter.kz; [3]akulyyasov@gmail.com; [5,6]071400, Казахстан, г. Семей, ул. Шугаева 159/3, Шәкәрім университет, e-mail: [5]assemey51@gmail.com, [6]azza_semsk@mail.ru.

Ruslan Kalendar, Oxana Khapilina, Arman Kulyyasov, Aidyn Zhuniskhanov, Amantai Isin, Azat Aitkali

ARCHAEOBOTANICAL AND MOLECULAR STUDY OF THE SEEDS FROM KURGAN NO. 2 AT THE KARATOBE BURIAL SITE

This study reports on the discovery of knotgrass (*Polygonum aviculare* L.) seeds recovered from Kurgan No. 2 of the Karatobe burial ground, their successful germination under in vitro culture conditions, and subsequent molecular-genetic analyses. Radiocarbon dating indicates that the seeds were introduced into the site during the 1950[s]—1960[s] rather than representing ancient deposits. These results underscore the importance of critical evaluation when interpreting botanical finds in funerary contexts. The study highlights that the mere presence of seeds in burial assemblages cannot be automatically linked to ancient ritual or subsistence practices; instead, comparative analyses of both human and plant remains are essential to establish reliable cultural and chronological associations.

Key words: archaeology, burial ground, kurgan, seeds, molecular-genetic research.

*Статья подготовлена в рамках программно-целевого финансированя Комитата науки МНВО РК 2024—2026, ИРН проекта BR24992916.

Статья поступила в номер 16 сентября 2025 г.
Принята к печати 30 сентября 2025 г.

About the authors: Kalendar Ruslan[1], PhD (Biology), Nazarbayev University; Khapilina Oxana[2], PhD (Biology), National Center for Biotechnology; Kulyyasov Arman[3], PhD (Chemistry), National Center for Biotechnology; Zhuniskhanov Aidyn[4], corresponding author, Nazarbayev University; Isin Amantai[5], PhD (History), Professor, Shakarim University; Aitkali Azat[5], PhD (History), Shakarim University.

Contact Information: [1,4]010000, Kazakhstan, Astana, 53 Kabanbay Batyr St., Nazarbayev University, e-mail: [1]ruslan.kalendar@mail.ru, [4]aidyn.zhuniskhanov@nu.edu.kz; [2,3]010000, Kazakhstan, Astana, 13/5 Korgalzhyn Highway, National Center for Biotechnology, e-mail: [2]hapilina@biocenter.kz; [3]akulyyasov@gmail.com; [5,6]071400, Kazakhstan, Semey, 159/3 Shugaev St., Shakarim University, e-mail: [5]assemey51@gmail.com, [6]azza_semsk@mail.ru.

Введение

Описание археологических материалов. Могильник Каратобе расположен у северо-западного подножия горы Кокентау в Жанасемейском районе области Абай. Памятник открыт Семейским отрядом Восточно-Казахстанской экспедиции в 2014 г. Археологические исследования на этом памятнике произведены впервые соавторами данной статьи А. Айткали и А. Жунисхановым (Айткали и др. 2014: 152—153, Aitkali et al. 2023: 85—90).

Могильник образован тремя курганными группами, насчитывающими 17 объектов. Они вытянуты по линии север—юг. Всего изучено пять курганов (Айткали и др. 2014:, Исин и др. 2018: 107—110). Насыпи курганов однотипны, состояли преимущественно из камней вперемешку с землей. Диаметр их не превышал 17 м. Внешнее кольцо (кромлех) чётко выступало над современной поверхностью земли. Между кромлехом и насыпью конструктивные элементы отсутствовали. С северо-восточной стороны каменного кольца фиксировался вход, образованный двумя аккуратно положенными крупными камнями в разрыве кольца (Айткали и др. 2014: 151). Могильные ямы всех исследованных курганов орентированы длинной осью по направлению восток—запад. Внутримогильные сооружения представлены в одном случае каменным ящиком, в остальных — грунтовой ямой с заставкой из вертикально поставленных плит, погребённые уложены на спину, головой ориентированы на запад и юго-запад. Из исследованных пяти курганов один — № 6 — с «усами» (Исин и др. 2018: 108).

В данной статье рассматриваются семена, обнаруженные при изучении кургана № 2. Материалы, полученные при его раскопках, опубликованы ранее (Айткали и др. 2014; Aitkali et al. 2023). Семена выявлены у южной стенки каменного ящика. Растительные остатки представлены семенами растений, предположительно относящихся к семейству *Polygonaceae*.

С целью определения хронологических рамок погребального памятника отобраны образцы человеческих костей и семян для радиоуглеродного датирования. Анализы проводились в лаборатории масс-спектрометрии Центр физических наук и технологий (г. Вильнюс, Литва). Результаты радиоуглеродного анализа имеют следующие значения: для костей человека — 2284 ± 26 ^{14}C BP, для семян — 297 ± 26 ^{14}C BP (табл. 1).

Семена растений в погребальных памятниках обнаруживаются часто. Но исследователи не всегда проводят радиоуглеродные анализы семян. Так, например, при изучении кургана Уржар (Тасарык) с женским погребением, выявленным в 2013 г. в ходе охранных работ, были обнаружены кроме человеческих останков и погребального инвентаря скопления растительных остатков. Среди них: плоды конопли (*Cannabis*), щавеля (*Rume*), дриады восьми-лепестной (*Dr*ý*as octopétala*), горца птичьего (*Polygonum aviculare*), триостренника болотного (*Triglochin palustris*), смолевки обыкновенной (*Silene*), кориандра (*Anéthum*), зиры (*Cumīnum cymīnum*), авра́на (*Gratiola officinalis*), чертополоха (*Carduus acantoides*), хвои, подорожника и большое количество семян злаков (Байтанаев 2019: 9, 16)[1]. Радиоуглеродный анализ из этого комплекса сделан по фрагменту сохранившегося дерева из погребального

[1] Определения выполнены к.б.н., д.г.-м.н. С.А. Нигматовой (прим. ред.).

предметного комплекса. В заключение автор статьи допускает мысль, о том что лечебные травы специально принесены, погребённый человек мог быть при жизни лекарем-жрецом (Байтанаев 2019: 17—19).

