

**Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
w Poznaniu**

Anna Juras

**Etnogeneza Słowian w świetle
badań kopalnego DNA**

**Praca doktorska wykonana
w Zakładzie Biologii Ewolucyjnej Człowieka
Instytutu Antropologii UAM w Poznaniu
pod kierunkiem Prof. dr hab. Janusza Piontka**



Poznań 2012

Składam serdeczne podziękowania Panu Prof. dr hab. Januszowi Piontkowi za wsparcie, pomoc oraz życzliwość w trakcie realizacji niniejszej pracy.

Szczególne wyrazy wdzięczności kieruję pod adresem Pani dr Mirosławy Dabert, dziękując za serdeczność, zaangażowanie i ogromną pomoc merytoryczną.

Składam także serdeczne podziękowania Prof. Eske Willerslovi, Prof. Tomowi Gilbertowi, dr Helenie Malmström, dr Maanasie Raghavan za możliwość realizacji badań w GeoGenetic Center na Uniwersytecie Kopenhaskim oraz za wsparcie merytoryczne i praktyczne.

Pragnę też gorąco podziękować dr Ene Metspalu i dr Lenie Kushniarevich z Uniwersytetu w Tartu w Estonii oraz dr Jakubowi Kosickiemu z Wydziału Biologii UAM za pomoc w opracowywaniu analiz statystycznych.

Dziękuję również swoim Bliskim w szczególności Mężowi i Dzieciom za cierpliwość, wyrozumiałość oraz wsparcie.

SPIS TREŚCI

Streszczenie	6
Summary	7
Rozdział I. Wstęp	8
1. Dotychczasowe badania etnogenezy Słowian	9
1.1. Koncepcje i interpretacje archeologiczne.....	9
1.2. Źródła historiograficzne.....	14
1.3. Analizy językoznawcze.....	16
1.4. Badania antropologiczne.....	17
1.5. Współpraca interdyscyplinarna.....	21
2. Kopalny DNA	22
2.1. Historia badań kopalnego DNA.....	24
2.2. Charakterystyka cząsteczek kopalnego DNA.....	24
2.2.1. Degradacja i uszkodzenia DNA <i>post-mortem</i>	24
2.2.2. Inhibitory PCR.....	27
2.2.3. Wpływ czynników środowiska na kopalny DNA.....	29
2.3. Źródła kopalnego DNA.....	32
2.4. Kontaminacje egzogennym DNA.....	34
2.5. Warunki i metodyka pracy z kopalnym DNA.....	35
2.6. Weryfikacja autentyczności wyników badań kopalnego DNA.....	40
2.7. Przykłady zastosowań badań kopalnego DNA i nowe możliwości badawcze.....	42
3. Mitochondrialny DNA w analizach populacji ludzkich	45
3.1. Charakterystyka mitochondrialnego DNA.....	45
3.2. System klasyfikacji mitochondrialnego DNA.....	47
3.3. Zastosowanie kopalnego mitochondrialnego DNA w badaniach populacyjnych...	50
4. Pochodzenie Słowian na podstawie badań współczesnego DNA	51
Rozdział II. Cel pracy	54
Rozdział III. Materiały i metody	55
1. Materiały	55
1.1. Materiał szkieletowy z okresu rzymskiego.....	56

1.2. Materiał szkieletowy z okresu średniowiecza.....	57
1.3. Kopalny materiał porównawczy.....	58
1.4. Współczesny materiał porównawczy.....	58
2. Metody.....	59
2.1. Pobieranie i oczyszczanie materiału.....	59
2.2. Izolacja DNA.....	60
2.3. Amplifikacja sekwencji markerowych, klonowanie produktów PCR i sekwencjonowanie.....	61
2.4. Analiza sekwencji.....	64
2.5. Analizy statystyczne.....	64
2.6.1. Analiza wspólnych haplotypów.....	64
2.6.2. Analiza międzypopulacyjnych dystansów genetycznych.....	65
Rozdział IV. Wyniki.....	67
1. Izolacja i amplifikacja kopalnego DNA.....	67
1.1. Skuteczność amplifikacji fragmentów HVR I mitochondrialnego DNA.....	68
1.1.1. Rogowo.....	69
1.1.2. Kowalewko.....	69
1.1.3. Gąski.....	70
1.1.4. Karczyn.....	70
1.1.5. Cedynia.....	71
1.1.6. Lednica.....	72
2. Klonowanie i sekwencjonowanie klonów.....	73
3. Analiza sekwencji.....	75
4. Analiza typów uszkodzeń DNA.....	77
5. Analiza polimorfizmu pojedynczych nukleotydów w regionie kodującym mitochondrialnego DNA.....	78
6. Zróżnicowanie mitochondrialnego DNA w badanych populacjach.....	80
7. Analizy statystyczne.....	82
7.1. Opis statystyczny populacji.....	82
7.2. Analiza wspólnych haplotypów.....	88
7.3. Analiza zróżnicowania międzypopulacyjnego.....	92
Rozdział V. Dyskusja.....	97

1. Skuteczność izolacji DNA.....	97
2. Międzypopulacyjne odległości genetyczne w ujęciu porównawczym.....	98
3. Zróznicowanie populacji z okresu rzymskiego i średniowiecza w ujęciu interdyscyplinarnym.....	100
3.1. Analiza wspólnych nieinformatywnych haplotypów.....	101
3.2. Analiza wspólnych informatywnych haplotypów.....	102
3.3. Rzadkie haplogrupy.....	104
3.4. Haplotypy unikatowe.....	106
Rozdział VI. Wnioski.....	109
Wykaz skrótów.....	110
Literatura.....	111
Załączniki.....	136

Streszczenie

Od wielu lat przedstawiciele nauk archeologicznych, antropologicznych, historycznych, językoznawczych, a od niedawna także genetycznych, próbują odpowiedzieć na pytanie gdzie, kiedy i w jaki sposób doszło do wyodrębnienia się etnosu Słowian i ich rozprzestrzenienia na szerokie obszary Europy. Ze względu na brak jednoznacznej odpowiedzi na to pytanie, w ramach niniejszej pracy, przeprowadzono badania kopalnego DNA. Do badań przeznaczono 72 osobniki pochodzące z populacji z okresu rzymskiego oraz średniowiecza, z terenów obecnej Polski. Dla 43 osobników, w tym 23 z okresu rzymskiego i 20 ze średniowiecza, otrzymano powtarzalne sekwencje fragmentów regionu HVR I mitochondrialnego DNA. Na podstawie mutacji regionu HVR I oraz SNP regionu kodującego wyznaczano przynależność haplogrupową każdego z badanych osobników. Uzyskany materiał genetyczny, wraz z kopalnym i współczesnym materiałem porównawczym został wykorzystany w analizach wspólnych haplotypów oraz w badaniach międzypopulacyjnych dystansów genetycznych zobrazowanych graficznie poprzez skalowanie wielowymiarowe. Na podstawie uzyskanych danych została podjęta próba oceny istnienia kontynuacji lub dyskontynuacji genetycznej na przełomie okresu rzymskiego i średniowiecza. Z jednej strony różnice na poziomie genetycznym, a także stosunkowo duże odległości genetyczne pomiędzy badanymi populacjami oraz istotna liczba informatywnych haplotypów wspólnych dla średniowiecza oraz Białorusi, Ukrainy i Bułgarii, mogą przemawiać za brakiem ciągłości genetycznej na przełomie okresu rzymskiego i średniowiecza. Z drugiej jednak strony największa liczba informatywnych haplotypów mtDNA wspólnie dzielonych pomiędzy populacją z okresu rzymskiego i populacją współczesną z Polski, a także obecność podhaplogrupy N1a1a2, mogą potwierdzać, że pewne linie wykazywały ciągłość genetyczną przynajmniej od okresu rzymskiego lub nawet neolitu, na terenach obecnej Polski. Uzyskane wyniki są pierwszymi, jakie otrzymano dla populacji z okresu rzymskiego i średniowiecza z terenów współczesnej Polski i są one traktowane, jako początkowy wkład w budowanie historii genetycznej Słowian.

Summary

For many years the origin of the Slavs has been the subject-matter in archaeology, anthropology, history, linguistics and recently also modern human population genetics. By now there is no unambiguous answer to a question where, when and in what way the Slavs originated. For the purposes of this dissertation, the analysis of ancient human mitochondrial DNA was applied. The ancient DNA was isolated from 72 specimens which came from Iron-Age and medieval graveyards from the area of current Poland. Ancient mtDNA was extracted from two teeth from each individual and reproducible sequence results were obtained for 20 medieval and 23 Iron-Age specimens. On the basis of HVR I mtDNA mutation motifs and coding region SNPs each specimen was assigned to a mitochondrial haplogroup. The obtained results were used together with other ancient and modern populations to analyse shared haplotypes and population genetic distances illustrated by multidimensional scaling plots (MDS). The differences on genetic level and quite high genetic distances (F_{ST}) between medieval and Iron-Age populations as well as significant number of shared informative haplotypes with Belarus, Ukraine and Bulgaria may evidence genetic discontinuity between medieval and Iron Ages. From the other side, the highest number of shared informative haplotypes between Iron-Age and extant Polish population as well as the presence of subhaplogroup N1a1a2, can confirm that some genetic lines show continuity at least from Iron Age or even Neolithic in the areas of present day Poland. The results obtained in this work are considered to be the first ancient contribution in genetic history of the Slavs.

Rozdział I. Wstęp

Populacje słowiańskie zamieszkują obecnie trzynaście państw, zajmujących znaczne obszary Europy środkowej, wschodniej, południowej oraz północną część Azji. Wielomilionowe populacje łączy nie tylko wspólna rodzina języków słowiańskich, ale także wspólna historia i pochodzenie, które do chwili obecnej nie zostały w pełni poznane. Od ponad stu lat przedstawiciele nauk humanistycznych poprzez analizę historycznych tekstów, języka i kultury materialnej próbują odpowiedzieć na pytanie gdzie, kiedy i w jaki sposób doszło do wyodrębnienia się etnosu Słowian, jak również ich rozprzestrzenienia na szerokie obszary Europy. Pomimo przeprowadzenia wielu badań i analiz, nie udało się uzyskać jednoznacznej odpowiedzi na te pytania.

Rozwój biologii molekularnej i genetyki populacyjnej umożliwił dostęp nowych metod, dzięki którym można uzyskać informacje na temat pochodzenia i migracji populacji. Metody oparte na analizie zróżnicowania haploidalnych markerów współczesnego mitochondrialnego DNA i chromosomu Y, dostarczyły w ostatniej dekadzie wielu istotnych danych, także w zakresie etnogenezy Słowian (Grzybowski i in. 2007; Rębała i in. 2007; Małyarchuk i in. 2006, 2008; Woźniak i in. 2010). Niezwykle interesujący obszar biologii molekularnej, umożliwiający bezpośredni dostęp do materiałów genetycznych populacji historycznych i prehistorycznych, stanowią badania kopalnego DNA. Na świecie istnieje wiele ośrodków naukowych, które specjalizują się w badaniach kopalnych materiałów genetycznych. Zajmują się one nie tylko realizacją konkretnych projektów naukowych z zakresu ewolucji człowieka, migracji populacji czy badania wymarłych gatunków zwierząt, ale także prowadzą intensywne badania nad opracowaniem metodyk pozwalających na otrzymanie autentycznych rezultatów i zwiększeniem rozdzielczości analiz kopalnego DNA. W Polsce tylko nieliczne ośrodki zajmują się tą tematyką, a badania dopiero zaczynają się rozwijać (Witas 2007; Juras 2008; Bogdanowicz i in. 2009; Stanković i in. 2011).

Niniejsza praca jest pierwszą w zakresie badań etnogenezy Słowian, w której wykorzystano analizy polimorfizmu kopalnego mitochondrialnego DNA. Ze względu na brak kopalnych danych porównawczych z terenów Polski, jak również z innych miejsc zamieszkałych przez populacje słowiańskie, praca ta nabiera charakteru

innowacyjnego i stanowi pewien wstęp do badań, które w przyszłości będą mogły być prowadzone na znacznie większą skalę.

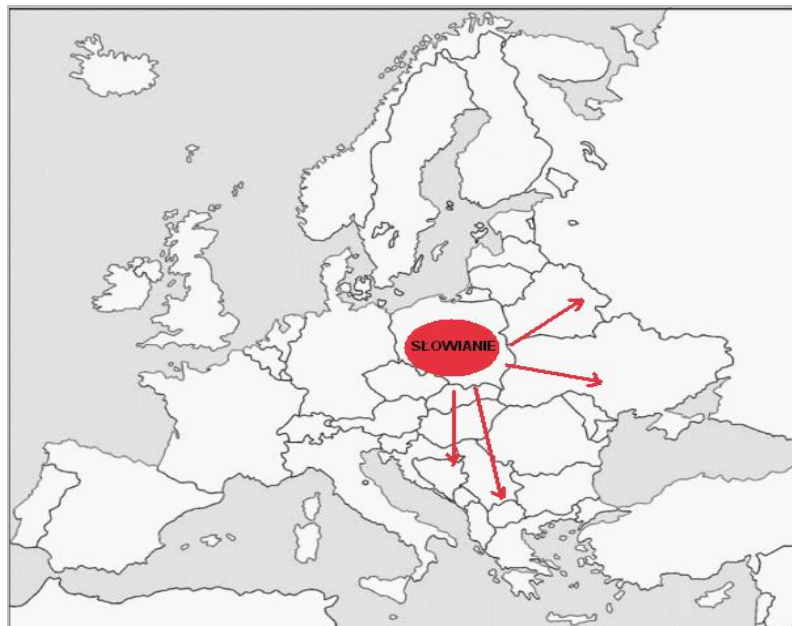
1. Dotychczasowe badania etnogenezy Słowian

1.1. Koncepcje i interpretacje archeologiczne

W archeologii rekonstrukcje etnogenezy opierają się przede wszystkim na analizie zmienności w czasie i przestrzeni przedmiotowych wytworów kulturowych, a zatem kultury materialnej. Według podejścia tradycyjnego „*badanie miejsca pochodzenia etnosów, to poszukiwanie maksymalnej jednolitości wytworów człowieka, czyli maksymalnej jednolitości kultury archeologicznej*” (Mamzer 2004). Zgodnie z metodą archeologiczno-osadniczą zapoczątkowaną przez Gustafa Kossinę, mającą swoje źródła w szkole kulturowo-historycznej, archeologiczne obszary kulturowe, wykreślone są zasięgiem podobieństw wytworów materialnych i pokrywają się we wszystkich czasach z danymi ludami, czyli grupami etnicznymi. Powyższa metoda stanowi podstawę migracjonizmu, poglądu według którego kultura materialna wspólnoty etnicznej jest cechą stałą i niezmienną, a każda jej radykalna zmiana, spowodowana dyfuzją lub migracją obcej etnicznie ludności, jest utożsamiana z jednoczesną zmianą etniczną (Mamzer 2001).

W przeciwieństwie do tradycyjnego podejścia, nowe tendencje w archeologii mówią, że relacje między kulturą archeologiczną, a etnosem czyli ludem nie są znane, ponieważ kultura archeologiczna jest konstruktem archeologów, czyli sposobem, w jaki porządkowany jest materiał źródłowy (Mamzer 2004). Według Mamzera (2001: 9) opierającego się na ustaleniach Gadamera (1993) i Ricoeura (1989): „*badacz nie jest w stanie wnikać w psychikę badanych przez siebie społeczeństw minionych, tak by było możliwe odtworzenie ich interpretacji rzeczywistości. Trzeba przyjąć, że wytwory kultury minionej, które badamy są rezultatem naszej własnej interpretacji przez pryzmat kultury, w której uczestniczymy*”. Zgodnie z nowymi perspektywami badawczymi zmiana kultury materialnej nie koniecznie musi oznaczać zmianę ludności i analogicznie ciągłość kulturowa, nie musi być związana z ciągłością etniczną (Mamzer 2001).

Na bazie prowadzonych od wielu lat badań kultury materialnej, zostały wysunięte dwie skrajne hipotezy dotyczące pochodzenia Słowian. Pierwsza z nich zwana jest teorią autochtoniczną i umieszcza pierwotną siedzibę Słowian w dorzeczu Odry i Wisły, a także przyjmuje, że w okresie wczesnego średniowiecza (na przełomie V i VI wieku n.e.) grupy te zajęły tereny Europy wschodniej oraz duże obszary Europy południowej (Bałkany) (Kostrzewski 1961). Zwolennicy powyższej koncepcji, a więc zachodniego usytuowania pierwotnej siedziby Słowian zwani autochtonistami (Kurnatowski 1977, 1992; Leciejewicz 1989, 2002; Brzostowicz 1994; Makiewicz 2001, 2005), popierają obecność kontynuacyjnego charakteru przemian pomiędzy okresem rzymskim i wczesnym średniowieczem oraz wspierają teorię formowania Słowiańszczyzny, przynajmniej od okresu rzymskiego na ziemiach dorzecza Odry i Wisły. Według niektórych badaczy pierwszym ogniwem kultury wczesnosłowiańskiej mogła być kultura przeworska (Buko 2006) zajmująca znaczne obszary Polski środkowo-zachodniej, południowej i w późniejszym okresie również południowo-wschodniej, której czas funkcjonowania przypadął na III w. p.n.e. do V w.n.e.

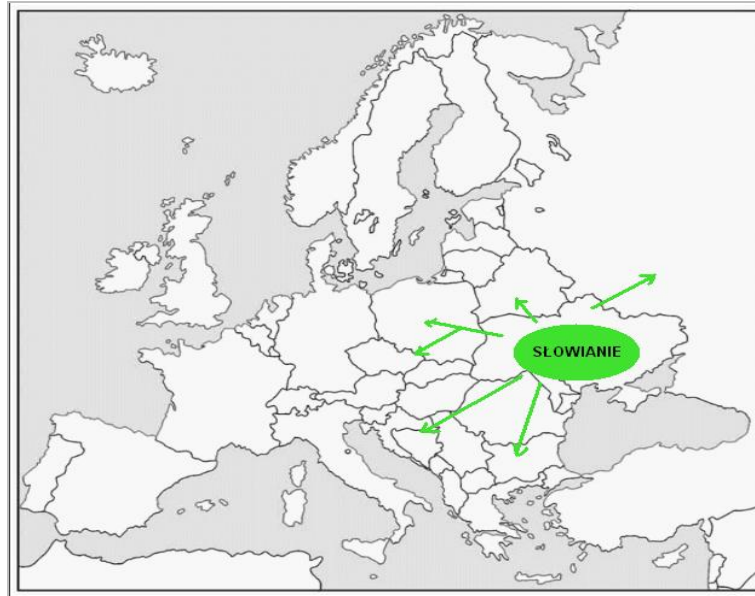


Rycina 1. Pochodzenie Słowian na podstawie teorii autochtonicznej; strzałkami zaznaczono kierunki migracji.

Kostrzewski (1961) jako jeden z pierwszych zwolenników teorii autochtonicznej, poszukiwał etnosu prasłowiańskiego jeszcze wcześniej, czyli w

początkach kultury łużyckiej, datowanej na III okres epoki brązu (1300-1100 p.n.e), która swym zasięgiem obejmowała większość obszarów współczesnej Polski. Z kolei kultura łużycka miała wywodzić się z kultury przedłużyckiej, w której duży udział miały stanowić elementy sąsiadującej kultury trzcinieckiej z wczesnej epoki brązu (1900-1000 p.n.e.). Jażdżewski (1981) uważał, idąc jeszcze dalej, że kultura trzciniecka jest kontynuacją kultur późnoneolitycznych i wywodzi się z grupy kultur ceramiki sznurowej, datowanych na III tysiąclecie p.n.e.

Druga archeologiczna hipoteza nazywana allochtoniczną, zakłada że Słowianie pochodzą z małego obszaru o wielkości ok. 300 tys. km², który zlokalizowany był w obszarze rzek Dniepr i Prypeć. Mieli oni z niego ekspandować w V i VI w. n.e. na obszary Europy środkowej i południowej (Godłowski 2000). Zwolennicy tej hipotezy (Mączyńska 1996; Parczewski 1988, 1998, 2002; Dulinicz 2001; Kokowski 2002) przyjmują również, że w okresie rzymskim dorzecze Odry i Wisły miało być zamieszkane przez plemiona germańskie wywodzące się ze Skandynawii, identyfikowane z kulturą przeworską i kulturą wielbarską. Kultura wielbarska obejmowała obszar współczesnej północnej i wschodniej Polski oraz zachodnią Ukrainę. Okres jej funkcjonowania przypada na I do V w. n.e. Zarówno kultura przeworska jak i wielbarska, w okresie wędrówek ludów miały przenieść się w kierunku zachodniej Europy. Zgodnie z teorią allochtoniczną dorzecze Odry i Wisły miało być przez pewien czas niezasiedlone, a z początkiem wczesnego średniowiecza miały przybywać tu liczne grupy Słowian pochodzące z Europy wschodniej (Godłowski 1979). Według allochtonistów pierwotną kolebką Słowian była kultura kijowska (ukształtowana na bazie kultury czerniachowskiej), która trwała od III-IV w. n.e. i obejmowała obszar dorzecza środkowego i górnego Dniepru. Kultura kijowska poprzez wykazywanie ciągłości wyrobów kulturowych miała być poprzedniczką kultury archeologicznej praskiej, zlokalizowanej w Europie środkowej, jak również pieńkowskiej umiejscowionej w dorzeczu Dniepru i Prypeci oraz kołoczyńskiej znajdującej się na północ od kultury Pieńkowskiej, których początki obserwowane są na wschodzie w V w n.e.



Rycina 2. Pochodzenie Słowian zgodnie z teorią allochtoniczną; strzałkami zaznaczono kierunki migracji.

Wielu archeologów utożsamia kulturę słowiańską z tak zwaną ceramiką typu „praskiego”, która znajdowana była na osadach wczesnosłowiańskich. Ceramika „praska” w przeciwieństwie do bogato zdobionej ceramiki z terenów wpływów rzymskich była znacznie uboższa w swym wykonaniu, bowiem stanowiły ją naczynia gliniane, ręcznie lepiące i nieozdobione. Jej rozprzestrzenienie ze wschodu na zachód miało być jednym z dowodów na wschodnie pochodzenie Słowian. Jednak jak podaje Curta (2001) ceramika „praska” niekoniecznie mogła reprezentować kulturę Słowian, ponieważ jej występowanie na szerokim obszarze wskazuje na możliwość jej użytkowania także przez inne ludy.

Aspekty metodologiczne archeologii kulturowo-historycznej czyli podejścia tradycyjnego widoczne są przede wszystkim w badaniach zwolenników koncepcji allochtonicznej, którzy uważają, że te same wytwory materialne musiały zostać wykonane przez tych samych wytwórców. I w związku z tym, jeśli kultura materialna wczesnosłowiańska różniła się od kultury materialnej okresu rzymskiego, to wytwórcami kultur musiały być różne grupy etniczne. Z kolei jak uważa Mamzer (2001), autochtoniści z jednej strony traktują podobieństwa w kulturze materialnej jako rezultat funkcjonowania grupy te podobieństwa wytwarzającej, a z drugiej strony znaczna różnica w sposobie wyrobu i ozdabianiu naczyń i innych przedmiotów użytkowych, nie stanowi dla nich argumentu na rzecz odrębności etnicznej.

Przykładem takiej niekonsekwencji miało być szukanie śladów kultury słowiańskiej w kulturze łużyckiej.

Pośród badaczy wczesnej słowiańszczyzny jedyną bezsporną tezę pozostaje stwierdzenie, że kultura archeologiczna z okresu wpływów rzymskich różniła się od kultury archeologicznej wczesnego średniowiecza. Zatem problem dotyczy głównie tego, czy te różnice były spowodowane konsekwentną ciągłą zmianą – kontynuacją, czy też miały charakter nagłej, przedzielonej luką czasową zmiany czyli dyskontynuacji i czy pociągały za sobą przemiany populacyjne i społeczne, czy też nie. Kwestią sporną pozostaje również głoszone przez allochtonistów stwierdzenie o „gwałtownej ekspansji” Słowian w początkach V/VI w.n.e, i ogromnym przyroście demograficznym. Przeciwnicy allochtonistów uważają, że jest to wizja mało prawdopodobna, co potwierdzają również przeprowadzone badania demograficzne sugerujące obecność małego demograficznego potencjału wyjściowego populacji Słowian (Barford 2001; Piontek 2006).

Według zwolenników dyskontynuacyjnego charakteru przemian, na przełomie okresu rzymskiego i wczesnego średniowiecza istniał tzw. hiatus absolutny, który oznacza brak znalezisk kultury materialnej, co równoznaczne jest z brakiem egzystencji ludzkiej (Żak 1985). Według allochtonistów takie zjawisko zwane również „pustką osadniczą” miało miejsce w momencie gdy tereny zamieszkałe w okresie rzymskim przez Germanów, w IV w.n.e. zostały przez nich opuszczone. Ziemie te przez pewien okres czasu miały być niezamieszkałe i dopiero w V i VI wieku przybywali tam Słowianie ze wschodu. Kwestia „pustki osadniczej” i jej istnienia, jest coraz częściej podważana przez archeologów głównie ze względu na brak przebadania dostatecznej ilości stanowisk archeologicznych. Makiewicz (2001) przedstawił dowody, które mogą świadczyć o istnieniu ciągłości zaludnienia, a więc barku pustki osadniczej. Prowadząc badania na stanowiskach archeologicznych w Wielkopolsce, datowanych na okres wędrówek ludów, odkrył istnienie przeworskich naczyń zasobowych kształtu jajowatego, które są w znacznym stopniu podobne do ceramiki typu „praskiego”. Na tej podstawie stwierdził, że w ostatniej fazie kultury przeworskiej nastąpiło znaczne zubożenie i ujednoczenie ceramiki przeworskiej i jej upodobnienie do ceramiki „praskiej”, co z kolei może być argumentem na rzecz ciągłości zaludnienia.

Oprócz skrajnych kontynuacyjno - dyskontynuacyjnych poglądów, istnieje również założenie o możliwości istnienia tzw. hiatusu relatywnego, który dopuszczał

istnienie stref - regionów kontynuacji czyli braku hiatusu oraz regionów dyskontynuacji czyli obecności hiatusu. Przykładem jest koncepcja etnicznej szachownicy Hensla (1991), według której Słowianie i Germanie w okresie wpływów rzymskich mogli współegzystować w tych samych kręgach kulturowych.

Trwający od ponad stu lat spór autochtonistów i allochtonistów, często uwarunkowany był czynnikami politycznymi i ideologicznymi, szczególnie w XX wieku. W czasach hitlerowskich archeolodzy niemieccy często podkreślali dowody świadczące o allochtonicznym pochodzeniu Słowian, z kolei po II Wojnie Światowej w znaczącym stopniu przeważały koncepcje autochtoniczne (Urbańczyk 2006). W latach 90 XX w. i po 2000 roku odbywały się liczne konferencje i dyskusje poświęcone Słowianom, publikowane były także teksty omawiające różne aspekty badań nad wczesną Słowiańszczyzną. Według Urbańczyka (2006) obecne zróżnicowanie opinii archeologów na temat pochodzenia Słowian wykracza poza prosty podział na allochtonistów i autochtonistów. A zatem istnieją badacze, którzy uważają, że korzenie Słowian znajdują się w epoce brązu, są także archeolodzy, którzy opowiadają się za powolnym formowaniem się Słowiańszczyzny w I tysiącleciu n.e. na ziemiach polskich, z kolei przeciwni kontynuacji kulturowej i demograficznej, są ci, którzy uważają Słowian za populację, która zasiedliła ziemię opuszczoną wcześniej przez ludy germańskie, a jeszcze inni wskazują na materialne dowody kontynuacji między kulturą przeworską, a kulturą wczesnosłowiańską.

1.2. Źródła historiograficzne

Różne koncepcje dotyczące pochodzenia Słowian mogą wynikać nie tylko z różnej interpretacji archeologicznej, ale także z różnej interpretacji źródeł historiograficznych. Mała liczba źródeł pisanych, a także ich fragmentaryczność i subiektywny sposób interpretacji sprawiają, że nie jesteśmy w stanie dokładnie określić czasu i miejsca wyodrębnienia się Słowian. Najstarsze wczesnośredniowieczne źródła historiograficzne pochodzą z VI-VII w n.e. (Tyszkiewicz 1994), natomiast najstarsze teksty antyczne, w których poszukuje się Słowian pochodzą nawet z V w p.n.e. i są one autorstwa m.in. Tacyta, Ptolemeusza, Strabona czy Herodota z Heraklitu. Z VI wieku n.e. pochodzą istotne dla historyków dzieła Jordanesa i Prokopa z Cezarei. Pierwszy z nich napisał słynną *Geticę*, w której

opisuje losy Gotów i Gepidów. W źródle tym Jordanes określa obszar „Scytii” leżącej na wschód od „Germanii” zasiedlonej przez Wenedów/Wenetów nazywanych także Sklawenami i Antami, którzy utożsamiani są przez wielu historyków ze Słowianami (Curta 2006). Pohl (2006) uważa jednak, że Jordanes nie utożsamiał bezpośrednio Wenetów ze Słowianami, a jedynie twierdził, że Słowianie mogą od nich pochodzić lub też są jedną nazwą pośród mnogich ludów nazywanych ogólnie Wenetami. Również w dziełach Prokopa pojawiły się podobne nazwy, często łączone ze Słowianami jak Sklawinowie i Antowie, a także niespotykana w innych źródłach nazwa Spory (Strzelczyk 2005).

Kolejne źródła pisane pochodzą z VII i VIII wieku i nazywane są anonimem lub Kosmografem z Rawenny. W nich także zawarte są opisy Scytii, lecz sam autor nie potrafi podać jej dokładnej lokalizacji, używa jedynie stwierdzenia iż jest ona położona „około szóstej godziny nocy” (Strzelczyk 2005). Jeszcze innych informacji dostarcza Geograf Bawarski (z IX wieku), który jest jednym z pierwszych źródeł odnoszących się do dziejów wczesnej Słowiańszczyzny. W piśmie tym można znaleźć wzmiankę o kraju zwanym *Zeriuani*, z którego miały pochodzić wszystkie słowiańskie plemiona. Autor nie zamieścił jednak żadnej informacji na temat jego lokalizacji.

Alinei (2003) krytykuje niektórych historyków za złą interpretację źródeł pisanych. Jako przykład podaje opis lokalizacji Wenetów stworzony przez Jordanesa, który opisuje, że zasiedlali oni obszar „od źródeł rzeki Wisły i niewspółmierne obszary”. Alinei (2003) uważa, że tym stwierdzeniem Jordanes nie podaje informacji na temat ich wędrówki na te ziemie, a jedynie stwierdza *statu quo*. Badacz ten podkreśla jednocześnie, że pierwsza wzmianka na temat danej populacji w źródłach pisanych zależy od narodzin pisma, a nie od narodzin ludzi tworzących tą populację.

Barford (2006: 110) z kolei krytykuje archeologów mówiąc, że zbyt często nadużywają źródeł historiograficznych, bo tak naprawdę to: „*źródła pisane stanowią jedynie jeden z rodzajów świadectw historycznych i nie powinny mieć pierwszeństwa przed innymi tylko dlatego, że na pierwszy rzut oka wydają się być „łatwiejsze” czy bardziej zrozumiałe w odczytaniu*”.

1.3. Analizy językoznawcze

Kwestia pochodzenia Słowian rozstrzygana jest także na poziomie badań językoznawczych. Według Barforda (2006) nazwa Słowianie, to grupa, która została utworzona przez językoznawców na podstawie klasyfikacji stosunkowo nowych języków i przeniesiona w przeszłość z uwzględnieniem tego, że nowożytny języki rozwinęły się z innego języka. W tym konkretnym przypadku miało chodzić o wyodrębnienie się języka słowiańskiego z innych grup należących do rodziny języków indo-europejskich. Ta ewolucja języka miała zachodzić w dalekich czasach prehistorycznych, gdzie nie było jeszcze źródeł pisanych i skąd dane archeologiczne nie są na tyle kompletne, aby dawały możliwość prześledzenia tego procesu.

Wielu lingwistów poszukuje tak zwanej praojczyzny Słowian i w tym celu prowadzą swoje prace w kilku obszarach badawczych. Poszukują przede wszystkim miejsc, w których powstały najstarsze słowiańskie nazwy geograficzne w tym głównie nazw rzek. Porównują także pod względem strukturalnym i leksykalnym języki słowiańskie z innymi językami, określają, jakie języki sąsiadowały z językiem słowiańskim i jaki wpływ mogły mieć na jego rozwój. Trzecią płaszczyzną analiz lingwistycznych jest badanie nazw roślin i zwierząt pod względem ich pochodzenia i porównywanie z miejscami, w których w przeszłości występowały te endemiczne gatunki (Barford 2006).

Prowadzone badania podobnie jak analizy archeologiczne czy historyczne nie przyniosły jednoznacznych odpowiedzi na pytanie o pochodzenia Słowian. Gołąb (1992) poszukiwał początków języka słowiańskiego już w I poł. III tysiąclecia p.n.e., uważając, iż w tym czasie protoplaści Słowian tworzyli wraz z przodkami plemion germańskich i bałtyckich dialektalny odłam północno-praindoeuropejski. Około 1000 r. p.n.e. miało dojść do utworzenia wspólnoty bałtyjsko-słowiańskiej, z której wyodrębnił się język prabałtyjski i prasłowiański. Niektórzy lingwiści są przeciwni istnieniu wspólnoty, sugerując iż języki wchodzące w jej skład ewoluowały w zupełnie osobnych procesach etno-lingwistycznych, a dopiero w późniejszym czasie na skutek bliskiego sąsiedztwa miały się do siebie upodobnić (Mallory 1989).

Polscy językoznawcy jak Mańczak (1997, 1998, 1999, 2000) wskazują na zachodnią praojczyznę Słowian. Argumentem przemawiającym za tą teorią miało być mniejsze podobieństwo języka Słowian do Bałtów niż do Germanów, co sugerowało, że ziemie słowiańskie zlokalizowane były między tymi dwoma

populacjami. Gołąb (1992) lokalizuje praojczyznę Słowian na zachodnio-środkowym Podnieprzu. Sławski (1998) uważa, że Słowianie pochodzą z lesistych i stepowych terenów znajdujących się za Dnieprem. Z kolei Popowska–Taborska (1991, 2001) mówi, że nie można w sposób jednoznaczny określić miejsca pierwotnej siedziby Słowian, ale podkreśla niezaprzeczalny fakt rozszczepienia się języka prasłowiańskiego na trzy grupy: zachodnią (obejmującą: Polaków, Słowaków, Czechów i nieliczną grupę Słowian połabskich), południową (obejmującą: Słoweńców, Bośniaków i Czarnogórców, Serbów, Chorwatów, Bułgarów i Macedończyków) i wschodnią (obejmującą: Rosjan, Białorusinów i Ukraińców), które mogło nastąpić w czasie rozpoczęcia ich wczesnośredniowiecznej ekspansji.

Z kolei Alinei (2003) przytacza argumenty zaprzeczające istnieniu „wielkiej migracji Słowian” w V i VI w. n.e. oraz ich ekspansji ze środkowo - wschodniej Europy na południe. Potwierdza on istnienie asymetryczności języka słowiańskiego, która oznacza niejednorodność języka północno słowiańskiego tworzącego dwie osobne gałęzie - wschodnią i zachodnią, które dzielą pewne cechy wspólne z językiem południowo-słowiańskim. Jednocześnie twierdzi, że z punktu widzenia geolingwistyki, mogło istnieć tylko jedno racjonalne wyjaśnienie tej asymetrycznej przestrzennej konfiguracji językowej, mianowicie pierwszym powstałym ogniwem miał być język południowo-słowiański, a dopiero w późniejszym czasie miały uformować się dwie północne gałęzie językowe, każda w charakterystyczny dla siebie sposób i z właściwą sobie historią. Autor powyższych argumentów jest także zwolennikiem tak zwanej teorii PCT (ang. *Paleolithic continuity theory*), czyli teorii kontynuacji indo-europejczyków i języków od Paleolitu do czasów współczesnych. Teoria kontynuacji paleolitycznej dotycząca Słowian opiera się na argumentach zbliżonych do teorii Trubaceva, który z kolei twierdził, że prehistoryczni Słowianie zasiedlali tereny nie tylko w środkowej części centralnej Europy, ale także ziemie znad środkowego Dunaju (Alinei 2000, 2003).

1.4. Badania antropologiczne

Już od XIX wieku antropolodzy fizyczni zajmowali się pochodzeniem Słowian próbując opracowywać metody badania różnicowania morfologicznego populacji. Pierwszym badaczem, który analizował Słowian pod kątem antropologicznym był

Wawrzyniec Surowiecki. Stworzył on syntetyczną pracę stosunków antropologicznych Europy, opierając się na badaniach zmienności cech pigmentacyjnych. Kolejni badacze z przełomu XIX i XX w. jak Virchow czy Rudkowski analizowali już nie tylko pigmentację, ale również zróżnicowanie morfologiczne czaszek, dzieląc ludność na długo- i krótkogłowców. Podstawą opisu wszystkich powyższych opracowań były średnie arytmetyczne cech morfologicznych oraz odsetek ich występowania w populacji, głównie cech pigmentacyjnych, a także kraniometrycznych (Piontek i in. 2008).

W XX w. przez długi okres czasu praktykowane były analizy typologiczne w badaniach zróżnicowania populacji. Początkowo stosowano metody obliczania składów antropologicznych, które miały być odzwierciedleniem struktury antropologicznej badanych ludności. Składy te były formułą genetyczną, która uwzględniała ilościowy stosunek wykrzyżowanych elementów obejmujących rasy antropologiczne (Kočka 1958). Powyższa metoda była krytykowana za niewiarygodność interpretacji genetycznych i ewolucyjnych w odniesieniu do badań typologicznych. W związku z powyższym wprowadzono nowe metody, obejmujące tzw. „punkty odniesienia Wankego” oraz metodę stochastycznej korelacji wielorakiej (Wanke 1955). Badacze uważali, że nowe metody bazujące na różnicach w składach antropologicznych mogą lepiej informować o odległości biologicznej między populacjami (Piontek i in. 2008).

Antropolodzy, którzy na bazie typologii opracowywali swoje analizy dotyczące etnogenezy Słowian, to między innymi Kočka (1958), Czekanowski (1967) czy Wierciński (1976). Na podstawie swoich badań Czekanowski (1967) stwierdził istnienie ciągłości zaludnienia obszaru między Bałtykiem a Sudetami oraz Karpatami, od Neolitu aż po teraźniejszość. Kočka (1958) dodatkowo wykazywał, że protosłowiański zespół etniczny powstał na obszarze dorzecza Odry i Wisły, a wspólnota praindoeuropejska miała kształtować się z naddunajskich plemion w Środkowej i Środkowo-Wschodniej Europie. Wierciński (1976) z kolei przekonywał, że kultura trzciniecka i łużycka ma charakter prasłowiański, co potwierdza kontynuację zasiedlenia ludności od czasu istnienia powyższych kultur, do wczesnego średniowiecza.

Metoda Wankego (1955) została wykorzystana również w pracach Rożnowskiego (1985) oraz Rożnowskiego i Gładykowskiej-Rzerzyckiej (1983). Badali oni podobieństwo biologiczne ludności kultury wielbarskiej do ludności

wczesnośredniowiecznej z Europy Środkowej i Północnej, ze szczególnym uwzględnieniem ludności germańskiej – Gotów, którzy według pewnych koncepcji mieli zamieszkiwać obszary dorzecza Wisły w okresie rzymskim. Wyniki analiz według autorów wyżej wspomnianych opracowań nie potwierdziły zawartości substratu germańskiego w strukturze morfologicznej ludności z kultury wielbarskiej. Seria czaszek uznawanych przez niektórych, jako Gockie miała być przede wszystkim podobna pod względem morfologii do ludności kultury czerniachowskiej.

Stopniowo metody typologiczne w antropologii fizycznej zostały zastąpione nowymi poszerzonymi metodami z zakresu paleodemografii. Modele paleodemograficzne zaczęto wykorzystywać w analizach procesów etnogenetycznych (Piontek 1992). Badania Słowian wschodnich były prowadzone przez Kozak-Zychman (1996) i Alekseevą (2002). Szkoła rosyjska, której przedstawicielką jest Alekseeva rozważa dwie koncepcje pochodzenia Słowian. Pierwsza koncepcja mówi o znacznym antropologicznym zróżnicowaniu Słowian od początku ich powstania. Druga natomiast wspiera twierdzenie o wykształceniu zróżnicowania dopiero w wyniku kontaktu z innymi etnosami w trakcie ich ekspansji i jednocześnie popiera hipotezę o pierwotnych siedzibach Słowian, które miały znajdować się na obszarze od Odry do Dniepru.

Analizę zróżnicowania antropologicznego populacji z dorzecza Odry i Wisły z okresu rzymskiego i wczesnego średniowiecza przeprowadził Dąbrowski (2003, 2007). Do tego celu wykorzystał metody analizy odległości biologicznych – odległość D^2 Mahalanobisa oraz metodę składowych głównych. Wyniki badań Dąbrowskiego zostały wzbogacone analizami Piontka (2008). Wykorzystując macierz odległości biologicznych, wykonał on analizę porównawczą cech morfologicznych czaszek poprzez porównanie populacji z okresu rzymskiego do populacji Słowian. Wyniki badań zarówno Piontka (2008) jak i Dąbrowskiego (2007) wskazują, że „*ludność zamieszkująca dorzecze Odry i Wisły w okresie wpływów rzymskich nie różniła się pod względem morfologicznym od ludności zamieszkującej te obszary w okresie wczesnego średniowiecza*” (Piontek i in. 2008: 19). Piontek i in. (2008) przeprowadzili również badania porównawcze populacji z okresu rzymskiego, czyli ludności kultury wielbarskiej, przeworskiej i czerniachowskiej z populacjami z dorzecza Odry i Wisły (z wczesnego i późnego średniowiecza) oraz ze średniowiecznymi populacjami ze Skandynawii. Analizy morfologiczne dowiodły, że istnieje wysokie podobieństwo morfologiczne populacji z okresu rzymskiego

do populacji średniowiecznych z dorzecza Odry i Wisły. Nie wykazano natomiast podobieństwa morfologicznego do populacji ze Skandynawii, uznawanych przez niektórych archeologów za populacje Gotów, które miały zasiedlać tereny dorzecza Odry i Wisły w okresie rzymskim.

Oprócz badań zróżnicowania morfologicznego Słowian prowadzone były analizy paleodemograficzne mające na celu sprawdzenie słuszności tezy o wielkim przyroście naturalnym Słowian i ich wielkiej ekspansji na przełomie V i VI w. n.e. Badania demograficzne zostały przeprowadzone przy użyciu między innymi metody składowych głównych pozwalającej dokładniej ocenić, jakie składowe struktury wymieralności decydują o zróżnicowaniu. Z badań Piontka (2006a) wynika, że tereny w dorzeczu Prypeci, Dniepru i Prutu, uważane przez niektórych archeologów - jak Godłowski (2000) za pierwotne siedziby Słowian, były zamieszkałe przez populacje o niskiej dynamice biologicznej i ograniczonej możliwości przyrostu naturalnego.

Do badań zmienności biologicznej, antropolodzy wykorzystują również cechy odontologiczne, głównie ze względu na determinację genetyczną zębów na wczesnych etapach ich rozwoju i odporność na warunki środowiskowe oraz dobry stan zachowania. Badania odontologiczne zostały przeprowadzone na ludności z cmentarzysk kultury wielbarskiej porównując je do ludności kultury czerniachowskiej (Kazak-Zychman i Segeda 1994). Na podstawie powyższych badań odontologicznych i kranologicznych, nie potwierdzono przynależności materiałów kultury wielbarskiej do ludności Gockiej.

W antropologii tematyka pochodzenia Słowian nadal pozostaje aktualna, o czym świadczą liczne prace Piontka (2001, 2002, 2006a, 2006b, 2009). Jednocześnie wyniki wszystkich analiz antropologicznych pozostają zgodne ze stwierdzeniem, że *„dotychczas żadne badania antropologiczne, w tym i nasze nie potwierdziły tezy o dyskontynuacji zasiedlenia obszarów w dorzeczu Odry i Wisły, między okresem rzymskim a wczesnym średniowieczem, a wręcz odwrotnie badania te wykazują wysokie podobieństwo biologiczne pomiędzy ludnością z okresu rzymskiego i wczesnego średniowiecza, zamieszkującą te ziemie”* (Piontek 2008: 78).

1.5. Współpraca interdyscyplinarna

Złożoność problemu etnogenezy Słowian kieruje badaczy do podjęcia współpracy na płaszczyźnie interdyscyplinarnej. Zwolennicy współczesnej nauki uważają, że tylko w taki sposób można kompleksowo sprawdzać słuszność tez stawianych przez archeologów czy historyków. Zdanie to podziela również Barford (2006: 130) odnosząc się do zagadnienia genezy Słowian, mówi: *„jest całkowicie jasne, że istnieje pilna potrzeba wypracowania nowego podejścia. Tradycyjne sposoby koncentrowały się wokół tych samych kwestii i opierały się na tych samych fragmentach świadectw przez tak długi czas, że trudno teraz dostrzec wyjście z tego błędnego koła argumentów i kontrargumentów, które narosły wokół problemu”*.