Целью исследований материала из кургана № 2 мог. Каратобе является регенерация растений из семян, их видовая идентификация. В предварительных экспериментах предприняты попытки прорастить семена обычным способом на увлажнённом субстрате в сосудах с почвой и чашках Петри, с использованием стратификации при +4°C и обработкой стимуляторами роста (гиббереллловой кислотой). Но эти исследования оказались безрезультатными: ни одно из семян не проросло. В связи с этим были предприняты попытки получить растения с использованием культуры *in vitro*.

Материалы

Материалом для исследований послужили семена, предположительно принадлежащих виду из семейства Гречишных (*Polygonaceae*). Растительный материал по форме представляет собой трёхгранные плоды размерами 1—2 × 0,3—0,5 мм, похожие на плоды гречихи, очень плотные и твёрдые, чёрного цвета (рис. 1)[2].

Рис. 1. Внешний вид зёрен растительных остатков из кургана № 2 могильника Каратобе.

Fig. 1. Morphology of plant macroremains (seeds) from Kurgan No. 2 of the Karatobe burial site.

[2] Иллюстрации подготовлены авторами.

Методы исследований

Культура in vitro. Для получения проростков в культуре *in vitro* отработано несколько вариантов стерилизации семян. Протокол № 1 состоял в обработке 70% этанолом в течение двух минут с последующей промывкой дистиллированной водой, затем 15% хлорамином в течение 20 минут с последующей промывкой стерильной дистиллированной водой (Калашникова 2004). Протокол № 2 состоял в стерилизации семян 0,1% раствором хлористой ртути в течение 15 минут с последующей промывкой стерильной водой, затем материал помещали в пакеты из фильтровальной бумаги, после чего помещали в раствор 0,1% гиббереллловой кислоты (GA3). Чашки с увлажнёнными пакетами помещали в холодильник с температурой +5°С на пять дней для стратификации. После стратификации семена, не разрушая целостности пакетов, стерилизовали в 0,1% растворе хлористой ртути в течение 15 минут с последующей тщательной промывкой стерильной водой три раза по 20 минут (Способ получения 2016). Протокол № 3 проводили аналогично протоколу № 2, но после пост-стратификационной стерилизации в растворе хлористой ртути семена помещали в каплю концентрированной серной кислоты на 1—2 минуты (рис. 2), затем тщательно промывали стерильной водой (Барсукова 2016).

Поверхностно стерилизованные семена помещали на поверхность питательной среды, содержащей ½ нормы минеральных солей по прописи Мурасиге и Скуга (Murashige, Skoog 1962), 5 мг/л гиббереллловой кислоты и 20 г/л сахарозы. Культивирование проводили в световой комнате при освещении светодиодными лампами Phytoflora.

Рис. 2. Стерилизация семян растений из кургана № 2 могильника Каратобе в концентрированной серной кислоте.

Fig. 2. Sterilization of seeds from Kurgan No. 2 of the Karatobe burial site using concentrated sulfuric acid.

Выделение тотальной ДНК из зёрен

Экстракцию ДНК проводили из проростков методом с использованием кислого лизирующего CTAB-HEPES буфера (1.5% CTAB, 1.5 M NaCl, 10 mM Na_3EDTA, 50 mM HEPES, pH 5.3), по протоколу компании PrimerDigital (Total DNA isolation protocol, PrimerDigital, дата обращения: 16.09.2025). Качественные и количественные показатели ДНК определяли с использованием гель-электрофореза и спектрофотометра NanoDrop.

Экстрагированную ДНК визуализировали с использованием системы гель-документации ChemiDoc-It®TS2 Imager (UVP), для чего проводили горизонтальный электрофорез в 1%-ном агарозном геле, помещенном в камеру с 1xTAE-буфером (40 мМ Tris-CH_3COOH, pH 8.0). Электрофорез проводили при постоянном напряжении 80 V, в течение 150 минут. В качестве маркера молекулярных масс (M) использовали GeneRuler DNA Ladder Mix (100—10,000 bp) (#SM0332, Thermo Fisher Scientific) (рис. 3).