Wcześniej nie zawsze doceniane i stosowane badania interdyscyplinarne obejmują swym zakresem nie tylko współpracę archeologów z antropologami czy lingwistami, ale również współpracę ze specjalistami z wąskich dziedzin nauki biologii czy biochemii, którzy oferują zastosowanie najnowocześniejszych technik badawczych, pomocnych między innymi w oznaczeniu chronologicznym znalezisk, ale także w badaniach populacyjnych. W ostatnich latach coraz częściej stosuje się metody izotopowego datowania materiałów (Leach i in. 2009), czy izotopowej analizy szkliska nazębnego, które pomagają w rekonstrukcji migracji i pochodzenia populacji (Price i in. 2004). Ogromne możliwości dają techniki badawcze biologii molekularnej umożliwiające prowadzenie badań kopalnego DNA. Bogate zbiory antropologiczne i archeologiczne mogą być dobrym źródłem materiałów do analiz kopalnego materiału genetycznego. Na świecie istnieje kilka ośrodków badawczych, których laboratoria specjalizują się w prowadzeniu tego typu badań. Stosowane przez nich sprawdzone techniki izolacji kopalnego materiału genetycznego, amplifikacji metodą PCR i sekwencjonowania prowadzone w określonych warunkach, w dużym stopniu pozwalają na uzyskanie autentycznych rezultatów. Z kolei odpowiednia interpretacja i zaawansowana analiza statystyczna wyników umożliwia wykorzystanie ich do badania struktury genetycznej, migracji czy pochodzenia populacji.

2. Kopalny DNA

Kopalny DNA to endogenny materiał genetyczny, który może być izolowany *post-mortem* ze szczątków organizmów. Kopalne matryce DNA pod wpływem czynników środowiska, a także enzymów nukleolitycznych uaktywnionych po śmierci komórek, ulegają uszkodzeniom i stopniowej degradacji. To powoduje, że w kopalnych próbach materiał genetyczny występuje zwykle w małych ilościach, w postaci krótkich fragmentów (Willerslev i Cooper 2005). Tak zmodyfikowany aDNA (ang. *ancient DNA*), stanowi niezwykle wyzwanie dla badaczy zajmujących się jego izolacją i analizą. Niewielka jego ilość, a także liczne uszkodzenia sprawiają, że znacznie wzrasta ryzyko kontaminacji badanego materiału, egzogenным współczesnym DNA. Dlatego wstępne procedury pracy z próbkami, z których mają być izolowane kopalne matryce DNA, są znacznie bardziej restrykcyjne i różnią się w istotny sposób od procedur stosowanych w badaniach współczesnego DNA. Przestrzeganie określonych zasad w trakcie pozyskiwania materiału, a także pracy w laboratorium, może znacznie zwiększyć skuteczność otrzymania autentycznych rezultatów.

2.1. Historia badań kopalnego DNA

Badania kopalnego DNA prowadzone są na świecie od niemal 30 lat. Pierwsze prace z tej tematyki ukazały się w latach 80-tych i stały się początkiem i podstawą wszystkich dzisiejszych projektów badań aDNA prowadzonych w wielu ośrodkach naukowych na całym świecie. W roku 1980, chińscy badacze ze Szkoły Medycznej Hunan po raz pierwszy udowodnili, że w tkankach szczątków ludzkich może być zachowany DNA (Hummel 2003). W roku 1984, Higuchi wraz ze współpracownikami przeprowadził pierwszą próbę izolacji kopalnego mitochondrialnego DNA. Badany materiał pochodził z tkanki skórnej kwagi (quagga) – wymarłego zwierzęcia z rodziny koniowatych (Higuchi i in. 1984). Zaraz potem Pääbo (1985) opublikował wynik sekwencjonowania fragmentu jądrowego DNA, należącego do mumii egipskiej pochodzącej sprzed 2 400 lat. Przełomowym momentem dla analiz kopalnego materiału genetycznego, było odkrycie łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) przez Mullisa i Faloona w roku 1987. Nowa technika

umożliwiła amplifikację i badanie nawet pojedynczej cząsteczki DNA, która może przetrwać w kopalnym materiale. To z kolei zapoczątkowało szybki rozwój i zróżnicowanie badań aDNA, co zaowocowało pojawianiem się wielu publikacji z tej tematyki (Pääbo i Wilson 1988; Pääbo 1989; Pääbo i in. 1989; Thomas i in. 1989). Pod koniec lat 80-tych pojawiła się pierwsza praca opisująca sukces izolacji kopalnego DNA z kości (Hagelberg 1989). Publikacja ta udowodniła, że materiały kostne zgromadzone w różnych ośrodkach antropologicznych, muzeach czy też wydobywane na bieżąco podczas wykopalisk archeologicznych, mogą stanowić doskonałe źródło aDNA.

Jednym z największych problemów badaczy zajmujących się kopalnym DNA jest wysokie ryzyko kontaminacji badanych próbek wszechobecnym współczesnym DNA. Udowodniono, że metoda PCR pomimo wysokiej efektywności i wielu zalet, może również powodować wzrost ryzyka amplifikacji zanieczyszczeń w postaci egzogenego DNA, preferencyjnie wobec krótkich fragmentów endogennego aDNA (Mulligan 2005). Ta zwiększona wrażliwość na kontaminacje może powodować otrzymanie fałszywie pozytywnych wyników. Autorzy niektórych prac, szczególnie tych pierwszych z lat 80-tych, ale także 90-tych, nie zwracali uwagi na możliwość kontaminacji prób egzogenym materiałem genetycznym i w związku z tym nie przestrzegali obecnie stosowanych istotnych procedur laboratoryjnych, które miały zwiększać skuteczność otrzymania autentycznych rezultatów. W związku z powyższym zakwestionowano autentyczność wyników zawartych w wielu spektakularnych publikacjach, które dotyczyły m.in. otrzymania sekwencji DNA z roślin datowanych na wiele milionów lat (Soltis i in. 1992; Golenberg i in. 1990), wyizolowania DNA z kości dinozaura (Woodward i in. 1994) czy też otrzymania DNA z owadów uwieczonych w bursztynach sprzed 25-40 milionów lat (Cano i in. 1992). Z biegiem czasu wyniki wielu prac, do których zaliczyć można również publikacje Higuchi i wsp. (1984), a także Pääbo (1985) zakwestionowano, ze względu na podejrzenia, że materiał genetyczny izolowany z kopalnych prób nie zawsze był autentycznym, endogennym DNA badanych osobników (Shapiro i Hofreiter 2012).

Wiele badań prowadzonych w ostatniej dekadzie znacznie wzbogaciło wiedzę na temat kopalnego DNA. Obecnie wiadomo, które z czynników środowiskowych istotnie wpływają na stopień zachowania aDNA, a także, jakie rodzaje uszkodzeń materiału genetycznego najczęściej występują w kopalnych próbach. Wiele wiadomo również o źródłach kontaminacji współczesnym DNA i kontroli ich obecności w

próbach. Na bazie tej wiedzy stworzono specjalne procedury pracy z aDNA i metodyki badawcze umożliwiające rzetelną weryfikację uzyskanych rezultatów (Kirsanow i Burger 2012).

2.2. Charakterystyka cząsteczek kopalnego DNA

Badania kopalnego DNA obejmują analizy materiałów biologicznych, które są starsze niż 75 lat (Graham 2007). Kopalny DNA w przeciwieństwie do DNA pochodzącego z żywych komórek, ulega stopniowej degradacji i modyfikacji *post-mortem*. Zmiany te zależne w dużej mierze od czynników środowiskowych, są obok kontaminacji współczesnym materiałem genetycznym, jednym z głównych problemów pracy z aDNA.

2.2.1. Degradacja i uszkodzenia kopalnego DNA *post-mortem*

Degradacja DNA rozpoczyna się natychmiast po śmierci organizmu. DNA ulega fragmentacji pod wpływem uwolnionych endogennych nukleaz, które katalizują hydrolizę wiązań fosfodiesterowych wewnątrz jego cząsteczek (Graham 2007). Oprócz enzymów nukleolitycznych, materiał genetyczny degradowany jest przez mikroorganizmy jak bakterie, grzyby, czy glebowe bezkręgowce, a także modyfikowany jest przez spontanicznie zachodzące procesy chemiczne jak oksydacja czy hydroliza (Binladen i in. 2006; Lindahl 1993; Hofreiter i in 2001b). W niektórych rzadkich przypadkach, kiedy tkanki ulegną gwałtownemu wysuszeniu tuż po śmierci organizmu, DNA może uniknąć degradacji powodowanej przez działanie enzymów nukleolitycznych czy mikroorganizmów (Pääbo i in. 2004). Również wysokie stężenia soli czy niskie temperatury mogą niszczyć lub inaktywować endonukleazy i tym samym - zabezpieczać cząsteczki kwasów nukleinowych przed ich redukcją do mononukleotydów (Hofreiter i in. 2001b). Pomimo zahamowania działania enzymów nukleolitycznych, DNA może nadal podlegać różnym procesom chemicznym, w tym hydrolitycznym czy oksydacyjnym, które w sposób wolniejszy, ale ciągły będą go modyfikować. Wiele z tych procesów jest identycznych albo podobnych do tych, które pojawiają się w żywych komórkach. Po śmierci organizmu skutki tych procesów nie mogą zostać naprawione ze względu na brak komórkowych systemów

naprawczych (Lindahl 1993). Wskutek tego, zniszczenia akumulują się do momentu, w którym DNA ulegnie pełnej degradacji, co jest równoznaczne z całkowitą utratą informacji o sekwencji nukleotydów. Reakcje PCR umożliwiają amplifikację tych fragmentów DNA, w których dezintegracja cząsteczek nie została w pełni ukończona. Sekwencje, które tą drogą można uzyskać, zazwyczaj są zredukowane do fragmentów o długości od 100 do 200 par zasad (Graham 2007); wyjątkowo, w przypadku bardzo dobrze zachowanego materiału biologicznego, można amplifikować fragmenty do 500 par zasad (Höss i in. 1996). Fragmentacja kopalnego aDNA jest spowodowana głównie procesami hydrolitycznymi i oksydacyjnymi (Lamers i in. 2009).

‘Atak’ hydrolityczny na DNA może powodować pęknięcie wiązania N-glikozylowego, które łączy cukier - deoksyrybozę z zasadą azotową, powodując w ten sposób oderwanie puryny lub pirymidyny i uformowanie tzw. miejsc AP (ang. *apurinic/apyrimidinic*). Mimo, że zjawisko dotyczy zarówno puryn jak i pirymidyn, to jednak częściej występuje rozerwanie wiązania pomiędzy deoksyrybozą i zasadą purynową (stąd polska nazwa tego typu zmian: depurynacja). Miejsca AP mogą dodatkowo powodować rozerwanie łańcucha DNA albo blokować aktywność polimerazy w reakcji PCR (Lindahl 1993). Stopień depurynacji lub depirymidacji zależy od wielu czynników zewnętrznych, w tym od warunków środowiska, w którym odnaleziono zostały szczątki, z których izolowany był DNA, a także od późniejszych warunków, w jakich przechowywane były próby (Lamers i in. 2009).

Oprócz tworzenia miejsc AP, zniszczenia hydrolityczne mogą powodować deaminację DNA, skutkującą modyfikacją zasad azotowych. Najczęściej takim zmianom podlegają pirymidyny, czyli cytozyna i jej pochodna 5-metylocytozyna. Modyfikacja tych nukleotydów powoduje ich zamianę odpowiednio do uracylu albo tyminy, co z kolei powoduje pojawienie się tranzycji G→A podczas amplifikacji cząsteczki DNA (Axelsson i in. 2008; Brotherton i in. 2007; Briggs i in. 2007; Gilbert i in. 2003; Lamers i in. 2009). Deaminacja może również dotyczyć zasad purynowych – adeniny i guaniny, jednakże jest to zjawisko występujące znacznie rzadziej. Adenina pod wpływem deaminacji przekształca się w hipoksantynę, która odczytywana jest przez polimerazę, jako guanina i powoduje powstanie tranzycji A/G lub T/C (Brotherton i in. 2007).

W przypadku badań kopalnego DNA oprócz uszkodzeń hydrolitycznych istotne są także uszkodzenia powstające na skutek działania czynników oksydacyjnych. Reakcje oksydacyjne związane są z działaniem reaktywnych form

tłenu takich jak: nadtlenek wodoru, wolny rodnik wodorotlenowy czy anionorodnik ponadtlenny (Pääbo i in. 2004). Głównymi miejscami ataku cząstek tlenowych są wiązania pomiędzy pirymidynami i purynami oraz wiązania w pierścieniu deoksyrybozy. Skutkiem takiego ataku jest fragmentacja pierścieni zasad oraz cukru, co prowadzi do powstania między innymi hydantoin. Związki te nie są rozpoznawane przez polimerazę DNA, przez co są inhibitorami reakcji PCR (Graham 2007; Lamers i in. 2009; Dizdaroglu i in. 2002). Niektóre z oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad mogą tworzyć 8-hydroksyguaninę, która odczytywana jest przez polimerazę, jako adenina, w związku z tym, do nowej syntetyzowanej nici włączana jest tymina, co powoduje powstanie transwersji G→T. Oprócz 8-hydroksyguaniny mogą powstawać inne produkty uszkodzeń oksydacyjnych, prowadzące do transwersji również innych zasad. Mitchell wraz ze współpracownikami (2005) uważa, że uszkodzenia oksydacyjne są głównymi modyfikacjami *post-mortem*, które mogą blokować aktywność polimerazy podczas reakcji PCR. W tabeli 1 przytoczono substytucje, które zmieniają zapis informacji genetycznej (ang. *miscoding lesions*), jakie można zaobserwować w sekwencjach kopalnego DNA. Wszystkie wymienione substytucje zarówno tranzycje jak i transwersje można podzielić na dwa typy. Tranzycje typu 1, to substytucje T→C oraz A→G, natomiast typ 2, to substytucje C→T i G→A. Analogiczna sytuacja jest w przypadku transwersji, z tą różnicą, że dla każdego nukleotydu są dwie możliwości zamiany, które generują transwersję i dają w sumie cztery możliwości substytucji dla każdego typu. Podział tranzycji i transwersji na dwa typy związany jest z komplementarnością łańcuchów DNA. Uszkodzenia na nici macierzystej mogą być obserwowane bezpośrednio na niej lub mogą być widoczne po amplifikacji na nici komplementarnej. Przykładowo typ 2 tranzycji może być widoczny zarówno jako C→T jak i G→A w zależności od tego na którym łańcuchu DNA zaszła pierwotna substytucja (Lamers i in. 2009). Powyżej opisany typ 2 tranzycji jest uważany za najczęściej występującą formę uszkodzenia *post-mortem* w DNA (Gilbert i in. 2003; Hansen i in. 2001; Stiller i in. 2006). Częste występowanie typu 2 może być wynikiem różnicy w szybkości deaminacji zasad. Lindahl (1993) uważa, że cytozyna znacznie szybciej traci grupę aminową (do ~30-50 razy szybciej) niż adenina.

Tabela 1. Substytucje występujące w aDNA, które powstają na skutek działania czynników hydrolitycznych lub oksydacyjnych (według Hansen i in. 2001).

Substytucja	Główny czynniki powodujący uszkodzenie	Typ tranzycji lub transwersji
T→C	Deaminacja hydrolityczna	Tranzycja typ 1
A→G	Deaminacja hydrolityczna	Tranzycja typ 1
C→T	Deaminacja hydrolityczna	Tranzycja typ 2
G→A	Deaminacja hydrolityczna	Tranzycja typ 2
A→C	Oksydacja	Transwersja typ 1
T→G	Oksydacja	Transwersja typ 1
A→T	Oksydacja	Transwersja typ 1
T→A	Oksydacja	Transwersja typ 1
C→A	Oksydacja	Transwersja typ 2
G→T	Oksydacja	Transwersja typ 2
C→G	Oksydacja	Transwersja typ 2
G→C	Oksydacja	Transwersja typ 2

Jeszcze innym typem występujących w aDNA uszkodzeń są wiązania krzyżowe międzycząsteczkowe i wewnątrzcząsteczkowe typu DNA-DNA lub DNA-białko. Specyficznym wiązaniem krzyżowym, które występuje w kopalnym DNA jest połączenie powstające podczas reakcji Maillarda pomiędzy cukrem i pierwszorzędową grupą aminową kwasów nukleinowych lub białek. Takie wiązanie uniemożliwia dostęp polimerazy do DNA i co za tym idzie skuteczne przeprowadzenie reakcji PCR (Pääbo i in. 2004). Poinar i wsp. (1998) stwierdzili, że wiązania krzyżowe często, choć nie zawsze (Kemp i in. 2006) występują w koprolitach. Z kolei w materiałach pochodzących z wiecznej zmarzliny liczba wiązań krzyżowych znacznie przewyższa liczbę innych typów uszkodzeń. Szybkość tworzenia tych wiązań *post-mortem* jest znacznie większa niż szybkość pojawiania się pęknięć pojedynczych nici DNA, które są w dużej części odpowiedzialne za fragmentację. Oznacza to, że DNA może być nadal obecny w próbach nawet jeśli uzyska się negatywne rezultaty z PCR (Willerslev i in. 2004a).

2.2.2. Inhibitory PCR

Z punktu widzenia badań aDNA istotna jest obecność w próbce związków, które mogą hamować lub utrudniać amplifikację materiału genetycznego. Efektem ich działania jest nie tylko brak produktu, ale także brak dimerów starterów, smug i innych niespecyficzných produktów amplifikacji PCR. Do najczęściej występujących związków będących inhibitorami łańcuchowej reakcji polimerazy należą: kwasy

humusowe, fulwowe, taniny i polifenole. Związane są one ze środowiskiem glebowym i powstają głównie na skutek rozkładu materiału roślinnego. Ich ilość zależy od rodzaju flory porastającej glebę, pH, temperatury, a także uwodnienia (Hummel 2003). Do związków utrudniających amplifikację DNA należą również wcześniej wspomniane produkty reakcji Maillarda. Scholz i współpracownicy (1998) wykazali, że inhibitorem PCR może być także kolagen typu I (widoczny na żelu agarozowym jako zielono-niebieska smuga).

Istnieje kilka sposobów usunięcia lub ograniczenia wpływu inhibitorów na reakcję PCR. Najprostszą metodą jest rozcieńczanie ekstraktu DNA wodą, jednak ta metoda nie nadaje się do amplifikacji aDNA ze względu na to, że może zmniejszyć dostępną już i tak małą liczbę zdolnych do amplifikacji matryc kwasów nukleinowych (King i in. 2009). Inne proponowane metody, to precypitacja DNA z roztworu przy pomocy izopropanolu (Häni i in. 1995), stosowanie izolacji DNA na kolumnkach z filtrami krzemionkowymi (Yang i in. 1998), czy kilkukrotna precypitacja z zastosowaniem różnych alkoholi w połączeniu z dwukrotnym wiązaniem na krzemionce (Kemp i in. 2006).

Znane są również przykłady eliminacji inhibitorów poprzez wiązanie ich z różnymi substancjami jak: Dextran Blue (Kalmár i in. 2000), albumina z surowicy wołu (BSA) (Rohland i Hofreiter 2007) lub poliwinylpolipriolidon (PVPP), który jest polimerem nierozpuszczalnym w wodzie, mającym zdolność wiązania polifenoli i tanin (Berthelet i in. 1996; Brunner i in. 2001). W niektórych przypadkach skuteczna w eliminacji inhibitorów PCR była procedura uwalniania ich do roztworu poprzez denaturację DNA w NaOH i przepuszczanie przez membranę (Micrococon-100). Związany do membrany DNA był następnie renaturowany i wykorzystywany do reakcji PCR (Bourke i in. 1999). Do usunięcia kolagenu typu I, rozwiązaniem jest użycie podczas ekstrakcji kolagenazy zamiast proteinazy K (Scholz i in. 1998). Do usunięcia inhibitorów PCR można również zastosować bromek-N-fenyloacetylotiazolowy (PTB), który ma zdolność rozbijania wiązań krzyżowych, przez co jest przydatny w próbach, w których obecne są produkty reakcji Maillarda, blokujące dostęp polimerazy do DNA (Poinar i in. 1998, Hofreiter i in. 2001a, Kuch i in. 2002).

Oprócz eliminacji inhibitorów PCR, istnieją także sposoby, które mogą w pewnym stopniu pomóc w przezwycięzeniu innych niekorzystnych skutków modyfikacji *post-mortem*. Jednym z nich jest zastosowanie enzymu Uracylo-N-

glikozylazy (UNG), który usuwa uracyl z DNA. To pozwala zredukować liczbę substytucji G/C→A/T, które są efektem deaminacji cytozyny (Hofreiter i in. 2001a). Axeelsson i in. (2008) twierdzą jednak, że enzym ten może także zmniejszyć całkowitą liczbę dostępnych endogennych matryc DNA.

Istnieją także metody, które pomagają skutecznie identyfikować sekwencje posiadające błędne substytucje nukleotydowe (ang. *misincorporations*), będące efektem uszkodzeń DNA *post-mortem* lub w znacznie mniejszym stopniu błędów samej polimerazy podczas PCR. Jeśli liczba matryc wyjściowych w PCR jest większa niż 1000 kopii to liczba uszkodzeń *post-mortem* nie powinna w znaczący sposób wpływać na ostateczny rezultat. Problem pojawia się wtedy kiedy liczba wyjściowych matryc inicjujących reakcję PCR jest bardzo mała. Wówczas prawdopodobne jest, że otrzymane sekwencje będą zawierały artefakty (Handt i in. 1996, Krings i in. 1997). Kiedy błędne substytucje nukleotydowe pojawią się w pojedynczym łańcuchu DNA amplifikowanym w pierwszym cyklu reakcji PCR, wszystkie następne amplikony powstałe w kolejnych cyklach będą posiadały ten sam błąd. W konsekwencji finałowy produkt PCR będzie homogeny, pomimo że posiada błędną sekwencję. Rozwiązaniem tego problemu jest kilkukrotna amplifikacja tego samego fragmentu DNA, następnie jego klonowanie i sekwencjonowanie klonów. Posiadanie wielu sekwencji klonów pochodzących z różnych amplifikacji pozwala sprawdzić prawidłowość pozycji każdego z nukleotydów w DNA (Pääbo i in. 2004, Stiller i in. 2006, Ho i Gilbert 2010).

Pomimo dostępności kilku metod eliminujących inhibitory lub likwidujących w pewnym stopniu negatywne skutki modyfikacji kopalnego DNA *post-mortem*, nadal nie jest możliwe zaprojektowanie w pełni skutecznych enzymatycznych systemów naprawczych *in vitro*. Niemożność ta wynika z faktu, że nadal do końca nie poznano tempa oraz sposobu przebiegu powstawania uszkodzeń *post-mortem* (Di Bernardo i in. 2002).

2.2.3. Wpływ czynników środowiska na kopalny DNA

Istnieje duża liczba biotycznych i abiotycznych czynników środowiska, które wpływają na stopień zachowania kopalnego DNA. Do czynników biotycznych zalicza się bakterie glebowe, grzyby, a także drobną faunę. Z kolei główne czynniki abiotyczne to temperatura, typ gleby, pH, obecność substancji humusowych,

uszkodzenia spowodowane działaniami fizycznymi, procesy pogodowe, zawartość wody i tlenu czy promieniowanie UV. Wszystkie powyższe czynniki mogą powodować fragmentację aDNA, jego modyfikacje, a także tworzenie wiązań krzyżowych między DNA i innymi cząsteczkami. Te skomplikowane reakcje czynników biologicznych, chemicznych i fizycznych powodują, że właściwości i cechy miejsc, w których znajdowane są szczątki organizmów znacząco się od siebie różnią (Lamers i in. 2009), a to z kolei ma wpływ na stopień zachowania materiału genetycznego. Wielu badaczy sądzi, że czynniki środowiskowe znacznie bardziej wpływają na poziom degradacji aDNA, aniżeli wiek próby i czas, który upłynął od chwili śmierci organizmu (Willerslev and Cooper 2005; Hebsgaard i in. 2005). Powyższe stwierdzenie popiera fakt, że nawet bardzo stare szczątki jak np. liczące ponad 50 000 lat mamuty włochate z Syberii mogą zawierać dobrze zachowany DNA (Shapiro i Cooper 2003, Gilbert i in. 2008b).

Temperatura jest jednym z głównych czynników środowiskowych, który odgrywa bardzo istotną rolę w procesie degradacji kwasów nukleinowych (Smith i in. 2003). Niska temperatura wpływa korzystnie na zachowanie DNA. Najstarsze kopalne materiały genetyczne jakie udało się dotąd uzyskać pochodziły ze szczątków organizmów z wiecznej zmarzliny oraz z zimnych jaskiń. Według Pruvosta i wsp. (2007), DNA izolowany z prób znalezionych w wyżej wspomnianych środowiskach może być znacznie lepiej zachowany niż DNA pochodzący z suchych i gorących terenów. W lodowcach Grenlandii znaleziono DNA należący do roślin i owadów, które mają od 450 000 do 800 000 lat (Willerslev i in. 2007). W jaskiniach Atapuerca w Hiszpanii odnaleziono szczątki niedźwiedzi datowane na ponad 400 000 lat, które również zawierały kopalny materiał genetyczny (Valdosiera i in. 2006). Powyższe przykłady świadczą o tym, że DNA może przetrwać dłużej niż przewidywali wcześniej badacze. Przykłady z Grenlandii czy Hiszpanii znacznie przekroczyły obliczony przez Poinara i współpracowników (1996) czy Smitha i współpracowników (2001) maksymalny wiek zachowania DNA, który dla klimatu umiarkowanego miał wynosić 10 000 lat, a dla niskich temperatur 100 000 lat. Do określania stopnia zachowania DNA mogą służyć pewne modele, takie jak stopień racemizacji aminokwasów (Poinar i in. 1996) czy badanie wieku termalnego (Smith i in. 2003). Jednak Hansen i współpracownicy (2006) uważają, że powyższe modele nie nadają się do stosowania na próbach pochodzących ze wszystkich środowisk. Powyższe sposoby oznaczania stopnia zachowania materiału genetycznego uznają depurynację

za jedyny istotny typ uszkodzenia DNA, który limituje jego ilość. W związku z tym nie mają one przełożenia na próby, które pochodzą z wiecznej zmarzliny, a w których zdecydowaną większość uszkodzeń DNA stanowią wiązania krzyżowe. Próby wybierane do analiz DNA mogą charakteryzować się wysokim stopniem zróżnicowania typów i częstości uszkodzeń materiału genetycznego zależnych od środowiska, w którym się znajdowały. Zatem stosowanie ogólnych modeli do określenia możliwości przetrwania DNA powinno być poprzedzone oszacowaniem stopnia uszkodzeń materiału genetycznego, indywidualnie dla każdego środowiska (Hansen i in. 2006).

Wieczne zmarzliny, z których pochodzą najstarsze próby, stanowią idealne miejsce dla dobrego stanu zachowania DNA. Oprócz niskiej temperatury są stosunkowo suche. Szacuje się, że zawierają zaledwie 3-8% całkowitej ilości wody, która jest w stanie niezamrożonym (Willerslev i in. 2004b). Niska temperatura, pH zbliżone do obojętnego, a także brak dużej ilości wolnej wody, znacznie ograniczają częstość uszkodzeń DNA spowodowanych procesami hydrolitycznymi i zabezpieczają materiał genetyczny przed całkowitą degradacją.

Oprócz niskiej temperatury, korzystne działanie mają również takie czynniki, jak: brak obecności mikroorganizmów (Burger i in. 1999), wysokie stężenia soli, a także niska zawartość kwasów humusowych i fulwowych w glebie (Tuross 1994). Kwasy humusowe i fulwowe wykazują dodatnią korelację z wilgotnością gleby, a zatem mogą być indykatorami obecności niekorzystnie działającej na DNA wody (Burger i in. 1999). Szkodliwe działanie na DNA ma promieniowanie UV, które odpowiedzialne jest za powstawanie wiązań krzyżowych między resztami tiaminy, które z kolei są inhibitorami reakcji PCR (Tuross 1994).

Jakość i ilość DNA w kopalnych próbach jest zależna także od procesów i czynności jakie są wykonywane po wydobyciu szczątków z ziemi (Pruvost i in. 2007). Próby przechowywane przez wiele lat w muzealnych kolekcjach, zwykle w temperaturze pokojowej wykazują mniejszą zdolność amplifikacji w porównaniu do prób 'świeżo' wykopanych z ziemi i natychmiast przeznaczonych do izolacji DNA. Takie różnice mogą być efektem przechowywania w wyższej temperaturze niż ta, która była w ziemi, albo zmniejszenia odczynu pH i zawartości soli spowodowanych myciem kolekcjonowanych obiektów. Idealne przechowywanie materiałów przeznaczonych do badań DNA, powinno odbywać się w niskich temperaturach, najlepiej w stanie zamrożenia (Malmström 2007).

2.3. Źródła kopalnego DNA

Kopalny DNA może być izolowany ze szczątków organizmów ludzkich, zwierzęcych lub roślinnych, które pochodzą z wykopalisk archeologicznych, kolekcji muzealnych lub innych paleobiologicznych źródeł jak np. osadów glebowych lub lodowcowych. Najczęściej DNA izolowany jest z tkanek twardych czyli zębów i kości, pozostałe źródła aDNA to między innymi zmumifikowane tkanki miękkie, włosy, rogi, paznokcie czy nasiona roślin.

Zęby i kości reprezentują najpopularniejsze źródło kopalnego DNA, co jest związane z faktem, że szczątki ludzkie lub zwierzęce znajdowane są najczęściej właśnie w postaci kości. Struktura tkanki kostnej pozwala na przetrwanie jej zdecydowanie dłużej niż tkanek miękkich (Ho i Gilbert 2010). W zależności od warunków środowiska, w tym od rodzaju obecnych bakterii stopień zachowania zmineralizowanych tkanek kostnych, może być różny. Przykładowo w mocno napowietrzonych glebach grzyby i bakterie kolonizują otwarte pory w kości i niszczą ją w ciągu kilku lat (Jans i in. 2004). Z kolei w środowiskach morskich i w świeżej wodzie, sinice powodują degradację tkanek kostnych poprzez zwiększanie ich porowatości (Nielsen-Marsh i Hedges 1999; Pesquero i in. 2010). Campos i współpracownicy (2011) na podstawie niedawno przeprowadzonych badań wysunęli kilka hipotez dotyczących umiejscowienia fragmentów DNA w kości. W warunkach *in-vivo*, DNA może być związany z włóknami kolagenowymi, otoczonymi przez kryształy hydroksyapatytu (HAP), które tworzą się podczas mineralizacji tych włókien. Również *in-vivo* DNA może zostać związany do hydroksyapatytu lub może znaleźć się wewnątrz kryształów HAP, które rosną w przestrzeniach między włóknami kolagenu w części mineralnej osteoidu kości. Z kolei degradacja *post-mortem* komponentów komórkowych tkanki kostnej powoduje uwolnienie fragmentów DNA przez mikroskopijne pory i ich migrację wraz z roztworem jonów wapnia i fosforu. Migrujące jony mogą ponownie tworzyć kryształy HAP. DNA może zostać zaadsorbowany na ich powierzchni lub związany w ich wnętrzu. *Post-mortem* DNA może być także zaadsorbowany do włókien kolagenowych i uwalniany przez pory kostne, które powstają na skutek chemicznej albo mikrobiologicznej degradacji. Istotnym pozostaje stwierdzenie, że kopalny DNA może przetrwać nie tylko w postaci związanej z częścią organiczną kości, ale również z frakcją mineralną, co oznacza, że

komponenty w postaci hydroksyapatytu powinny być tak samo ważne w przypadku badań aDNA jak i frakcja kolagenowa (Campos i in. 2011). Schwarz i wsp. (2009) na podstawie badań kości mamuta stwierdzili, że około 40% otrzymanych fragmentów mtDNA o długości 84 par zasad, było także obecnych we frakcji hydroksyapatytowej. Zauważyli oni również, że frakcja ta zawiera krótsze fragmenty zarówno mtDNA jak i jądrowego DNA w porównaniu do frakcji kolagenu. Z kolei zmienność długości fragmentów może być związana albo z tym, że DNA znajdujący się w części mineralnej kości jest bardziej podatny na degradację *post-mortem* albo z filtracją, pod wpływem której mniejsze fragmenty DNA mogą przechodzić z części kolagenowej do frakcji mineralnej, a większe są w niej zatrzymywane. Campos i wsp. (2011) zauważyli również, że spadkowi ilości DNA, który związany jest z częścią hydroksyapatytową towarzyszy spadek ilości DNA związanego z częścią organiczną. I odwrotnie spadek ilości kolagenu na skutek jego hydrolizy powoduje zarówno utratę DNA związanego z frakcją organiczną jak i spadek ilości DNA związanego z częścią nieorganiczną.

Kości długie są wykorzystywane w badaniach kopalnego DNA, ale jeśli jest tylko możliwość to w wielu przypadkach znacznie częściej jako źródło aDNA używa się zębów. Wielu badaczy uważa, że szkliwo i cement zębów stanowią skuteczną barierę chroniącą DNA przed degradującym wpływem czynników środowiska, a mniejsza porowatość tkanki zęba w stosunku do kości może lepiej chronić go przed kontaminacjami współczesnym DNA (Rudbeck i in. 2005; Sampietro i in. 2006; Haak i in. 2008). Z badań Adlera i wsp. (2011) wynika, że cement zęba stanowi najlepsze źródło kopalnego materiału genetycznego. Można z niego otrzymać o cztery do pięć razy więcej kopii fragmentów mtDNA niż z zębiny. Szczególnie dużo cementu znajduje się na wierzchołku korzenia i to właśnie z niego można otrzymać stosunkowo najwięcej aDNA. Ponadto część wierzchołkowa korzenia osadzona *in situ* w szczęcie lub żuchwie, niewidoczna z zewnątrz może być znacznie mniej podatna na kontaminację współczesnym DNA (Adler i in. 2011).

Oprócz kości i zębów coraz bardziej popularnym źródłem aDNA są tkanki keratynowe jak włosy, paznokcie czy rogi, które zachowane w odpowiednich warunkach mogą być równie dobrym źródłem kopalnego materiału genetycznego. Stwierdzenie to popierają prace, których autorom udało się uzyskać fragmenty kopalnego mtDNA z włosów pochodzących z muzealnych i archeologicznych kolekcji liczących kilkaset lat (Baker i in. 2001; Gilbert i in. 2004; Amory i in. 2007;

Gilbert i in. 2007a; Matheson i in. 2009; Melchior i in. 2010). Dzięki sekwencjonowaniu 'nowej generacji' udało się uzyskać również pełne genomy mtDNA z włosów mamutów (Gilbert i in. 2007b), wymarłych nosorożców włośchatych (Willerslev i in. 2009) czy ludzi (Gilbert i in. 2008; Rasmussen i in. 2010). Morfologia i struktura biochemiczna tkanek keratynowych, sprawia że DNA może degradować nieco wolniej niż w innych tkankach. Podczas keratynizacji włosy i paznokcie ulegają naturalnej desykcji, co zabezpiecza DNA przed uszkodzeniami hydrolitycznymi, które powstają w obecności wolnej wody (Bengtsson i in. 2011). Pośrednim dowodem na to jest mniejsza liczba uszkodzeń spowodowanych deaminacją cytozyny, a zatem mniejsza liczba tranzycji (Gilbert i in. 2004). Głównym typem uszkodzeń aDNA we włosach i paznokciach są transwersje, które powstają na skutek działania procesów oksydacyjnych. Procesy te są skorelowane z temperaturą, przez co próby, które posiadają dobrze zachowany DNA z reguły pochodzą ze środowisk o bardzo niskiej temperaturze (Glibert i in. 2004). Ze względu na wyjątkowa biogenezę i morfologię włosy czy paznokcie, odznaczają się także znacznie lepszą odpornością na kontaminacje egzogennym DNA. Gilbert i wsp. (2006) uważają, że nawet częściowo zachowane włosy nie są bardziej podatne na zanieczyszczenia współczesnym DNA niż te, które zachowały się w całości.

2.4. Kontaminacje egzogennym DNA

Kontaminacje egzogennym DNA stanowią niewątpliwie poważny problem w badaniach, w szczególności ludzkiego kopalnego DNA. Niewielka liczba matryc aDNA lub często ich całkowity brak, mogą znacznie zwiększać ryzyko zanieczyszczenia analizowanych prób obcym DNA. Jego źródłem mogą być osoby, które bezpośrednio dotykają próby, a zatem wszyscy ci, którzy zaangażowani są w wydobywanie i badanie znalezionych szczątków, jak również genetycy, którzy już w laboratorium zajmują się izolacją kopalnego DNA (Hummel 2003). Potencjalne źródło zanieczyszczeń stanowi także DNA osób pracujących w komercyjnych przedsiębiorstwach, przygotowujących odczynniki i sprzęty (próbówki), które używane są do ekstrakcji i amplifikacji aDNA, w tym startery do reakcji PCR (Deguilloux i in. 2011). W przypadku roślin i zwierząt, podstawowe źródło zanieczyszczeń stanowi nie ludzki materiał genetyczny, a DNA współcześnie

żyjących przedstawicieli badanych gatunków (Yang i in. 2004). Podobnie jest w przypadku analiz kopalnego DNA patogenów. Tu zagrożenie stanowią blisko spokrewnione szczepy bakterii obecne w glebie i otaczającym środowisku (Yang i Watt 2005).

Źródłem zanieczyszczeń w postaci egzogenego DNA mogą być także powstające w laboratoriach współczesnego DNA, produkty amplifikacji ludzkich fragmentów materiału genetycznego. W trakcie reakcji PCR powstaje od 10^{12} do 10^{15} cząsteczek DNA (Kwok i Higuhi 1989). Podczas otwierania probówek lub przenoszenia roztworów PCR z jednej probówki do innej, do otaczającego środowiska zostają uwolnione kropelki niewidocznego aerozolu, z których każda może zawierać od 10^5 – 10^9 cząsteczek współczesnego materiału genetycznego (Willerslev i Cooper 2005). To oznacza, że ilość uwolnionego DNA może nawet tysiąc razy przekraczać ilość mitochondrialnego endogenego DNA jaki może być obecny w jednym gramie w wielu kopalnych próbkach (10^5 – 10^6 cząsteczek na gram) (Willerslev i Cooper 2005). Kropelki aerozolu zawierające egzogeny DNA mogą osiadać na włosach, skórze i ubraniach badaczy, a także na sprzętach i otaczających powierzchniach (Champlot i in. 2010). Dlatego badania kopalnego DNA nie mogą być prowadzone w laboratoriach współczesnego DNA, ani w pomieszczeniach, w których kiedykolwiek badano współczesny materiał genetyczny.

2.5. Warunki i metodyka pracy z kopalnym DNA

Laboratoria przeznaczone tylko do badań aDNA powinny być fizycznie odizolowane od laboratoriów współczesnego DNA, najlepiej gdyby znajdowały się w osobnym budynku. Personel pracujący z aDNA powinien ściśle przestrzegać kierunku przemieszczania się - zawsze od laboratorium kopalnego DNA do współczesnego, a nigdy odwrotnie (Willerslev i Cooper 2005). Przestrzeganie tej zasady skutecznie zabezpiecza przed przenoszeniem obcego DNA i produktów amplifikacji PCR (z ang. *carry-over*). Ponadto laboratoria przeznaczone do badań aDNA powinny posiadać system wentylacji wytwarzający nadciśnienie (wypychający powietrze na zewnątrz pomieszczenia) zaopatrzony w wysokiej jakości filtry HEPA, a także system lamp wytwarzających promieniowanie UVC. Powierzchnie pracy powinny być często czyszczone podchlorynem sodu NaOCl lub innymi środkami niszczącymi DNA

(Champlot i in. 2010). Laboratorium musi posiadać służbę, pomieszczenie do czyszczenia i nawiercania materiałów kostnych, jak również osobne pomieszczenie do ekstrakcji DNA i nastawiania reakcji PCR, zaopatrzone w odpowiedniej klasy czystości komory laminarne i komory do przygotowywania reakcji PCR. Pracownicy sterylnego laboratorium muszą nosić kombinezony, maseczki, podwójne rękawice, a także obuwie przeznaczone tylko do użytkowania w pomieszczeniu laboratoryjnym (Knapp i in. 2011).

Zabezpieczenie przed kontaminacjami współczesnym DNA, to nie tylko osobne laboratorium spełniające określone warunki techniczne, to także przestrzeganie odpowiednich zasad na wszystkich etapach pracy z kopalnym DNA, począwszy od wydobycia i badania szczątków, aż do izolacji materiału genetycznego i nastawiania reakcji PCR. Badacze, którzy jako pierwsi mają styczność z kopalnym materiałem tj. archeolodzy i antropolodzy powinni używać jednorazowych rękawic (do każdej próby osobnych), maseczek i kombinezonów, by nie zanieczyścić badanych szczątków swoim własnym DNA. Zgodnie z Sampietro i wsp. (2006) to właśnie osoby, które zajmują się wydobyciem, segregacją materiałów i analizą antropologiczną szczątków kostnych są najczęstszym źródłem obcego DNA, a nie koniecznie osoby przeprowadzające izolację aDNA. Materiał kostny nie powinien być czyszczony wodą, co jest często praktykowane przez antropologów, ponieważ może ona spowodować przemieszczanie się kontaminującego DNA poprzez pory do wnętrza tkanki kostnej. Woda może także spowodować powstanie uszkodzeń hydrolitycznych w kopalnym DNA (Yang i Watt 2005). Na materiał kostny nie powinno się działać substancjami chemicznymi w postaci klejów, ponieważ mogą one być inhibitorami reakcji PCR i przyciągać zanieczyszczenia w postaci egzogenego DNA (Nicholson i in. 2002). Materiały przeznaczone do analiz aDNA powinny być zawinięte w folię aluminiową i przechowywane w plastikowych lub papierowych woreczkach umieszczonych w suchym i chłodnym miejscu, najlepiej w -20°C w zamrażarce, w celu zabezpieczenia ich przed dalszą degradacją DNA. Nie mogą być one przechowywane wraz ze współczesnym materiałem, po to by nie doszło do tzw. zanieczyszczenia krzyżowego (ang. *cross-contamination*) (Yang i Watt 2005).

Przeważającą część prób kostnych przeznaczonych do izolacji aDNA stanowią obiekty muzealne, a także szkielety pochodzące ze zbiorów antropologicznych, które nie były pozyskiwane z myślą o badaniach kopalnego DNA i w związku z tym nie były pobierane zgodnie z zachowaniem wyżej opisanych zasad. W ich przypadku

powinno się zachować szczególną ostrożność i zastosować możliwie jak najbardziej skuteczne metody oczyszczania w celu pozbycia się ewentualnych kontaminacji w postaci obcego DNA.

Sposobów czyszczenia prób przeznaczonych do analiz aDNA jest bardzo wiele, podobnie jak sposobów izolacji DNA. Z reguły laboratoria wybierają metodyki w sposób indywidualny i modyfikują je zgodnie z własnymi potrzebami. W celu usunięcia kontaminacji egzogennym DNA można stosować naświetlanie promieniami UVC, przemywanie rozcieńczonym kwasem solnym lub też przemywanie silnie utleniającymi odczynnikami w postaci NaOCl. NaOCl niszczy DNA i może być używany nie tylko do przemywania powierzchni kości i zębów, ale także do przemywania już rozdrobnionej tkanki kostnej (proszku kostnego lub zębnego). Skuteczność działania NaOCl degradującego obcy DNA potwierdziły badania Kemp i Smith (2005). Także Malmström i wsp. (2007) oraz Dissing i wsp. (2008) stwierdzili, że traktowanie proszku zębnego lub kostnego podchlorynem sodu, skutecznie redukuje zanieczyszczenia w postaci egzogenego DNA, nie niszcząc jednocześnie w znaczących ilościach endogenego materiału genetycznego. Endogeny DNA jest odporny na działanie NaOCl prawdopodobnie dzięki adsorbcji na hydroksyapatycie (Kemp i Smith 2005) lub zamknięciu wewnątrz jego kryształów. Z kolei hydroksyapatyt nie jest wrażliwy na działanie podchlorynu sodu (Salamon i in. 2005).

Istnieją różne metody rozdrabniania materiału w celu uzyskania proszku kostnego lub zębnego do izolacji DNA. Fragmenty kości i zęby można pulweryzować w młynkach lub młynkach z ciekłym azotem, ale wiąże się to ze zniszczeniem całej próby. Mniej inwazyjną metodą jest nawiercanie materiałów kostnych. Pozwala to na zachowanie większej części kości lub zębów, co może być istotne w badaniach cennych okazów (Rohland i in. 2004, Asher i Hofreiter 2006). Adler i wsp. (2011) stwierdzili, że nawiercanie zębów przy różnych prędkościach wiertła (100 i 1000 RPM) i pulweryzacja w młynkach, mogą w zmienny sposób wpływać na ilość uzyskanego aDNA. Przeprowadzone badania wykazały, że znacząco mniej DNA można uzyskać z prób, które nawiercane są wiertłami z prędkością 1000 RPM, co ma prawdopodobnie związek z wytwarzającą się podczas wiercenia wysoką temperaturą niszczącą cząsteczki DNA. Natomiast nawiercanie zębów z mniejszą prędkością (100 RPM) i rozkruszanie w młynkach nie wpływają znacząco na ilość otrzymanego materiału genetycznego (Adler i in. 2011).

Kolejnym etapem pracy jest ekstrakcja kopalnego DNA, która składa się z dwóch faz. Celem pierwszej fazy jest odwapnienie tkanki kostnej, a także eliminacja białek w postaci kolagenu, białek błonowych, a także białek histonowych i niehistonowych. W fazie tej do proszku zębnego dodaje się kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA), proteinazę K (Yang i in. 1998), w niektórych przypadkach również mocznik. Zgodnie z Rohland i Hofreiter (2007) wyżej wspomniane substancje, dobrane w odpowiednich proporcjach tworzą bufor ekstrakcyjny, który w określonej temperaturze po odpowiednio długim czasie jest w stanie uwolnić cząsteczki DNA z pozostałości struktur komórek kostnych. Tak uwolniony DNA może być następnie zagęszczony na mikrokoncentratorach, których anizotropiczne membrany zatrzymują makrocząsteczki łącznie z DNA, a przepuszczają cząsteczki o niższym ciężarze molekularnym. W ten sposób zmniejszona objętość roztworu powoduje jednoczesny wzrost stężenia DNA (Yang i in.1998).

Oczyszczanie i izolację DNA można prowadzić wieloma metodami. Wydajność metod izolacji może być różna i zależna od rodzaju próby (Rohland i Hofreiter 2007). Kopalny DNA może być izolowany: poprzez wiązanie z krzemionką (Höss i Pääbo 1993; Prado i in. 1997; Yang i in. 1998; Kemp i in. 2006; Rohland i Hofreiter 2007), metodą organiczną - mieszaniną fenol-chloroform (Hänni i in. 1995), poprzez precypitację etanolem lub izopropanolem (Cattaneo i in. 1995), na kulkach magnetycznych (Caldarelli-Stefano i in. 1999) lub metodą z użyciem Chelexu (Faerman i in. 1995).

Można ulepszać metody izolacji poprzez stosowanie dodatkowych odczynników jak bromek cetylotrimetyloamoniowy (CTAB) (Yang i in. 1997), czy izotiocyanianu guanidyny (GuSCN) (Rohland i Hofreiter 2007). Istnieje także możliwość stosowania dodatkowych metod oczyszczania ekstraktu, mających na celu zwiększenie ilości zdolnych do amplifikacji cząsteczek aDNA, jak np. oczyszczanie na kolumnach jonowymiennych (Kim i in. 2008).

Oczyszczony aDNA jest wykorzystywany do amplifikacji wybranych fragmentów materiału genetycznego. Ze względu na małą liczbę matryc wejściowych aDNA, liczba cykli reakcji PCR musi być większa niż w przypadku współczesnego materiału genetycznego. Z reguły znajduje się w przedziale od 40-60 cykli i wymaga zastosowania odpowiednich polimeraz DNA, które nie tracą swojej aktywności przez dłuższy okres czasu. Ze względu na liczne uszkodzenia cząsteczek

aDNA stosowane polimerazy muszą być także dokładne w odczytywaniu sekwencji zasad, co jest szczególnie istotne w przypadku badania zmienności genetycznej pojedynczych nukleotydów (SNP).

W badaniach aDNA, najczęściej stosowanymi polimerazami są Amplitaq Gold (Applied Biosystems) i Platinum Taq HiFi (Invitrogen) (Shapiro 2008). Jak wykazał Brotherton i wsp. (2007) odznaczają się one wysoką dokładnością odtwarzania informacji genetycznej i podobną skutecznością działania. Nadal jednak poszukuje się polimeraz, które nie będą wrażliwe na zmiany chemiczne *post-mortem*, jakie zachodzą w kopalnym DNA. d'Abbadie i wsp. (2007) zrekombinowali geny polimeraz z rodziny A (DNA pol I), pochodzące z trzech gatunków bakterii – *T. aquaticus*, *T. thermophilus* i *T. flavus*, dzięki czemu stworzyli enzymy, które są aktywne i wydłużają łańcuchy DNA pomimo obecności uszkodzeń tj. modyfikacji zasad, braku parowania, czy miejsc AP. Z kolei McDonald i wpół. (2006) zidentyfikowali nowe polimerazy – chimery należące do rodziny Y- polimeraz, podobne do DPo4, które znajdowane są w archeonach (*Archaea*). Polimerazy z rodziny Y, odznaczają się zdolnością do wydłużania łańcuchów DNA pomimo obecności różnego rodzaju uszkodzeń. Podobnie pochodna DPo4 wydłużała łańcuchy zarówno nieuszkodzonego DNA jak i tego uszkodzonego, a także wstawiała prawidłowe nukleotydy naprzeciwko uszkodzonych zasad. Minusem polimeraz z rodziny Y jest znacząco mniejsza dokładność w replikacji w stosunku do polimeraz z rodziny A. Ta właściwość spowodowała, że McDonald i wsp. (2006) użyli kombinacji polimeraz z rodziny Y i A w reakcji PCR na DNA, który był uszkodzony promieniami UV. Wykazali oni, że kombinacja polimeraz z rodziny A i Y przewyższała znacząco skuteczność działania pojedynczych polimeraz z rodziny A, jak również AmplitaqGold czy standardowej *Taq*.

Jak podkreśla Shapiro (2008) powyższe metody uzyskiwania nowych jeszcze bardziej skutecznych polimeraz wydają się bardzo obiecujące, ale nadal wymagane jest przeprowadzenie dalszych badań w tym zakresie.

Ze względu na fragmentację materiału genetycznego, startery stosowane w reakcjach PCR powinny umożliwiać amplifikację krótkich fragmentów DNA (do około 100 pz). Zgodnie z Malmström i wsp. (2007) stosowanie starterów na krótsze fragmenty DNA zwiększa szansę ich uzyskania i jednocześnie zmniejsza ryzyko powielenia fragmentów kontaminującego egzogenne DNA. Równocześnie wraz

ze zmniejszeniem długości amplifikowanych fragmentów następuje znaczący wzrost względnego udziału matrycy endogennego DNA.

2.6. Weryfikacja autentyczności wyników badań kopalnego DNA

Badacze zajmujący się kopalnym DNA stworzyli kryteria, które powinny zostać spełnione, po to by zwiększać skuteczności otrzymania autentycznych wyników (Cooper i Poinar 2000; Poinar 2003; Pääbo i in. 2004; Gilbert i in. 2005; Rohland i Hofreiter 2007). Kryteria te oprócz warunków technicznych czyli fizycznego odizolowania laboratorium, w którym prowadzone są badania aDNA, uwzględniają również wykonywanie kontroli negatywnych ekstrakcji i amplifikacji, po to by obserwować obecność ewentualnych zanieczyszczeń na każdym etapie badań aDNA (Cooper i Poinar 2000). Ze względu na możliwość kontaminacji odczynników używanych do ekstrakcji czy amplifikacji zaleca się ich kontrolę i ewentualną sterylizację promieniami UVC w crosslinkerze UV. Tym sposobem można likwidować obcy DNA, który może być obecny w buforach do ekstrakcji materiału genetycznego, a także w wodzie, probówkach, pipetach czy na statywach. Można wykonywać również analizę wielkości otrzymanego produktu – fragmenty większe niż 1000 pz (a często nawet większe niż 300 pz) mogą świadczyć o obecności zanieczyszczenia w postaci współczesnego materiału genetycznego (Poinar 2003). Określenie liczby kopii aDNA można wykonywać przy użyciu techniki real-time PCR, która umożliwia oznaczenie ilości początkowej matrycy aDNA. Jeśli otrzymana liczba cząsteczek wejściowych będzie mniejsza niż 1000, to w tym momencie, nie można wykluczyć obecności zanieczyszczenia w postaci egzogennej matrycy genetycznej (Poinar 2003). Bardzo istotna z punktu widzenia badań kopalnego DNA jest również powtarzalność wyników. Od każdego osobnika powinny być pobrane co najmniej dwa zęby lub dwa fragmenty kości, a otrzymane z osobnych ekstraktów i amplifikacji wyniki powinny być identyczne (w obrębie tego samego osobnika) (Cooper i Poinar 2000). Kolejną bardzo ważną czynnością jest klonowanie produktów PCR w wektorach bakteryjnych i następnie sekwencjonowanie klonów w celu określenia liczby endogennych i egzogennych sekwencji, a także liczby zmian spowodowanych uszkodzeniami aDNA. Posiadanie wielu sekwencji klonów pochodzących z różnych amplifikacji pozwala sprawdzić prawidłowość pozycji każdego z nukleotydów w DNA

i ustalić sekwencję konsensusową (Ho i Gilbert 2010). Można także przeprowadzić niezależną replikację obejmującą ekstrakcję, amplifikację i sekwencjonowanie osobnych próbek aDNA z tego samego osobnika w innym niezależnym laboratorium, a przeprowadzone badania powinny kończyć się otrzymaniem tych samych rezultatów (Poinar 2003). Stopień zachowania DNA można badać w sposób pośredni poprzez analizę biochemiczną biomolekuł, których obecność może korelować z obecnością DNA. Przykładem tego jest ocena zawartości kolagenu lub stopnia racemizacji aminokwasów (Cooper i Poinar 2000). Z kolei analiza towarzyszących szczątków zwierzęcych pod kątem obecności kontaminacji w postaci ludzkiego DNA może stanowić dodatkową kontrolę negatywną na etapach ekstrakcji i amplifikacji kopalnego DNA (Poinar 2003; Malmström i in. 2007).

Przydatną metodą może być umieszczenie prowadzonych badań aDNA w określonej kategorii „ryzyka kontaminacjami obcym DNA”. Jak podaje Gilbert i wsp. (2005) takich kategorii są cztery. Próby o największym ryzyku kontaminacji stanowią materiały ludzkie. Próby o wysokim ryzyku kontaminacji to paleopatogeny i mikroorganizmy. Z kolei do prób o średnim ryzyku kontaminacji zaliczane są badania udomowienia zwierząt i roślin. Niektóre gatunki zwierząt jak świnie, krowy czy kury mogą być łatwiej zanieczyszczone, w związku z tym zaliczane są do wysokiego ryzyka. Do ostatniej kategorii o niskim ryzyku kontaminacji zaliczane są badania pozostałych organizmów. Oczywiście system kategoryzacji wymaga pewnej elastyczności czego przykładem są badania mtDNA Neandertalczyka, którego region hiperzmienny - HVR (ang. *hypervariable region*) różni się w istotnym stopniu od ludzkiego współczesnego HVR. W związku z powyższym ryzyko badań może być zaliczone do kategorii średniej. Ale już fragmenty regionu kodującego mtDNA mogą być na tyle podobne do ludzkiego współczesnego DNA, że ryzyko kontaminacji może wzrosnąć do poziomu najwyższego.

Jak podkreśla Gilbert i wsp. (2005) spełnienie wszystkich kryteriów może nie gwarantować uzyskania autentycznych wyników, ale jednocześnie nie spełnienie niektórych z nich nie musi oznaczać, że otrzymane rezultaty nie są autentyczne. Istotne jest aby zastanowić się i przeanalizować historię aktualnie badanych prób - określić ich wiek, rodzaj środowiska z którego pochodzą oraz to czy stopień zachowania materiału może sugerować przetrwanie w nich kopalnego DNA. Warto przeanalizować również to czy natura próbek, rodzaj amplifikowanych fragmentów DNA i ilość osób, która miała styczność z materiałem mogą zwiększać ryzyko

wystąpienia kontaminacji. Ważne są także rezultaty, a zatem czy otrzymane sekwencje mogą być autentyczne czy są raczej efektem uszkodzeń, „jumping PCR” lub kontaminacji i czy mają sens filogenetyczny i jest ich wystarczająco dużo aby były użyteczne i wspierały wyciągane wnioski.

2.7. Przykłady zastosowań badań kopalnego DNA i nowe możliwości badawcze

Badania kopalnego DNA umożliwiają paleogenetykom poznawać określone aspekty historii poprzez bezpośredni wgląd w materiał genetyczny organizmów żyjących w przeszłości. Pomimo że analizy aDNA są stosunkowo wąskim obszarem nauki, to mają one swój istotny udział nie tylko w analizach DNA populacji ludzkich, ale także zwierzęcych, w archeobotanice i paleoepidemiologii.

Kopalny mitochondrialny DNA wraz z markerami mikrosatelitarnymi autosomalnego DNA i chromosomu Y może być używany do określania pokrewieństwa między osobnikami. Jedną ze słynniejszych spraw z zastosowaniem powyższych markerów była zakończona powodzeniem identyfikacja zwłok ostatniego cara Rosji Romanowa i członków jego rodziny (Rogaev i in. 2009; Coble i in. 2009). W podobny sposób badano pokrewieństwo między trzema osobnikami znalezionymi w grobie Brigera Magnussona, założyciela Sztokholmu, zmarłego w 1266 roku (Malmström i in. 2011). Badania kopalnego mtDNA zostały wykorzystane także do genetycznej próby identyfikacji szczątków Mikołaja Kopernika (Bogdanowicz i in. 2009) oraz do oceny pokrewieństwa między ostatnim królem Wikingów Svenem Estridsenem i kobietą uważaną za jego matkę - Estrid (Dissing i in. 2007).

Podobnie jak badania pokrewieństwa, również określenie płci szczątków ludzkich znajdujących na stanowiskach archeologicznych jest istotne, umożliwia bowiem poznanie społecznej i biologicznej struktury populacji historycznych i rekonstrukcję procesów demograficznych jakie zachodziły w przeszłości (Daskalaki i in. 2011). Niestety nie zawsze możliwe jest morfologiczne oznaczenie płci, szczególnie wtedy gdy mamy do czynienia ze słabo zachowanym materiałem kostnym lub ze szkieletami dziecięcymi. W takiej sytuacji można zastosować metody molekularne, bazujące na analizie długości fragmentu genu amelogeniny, który zlokalizowany jest na chromosomach X i Y. Insety w genach znajdujących się w obu

loci różnią się długością, co przekłada się na długość amplifikowanych fragmentów. Molekularne metody zostały wykorzystane między innymi do oznaczenia płci szkieletów niewolników poświęconych jako ofiary, które znaleziono w grobowcach Qin State w Chinach (Zhang i wsp. 2011), płci średniowiecznych szkieletów dziecięcych (Witas i in. 2005), a także płci szkieletów dziecięcych z czasów rzymskich znalezionych w Wielkiej Brytanii (Mays 2001) oraz określenia płci czaszek z Turcji datowanych na 9400 lat (Matheson i Loy 2001).

Dzięki nowym wysoko przepustowym metodom sekwencjonowania (NGS, ang. *next generation sequencing*), możliwe stało się odczytanie sekwencji całych kopalnych genomów mitochondrialnych, a także dużych części kopalnego jądrowego DNA. Sekwensatory „nowej generacji”, takie jak 454 Life Sciences GS FLX czy Illumina wykorzystano między innymi do sekwencjonowania genomów mitochondrialnych Neandertalczyka (Green i in. 2010), hominina z Denisova z południowej Syberii (Krause i in. 2010) czy australijskiego Aborygena (Rasmussen i in. 2011). W przypadku Neandertalczyka odczytano dodatkowo około 4 miliardy par zasad genomu jądrowego. Uzyskane informacje potwierdziły między innymi, że przed rozdzieleniem się grup Euroazjatyckich mógł istnieć przepływ genów między Neandertalczykami, a przodkami ludzi współczesnych (Green i in. 2010).

Analizy kopalnego DNA mają swój istotny udział w archeozoologii. Wiele uwagi poświęca się kwestii udomowienia zwierząt takich jak koni (Ludwig i in. 2009), świń (Larson i in. 2007), osłów (Kimura i in. 2010), owiec (Cai i in. 2011) czy psów (Malmström i in. 2008). W wielu przypadkach badania aDNA są jedyną drogą do poznania biologii wymarłych gatunków takich jak: mamuty włochate (Gilbert i in. 2008b), moa (Allentoft i in. 2009), nosorożce włochate (Willerslev i in. 2009), niedźwiedzie jaskiniowe (Krause i in. 2008; Bon i in. 2008) czy tygrysy tasmańskie (Miller i in. 2009). Na szeroką skalę prowadzone są także badania megafauny plejstoceniowej obejmujące oprócz mamutów i nosorożców włochatych także konie, renifery, bizony i woły piżmowe (Lorenzen i in. 2011), niedźwiedzie polarne (Edwards i in. 2011) czy jelenie szlachetne (Stanković i in. 2011). Celem powyższych badań jest prześledzenie ewolucji różnych gatunków, w tym określenia czasu i warunków oddzielenia się poszczególnych linii, a także oznaczenia wpływu zmian klimatycznych i pojawienie się człowieka na zmniejszenie liczby lub wymarcie poszczególnych gatunków zwierząt.

Analizy kopalnego DNA mogą wspomagać także botaników. Większość prac z zakresu archeobotaniki dotyczy roślin uprawnych, głównie zbóż i owoców, w tym ryżu (Jones and Brown 2000), pszenicy (Li i in. 2011) czy winogron (Cappellini i in. 2010). W określonych regionach geograficznych takich jak jaskinie czy pustynie, materiał genetyczny roślin uprawnych może przetrwać dzięki procesowi desykcacji (Schlumbaum i in. 2008). Znane są przykłady badań kopalnego materiału genetycznego roślin znalezionych na stanowiskach archeologicznych w Egipcie, w tym rzodkiewki (O'Donghue i in. 1994) czy papirusa (Marota i in. 2002). Prowadzone były także badania DNA kukurydzy w celu określenia sposobu w jaki udomowione gatunki tej rośliny przedostały się do Ameryki Południowej (Lia i in. 2007). Porównanie na poziomie genetycznym współczesnych udomowionych roślin z ich przodkami, stwarza możliwość poznania sposobów selekcji tych roślin podczas procesu udomawiania (Schlumbaum i in. 2008). Z kolei analizy aDNA drzew (Liepelt i in. 2006) umożliwiają badanie ewolucyjnie wykształconego zróżnicowania genetycznego populacji tych roślin (Tani i in. 2003), a także rekonstrukcję geograficznego pochodzenia różnych gatunków drewna np. dębowego (Deguilloux i in. 2003).

Dzięki sekwencjonowaniu „nowej generacji” bardziej efektywne stały się badania aDNA mieszanin organizmów znajdujących się w glebach, osadach lodowcowych lub osadach organicznych. Metody te wykorzystano między innymi do oznaczenia Panarktycznej flory i rekonstrukcji dawnej Arktycznej wegetacji oraz klimatu (Sønstedt i in. 2010).

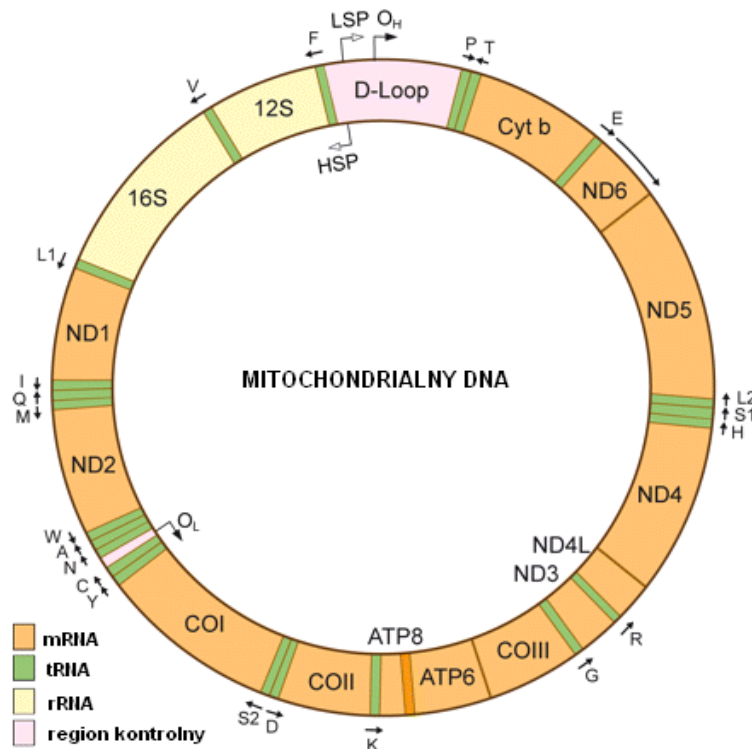
Badania kopalnego DNA są także częścią paleoepidemiologii, która obejmuje między innymi badania alleli predysponujących do wystąpienia chorób autoimmunologicznych (Witas i in. 2007), a także identyfikację bakterii, wirusów lub pasożytów obecnych w kopalnych próbach. Dzięki analizom aDNA udało się zidentyfikować między innymi: wirus (*Anelloviridae*) z 200-letniego zęba pochodzącego od jednego z członków Armii Napoleona (Bédarida i in. 2011), a także bakterie *Yersinia pestis* (Tran i in. 2011; Haensch i in. 2010), bakterie *Mycobacterium tuberculosis* na szkieletach ze stanowisk archeologicznych w Egipcie (Zink i in. 2001), bakterie *Mycobacterium tuberculosis* wraz z *Mycobacterium leprae* na szkieletach z grobu w Akeldama z Izraela (Matheson i in. 2009), pasożyty *Trypanosoma cruzi* (świdrowce) na szkieletach z Ameryki Południowej, odpowiedzialne za chorobę Chagasa (Aufderheide i in. 2004) czy *Plasmodium*

falsiparum (zarodźca sierpowego) odpowiedzialnego za przenoszenie malarii, obecnego na mumiach egipskich należących do członków rodziny Tutenchamona (Hawass i in. 2010).

3. Mitochondrialny DNA w analizach populacji ludzkich

3.1. Charakterystyka mitochondrialnego DNA

Mitochondrialny DNA jest dwuniciową, kolistą cząsteczką, liczącą 16569 par zasad. Składa się on z regionu kodującego, który ma w sumie 37 genów, nie zawierających intronów, w tym 13 genów kodujących białkowe produkty uczestniczące w fosforylacji oksydacyjnej, 2 geny rybosomowego RNA (rRNA) i 22 geny tRNA (Brown 1980). Oprócz regionu kodującego w mtDNA występuje region kontrolny (zwany również pętlą D, długości 1122 pz), który jest odpowiedzialny za regulację transkrypcji oraz inicjację replikacji (Foran i in. 1988). W pętli D można wyróżnić dwa hiperzmienne regiony zwane HVRI i HVRII (ang. *hypervariable region I i II*) (Rycina 3).



Rycina 3. Schemat ludzkiego genomu mitochondrialnego (według Park i Larsson 2011).

Po raz pierwszy całkowita sekwencja genomu mitochondrialnego została opublikowana w 1981 roku. Genom mitochondrialny pochodził z europejskiej próby łożyska ludzkiego. Jego sekwencja została odczytana z pomocą bydłowego genomu mtDNA oraz linii afrykańskich komórek HeLa (Anderson i in. 1981). Została ona określona jako sekwencja referencyjna z Cambridge - CRS (ang. *Cambridge reference sequence*). W 1999 roku Andrews i wsp. ponownie przeanalizowali sekwencję CRS i znaleźli kilka błędnie podstawionych nukleotydów. Poprawiona sekwencja nazywa się rCRS (ang. *revised Cambridge reference sequence*) i należy do europejskiej haplogrupy H (numer akcesyjny w GenBanku: NC_012920.1). Do sekwencji referencyjnej rCRS porównywane są kolejno otrzymywane genomy mitochondrialne.

MtDNA jako haploidalny marker ma istotne cechy, dzięki którym może być wykorzystywany w badaniach populacyjnych i ewolucyjnych. Pierwszą istotną cechą jest to, że dziedziczony jest tylko w linii żeńskiej, bez rekombinacji. W przeciwieństwie do jądrowego DNA, który występuje tylko w dwóch kopiach, liczba kopii mitochondrialnego DNA jest znacznie większa i wynosi średnio od 1000 - 10000 w komórce (Giles i in. 1980). Kopie mtDNA obecne u danego osobnika są z reguły identyczne. Czasem jednak mogą pojawić się inne typy mtDNA, co jest nazywane zjawiskiem heteroplazmii. Częstość heteroplazmii zależy od sposobu jej szacowania i średnio przyjmuje się, że u 14% populacji ludzi, drugi typ mtDNA występuje z częstością 1% (Tully i in. 2000).

Kolejną istotną cechą mitochondrialnego DNA, ważną z punktu widzenia badań filogenetycznych jest wysoka częstością mutacji, znacznie przewyższająca częstość mutacji występujących w jądrowym DNA. Najwięcej zmian nukleotydowych pojawia się w regionach HVR I i HVR II mtDNA. Według Soaresa i wsp. (2009) częstość mutacji regionu HVR I w pozycjach nukleotydowych od 16051 do 16400 (z wyłączeniem nukleotydów w miejscach 16182C, 16183C, 16194C i ciągu poli-C z wariantem 16189C) to jedna zmiana nukleotydowa na 16 677 lat, a w regionie HVR II w pozycjach nukleotydowych od 68-263, to jedna mutacja na 22 388 lat. Z kolei w całym regionie kontrolnym jedna mutacja pojawia się raz na 9058 lat. Informacje na temat częstości mutacji istotne są dla tworzenia „zegarów molekularnych”. Zegary te, po odpowiedniej kalibracji wykorzystywane są do szacowania czasu i miejsca powstania określonych kładów mitochondrialnego DNA.

Na podstawie badań filogenetycznych stwierdzono, że starsze gałęzie drzewa filogenetycznego mtDNA wykazują większą ilość mutacji synonimicznych niż

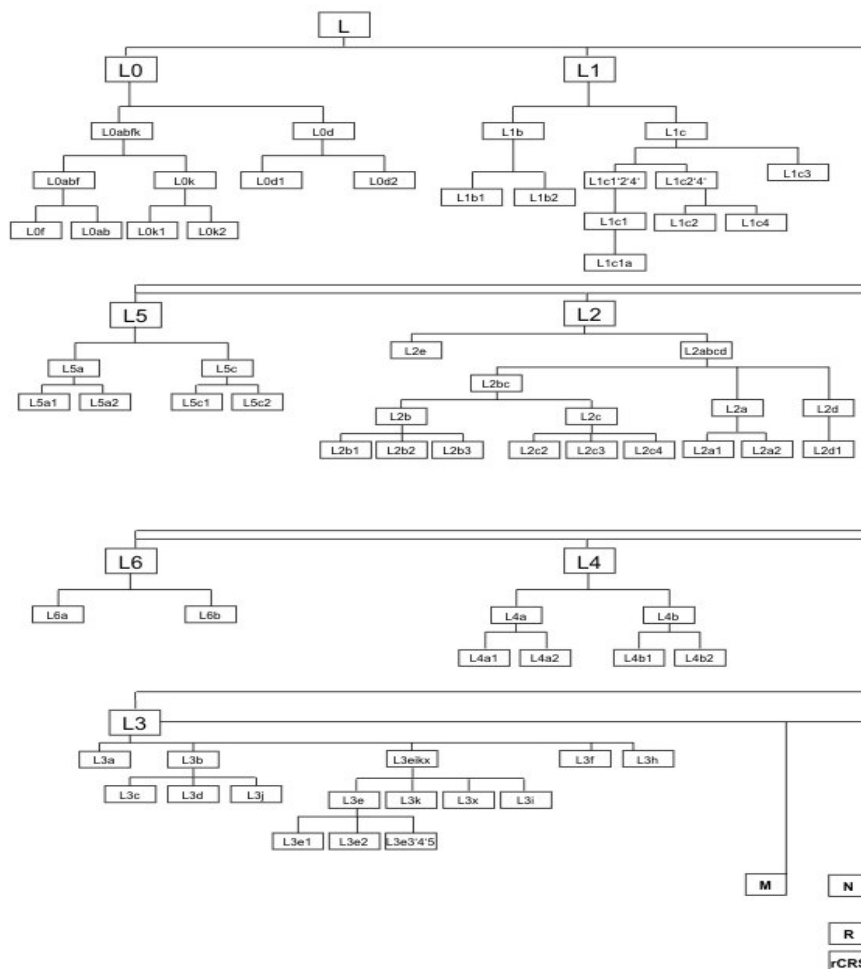
młodsze, z kolei młodsze gałęzie prezentują większą ilość niesynonimicznych mutacji w genach kodujących białka, a także substytucji w genach RNA (Kivisilid i in. 2006). Zgodnie z Soaresem i wsp. (2009) jedyną klasą mutacji, która może nie podlegać selekcji są mutacje synonimiczne. Stwierdzili oni także, potwierdzając jednocześnie badania Kivisilida i wsp. (2006), że akumulacja mutacji w mtDNA jest nieliniarna i jest rezultatem selekcji oczyszczającej, której w sposób stopniowy, ale ciągły podlegają linie zawierające „mutacje o małej szkodliwości”.

W genomie mitochondrialnym wyróżnia się pewne pozycje nukleotydowe zwane „gorącymi miejscami” (ang. *hot spots*), w których częstość mutacji znacznie przewyższa średnią częstość mutacji charakterystyczną dla innych miejsc w mtDNA. Pozycje te występują zarówno w regionie HVR I jak i HVR II. Wśród „miejsc gorących” w HVR I można wyróżnić między innymi pozycje: 16093, 16129, 16189, 16311 i 16362, a w HVR II: 152, 146, 150 i 195 (Malyarchuk i in. 2002a). Do szybko ewoluujących miejsc zalicza się także pozycję 16519 (Salas i in. 2007). Mutacje w „gorących miejscach” mogą ulegać rewersji przez co w wielu przypadkach stają się niezauważalne.

3.2. System kasyfikacji mitochondrialnego DNA

W drzewie filogenetycznym mtDNA istnieje sieć haplotypów, w której główne gałęzie oznaczane są przez pozycje regionu kodującego natomiast młodsze, boczne odgałęzienia wyznaczane są przez miejsca regionu kontrolnego, o szybszym tempie mutacji (Macaulay i in. 1999). Na podstawie badań Richardsa i wsp. (1998) oraz Maculaya i wsp. (1999) został opracowany filogenetyczny system klasyfikacji mtDNA. Zgodnie z ich zasadami mitochondrialny DNA populacji ludzkich reprezentowany jest przez kombinacje grup (haplogrup lub kładów) różnych typów (haplotypów) mtDNA. Haplotypy mtDNA wchodzące w skład haplogrup prezentują określone warianty sekwencji, pochodzącej od wspólnego przodka. Haplogrupy mtDNA oznaczane są dużymi rzymskimi literami jak np. H, K, J, U, natomiast ich podgrupy (podklady) naprzemiennie dodatnimi liczbami całkowitymi i małymi literami rzymskimi np. J1, J1b, J1b2, itp. Superklady, które składają się z sekwencji należących do różnych kładów oznaczane są przez połączenie nazw tych kładów np. HV (Richards i in. 2000). Nienazwane klady będące częścią poznanych wcześniej

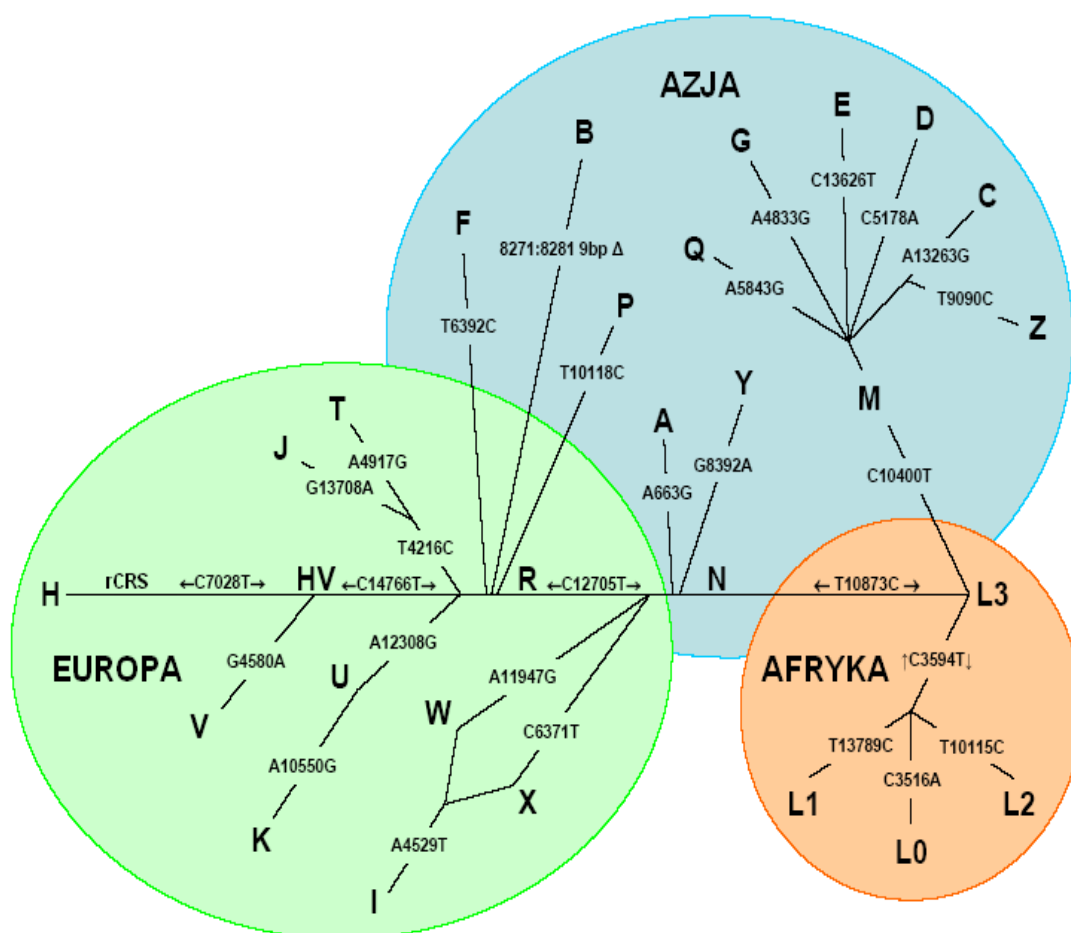
haplogrupy oznaczane były z przedrostkiem „pre”. Obecnie haplogrupę pre-HV określa się jako R0, a haplogrupę pre-V jako HV0 (Torrioni i in. 2006). Haplogrupy mtDNA są definiowane przez motywy, obejmujące poszczególne mutacje znajdujące się w określonych pozycjach zarówno regionu kontrolnego jak i regionu kodującego (Salas i in. 2007). Mitochondriany DNA wykazuje duże zróżnicowanie dla różnych regionów geograficznych świata. Najgłębiej „zakorzenione” gałęzie mitochondrialnego drzewa znajdują się w części sub-Saharyjskiej Afryki. Na kontynencie tym znajdują się najbardziej zróżnicowane i najstarsze haplogrupy mtDNA, takie jak: L0, L1, L2, L3a, L3bcd, L3eix, L3f, L3h, L4, L5, i L7 (Rycina 4) (Torrioni i in. 2006). Ich występowanie ograniczone jest głównie do populacji afrykańskich, ale mogą pojawiać się także w innych częściach świata wskutek przepływu genów, który następował w ostatnich kilku tysiącach lat i był związany chociażby z migracjami niewolników z Afryki.



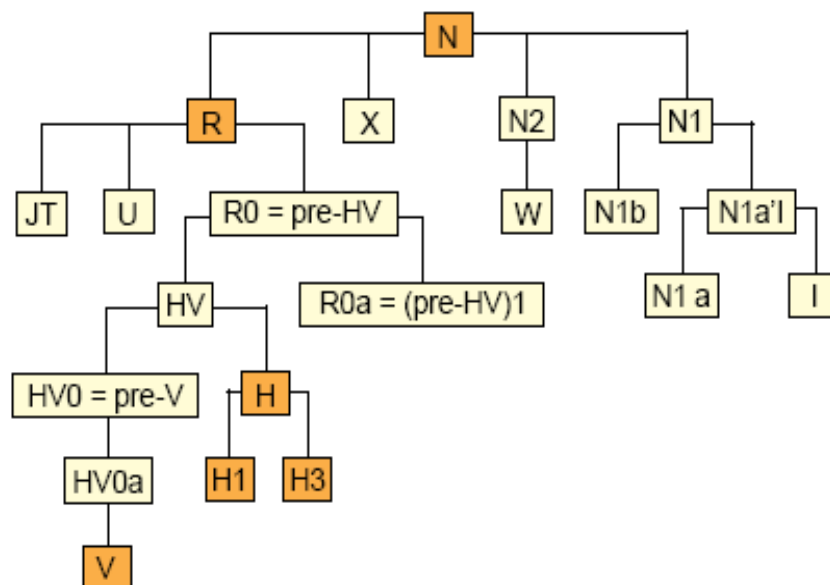
Rycina 4. Drzewo filogenetyczne haplogrup należących do makrohaplogrupy L (na schemacie nie uwzględniono wszystkich znanych haplogrup L) (źródło: Institute of Legal Medicine Innsbruck Medical University http://gerichtsmedizin.at/mtdna_phylogeography_africa.html).

Haplogrupa L3 obecna jest zarówno w populacjach afrykańskich jak i nieafrykańskich. Poza Afryką, L3 dzieli się na dwie podhaplogrupy nazywane euroazjatyckimi „makrohaplogrupami” M i N (Rycina 5) (Salas i in. 2007). Ich pojawienie się jest związane z tzw. „wyjściem z Afryki”, które mało miejsce 60 do 80 tysięcy lat temu (Macaulay i in. 2005). Makrohaplogrupa N (Rycina 6) bardzo szybko utworzyła kład R, a z jego korzenia powstały następne odgałęzienia dające początek głównym haplogrupom zachodniej Euroazji, takim jak: R0, JT, U (włączając K), N1 (obejmująca: I, N1a, N1b, N1c i N1d), N2 (łącznie z W), a także X, która jest bezpośrednim odgałęzieniem od korzenia haplogrupy N (Palanichamy i in. 2004).

RYSUNEK A



RYSUNEK B



Rycina 5. Rysunek A: schematyczny obraz drzewa filogenetycznego dla haplogrup europejskich, azjatyckich i afrykańskich; numerami oznaczone są polimorfizmy definiujących przynależność do określonych haplogrup mtDNA (źródło: www.mitomap.org). Rysunek B: schematyczny obraz drzewa filogenetycznego głównych europejskich haplogrup mtDNA (Torrioni i in. 2006).

3.3. Zastosowanie kopalnego mitochondrialnego DNA w badaniach populacyjnych

Wysoki poziom polimorfizmu mtDNA w obrębie populacji o różnym pochodzeniu geograficznym, ale także etnicznym sprawia, że dane na temat zróżnicowania genomu mitochondrialnego są niezwykle istotne w badaniach populacyjnych i ewolucyjnych. Ze względu na dużą ilość kopii mtDNA w komórkach, ich szansa wyizolowania z kopalnych prób jest znacznie większa niż jądrowego DNA. To z kolei sprawia, że marker ten jest często wykorzystywany w badaniach populacji, które istniały kilkaset lub kilka tysięcy lat temu. Przykładów jego zastosowań jest bardzo wiele. Polimorfizm mtDNA wykorzystano między innymi do ustalenia pochodzenia populacji z Jakucji ze wschodniej Syberii (Crubézy i in. 2010), jak również do wyjaśnienia jaki wpływ miały kontakty między populacjami azjatyckimi i europejskimi, cztery tysiące lat temu, na strukturę genetyczną tych populacji (Zhang i in. 2010; Li i in. 2010). Zróżnicowanie kopalnego mtDNA wykorzystano także w badaniach: populacji z wyspy Nukdo w Południowej Korei (Kim i in. 2009),

osobników odkrytych na cmentarzu Zhenzishan w Mongolii (Fu i in. 2009), populacji z Egiptu Gol Valley również z Mongolii (Keyser-Tracqui i in. 2006), osobników znalezionych na cmentarzysku w Liaoning, w Chinach (Wang i in. 2007) czy populacji z południowej Syberii (Keyser i in. 2009). Poza Azją badano także osobniki pochodzące: z XV-XVIII wieku z Wysp Kanaryjskich (Maca-Meyer i in. 2005), z Peru (Shinoda i in. 2006), z Anglii (Töpf i in. 2007), z Sardynii (Caramelli i in. 2007), czy Turcji (Matney i in. 2010).

Dużo prac poświęconych jest badaniom mtDNA populacji neolitycznych. Na podstawie prowadzonych analiz podejmowane są próby określenia w jaki sposób rozprzestrzenił się proces „neolityzacji” i jaki miał wpływ na strukturę genetyczną współczesnych populacji europejskich (Haak i in. 2005; Sampietro i in. 2007; Bramanti i in. 2009; Malmström i in. 2009; Haak i in. 2010; Deguilloux i in. 2011; Lacan i in. 2011; Gamba i in. 2012).

Obecne trendy w badaniach współczesnego mtDNA wskazują, że najwięcej informacji na temat historii populacji można uzyskać poprzez sekwencjonowanie pełnych genomów mitochondrialnych. W przypadku badań kopalnego materiału genetycznego, to zadanie jest utrudnione ze względu na duży stopień degradacji DNA. Sekwencjonowanie pełnych genomów mitochondrialnych pozostaje możliwe jedynie na materiałach, które charakteryzują się obecnością bardzo dobrze zachowanego DNA. Jak dotąd znane są nieliczne, ale za to spektakularne przykłady zastosowania mitogenomiki na próbach kopalnego DNA ludzi. Wśród nich jest wspomniany wcześniej autochtoniczny Australijczyk (Aborygen) (Rasmussen i in. 2011), jak również liczący ponad 4000 lat Paleo-Eskimos z Grenlandii (Gilbert i in. 2008a), czy też liczący ponad 5000 lat Tyrolczyk z Alp (Ermini i in. 2008). Rozwój nowych metod badawczych związanych z technikami wysokoprzepustowego sekwencjonowania, daje szansę na to, że być może w niedalekiej przyszłości sekwencjonowanie pełnych genomów mtDNA będzie można stosować na znacznie większą skalę także w badaniach kopalnych populacji ludzkich.

4. Pochodzenie Słowian na podstawie badań współczesnego DNA

Dotychczasowe badania polimorfizmu współczesnego mitochondrialnego DNA wykazały, że wszystkie populacje europejskie charakteryzuje podobny rozkład

frekwencji haplogrup takich jak: H, V, T, J, K, U, W, I, X i N (Simoni i in. 2000; Grzybowski i in. 2007; Malyarchuk i in. 2003). Populacje słowiańskie także wykazują duży stopień homogenności i nie różnią się w sposób istotny pod względem mtDNA od pozostałych populacji europejskich (Malyarchuk i in. 2002b; Branicki i in. 2005; Grzybowski i in. 2007).

Wyniki z sekwencjonowań pełnych genomów mitochondrialnych oraz analizy chromosomu Y, wnoszą coraz więcej informacji na temat pochodzenia współczesnych Europejczyków, w tym pochodzenia Słowian. Dzięki nim możliwa jest identyfikację nowych podkladów mtDNA i podhaplogrup chromosomu Y, których czas powstania i historia rozprzestrzeniania mogą być potwierdzone danymi pochodzącymi z archeologii, antropologii czy językoznawstwa.

Na bazie przeprowadzonych przez Malyarchuka i wsp. (2008a) analiz mtDNA, zidentyfikowano podhaplogrupy takie jak: U4a2a, U4a2, HV3 i R1a1, charakterystyczne dla populacji słowiańskich. Z punktu widzenia etnogenezy Słowian według Malyarchuka i wsp. (2008a), najistotniejszym podkladem jest U4a2, który prawdopodobnie pochodzi ze środkowo-wschodniej Europy. Okres ekspansji tej podhaplogrupy przypada na czas, w którym w centralnej, północnej i wschodniej Europie obecna była neolityczna kultura ceramiki sznurowej. To z kolei pozwala przypuszczać, że przedstawiciele tej kultury mogą być przodkami współczesnych populacji słowiańskich.

Pochodzenie Słowian badane jest także na podstawie polimorfizmu chromosomu Y. Chromosom Y posiada duży blok DNA (NRY), który nie ulega rekombinacji. Wysoki poziom polimorfizmu regionu NRY, jak również dziedziczenie z ojca na syna, umożliwiają wykorzystanie go do analiz linii męskich w badaniach populacyjnych. Na podstawie badań polimorfizmu SNP i markerów mikrosatelitarnych STR chromosomu Y, zidentyfikowano między innymi specyficzny haplotyp - R1a1-WSL, który ma kombinację alleli - 10,14 i 9,14 w locus o nazwie DYS385ab. Występuje on w wysokiej częstości u Słowian zachodnich. W populacji czeskiej jego frekwencja wynosi 13%, w polskiej 11,5%, a w słowackiej 5%. W pozostałych populacjach jego ilość jest mniejsza, za wyjątkiem regionu Nowogrodu w północno-zachodniej Rosji, gdzie występuje z częstością 7,9% (Woźniak i in. 2010). Autor badań podaje, że specyficzny haplotyp mógł być obecny pośród wczesno-słowiańskich populacji jeszcze przed rozprzestrzenieniem się słowiańszczyzny w VI w. n.e., a stosunkowo wysoka frekwencja R1a1-WSL pośród zachodnich Słowian

zgodnie z hipotezą zaproponowaną przez autorów badań, mogła być związana z „efektem założyciela” spowodowanym małą liczbą osobników, która wzięła udział w migracji Słowian na zachód (Woźniak i in. 2010). Underhill i wsp. (2010) wyodrębnili podklad R1a1a7, który definiowany jest przez mutację M458 na chromosomie Y. Występuje on z częstością ponad 30% w środkowej i południowej Polsce. W pozostałych populacjach Słowian zachodnich i wschodnich pojawia się z częstością ponad 10%, i znacznie mniejszą frekwencją u południowych Słowian i pozostałych populacji europejskich. Według Woźniaka i wsp. (2010) duża część chromosomów (15%) zaliczonych przez Underhilla i wsp. (2010) do pohaplogrupy R1a1a7 ma taki sam haplotyp, jak R1a1-WSL, co wskazuje, że R1a1-WSL mogą należeć do podhaplogrupy R1a1a7. Czas ekspansji tego podkaldu przypada na lata 3300-2500 lat, co pokrywa się z czasem ekspansji kultury łużyckiej z okresu brązu która rozprzestrzeniała się od dorzecza środkowej Odry i grzbietów górskich Bohemii i Słowacji, aż po wschód czyli obecną Ukrainę i na północ w kierunku wybrzeża Bałtyckiego. Badania te potwierdzają, że możliwe jest istnienie ciągłości genetycznej w Europie środkowej przynajmniej od okresu brązu.