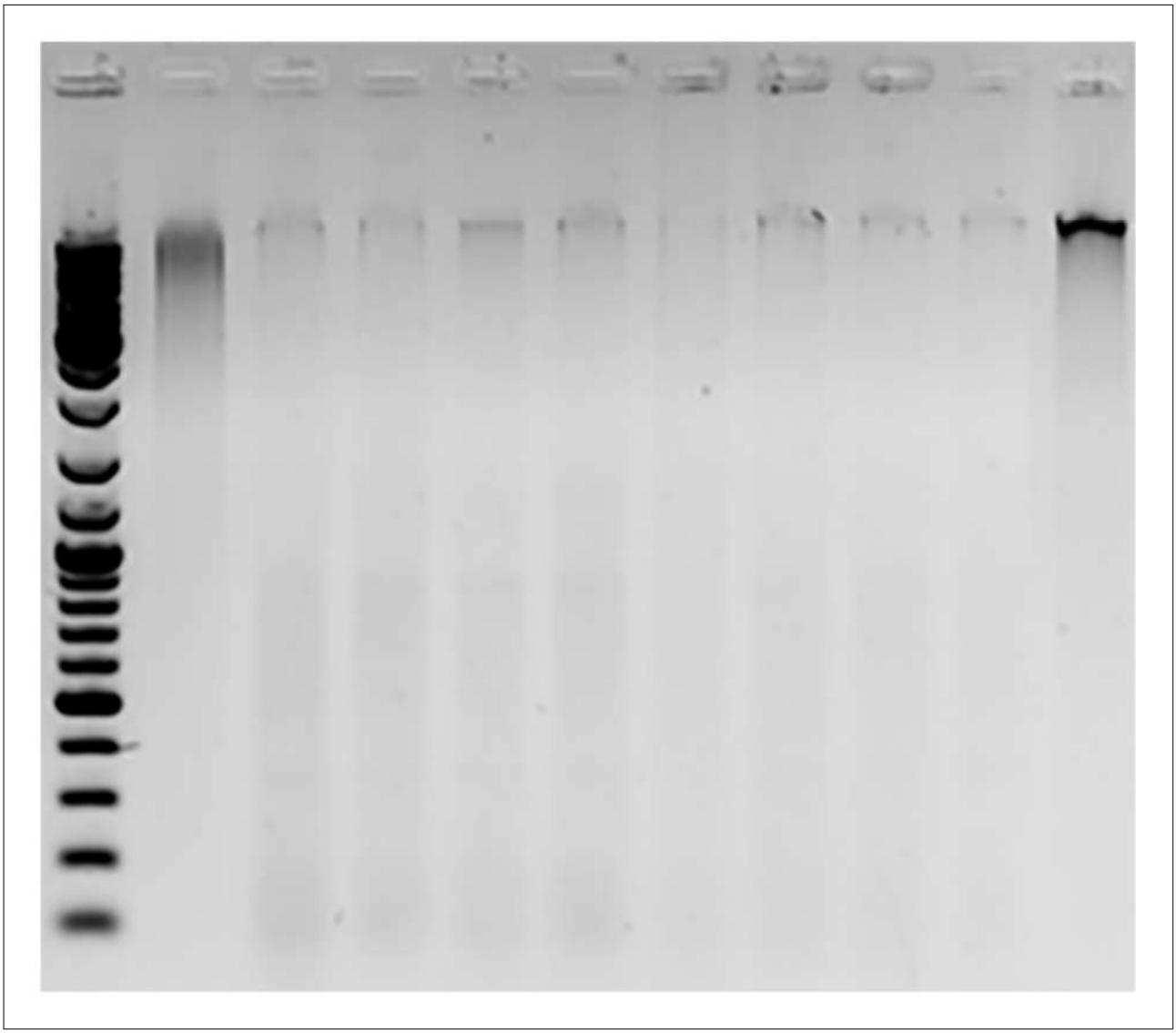

Рис. 3. Электрофорез выделенной ДНК из индивидуальных зерён растений из кургана № 2 могильника Каратобе.

Fig. 3. Electrophoresis of DNA extracted from individual plant seeds, Kurgan No. 2, Karatobe burial site.

Слева, маркера молекулярных масс (GeneRuler DNA Ladder Mix: 100—10,000 п.н.) и 10 образцов ДНК из индивидуальных зёрен.

ПЦР анализ с использованием PBS праймеров

Для проведения ПЦР амплификации для ДНК-фингерпринта использовали реакционную смесь в объёме 25 мкл следующего состава: ДНК 25 нг, 1x DreamTaq буфер (содержащий 1.5 mM $MgCl_2$), 1μM праймер, 200μM dNTP, 1 U Dream Taq ДНК полимеразы (Thermo Fisher Scientific). Режим амплификации был следующим: предварительная денатурация при 95°C в течение двух минут, затем 32 цикла: 15 сек — 95°C, 30 сек — 50°C и 90 сек — 72°C; последняя элонгация — две минуты при 72°C.

Результаты оценивали в 1.2%-м агарозном геле в 1x THE (20 mM Tris-HEPES, pH 8.06), в присутствии бромистого этидия, с использованием системы гель-документации ChemiDoc-It®TS2 Imager (UVP). Электрофорез проводили при постоянном напряжении 70 V в течение четырёх часов.

Приготовление образцов для хромато-тандемной масс спектрометрии LC-MS/MS

Несколько зёрен (3—4) перенесли в микропробирку на 1.5 мл и добавили 50 мкл свежеприготовленного раствора 8 М мочевины в 0,1 М Tris-HCl (pH 8.5). Содержимое пробирок интенсивно размельчали с помощью пестика в течение 3—4 минут. После вортексирования и откручивания на настольной центрифуге при максимальной скорости, верхнюю фазу (экстракт), содержащую белки отобрали и использовали на следующих этапах.

Белковую фракцию в объеме 30 мкл смешали с 10 мкл буферного раствора NuPAGE LDS Sample buffer (Invitrogen, NP0007), содержащего 10% меркаптоэтанола. Смесь инкубировали при 98°C в течение трёх минут и вносили на готовый градиентный гель NuPAGE 4-12% Bis-Tris gradient precast gel (Invitrogen NP0321BOX).

Белковые полосы вырезали из геля и обработали согласно протоколу, описанному ранее в литературе (Калашникова 2004). Кусочки геля дегидратировали добавлением 300 мкл 50% ацетонитрила с последующим добавлением 300 мкл 100% ацетонитрила, а затем регидратировали добавлением 300 мкл 50 мМ бикарбоната аммония. Конечную дегидратацию проводили двухкратной промывкой 300 мкл 50% ацетонитрила и 300 мкл 100% ацетонитрила. Каждую промывку проводили 10 минут при скорости встряхивания 1400 rpm и 25°C. Затем кусочки геля высушили на вакуумном концентраторе SpeedVac при 35°C в течение 30 минут. Для проведения протеолитического расщепления, кусочки геля преинкубировали с 10 мкл раствора трипсина с концентрацией 13.33 нг/мл (Pierce, 90057) при комнатной температуре в течение 10 минут. Затем в пробирку добавили 25 мкл 50 мМ раствора бикарбоната аммония и кусочки геля инкубировали 16 часов при 37°C. Полученную смесь пептидов очищали с помощью набора Zip tip (Pierce C18 Tips, 10 μL bed, 87782). Очищенную смесь пептидов высушили на вакуумном концентраторе SpeedVac при 35°C в течение 30 минут, а затем ресуспендировали в 10 мкл раствора с 0.1% трифторуксусной кислоты (TFA).

В экспериментах использовали улавливающую колоночную систему (Acclaim PepMap100 C18 pre-column, 5 mm×300 mm; 5 mm particles; Thermo Fisher Scientific) с насосом для ВЭЖХ от компании Dionex (Ultimate 3000 RSLCnano System, Thermo Fisher Scientific). Смесь пептидов разделяли на колонке Acclaim Pep-Map RSLC column (15 cm×75 mm, 2 mm particles; Thermo Scientific) с использованием 75-минутного многошагового градиента ацетонитрила (буфер А: раствор муравьиной кислоты (0.1%); буфер В: 90% ацетонитрил, 10% раствора муравьиной кислоты (0.1%)) при скорости потока 0.3 мкл/мин. Временной график процесса: 0 мин — 2% В, 10 мин — 2% В, 58 мин — 50% В, 59 мин — 99%, 69 мин — 99%, 70 мин — 2.0%, 75 мин — 2.0%. Немодифицированный источник CaptiveSpray

(Капилляр 1300 В, сухой газ 3.0 л/мин, температура высушивания 150°С) использовали для интерфейса системы ВЭЖХ с масс спектрометром Impact II (Bruker). Для накопления данных от образца, программа выбирала для фрагментации два наиболее интенсивных ионов прекурсоров, в результате чего общее время цикла составило 3 секунды. Диапазон масс MS-скана был установлен в интервале m/z от 150 до 2200 в режиме положительных ионов.

Программный продукт Mascot использовали для проведения поиска по базе данных SwissProt 2014_08 database (546,238 сиквенсов; 194,363,168 остатков), а также по обновленной базе данных SwissProt 2016_10 (552,884 сиквенсов; 197,760,918 остатков). Параметры поиска: вариабельные модификации окисление метионина (М), допуск масс фрагментного иона, 20 ppm; допуск масс родительского иона, 20 ppm.

Результаты

Культура in vitro семян из предполагаемого семейства Polygonaceae. Выбор оптимального протокола был основан на таких критериях, как отсутствие инфицированных эксплантов, а также сохранение жизнеспособности семян. Изучение различных протоколов стерилизации показало, что стандартный протокол, используемый для большинства растительных материалов, не подходит для данных образцов. По истечении недели культивирования экспланты были инфицированы плесневыми грибами. При использовании протоколов № 2 и 3 отмечали стерильность эксплантов, при этом на отдельных эксплантах было отмечено прорастание (табл. 2). Всего было получено четыре полноценных проростка, два из которых имеют укороченые междоузлия, у двух — междоузлия несколько растянуты. Удлинённые междоузлия возможно обусловлены воздействием гиббереллловой кислоты.

Два проросших семени, у которых было отмечено формирование первичного корешка, остановили своё развитие. Все выжившие проростки имели антоциановую окраску гипокотиля, которая исчезала по мере появления настоящих листьев (рис. 4, 5).

Рис. 4. Появление зародышевого корня на отдельных эксплантах (3 день культивирования).

Fig. 4. Emergence of the Embryonic Root on Individual Explants (Day 3 of Cultivation).

Рис. 5. Стерильные проростки, полученные из семян через семь дней культивирования (осень 2017).

Fig. 5. Sterile Seedlings Obtained from Seeds after 7 Days of Cultivation (Autumn 2017).

У проростков в возрасте 21 день сформирован слабый стелющийся стебель длиной 4—6 см, который имеет 2—3 междоузлия, с очередным расположением листьев, листья тонко ланцетовидные, гладкие, блестящие, без опушения, без прилистников, длиной 2—3 см. Корневая система развита слабо, у проростков наблюдали от одного до пяти нитевидных корней. Для дальнейшего роста и развития проростки были помещены на среду с повышенным содержанием цитокининовых фитогормонов (BAP и кинетин). В настоящий момент проростки культивируются в маджента-боксах (рис. 6) и получены растения с хорошо сформированной корневой системой (рис. 7).

Рис. 6. Культивирование проростков *Polygonum aviculare* L. **на среде для индукции органогенеза** (январь 2018).

Fig. 6. Cultivation of *Polygonum aviculare* L. **seedlings on medium for organogenesis induction** (January 2018).