Do innych wniosków doszli wcześniej Rębała i wsp. (2007). Wykonane przez nich badania oparte na analizie zróżnicowania haplotypów Y-STR wskazują na to, że populacje Słowian zachodnich i wschodnich są homogenne i różnią się istotnie od Słowian południowych za wyjątkiem Słoweńców. Autorzy badań poparli także teorię allochtoniczną pochodzenia Słowian, używając jako argumentu stwierdzenia, że skoro Ukraińcy są pod względem genetycznym najbardziej podobni do pozostałych populacji Słowiańskich, to w związku z tym Słowianie prawdopodobnie wywodzą się właśnie z obszarów obecnej Ukrainy.

Rozdział II. Cel pracy

Głównym celem niniejszej pracy jest oznaczenie zróżnicowania kopalnego mitochondrialnego DNA w populacjach pochodzących z okresu rzymskiego i średniowiecza z terenów Polski i porównanie ich do współczesnych populacji słowiańskich i sąsiadujących europejskich, jak również do populacji kopalnych z okresu żelaza i średniowiecza z terenu Danii oraz populacji neolitycznej z kultury ceramiki wstęgowej rytej, z terenu Niemiec. Na podstawie rezultatów analizy porównawczej zostanie podjęta próba oceny istnienia ciągłości genetycznej na poziomie mtDNA pomiędzy okresem rzymskim i wczesnym średniowieczem oraz ciągłości genetycznej pewnych linii mtDNA, aż do czasów współczesnych i ich interpretacja w odniesieniu do danych pochodzących z analiz współczesnego DNA, archeologii i antropologii.

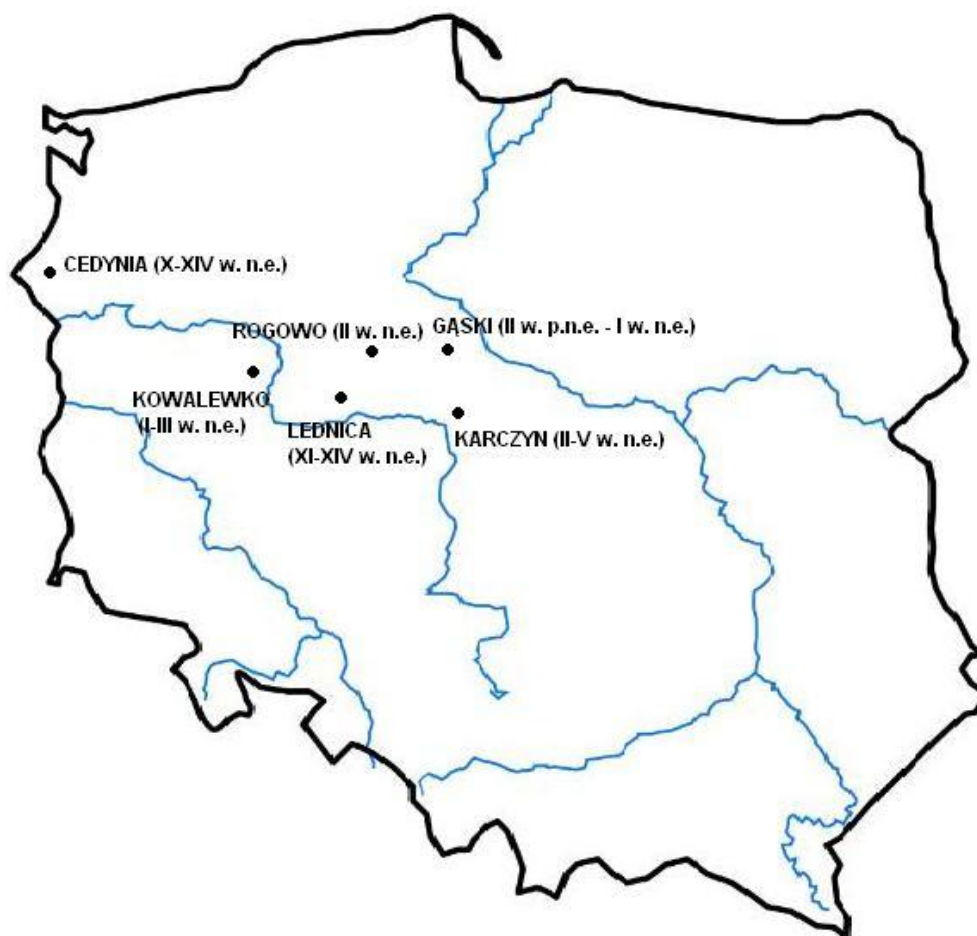
Cele szczegółowe są następujące:

- Określenie przynależności haplogrupowej mtDNA 72 osobników z okresu rzymskiego i średniowiecza poprzez izolację, klonowanie i sekwencjonowanie określonych fragmentów regionu HVR I mtDNA i wyznaczenia polimorfizmu pojedynczych nukleotydów(SNP) regionu kodującego.
- Ocena skuteczności otrzymania powtarzalnych wyników amplifikacji kopalnego DNA dla 72 osobników oraz analiza uszkodzeń występujących w sekwencjach aDNA.
- Ocena częstości występowania wspólnych haplotypów kopalnego mtDNA z okresu rzymskiego i średniowiecza we współczesnych populacjach słowiańskich i innych populacjach europejskich.
- Określenie międzypopulacyjnych dystansów genetycznych (linearnego *F_{st}* Slatkina) i ich graficzne zobrazowanie metodą skalowania wielowymiarowego MDS, w celu oceny struktury genetycznej zarówno kopalnych jak i współczesnych populacji.

Rozdział III. Materiały i metody

1. Materiały

Materiał badawczy stanowiły szkielety pochodzące z okresu rzymskiego z cmentarzysk datowanych na II w.p.n.e. - V w.n.e., jak również szkielety pochodzące ze średniowiecznych cmentarzysk datowanych na X - XIV w.n.e. Do badań kopalnego DNA przeznaczono w sumie 72 osobniki, w tym 38 osobników z populacji z okresu rzymskiego i 34 osobniki z populacji średniowiecznych. DNA izolowano z dwóch zębów pochodzących od każdego osobnika, co równoznaczne było z izolacją materiału genetycznego ze 144 prób. W Tabeli 2 znajduje się liczba osobników z poszczególnych stanowisk archeologicznych, a ich lokalizacja geograficzna przedstawiona jest na Rycinie 6.



Rycina 6. Lokalizacja geograficzna stanowisk archeologiczne z okresu rzymskiego i średniowiecza wraz z datami.

Tabela 2. Liczba osobników przeznaczonych do analiz kopalnego DNA z poszczególnych cmentarzysk z okresu rzymskiego i wczesnego średniowiecza.

Nazwa cmentarzyska	Liczba osobników
Okres rzymski	
Kowalewko (I-III w.n.e.)	11
Rogowo (II w.n.e.)	13
Karczyn (II-V w.n.e.)	12
Gąski (II w.p.n.e.– I w.n.e.)	2
Średniowiecze	
Cedynia (X-XIV w.n.e.)	18
Lednica (XI-XIV w.n.e.)	16

1.1. Materiał szkieletowy z okresu rzymskiego

Materiał szkieletowy z okresu rzymskiego w ilości 38 osobników pochodził ze stanowisk archeologicznych zaliczanych do kultur: wielbarskiej i przeworskiej. Do kultury wielbarskiej należały osobniki z cmentarzysk w Kowalewku i Rogowie, natomiast do kultury przeworskiej, osobniki ze stanowisk archeologicznych w Karczynie i Gąskach (Rycina 4).

Cmentarzysko w Kowalewku, (stanowisko 12) znajduje się pod Poznaniem w woj. wielkopolskim i datowane jest na wczesny okres rzymski, czyli od około połowy I wieku n.e. do początku III w. n.e. Badania archeologiczne prowadzone na tym cmentarzysku przez archeologów z Muzeum Archeologicznego w Poznaniu (Skorupka 2001) pozwoliły na wyodrębnienie 498 grobów szkieletowych i ciałopalnych. Materiał kostny (zęby), który został wykorzystany do badań kopalnego DNA znajduje się obecnie w zbiorach Instytutu Antropologii UAM w Poznaniu.

Cmentarzysko w Rogowie (stanowisko 23), w pow. toruńskim, woj. kujawsko-pomorskim datowane jest na II w. n.e. Wyodrębniono na nim 137 grobów szkieletowych i 151 grobów ciałopalnych (Chudziak 2000). Zęby do analiz DNA zostały pobrane z lepiej zachowanych fragmentów szczęk i żuchw. Materiał kostny znajduje się obecnie w Zakładzie Antropologii UMK w Toruniu.

Cmentarzysko w Karczynie (stanowisko 21/22) zaliczane do kultury przeworskiej (datowane na II do V w. n.e.), zlokalizowane jest w pow. inowrocławskim, w woj. kujawsko-pomorskim. Badania wykopaliskowe na tym cmentarzysku prowadzone były w latach 2002-2003 oraz 2005-2006. Wyodrębniono

na nim 36 pochówków. Materiał kostny jest zdeponowany w Instytucie Antropologii UAM w Poznaniu (Piontek i in. 2008).

Cmentarzysko w Gąskach (stanowisko 18) znajduje się w pow. inowrocławskim, woj. kujawsko-pomorskim. Zaliczane jest ono do grupy kruszańskiej kultury przeworskiej. Datowane jest na okres od II wieku p.n.e. do I wieku n.e. Prace wykopaliskowe na tym cmentarzysku pozwoliły na odkrycie między innymi 39 grobów szkieletowych (Andrałajć i Stolpiak, 2004). Materiał kostny znajduje się obecnie w Instytucie Antropologii UAM w Poznaniu.

1.2. Materiał szkieletowy z okresu wczesnego średniowiecza

Średniowieczny materiał szkieletowy w ilości 34 osobników pochodził z cmentarzysk w Cedyni oraz Lednicy (Rycina 6).

Cedynia zlokalizowana jest w pow. gryfińskim, w woj. zachodniopomorskim. Na terenie miasta wyodrębniono dwa cmentarzyska na stanowiskach 2 i 2a, z łączną sumą około 1600 pochówków (ok. 3000 pochowanych osobników), które całościowo stanowi największą nekropolię północno-zachodniej Słowiańszczyzny. Cmentarzysko ze stanowiska nr 2 datowane jest na okres od X do połowy XIV wieku, natomiast cmentarzysko ze stanowiska 2a przypada na okres od X do XII wieku (Porzeziński 2006). Opisy cmentarzysk wraz z analizą poszczególnych grobów zostały zawarte m.in. w opracowaniach Wokroja (1980), Malinowskiej-Łazarczyk (1982) czy Porzezińskiego (2006). Do analiz kopalnego DNA zostały wybrane zęby pochodzące zarówno od osobników dorosłych jak i dzieci. Materiał kostny z tego cmentarzyska znajduje się obecnie w Instytucie Antropologii UAM w Poznaniu.

Stanowisko archeologiczne w Lednicy obejmuje trzy cmentarzyska średniowiecznych – Dziekanowice „2”, Dziekanowice „22” i Ostrów Lednicki. Wszystkie stanowiska znajdują się w bliskim sąsiedztwie, nad jeziorem Lednickim w woj. Wielkopolskim. Cmentarzysko na Ostrowie Lednickim użytkowane było od XI/XII do XIV wieku czyli przez około 300 lat. Prowadzone badania archeologiczne pozwoliły na odkrycie na nim ponad 2000 grobów. Na cmentarzysku w Dziekanowicach „2” odkryto 45 szkieletów, natomiast na cmentarzysku w Dziekanowicach „22” użytkowanym od połowy XI do XIII wieku odkryto ponad

1150 grobów szkieletowych. Materiał kostny jest obecnie zdeponowany w zbiorach Muzeum Pierwszych Piastów na Lednicy (Wrzesińska i Wrzesiński 2005).

1.3. Kopalny materiał porównawczy

Kopalne populacje porównawcze pochodziły z cmentarzysk z okresu żelaza i średniowiecza zlokalizowanych na terytorium Danii (Rudbeck i in. 2005; Melchior i in. 2008a, 2008b, 2010). Składały się z 24 osobników z okresu żelaza i 29 osobników ze średniowiecza. Osobniki z epoki żelaza pochodziły z cmentarzysk: Bøgebjerggård datowanego na okres od 0 do II w. n.e., Skovgaarde datowanego na II do III w. n.e. oraz Simonsborg datowanego na 0 do II w. n.e. Wszystkie stanowiska z okresu żelaza znajdowały się w południowej części Danii, na wyspie Zelandia. Z kolei cmentarzyska średniowieczne obejmowały: Kongemarken datowane na X-XIII w. n.e., Riisby z XIII-XV w. n.e. i Galgedil z X w. n.e. Dwa pierwsze stanowiska znajdowały się na wyspie Zelandia, natomiast Galgedil zlokalizowane było na północy wyspy Fiona (Melchior i in. 2010).

W badaniach porównawczych wykorzystano także kopalny materiał genetyczny osobników należących do neolitycznej kultury ceramiki wstęgowej rytej (LBK). Populacja porównawcza składała się z 42 osobników pochodzących z cmentarzysk zlokalizowanych na terenie współczesnych Niemiec (Haak i in. 2005, Bramanti i in. 2009; Haak i in. 2010).

Ze względu na brak opublikowanych danych na temat innych kopalnych materiałów porównawczych pochodzących z okresu żelaza czy średniowiecza zarówno z terenów Polski jak i z pozostałych terenów zamieszkałych przez populacje słowiańskie, wyżej wymieniony kopalny materiał stanowił jedyny dostępny i nadający się do wykorzystania w badaniach pochodzenia Słowian.

1.4. Współczesny materiał porównawczy

Dane populacji współczesnych (nazwa populacji, liczebność i źródło danych), które zostały wykorzystane w analizach międzypopulacyjnych dystansów genetycznych jak i analizie wspólnych haplotypów, znajdują się w Tabeli 3.

Tabela 3. Populacje współczesne wykorzystane w analizach porównawczych; N- liczebność populacji.

Nazwa populacji współczesnej	N	Źródło danych
Polska	413	Grzybowski i wsp. (2007)
Czechy	179	Malyarchuk i wsp. (2006)
Słowacja	207	Malyarchuk i wsp. (2008b)
Białoruś	267	Estonia Biocentre*
Rosja (część europejska)	201	Malyarchuk i wsp. (2002b)
Ukraina	132	Malyarchuk i Derenko (2001) Estonia Biocentre*
Bośnia i Hercegowina	144	Malyarchuk i wsp. (2003)
Słowenia	104	Malyarchuk i wsp. (2003)
Serbia	100	Zgonjanin i wsp. (2010)
Macedonia	200	Zimmermann i wsp. (2007)
Chorwacja	300	Estonia Biocentre*
Bułgaria	855	Karachanak i wsp. (2011)
Estonia	113	Lappalainen i wsp. (2008)
Łotwa	112	Lappalainen i wsp. (2008)
Litwa	149	Lappalainen i wsp. (2008)
Niemcy	287	Poetsch i wsp. (2003)
Szwecja	286	Tillmar i wsp. (2010)
Finlandia	200	Hedman i wsp. (2007)

Oznaczenia:

*Dane nieopublikowane udostępnione przez Estonian Biocentre, Uniwersytet w Tartu, w Estonii.

2. Metodyka

2.1. Pobieranie i oczyszczanie materiału

Do badań kopalnego DNA przeznaczono osobniki, od których możliwe było pobranie przynajmniej dwóch nieuszkodzonych zębów (bez pęknięć i szczelin). W trakcie pozyskiwania próbek zachowane zostały wszelkie środki ostrożności, zabezpieczające materiał przed zanieczyszczeniem współczesnym DNA, które mogło

pochodzić przede wszystkim od badacza pobierającego próby kostne. Do ekstrakcji zębów używane były jednorazowe sterylne rękawiczki, jednorazowe maseczki i jednorazowe fartuchy. Po pobraniu, materiał przechowywany był w -20°C , w celu zabezpieczenia go przed dalszą degradacją DNA.

Wszystkie etapy pracy z kopalnymi próbkami, począwszy od oczyszczania a skończywszy na przygotowaniu reakcji PCR, były wykonywane w specjalistycznym laboratorium przeznaczonym do pracy tylko z kopalnym DNA – w Center for GeoGenetics na Uniwersytecie Kopenhaskim w Danii.

Materiał przeznaczony do izolacji DNA oczyszczano przy pomocy sterylnych patyczków, których bawełniane końcówki były nasączone 1 M roztworem HCl. Następnie zęby zanurzano w 0,1 M roztworze HCl i inkubowano w temperaturze pokojowej mieszając przez 5 minut. Po usunięciu roztworu HCl, próby kostne płukano trzykrotnie sterylną wodą (Accugene - Lonza), która dodatkowo była naświetlona promieniami UVC (2000 J/cm^2 przez 20 minut). Tak oczyszczony materiał pozostawiano do wysuszenia na 1 godzinę pod zamkniętym dygestorium.

2.2. Izolacja DNA

Proces pozyskiwania sproszkowanego materiału kostnego przeprowadzono pod dygestorium. Kopalny DNA izolowano z proszku zębnego. W celu uzyskania proszku, materiały nawiercano przy pomocy wiertarki typu Dremel z wymiennymi wiertłami. Do każdego zęba stosowano osobne wiertła (średnica robocza 1,6 mm), które wcześniej inkubowano przez noc w roztworze degradującym DNA (DNAaway, Molecular Bioproducts) i naświetlano promieniami UVC (2000 J/cm^2 przez 20 minut). Materiał nawiercano tylko od strony korzenia, po uprzednim zdarciu niewielkiej ilości warstwy zewnętrznej i przy jednoczesnym nienaruszeniu korony zęba. Proszek powstający podczas wiercenia zbierano do sterylnych jednorazowych pojemników, a następnie przenoszono go do 2 ml stożkowych, zakręczanych probówek. Do każdego zęba oprócz osobnych wiertel używano również sterylne, jednorazowe pensety. Po każdorazowym nawiercaniu materiału, komora dygestorium oraz stałe elementy wiertarki były przemywane 1,4% roztworem NaOCl (VWR).

Do otrzymanego proszku zębnego zgodnie z metodyką Malmström i in. (2007) dodawano 1ml 0,5% roztworu podchlorynu sodu. Próby inkubowano w temperaturze pokojowej, mieszając na kołysce przez 15 minut, a następnie wirowano przez 2

minuty przy 7 tys. obr./min. Osad płukano trzykrotnie 1 ml wody (Accugene Lonza), naświetlonej promieniami UVC (2000 J/cm^2 przez 20 minut). Za każdym razem próby inkubowano przez 3 minuty mieszając na kołyszce w temperaturze pokojowej i wirowano przez 2 minuty przy 7 tys. obr./min.

Ekstrakcję DNA wykonywano w komorze laminarnej HETO HOLTEN (klasa bezpieczeństwa II), zaopatrzonej w dwa filtry HEPA oraz lampę UV. Komora za pomocą „kołnierza” połączona była z systemem wentylacyjnym, dzięki czemu powietrze wychodziło z niej bezpośrednio na zewnątrz budynku, a nie do środka pomieszczenia laboratoryjnego. Sprzęty i materiały w postaci pipet, probówek do PCR, statywów oraz odczynniki w postaci wody i buforów do izolacji DNA naświetlano promieniami UVC 2000 J/cm^2 przez 20 min. Do pipet stosowano tipsy z filtrami.

Całkowity DNA oczyszczano z lizatu zgodnie z metodyką Yang i in. (1998). Do lizatu dodawano bufor ekstrakcyjny (0,5 M EDTA o pH 8 oraz 18 μl proteiny K (Roche, nr kat. 3115828001), 10M mocznik). Po dodaniu buforu ekstrakcyjnego materiał mieszano na rotatorze przez 48 godz. w 55°C .

Po inkubacji, próby wirowano przez 5 minut przy 2 tys. obr./min. Supernatanty przenoszono na filtry Amicon Ultra-15 (Millipore). W celu koncentracji DNA roztwór filtrowano do objętości 250 μl poprzez wirowanie prób przy 4 tys. obr./min. przez 5–15 min. Następnie z roztworu zatrzymanego na anizotropowej membranie izolowano DNA. Izolację DNA prowadzono z zastosowaniem komercyjnego kitu QiaQuick PCR Purification Kit (Qiagen), zgodnie z protokołem dołączonym przez producenta. Końcowa objętość otrzymanego ekstraktu DNA wynosiła 90 μl .

2.3. Amplifikacja sekwencji markerowych, klonowanie produktów PCR i sekwencjonowanie

Amplifikowano fragmenty regionu HVR I mtDNA (F1, F2, F3, F4, 209-356) oraz fragmenty regionu kodującego zawierające polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNP) definiujące przynależność do określonych haplogrup mtDNA. Startery do poszczególnych fragmentów mtDNA zostały zaprojektowane, a następnie zamówione w firmie Biomer (<http://www.biomers.net/en/index.html>). Ich opis znajduje się w Tabeli 4.

Tabela 4. Charakterystyka starterów użytych do amplifikacji fragmentów kopalnego mtDNA.

Nazwa amplifikowanego fragmentu	Nazwa startera	Sekwencja 5'-3'	pz*	Referencje
F1	L16050 H16130	GGGAAGCAGATTTGGGT AGGTGGTCAAGTATTTATGGTAC	119	Malmström i in. 2007
F2	L16119 H16196	TTACTGCCAGCCACCATGA GATTGCTGTACTTGCTTGTAAGC	118	Malmström i in. 2007
F3	L16181 H16226	CATAAAAACCCAATCCACATCAA GGTGAGGGGTGGCTTTGG	109	Malmström i in. 2007
F4	L16249 H16317	AACTATCACACATCAACTGCAACT TGCTATGTACGGTAAATGGCTT	113	Malmström i in. 2007
209-356	L16209 H16356	CCCCATGCTTACAAGCAAGT GTCATCCATGGGGACGAGAA	185	Handt i in. 1996
H	H_7028_F H_7028_R	TACTACACGACACGTACTACG TAGGAGCTGTATTTGCCATCATAG	75	Obecne badania
X1	X1_146,195_F X1_146,195_R	ATGTGCGAGTATCTGTCTTTG AGTGTGTTAATTAATTAATGCTTGT	111	Obecne badania
X2	X2_1719_F X2_1719_R	ACCCACTCCACCTTACTACCAG TACCCAAATAAAGTATAGGCGATAG	67	Obecne badania
T2b	T2b_5147_F T2b_5147_R	CCTACTACTCAACTTAAACTCC TTGTTTCAGGTGCGAGATAG	60	Obecne badania
HV0	HVO_72_F HVO_72_R	ATGCATTTGGTATTTTCGTCTG CGTCTCGCAATGCTATCG	53	Obecne badania
R1	R1_11719_F R1_11719_R	GCGCAGTCATTCTCATAATC GCTAGGCAGAATAGTAATGAG	58	Obecne badania
HV	HV_14766_F HV_14766_R	CACCAATGACCCCAATACG GAGGTGATGAATGAGTGGTTAA	68	Obecne badania
V	V_4580_F V_4580_R	TACCTGAGTAGGCCTAGAA TTGGTTAGAACTGGAATAAAAG	54	Obecne badania
K1	K1_1189_F K1_1189_R	CTCAAAGGACCTGGCGGTG CGATTACAGAACAGGCTCCTC	55	Obecne badania
K2	K2_146_F K2_146_R	ATGTGCGAGTATCTGTCTTT AATATTGAACGTAGGTGCGAT	65	Obecne badania
R0a	ROA_F ROA_R	AAAGCCATTTACCGTACATAG TATCTGAGGGGGGTCATC	72	Obecne badania
J	J_10398_F J_10398_R	TGGCCTATGAGTGACTACAA CGTTTTGTTTAACTATATACC	65	Obecne badania
J2a	J2a_7476_F J2a_7476_R	AAGGAAGGAATCGAACCCC ATGGAGGCCATGGGGTTG	55	Obecne badania
U	U_12308_F U_12308_R	ACAGCTATCCATTGGTCTTA TATTACTTTTATTTGGAGTTGC	60	Obecne badania
U5b	MR_HgU5b_7768 MR_HgU5b_7768	CTAATACTAACATCTCAGACGCTC GGCGGGCAGGATAGTTCAGA	59	Obecne badania
U3	U3_14139_F U3_14139_R	TTCCCACTCATCCTAACCCCT GATTGCTCGGGGGAATAGG	55	Obecne badania
N1	N1_10238_F N1_10238_R	CCTTTTCTCATAAAATCTTC GGAGGGCAATTTCTAGATCAAA	68	Obecne badania
W	MR_HgW_8252F MR_HgW_8252R	AATTAATCCCCTAAAAATCTTTG AGGGGGTGCTATAGGGTA	58	Obecne badania

*wielkość produktu

Amplifikację prowadzono w objętości 25 μ l, stosując następujące składniki reakcji: 2 μ l matrycy DNA, 0,1 μ l polimerazy Platinum HiFi Taq (5U/ μ l) (Invitrogen), 2,5 μ l buforu do polimerazy (10 x stężony) (Invitrogen), 1 μ l MgSO₄ (50mM) (Invitrogen), 1 μ l RSA (20mg/ml, Calbiochem), 0,2 μ l dNTP (25mM) (Invitrogen), 0,5 μ l (10uM) każdego startera i dopełniono odpowiednią ilość wody (Accugene Lonza) do objętości 25 μ l.

Amplifikacje prowadzono stosując następujące warunki reakcji: wstępna denaturacja 94°C przez 4 minuty, następnie 42 cykle, obejmujące denaturację w 94°C przez 30 sekund, przyłączanie starterów w temperaturze od 52°C - 60°C (w zależności od rodzaju starterów) przez 20 sekund, wydłużanie w 68°C przez 20 sekund oraz końcowe wydłużanie w 72°C przez 10 minut.

Podczas izolacji i amplifikacji DNA stosowano dwie kontrole negatywne ekstrakcji i jedną kontrolę negatywną reakcji PCR (dla każdej pary starterów). Jako kontrole negatywne stosowano także szczątki zwierzęce.

Detekcję produktów amplifikacji wykonywano za pomocą elektroforezy w 2% żelu agarozowym z użyciem bromku etydyny (0,625 mg/ml; BDH Prolabo), wobec wzorca masy DNA Φ X174 RF DNA (HeaIII).

Otrzymane produkty PCR były klonowane przy użyciu kitu TOPO TA (Invitrogen). W ramach pojedynczej reakcji przygotowywano mieszaninę ligacyjną składającą się z 0,25 μ l wektora, 0,25 μ l buforu, 4,5 μ l wody oraz 1 μ l rozcieńczonego (1:10) produktu PCR. Ligację prowadzono przez 25 minut w temperaturze pokojowej. Następnie do mieszaniny ligacyjnej dodawano 10 μ l komórek kompetentnych i umieszczano ją w lodzie na 20 minut. Szok termiczny przeprowadzano w termocyklerze w temperaturze 42°C przez 30 sekund. Następnie mieszaninę przenoszono do lodu na co najmniej 5 minut. Do prób dodawano 100 μ l płynnej pożywki LB zawierającej trypton (1g/100ml) i ekstrakt drożdżowy (0,5g/100ml) (Sigma) oraz NaCl (1g/100ml) i 1M NaOH (1,6 μ l/1ml) (Chempur), a następnie inkubowano przez 45-60 minut w 37°C, w cieplarni. Po inkubacji, próby były posiewane na płytki z pożywką LB zawierającą ampicylinę (1 μ l/ml, Polfa Tachomin). Posiane bakterie inkubowano przez 15 godzin w 37°C. Identyfikację klonów zawierających insert wykonano za pomocą metody PCR z wykorzystaniem uniwersalnych starterów (M13R 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' i M13F 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') hybrydujących do wektora. Wyselekcjonowane klony były sekwencjonowane automatycznie przy użyciu zestawu BigDye Tv3.1

(Applied Biosystems), a produkty sekwencjonowania były rozdzielane w analizatorze ABI Prism 3130XL (Applied Biosystem).

2.4. Analiza sekwencji

Chromatogramy edytowano w programie Chromas 2.33 (Technelysium) i przyrównywano ręcznie w programie BioEdit v7.0.5.3 (Hall, T.A. 1999).

W celu określenia zmian nukleotydowych w regionie HVR I, otrzymane sekwencje mtDNA przyrównywano do sekwencji referencyjnej rCRS mtDNA (numer akcesyjny GenBank NC_012920.1) Przynależność poszczególnych haplotypów mtDNA do haplogrup i podhaplogrup wyznaczano na podstawie mutacji w regionie kontrolnym oraz SNP w regionie kodującym. Sprawdzane miejsca regionu kodującego, które definiowały przynależność haplogrupową pochodziły z globalnej bazy danych mtDNA znajdującej się na stronie www.phylotree.com, rekomendowanej przez Oven i Kayser (2008).

2.5. Analizy statystyczne

2.5.1. Analiza wspólnych haplotypów mitochondrialnego DNA

W analizie wspólnych haplotypów wykorzystano 18 populacji opisanych w Tabeli 3 (podrozdział 1.4.). Liczebność każdej populacji wynosiła 300 osobników, za wyjątkiem Macedonii/Serbii (293 osobniki), Ukrainy (227 osobników), Szwecji (296 osobników) oraz Litwy/Łotwy (277 osobników). W celu zwiększenia liczby osobników, niektóre z populacji tj. Słowacja/Czechy, Macedonia/Serbia, Bośnia/Słowenia/Chorwacja, Litwa/Łotwa, Finlandia/Estonia, zostały połączone. Populacje łączono zgodnie z bliskim położeniem geograficznym i podobieństwem językowym, uzyskując 12 populacji porównawczych. Jeśli liczba osobników z populacji łączonych była znacznie większa od 300, wówczas w sposób losowy wybierano pulę 300 osobników. Wybór losowy przeprowadzono w przy użyciu formuły „*random factor*” w Excel 2010.

Następnie sprawdzano obecność oraz liczbę kopalnych haplotypów mtDNA dzielonych wspólnie ze współczesnymi populacjami porównawczymi. Na bazie

uzyskanych informacji kopalne haplotypy mtDNA dzielono na trzy grupy: nieinformatywną, informatywną i unikatową. Do grupy nieinformatywnej zaliczano te, które występowały w największej ilości, czyli stanowiły ponad 0,4% spośród wszystkich haplotypów występujących w badanych populacjach współczesnych. Do grupy informatywnych włączano te haplotypy, które występowały stosunkowo rzadko (poniżej 0,4%). Natomiast do grupy haplotypów unikatowych należały te, które nie zostały odnalezione w analizowanych współczesnych populacjach.

W każdej z 12 populacji porównawczych obliczano procent informatywnych i nieinformatywnych kopalnych haplotypów mtDNA. W celu wskazania różnic pomiędzy haplotypami informatywnymi poszczególnych populacji, a średnim udziałem haplotypów informatywnych w całej populacji, zastosowano nieparametryczny test z (Haak i in. 2010). Zastosowany test pozwolił na wyodrębnienie populacji, które wykazują istotnie wyższy procent wspólnych informatywnych haplotypów. Test ten został obliczony zgodnie z metodą Haak i wsp. (2010) w programie Excel 2010.

Ze względu na nieznajomość rozkładu częstości występowania poszczególnych haplotypów w całej populacji, średni udział haplotypów i ich 95% przedziały ufności (95% CL) obliczano z wykorzystaniem metod bootstrapowych (10 000 powtórzeń). Do obliczeń wykorzystano pakiet R 2.12.1 (R Development Core Team 2008) w którym użyto skryptu:

```
#ms<-numeric(10000)
for(i in 1:10000){
  ms[i]<-mean(sample(x,replace=T))
}
#quantile(ms,c(0.025,0.975))
#mean(x)-quantile(ms,c(0.025,0.975))
#1.96*sqrt(var(x)/length(x))
#library(boot)
#mymean<-function(x,i)mean(x[i])
#myboot<-boot(x,mymean,R=10000)
#myboot
#boot.ci(myboot)
```

Oznaczenia: x – populacja

2.5.2. Analiza międzypopulacyjnych dystansów genetycznych

Na podstawie częstości haplogrup mtDNA poszczególnych populacji, wyznaczono międzypopulacyjne dystanse genetyczne Slatkina – linearny F_{ST} (ang. *Slatkin's linearized F_{ST}*) (Slatkin 1995). Analizę przeprowadzono w programie *Arlequin v. 3.5*. (Ecoffirer i in. 2005). Istotność statystyczna obliczonych dystansów była testowana z wykorzystaniem metod permutacji – 10 000 powtórzeń przy poziomie istotności 0,05. Międzypopulacyjne dystanse genetyczne (linearny F_{ST}) zostały graficznie zobrazowane poprzez analizę MDS, czyli skalowania wielowymiarowego, które zostało wykonane w programie *Statistica v. 10*, StatSoft (2011).

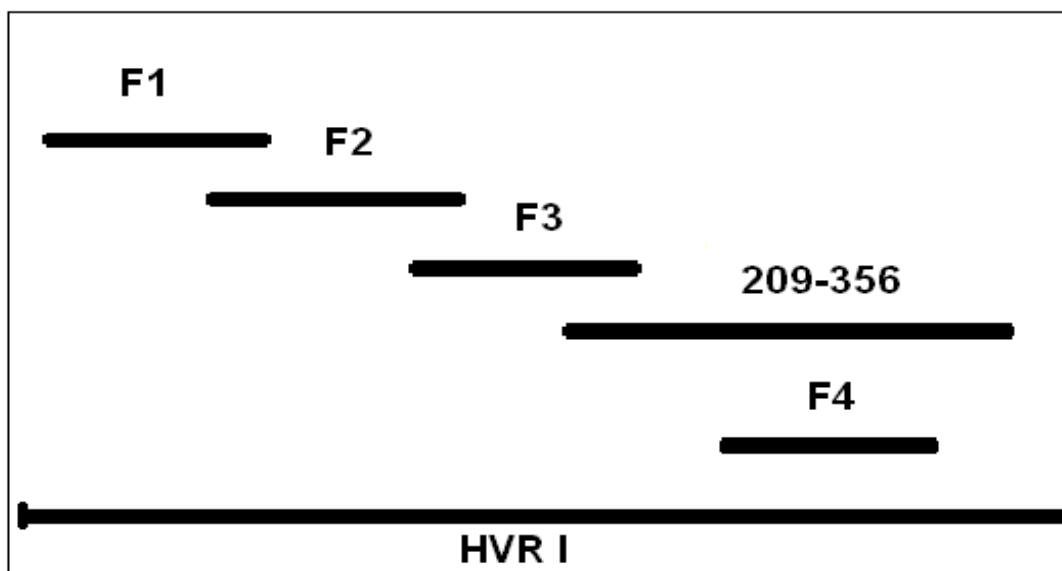
Rozdział IV. Wyniki

1. Izolacja i amplifikacja kopalnego mtDNA

DNA izolowany był z 72 osobników pochodzących z okresu rzymskiego i średniowiecza, zgodnie z metodą opisaną w podrozdziale 2.2. (Rozdział III). Aby potwierdzić autentyczność wyników, izolację DNA przeprowadzano z dwóch zębów (głównie klów, trzonowców lub przedtrzonowców) należących do każdego osobnika.

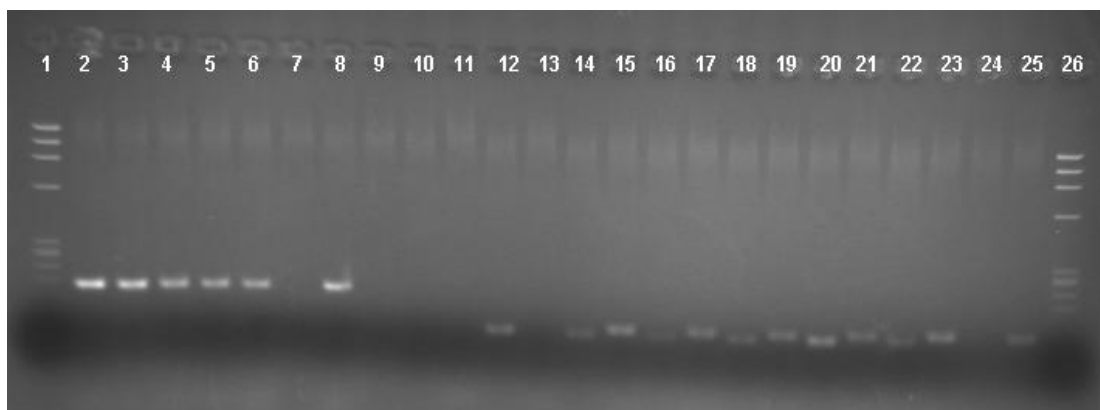
Fragmety regionu hiperzmiennego (HVR I) mtDNA o nazwach F1, F2, F3, 209-356 amplifikowano przy pomocy starterów, opisanych w Tabeli 4 (podrozdział 2.3, Rozdział III). W przypadku braku otrzymania produktu PCR w postaci fragmentu 209-356, amplifikowany był fragment F4 (startery L16249-H16317).

Amplifikowane fragmenty HVR I mtDNA (F1, F2, F3, F4, 209-356), pokrywają się względem siebie w dystalnych odcinkach sekwencji i obejmują w sumie obszar 305 pz (Rycina 7).



Rycina 7. Schemat ułożenia fragmentów regionu HVR I mtDNA (F1, F2, F3, F4, 209-356) amplifikowanych przez odpowiednie pary starterów (Tabela 4).

Na Rycinie 8 przedstawiono przykładowy rezultat amplifikacji fragmentów HVR I mtDNA (F2, F3 i 209-356) obejmujących łącznie rejon 235 nukleotydów, znajdujący się między 16120 a 16355 nukleotydem mtDNA człowieka (nr akcesyjny GenBank: NC_012920.1).



Rycina 8. Obraz z elektroforezy przedstawiający rozdzielanie fragmentów F2, F3 i 209-356 regionu HVR I mtDNA amplifikowanych z ekstraktów DNA pochodzących od osobników o numerach 2b, 3b, 4b, 6b, 10 i 11 (Tabela 5 i 9). Linie 2-6 i 8 - rozdzielany fragment 209-356, linie 12,14,16,18,20,22 - F3, linie 15,17,19,21,23,25 - F2. Linie 9, 10, 11, 13- kontrole negatywna ekstrakcji, linie 7, 24 - kontrola negatywna PCR, linie 1, 26 – standard wielkości Φ X174 RF DNA (HaeIII).

W większości przypadków kontrole negatywne nie wykazywały obecności DNA (Rycina 8). W nielicznych przypadkach, gdzie stwierdzono obecność produktu amplifikacji, reakcje PCR były powtarzane. Jako kontrolę negatywną ekstrakcji i PCR, stosowano również szczątki zwierzęce. W żadnym przypadku nie stwierdzono w nich obecności ludzkiego materiału genetycznego.

1.1. Skuteczność amplifikacji fragmentów HVR I mtDNA

Dla osobników z populacji z okresu rzymskiego (Rogowo, Kowalewko, Gąski i Karczyn) i średniowiecza (Cedynia, Lednica) przeprowadzono amplifikację fragmentów F1, F2, F3, 209-356 regionu HVRI mtDNA. W sumie dla każdego osobnika można było uzyskać 8 fragmentów regionu HVR I (po 4 fragmenty z każdego zęba).

1.1.1. Rogowo

Populacja z cmentarzyska w Rogowie liczyła 13 osobników (Tabela 5). W przypadku 11 osobników otrzymano wszystkie analizowane fragmenty. Dla dwóch osobników (numery prób 24/24b oraz 30/30b) otrzymano odpowiednio 6 i 7 spośród 8 fragmentów mtDNA. Ostatecznie do dalszych analiz zakwalifikowano wszystkie osobniki z badanej populacji.

Tabela 5. Skuteczność amplifikacji fragmentów F1, F2, F3 i 209-356 regionu HVR I mtDNA dla prób pochodzących z okresu rzymskiego ze stanowiska archeologicznego w Rogowie.

Nr	Nazwa	Nr próby (ząb 1/ząb 2)	Fragmenty HVR I mtDNA			
			F1	F2	F3	209-356
1	R ob. 29 28/99	2/2b	+/+	+/+	+/+	+/+
2	R ob. 51 20/99	3/3b	+/+	+/+	+/+	+/+
3	R ob. 718 inw. 77/00	10/10b	+/+	+/+	+/+	+/+
4	R ob. 724 inw 80/00	12/12b	+/+	+/+	+/+	+/+
5	R. ob. 680 inw 52/00	13/13b	+/+	+/+	+/+	+/+
6	R ob. 438 (gr.68) inw 78/K/99	14/14b	+/+	+/+	+/+	+/+
7	R ob. 96 13/99	20/20b	+/+	+/+	+/+	+/+
8	R ob. 11/99 ob. 24	21/21b	+/+	+/+	+/+	+/+
9	R ob. 37 inw 32/99	23/23b	+/+	+/+	+/+	+/+
10	R ob. 705 inw 74/00	24/24b	+/+	+/-	+/+	+/-
11	R ob. 665 inw 43/00	25/25b	+/+	+/+	+/+	+/+
12	R ob. 45 16/99	30/30b	+/+	+/+	+/+	-/+
13	R ob. 421 nr inw. 68/K/99	31/31b	+/+	+/+	+/+	+/+

Oznaczenia:

„+” - otrzymanie produktu PCR

„+/+” - otrzymanie produktu PCR z obu zębów danego osobnika

„-” - brak produktu PCR

„+/-” lub „-/+” - otrzymanie produktu PCR z jednego zęba danego osobnika

1.1.2. Kowalewko

Populacja z cmentarzyska w Kowalewku liczyła 11 osobników (Tabela 6). Dla 6 osobników uzyskano wszystkie analizowane fragmenty mtDNA. W przypadku 4 osobników otrzymano od 6 do 7 spośród 8 analizowanych fragmentów mtDNA. Osobnik o numerach prób 1/1b nie został zakwalifikowany do dalszych badań ze względu na brak otrzymania wszystkich 4 fragmentów mtDNA, w jednym z dwóch badanych zębów. Ostatecznie do dalszych badań zakwalifikowano 10 osobników.

Tabela 6. Skuteczność amplifikacji fragmentów F1, F2, F3 i 209-356 regionu HVR I mtDNA dla prób pochodzących z okresu rzymskiego ze stanowiska archeologicznego w Kowalewku.

Nr	Nazwa	Nr próby (dwa zęby)	Fragmenty HVRI mtDNA			
			F1	F2	F3	209-356
1	Kowalewko 597	1/1b	-/nd	-/nd	-/nd	-/nd
2	Kowalewko 572	27/27b	+/+	+/+	+/+	-/+
3	Kowalewko 466	28/28b	+/+	+/+	+/+	+/+
4	Kowalewko 597	29/29b	+/+	+/+	+/+	-/-
5	Kowalewko 243	83/83b	-/+	+/+	+/+	+/+
6	Kowalewko stan.12 nr1	84/84b	+/+	+/+	+/+	+/+
7	Kowalewko 267	85/85b	+/+	+/+	+/+	+/+
8	Kowalewko 502	86/86b	+/+	+/+	+/+	+/+
9	Kowalewko 314	87/87b	+/+	+/+	+/+	-/+
10	Kowalewko 189	88/88b	+/+	+/+	+/+	+/+
11	Kowalewko 188	89/89b	+/+	+/+	+/+	+/+

Oznaczenia:

„nd” – nie wykonywano amplifikacji

Pozostałe oznaczenia jak w Tabeli 5.

1.1.3. Gąski

Populacja z cmentarzyska w Gąskach liczyła tylko dwa osobniki (Tabela 7). Zarówno dla prób 49/49b jak i 50/50b otrzymano 7 z 8 analizowanych fragmentów mtDNA. Ostatecznie do dalszych badań zakwalifikowano oba osobniki.

Tabela 7. Skuteczność amplifikacji fragmentów F1, F2, F3 i 209-356 regionu HVR I mtDNA dla prób pochodzących z okresu rzymskiego ze stanowiska archeologicznego w Gąskach.

Nr	Nazwa	Nr próby (dwa zęby)	Fragmenty HVRI mtDNA			
			F1	F2	F3	209-356
44	Gąski 18 ob. 23234 na NE od ob. 566	49/49b	+/+	+/+	+/+	-/+
45	Gąski 18 ob. 58	50/50b	+/+	+/+	+/-	+/+

Oznaczenia jak w Tabeli 5.

1.1.4. Karczyn

Populacja ze stanowiska archeologicznego w Karczynie licząca 12 osobników wykazała najmniejszą skuteczność amplifikacji fragmentów mtDNA (Tabela 8). Tylko dla dwóch osobników (próby 63/63b i 72/72b) możliwe było uzyskanie kompletu analizowanych fragmentów mtDNA. Siedem osobników posiadało od 4 do 7 spośród 8 analizowanych fragmentów. W przypadku trzech osobników o numerach prób 57/57b, 58/58b oraz 59/59b, nie uzyskano żadnych spośród 8 możliwych do

otrzymania fragmentów mtDNA. Ostatecznie do dalszych badań zakwalifikowano 9 osobników.

Tabela 8. Skuteczność amplifikacji fragmentów F1, F2, F3 i 209-356 regionu HVR I mtDNA dla prób pochodzących z okresu rzymskiego ze stanowiska archeologicznego w Karczynie.

Nr	Nazwa	Nr próby (dwa zęby)	Fragmenty HVRI mtDNA			
			F1	F2	F3	209-356
1	Karczyn ob.200 PET 30/197	57/57b	-/-	-/-	-/-	-/-
2	Karczyn ob.269 PET 30/341	58/58b	-/-	-/-	-/-	-/-
3	Karczyn 30 wyk. 13/14 ob. Szkielet I	59/59b	-/-	-/-	-/-	-/-
4	Karczyn ob.180 PET 30/160 czaszka	60/60b	+/+	+/+	+/+	+/-
5	Karczyn ob.353 PET 30/580	61/61b	+/+	+/+	+/+	+/-
6	Karczyn ob.302 wykop 339a 30/534	62/62b	+/-	+/+	-/-	-/-
7	Karczyn ob. 303 czaszka	63/63b	+/+	+/-	+/+	+/+
8	Karczyn ob. 36 PET 30/107	64/64b	+/-	+/+	+/-	+/-
9	Karczyn PET 30/148 ob. 157	69/69b	+/+	+/+	+/-	+/+
10	Karczyn ob. 264 PET 30/340	70/70b	+/+	+/-	+/-	+/+
11	Karczyn ob. 374 stan 21/22	71/71b	+/-	+/+	+/-	-/-
12	Karczyn ob. 266 PET 30/339	72/72b	+/+	+/+	+/+	+/+

Oznaczenia jak w Tabeli 5.

1.1.5. Cedynia

Dla 11 spośród 18 osobników, które wchodziły w skład populacji z cmentarzyska w Cedyni, otrzymano wszystkie 8 analizowanych fragmentów mtDNA (Tabela 9). W przypadku sześciu osobników uzyskano od 6 do 7 fragmentów HVRI mtDNA. Tylko jeden osobnik o numerze prób 36/36b nie został zakwalifikowany do dalszych badań. Powodem jego odrzucenia było otrzymanie zaledwie jednego spośród 4 analizowanych fragmentów mtDNA w jednym z badanych zębów. Ostatecznie do dalszych badań zakwalifikowano 17 osobników.

Tabela 9. Skuteczność amplifikacji fragmentów F1, F2, F3 i 209-356 regionu HVR I mtDNA dla prób pochodzących ze średniowiecza ze stanowiska archeologicznego w Cedyni.

Nr	Nazwa	Nr próby (dwa zęby)	Fragmenty HVRI mtDNA			
			F1	F2	F3	209-356
1	Cedynia 269 child	4/4b	-/+	+/+	+/+	+/+
2	Cedynia 02	5/5b	+/+	+/+	-/-	+/+
3	Cedynia 1008	6/6b	+/+	+/+	-/+	+/+
4	Cedynia 67 child	11/11b	+/+	+/+	+/+	+/+
5	Cedynia 119	32/32b	+/+	+/+	+/+	+/+
6	Cedynia 36	36/36b	x/nd	-/nd	-/nd	-/nd
7	Cedynia 645	37/37b	+/+	+/+	+/+	+/+
8	Cedynia 615	38/38b	+/+	+/+	+/+	+/+
9	Cedynia 936	39/39b	+/+	+/+	+/+	-/+

Tabela 9. C.d.

Nr	Nazwa	Nr próby (dwa zęby)	Fragmenty HVRI mtDNA			
			F1	F2	F3	209-356
10	Cedynia 797	40/40b	+/+	+/+	+/+	+/+
11	Cedynia 801	41/41b	+/+	+/+	+/+	+/+
12	Cedynia 805	42/42b	+/+	+/+	+/+	+/+
13	Cedynia 695	43/43b	+/+	+/+	+/+	+/+
14	Cedynia 323	52/52b	+/+	+/+	+/+	+/+
15	Cedynia 708	53/53b	+/+	+/+	+/+	+/+
16	Cedynia LX 19	54/54b	+/+	+/+	+/+	+/+
17	Cedynia 773	55/55b	+/+	+/+	+/-	+/+
18	Cedynia 172	56/56b	+/+	+/+	+/-	+/+

Oznaczenia jak w Tabeli 5.

1.1.6. Lednica

Spośród populacji pochodzącej z cmentarzyska w Lednicy, do badań aDNA przeznaczono 16 osobników (Tabela 10). Dla siedmiu z nich udało się uzyskać komplet fragmentów regionu HVR I mtDNA. W przypadku sześciu osobników otrzymano od 5 do 6 fragmentów mtDNA. Trzy osobniki o numerach prób 33/33b, 34/34b i 35/35b nie zostały zakwalifikowanych do dalszych badań ze względu na zbyt małą liczbę uzyskanych fragmentów mtDNA. Ostatecznie do dalszych badań zakwalifikowano 13 osobników.

Tabela 10. Skuteczność amplifikacji fragmentów F1, F2, F3 i 209-356 regionu HVR I mtDNA dla prób pochodzących ze średniowiecza ze stanowiska archeologicznego w Lednicy.

Nr	Nazwa	Nr próby (dwa zęby)	Fragmenty HVRI mtDNA			
			F1	F2	F3	209-356
1	Lednica male czaszka "1" Dz.22 3	65/65b	+/+	+/+	+/+	+/+
2	Lednica male 25/78	66/66b	+/+	+/+	-/+	+/-
3	Lednica male "2"	67/67b	+/+	+/+	-/-	+/-
4	Lednica czaszka female "10"	68/68b	+/+	+/+	+/+	-/+
5	Lednica/Dzieskanowice 9/92 adult	16/16b	+/+	+/+	+/+	+/+
6	1554 Lednica/Dzieskanowice	18/18b	+/+	+/+	+/+	+/+
7	615 Lednica/Dzieskanowice	19/19b	+/+	+/+	+/+	+/+
8	Lednica 356 A	33/33b	-/+	-/+	-/+	-/+
9	Lednica 7/83	34/34b	+/nd	-/nd	-/nd	-/nd
10	Lednica 1/86	35/35b	+/nd	+/nd	+/nd	-/nd
11	Lednica male "7"	73/73b	+/+	+/+	+/+	+/+
12	Lednica male "6"	74/74b	+/-	+/+	+/-	-/+
13	Lednica male "8"	75/75b	+/+	+/+	+/+	+/+
14	Lednica Dz.22 male P85	76/76b	+/+	+/+	+/+	+/+
15	Lednica male "5"	77/77b	+/+	+/-	+/-	+/-
16	Lednica 556	82/82b	+/+	-/+	+/+	-/-

Oznaczenia jak w Tabeli 5.

2. Klonowanie i sekwencjonowanie klonów

Do klonowania produktów PCR i ich sekwencjonowania, zakwalifikowano w sumie 64 z 72 osobników. Wyizolowane fragmenty regionu HVR I mtDNA należące do 64 osobników były klonowane i sekwencjonowanie zgodnie z metodą opisaną w podrozdziale 2.3 (Rozdział III). Tylko dla niektórych prób opisanych w Tabeli 11 i 12 klonowany i sekwencjonowany był dodatkowo fragment F1. Wówczas analizowany obszar wynosił 305 nukleotydów i znajdował się w pozycjach między 16050 a 16355. Dla 64 osobników w sumie sklonowano 364 fragmenty regionu HVR I mtDNA.

W Tabeli 11 i 12 znajdują się dane na temat liczby zsekwenconowanych klonów poszczególnych fragmentów regionu HVR I mtDNA, dla każdego osobnika.

Tabela 11. Łączna ilość zsekwenconowanych klonów fragmentów regionu HVR I mtDNA (F1, F2, F3 i 209-356) dla osobników pochodzących z populacji z okresu rzymskiego.

OKRES RZYMSKI			Łączna liczba sekwencji klonów fragmentów HVRI mtDNA			
Nr	Nazwa	Nr próby	F1	F2	F3	209-356
1	Rog. ob. 29 28/99	2/2b	nd	20	11	16
2	Rog. ob. 51 20/99	3/3b	nd	16	nd	15
3	Rog. ob. 718 inw. 77/00	10/10b	6	14	11	13
4	Rog. ob. 724 inw 80/00	12/12b	11	12	13	14
5	Rog. ob. 680 inw 52/00	13/13b	7	17	5	12
6	Rog. ob. 438 (gr.68) inw 78/K/99	14/14b	10	13	7	8
7	Rog. ob. 96 13/99	20/20b	nd	11	5	12
8	Rog. ob. 11/99 ob. 24	21/21b	nd	9	nd	12
9	Rog. ob. 37 inw 32/99	23/23b	7	12	10	12
10	Rog. ob. 705 inw 74/00	24/24b	nd	13	6	12
11	Rog. ob. 665 inw 43/00	25/25b	nd	11	10	11
12	Rog. ob. 45 16/99	30/30b	nd	7	6	8
13	Rog. ob. 421 nr inw. 68/K/99	31/31b	nd	10	10	12
14	Kowalewko 572	27/27b	nd	5	1	5
15	Kowalewko 466	28/28b	nd	12	8	12
16	Kowalewko 597	29/29b	nd	12	9	nd
17	Kowalewko 243	83/83b	nd	nd	nd	9
18	Kowalewko stan.12 nr1	84/84b	nd	10	9	9
19	Kowalewko 267	85/85b	nd	9	10	10
20	Kowalewko 502	86/86b	nd	7	8	10
21	Kowalewko 314	87/87b	nd	9	9	9
22	Kowalewko 189	88/88b	nd	11	5	10
23	Kowalewko 188	89/89b	nd	10	9	11
24	Gąski 18 ob. 23234 na NE od ob. 566	49/49b	nd	13	5	5
25	Gąski 18 ob. 58	50/50b	nd	10	4	11
26	Karczyn ob.180 PET 30/160 czaszka	60/60b	nd	nd	nd	10
27	Karczyn ob.353 PET 30/580	61/61b	nd	12	10	8
28	Karczyn ob.302 wykop 339a 30/534	62/62b	nd	7	-	-

Tabela 11. C.d.

OKRES RZYMSKI			Łączna liczba sekwencji klonów fragmentów HVRI mtDNA			
Nr	Nazwa	Nr próby	F1	F2	F3	209-356
29	Karczyn ob. 303 czaszka	63/63b	nd	5	1	9
30	Karczyn ob. 36 PET 30/107	64/64b	nd	5	nd	5
31	Karczyn PET 30/148 ob. 157	69/69b	nd	9	4	10
32	Karczyn ob. 264 PET 30/340	70/70b	nd	1	nd	7
33	Karczyn ob. 374 stan 21/22	71/71b	nd	10	nd	-
34	Karczyn ob. 266 PET 30/339	72/72b	nd	5	3	10

Oznaczenia:

„nd” – nie wykonywano klonowania

„-” - brak fragmentu do klonowania

Tabela 12. Łączna ilość zsekwencjonowanych klonów fragmentów regionu HVR I mtDNA (F1, F2, F3 i 209-356) dla osobników pochodzących z populacji ze średniowiecza.

ŚREDNIOWIECZE			Łączna liczba sekwencji klonów fragmentów HVRI mtDNA			
Nr	Nazwa	Nr próby	F1	F2	F3	209-356
1	Cedynia 269 child	4/4b	nd	16	9	11
2	Cedynia 02	5/5b	nd	16	21	12
3	Cedynia 1008	6/6b	12	21	4	18
4	Cedynia 67 child	11/11b	7	15	12	11
5	Cedynia 119	32/32b	nd	10	8	10
7	Cedynia 645	37/37b	nd	11	4	10
8	Cedynia 615	38/38b	nd	9	9	10
9	Cedynia 936	39/39b	5	9	5	9
10	Cedynia 797	40/40b	nd	4	nd	11
11	Cedynia 801	41/41b	nd	8	7	11
12	Cedynia 805	42/42b	nd	10	10	10
13	Cedynia 695	43/43b	nd	11	10	10
14	Cedynia 323	52/52b	nd	10	10	10
15	Cedynia 708	53/53b	nd	10	8	10
16	Cedynia LX 19	54/54b	nd	10	10	14
17	Cedynia 773	55/55b	nd	11	12	13
18	Cedynia 172	56/56b	nd	10	5	16
19	Lednica male czaszka "1" Dz.22 3	65/65b	nd	7	nd	10
20	Lednica male 25/78	66/66b	nd	10	2	5
21	Lednica male "2"	67/67b	nd	6	-	5
22	Lednica czaszka female "10"	68/68b	nd	10	7	8
23	Lednica/Dziekanowice 9/92 adult	16/16b	nd	10	7	11
24	1554 Lednica/Dziekanowice	18/18b	nd	8	10	22
25	615 Lednica/Dziekanowice	19/19b	5	10	10	11
26	Lednica male "7"	73/73b	nd	7	nd	8
27	Lednica male "6"	74/74b	nd	11	nd	8
28	Lednica male "8"	75/75b	5	10	4	7
29	Lednica Dz.22 male P85	76/76b	nd	8	6	10
30	Lednica male "5"	66/66b	nd	5	nd	7
31	Lednica 556	82/82b	nd	7	6	-

Oznaczenia jak w Tabeli 11.

W przypadku prób, dla których nie otrzymano fragmentu 209-356, dodatkowo amplifikowany, klonowany i sekwencjonowany był fragment F4 regionu HVRI mtDNA. Dane na temat łącznej liczby sekwencji klonów fragmentu F4 dla poszczególnych osobników znajdują się w (Tabeli 13).

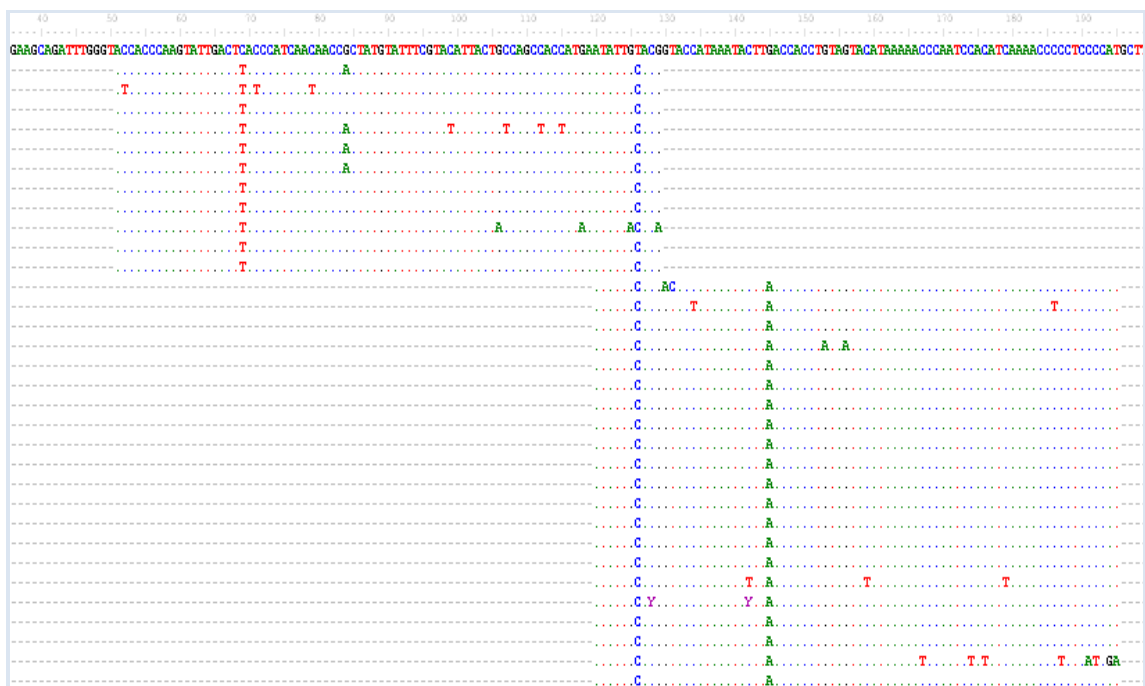
Tabela 13. Łączna ilość zsekwencjonowanych klonów fragmentów F4 regionu HVR I mtDNA dla osobników pochodzącego z populacji: 1 – Rogowo; 2- Kowalewko; 3-Cedynia; 4-Gąski.

			Łączna liczba sekwencji klonów fragmentów HVR I mtDNA
Nr	Nazwa	Nr próby	F4
1	R ob. 45 16/99	30	5
2	Kowalewko 597	29	10
3	Cedynia 936	39	8
4	Gąski 18 ob. 23234 na NE od ob. 566	49	5

3. Analiza sekwencji

Otrzymane sekwencje klonów określonych fragmentów regionu HVRI przyrównywane były do sekwencji referencyjnej rCRS (numer akcesyjny GenBank NC_012920.1) zgodnie z metodą opisaną w podrozdziale 2.3. (Rozdział III).

Dla 43 z 64 osobników otrzymano powtarzalne sekwencje fragmentów regionu HVR I. Uzyskano zatem fragmenty mtDNA o tym samym motywie mutacji w obu zębach danego osobnika. Przyrównania (ang. *alignment*) sekwencji klonów poszczególnych fragmentów HVR I mtDNA do sekwencji referencyjnej (rCRS) każdego z 43 osobników, znajdują się w Załącznikach niniejszej pracy (Załączniki 1-43). Dzięki temu, że amplifikowanych fragmenty mtDNA pokrywały się w dystalnych odcinkach, niektóre z mutacji w regionie HVR I mogły być widoczne i powtórzone w liczbie do 32 sklonowanych sekwencji (Rycina 9). Brak powtarzalności wyników, czyli identycznego rezultatu z dwóch różnych zębów należących do tego samego osobnika, dyskwalifikował go z dalszych badań (Rycina 10).



Rycina 9. Przyrównanie sekwencji klonów fragmentu F1 i F2 regionu HVR I mtDNA osobnika 1008 z Cedyni (numer prób 6/6b) do sekwencji referencyjnej rCRS. Kropkami oznaczono nukleotydy bez różnic względem rCRS; literami oznaczono zmiany nukleotydowe względem rCRS. Badany osobnik został zakwalifikowany do dalszych badań dzięki mutacjom (A→T, T→C, G→A), których obecność obserwowana była we wszystkich analizowanych sekwencjach klonów.



Rycina 10. Przyrównanie sekwencji klonów fragmentu 209-356 regionu HVR I mtDNA osobnika z Rogowa ob. 51 20/99 (numer prób 3/3b) do rCRS. Oznaczenia są takie same jak na Rycinie 9. Badany osobnik nie został zakwalifikowany do dalszych badań ze względu na brak obecności mutacji C→T w sekwencjach klonów pochodzących z drugiego zęba badanego osobnika.

Biorąc pod uwagę poszczególne stanowiska archeologiczne skuteczność otrzymania powtarzalnych wyników, czyli tych samych sekwencji fragmentów, pochodzących z dwóch zębów danego osobnika była różna, na co wskazują wyniki z Tabeli 14.

Tabela 14. Skuteczność otrzymania powtarzalnych wyników amplifikacji aDNA dla poszczególnych stanowisk archeologicznych.

Nazwa cmentarzyska	Liczba osobników wziętych do badań	Liczba osobników z powtarzalnym wynikiem amplifikacji DNA	% osobników z powtarzalnym wynikiem amplifikacji DNA
Okres rzymski			
Kowalewko	11	7	64%
Rogowo	13	12	92%
Karczyn	12	2	17%
Gąski	2	2	100%
Średniowiecze			
Cedynia	18	15	83%
Lednica	16	5	31%

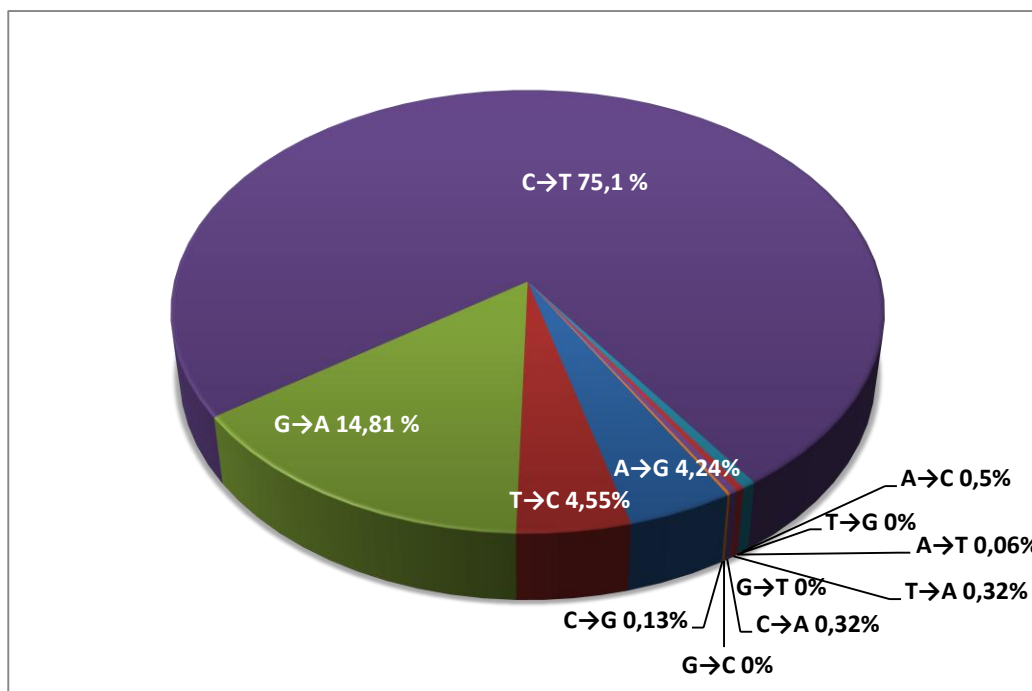
Najwięcej osobników z powtarzalnym rezultatem DNA pochodziło z Rogowa - 92% (okres rzymski) i z Cedyni - 83% (średniowiecze). Z kolei najmniej osobników z powtarzalnym rezultatem pochodziło z Karczyna – 17% (okres rzymski) i Lednicy – 31% (średniowiecze). Stanowisko w Gąskach, ze względu na zbyt małą liczbę prób nie zostało wzięte pod uwagę.

4. Analiza typów uszkodzeń kopalnego DNA

Typy uszkodzeń kopalnego DNA w postaci pojedynczych zmian nukleotydowych, a także ich liczba, zostały określone dla całkowitej liczby 1598 sekwencji klonów fragmentów regionu HVR I mtDNA otrzymanych łącznie dla 64 badanych osobników.

Najczęstszym typem zidentyfikowanych uszkodzeń były transzycje (98,6%) i ich liczba zdecydowanie przewyższała liczbę transwersji (1,3%). Wśród transzycji najczęściej występował typ 2 obejmujący substytucje C/T (75,1%) oraz G/A (14,8%), które pojawiały się odpowiednio 1186 i 234 razy (Rycina 11). Na kolejnych miejscach były transzycje T/C (4,55%) i A/G (4,24%), które występowały odpowiednio 72 i 67 razy (Rycina 11). Z kolei pośród nielicznych transwersji najczęściej było substytucji

A/C, które stanowiły zaledwie 0,5% wszystkich typów uszkodzeń aDNA. Nie stwierdzono natomiast obecności transwersji w postaci zmian nukleotydowych: T/G, G/T ani G/C.



Rycina 11. Wykres przedstawiający odsetek poszczególnych typów uszkodzeń w regionie HVR I, obejmujących tranzycje - czcionka biała oraz transwersje - czcionka czarna.

5. Analiza polimorfizmu pojedynczych nukleotydów w regionie kodującym mitochondrialnego DNA

Na podstawie obecności mutacji (lub ich braku) w analizowanym regionie HVR I, można było wstępnie ustalić przynależność haplogrupową badanych osobników. W przypadku prób o numerach 6/6b, 55/55b, 68/68b ze średniowiecza oraz 24/24b i 50/50b z okresu rzymskiego, przynależność haplogrupową można było określić już na podstawie sekwencji regionu HVR I mtDNA. W pozostałych przypadkach przynależność haplogrupową mtDNA określano na podstawie mutacji w regionie HVR I oraz wybranych SNP, które obecne były w regionie kodującym mtDNA. Do każdego SNP projektowane były pary starterów amplifikujące krótkie fragmenty mtDNA (53 – 111 pz), zawierające badane miejsca nukleotydowe. Opis

starterów zaprojektowanych do wybranych SNP znajduje się w Tabeli 4 (podrozdział 2.3, Rozdział III). W przypadku próby 39/39b oraz 67/67b sprawdzana była dodatkowo mutacja w pozycji 16362 w regionie HVR I (zmiana nukleotydowe spoza obszaru 16050-16355), a w przypadku próby 43/43b sprawdzana była pozycja 72 w regionie HVR II.

Fragmety regionów mtDNA zawierające SNP definiujące przynależność do określonych haplogrup mtDNA, zostały zamplifikowane w reakcji PCR, a następnie sklonowane i zsekwencjonowane. Pozycje badanych SNP, liczba sekwencji klonów i definiowana haplogrupa znajdują się w Tabeli 15 i 16.

Tabela 15. Pozycje badanych SNP definiujących przynależność do określonych haplogrup mtDNA, dla poszczególnych osobników z okresu rzymskiego.

OKRES RZYMSKI				
Nr	Nazwa	SNP	Definiowana haplogrupa	Ilość sekwencji klonów
1	Rogowo ob. 29 28/99	7028	H	8
2	Rogowo ob. 718 inw. 77/00	7028	H	4
3	Rogowo ob. 724 inw 80/00	7028	H	4
4	Rogowo. ob. 680 inw 52/00	7028	H	4
5	Rogowo ob. 438 (gr.68)	7028	H	4
6	Rogowo ob. 96 13/99	7028	H	4
7	Rogowo ob. 11/99 ob. 24	7028	H	4
8	Rogowo ob. 37 inw 32/99	10398	J	1
10	Rogowo ob. 665 inw 43/00	7028	H	5
11	Rogowo ob. 45 16/99	7028	H	4
12	Rogowo ob. 421	7028	H	5
13	Kowalewko 466	8251	W	5
14	Kowalewko 502	12308, 14139	U, U3	1, 5
15	Kowalewko 267	7028	H	5
16	Kowalewko stan.12 nr 1	7028	H	5
17	Kowalewko 314	7768	U5b	5
18	Kowalewko 189	8251	W	4
19	Kowalewko 188	8251	W	5
20	Kar. ob.353 PET 30/580	7028	H	5
22	Karczyn PET 30/148 ob. 157	10238	N1	8
23	Gąski 18 ob. 23234 na NE od ob. 566	7028	H	5

Tabela 16. Rodzaje badanych SNP definiujących przynależność do określonych haplogrup mtDNA, dla poszczególnych osobników ze średniowiecza.

ŚREDNIOWIECZE				
Nr	Nazwa	SNP	Definiowana haplogrupa	Ilość sekwencji klonów
1	Cedynia 269 child	7028	H	7
2	Cedynia 02	1719, 146, 195	X1,X2	7, 10, 10
4	Cedynia 67 child	16362 (HVRI)	R0a	4
5	Cedynia 119	1189	K1	4
6	Cedynia 645	7028	H	5

Tabela 16. C.d.

ŚREDNIOWIECZE				
Nr	Nazwa	SNP	Definiowana haplogrupa	Ilość sekwencji klonów
7	Cedynia 615	7028, 14766	H, HV	5, 5
8	Cedynia 936	7028, 16362 (HVRI)	H, R0a	5, 1
9	Cedynia 805	7028	H	5
10	Cedynia 695	7028, 72 (HVRII)	H, HV0,V*	5, 5
11	Cedynia 323	7028	H	3
12	Cedynia 708	1719, 146, 195	X1,X2	5, 5, 5
13	Cedynia LX 19	1189, 146, 152	K1,K2	2, 5, 5
15	Cedynia 172	7028	H	5
16	Led./Dziek. 9/92 adult	7028	H	7
18	Lednica male "8"	10398	J	5
19	Lednica male "5"	7028	H	5
20	1554 Lednica/Dziek.	8251	W	5

*nie otrzymano fragmentu regionu kodującego mtDNA z pozycją diagnostyczną dla haplogrupy V

6. Zróźnicowanie mitochondrialnego DNA w populacjach z okresu rzymskiego i średniowiecza

Na podstawie mutacji regionu kontrolnego i kodującego wyznaczono przynależność haplogrupową 23 osobników pochodzących z okresu rzymskiego i 20 osobników ze średniowiecza. Dane dotyczące przynależności do określonej haplogrupy mitochondrialnego DNA zawarte są w tabeli 17 i 18.

Przynależność haplogrupowa była wyznaczana na podstawie diagnostycznych SNP znajdujących się w regionie kodującym mitochondrialnego DNA. Brak mutacji diagnostycznej w pozycji 7028 oznaczał przynależność badanego osobnika do haplogrupy H, z kolei obecność mutacji w innych pozycjach regionu kodującego oznaczała przynależność do pozostałych haplogrup i podhaplogrup: 10398 (J), 8251 (W), 7768 (U5b), 12308 (U), 14139 (U3), 10238 (N1), 1189 (K1), 146 (K2), 195 i 1719 (X2), 146 (X1), 14766 (HV).

Pośród osobników z populacji z okresu rzymskiego zidentyfikowano 16 różnych haplotypów mtDNA (Tabela 17). Wchodzą one w skład głównych haplogrup występujących w zachodniej Euroazji (H, W, T, J, U i N). Kładem, który występował z największą częstością w badanej populacji był kład H - 60,9% (14 osobników). Z tego prawie 42,8% haplotypów w obrębie tej haplogrupy nie różniło się względem sekwencji referencyjnej (rCRS). Drugim najczęstszym kładem była haplogrupa W, która występowała z frekwencją 13% (3 osobniki) oraz haplogrupa U (13%),

obejmująca trzy podklady: U3, U5a i U5b. Pozostałe haplogrupy: T, J2a i N1a występowały z równą częstością 4,3% odpowiadającą obecności u jednego osobnika w badanej populacji.

Tabela 17. Przynależność poszczególnych osobników z okresu rzymskiego do określonych haplogrup mtDNA (Hg) wraz z opisem mutacji w regionie kontrolnym i kodującym.

Nr	OSOBNIK	NR PRÓBY	REGION KODUJĄCY	REGION HVR I (16050-16355)	Hg
1	R ob. 29 28/99	2/2b	7028C	CRS	H
2	R ob. 718 inw. 77/00	10/10b	7028C	16093C, 16129A, 16316G	H
3	R ob. 724 inw 80/00	12/12b	7028C	16153A, 16304C	H
4	R. ob. 680 inw 52/00	13/13b	7028C	CRS	H
5	R ob. 438 (gr.68) inw 78/K/99	14/14b	7028C	16183C, 16189C	H
6	R ob. 96 13/99	20/20b	7028C	CRS	H
7	R ob. 11/99 ob. 24	21/21b	7028C	CRS	H
8	R ob. 665 inw 43/00	25/25b	7028C	CRS	H
9	R ob. 45 16/99	30/30b	7028C	16183C, 16189C	H
10	R ob. 421 nr inw. 68/K/99	31/31b	7028C	16129A	H
11	R ob. 37 inw 32/99	23/23b	10398G	16069T, 16126C, 16145A, 16231C, 16261T, 16299G	J2a
12	R ob. 705 inw 74/00	24/24b		16126C, 16294T, 16296T, 16304C	T2
13	Kowalewko 267	85/85b	7028C	16304C	H
14	Kowalewko stan.12 nr 1	84/84b	7028C	CRS	H
15	Kowalewko 466	28/28b	8251A	16223T, 16292T	W
16	Kowalewko 189	88/88b	8251A	16192T, 16223T, 16292T	W
17	Kowalewko 188	89/89b	8251A	16223T, 16292T	W
18	Kowalewko 314	87/87b	7768G	16192T, 16270T	U5b
19	Kowalewko 502	86/86b	12308G, 14139G	16343G	U3
20	Karczyn ob.353 PET 30/580	61/61b	7028C	16222T	H
21	Karczyn PET 30/148 ob. 157	69/69b	10238C	16147A, 16223T, 16248T, 16320T, 16355T	N1a1
22	Gąski 18 ob. 23234 na NE od ob. 566	49/49b	7028C	16129A, 16304C	H
23	Gąski 18 ob. 58	50/50b		16256T, 16263C, 16270T	U5a

W populacji ze średniowiecza zidentyfikowano 19 różnych haplotypów mtDNA, spośród 20 osobników (Tabela 18). Wszystkie haplotypy należały do kładów zachodnio-euroazjatyckich (H, K, HV, T, J, W, X, HV0 i R0). Spośród nich z największą częstością występowała haplogrupa H (40%), w obrębie której 25% haplotypów nie różniło się względem sekwencji referencyjnej (rCRS). Inne klady tj. K, J i X występowały z częstością odpowiednio po 10%. Z kolei haplogrupy: T, W,

N1b, HV, HV0 oraz podklad R0a, występowały z częstością po 5% każda, co odpowiadało obecności danej haplogrupy u jednego osobnika.

Tabela 18. Przynależność poszczególnych osobników ze średniowiecza do określonych haplogrup mtDNA wraz z opisem mutacji w regionie kontrolnym i kodującym.

NR	OSOBNIK	NR PRÓBY	REGION KODUJĄCY – miejsca diagnostyczne dla haplogrup	REGION HVR I (16050-16355)	Hg
1	Cedynia 323	52/52b	7028C	CRS	H
2	Cedynia 172	56/56b	7028C	CRS	H
3	Cedynia 269 child	4/4b	7028 C	16354T	H
4	Cedynia 645	37/37b	7028C	16189C	H
5	Cedynia 936	39/39b	7028C, 16362T (HVRI)	16126C	H
6	Cedynia 805	42/42b	7028C	16162G	H1a
7	Cedynia 119	32/32b	1189C	16224C, 16311C	K1
8	Cedynia LX 19	54/54b	1189T, 146C, 152T	16222T, 16224T, 16270T, 16311C	K2
9	Cedynia 02	5/5b	1719G, 146C, 195C	16183C, 16189C, 16223T, 16258C, 16266T, 16274A, 16278T	X2
10	Cedynia 708	53/53b	1719A, 146T, 195C	16183C, 16189C, 16223T, 16278T	X2
11	Cedynia 615	38/38b	7028T, 14766T	16189C, 16271C	HV
12	Cedynia 1008	6/6b		16069T, 16126C, 16145A, 16222T, 16261T	J1b
13	Cedynia 67 child	11/11b	16362C (HVRI)	16126C	R0a
14	Cedynia 695	43/43b	7028T, 72C (HVRII)	16129A, 16145A, 16298C	HV0*
15	Cedynia 773	55/55b		16145A, 16176G, 16209C, 16223T	N1b
16	Led./Dziek. 9/92 adult	16/16b	7028C	16304C	H
17	Lednica male "5"	66/66b	7028 C	16311C	H
18	Lednica czaszka "10"	68/68b		16126C, 16163G, 16186T, 16189C, 16294T	T1a
19	Lednica male "8"	75/75b	10398G	16069T, 16126C, 16145A, 16172C, 16222T, 16261T	J1b
20	1554 Led./Dziek.	18/18b	8251A	16223T	W

*istnieje możliwość przynależności badanego haplotypu do haplogrupy V. Wynik ten nie ma znaczącego wpływu na dalsze badania.

7. Analizy statystyczne

7.1. Opis statystyczny populacji

W Tabelach 19 i 21 oznaczono obecność („1”) lub brak obecności („ . ”) analizowanego kopalnego haplotypu w poszczególnych współczesnych populacjach

porównawczych. Natomiast w Tabelach 20 i 22 oznaczono dokładną liczbę każdego ze wspólnych haplotypów mtDNA.

Grupa nieinformatywna prób z okresu rzymskiego składała się z sześciu haplotypów mtDNA, z czego trzy pierwsze występowały w największej ilości i pojawiły się we wszystkich populacjach. Najczęściej występował haplotyp osobników należących do haplogrupy H, bez różnic względem sekwencji referencyjnej rCRS. Haplotyp ten był obecny najczęściej (9,65%) pośród 3522 analizowanych współczesnych haplotypów porównawczych. Do grupy informatywnej zostało zaliczonych osiem haplotypów (Tabela 19). Tylko w populacjach współczesnych z Bułgarii, Niemiec oraz Serbii/Macedonii, nie odnotowano obecności żadnych informatywnych haplotypów dzielonych wspólnie z populacją z okresu rzymskiego. Pośród grupy badanych osobników zidentyfikowano także dwa haplotypy, które są unikatowe i nie występują w żadnej z badanych populacji porównawczych. Pierwszy z haplotypów z motywem mutacji 16256-16263-16270 należał do haplogrupy U5a, natomiast drugi z motywem 16147A-16223-16248-16320-16355 i rewersją mutacji w pozycji 16172 należał do haplogrupy N1a.

W przypadku prób z okresu średniowiecza, grupa nieinformatywna składała się z dziewięciu haplotypów mtDNA, z czego cztery pierwsze występowały w największej liczbie (Tabela 22) i pojawiły się we wszystkich badanych współczesnych populacjach. Analogicznie do okresu rzymskiego, najczęściej występował haplotyp należący do haplogrupy H, bez różnic względem sekwencji referencyjnej (rCRS). Występował on u dwóch osobników ze średniowiecza. Do grupy informatywnej zostało zaliczonych osiem kopalnych średniowiecznych haplotypów (Tabela 22). Występowały one w sześciu spośród 12 analizowanych współczesnych populacji. W pozostałych populacjach tj. Rosji (część europejska), Słowacji/Czechach, Bośni/Słowenii/Chorwacji, Niemczech, Litwie/Łotwie oraz Finlandii/Estonii nie stwierdzono obecności żadnych informatywnych haplotypów, dzielonych wspólnie z populacją ze średniowiecza. Podobnie jak w przypadku prób z okresu rzymskiego, w populacji ze średniowiecza zidentyfikowano dwa unikatowe haplotypy, które nie były obecne w żadnej z współczesnych populacji porównawczych. Pierwszy haplotyp z motywem mutacji 16129-16145-16298 oraz mutacją w pozycji 72 w regionie HVR II należał do haplogrupy HV0, natomiast drugi haplotyp z motywem 16183-16189-16223-16258-16266-16274-16278 należał do haplogrupy X2.

Tabela 19. Obecność haplotypów z okresu rzymskiego we współczesnych populacjach porównawczych.

			Okres rzymski	Polska	Białoruś	Rosja (część europejska)	Słowacja i Czechy	Bośnia Słowenia i Chorwacja	Bulgaria	Macedonia i Serbia	Ukraina	Szwecja	Niemcy	Litwa i Łotwa	Finlandia i Estonia	SUM
Grupa haplotypów	Hg	Mutacje w HVR I (-1600)	23	300	305	307	300	300	300	293	227	296	300	277	317	3522
Nieinformatywne	H	CRS	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12
	H	304	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12
	T2b	126 294 296 304	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12
	H	129	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	11
	W	223 292	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9
	U3	343	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	6
Informatywne	H	183 189	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
	H	93 129 316	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4
	H	222	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
	H	129 304	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	U5b	192 270	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
	H	153 304	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
	J2a	69,126, 145, 231, 261, 299	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	W	192 223 292	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Unikatowe	U5a	256 263 270	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	N1a1	147A 223 248 320 355	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Suma wszystkich wspólnych haplotypów (obecności)			16	9	7	7	7	9	5	5	7	5	4	6	7	78
Suma informatywnych haplotypów			10	4	1	1	2	3	0	0	1	1	0	2	1	16

Oznaczenia:

„1” – obecność haplotypu

„.” – brak obecności haplotypu

SUM – suma wszystkich haplotypów populacji porównawczych

Hg - haplogrupa

Kolor żółty – haplotypy informatywne

Kolor pomarańczowy – haplotypy unikatowe

Tabela 20. Liczba poszczególnych wspólnych haplotypów z okresu rzymskiego we współczesnych populacjach porównawczych.

			Okres rzymski	Polska	Białoruś	Rosja (część europejska)	Słowacja i Czechy	Bośnia, Słowenia i Chorwacja	Bulgaria	Macedonia i Serbia	Ukraina	Szwecja	Niemcy	Litwa i Łotwa	Finlandia i Estonia	SUM
Grupy haplotypów	Hg	Mutacje w HVR I (-1600)	23	300	305	307	300	300	300	293	227	296	300	277	317	3522
Nieinformatywne	H	CRS	6	46	23	23	25	41	27	31	20	19	35	20	30	340
	H	304	1	5	5	6	12	23	6	7	1	2	8	3	3	81
	T2b	126, 294, 296, 304	1	5	1	8	2	7	1	4	5	5	8	10	7	63
	H	129	1	2	5	3	3	4	2	1	1	.	2	7	2	32
	W	223, 292	2	2	3	3	1	4	1	.	1	3	.	.	3	21
	U3	343	1	.	3	1	.	5	.	1	2	.	.	1	1	14
Informatywne	H	183, 189	2	2	.	.	.	1	3	6
	H	93, 129, 316	1	1	.	.	1	2	.	1	.	5
	H	222	1	1	.	.	.	1	.	2
	H	129, 304	1	1	1	.	2
	U5b	192, 270	1	.	.	.	1	1	2
	H	153, 304	1	1	.	1	2
	J2a	69,126, 145, 231, 261, 299	1	1	1
	W	192, 223, 292	1	.	1	1
Unikatowe	U5a	256, 263, 270	1	0
	N1a1	147A, 223, 248, 320, 355	1	0
Suma wszystkich wspólnych haplotypów			23	65	42	45	45	87	37	44	31	31	53	44	49	572
Suma wszystkich informatywnych haplotypów			11	5	1	1	2	3	0	0	1	2	0	3	3	21
% inform. wśród wszystkich wspólnych haplotypów				7,69	2,44	2,22	4,44	3,45	0	0	3,23	6,45	0	6,82	6,12	

Oznaczenia jak w Tabeli 19

Tabela 21. Obecność haplotypów średniowiecznych we współczesnych populacjach porównawczych.

			Średniowiecze	Polska	Białoruś	Rosja	Słowacja i Czechy	Bośnia, Słowenia i Chorwacja	Bulgaria	Macedonia i Serbia	Ukraina	Szwecja	Niemcy	Litwa i Lotwa	Finlandia i Estonia	SUM
Grupa haplotypów	Hg	Mutacje w HVR I (-1600)	20	300	305	307	300	300	300	293	227	296	300	277	317	3522
nieinformatywne	H	CRS	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12
	H	304	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12
	H	311	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12
	K1	224, 311	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12
	T1a	126, 163, 186, 189, 294	1	1	.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	11
	H1a	162	1	1	1	1	1	.	1	1	1	1	1	1	1	11
	H	354	1	1	1	1	.	1	1	.	1	.	1	1	1	9
	H	189	1	1	1	.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	11
	J1b	069, 126, 145, 172, 222, 261	1	.	1	1	1	1	1	.	1	.	.	1	1	8
informatywne	X2	183, 189, 223, 278	1	1	1	1	3
	N1b	145, 176A, 209, 223	1	.	1	1	2
	W	223	1	1	1	2
	H	126	1	1	1
	J1b	069, 126, 145, 222, 261	1	1	1
	K2	222, 224, 270, 311	1	1	.	.	.	1
	R0a	126, 362	1	1	1
	HV	189, 271	1	1	1
Unikatowe	HV0	129, 145, 298 , (72 HVRII)	1	0
	X2	183, 189, 223, 258, 266, 274, 278	1	0
Suma wszystkich wspólnych haplotypów			20	10	10	8	8	9	10	10	11	9	7	9	9	110
Suma informatywnych haplotypów			10	2	2	0	0	0	2	2	3	1	0	0	0	12

Oznaczenia jak w Tabeli 19.

Tabela 22. Liczba poszczególnych średniowiecznych haplotypów we współczesnych populacjach porównawczych.

			Średniowiecze	Polska	Białoruś	Rosja (część europejska)	Słowacja i Czechy	Bośnia, Słowenia i Chorwacja	Bułgaria	Macedonia i Serbia	Ukraina	Szwecja	Niemcy	Litwa i Łotwa	Finlandia i Estonia	SUM
Grupa haplotypów	Hg	Mutacje w HVR I (-1600)	20	300	305	307	300	300	300	293	227	296	300	277	317	3522
Nieinforma-tywne	H	CRS	2	46	23	23	25	41	27	31	20	19	35	20	30	340
	H	304	1	5	5	6	12	23	6	7	1	3	8	3	3	82
	H	311	1	4	3	3	5	18	2	6	1	12	6	2	10	72
	K1	224, 311	1	4	4	4	4	8	2	5	7	4	3	3	9	57
	T1a	126, 163, 186, 189, 294	1	3	.	1	6	4	7	11	3	4	3	6	6	54
	H1a	162	1	1	1	3	3	2	.	1	1	2	3	7	10	34
	H	354	1	7	3	6	.	2	2	4	.	2	.	3	5	34
	H	189	1	3	2	.	2	1	1	11	1	2	2	1	2	28
	J1b	069, 126, 145, 172, 222, 261	1	.	4	4	3	2	1	.	1	.	.	2	3	20
Informatywne	X2	183C, 189, 223, 278	1	1	2	1	4
	N1b	145, 176A, 209, 223	1	.	3	1	4
	W	223	1	1	1	2
	H	126	1	1	1
	J1b	069, 126, 145, 222,261	1	1	1
	K2	222, 224, 270, 311	1	1	.	.	.	1
	R0a	126, 362	1	1	1
	HV	189, 271	1	1	1
unikatowe	HV0	129, 145, 298 , (72 HVRII)	1	0
	X2	183C, 189, 223, 258, 266, 274, 278	1	0
Suma wszystkich wspólnych haplotypów			20	75	49	50	60	101	51	78	38	49	60	47	78	736
Suma wszystkich informatywnych haplotypów			10	2	4	0	0	0	3	2	3	1	0	0	0	
% inform. wśród wszystkich wspólnych hapl.				2,7	8,2	0	0	0	5,9	2,6	7,9	2,0	0	0	0	

Oznaczenia jak w Tabeli 19.

7.2. Analiza wspólnych haplotypów

Wartości średnie udziału poszczególnych holotypów (wszystkich wspólnych, informatywnych oraz nieinformatywnych) w populacjach wraz z miarami zmienności przedstawiono w Tabeli 23 i 24. Graficzny obraz średniego procentu udziału poszczególnych grup haplotypów z okresu rzymskiego znajduje się na Rycinie 12,a ze średniowiecza na Rycinie 13.