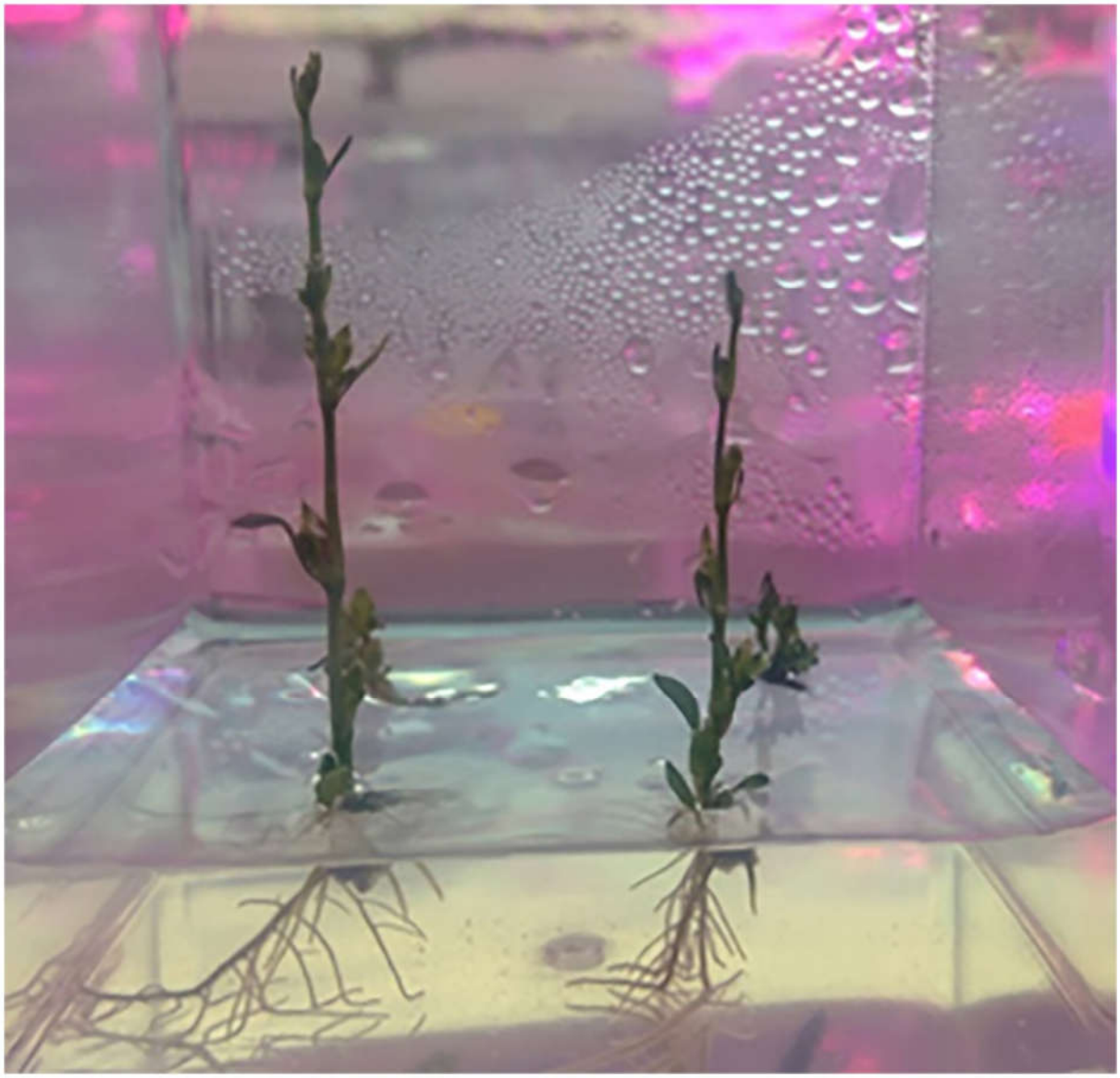

Рис. 7. Культивирование растений на среде для получение полноценного растения горца (*Polygonum aviculare* L.*)* (август 2018).

Fig. 7. Cultivation of plants on medium for obtaining a complete knotgrass (*Polygonum aviculare* L.*)* (August 2018).

Клонирование и анализ рибосомальных 18S и 23S генов

Для определения видовой принадлежности семян из кургана № 2 проведено клонирование и секвенирование фрагмента участка гена18S рибосомальной РНК из выделенной из семян ДНК. Для анализа и амплификации участков генов 18S рибосомальной РНК (рРНК) и 23S использовали универсальные праймеры (табл. 3).

ПЦР амплификацию проводили для комбинаций праймеров, которые амплифицируют участки ITS между генами рРНК 18S и 23S, а также только для гена 18S рРНК. Полученные фрагменты амплификации представлены на рисунке 8. ПЦР амплификация участков ITS между 18S и 23S генами рРНК выявили две полосы (рис. 8: слот 1 и 2), где полоса большей

массы соответствует растительной ДНК, а полоса меньшей соответствует наличию ДНК грибов. Фрагмент для гена 18S рРНК давал одну полосу, соответствующую только растительному фрагменту этого гена. ПЦР фрагмент для гена 18S рРНК был секвенирован. Анализ полученных после секвенирования последовательностей ДНК для гена 18S рРНК проводили с помощью онлайн программы BLAST. Получали список растений семейства Гречишных с максимальной гомологией. Достоверным свидетельством того, что фрагмент принадлежит определенному виду, считали совпадение его нуклеотидной последовательности 18S рРНК с последовательностью 18S рРНК, представленной в банке NCBI, более чем на 97%. Наибольшую гомологию данный фрагмент последовательности 18S рРНК соответствовал горцу птичьему (*Polygonum aviculare* L.*)*.

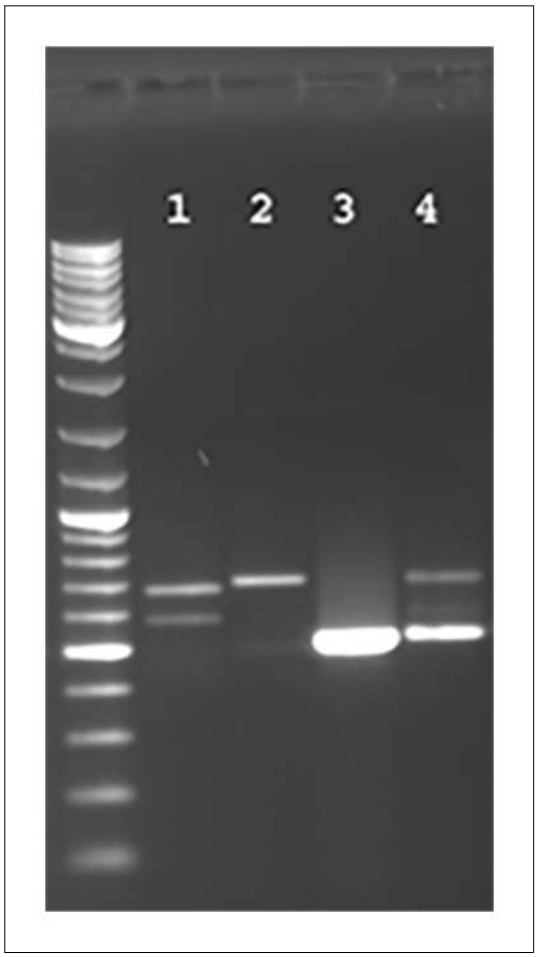

Рис. 8. ПЦР амплификация ДНК из зерна растения горца *(Polygonum aviculare* L.*)* **с помощью ПЦР праймеров:** *1* — ПЦР продукт в 733 п.н. для амплификации ITS региона (праймеры 2943—2944); *2* — ПЦР продукт в 749 п.н. для амплификации ITS региона (праймеры 2949—2944); *3* — ПЦР продукт в 501 п.н. для 18S rRNA гена (праймеры 3173—3174); *4* — Мультиплексный ПЦР с праймерами 1—3.

Fig. 8. PCR amplification of DNA from knotgrass *(Polygonum aviculare* L.*)* **grain using PCR primers:** *1* — PCR product of 733 bp for amplification of the ITS region (primers 2943—2944); *2* — PCR product of 749 bp for amplification of the ITS region (primers 2949—2944); *3* — PCR product of 501 bp for the 18S rRNA gene (primers 3173—3174); *4* — Multiplex PCR with primers 1—3.

Изучение молекулярно-генетического полиморфизма семян горца

Для выявления внутривидового полиморфизма, мы использовали универсальные ПЦР праймеры комплементарные PBS (Primer Binding Site) последовательностям ретротранспозонов.

Амплификации ДНК между PBS последовательностями, универсальный и эффективный метод, как для непосредственной визуализации полиморфизма между образцами, так и для полиморфизма в транскрипционных профилях, а также для быстрого клонирования сегментов LTR (Long Terminal Repeat) из геномной ДНК и алгоритма поиска по базе данных LTR-ретротранспозонов. Данный метод iPBS-амплификации основан на фактически универсальном присутствии тРНК-комплекса в качестве сайта связывания праймеров с обратной транскриптазой как в ретровирусах, так и в LTR-ретротранспозонах, что необходимо для инициации обратной транскрипции во время цикла репликации. Высококонсервативные PBS последовательности характерны для различных семейств LTR ретротранспозонов, и поскольку тРНК связывается с PBS-областью для инициации обратной транскрипции, последовательность этого региона комплементарна последовательности 3'-конца тРНК. Высокая степень информативности используемых ПЦР праймеров обусловлена повсеместным распространением последовательностей ретротранспозонов по всем хромосомам, включая кодирующие участки и гетерохроматин, за исключением теломерных и центромерных участков хромосом. ДНК фингерпринт на основе PBS технологии амплификации является наиболее быстрым и экономически более выгодным способом идентификации биологического материала, ввиду охвата значительного числа локусов на различных участках хромосом (гены, повторы, структурный хроматин и т.д.).

Последовательности используемых праймеров, комплементарных PBS участкам для ретротранспозонов представлены в таблице 3. Критериями эффективности используемых праймеров являлись равномерность насыщения спектров амплификации, а также индекс детектируемого полиморфизма. Праймеры, генерировавшие мало ПЦР-продуктов были отброшены, также были исключены праймеры, которые при хорошем насыщении спектров давали в основном мономорфные продукты.

ПЦР амплификация для ДНК из индивидуальных зерен горца *(Polygonum aviculare* L.*)* с PBS праймерами показали, что используемые PBS праймеры являются высокоэффективными для детекции полиморфизма между индивидуальными образцами семян. Количество выявленных полиморфных локусов более чем достаточно для дифференциации исследуемых индивидуальных генотипов зерен, которые отличались уникальным сочетанием полиморфных амплифицированных фрагментов различного молекулярного веса. Размеры амплифицированных ПЦР фрагментов варьировали от 150 до 4000 п.н. Размеры и количество амплифицированных фрагментов, характер их распределения в спектрах различных видов бобовых, является индивидуальным и неповторимым для каждого генотипа (рис. 9). Внутривидовой полиморфизм (между индивидуальными семенами), выявляемый с использованием PBS праймеров может достигать 40—60%. Это очень высокий показатель внутривидовой изменчивости, так как количество полиморфных полос достигало до 50% из общего числа полос для восьми исследуемых зёрен, при которых не было выявлено одинаковых генотипа. Таким образом, семена из коллекции кургана № 2, показывали высокую степень гетерогенности при использовании PBS праймеров, характерную для неселекционных форм растений.

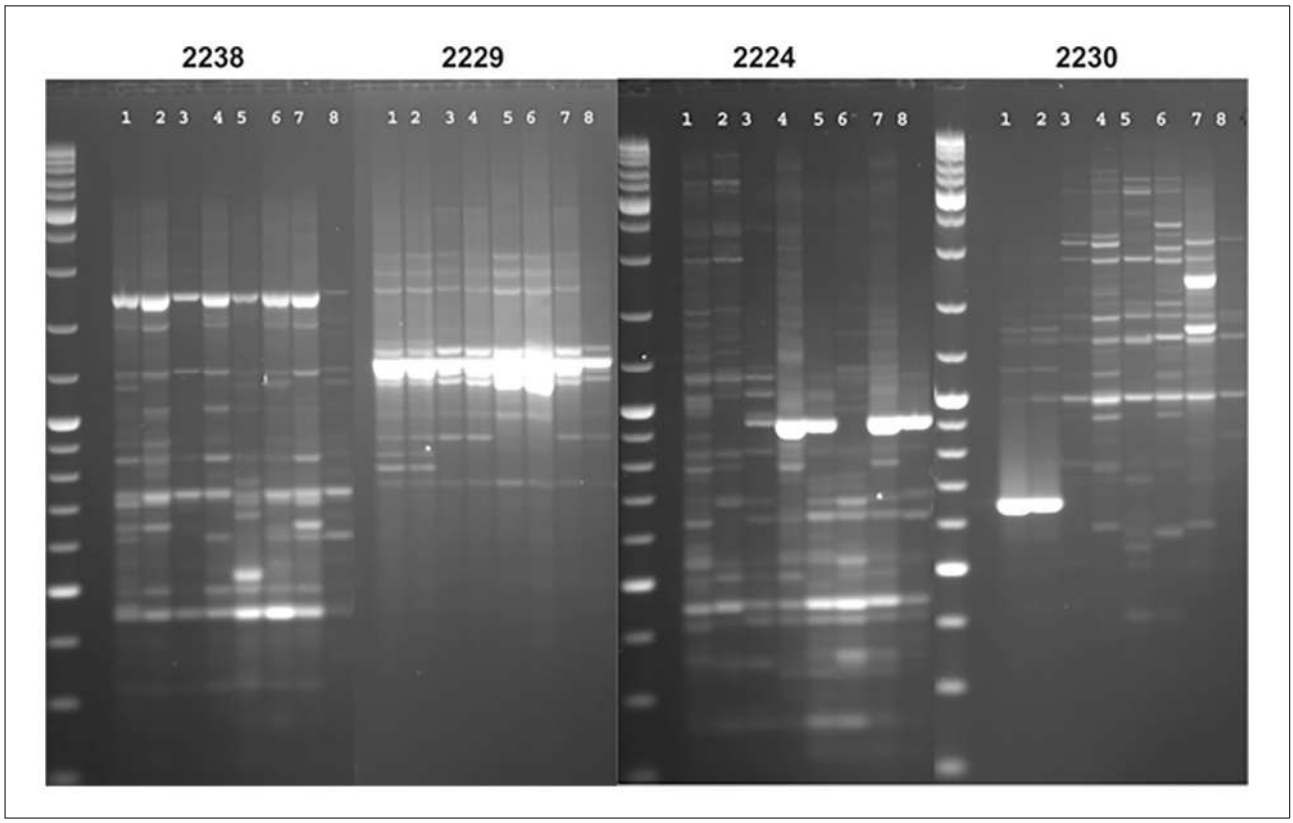

Рис. 9. ДНК фингерпринт индивидуальных зёрен горца *(Polygonum)* (1—8) с использованием универсальных PBS ПЦР праймерами из кургана № 2 мог. Каратобе.

Fig. 9. DNA fingerprinting of individual knotweed *(Polygonum)* seeds (1—8) with universal PBS PCR primers, Kurgan No. 2, Karatobe burial site.