Tabela 23. Średni procent udziału poszczególnych grup haplotypów wspólnie dzielonych pomiędzy populacją z okresu rzymskiego i pozostałymi populacjami, wraz z miarami zmienności.

Populacje współczesne	Haplotypy osobników z okresu rzymskiego		
	Średni % wszystkich wspólnych haplotypów	Średni % infromatywnych haplotypów	Średni % nieinformatywnych haplotypów
Polska	21,68 ± 9,39	7,67 ± 1,25	13,98 ± 10,02
Białoruś	13,43 ± 6,05	2,42 ± 1,25	10,99 ± 6,68
Rosja (cz. europejska)	14,65 ± 7,21	2,22 ± 0,85	12,43 ± 7,34
Słowacja/Czechy	14,98 ± 6,94	4,42 ± 0,8	10,54 ± 7,19
Bośnia/Słowenia/Chorwacja	29,00 ± 6,62	3,45 ± 0,75	25,56 ± 9,00
Bułgaria	12,36 ± 6,14	0,00	12,36 ± 6,14
Macedonia	14,98 ± 7,37	0,00	14,98 ± 7,37
Serbia	13,65 ± 4,88	3,22 ± 0,85	10,42 ± 5,01
Ukraina	10,48 ± 4,58	6,46 ± 0,5	4,03 ± 3,83
Szwecja	17,76 ± 8,74	0,00	17,76 ± 8,74
Niemcy	15,89 ± 6,44	6,83 ± 0,75	9,08 ± 6,82
Finlandia/Estonia	15,48 ± 7,26	6,15 ± 0,75	9,37 ± 7,64

Tabela 24. Średni procent udziału poszczególnych grup haplotypów wspólnie dzielonych pomiędzy populacją z okresu rzymskiego i pozostałymi populacjami wraz z miarami zmienności dla średniowiecza.

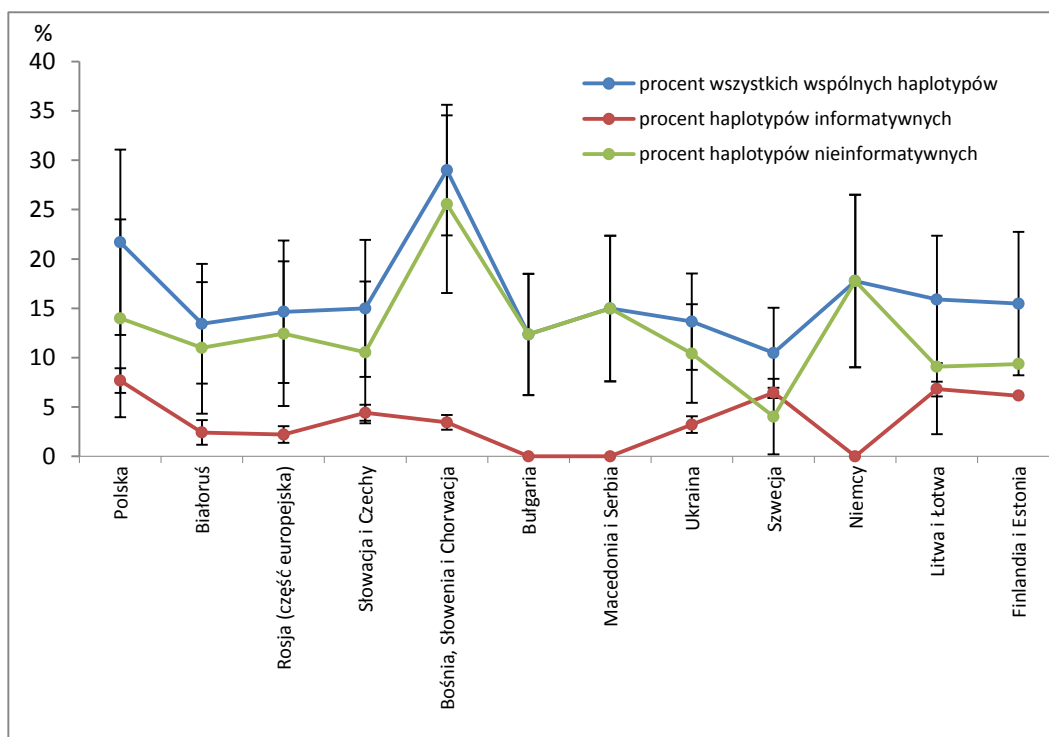
Populacje współczesne	Haplotypy osobników ze średniowiecza		
	Średni % wszystkich wspólnych haplotypów	Średni % informatywnych haplotypów	Średni % nieinformatywnych haplotypów
Polska	24,94 ± 8,42	2,61 ± 0,65	22,28 ± 8,17
Białoruś	16,05 ± 5,07	8,15 ± 0,14	7,89 ± 5,02
Rosja (cz. europejska)	16,17 ± 5,62	0,00	16,17 ± 5,62
Słowacja/Czechy	19,79 ± 6,81	0,00	19,79 ± 6,81
Bośnia/Słowenia/Chorwacja	33,60 ± 7,27	0,00	33,60 ± 7,27
Bułgaria	16,80 ± 5,90	5,69 ± 0,99	10,92 ± 5,53
Macedonia	26,65 ± 8,66	2,59 ± 0,65	24,08 ± 8,41
Serbia	16,74 ± 4,25	7,89 ± 0,9	8,84 ± 3,88

Tabela 24. C.d.

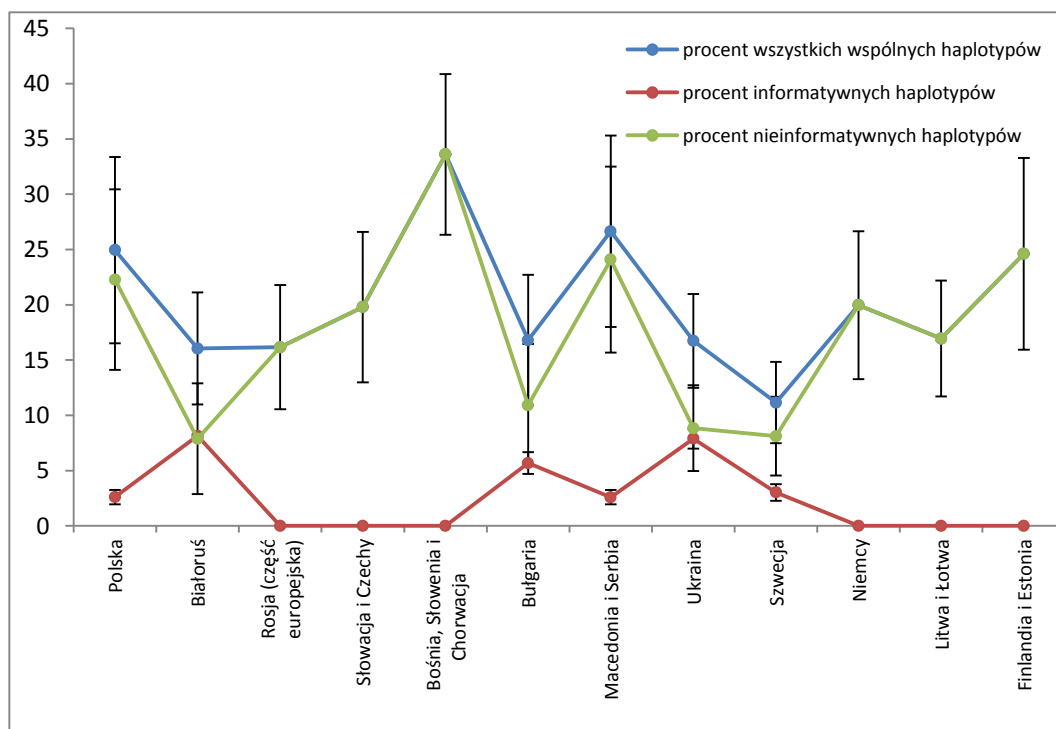
Populacje współczesne	Haplotypy osobników ze średniowiecza		
	Średni % wszystkich wspólnych haplotypów	Średni % informatywnych haplotypów	Średni % nieinformatywnych haplotypów
Ukraina	11,15±3,67	3,03±0,75	8,12± 3,55
Szwecja	19,96± 6,70	0,00	19,96±6,70
Niemcy	16,94± 5,24	0,00	16,94±5,24
Finlandia/Estonia	24,60± 8,66	0,00	24,60± 8,66

Stwierdzono obecność istotnych różnic międzypopulacyjnych w częstości występowania haplotypów nieinformatywnych dzielonych wspólnie z populacją z okresu rzymskiego i populacjami współczesnymi (jednoczynnikowa ANOVA $F_{11;84}=3,45$ $p=0,03$; Rycina 12). Różnice te dotyczyły tylko populacji Bośnia/Słowenia/Chorwacja *vs.* Szwecja (*post-hoc* $p < 0,05$). Podobnie stwierdzono obecność istotnych różnic w udziale haplotypów informatywnych (jednoczynnikowa ANOVA $F_{11;84} = 8,27$; $p = 0,01$; Rycina 12), a różnice te dotyczyły populacji: Polska *vs.* Białoruś, Rosja (część europejska), Słowacja/Czechy i Bośnia/Słowenia/Chorwacja; Rosja (część europejska) *vs.* Słowacja/Czechy, Szwecja *vs.* Białoruś, Rosja (część europejska), Słowacja/Czechy i Bośnia/Słowenia/Chorwacja (*post-hoc* we wszystkich przypadkach $p < 0,05$).

W przypadku populacji ze średniowiecza nie stwierdzono istotnych różnic międzypopulacyjnych w częstości występowania haplotypów nieinformatywnych dzielonych wspólnie z populacjami współczesnymi (jednoczynnikowa ANOVA $F_{11,84}=0,86$ $p=0,67$; Rycina 13). Stwierdzono natomiast istotne różnice międzypopulacyjne w udziale haplotypów informatywnych (jednoczynnikowa ANOVA $F_{11,84} = 6,42$ $p=0,01$; Rycina 13), a różnica dotyczyła populacji: Polska *vs.* Bośnia/Słowenia/Chorwacja, Bułgaria, Ukraina oraz Macedonia/Serbia *vs.* Bułgaria, Ukraina (*post-hoc* we wszystkich przypadkach $p < 0,05$).



Rycina 12. Procent wszystkich wspólnych, informatywnych i nieinformatywnych haplotypów wraz z przedziałami ufności dla populacji z okresu rzymskiego.



Rycina 13. Procent wszystkich wspólnych, informatywnych i nieinformatywnych haplotypów wraz z przedziałami ufności dla populacji ze średniowiecza.

Różnice pomiędzy haplotypami informatywnymi w poszczególnych populacjach, a średnim udziałem holotypów informatywnych w całej znanej populacji zawiera Tabela 25 i 26. Największy procent haplotypów dzielonych wspólnie z populacją z okresu rzymskiego, miała współczesna populacja Polski, ale także Litwy/Łotwy, Szwecji oraz Finlandii/Estonii ($p < 0,05$). W przypadku Białorusi, Rosji, Słowacji/Czech, Bośni/Słowenii/Chorwacji, Ukrainy, procent informatywnych haplotypów dzielonych wspólnie z populacją z okresu rzymskiego nie był istotny statystycznie. Dla Bułgarii, Macedonii/Serbii i Niemiec, test z nie był wykonywany ze względu na brak wspólnych haplotypów (Tabela 25).

Największy istotny procent haplotypów dzielonych wspólnie z populacją ze średniowiecza, obserwowany był w populacji z Białorusi, Ukrainy oraz Bułgarii ($p < 0,05$) (Tabela 26). Nieistotne statystycznie różnice wykazano dla populacji ze Szwecji, Polski i Macedonii/Serbii. Ze względu na brak wspólnych haplotypów, testu z nie wykonano dla populacji z Rosji, Słowacji/Czech, Bośni/Słowenii/Chorwacji, Niemiec, Litwy/Łotwy oraz Finlandii/Estonii.

Tabela 25. Istotność statystyczna informatywnych haplotypów dzielonych wspólnie pomiędzy populacją z okresu rzymskiego i współczesnymi populacjami porównawczymi. Czerwonym drukiem oznaczono wartości, które są istotne statystycznie.

	Suma wszystkich wspólnych haplotypów	Suma informatywnych haplotypów	% informatywnych haplotypów	TEST z , jednostronny	TEST z , dwustronny
Polska	65	5	7,692307692	0,999999868	0,000
Białoruś	41	1	2,43902439	0,078486779	0,157
Rosja (część europejska)	45	1	2,222222222	0,045883578	0,092
Słowacja i Czechy	45	2	4,444444444	0,862100702	0,276
Bośnia, Słowenia i Chorwacja	87	3	3,448275862	0,43857327	0,877
Bulgaria	37	brak	-	-	-
Macedonia i Serbia	44	brak	-	-	-
Ukraina	31	1	3,225806452	0,332692027	0,665
Szwecja	31	2	6,451612903	0,99983912	0,000
Niemcy	53	brak	-	-	-
Litwa i Łotwa	44	3	6,818181818	0,999974936	0,000
Finlandia i Estonia	49	3	6,12244898	0,999278565	0,001
średnia			3,572027064		
odchylenie standardowe			2,773101235		

Tabela 26. Istotność statystyczna informatywnych haplotypów dzielonych wspólnie z populacją ze średniowiecza i współczesnymi populacjami porównawczymi. Czerwonym drukiem oznaczono wartości, które są istotne statystycznie.

	Suma wszystkich wspólnych haplotypów	Suma informatywnych haplotypów	% informatywnych haplotypów	TEST z, jednostronny	TEST z, dwustronny
Polska	75	2	2,666666667	0,564835883	0,870
Białoruś	49	4	8,163265306	1	0,000
Rosja (część europejska)	50	brak	-	-	-
Słowacja i Czechy	60	brak	-	-	-
Bośnia, Słowenia i Chorwacja	101	brak	-	-	-
Bułgaria	51	3	5,888888888	0,999885871	0,000
Macedonia i Serbia	78	2	2,564102564	0,520388001	0,959
Ukraina	38	3	7,894736842	0,999999998	0,000
Szwecja	33	1	3,03030303	0,712511671	0,575
Niemcy	60	brak	-	-	-
Litwa i Łotwa	47	brak	-	-	-
Finlandia i Estonia	78	brak	-	-	-
średnia			2,517330274		
odchylenie standardowe			3,169023818		

8. Analiza różnicowania międzypopulacyjnego

W Tabeli 27 znajdują się częstości haplogrup mtDNA wyrażone w procentach, obliczone dla badanych populacji z okresu rzymskiego i średniowiecza, jak również dla poszczególnych populacji współczesnych oraz porównawczych populacji kopalnych z Danii (średniowiecze i okres żelaza) oraz Niemiec (neolit LBK). Źródła danych, które zostały wykorzystane do określenia częstości haplogrup znajdują się w podrozdziale 2.2 i 2.3 (Rozdział III). Obliczone na podstawie częstości haplogrup dystanse genetyczne (linearny F_{ST} Slatkina) znajdują się w Tabeli 28.

Największe istotne statystycznie dystanse genetyczne na poziomie 0,112 - 0,047 można było zaobserwować między populacją neolityczną i wszystkimi pozostałymi populacjami. Duże istotne statystycznie dystanse genetyczne na poziomie 0,094 – 0,013, zanotowano także między populacją Finlandii i większością pozostałych populacji. Na uwagę zasługuje fakt, że populacja z okresu rzymskiego była najbardziej odległa pod względem genetycznym od populacji z Ukrainy (0,029) i Białorusi (0,026) (nie licząc populacji neolitycznej, Finlandii oraz Łotwy) i były to wartości istotne statystycznie.

Tabela 27. Częstości haplogrup mtDNA (wyrażone procentowo) w populacjach kopalnych i współczesnych. Źródła danych populacji współczesnych i kopalnych znajdują się w podrozdziale odpowiednio 1.4. i 1.3. (Rozdział III).

	Populacje kopalne					Populacje współczesne					
	Okres rzymski (badania własne) N=23	Średniowiecze (badania własne) N=20	Okres żelaza Dania N=24	Średniowiecze Dania N=29	Neolit (LBK) Niemcy N=42	Czechy N=179	Polska N=417	Słowacja N=207	Rosja (cz. europ.) N=201	Ukraina N=132	Białoruś N=267
HAPLOGRUPA											
H	60,9 (14)	40,0 (8)	41,6 (10)	34,5 (10)	16,7 (7)	44,1 (79)	41,7 (174)	45,4 (94)	42,3 (85)	37,9 (50)	37,1 (99)
R0	0,0 (0)	5 (1)	4,2 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,2 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
HV	0,0 (0)	5 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)	7,1 (3)	1,7 (3)	1,9 (8)	2,9 (6)	2,0 (4)	3,0 (4)	2,6 (7)
HV0	0,0 (0)	5 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,5 (1)	0,2 (1)	3,9 (8)	0,5 (1)	1,5 (2)	1,5 (4)
V	0,0 (0)	0,0 (0)	4,2 (1)	0,0 (0)	4,8 (2)	1,7 (3)	4,8 (20)	0,0 (0)	5,5 (11)	6,8 (9)	5,2 (14)
U (U*, U1, U2 U3, U6, U7, U8)	4,3 (1)	0,0 (0)	8,3 (2)	3,4 (1)	2,4 (1)	3,4 (6)	4,3 (18)	1,9 (4)	4,0 (8)	7,6 (10)	4,5 (12)
U4	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	2,8 (5)	5 (21)	5,3 (11)	3,5 (7)	4,5 (6)	3,7 (10)
U5	8,7 (2)	0,0 (0)	8,3 (2)	10,3 (3)	2,4 (1)	8,4 (15)	12,2 (51)	7,2 (16)	10,5 (21)	7,6 (10)	12,0 (32)
K	0,0 (0)	10(2)	8,3 (2)	6,9 (2)	14,3 (6)	3,9 (7)	4,3 (18)	1,5 (3)	3,0 (6)	5,3 (7)	3,7 (10)
J	4,3 (1)	10 (2)	8,3 (2)	13,8 (4)	9,5 (4)	11,7 (21)	7,7 (32)	9,2 (19)	8,0 (16)	11,4 (15)	9,0 (24)
T	4,3 (1)	5 (1)	4,2 (1)	10,3 (3)	21,4 (9)	12,3 (22)	7,4 (31)	10,6 (22)	10,9 (22)	8,3 (11)	7,5 (20)
X	0,0 (0)	10 (2)	0,0 (0)	3,4 (1)	0,0 (0)	1,7 (3)	1,9 (8)	1,5 (3)	3,5 (7)	1,5 (2)	1,1 (3)
W	13 (3)	5 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)	7,1 (3)	0,5 (1)	3,6 (15)	2,9 (6)	1,9 (4)	1,5 (2)	3,4 (9)
I	0,0 (0)	0,0 (0)	12,5 (3)	13,8 (4)	0,0 (0)	2,8 (5)	2,2 (9)	4,8 (10)	2,5 (5)	1,5 (2)	2,6 (7)
NIa	4,3 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)	3,4 (1)	14,3 (6)	0,5 (1)	0,5 (2)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,7 (2)
NIb	0,0 (0)	5 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	1,1 (2)	0,7 (3)	0,5 (1)	0,0 (0)	1,5 (2)	1,5 (4)
N (N+N9, A)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	1,1 (2)	0,2 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	1,1 (3)
M (M, C, D, G, Z)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	1,7 (3)	0,5 (2)	0,9 (2)	1,5 (3)	0,0 (0)	2,6 (7)
L, R, B	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,5 (2)	0,9 (2)	0,75 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)

Oznaczenia: N- liczebność populacji

Tabela 27. C.d

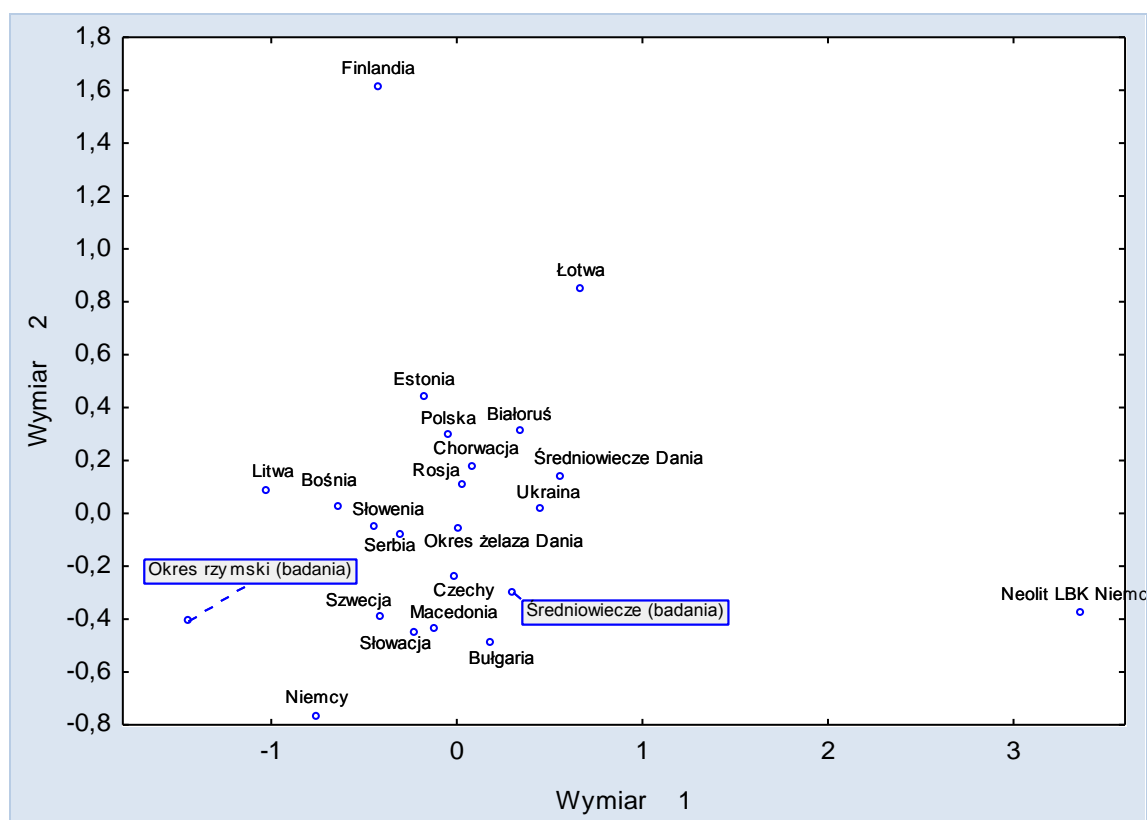
	Populacje współczesne												
	Chorwacja	Bulgaria	Macedonia	Serbia	Słowenia	Bośnia	Litwa	Łotwa	Estonia	Niemcy	Szwecja	Finlandia	
	N=300	N=855	N=200	N=100	N=104	N=144	N=149	N=112	N=113	N=287	N=286	N=200	
HAPLOGRUPA													
H	41,3 (124)	42 (359)	45 (90)	45 (45)	47,1 (49)	47,9 (69)	51 (76)	35,7 (40)	42,5 (48)	51,9 (149)	46,9 (134)	40 (80)	
R0	0,0 (0)	4,7 (5)	1,0 (2)	0,0 (0)	0,0 (0)	1,4 (2)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	
HV	2,7 (8)	3,9 (33)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,7 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,7 (2)	0,0 (0)	
HV0	0,7 (2)	2,22 (19)	4,5 (9)	0,0 (0)	2,9 (3)	1,4 (2)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	3,8 (11)	4,5 (9)	
V	4,7 (14)	1,5 (13)	0,0 (0)	4,0 (4)	3,8 (4)	4,9 (7)	6,7 (10)	1,8 (2)	1,8 (2)	5,6 (16)	0,0 (0)	0,0 (0)	
U (U*, U1, U2, U3, U6, U7, U8)													
U4	1,7 (5)	3,9 (33)	2,0 (4)	3,0 (3)	5,8 (6)	5,6 (8)	2,7 (4)	8,9 (10)	4,4 (5)	2,1 (6)	2,8 (8)	2,0 (4)	
U5	11,7 (35)	6,7 (57)	8,0 (16)	9,0 (9)	10,6 (11)	11,8 (17)	13,4 (20)	13,4 (15)	13,3 (15)	4,9 (14)	8,7 (25)	24,5 (49)	
K	3,7 (11)	5,8 (50)	5,0 (10)	4,0 (4)	3,8 (4)	4,2 (6)	0,7 (1)	2,7 (3)	0,9 (1)	4,2 (12)	6,3 (18)	6,5 (13)	
J	10,3 (31)	7,8 (67)	7,5 (15)	9,0 (9)	9,6 (10)	6,9 (10)	5,4 (8)	5,4 (6)	13,3 (15)	10,5 (30)	9,8 (28)	4,5 (9)	
T	9,7 (29)	10,6 (91)	9,5 (19)	11,0 (11)	5,8 (6)	4,9 (7)	11,4 (17)	8,9 (10)	14,2 (16)	9,4 (27)	8,0 (23)	6,0 (12)	
X	1,3 (4)	2,1 (18)	3,0 (6)	2,0 (2)	0,9 (1)	1,4 (2)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,9 (1)	1,7 (5)	2,4 (7)	2,5 (5)	
W	2,0 (6)	2,8 (24)	4,0 (8)	6,0 (6)	4,8 (5)	1,4 (2)	3,4 (5)	4,5 (5)	2,6 (3)	1,4 (4)	1,4 (4)	2,5 (5)	
I	2,3 (7)	1,2 (10)	1,5 (3)	2,0 (2)	1,9 (2)	2,8 (4)	2,7 (4)	5,3 (6)	1,8 (2)	4,2 (12)	2,8 (8)	2,0 (4)	
N1a	0,7 (2)	0,7 (6)	0,0 (0)	1,0 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	1,5 (3)	
N1b	0,0 (0)	0,7 (6)	2,0 (4)	1,0 (1)	0,0 (0)	0,7 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	
N (N+N9, A)	0,0 (0)	0,3 (3)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	
M (M, C, D, G, Z)	1,0 (3)	0,9 (8)	0,5 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)	1,4 (2)	0,0 (0)	0,9 (1)	0,0 (0)	1,4 (4)	1,4 (4)	0,0 (0)	
L, R, B	0,3 (1)	0,6 (5)	0,5 (1)	1,0 (1)	0,0 (0)	0,7 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	1,7 (5)	2,5 (5)	

Oznaczenia: N- liczebność populacji

Tabela 28. Macierz międzypopulacyjnych dystansów genetycznych Słatkina (linearny Fst). Istotność statystyczna oznaczona jest znakiem (+), p<0,05.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
1 Okres rzymski (bad. własne)																								
2 Średniowiecze (bad. własne)	0,019																							
3 Okres żelaza Dania	0,016	0,000																						
4 Średniowiecze Dania	0,044	0,000	0,000																					
5 Neolit LBK Niemcy	0,138	0,044	0,055	0,030																				
6 Czechy	0,016	0,000	0,000	0,000	0,067																			
7 Polska	0,014	0,002	0,000	0,002	0,068	0,002																		
8 Słowacja	0,010	0,000	0,000	0,002	0,080	0,000	0,003																	
9 Rosja	0,016	0,000	0,000	0,000	0,064	0,000	0,000	0,000																
10 Ukraina	0,029	0,000	0,000	0,000	0,047	0,001	0,000	0,005	0,000															
11 Białoruś	0,026	0,000	0,000	0,000	0,051	0,003	0,000	0,006	0,000	0,000														
12 Chorwacja	0,018	0,003	0,000	0,000	0,062	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000													
13 Bośnia	0,004	0,005	0,000	0,010	0,099	0,002	0,000	0,002	0,000	0,005	0,004	0,002												
14 Słowenia	0,000	0,000	0,000	0,007	0,088	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,000	0,000											
15 Serbia	0,003	0,000	0,000	0,000	0,065	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000										
16 Macedonia	0,006	0,000	0,000	0,004	0,075	0,000	0,002	0,000	0,001	0,003	0,005	0,002	0,002	0,000	0,000									
17 Bułgaria	0,017	0,000	0,000	0,003	0,057	0,000	0,002	0,001	0,000	0,000	0,003	0,002	0,005	0,002	0,000	0,000								
18 Litwa	0,000	0,022	0,004	0,021	0,112	0,005	0,005	0,005	0,002	0,014	0,012	0,006	0,000	0,000	0,000	0,007	0,011							
19 Łotwa	0,034	0,018	0,000	0,001	0,060	0,012	0,004	0,012	0,006	0,003	0,003	0,006	0,013	0,010	0,009	0,010	0,009	0,020						
20 Estonia	0,020	0,009	0,000	0,000	0,068	0,000	0,001	0,001	0,000	0,002	0,002	0,000	0,005	0,000	0,000	0,003	0,004	0,004	0,006					
21 Niemcy	0,005	0,009	0,000	0,016	0,111	0,003	0,010	0,005	0,006	0,012	0,016	0,009	0,003	0,001	0,001	0,006	0,009	0,004	0,030	0,010				
22 Szwecja	0,009	0,000	0,000	0,004	0,087	0,000	0,004	0,000	0,002	0,006	0,007	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,007	0,016	0,004	0,003			
23 Finlandia	0,038	0,032	0,013	0,016	0,094	0,024	0,013	0,024	0,017	0,026	0,014	0,017	0,015	0,016	0,019	0,021	0,025	0,022	0,020	0,018	0,043	0,020		

Na podstawie macierzy Slatkina (linearny F_{ST}) wykonano skalowanie wielowymiarowe (MDS). Zgodnie z otrzymanym obrazem (Rycina 14), można stwierdzić, że rozwarstwienie struktury genetycznej populacji europejskich nie jest duże. Jedynie populacja kopalna z neolitu (LBK) oraz populacje współczesne z Finlandii i Łotwy oddzielają się od reszty analizowanych populacji. Dzięki zwiększeniu liczby badanych osobników z Białorusi (dane nieopublikowane udostępnione przez Estonian Bicentre), populacja ta zbliżyła się pod względem międzypopulacyjnych odległości genetycznych do pozostałych populacji słowiańskich. W stosunkowo homogennej grupie znalazła się także populacja ze średniowiecza i nieco bardziej od niej oddalona populacja z okresu rzymskiego. Odległość między nimi różnicował przede wszystkim wymiar 1. Obie kopalne populacje są także oddalone od współczesnej populacji Polskiej. Populacje z okresu żelaza i średniowiecza z Danii, mimo swojej małej liczebności wykazują mniejszy dystans genetyczny względem siebie, aniżeli populacje z okresu rzymskiego i średniowiecza z terenów współczesnej Polski.



Rycina 14. Wykres skalowania wielowymiarowego MDS linearnych dystansów F_{ST} określonych na podstawie częstości haplogrup mtDNA populacji kopalnych oraz współczesnych populacji słowiańskich i sąsiadujących populacji europejskich. Źródła danych populacyjnych znajdują się w podrozdziale 2.3 (Rozdział III).

Rozdział V. Dyskusja

1. Skuteczność izolacji DNA

Badania kopalnego DNA prowadzone w ramach niniejszej pracy wykonywane były w Center for GeoGenetics na Uniwersytecie Kopenhaskim, w Danii. Dzięki zachowaniu określonych warunków laboratoryjnych oraz zapewnieniu odpowiednich metodologii badawczych, możliwe było uzyskanie wysokiej ilości powtarzalnych sekwencji DNA. Oznacza to, że u danego osobnika z dwóch różnych zębów, możliwe było uzyskanie fragmentów mtDNA o tym samym motywie mutacji w regionie HVR I. Przynależność haplogrupową mtDNA wyznaczono dla 43 z 72 badanych osobników, co równoznaczne było ze skutecznością izolacji na poziomie 60%. Podobny poziom skuteczności uzyskano także w badaniach aDNA wykonanych przez Melchior i wsp. (2010) czy Shinoda i wsp. (2006).

Specyfika badań kopalnego DNA nie pozwala na uzyskanie tak dużej liczby osobników jak w przypadku badań współczesnego materiału genetycznego. Wynika to przede wszystkim z ograniczeń w postaci braku dostatecznej ilości materiałów kostnych oraz złego stanu zachowania szkieletów. Nie ma też pewności, że kopalny DNA uzyska się ze wszystkich osobników jakie przeznaczone zostaną do analiz.

Zróżnicowanie skuteczności izolacji DNA i równocześnie różny stopień zachowania materiału genetycznego widoczne było nie tylko na poziomie osobniczym ale przede wszystkim na poziomie badanych populacji (Tabela 14). Najlepsze rezultaty otrzymano dla osobników ze stanowisk archeologicznych w Cedyni i Rogowie. Skuteczność izolacji DNA wynosiła w tych populacjach odpowiednio 83% i 92%. Na cmentarzysku w Cedyni warunki środowiskowe w tym właściwości gleb mogły sprzyjać lepszemu zachowaniu kopalnego DNA. Ponadto warunki przechowywania pozyskanych szkieletów w suchym i stosunkowo chłodnym pomieszczeniu mogły dodatkowo zabezpieczać DNA szczególnie przed degradacją hydrolityczną. Do badań pobierane były zęby mocno osadzone w szczękach i żuchwach, co zabezpieczało ich korzenie przed dostępem obcego materiału genetycznego. Dzięki temu, możliwe było uzyskanie powtarzalności sekwencji DNA mimo, że szkielety podlegały intensywnej eksploracji przez antropologów.

Najmniej prób z powtarzalnym rezultatem uzyskano dla populacji ze stanowisk archeologicznych w Lednicy i Karczynie. Skuteczność izolacji aDNA była na poziomie odpowiednio 31% i 17% (Tabela 14). W przypadku Lednicy, przyczyn obniżonej skuteczności można upatrywać w niekorzystnych warunkach środowiskowych. Cmentarzysko znajdowało się na mocno nawodnionych polach uprawnych, nawożonych organicznie, a szkielety były położone płytko pod ziemią od 35cm do 120cm. (Wiercińska i Wierciński 2005). Dostęp wody i tlenu mógł przyspieszać degradację DNA, a nawozy organiczne mogły być źródłem kontaminacji i inhibitorów PCR. Wydobyte materiały kostne były przechowywane w wilgotnej piwnicy, co dodatkowo mogło zwiększać liczbę uszkodzeń DNA powodowanych przez czynniki hydrolityczne.

W przypadku Karczyna, nie ma informacji na temat warunków środowiskowych, choć można przypuszczać, że nie były one korzystne dla dobrego zachowania aDNA. Można nawet sądzić, że u trzech osobników (Tabela 8) brak otrzymania jakichkolwiek fragmentów materiału genetycznego, mógł być związany z obecnością inhibitorów PCR.

Jakość otrzymywanych sekwencji kopalnego DNA została przeanalizowana pod kątem obecności uszkodzeń w postaci zmian nukleotydowych. Tak jak w przypadku innych prac z zakresu badań kopalnego materiału genetycznego (Hansen i in. 2001; Gilbert i in. 2003; Stiller i in. 2006), najczęstszym typem uszkodzeń były tranzycje C→T oraz G→A (Rycina 11). W niniejszych badaniach stanowiły one odpowiednio 75,1% oraz 14,8% wszystkich uszkodzeń w HVR I mtDNA u 43 badanych osobników. Był to wynik zbliżony do rezultatów otrzymanych w pracach Binladena i in. 2006 czy Lamersa i in. 2009.

2. Międzypopulacyjne odległości genetyczne w ujęciu porównawczym

Ze względu na małą liczbę osobników badanych populacji, częstości otrzymanych haplogrup mtDNA znacznie różniły się od częstości haplogrup otrzymanych dla liczebnych współczesnych populacji porównawczych (Tabela 27). Nie wyklucza to jednak możliwości podjęcia próby interpretacji i dyskusji wyników

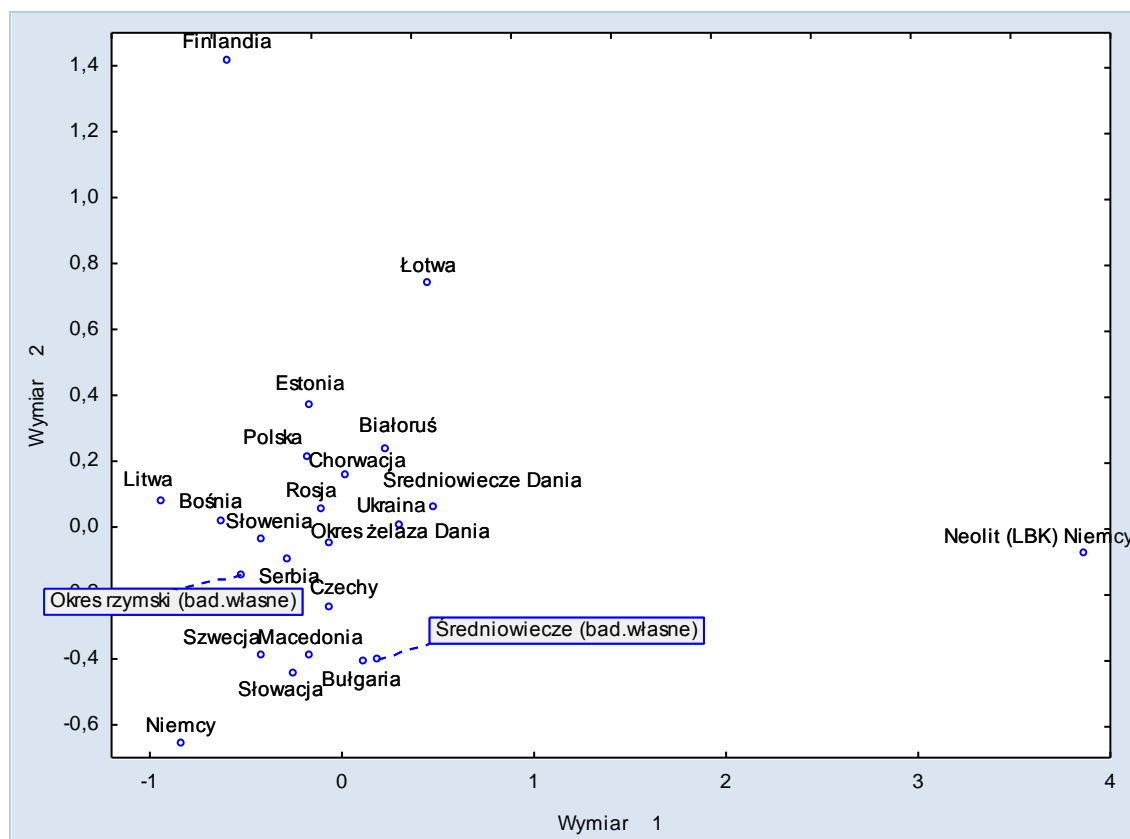
otrzymanych w badaniach międzypopulacyjnych dystansów genetycznych (linearny F_{ST} Slatkina) zobrazowanych graficznie na wykresie MDS (Rycina 14).

Ze względu na dużą częstość haplogrupy N1a i mniejszą częstość haplogrupy H, najbardziej odległa pod względem genetycznym od pozostałych populacji europejskich była neolityczna populacja pochodząca z kultury ceramiki wstęgowej rytej (5600 p.n.e. - 4900 p.n.e.) (Haak i in. 2010) (Rycina 14 i 15). Została ona włączona do niniejszych badań dla pokazania różnic, jakie istnieją na poziomie genetycznym również między populacjami kopalnymi. Populacje z okresu rzymskiego i średniowiecza są bliższe pod względem chronologicznym czasom współczesnym, przez to mają mniejszy dystans genetyczny wobec współczesnych populacji europejskich niż populacja wczesno- neolityczna. Taki obraz potwierdza wniosek Haaka i wsp. (2010), którzy stwierdzili, że największe przemiany demograficzne, w tym genetyczne musiały zachodzić po okresie wczesnego neolitu.

Z punktu widzenia ciągłości genetycznej i ewentualnej kontynuacji lub dyskontynuacji, istotne są odległości genetyczne między populacją z okresu rzymskiego, a populacją średniowieczną oraz między dwoma kopalnymi populacjami, a populacją współczesną z Polski. Dystanse otrzymane na obrazie skalowania wielowymiarowego (Rycina 14) pokazują, że badane populacje mimo, że nie są położone w bliskiej odległości, to nadal pozostają w stosunkowo homogenicznej grupie populacji słowiańskich. Przyczyn stosunkowo dużych dystansów między nimi, można upatrywać albo w rzeczywistych różnicach na poziomie genetycznym, albo w różnicach będących efektem małej liczebności badanych kopalnych populacji. W tym przypadku wersja związana z liczebnością populacji wydaje się bardziej prawdopodobna.

Ze względu na dużą częstość haplogrupy H (60,9%) w populacji z okresu rzymskiego, oddala się ona bardziej od homogenicznej grupy populacji słowiańskich, niż populacja średniowieczna. Duża częstość haplotypu bez różnic względem rCRS, szczególnie w populacji z Rogowa (41,6%) może być związana z tym, że osobniki te mogły być ze sobą spokrewnione w linii żeńskiej. Oczywiście potwierdzenie tego przypuszczenia wymagałoby przeprowadzenia dalszych badań z wykorzystaniem markerów mikrosatelitarnych. Tak wysoka częstość mogła być również efektem losowości próby tym bardziej, że haplogrupa H bez różnic względem rCRS w regionie HVR I stanowi ponad 25% współczesnych europejskich linii haplotypów znajdujących się w obrębie haplogrupy H (Loogväli i in. 2004).

Niemniej jednak, jeśli hipoteza związana z pokrewieństwem osobników byłaby prawdziwa, to w badaniach populacyjnych zamiast pięciu osobników należałoby uwzględnić tylko jednego. Wyeliminowanie czterech osobników należących do haplogrupy H powoduje, że populacja z okresu rzymskiego zmniejsza swoją odległość genetyczną względem innych populacji słowiańskich, w tym także względem populacji ze średniowiecza i współczesnej Polski (Rycina 15).



Rycina 15. Wykres skalowania wielowymiarowego MDS (linearny F_{ST}) określonych na podstawie częstości haplogrup mtDNA populacji kopalnych oraz współczesnych populacji słowiańskich i innych europejskich. Populacja z okresu rzymskiego została pomniejszona o cztery potencjalnie ze sobą spokrewnione osobniki. Źródła danych populacyjnych znajdują się w podrozdziale 2.3 (Rozdział III).

3. Zróznicowanie populacji z okresu rzymskiego i średniowiecza w ujęciu interdyscyplinarnym

Otrzymane haplotypy mtDNA zarówno dla populacji z okresu rzymskiego jak i średniowiecza należały do głównych europejskich haplogrup. Wśród nich można wyróżnić kłady takie jak: H, HV, HV0, J, K, T, U, W, X, N i R0. Haplogrupy te wraz z innymi europejskimi kładami występują z różną częstością także we

współczesnych populacjach słowiańskich (Belyaeva i in. 2003; Branicki i in. 2005; Grzybowski 2006; Grzybowski 2007; Zimmermann i in. 2007; Malyarchuk i in. 2001, 2002b, 2003, 2006, 2008a, 2008b; Vanecek i in. 2004; Zgonjanin i in. 2010; Karachanak i in. 2011).

Zgodnie z założeniami niniejszej pracy, opis zróżnicowania mtDNA badanych kopalnych populacji, miał być podstawą do interpretacji otrzymanych paleogenetycznych wyników w kontekście pochodzenia Słowian, a tym samym określenia istnienia lub braku ciągłości genetycznej na przełomie okresu rzymskiego i średniowiecza. Dzięki zastosowaniu metody analizy wspólnych haplotypów, możliwe było poznanie struktury genetycznej badanych populacji na poziomie zróżnicowania haplotypów mtDNA. Haplotypy osobników z okresu rzymskiego i średniowiecza podzielono na grupę informatywną, nieinformatywną i unikatową. Grupa nieinformatywna obejmowała haplotypy, które nie niosły ze sobą żadnych istotnych informacji, ponieważ występowały we wszystkich populacjach porównawczych w stosunkowo dużych częstościach. Z kolei grupa haplotypów informatywnych występowała w bardzo małych częstościach i dzięki temu dostarczała informacji na temat analizowanej populacji oraz jej kontaktów z populacjami, w których badane haplotypy zostały również zidentyfikowane. Analiza ta została wcześniej wykorzystana przez Haaka i wsp. (2010) w badaniach osobników pochodzących z neolitycznej kultury ceramiki wstęgowej rytej. Między innymi dzięki jej zastosowaniu, autorzy pracy mogli wykazać, że największy wkład genetyczny podczas procesów rozprzestrzeniania się neolitycznego rolnictwa, pochodził z obszarów Bliskiego Wschodu.

3.1. Analiza wspólnych nieinformatywnych haplotypów

Najczęściej występującą haplogrupą zarówno w okresie rzymskim jak i w średniowieczu była haplogrupa H (odpowiednio 60,9% i 40%). Haplogrupa ta występuje z największą częstością również w współczesnej Europie (od 25,9% do 48,9%), z wyjątkiem Saamów (5,3%). Pojawia się także stosunkowo często w północnej Afryce i na Bliskim Wschodzie (Achilli i in. 2004). We współczesnych populacjach słowiańskich haplogrupa ta występuje z częstością od 37,1% na Białorusi (dane nieopublikowane udostępnione przez Estonian Biocenter) do 47,9%

w Bośni i Hercegowinie (Malyarchuk i in. 2003). Dominującym haplotypem mtDNA zarówno w populacji z okresu rzymskiego jak i w średniowieczu był haplotyp należący do haplogrupy H bez różnic względem rCRS.