Хромато-тандемная масс спектрометрия (LC-MS/MS) запасных белков зерна

Для определения видовой принадлежности зёрен, помимо применения секвенирования 18S рРНК генов был также использован метод хромато-тандемной масс спектрометрии. На рисунке 10 показан электрофорез в ПАА геле тотальных белков из семян растений. Были вырезаны две полосы из геля, фрагмент, соответствующий массе ~39 кДа, который идентифицировали как белок 13S globulin seed storage protein из вида *Fagopyrum esculentum* (пептиды LTASEPSR и LTASEPSRR имеющие величины уровня достоверности Scores 36 и 47 соответственно). Второй фрагмент, соответствующий массе ~25 кДа, также идентифицирован как белок 13S globulin seed storage protein из *Fagopyrum esculentum* (пептид NAILGPR имеющий величину уровня достоверности Scores 35). Величины уровня достоверности были низкими, но они были выше минимального порога, составляющего величину 32. Поскольку молекулярная масса белка составляет 64.5 кДа и оказалась равной сумме масс этих двух бэндов, мы предполагаем, что образец содержал продукты деградации запасного белка (13S globulin seed storage protein). Повторное сравнение данных эксперимента с уже расширенной базой белков (в варианте SwissProt 2016_10 на 6646 сиквенсов больше, чем в старой версии 2014_08) показал идентичный результат.

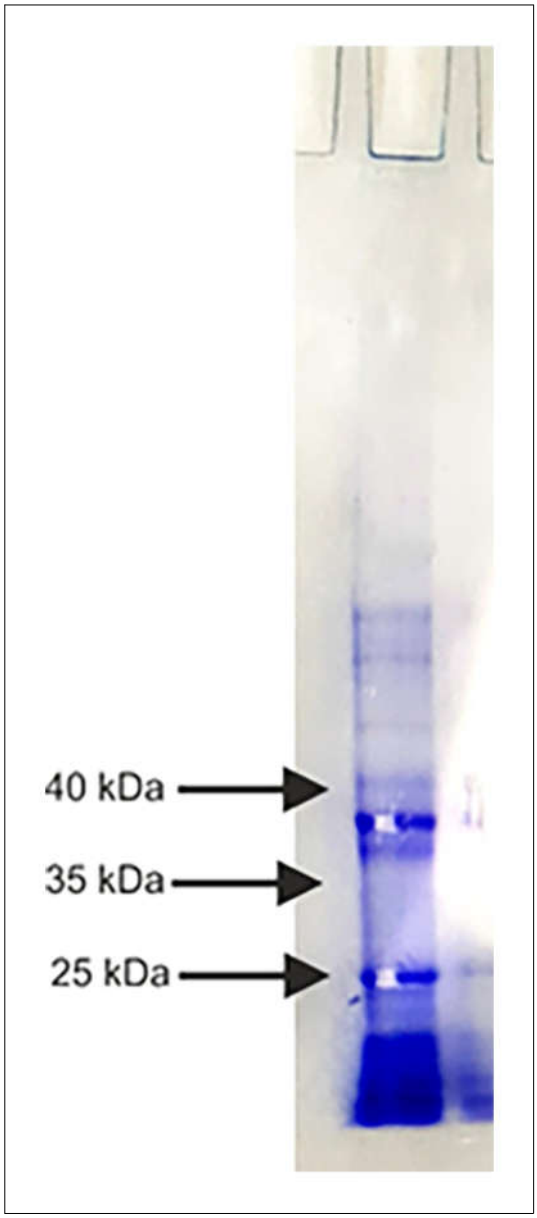

Рис. 10. Электрофорез белков зерна. Показаны участки вырезания из геля двух кусочка из геля, соответствующих массам ~39 кДа и 25 кДа.

Fig. 10. Electrophoresis of grain proteins. Sections corresponding to ~39 kDa and 25 kDa were excised from the gel.

Заключение

Результаты проведённых исследований показывают, полученные семена неизвестного происхождения принадлежат горцу птичьему *(Polygonum aviculare* L.*)*. Данные были получены с использованием нескольких подходов: первый — секвенирование универсальных последовательностей рибосомальных генов (18S и 23S), второй — использование масс-спектрометрического анализа запасных белков из зёрен. Выделение тотальной ДНК и РНК показывает, что семена отлично сохранились, так как качество РНК идеальное. Поэтому, семена были подготовлены для культуры *in vitro* для получения полноценного растения. Получены жизнеспособные регенераты из семян. Некоторые дали полноценное растение спустя некоторое время культивирования в культуре *in vitro*

с гормонами роста. В результате получено несколько жизнеспособных растений, которые дали корни, и растение выглядело как современный горец птичий.

Проведён молекулярно-генетический полиморфизм индивидуальных семян горца. Эффективное выделение ДНК проведено с использованием кислого CTAB буфера. Качество ДНК позволило проведение ДНК-фингерпритного анализа индивидуальных семян с использованием универсальных к ретротранспозонам PBS праймеров. Внутривидовой полиморфизм (между индивидуальными семенами), выявляемый с использованием PBS праймеров достигал до 40—60%. Это очень высокий показатель внутривидовой изменчивости для восьми исследуемых зёрен, у которых не было выявлено двух одинаковых генотипа. Таким образом, семена из коллекции кургана № 2 показывали высокую степень гетерогенности при использовании PBS праймеров, характерную для неселекционных форм растений.

Вместе с тем результаты радиоуглеродного анализа показали, что семена были занесены в погребальную камеру в середине XX в. Тем не менее находка имеет важное значение в археологической науке, так как впервые в Казахстане семена из погребального памятника исследованы на молекулярно-генетическом уровне и успешно проращены в лабораторных условиях. Этот пример подчёркивает необходимость по возможности отбирать несколько различных образцов из одного кургана при проведении радиоуглеродного анализа. Такой подход позволяет более точно определить хронологические рамки памятника и избежать преждевременных выводов о ряде элементов погребальной обрядности в древнем обществе.