Na podstawie badania pozycji diagnostycznej 7028 w regionie kodującym mtDNA, do haplogrupy H zaliczone zostały także inne haplotypy z populacji z okresu rzymskiego i średniowiecza, w tym haplotyp z mutacją 16304C. Haplotyp ten jako jedyny (z wyjątkiem H bez różnic względem rCRS) występował w obu analizowanych kopalnych populacjach. Jednak zważywszy na to, że częstość jego występowania w populacjach porównawczych współczesnych była także wysoka, to jego obecność w obu kopalnych grupach nie była istotna dla prowadzonych badań. Pozostałe haplotypy nieinformatywne zarówno średniowieczne jak i z okresu rzymskiego, które równie często występowały w analizowanych populacjach współczesnych, należały w dużej mierze do haplotypów założycielskich. Wśród nich znajdował się haplotyp z haplogrupy W z mutacjami w pozycjach 16223 i 16292, U3 z mutacją w pozycji 16343 oraz K z motywem 16224-16311 (Tabela 20 i 22).

3.2. Analiza wspólnych informatywnych haplotypów

Żaden z haplotypów informatywnych nie był wspólnie dzielony między populacją z okresu rzymskiego i średniowiecza. Fakt ten może być równoznaczny z istnieniem nieciągłości genetycznej między analizowanymi populacjami, jednak biorąc pod uwagę liczebność badanych populacji otrzymane różnice mogą być efektem małej próby. W grupie informatywnej z okresu rzymskiego było pięć haplotypów należących do haplogrupy H z motywami: 16183-16189; 16093-16129-16316; 16222; 16129-16304 i 16153-16304, jak również podklady: U5b (16192-16270), J2a (16069-16126-16145-16231-16261-16299) oraz haplotyp należący do haplogrupy W (16192-16223-16292). Występowały one od jednego do sześciu razy pośród wszystkich 3522 współczesnych haplotypów porównawczych. Największa liczba wspólnych informatywnych haplotypów z okresu rzymskiego była dzielona ze współczesną populacją z Polski (Rycina 12). Istotny statystycznie wynik może oznaczać, że pewne linie genetyczne wykazywały ciągłość przynajmniej od okresu rzymskiego, aż do współczesności. Takie stwierdzenie może wspierać teorię

ciągłości zaludnienia na obszarach dorzecza Odry i Wisły na przełomie okresu rzymskiego i wczesnego średniowiecza, która popierana jest także przez badania archeologiczne Kostrzewskiego (1961) czy Makiewicza (2005). Istnienie ciągłości genetycznej potwierdzały także wyniki badań antropologicznych obejmujących morfologiczne zróżnicowanie czaszek populacji z okresu rzymskiego i średniowiecza, które nie dowiodły istnienia znaczących różnic, świadczących o dyskontynuacyjnym charakterze przemian na przełomie okresu rzymskiego i średniowiecza (Piontek i in. 2008).

Poza populacją współczesną z Polski, istotne statystycznie wyniki uzyskano także dla haplotypów dzielonych wspólnie z populacją z Litwy/Łotwy, Szwecji oraz Finlandii/Estonii. Rezultat ten może wskazywać na bliskie kontakty populacji z okresu rzymskiego z populacjami takimi jak Bałtowie, Germanie czy Finnougrowie. Fakt ten jest także potwierdzany przez badania archeologiczne i historyczne. Imperium Rzymskie w okresie swojego największego rozwoju sięgało od południa aż na północ Europy. W okresie tym poprzez obszary współczesnej Polski oraz ziem zajmowane przez Bałtów przechodziły szlaki handlowe, którymi transportowano między innymi wyroby metalowe czy bursztyny. Szlaki te kierowały się na północ i wschód aż do ziem zajmowanych przez populacje Finnougryjskie (Gimbutas 1963). Obecność szlaków handlowych sprawiła, że populacje z okresu rzymskiego z terenów współczesnej Polski takie jak kultura wielbarska i przeworska, mogły mieć bliskie kontakty z Bałtami, Finnougrami czy Germanami, co pociągało to za sobą również możliwy przepływ genów. Stąd też w analizie wspólnych haplotypów większa częstość „rzymskich” haplotypów pojawia się także na Litwie/Łotwie, Szwecji oraz Finlandii/Estonii.

Populacja ze średniowiecza odznaczała się większym zróżnicowaniem haplogrup mtDNA niż populacja z okresu rzymskiego (Tabela 23). Spośród ośmiu haplotypów zaliczonych do grupy informatywnej, każdy należał do innego kładu. Wśród nich była podhaplogrupa X2 z motywem 16183-16189-16223-16278, podhaplogrupa N1b z motywem 16145-16176A-16209-16223, haplogrupa W z mutacją w pozycji 16223, kład H z mutacją w pozycji 16126, kład J z motywem 16069-16126-16145-16222-16261, podhaplogrupa K2 z mutacjami z pozycjach 16222-16224-16270-16311, podkład R0a z motywem 16126-16362 oraz haplogrupa HV z mutacjami w pozycjach 16189-16271. Wszystkie średniowieczne haplotypy

informatywne występowały od jednego do czterech razy pośród 3522 współczesnych haplotypów porównawczych.

Zgodnie z przeprowadzoną analizą wspólnych haplotypów, największa ilość wspólnych informatywnych średniowiecznych haplotypów była dzielona ze współczesną populacją z Białorusi, Ukrainy oraz Bułgarii. Wynik ten nie jest w pełni jednoznaczny. Z jednej strony większa częstość haplotypów „średniowiecznych” we współczesnych populacjach z Białorusi, Ukrainy i Bułgarii może oznaczać, że na początku średniowiecza Słowianie migrowali z terenów dorzecza Odry i Wisły na wschód i południe Europy. Z drugiej jednak strony, biorąc pod uwagę większy dystans genetyczny między populacją z okresu rzymskiego i średniowiecza, migracja ta mogła odbywać się w odwrotnym kierunku, a więc ze wschodu na zachód. Druga hipoteza byłaby zgodna z teoriami allochtonistów jak Godłowski (2000), którzy uważali, że Słowianie pochodzą z terenów obecnej Ukrainy z dorzecza Dniepru i stamtąd w początkach średniowiecza migrowali na zachód i południe Europy. Teoria ta pozostaje jednak w sprzeczności z danymi uzyskanymi dla populacji rzymskiej, które sugerują istnienie ciągłości pewnych linii genetycznych przynajmniej od okresu rzymskiego do współczesności na terenach obecnej Polski.

3.3. Rzadkie haplogrupy

Niektóre z analizowanych haplotypów należały do kładów, które występują w Europie w niskich częstościach. Wśród nich była haplogrupa X, która współcześnie występuje nielicznie zarówno w zachodniej Euroazji (Richards i in. 2000) jak i wśród północnych grup rdzennych Amerykanów (Malhi i in. 2001). We współczesnych populacjach słowiańskich występuje na poziomie od 0,9% w Słowenii (Malyarchuk i in. 2003) do 3,5% w cz. europejskiej Rosji (Malyarchuk i in. 2002b). W populacji średniowiecznej do podhaplogrupy X2 zaliczono dwa osobniki. Jeden z haplotypów podhaplogrupy X2 należał do grupy informatywnej, a drugi do unikatowej. Podkład X2 został zidentyfikowany również w populacji średniowiecznej z Danii (Melchior i in. 2008b). Osobnik należący do tego podkladu miał haplotyp z motywem 16129-16223-16255-16278 i różnił się od tych, które zidentyfikowano w średniowieczu na terenach Polski.

Rzadką Europejską podhaplogrupą jest również R0a. W niektórych populacjach słowiańskich, takich jak cz. europejska Rosji, Białoruś, Ukraina, Słowacja, Czechy, Słowenia, Chorwacja czy Serbia, haplogrupa R0 nie została odnaleziona. Natomiast największa jej częstość pośród populacji słowiańskich obserwowana jest w Bułgarii (4,7%) (Karachanak i in. 2011). Podkład R0a (z motywem 16126-16355-16362) został zidentyfikowany również w populacji porównawczej z okresu żelaza w Danii (Melchior i in. 2008a). Haplotyp obecny w populacji z Cedyni różnił się od duńskiego brakiem mutacji w pozycji 16355.

Szansa uzyskania osobnika należącego do rzadkiej haplogrupy szczególnie w nielicznej populacji jest bardzo mała. A zatem obecność rzadkich haplogrup zarówno w Cedyni jak i w populacjach duńskich może oznaczać, że był to albo efekt losowości próby albo też haplogrupa ta występowała w tamtym okresie w większej częstości niż współcześnie. W związku z powyższym ich obecność w kopalnych populacjach jest trudna do interpretacji. Melchior i wsp. (2008a) w oparciu o dane historyczne zaproponowali pewną hipotezę, według której osobnik należący do podhaplogrupy R0a pochodził prawdopodobnie z południa Europy, gdzie częstość tego podkładu była większa. Miał on być albo niewolnikiem albo żołnierzem lub krewnym kobiety pochodzącej z Imperium Rzymskiego, którego legiony w okresie żelaza miały stacjonować w północnej części Niemiec nad rzeką Elbą. Analogicznie można potraktować obecność podkładu R0a w średniowiecznej populacji polskiej. Kierując się interpretacją Melchior i wsp. (2008a), podhaplogrupa R0a obecna w Cedyni mogła być kontynuacją linii genetycznej, która w okresie rzymskim przywędrowała z południa Europy. Jeśli powyższa interpretacja miałaby być prawdziwa oznaczałoby to, że osobnik należący do haplogrupy R0a najprawdopodobniej miał korzenie południowo-europejskie i musiał być obecny na terenach współczesnej Polski co najmniej od okresu rzymskiego. Taka hipoteza mogłaby być kolejnym dowodem na istnienie ciągłości genetycznej między okresem rzymskim i średniowieczem.

Haplogrupą, której nie zidentyfikowano ani w populacji z okresu rzymskiego, ani w populacji średniowiecznej z terenów współczesnej Polski, była haplogrupa I. Obecnie wśród współczesnych populacji słowiańskich haplogrupa ta występuje na poziomie od 1,2% w Bułgarii do 4,8% na Słowacji. Wysoką jej częstość zanotowano także w kopalnych populacjach z Danii. W okresie żelaza występowała na poziomie 12,5%, a w średniowieczu na poziomie 13,8%. Melchior i wsp. (2008a)

przypuszczają, że haplogrupa I w tamtym okresie mogła występować w większych częstościach zwłaszcza w Danii i północnej Europie. W związku z tym brak tej haplogrupy w populacjach kopalnych z terenu Polski, może świadczyć o tym, że kultura przeworska i wielbarska z okresu rzymskiego nie powinny być identyfikowane z populacjami germańskimi. Taka hipoteza podważałaby allochtoniczną teorię Słowian, według której kultury z okresu rzymskiego obecne na terenach współczesnej Polski miały być populacjami germańskimi pochodzącymi ze Skandynawii (Godłowski 2002).

3.4. Haplotypy unikatowe

W grupie unikatowych haplotypów, zidentyfikowany został osobnik z okresu rzymskiego należący do podkladu U5a z motywem regionu kontrolnego 16256-16263-16270, a także dwa osobniki ze średniowiecza, które należały do podhaplogrupy X2 z motywem mutacji w pozycjach 16183-16189-16223-16258-16266-16274-16278 i haplogrupy HVO z motywem mutacji w pozycjach 16129-16145-16298. Haplogrupa U5 występuje stosunkowo często wśród populacji słowiańskich od 6,7% w Bułgarii (Karachanak i in. 2011) do 12,5% w Polsce (Grzybowski i in. 2007). Z kolei haplotyp założycielski U5a z motywem mutacji w pozycjach 16256-16270 występuje w Polsce w niewielkiej częstości - 0,2% (Grzybowski i in. 2007). Haplotyp U5a osobnika z okresu rzymskiego wraz z dodatkową mutacją 16263C sprawił, że stał się on unikatowy i nie był obecny wśród 3522 współczesnych haplotypów porównawczych. Z kolei na unikatowość podhaplogrupy X2 u osobnika z Cedyni wpłynęła obecność dodatkowych podstawień w pozycjach 16258, 16266 i 16274, a w przypadku osobnika należącego do haplogrupy HVO obecność mutacji w pozycji 16145.

Na szczególną uwagę zasługuje unikatowy haplotyp należący do podhaplogrupy N1a, który został zidentyfikowany w populacji z okresu rzymskiego. Współcześnie podhaplogrupa N1a występuje w niewielkiej częstości, bo zaledwie u 0,2% populacji europejskiej (Palanichamy i in. 2010). Pośród populacji słowiańskich do chwili obecnej, nie stwierdzono obecności N1a w Macedonii, Słowenii, Bośni i Hercegowinie, Słowacji i Rosji. Natomiast maksymalna jej częstość (1,5%) wśród populacji słowiańskich występuje na Białorusi i Ukrainie (Tabela 28). Haplotyp,

który został zidentyfikowany w populacji z okresu rzymskiego, miał mutacje 16147A, 16223T, 16248T, 16320T, 16355T i rewersję mutacji w pozycji 16172 i był unikatowy wśród populacji porównawczych. Palanichamy i wsp. (2010) analizując osobniki należące do kładu N1a, znaleźli dwa identyczne haplotypy, które posiadały ten sam motyw mutacji co osobnik z okresu rzymskiego. Pierwszy z haplotypów pochodził z Francji, a drugi ze Stanów Zjednoczonych, gdzie pojawił się prawdopodobnie wraz z migrującą ludnością z Europy. Oba haplotypy zostały zaliczone do podkladu N1a1a2, do którego należy także haplotyp (bez rewersji mutacji w pozycji 16172) zidentyfikowany we współczesnej populacji polskiej (Grzybowski i in. 2007). Podkład N1a1a2 według Palanichamy i wsp. (2010) jest jednym z młodszych gałęzi drzewa filogenetycznego haplogrupy N. Wiek ewolucyjny tej podhaplogrupy szacowany jest na 3400 – 4000 lat, co pokrywa się z okresem, w którym w Europie duże obszary zajmowała kultura ceramiki sznurowej. Palanichamy i wsp. (2010) stwierdzili, że miejscem powstania podkladu N1a1a2 jest centralna Europa, przez co można przypuszczać, że haplotyp N1a zidentyfikowany w populacji z okresu rzymskiego może wywodzić się właśnie z kultury ceramiki sznurowej. To z kolei oznacza, że na terenach obecnej Polski mogła istnieć ciągłość tej linii genetycznej już od okresu neolitu.

Osobnik należący do podhaplogrupy N1a, pochodził z kultury przeworskiej, która uważana jest przez niektórych archeologów za kulturę, z której wywodzą się Słowianie (Buko 2006). Jeśli zidentyfikowany haplotyp należy do pokładu N1a1a2 pochodzącego z centralnej Europy, może to oznaczać, że kultura przeworska mogła również wywodzić się z neolitycznej kultury ceramiki sznurowej. Potwierdzałyby to archeologiczne tezy prezentowane przez autochtonistów Kostrzewskiego (1961) czy Jażdżewskiego (1981). Potwierdzenie powyższych spostrzeżeń można także uzyskać w badaniach genetycznych prowadzonych na współczesnym DNA, obejmujących analizę innych podhaplogrup, w tym U4a2 (Malyarchuk i wsp. 2008). Według Malyarchuka i wsp. 2008, podkład U4a2 występujący we współczesnych populacjach słowiańskich, prawdopodobnie również pochodzi z centralno-wschodniej Europy, a jego wiek ewolucyjny tak jak w przypadku N1a1a2 także może być powiązany z okresem kultury ceramiki sznurowej.

Wyniki uzyskane na bazie przeprowadzonych analiz kopalnego DNA i porównań międzypopulacyjnych dostarczają po raz pierwszy bezpośrednich, paleogenetycznych informacji na temat populacji z okresu rzymskiego

i średniowiecza z terenów obecnej Polski. Jednak ze względu na stosunkowo małą liczbę osobników jak na analizy statystyczne, ale jednocześnie dużą jak na badania kopalnego DNA, nie jest możliwe formułowanie jednoznacznych wniosków dotyczących etnogenezy Słowian. Pośród otrzymanych danych pojawia się jednak kilka istotnych informacji, które nie zaprzeczają istnieniu ciągłości genetycznej i mogą potwierdzać teorię kontynuacji zasiedlenia w dorzeczu Odry i Wisły na przełomie okresu rzymskiego i średniowiecza. Warto jednak podkreślić, że wyniki otrzymane na podstawie badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy stanowią pierwszą „kopalną cegiełkę” w budowaniu historii genetycznej Słowian.

Rozdział VI. Wnioski

- Możliwość otrzymania kopalnego DNA była zróżnicowana. Najlepsze rezultaty uzyskano dla populacji z cmentarzyska w Cedyni oraz Rogowie. Skuteczność izolacji aDNA była na poziomie 60%, co oznacza, że przynależność haplogrupową mtDNA wyznaczono dla 43 z 72 badanych osobników. Pośród analizowanych uszkodzeń materiału genetycznego dominowały, charakterystyczne dla kopalnego DNA, tranzycje, w tym głównie C→T (75,1%).
- Populacje z okresu rzymskiego i średniowiecza pozostają w stosunkowo homogenicznej grupie populacji europejskich (z wyjątkiem Finlandii i Łotwy). Stosunkowo duży dystans genetyczny między nimi i populacją współczesną z Polski może odzwierciedlać rzeczywiste zróżnicowanie na poziomie genetycznym lub może być efektem zbyt małych liczebności populacji z okresu rzymskiego i średniowiecza.
- Największa liczba informatywnych haplotypów z okresu rzymskiego była wspólnie dzielona z populacją ze współczesnej Polski, a także Litwy/Łotwy, Szwecji oraz Finlandii/Estonii. Może to wskazywać, że na terenach obecnej Polski istnieje ciągłość pewnych linii genetycznych przynajmniej od okresu rzymskiego do współczesności, jak również na bliskie kontakty populacji z okresu wpływów rzymskich z Bałtami, Germanami i populacjami Finnougryjskimi.
- Populacja ze średniowiecza dzieliła największą liczbę wspólnych informatywnych haplotypów z populacją ze współczesnej Białorusi, Ukrainy oraz Bułgarii.
- Pośród badanych kopalnych populacji zidentyfikowano haplogrupy takie jak X2, R0a czy N1a, które we współczesnych populacjach występują w małych częstościach. Ich obecność w niewielkich kopalnych populacjach może wynikać z losowości próby lub z większych częstości tych haplogrup w okresie rzymskim i średniowieczu.
- W populacjach z okresu rzymskiego i średniowiecza stwierdzono obecność czterech unikatowych haplotypów, w tym jednego z kultury przeworskiej, należącego prawdopodobnie do podhaplogrupy N1a1a2. Oznacza to, że kultura przeworska z okresu rzymskiego, uważana przez niektórych archeologów za kolebkę Słowian, przypuszczalnie mogła wywodzić się z kultury ceramiki sznurowej, z którą badany haplotyp jest wiązany.

Wykaz skrótów

DNA	kwask deoksyrybonukleinowy
aDNA	kopalny DNA
pz	pary zasad
hg	haplogrupa
mtDNA	mitochondrialny DNA
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy
HVR I lub II	region hiperzmienny I lub II
SNP	polimorfizm pojedynczych nukleotydów
LBK	kultura ceramiki wstępowej rytej
AP	miejsca depurynacji lub depirymidyzacji
A	adenina
T	tymina
G	guanina
C	cytozyna
EDTA	kwask etylenodiaminotetraoctowy
PTB	bromek N-fenyloacetylotiazolowy
PVPP	poliwinylopolipriolidon
BSA	albumina z surowicy wołu
CTAB	bromek cetylotrimetyloamoniowy
GuSCN	izotiocyjanian guanidyny

Literatura

- Achilli A., Rengo C., Magri C., Battaglia V., Olivieri A., Scozzari R., Cruciani F., Zeviani M., Briem E., Carelli V., Moral P., Dugoujon J.M., Roostalu U., Loogväli E.L., Kivisild T., Bandelt H.J., Richards M., Villems R., Santachiara-Benerecetti A.S., Semino O., Torroni A., 2004, The molecular dissection of mitDNA haplogroup H confirms that the Franco-Cantabrian glacial refuge was a major source for the European gene pool. *American Journal of Human Genetics*, 75: 910-918.
- Adler C.J., Haak W., Donlon D., Cooper A., The Genographic Consortium, 2011, Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones, *Journal of Archaeological Science*, 38: 956-964.
- Alekseeva T.I., 2002, Vostočnéye Slavâne, Antropologîâ i ethničeskaâ istoriâ, naučnyj Mir, Moskva.
- Allentoft, M.E., Schuster, S.C., Holdaway, R.N., Hale, M.L., McLay, E., Oskam C., Gilbert, M.T.P., Spencer, P.; Willerslev, E., Bunce, M., 2009, Identification of microsatellites from an extinct moa species using high-throughput (454) sequence data. *Biotechniques*, 46, 195-200.
- Alinei M., 2000, An alternative model for the origins of European people and languages the continuity theory, *Quadermi di Semantica*, XXI, p.21-50.
- Alinei M., 2003, Interdisciplinary and linguistic evidence for Paleolithic continuity of Indo-European, Uralic and Altaic populations in Euroasia with an excursus on Slavic ethnogenesis, *Quadermi di Semantica*, 24, pp. 187-216.
- Amory S., Keyser C., Crubezy E., Ludes B., 2007, STR typing of ancient DNA extracted from hair shafts of Siberian mummies, *Forensic Science International*, 218-229.
- Anderson S., Bankier A.T., Barrel B.G., de Bruijn M.H.L., Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F, Schreier P.H., Smith A.J.M., Staden R., Young I.G., 1981, Sequence and organization of the human mitochondrial genome, *Nature*, 290: 457-465.
- Andrałajć M., Stolpiak B., 2004, Pochówki dzieci z cmentarzyska kultury przeworskiej w Gąskach, stan. 18, [w:] Dusza maluczka, a starta ogromna. *Funeralna Lednickie Spotkanie 6*, W. Dzieduszycki, J. Wrzesiński (red.), Stowarzyszenie Naukowe Archeologów Polskich Oddział w Poznaniu, Poznań.
- Andrews R.M., Kubacka I., Chinnery P.F., Lightowlers R.N., Turnbull D.M., Howell M., 1999, Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA, *Nature Genetics*, 23:147.
- Asher R.J., Hofreiter M., 2006, Tenrec phylogeny and the noninvasive extraction of nuclear DNA, *Systematic Biology*, 55: 181-194.

- Aufderheide A.C., Salo W., Madden M., Streitz J., Buikstra J., Guhl F., Arriaza B., Renier C., Wittmers L.E., Fornaciari G., Allison M., 2004, A 9,000-year record of Chagas' disease, *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA*, 101: 2034-2039.
- Axelsson E., Willerslev E., Gilbert M.T.P., Nielsen R., 2008, The Effect of Ancient DNA Damage on Inferences of Demographic Histories, *Molecular Biology Evolution*, 25: 2181-2187.
- Baker L.E., McCormick W.F., Matteson K.J., 2001, A silica-based mitochondrial DNA extraction method applied to forensic hair shafts and teeth. *Journal of Forensic Science*, 46: 126-130.
- Barford P.M., 2001, *The early Slavs: culture and society in early medieval Eastern Europe*, London, British Museum.
- Barford P., 2006, Wiedzieć niewiadome. Jak możemy uprawiać archeologię rozprzestrzeniania się języków słowiańskich ?, [w:] *Nie-Słowianie o początkach Słowian*, P. Urbańczyk (red.), Poznań-Warszawa, 89.
- Belyaeva O., Bermisheva M., Khrunin A., Slominsky P., Bebyakova N., Khusnutdinova E., Mikulich A., Limborska S., 2003, Mitochondrial DNA variations in Russian and Belorussian populations, *Human Biology*, 75: 647-660.
- Bédarida S., Dutour O., Buzhilova A.P., De Micco P., Biagini P., 2011, Identification of viral (Anelloviridae) in 200-year-old dental pulp sample (Napoleon's Great Army, Kaliningrad, 1812), *Infection, Genetics and Evolution*, 11: 358-362.
- Bengtsson C.F., Olsen M.E., Brandt L.O., Bertelsen M.F., Willerslev E., Tobin D.J., Wilson A.S., Gilbert M.T.P., 2011, DNA from keratinous tissue. Part I: Hair and nail, *Annals of Anatomy*, doi:10.1016/j.aanat.2011.03.013.
- Berthelet M., Whyte L.G., Greer C.W., 1996, Rapid, direct, extraction of DNA from soils for PCR analysis using polyvinylpyrrolidone spin columns. *Microbiology Letters*, 138: 17-22.
- Binladen J., Wiuf C., Gilbert M.T., Bunce M., Barnett R., Larson G., Greenwood A.D., Haile J., Ho S.Y., Hansen A.J., Willerslev E., 2006, Assessing the fidelity of ancient DNA sequences amplified from nuclear genes, *Genetics*, 172: 733-741.
- Bogdanowicz W., Allen M., Branicki W., Lembring M., Gajewska M., Kupiec T., 2009, Genetic identification of putative remains of the famous astronomer Nicolaus Copernicus, *Proceedings of National Academy of Science*, 106: 12279-12282.
- Bramanti B., Thomas M.G., Haak W., Unterlaender M., Jores P., Tambets K., Antanaitis-Jacobs I., Haidle M.N., Jankauskas R., Kind C.J., Lueth F., Terberger T., Hiller J., Matsumura S., Forster P., Burger J., 2009, Genetic Discontinuity

- Between Local Hunter-Gatherers and Central Europe's First Farmers, *Science*, 326: 137-140.
- Branicki W., Kalista K., Kupiec T., Wolańska-Nowak P., Zołędzewska M., Lessig R., 2005, Distribution of mtDNA haplogroups in a population sample from Poland. *Journal of Forensic Science*, 50: 732-733.
- Brotherton P., Endicott P., Sanchez J.J., Beaumont M., Barnett R., Austin J., Cooper A., 2007, Novel high-resolution characterization of ancient DNA reveals C > U-type base modification events as the sole cause of *post mortem* miscoding lesions, *Nucleic Acids Research*, Vol. 35, 17: 5717-5728.
- Briggs A.W., Stenzel U., Johnson P.L.F., Green R.E., Kelso J., Prufer K., Meyer M., Krause J., Ronan M.T., Lachmann M., Pääbo S., 2007, Patterns of Damage in genomic DNA sequences from a Neandertal. *PNAS* 104(37): 14616-14621.
- Brown W.M., 1980, Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 77: 3605-3609.
- Brunner I., Brodbeck S., Buchler U., Sperisen C., 2001, Molecular identification of fine roots of trees from the Alps: reliable and fast DNA extraction and PCR-RFLP analyses of plastid DNA. *Molecular Ecology*, 10: 2079-2087.
- Brzostowicz M., 1994, Elementy kultur okresu rzymskiego w zespołach wczesnośredniowiecznych północno-zachodniej Polski. *Slavia Antiqua* 34.
- Buko A., 2006, *Archeologia Polski wczesnośredniowiecznej: odkrycia, hipotezy, interpretacje*, Warszawa, Trio.
- Burger J., Hummel S., Herrmann B., Henke W., 1999, DNA preservation: A microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains, *Electrophoresis*, 20: 1722-1728.
- Cai D., Tang Z., Yu H., Han L., Ren X., Zhao X., Zhu H., Zhou H., 2011, Early history of Chinese domestic sheep indicated by ancient DNA analysis of Bronze Age individuals, *Journal of Archaeological Science*, 38: 896-902.
- Caldarelli-Stefano R., Vago L., Bonetto S., Nebuloni M., Costanzi G., 1999, Use of magnetic beads for tissue DNA extraction and IS6110 *Mycobacterium tuberculosis* PCR, *Molecular Pathology*, 52: 158-160.
- Cano R.J., Poinar H.N., Roublik D.W., Poinar Jr. G.O. 1992. Enzymatic amplification and nucleotide sequencing of portions of the 18S rRNA gene of the bee *Proplebeia dominicana* (Apidae: Hymenoptera) isolated from 25-40 million year old Dominican amber. *Journal of Medical Sciences Research*, 20: 619-622.
- Cappellini E., Gilbert M.T.P., Geuna F., Fiorentino G., Hall A., Thomas-Oates J., Ashton P.D., Ashford D.A., Arthur P., Campos P.F., Kool J., Willerslev E.,

- Collins M.J., 2010, A multidisciplinary study of archaeological grape seeds, *Naturwissenschaften* 97: 205-217.
- Caramelli D., Vernesi C., Sanna S., Sampietro L., Lari M., Castri L., Vona G., Floris R., Francalacci P., Tykot R., Casoli A., Bertranpetit J., Lalueza-Fox C., Bertorelle G., Barbujani G., 2007, Genetic variation in prehistoric Sardinia, *Human Genetics*, 122: 327-336.
- Cattaneo C., Smillie D.M., Gelsthorpe K., Piccinini A., Gelsthorpe A.R., Sokol R.J., 1995, A simple method for extracting DNA from old skeletal material. *Forensic Science International*, 74: 167-174.
- Champlot S., Berthelot C., Pruvost M., Bennett E.A., Grange T., Geigl E.M., 2010, An efficient multistrategy DNA decontamination procedure of PCR reagents for hypersensitive PCR applications, *PLoS ONE*, 5.
- Chudziak W., 2000, Archeologia na bydgosko-toruńskim odcinku autostrady A-1. Z otchłani wieków, *Archeologia na dużych inwestycjach w Polsce*, 55, 2, 28-32.
- Coble M.D., Loreille O.M., Wadhams M.J., Edson S.M., Maynard K., Meyer C.E., Niedertätter H., Berger C., Berger B., Falsetti A.B., Gill P., Parson W., Finelli L.N., 2009, Mystery Solved: The Identification of the Two Missing Romanov Children Using DNA Analysis, *PLoS One*, 4: 1-9.
- Cooper A., Poinar H.N., 2000. Ancient DNA: do it right or not at all, *Science*, 289, 1139.
- Cooper A., Lalueza – Fox C., Anderson S., Rambaut A., Austin J., Ward R., 2001, Complete mitochondrial genome sequences of two extinct moas clarify ratite evolution, *Nature*, 409: 704-707.
- Crubézy E., Amory S., Keyser C., Bouakaze C., Bodner M., Gibert M., Röck A., Parson W., Alexeev A., Ludes B., 2010, Human evolution in Siberia: from frozen bodies to ancient DNA, *BMC Evolutionary Biology*, 10: 25.
- Curta F., 2001, *The Making of the Slavs. History and archaeology of the lower Danube Region, c. 500-700*, Cambridge-New York.
- Curta F., 2006, Tworzenie Słowian, Powrót do słowiańskiej etnogenezy, [w:] *Nie-Słowianie o początkach Słowian*, P. Urbańczyk (red.), Poznań-Warszawa, s.27-55.
- Czekanowski J., 1967, *Człowiek w czasie i przestrzeni*, Warszawa.
- d'Abbadie M., Hofreiter M., Vaisman A., Alexandra, Loakes D., Gasparutto D., Cadet J., Woodgate R., Pääbo S., Holliger P., 2007, Molecular breeding of polymerases for amplification of ancient DNA, *Nature Biotechnology*, 25: 939-943.

- Daskalaki E., Anderung C., Humphrey L., Götherström A., 2011, Further developments in molecular sex assignment: a blind test of 18th and 19th century human skeletons, *Journal of Archaeological Science*, 38: 1326-1330.
- Dąbrowski R., 2003, Zastosowanie metod statystycznych do analiz różnicowania morfologicznego wczesnośredniowiecznej populacji Słowian Zachodnich i Wschodnich [w:] *Metody statystyczne w antropologii. Szóste warsztaty antropologiczne im. Profesora Janusza Charzewskiego*, J. Charzewska, K. Kaczanowski, H. Piechaczek (red.), Warszawa, 77-88.
- Dąbrowski R., 2007, *Populacje ludzkie z dorzecza Odry i Wisły w okresie wpływów rzymskich i we wczesnym średniowieczu*, Seria *Antropologia* nr 23, Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań.
- Deguilloux M.F., Pemonge M.H., Bertel L., Kremer A., Petit R.J., 2003, Checking the geographical origin of oak wood: molecular and statistical tools, *Molecular Ecology* 12: 1629-1636.
- Deguilloux M.F., Ricaud S., Leahy R., Pemonge M.H., 2011, Analysis of ancient human DNA and primer contamination: One step backward one step forward, *Forensic Science International*, 210: 102-109.
- Degulloux M.F., Soler L., Pemonge M.H., Scarre C., Joussaume R., Laporte L., 2011, News From the West: Ancient DNA From French Megalithic Burial Chamber, *American Journal of Physical Anthropology*, 144: 108-118.
- Di Bernardo G., Del Gaudio S., Cammarota M., Galderisi U., Cascino A., Cipollaro M., 2002, Enzymatic repair of selected cross-linked homoduplex molecules enhances nuclear gene rescue from Pompeii and Herculaneum remains, *Nucleic Acids Research*, 30, e16.
- Dissing J., Binladen J., Hansen A., Sejrsen B., Willerslev E., Lynnerup N., 2007, The las Viking King: A royal maternity case solved by ancient DNA analysis, *Forensic Science International*, 166: 21-27.
- Dissing J., Kristinsdottir M.A., Friis C., 2008, On the elimination of extraneous DNA in fossil human teeth with hypochlorite. *Journal of Archaeological Science*, 35: 1445-1452.
- Dizdaroglu M., Jaruga P., Birincioglu M., Rodriguez H., 2002, Free radical – induced damage to DNA: mechanisms and measurement, *Free Radical Biology and Medicine*, 32: 1102-1115.
- Dulnicz M., 2008, *Antropologia fizyczna, archeologia, etnogeneza Słowian*, *Archeologia Polski*, 53, 1, 111-134.
- Edwards, C.J., Suchard M.A., Lemey P., Welch J.J., Barnes I., Fulton T.L., Barnett R., O'Connell T.C., Coxon P., Monaghan N., Valdosiera C.E., Lorenzen E.D., Willerslev E., Baryshnikov G.F., Rambaut A., Thomas M.G., Bradley D.G.,

- Shapiro B., 2011, Ancient Hybridization and an Irish Origin for the Modern Polar Bear Matriline, *Current Biology*, 21: 1-8.
- Ermini L., Olivieri C., Rizzi E., Corti G., Bonnal R., Soares P., Luciani S., Marota I., De Bellis G., Richards M.B., Rollo F., 2008, Complete mitochondrial genome sequence of the tyrolean Iceman, *Current Biology*, 18: 1687-1693.
- Excoffier, Laval L.G., Schneider S., 2005, Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- Faerman M., Filon D., Kahila G., Greenblatt C.L., Smith P., Oppenheim A., 1995, Sex identification of archaeological human remains based on amplification of the X and Y amelogenin alleles, *Gene*, 167: 327-332.
- Foran D.R., Hixson J.E., Brown W.M., 1988, Comparison of ape and human sequences that regulate mitochondrial DNA transcription and D-loop DNA synthesis, *Nucleic Acids Research*, 16: 5841-5861.
- Fu Y., Xie C., Xu X., Li C., Zhang Q., Zhou H., Zhu H., 2009, Ancient DNA Analysis of Human Remains From the Upper Capital City of Kublai Khan, *American Journal of Physical Anthropology*, 138: 23-29.
- Gamba C., Fernández E., Tirado M., Deguilloux M.F., Pemonge H., Utrilla P., Edo M., Molist M., Rasteiro R., Chikhi L., Arroyo-Pardo E., 2012, Ancient DNA from an Early Neolithic Iberian population supports a pioneer colonization by first farmers, *Molecular Ecology*, 21: 45-56.
- Gilbert M.T., Willerslev E., Hansen A.J., Barnes I., Rudbeck L., Lynnerup N., Cooper A., 2003, Distribution patterns of postmortem damage in human mitochondrial DNA, *American Journal of Human Genetics*, 72: 32-47.
- Gilbert M.T., Wilson A.S., Bunce M., Hancen A.J., Willerslev E., Shapiro B., Higham T.F.G., Richards M.P., O'Connell T.C., Tobin D.J., Janaway R.C., Cooper A., 2004, Ancient mitochondrial DNA from hair. *Current Biology*, 14: R463-R464.
- Gilbert M.T.P., Bandelt H.J., Hofreiter M., Barnes I., 2005, Assessing ancient DNA studies, *Trends in Ecology and Evolution*, 20(10): 542-544.
- Gilbert M.T.P., Janaway R.C., Tobin D.J., Cooper A., Wilson A.S., 2006, Histological correlates of post mortem DNA damage in degraded hair. *Forensic Science International*, 156: 201-207.
- Gilbert M.T.P., Djurhuus D., Melchior L., Lynnerup N., Worobey M., Wilson A.S., Andreasen C., Dissing J., 2007a, mtDNA from hair and nail clarifies the genetic relationship of 15C Qilakitsoq Inuit mummies. *American Journal of Physical Anthropology*, 133: 847-853.
- Gilbert M.T.P., Tomsho L.P., Rendulic S., Packard M., Drautz D.I., Sher A., Tikhonov A., Dalén L., Kuznatsova T., Campos P.F., Higham T.F.G., Collins M.J., Wilson

- A.S., Shidlovskiy F., Buigues B., Ericson P.G., Germonpré M., Götherström A., Iacumin P., Nikolaev V., Nowak-Kemp E., Willerslev E., Knight J.R., Irzyk F.P., Perbost C.S., Fredrikson K.M., Harkins T.T., Sheridan S., Miller W., Schuster S., 2007b, Whole-genome shotgun sequencing of mitochondria from ancient hair shafts, *Science* 317: 1927-1930.
- Gilbert M.T.P., Kivisild T., Grønnow B., Andersen P.K., Metspalu E., Reidla M., Tamm E., Axelsson E., Götherström A., Campos P.F., Rasmussen M., Metspalu M., Higham, T.F.G., Schwenninger J.-L., Nathan R., De Hoog C.-J., Koch A., Møller L.N., Andreasen C., Meldgaard M., Villems R., Bendixen C., Willerslev E., 2008a, Paleo-Eskimo mtDNA genome reveals matrilineal discontinuity in Greenland, *Science*, 320: 1787–1789.
- Gilbert M.T.P., Drautz D.I., Lesk A.M., Ho S.Y.W., Qi J., Ratan A., Hsu C.H., Sher A., Dalén L., Götherström A., Tomsho L.P., Rendulic S., Packard M., Campos P.F., Kuznetsova T.V., Shidlovskiy F., Tikhonov A., Willerslev E., Iacumin P., Buigues B., Ericson P.G.P., Germonpré M., Kosintsev P., Nikolaev V., Nowak-Kemp M., Knight J.R., Irzyk G.P., Perbost C.S., Fredrikson K.M., Harkins T.T., Sheridan S., Miller W., Schuster S.C., 2008b, Intraspecific phylogenetic analysis of Siberian woolly mammoths using complete mitochondrial genomes, *Proceedings of The National Academy of Sciences of the USA*, 105: 8327-8332.
- Giles R.E., Blanc H., Cann H.M., Wallace D.C., 1980, Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 77: 6715–6719.
- Godłowski K., 1979, *Z badań nad rozprzestrzenianiem się Słowian w V-VII w. n.e.*, Kraków.
- Godłowski K., 2000, *Spór o słowian*, [w:] *Pierwotne siedziby Słowian*, M. Parczewski (red.), Kraków.
- Golenberg E.M., Giannassi D.E., Clegg M.T., Smiley C.J., Durbin M., Henderson D., Zurawski G., 1990, Chloroplast DNA from a Miocene Magnolia species, *Nature* 344: 656-658.
- Gołąb Z., 1992, *The origins of the Slavs: a linguist's view*. Columbus, Ohio, Slavica Publishers, Inc.
- Graham E.A.M., 2007, DNA reviews: Ancient DNA, *Forensic Science and Medical Pathology*, 3: 221-225.
- Green R.E., Krause J., Briggs J.A., Maricic T., Stenzel U., Kircher M., Patterson N., Li H., Zhai W., Hsi-Yang Fritz M., Hansen N.F., Durand E.Y., Sapfo Malaspinas A., Jensen , Marques-Bonet T., Alkan C., Prüfer K., Meyer M., Burbano H.A., Good J.M., Schultz R., Aximu-Petri A., Butthof A., Höber B., Höffner B., Siegemund M., Weihmann A., Nusbaum C., Lander E.S., Russ C., Novod N., Affourtit J., Egholm M., Verna C., Rudan P., Brajkovic D., Kucan Z., Gušić I., Doronichev V.B., Golovanova L.V., Lalueza-Fox C., de la Rasilla M., Fortea J., Rosas A., Schmitz R.W., Johnson P.L.F., Eichler E.E., Falush D.,

- Birney E., Mullikin J.C., Slatkin M., Nielsen R., Kelso J., Lachmann M., Reich D., Pääbo S., 2010, A Draft Sequence of the Neandertal Genome, *Science*, 328: 710-722.
- Grzybowski T., 2006, Zróznicowanie sekwencji mitochondrialnego DNA w populacjach ludzkich północnej Euroazji. Wybrane aspekty filogeograficzne, Bydgoszcz, Rozprawa habilitacyjna.
- Grzybowski T., Malyarchuk B.A., Derenko M.V., Perkova M.A., Bednarek J., Woźniak M., 2007, Complex interactions of the Eastern and Western Slavic populations with other European groups as revealed by mitochondrial DNA analysis. *Forensic Science International: Genetic*, 1: 141-147.
- Haak W., Forster P., Bramanti B., Matsumura S., Brandt G., Tänzer M., Villems R., Renfrew C., Gronenborn D., Alt K.W., Burger J., 2005, Ancient DNA from the first European Farmers in 7500-Year-Old Neolithic Sites, *Science*, 310: 1016-1018.
- Haak W., Brandt G., de Jong H.N., Meyer C., Gansmeier R., Heyd V., Hawkesworth C., Pike A.W.G., Meller H., Alt K.W., 2008, Ancient DNA, Strontium isotopes, and osteological analyses shed light on social and kinship organization of the Later Stone Age, *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA*, 105: 18226-18231.
- Haak W., Balanovsky O., Sanchez J.J., Koshel S., Zaporozhchenko V., Adler C.J., Der Sarkissian C.S.I., Brandt G., Schwarz C., Nicklisch N., Dresley V., Fritsch B., Balanovska E., Villems R., Meller H., Alt K.W., Cooper A., The Genographic Consortium, 2010, Ancient DNA from European early Neolithic farmers reveals their Eastern Affinities. *PLoS Biology* 8.
- Haensch S., Bianucci R., Signoli M., Rajerison M., Scultz M., Kacki S., Vermunt M., Weston D., Hurst D., Achtman M., Carniel E., Bramanti B., 2010, Distinct clones of *Yersinia pestis* caused the black death, *PLoS Pathogens* 6 (10).
- Hagelberg E., Sykes B., Hedges R. 1989, Ancient bone DNA amplified, *Nature* 342:485-485.
- Hagelberg E., 2003, Recombination or mutation rate heterogeneity? Implications for Mitochondrial Eve, *Trends in Genetics*, 19: 84-90.
- Handt O., Krings M., Ward R., Pääbo S., 1996, The retrieval of ancient human DNA sequences, *American Journal of Human Genetics*, 59: 368-376.
- Hansen A.J., Willerslev E., Wiuf C., Mourier T., Arctander P., 2001, Statistical evidence for miscoding lesions in ancient DNA templates. *Molecular Biology Evolution*, 18: 262-265.
- Hansen A.J., Mitchell D.L., Wiuf C., Paniker L., Brand T.B., Binladen J., Gilichinsky D.A., Rønn R., Willerslev E., 2006, Crosslinks Rather Than Breaks Determine

- Access to Ancient DNA Sequences From Frozen Sediments, *Genetics*, 173: 1175-1179.
- Hawass Z., Gad Y.Z., Ismail S., Khairat R., Fathalla D., Hasan N., Ahmed A., Elleithy H., Ball M., Gaballah F., Wasef S., Fatten M., Amer H., Gostner P., Selim A., Zink A., Pusch C.M., 2010, Ancestry and pathology of king Tutanhamon's family, *JAMA* 303: 638-647.
- Hänni C., Brousseau T., Laudet V., Stehelin T., 1995, Isopropanol precipitation removes PCR inhibitors from ancient bone extracts. *Nucleic Acids Research*, 23: 881-882.
- Hebsgaard M.B., Philips M., Willerslev E., 2005, Geologically ancient DNA: fact or artifact ?, *Trends in Microbiology*, 13: 212-220.
- Hedman M., Brandstätter A., Pimenoff V., Sistonen P., Palo J.U., Parson W., Sajantila A., 2007, Finnish mitochondrial DNA HVS-I and HVS-II population data, *Forensic Science International*, 172: 171-178.
- Hensel W., 1991, Dawne siedziby Słowian (I w. p.n.e. – VI w. n.e.). *Slavia Antiqua* 33: 7-18.
- Higuchi R., Bowman B., Freiberg M., Ryder O.A., Wilson A.C., 1984, DNA sequences from the quagga, an extinct member of horse family, *Nature*, 312: 282-284.
- Ho S.Y.W., Gilbert M.T.P., 2010, Ancient mtogenomics, *Mitochondrion*, 10: 1-11.
- Hofreiter M., Jaenicke V., Serre D., Haeseler A., Pääbo S., 2001a, DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA, *Nucleic Acids Research*, Vol. 29, 23: 4793-4799.
- Hofreiter M., Serre D., Poinar H.N., Kuch M., Pääbo S., 2001b, Ancient DNA, *Nature Reviews Genetics*, 2: 353-359.
- Höss M., Pääbo S., 1993, DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method, *Nucleic Acids Research*, 21: 3913-3914.
- Höss M., Jaruga P., Zastawny T.H., Dizdaroglu M., Pääbo S., 1997, DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues, *Nucleic Acids Research*, 24: 1304-1307.
- Hummel S. 2003, *Ancient DNA typing. Methods, Strategies and Applications*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Jans M., Nielsen-Marsh C., Smith C., Collins M., Kars H., 2004, Characterization of microbial attack on archaeological bone, *Journal of Archaeological Science*, 31: 87-95.
- Jażdżewski K. ,1981, *Pradzieje Europy Środkowej*, Zakład Narodowy im. Ossolińskich

- Jones M., Brown T.A., 2000, Agricultural origins: the evidence of modern and ancient DNA, *The Holocene*, 10: 769-776.
- Juras A., 2008, Badania kopalnego DNA. Aspekty metodologiczne, w: Charzewski J. (red.), *Współczesna antropologia fizyczna. Zakres i metody badań, współpraca interdyscyplinarna*, Poznań, 61-67.
- Kalmár T., Bachrati C.Z., Marcsik A., Raskó I., 2000, A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones, *Nucleic Acids research* 28, e67.
- Karachanak S., Carossa V., Nesheva D., Olivieri A., Pala M., Kashani B.H., Grugni V., Battaglia V., Achilli A., Yordanov Y., Galabov A.S., Semino O., Toncheva D., Torroni A., 2011, Bulgarians vs the other European populations: a mitochondrial DNA perspective, *International Journal of Legal Medicine*, DOI: 10.1007/s00414-011-0589-y.
- Kemp B.M., Smith D.G., 2005, Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth. *Forensic Science International*, 154: 53-61.
- Kemp B.M., Monroe C., Glenn Smith D., 2006, Repeat silica extraction: a simple technique for the removal of PCR inhibitors from DNA extracts. *Journal of Archaeological Science*, 33: 1680-1689.
- Keyser C., Bouakaze C., Crubézy E., Nikolaev V.G., Montagnon D, Reis T., Ludes B., 2009, Ancient DNA provides new insights into the history of South Siberian Kurgan People, *Human Genetics*, 126: 395-410.
- Keyser-Tracqui C., Crubézy E., Pamzav H., Varga T., Ludes B., 2006, Population Origins in Mongolia: Genetic Structure Analysis of Ancient and Modern DNA, *American Journal of Physical Anthropology*, 131: 272-281.
- Kim K., Kim K.Y., Jeon E., Togloom A., Cho Y.O., Lee M.S., Lkhagvasuren G., Choi J.H., Tumen D., Park A.J., Kim K.C., Park K.W., Kim J.H., Noh M., Yoo K.J., Lee K.H., 2008, Technical Note: Improved Ancient DNA Purification for PCR Using Ion-Exchange Columns, *American Journal of Physical Anthropology*, DOI 10.1002/ajpa.20782.
- Kim A.J., Kim K., Choi J.H., Choi E.H., Jung Y.J., Min N.Y., Lkhagvasuren G., Rhee S., Kim J.H., Noh M., Park A.J., Kim K.Y., Kang Y., Lee K.H., Kim K.C., 2009, Mitochondrial DNA analysis of ancient human bones excavated from Nukdo island, S.Korea, *BMB reports*, 133-139.
- Kimura B., Marshall F.B., Chen S., Rosenbom S., Moehlman P.D., Tuross N., Sabin R.C., Peters J., Barich B., Yohannes H., Kebede F., Teclai R., Beja-Pereira A., Mulligan C.J., 2010, Ancient DNA from Nubian and Somali wild ass provides insights into donkey ancestry and domestication, *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences*, 278: 50-57.