Таблица 1. **Мог. Каратобе. Результаты радиоуглеродного анализа**

№	Lab code	Monument	^{14}C BP	Sample	Calibrating date (1σ)	Calibrating date (2σ)
1	FTMCRY88 - 11	Karatobe Kurgan 2	2284±26	bone	68.3% probability 396 (57.2%) 361calBC 272 (6.2%) 265calBC 241 (4.8%) 236calBC	95.4% probability 401 (60.4%) 352 calBC 289 (33,6%) 227calBC 220 (1,5%) 210 calBC
2	FTMCRY88 - 12	Karatobe Kurgan 2	-297±26	seeds	68.3% probability 1956 (68.3%) calAD	95.4 probability 1955 (1.2%) 1955calAD 1956 (74.5%) 1957calAD 2008 (6.6%) 2008calAD 2009 (13.1%) 2009calAD

Таблица 2. **Всхожесть семян в зависимости от способа стерилизации**

Вариант стерилизации	Количество семян	Количество инфицированных семян, шт.	Количество всхожих семян, шт.	Количество проростков, шт.
№1	5	100%	-	-
№2	10	-	1	1
№3	10	-	5	3

Таблица 3. **Последовательности и характеристика используемых универсальных праймеров для генов 18S рибосомальной РНК и 23S**

ID	Последовательность	Положение 18S-23S (KY860924); 18S rRNA (HG965134)	Tm (°C)	Информация
2943	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	1255→1276	51.3	ITS5
2944	TCCTCCGCTTATTGATATGC	1968←1987	51.4	ITS4
2949	AACCTTATCATTTAGAGGAAGG	1239→1260	48.9	ITS1
3173	GGAGCCTGAGAAACGGCTACCAC	1004→1026	61.6	18S rRNA (HG965134)
3174	ATACGAATGCCCCCGACTGTCC	1483←1504	60.4	

Таблица 4. **Последовательности и характеристика используемых 18-мерных PBS праймеров**

ID	Последовательность (5'-3')	T_m (°C)	ГЦ-состав (%)
2222	ACTTGGATGCCGATACCA	51.9	50.0
2224	ATCCTGGCAATGGAACCA	52.3	50.0
2229	CGACCTGTTCTGATACCA	49.9	50.0
2230	TCTAGGCGTCTGATACCA	50.3	50.0
2232	AGAGAGGCTCGGATACCA	52.6	55.6
2238	ACCTAGCTCATGATGCCA	51.5	50.0
2239	ACCTAGGCTCGGATGCCA	56.2	61.1
2399	AAACTGGCAACGGCGCCA	59.7	61.1

Литература

Айткали и др. 2014: Айткали А.К., Жунисханов А.С., Каирмагамбетов А.М., Ахметов М.Г., Рахманкулов Е.Ж. 2014. Предварительные результаты исследования могильника Каратобе в микроархеологическом районе Кокентау. В: Бисембаев А.А. (научн. ред.). *Кадырбаевские чтения—2014. Материалы IV Международной научной конференции.* Актобе: ГККБ «Актюбинский областной историко-краеведческий музей», 151—160.

Байтанаев Б.А. 2019. Курган Урджар: история открытия и некоторые итоги исследования. *Археология Казахстана (Қазақстан археологиясы)* 2 (4), 9—22.

Барсукова Е.Н. 2016. *Способ размножения гречихи in vitro*. Патент № 2538167. Выдан 08.08.2016.

Исин и др. 2018: Исин А., Жунисханов А., Айткали А., Рахманкулов Е. 2025. Археологические памятники Семейтау и Кокентау в Восточном Казахстане. В: Ахметов Д. (ред.). *Алтай — түркі әлемінің алтын бесігі.* Өскемен: ШҚО әкімдігі, 98—112.

Калашникова Е.А. 2004. *Лабораторный практикум по биотехнологии*. Москва: РГАУ—МСХА.

Способ получения стерильных проростков родиолы розовой (Rhodiola rosea L.*) для эксплантирования в культуру in vitro*. Патент на полезную модель № 1912. Выдан 16.05.2016.

Aitkali and etc. 2023: Aitkali A., Zhuniskhanov A., Rakhmankulov E. 2023. Investigation of the burial mounds of early nomads of the Irtysh River region of Semey. *Kazakhstan Archeology* 3(21), 82—94.

Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15 (3), 473—497.

Total DNA isolation protocol. PrimerDigital. URL: https://primerdigital.com/dna.html (дата обращения 16.09.2025).

References

Aitkali et al. 2014: Aitkali, A.K., Zhuniskhanov, A.S., Kairmagambetov, A.M., Akhmetov, M.G., Rakhmankulov, E.Zh. 2014. In: Bissembaev, A.A. (ed.). Kadyrbaevskie chteniya—2024 (*Kadyrbaev Readings—2014)*. Aktobe: State Budgetary Clinical Hospital "Aktobe Regional Museum of History and Local Lore", 151—160 (in Russian).

Baitanaev, B.A. 2019. In *Kazakstan arheologiyasy (Kazakhstan Archeology)* 2 (4), 9—22 (in Russian).

Barsukova, E.N. 2016. *Sposob razmnozheniya grechihi in vitro*. Patent № 2538167. Vydan 08.08.2016 *(Method of buckwheat propagation in vitro.* Patent No. 2538167. Issued 08.08.2016) (in Russian).

Isin et al. 2018: Isin, A., Zhuniskhanov, A., Aitkali, A., Rakhmankulov, E. 2018. In: Ahmetov, D. (ed.). *Altai — turki aleminin altyn besigi (Altai is the golden cradle of the Turkic world).* Oskemen: East Kazakhstan Region Akimat, 98—112 (in Russian).

Kalashnikova E.A. 2004. *Laboratornyj praktikum po biotekhnologii (Laboratory workshop on biotechnology*). Moscow: Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy.

Sposob polucheniya sterilnyh prorostkov rodioly rozovoj (Rhodiola rosea L.) dlya eksplantirovaniya v kulturu in vitro. Patent na poleznuyu model № 1912. Vydan 16.05.2016. (*Method for obtaining sterile seedlings of Rhodiola rosea (Rhodiola rosea L.) for explantation into in vitro culture.* Utility model patent No. 1912. Issued 16.05.2016) (in Russian).

Aitkali et al. 2023: Aitkali, A., Zhuniskhanov, A., Rakhmankulov, E. 2023. In *Kazakstan arheologiyasy (Kazakhstan Archeology)* 3 (21), 82—94.

Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15 (3), 473—497.

Total DNA isolation protocol. *PrimerDigital.* Available at: https://primerdigital.com/dna.html (accessed 16.09.2025).