- King C.E., Debruyne R., Kuch M., Schwarz C., Poinar H.N., 2009, A quantitative approach to detect and overcome PCR inhibition in ancient DNA extracts, *Biotechniques* 47: 941-949.
- Kirsanow K., Burger J., Ancient human DNA, *Annals of Anatomy*, 194: 121-132.
- Kivisild T., Shen P., Wall D.P., Do B., Sung R., Davis K., Passarino G., Underhill P.A., Scharfe C., Torrini A., Scozarri R., Modiano D., Koppa A., de Knijff P., Feldman M., Cavalli-Sforza L.L., Oefner P.J., 2006, The Role of Selection in the Evolution of Human Mitochondrial Genomes, *Genetics*, 172: 373-387.
- Knapp M., Clarke A.C., Horsburgh K.A., Matisoo-Smith E.A., 2011, Setting the stage – Building and working in an ancient DNA laboratory, *Annals of Anatomy*, doi: 10.1016/j.aanat.2011.03.008.
- Kočka W., 1958, *Zagadnienie etnogenezy ludów Europy*, Wrocław.
- Kokowski A., 2002, Cień Światowita, [w:] *Cień Światowita, czyli pięć głosów w sprawie etnogenezy Słowian*, red. A. Kokowski, Lublin, s. 7-13.
- Kostrzewski J., 1961, *Zagadnienie ciągłości zaludnienia ziem polskich w pradziejach (od połowy II tysiąclecia p.n.e. do wczesnego średniowiecza)*, Poznań.
- Kozak-Zychman W., Segeda S., 1994, Wyniki wstępnej analizy kranologicznej i odontologicznej ludności grupy masłomeckiej, *Annales Universitatis Marie Curie-Skłodowska*, 49 (16C), 213-247.
- Kozak-Zychman W., 1996, *Charakterystyka antropologiczna ludności Lubelszczyzny z młodszego okresu rzymskiego*, Wydawnictwo UMCS, Lublin.
- Krause J., Fu Q., Good J.M., Viola B., Shunkov M., Derevianko A.P., Pääbo S., 2010, The complete mitochondrial DNA genome of an unknown hominin from southern Siberia, *Nature Letters*, 464: 894-897.
- Krings M., Stone A., Schmitz R.W., Krainitzki H., Stoneking M., Pääbo S., 1997, Neandertal DNA sequence and the origin of modern humans, *Cell*, 90: 19-30.
- Kuch M., Rohland N., Betancourt J.L., Latorre C., Stepan S., Poinar H.N., 2002, Molecular analysis of an 11,700-year-old rodent midden from the Atacama Desert, Chile, *Molecular Ecology*, 11: 913-924
- Kurnatowski S., 1977, Nowe teorie na temat pierwotnych siedzib Słowian w świetle analizy paleodemograficznej, *Slavia Antiqua*, 24, 17-38.
- Kurnatowski S., 1992, Próba oceny zaludnienia ziem polskich między XVIII w p.n.e. a IV w. n.e. – materiały źródłowe, próba oceny, K. Kaczanowski, S. Kurnatowski, A. Malinowski, J. Piontek (red.), *Szkoła Główna Handlowa, Instytut Statystyki i Demografii*, Warszawa.
- Kwok S., Higuchi R., 1989, Avoiding false positive with PCR, *Nature*, 339: 237-238.

- Lacan M., Keyser C., Ricaut F.X., Brucato N., Duranthon F., Guilaine J., Crubézy E., Ludes B., 2011, Ancient DNA reveals male diffusion through the Neolithic Mediterranean route, *Proceeding of the National Academy of Science, USA*, 108: 9788-9791.
- Lamers R., Hayter S., Matheson C.D., 2009, Postmortem Miscoding Lesions in Sequence Analysis of Human Ancient Mitochondrial DNA, *Journal of Molecular Evolution*, 68: 40-55.
- Lappalainen T., Laitinen V., Salmela E., Anderson P., Huoponen K., Savontaus M.L., Lahermo P., 2008, Migration waves to the Baltic Sea region, *Annals of Human Genetic*, 72: 337-348.
- Larson G, Albarella U., Dobney K., Rowley-Conwy P., Schibler J., Tresset 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., 2007, Ancient DNA, pig domestication, and the spread of the Neolithic into Europe, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 104: 15276-15281.
- Leach S. Lewis M., Chenery C., Müldner G., Eckardt H., 2009, Migration and Diversity in Roman Britain: A multidisciplinary approach to the identification of immigrants in Roman York, England, *American Journal of Physical Anthropology*, 140: 546-561.
- Leciejewicz L., 1989, *Słowianie Zachodni. Z dziejów tworzenia się średniowiecznej Europy*, Wrocław.
- Leciejewicz L., 1998, O modelu kultury wczesnosłowiańskiej, (w:) *Kraje słowiańskie w wiekach średnich. Profanum i sacrum*, red. H. Kocka-Krenz, W. Łosiński, Poznań 1998, s. 31-37.
- Li C., Li H., Cui Y., Xie C., Cai D., Li W., Mair V.H., Xu Z., Zhang Q., Abuduresule I., Jin L., Zhu H., Zhou H., 2010, Evidence that a West-East admixed population lived in the Tarim Basin as early as the early Bronze Age, *BMC Biology*, 8: 15.
- Li C., Lister D.L., Li H., Xua Y., Cui Y., Bower M.A., Jones M.K., Zhou H., 2011, Ancient DNA analysis of desiccated wheat grains excavated from a Bronze Age cemetery in Xinjiang, *Journal of Archaeological Science*, 38: 115-119.
- Lia V.V., Confalonieri V.A., Ratto N., Cámara Hernandez J.A., Miente Alzogaray A.M., Poggio L., Brown T.A., 2007, Microsatellite typing of ancient maize: insights into the history of agriculture in southern South America, *Proceedings of Royal Society of London Biology*, 274:545-554.
- Liepelt S., Sperisen C., Deguilloux M.F., Petit R.J., Kissling R., Spencer M., de Beaulieu J.L., Taberlet P., Gielly L., Ziegenhagen B., 2006, Authenticated DNA from ancient wood remains, *Ann Bot*, 98: 1107-1111.

- Lindahl T., 1993, Instability and decay of the primary structure of DNA, *Nature*, 362: 709-715.
- Loogväli E.L., Roostalu U., Malyarchuk B., Derenko M.V., Kivisild T., Metspalu E., Tambets K., Reidla M., Tolk H.V., Parik J., Pennarun E., Laos S., Lunkina A., Golubenko M., Barac L., Pericić M., Balanovsky O., Gusar V., Khusnutdinova E.K., Stepanov V., Puzyrev V., Rudan P., Balanovska E.V., Grechanina E., Richard C., Moisan J.P., Chaventré A., Anagnou N.P., Pappa K.I., Michalodimitrakis E.N., Claustres M., Gölge M., Mikerezi I., Usanga E., VILLEMS R., 2004, Disuniting uniformity: a pied cladistic canvas of mtDNA haplogroup H in Eurasia, *Molecular Biology Evolution*, 21: 2012-2021.
- 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-Sørensen 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., 2011, Species-specific responses of Late Quaternary megafauna to climate and humans, *Nature*, doi:10.1038/nature10574.
- Ludwig A., Pruvost M., Reissmann M., Benecke N., Brockmann G.A., Costanos P., Cieslak M., Lippold S., Llorente L., Sapfo-Malaspinas A., Slatkin M., Hofreiter M., 2009, Coat Color Variation at the Beginning of Horse Domestication, *Science*, 324: 485.
- Maca-Meyer N., Cabrera V.M., Arnay M., Flores C., Fregel R., González A.M., Larruga J.M., 2005, Mitochondrial DNA Diversity in 17-18th Century Remains From Tenerife (Canary Islands), *American Journal of Physical Anthropology*, 127: 418-426.
- Macaulay V., Richards M., Hickey E., Vega E., Cruciani F., Guida V., Scozzari R., Bonne-Tamir B., Sykes B., Torrini A., 1999, The emerging tree of west Euroasian mtDNAs: a synthesis of control-region sequences and RFLPs, *American Journal of Human Genetics*, 64: 232-249.
- Macaulay V., Hill C., Achilli A., Rengo C., Clarke D., Meehan W., Blackburn J., Semino O., Scozzari R., Cruciani F., Taha A., Shaari N.K., Raja J.M. Ismail P., Zainuddin Z., Goodwin, Bulbeck D., Bandelt J.H., Oppenheimer A., Torrioni A., Richards M., 2005, Single, rapid coastal settlement of Asia revealed by analysis of complete mitochondrial genomes, *Science*, 308: 1034-1036.
- Makiewicz T., 2001, Problem kontynuacji kulturowej pomiędzy starożytnością a wczesnym średniowieczem w świetle nowych materiałów ceramicznych z Wielkopolski, *Zbiór wypowiedzi*, W. Mańczak (red.), Kraków.

- Makiewicz T., 2005, W sprawie aktualnego stanu badań nad problemem kontynuacji kulturowej pomiędzy starożytnością a wczesnym średniowieczem w Polsce. Punkt widzenia autochtonisty, SIA, 46, 9-38.
- Malhi R.S., Schultz B.A. Smith D.G., 2001, Distribution of mitochondrial DNA lineages among Native American tribes of Northeastern North America, *Human Biology*, 73: 17-55.
- Malinowska-Łazarczyk H., 1982, Cmentarzysko Średniowieczne w Cedyni, Szczecin.
- Mallory J.P., 1989, In search of the Indo-Europeans: language, archaeology, and myth. New York, N.Y., Thames and Hudson.
- Malmström H., Svensson E.M., Gilbert M.T.P., Willerslev E., Götherström A., Holmlund G., 2007, More on Contamination: The Use of Asymmetric Molecular Behavior to Identify Authentic Ancient Human DNA, *Molecular Biology evolution* 24(4):998-1004.
- Malmström H., Vilà C., Gilbert M.T.P., Storå J., Willerslev E., Holmlund G., Götherström A., 2008, Barking up the wrong tree: Modern northern European dogs fail to explain their origin, *BMC Evolutionary Biology* 8: 71.
- Malmström H., Gilbert M.T.P., Thomas M.G., Brandström M., Storå J., Molnar P., Andersen P.K., Bendixen C., Holmlund G., Götherström A., Willerslev E., 2009, Ancient DNA Reveals Lack of Continuity between Neolithic Hunter-Gatherers and Contemporary Scandinavians, *Current Biology*, 19: 1758-1762.
- Malmström H., Vretemark M., Tillmar A., Brandström Durling M., Skoglund P., Gilbert M.T.P., Willerslev E., Holmlund G., Götherström A., 2011, Finding the founder of Stockholm – A kinship study based on Y-chromosomal, autosomal and mitochondrial DNA, *Annals of Anatomy*, doi:10.1016/j.aanat.2011.03.014.
- Malyarchuk B.A., Derenko M.V., 2001, Mitochondrial DNA variability in Russians and Ukrainians: implication to the origin of the Eastern Slavs. *Annals of Human Genetics* 65: 63-78.
- Malyarchuk B.A., Rogozin I.B., Berikov V.B., Derenko M.V., 2002a, Analysis of phylogenetically reconstructed mutational spectra in human mitochondrial control region, *Human Genetics*, 111: 46-53.
- Malyarchuk B.A., Grzybowski T., Derenko M.V., Czarny J., Woźniak M., Mścicka-Śliwka D., 2002b, Mitochondrial variability in Poles and Russians. *Annals of Human Genetics*, 66: 261-283.
- Malyarchuk B.A., Grzybowski T., Derenko M.V., Czarny J., Drobnič K., Mścicka-Śliwka D., 2003, Mitochondrial DNA variability in Bosnians and Slovenians. *Annals of Human Genetics* 67: 412-425.

- Malyarchuk B.A., Vanecek T., Perkova M.A., Derenko M.V., Sip M., 2006, Mitochondrial DNA variability in the Czech population, with application to the ethnic history of Slavs. *Human Biology*, 78: 681-696.
- Malyarchuk B.A., Grzybowski T., Derenko M., Perkova M., Vanecek T., Lazur J., Gomolcak P., Tsybovsky I., 2008a, Mitochondrial DNA phylogeny in Eastern and Western Slavs, *Molecular Biology Evolution*, 25: 1651-1658.
- Malyarchuk B.A., Perkova M.A., Derenko M.V., Vanecek T., Lazur J., Gomolcak P., 2008b, Mitochondrial DNA variability in Slovaks, with application to the Roma origin. *Annals of Human Genetics*, 72: 228-240.
- Mamzer H., 2001, Archeologia etniczna versus kulturowo-interpretacyjna, [w:] *Praojczyzna Słowian. Zbiór wypowiedzi*, W. Mańczak (red.), Kraków.
- Mamzer H., 2004, Archeologia i dyskurs. Rozważania meta archeologiczne, Instytut Archeologii i Etnologii Polskiej Akademii nauk, Poznań.
- Mańczak W., 1997, Czy słowiański Biskupin to naukowa legenda?, *Slavia Antiqua*, 38, s. 191-194.
- Mańczak W., 1998, Prehistoria Słowian i Gotów a prównanie słownictwa w paralelnych tekstach, *Slavia Antiqua*, 39, 294-300.
- Mańczak W., 1999, O poglądzie Godłowskiego na praojczyznę Słowian, *Slavia Antiqua*, 40, 291-292.
- Mańczak W., 2001, Zachodnia praojczyzna Słowian, [w:] *Praojczyzna Słowian. Zbiór wypowiedzi*, W. Mańczak (red.), Kraków.
- Marota I., Basile C., Ubaldi M., Rollo F., 2002, DNA decay rate in papyri and human remains from Egyptian archaeological sites. *American Journal of Physical Anthropology*, 117: 310-318.
- Matheson D.C., Loy T.H., 2001, Genetic sex identification of 9400-year-old Human Skull Samples from Çayönü Tepesi, Turkey, *Journal of Archaeological Science*, 28: 569-575.
- Matheson C.D., Vernon K.K., Lahti A., Fratpietro R., Spigelman, M., Gibson, S., Greenblatt C.L., Donoghue H.D., 2009, Molecular exploration of the first-century Tomb of the Shroud in Akeldama, Jerusalem, *PLoS ONE* 4, e8319.
- Matney T., Algaze G., Dulik M.C., Erdal Ö.D., Erdal Y.S., Gokcumen O., Lorenz J., Mergen H., Understanding Early Bronze Age Social Structure Through Mortuary Remains: A Pilot aDNA Study From Titris, Höyük, Southeastern Turkey, *International Journal of Osteoarchaeology*, DOI: 10.1002/oa.1213.
- Mays S., 2001, Sex identification in some Putative Infanticide victims from Roman Britain using ancient DNA, *Journal of Archaeological Science*, 28: 555-559.

- Mączyńska M., 2002, O dwóch modelach kulturowych – późnorzymskim i wczesnośredniowiecznym, [w:] Cień Światowita, czyli pięć głosów w sprawie etnogenezy Słowian, red. A. Kokowski, Lublin, s. 71-83.
- McDonald J.P., Hall A., Gasparutto D., Cadet J., Ballantyne J., Woodgate R., 2006, Novel thermostable γ -family polymerases: applications for the PCR amplification of damaged or ancient DNAs, *Nucleic Acids Research*, 34: 1102-1111.
- Melchior L., Gilbert M.T.P., Kivisild T., Lynnerup N., Dissing J., 2008a, Rare mtDNA Haplogroups and Genetic Differences in Rich and poor Danish Iron-Age villages, *American Journal of Physical Anthropology*, 135: 206-215.
- Melchior L., Kivisild T., Lynnerup N., Dissing J., 2008b, Evidence of Authentic DNA from Danish Viking Age Skeletons Untouched by Humans for 1,000 Years, *PLoS One*, 3: 1-8.
- Melchior L., Lynnerup N., Siegismund H.R., Kivisild T., Dissing J., 2010, Genetic diversity among ancient Nordic populations, *PLoS ONE*, 5, e11898.
- Miller W., Drautz D.J., Janecka J.E., Lesk A.M., Ratan A., Tomsho L.P., Packard M., Zhang Y., McCellan L.R., Qi J., Zhao F., Gilbert M.T.P., Dalen L., Arsuaga J.L., Ericson P.G., Huson D.H., Helgen K.M., Murphy W.J., Gotherstrom A., Schuster S.C., 2009, The mitochondrial genome sequence of the Tasmanian tiger (*Thylacinus cynocephalus*), *Genome research*, 19: 213-220.
- Mitchell D., Willerslev E., Hansen A.J., 2005, Damage and repair of ancient DNA, *Mutation Research*, 571: 265-276.
- Mulligan C.J. 2005. Isolation and Analysis of DNA from Archaeological, Clinical, and Natural History Specimens. *Methods in Enzymology*, 395: 87-103.
- Mullis K., Faloona F., 1987, Specific Synthesis of DNA In vitro Via Polymerase Chain Reaction, *Methods in Enzymology*, 155: 335-350.
- Nicholson G.J., Tomiuk J., Czarnetzki L., Bachmann., Pusch C.M., 2002, Detection of bone glue treatment as a major source of contamination in ancient DNA analyses, *American Journal of Physical Anthropology*, 118: 117-120.
- Nielsen-Marsh C.M., Hedges R.E.M., 1999, Bone porosity and the use of mercury intrusion porosimetry in bone diagenesis studies. *Archeometry*, 41: 165-174.
- O'Donoghue K., Brown T.A., Carter J.F., Evershed R.P., 1994, Detection of nucleotide bases in ancient seeds using gas chromatography/ mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry, *Mass Spectrometry*, 8: 503-508.
- Oven., Kayser, 2008, Updated Comprehensive Phylogenetic Tree of Global Human Mitochondrial DNA Variation, *Human Mutation*, 30 (2), 386-394.

- Pakendorf B., Stoneking M., 2005, Mitochondrial DNA and human evolution, *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 6: 165-183.
- Palanichamy M.G., Zhang C.L., Mitra B., Malyarchuk B., Derenko M., Chaudhuri T.K., Zhang Y.P., 2010, Mitochondrial haplogroup N1a phylogeography with implication to the origin of European farmers, *BMC Evolutionary Biology*, 10: 304.
- Pääbo S., 1985, Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. *Nature*, 314: 644-645.
- Pääbo S., Wilson A.C, 1988, Polymerase chain reaction reveals cloning artifacts. *Nature*, 334: 387-388.
- Pääbo S., 1989, Ancient DNA; extraction, characterization, molecular cloning and enzymatic amplification, *The Proceedings of the National Academy of Science USA*, 86: 1939-1943.
- Pääbo S., Wilson A.C., Higuchi R.G., 1989, Ancient DNA and the polymerase chain reaction, *Journal of Biological Chemistry*, 264: 9709-9712.
- Pääbo S., Poinar H., Serre D., Jaenicke-Despres V., Hebler J., Rohland N., Kuch M., Krause J., Vigilant L., Hofreiter M., 2004, Genetic analyses from ancient DNA, *Annual Review of Genetics*, 38: 645-679.
- Parczewski M., 1988, Początki kultury wczesnosłowiańskiej w Polsce. Krytyka i datowanie źródeł archeologicznych, Wrocław 1988.
- Parczewski M., 1998, U źródeł Słowiańszczyzny, [w:] Słowianie w Europie wcześniejszego średniowiecza, red. M. Miśkiewicz, Warszawa, s. 33-46.
- Parczewski M., 2002, Praojczyzna Słowian w ujęciu źródłoznawczym, [w:] Cień Światowita, czyli pięć głosów w sprawie etnogenezy Słowian, red. A. Kokowski, Lublin, s. 23-68.
- Park C.B. Larsson N.G., 2011, Mitochondrial DNA mutations in disease and aging, *The Journal of Cell Biology*, 193: 809-818.
- Pesquero M.D., Ascaso C., Alcalá L., Fernandez-Jalvo Y., 2010, A new taphonomic bioerosion in a Miocene lakeshore environment, *Paleogeogr. Paleoclimatol. Paleoecol.* 295: 192-198.
- Piontek J., 1992, Zastosowanie modelu paleodemograficznego do rekonstrukcji historycznego procesu etnogenezy Słowian, *Acta universitatis Lodziensis, folia Archaeologica*, 16, 285-298.
- Piontek J., 2001, Archeologiczne rekonstrukcje procesu etnogenezy Słowian, a ustalenia antropologii fizycznej, [w:] Praojczyzna Słowian. Zbiór wypowiedzi, W. Mańczak (red.), Kraków, 39-44.

- Piontek J., 2002, Antropologia pradziejowa i wczesnohistoryczna. Spory o etnogenezę Słowian: ustalenia archeologów i wątpliwości antropologów fizycznych, [w:] *Metody statystyczne w antropologii*, J. Charzewska, K. Kaczanowski, H. Piechaczek (red.), *Szóste Warsztaty Antropologiczne im. Profesora Janusza Charzewskiego*, Warszawa, 27-49.
- Piontek J., 2006a, Etnogeneza Słowian w Świetle nowszych badań antropologicznych, *Slavia Antiqua*, 47, 161-189.
- Piontek J., 2006b, Origin of the Slavs as a pretext for discussion, *Archaeologia polona*, 44, 317-331.
- Piontek J., 2009, Etnogeneza Słowian: od mitów ku faktom, *Archeologia Polski*, 54: 121-147.
- Piontek J., Iwanek B., Segeda S., 2008, *Antropologia o pochodzeniu Słowian*, Monografie Instytutu Antropologii UAM, Poznań.
- Poetsch M., Wittig H., Krause D., Lignitz E., 2003, Mitochondrial diversity of a northeast German population sample, *Forensic Science International*, 137: 125-132.
- Pohl W., 2006, Początki Słowian, kilka spostrzeżeń historycznych, [w:] *Nie-Słowianie o początkach Słowian*, P. Urbańczyk (red.), Poznań-Warszawa, s.11-25.
- Poinar H.N., Höss M., Bada J.L., Pääbo S., 1996, Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA, *Science*, 272: 864-866.
- Poinar H.N., Hofreiter M., Spaulding W.G., Martin P.S., Stankiewicz B.A., Bland H., Evershed R.P., Possnert G., Pääbo S., 1998, Molecular coproscopy: dung and diet of the extinct ground sloth *Nothrotheriops shastensis*. *Science*, 281: 402-406.
- Poinar H.N., 2003, The Top Ten List: criteria of authenticity for DNA from ancient and forensic samples, *International Congress Series*, 1239: 575-579.
- Popowska-Taborska H., 1991, *Wczesne dzieje Słowian w świetle ich języka*, [w:] Ossolineum, Wrocław.
- Popowska-Taborska H., 2001, Co językoznawca powiedzieć może o wczesnych dziejach Słowian ?, [w:] *Praojczyzna Słowian. Zbiór wypowiedzi*, W. Mańczak (red.), Kraków.
- Porzeziński A., 2006, *Wczesnośredniowieczne cmentarzysko szkieletowe na stanowisku 2a w Cedyni, województwo zachodniopomorskim*, Wydawnictwo Muzeum Narodowego w Szczecinie.
- Prado V.F., Castro A.K., Oliveira C.L., Souza K.T., Pena S.D., 1997, Extraction of DNA from human skeletal remains: practical applications in forensic science, *Genet Anal.* 14: 41-44.

- Price T.D., Knipper C., Grube G., Smrcka V., 2004, Strontium Isotops and Prehistoric Human Migration: The Bell Beaker Period in Central Europe, *European Journal of Archaeology*, t. 7, nr 1, s. 9-40.
- Pruvost M., Schwarz R., Correia V.B., Champlot S., Braguier S., Morel N., Fernandez-Jalvo Y., Grange T., Geigl E.A., 2007, Freshly excavated fossil bones are best for amplification of ancient DNA. *Proceeding of National Academy of Science, USA*, 104: 739-744
- R Development Core Team, 2008, R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rasmussen, M., Li, Y., Lindgren, S., Skou Pedersen, J., Albrechtsen, A., Moltke, I., Metspalu, M., Metspalu, E., Kivisild, T., Gupta, R., Bertalan, M., Nielsen, K., Gilbert, M.T.P., Wang, Y., Raghavan, M., Campos, P.F., Munkholm Kamp, H., Wilson, A.S., Gledhill, A., Tridico, S., Bunce, M., Lorenzen, E., Binladen, J., Guo, X., Zhao, J., Zhang, X., Zhang, H., Li, Z., Chen, M., Orlando, L., Kristiansen, K., Bak, M., Tommerup, N., Bendixen, C., Pierre, T.L., Grønnow, B., Meldgaard, M., Andreasen, C., Dedorova, S.A., Osipova, L.P., Higham, T.F.G., Bronk Ramsay, C., Hansen, T.v.O., Nielsen, F.C., Crawford, M.H., Brunak, S., Sicheritz-Pontén, T., Villems, R., Nielsen, R., Krogh, A., Wang, J., Willerslev, E., 2010, Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo, *Nature*, 463: 757–762.
- Rasmussen M., Guo X., Wang Y, Lohmueller K.E., Rasmussen S., Albrechtsen A., Skotte L., Lindgreen S., Metspalu M., Jombart T., Kivisild T., Zhai W., Eriksson A., Manica A., Orlando L., De La Vega F.M., Tridico S., Metspalu E., Nielsen K., Ávila-Arcos M.C., Moreno-Mayar V.J., Muller C., Dortch J., Gilbert M.T.P., Lund O., Wesolowska A., Karmin M., Weinert L.A., Wang B., Li J., Tai S., Xiao F., Hanihara T., van Driem G., Jha A.R., Ricaut F.X., de Knijff P., Migliano A.B., Gallego Romero I., Kristiansen K., Lambert D.M., Brunak S., Forster P., Brinkmann B., Nehlich O., Bunce M., Richards M, Gupta R., Bustamante C.D., Krogh A., Foley R.A., Lahr M.M., Balloux F., Sicheritz-Pontén T., Villems R, Nielsen R., Wang J, Willerslev E., 2011, An Aboriginal Australian Genome Reveals Separate Human Dispersals into Asia, *Science*, 334: 94-98.
- Rębała K., Mikulich A.I., Tsybovsky I.S., Siváková D., Dzupinková Z., Szczerkowska-Dobosz A., Szczerkowska Z., 2007, Y-STR variation among Slavs: evidence for the Slavic homeland in the middle Dnieper basin. *Journal of Human Genetics*, 52: 406-414.
- Richards M.B., Macaulay V., Bandelt H.J., Sykes B.C., 1998, Phylogeography of mitochondrial DNA in western Europe, *Annals of Human Genetic*, 62: 241-260.
- Richards M., Macaulay V., Hickey E., Vega E., Sykes B., Guida V., Rengo C., Sellitto D., Cruciani F., Kivisild T., Villems R., Thomas M., Rychkov S., Rychkov O., Rychkov Y., Gölge M, Dimitrov D, Hill E., Bradley D., Romano V., Francesco Cali F., Vona G., Demaine A., Papiha S., Triantaphyllidis C., Stefanescu G., Hatina J., Belledi M., Di Rienzo A., Novelletto A., Oppenheim A., Nørby S., Al-

- Zaheri N., Santachiara-Benerecetti S., Scozzari R., Torroni A., Bandelt H.J., 2000, Tracing European Founder Lineages in the Near Eastern mtDNA Pool, *American Journal of Human Genetics*, 67: 1251-1276.
- Rogaev E.I., Grigorenko A.P., Moliaka Y.K., Faskhutdinova G., Goltsov A., Lahti A., Hildenbrandt C., Kittler E.L.W., Morozova I., 2009, Genomic identification in the historical case of the Nicholas II royal family. *Proceeding of National Academy of Science USA*, 106: 5258-5263.
- Rohland N., Siedel H., Hofreiter M., 2004, Nondestructive DNA extraction method for mitochondrial DNA analyses of museum specimens. *Biotechniques*, 36: 814-816, 818-812.
- Rohland N. i Hofreiter M., 2007, Ancient DNA extraction from bones and teeth, *Nature Protocols*, 2: 1756-1762.
- Rożnowski F., 1985, Stosunki antropologiczne na terenach zajętych w okresie rzymskim przez ludność kultury wielbarskiej i ludność kultury czerniachowskiej, [w:] *Teoria i empiria w polskiej szkole antropologicznej*, J. Piontek, A. Malinowski (red.), *Seria Antropologia 11*, Poznań, 239-249.
- Rożnowski F., Gaładykowska-Rzerzycka J., 1983, Stan i wyniki badań nad ludnością kultury wielbarskiej, *Materiały Zachodniopomorskie*, 29, 47-76.
- Rudbeck L., Gilbert M.T., Willerslev E., Hansen A.J., Lynnerup N., Christensen T., Dissing J., 2005, mtDNA analysis of human remains from an early Danish Christian cemetery, *American Journal of Physical Anthropology*, 128: 424-429.
- Salamon M., Tuross. N., Arensburg B., Weiner S., 2005, Relatively well preserved DNA is present in the crystal aggregates of fossil bones. *Proceeding of National Academy of Science USA*, 102: 13783-13788.
- Salas A., Bandelt H.J., Macaulay V., Richards M.B., 2007, Phylogeographic investigations: The role of trees in forensic genetics, *Forensic Science International* 168: 1-13.
- Sampietro M.L., Gilbert M.T., Lao O., Caramelli D., Lari M., Bertranpetit J., Lalueza-Fox C., 2006, Tracking down human contamination in ancient human teeth, *Molecular Biology Evolution*, 23: 1801-1807.
- Sampietro M.L., Lao O., Caramelli D., Lari M., Pou R., Marti M., Bertranpetit J., Lalueza-Fox C., 2007, Paleogenetic evidence supports a dual model of Neolithic spreading into Europe, *Proceeding of the Royal Society of Biological Sciences*, 274: 2161-2167.
- Schlumbaum A., Tensen M., Jaenicke-Després V., 2008, Ancient plant DNA in archeobotany, *Vegetation History and Archeobotany*, 17: 233-244.

- Scholz M., Giddings I., Pusch C.M., 1998, Apolymerase chain reaction inhibitor of ancient hard and soft tissue DNA extracts is determined as human collagen type I, *Analytical Biochemistry*, 259: 283-286.
- Schwarz C., Debruyne R., Kuch M., McNally E., Schwarz H., Aubrey A., Bada J., Poinar H., 2009, New insights from old bones: DNA preservation and degradation in permafrost preserved mammoth Remains. *Nucleic Acids Research*, 37: 3215-3229.
- Shapiro B., 2008, Engineered polymerases amplify the potential of ancient DNA, *Trends in Biotechnology*, 26: 285-287.
- Shapiro B., Cooper A., 2003, Beringia as an ice age genetic museum, *Quaternary International*, 60: 94-100.
- Shapiro B., Hofreiter M., 2012, *Ancient DNA Methods and Protocols*, *Methods in molecular biology*, Springer Protocols.
- Shinoda K., Adachi N., Guillen S., Shimada I., 2006, Mitochondrial DNA Analysis of Ancient Peruvian Highlanders, *American Journal of Physical Anthropology*, 131: 98-107.
- Simoni L., Calafell F., Pettener D., Bertranpetit J. Barbujani G., 2000, Geographic Patterns of mtDNA Diversity in Europe, *American Journal of Human Genetics*, 66: 262-278.
- Skorupka T., 2001, Kowalewko 12. Cmentarzysko birtualne ludności kultury wielbarskiej (od połowy I w. n.e. do początku III w. n.e.), [w:] *Archeologiczne badania ratownicze wzdłuż trasy gazociągu tranzytowego*, M. Chłodnicki (red.) T. II Wielkopolska, cz. 3, Wydawnictwo Poznańskie, Poznań.
- Slatkin M., 1995, A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies, *Genetics* 139: 457-462.
- Sławski F., 1998, *Praojczyzna Słowian (w:) Prace na XII Międzynarodowy Kongress Sławistów w Krakowie 1999*, *Z polskich studiów Sławistycznych*. Seria 9. Językoznawstwo, Warszawa, s. 277-281.
- Smith C.I., Chamberlain A.T., Riley M.S., Cooper A., Stringer C.B., Collins M.J., 2001, Neanderthal DNA: not just old but old and cold ?, *Nature*, 10: 771-772.
- Smith C.I., Chamberlain A.T., Riley M.S., Stringer C., Collins M.J., 2003, The thermal history of human fossils and the likelihood of successful DNA amplification, *Journal of Human Evolution*, 45: 203-217.
- Soares P., Ermini L., Thomson N., Mormina M., Rito T., Röhl A., Salas A., Oppenheimer S., Macaulay V., Richards M.B., 2009, Correcting for purifying Selection: An Improved Human Mitochondrial Molecular Clock, *The American Journal of Human Genetics*, 84: 740-759.

- Soltis P.S., Soltis D.E., Smiley C.J., 1992, an *rbcL* sequence from Miocene *Taxodium* (bald cypress). *Proceeding of National Academy of Science, USA*, 89: 449-451.
- Sønstebø J.H., Gielly L., Brysting A.K., Elven R., Edwards M., Haile J., Willerslev E., Coissac E., Rioux D., Sannier J., Taberlet P., Brochmann C., 2010, Using next-generation sequencing for molecular reconstruction of past Arctic vegetation and climate, *Molecular Ecology Resources*, 10: 1009-1018.
- Stanković A., Doan K., Mackiewicz P., Ridush B., Baca M., Gromadka R., Socha P., Wegleński P., Nadachowski A., Stefaniak K., 2011, First ancient DNA sequences of the Late Pleistocene red deer (*Cervus elaphus*) from the Crimea, Ukraine, *Quaternary International*, 245: 262-267.
- Stiller M., Green R.E., Ronan M., Simons J.F., Du L., He W., Egholm M., Rothberg J.M., Keates S.G., Ovodov N.D., Antipina E.E., Baryshnikov G.F., Kuzmin Y.V., Vasilevski A.A., Wuenschell G.E., Termini J., Hofreiter M., Jaenicke – Despres V., Pääbo S., 2006, Patterns of nucleotide misincorporations during enzymatic amplification and direct large-scale sequencing of ancient DNA, *Proceeding of National Academy of Science, USA*, 103: 13578-13584.
- Strzelczyk J., 2005, *Etnogeneza Słowian w świetle źródeł pisanych*. Kaczanowski P, Parczewski M.,(red.), *Archeologia o początkach Słowian: Materiały z konferencji, Kraków, 19-21 listopada 2001, Kraków Księgarnia Akademicka: 65-78.*
- Tani N., Tsumura Y., Sato H., 2003, Nuclear gene sequences and DNA variation of *Cryptomeria japonica* samples from the postglacial period, *Molecular Ecology*, 12: 859-868.
- Tillmar A.O., Coble M.D., Wallerström T., Holmlund G., 2010, Homogeneity in mitochondrial DNA control region in Swedish subpopulations, *International Journal of Legal Medicine*, 124: 91-98.
- Thomas R.H., Schaffner W., Wilson A.C., Paabo S. 1989. DNA phylogeny of the extinct marsupial wolf. *Nature*, 340: 465-467.
- Torrioni A., Achilli A., Macaulay V., Richards M., Bandelt H.J., 2006, Harvesting the fruit of the human mtDNA tree, *Trends in Genetics*, 22: 339-345.
- Töpf A.L., Gilbert M.T.P., Fleischer R.C., Hoelzel A.R., 2007, Ancient human mtDNA genotypes from England reveal lost variation over the last millennium, *Biology Letters*, 3: 550-553.
- Tran T.N.N., Signoli L., Aboudharam G., Raoult D., Drancourt M., 2011, High throughput multiplex pathogen detection authenticates plaque waves in Medieval Venice, Italy, *PLoS One* 6, 3.
- Tully L.A., Parsons T.J., Steighner R.J., Holland M.M., Marino M.A., Prenger V.L., 2000, A sensitive denaturing gradient-gel electrophoresis assay reveals a high

- frequency of heteroplasmy in hypervariable region I of the human mtDNA control region, *American Journal of Human Genetic*, 67: 432-443.
- Underhill P.A., Myres N.M., Rootsi S., Metspalu M., Zhivotovsky L.A., King R.J., Lin A.A., Chow C.E., Semino O., Battaglia V., Kutuev I., Järve M., Chaubey G., Ayub Q., Mohyuddin A., Mehdi S.Q., Sengupta S., Rogaev E.I., Khusnutdinova E.K., Pshenichnov A., Balanovsky O., Balanovska E., Jeran N., Augustin D.H., Baldovic M., Herrera R.J., Thangaraj K., Singh V., Singh L., Majumder P., Rudan P., Primorac D., Villems R., Kivisild T., 2010, Separating the post-Glacial coancestry of European and Asian Y chromosomes within haplogroup R1a. *European Journal of Human Genetics*, 18: 479-484.
- Urbańczyk P., 2006, Polski węzeł słowiański, [w:] *Nie-Słowianie o początkach Słowian*, P. Urbańczyk (red.), Poznań-Warszawa, s.133-153.
- Valdiosera C., Garcia N, Dalen L., Smith C., Kahlke R.D., Liden K., Angerbjörn A., Arsuaga J.L., Götherström A., 2006, Typing single polymorphic nucleotides in mitochondria DNA as a way to Access Middle Pleistocene DNA, *Biology Letters*, 2: 601-603.
- Vanecek T., Vorel F., Sip M., 2004, Mitochondrial D-loop hypervariable regions: Czech population data. *International Journal of Legal Medicine*, 118: 14-18.
- Wang H., Ge B., Mair V.H., Cai D., Xie C., Zhang Q., Zhou H., Zhu H., 2007, Molecular Genetic Analysis of Remains From Lamadong Cemetery, Liaoning, China, *American Journal of Physical Anthropology*, 134: 404-411.
- Wanke A., 1955, Indywidualne określenia taksonomiczne, *Przegląd Antropologiczny*, 21, 968-988.
- Wierciński A., 1976, Problem strukturalnej i procesualnej identyfikacji antropologicznej Prasłowian, *Slavia Antiqua*, 23, 1-16.
- Willerslev E., Hansen A.J., Christensen B., Steffensen J.P., Arctander P., 1999, Diversity of Holocene life forms in fossil glacier ice. *Proceedings of Natinal Academy of Science, USA*, 96: 8017-8021.
- Willerslev E., Hansen A.J., Brandt T.B., Rønn R., Barnes I., Wiuf C., Gilichinsky D.A., Mitchell D., Cooper A., 2004a, Long-term persistence of bacterial DNA. *Current Biology*, 14: R9-R10.
- Willerslev E., Hansen A.J., Poinar H.N., 2004b, Isolation of nucleic acids and cultures from ice and permafrost, *Trends in Ecology and Evolution*, 19: 141-147.
- Willerslev E., Cooper A., 2005, Ancient DNA, *Proceedings of The Royal Society B – Biological Science*, 272: 3-16.
- Willerslev E., Cappellini E., Boomsma W., Nielsen R., Hebsgaard M.B., Brand T.B., Hofreiter M., Bunce M., Poinar M.N., Dahl-Jensen D., Johnsen S., Steffensen P., Bennike O., Schwenninger J.L., Nathan R., Armitage S., de Hoog C.J., Alfimov

- V., Christl M., Beer J., Muscheler R., Barker J., Sharp M., Penkman K.E.H., Haile J., Taberlet P., Gilbert M.T.P., Casoli A., Campani E., Collins M.J., 2007, Ancient Biomolecules from Deep Ice Cores Reveal a Forested Southern Greenland, *Science*, 317: 111-114.
- Willerslev E., Gilbert M.T.P., Binladen J., Ho S.Y.W., Campos P., Ratan A., Tomsho L., da Fonseca R., Sher A., Nowak-Kemp M., Roth T., Miller W., Schuster S., 2009, Analysis of complete mitochondrial genomes from extinct and extant rhinoceroses reveals lack of phylogenetic resolution, *BMC Evolution Biology*, 9: 95.
- Witas H.W., 2007, Kopalny DNA źródłem informacji w badaniach archeologicznych, *Archeologia Polski*, 52: 15-33.
- Witas H.W., Karasińska M., Jędrychowska-Dańska K., Żądzińska E., Wrzesińska A., Wrzesiński J., Zawicki P., Kołodziejczak M., Perenc M., Nadolski J., 2005, DNA from medieval teeth: approach to sex identification of infant and child remains, *Current Trends in Dental Morphology Research*, Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź, s. 191-198.
- Witas H.W., Jędrychowska-Dańska K., Zawicki P., 2007, Extremely high frequency of autoimmune-predisposing alleles in medieval specimens, *Journal of Zhejiang University Science B*, 8: 512-514.
- Wokroj F., 1980, *Ludność Cedyni wczesnośredniowiecznej w świetle antropologii*, Poznań.
- Woodward S.R., Weyand N.J., Bunell M. 1994. DNA sequence from Cretaceous period bone fragments. *Science*, 266: 1229-1232.
- Woźniak M., Grzybowski T., Starzyński J., Marciniak T., 2007, Continuity of Y chromosome haplotypes in the population of Southern Poland before and after the Second World War, *Forensic Science International: Genetic*, 1: 134-140.
- Yang D.Y., Eng D., Dudar J.C., Saunders S.R., Wayne J.S., 1997, Removal of PCR inhibitors using silica – based spin columns: application to ancient bones. *Canadian Society of Forensic Science*, 30: 1-5.
- Yang D. Y., Eng D., Wayne J.S., Dudar J.C., Saunders S.R., 1998, Technical note: Improved DNA extraction from ancient bones using silica based spin columns, *American journal of Physical Anthropology*, 105: 539-54.
- Yang D.Y., Cannon S.R., Saunders S.R., 2004, DNA species identification of archaeological salmon bone from the Pacific Northwest Coast of North America, *Journal of Archaeological Science*, 31: 619-631.
- Yang D.Y., Watt K., 2005, Contamination controls when preparing archaeological remains for ancient DNA analysis, *Journal of Archaeological Science*, 32: 331-336.

- Zgonjanin D., Veselinović I., Kubat M., Furac I., Antov M., Loncar E., Tasic M., Vuković R., Omorjan R., 2010, Sequence polymorphism of the mitochondrial DNA control region in the population of Vojvodina Pvince, Serbia, *Legal Medicine (Tokyo)*, 12: 104-107.
- Zhang F., Xu Z., Tan J., Sun Y., Xu B., Li S., Zhao X., Zhou H., Gong G., Zhang J., Jin L., 2010, Prehistorical East-West Admixture of Maternal Lineages in a 2,500-Year-Old Population in Xinjiang, *American Journal of Physical Anthropology*, 142: 314-320.
- Zhang H.Q., Liu F.E., Liu W.K., Du J.Q., Wu X.M., Chen X.M., Liao G.X., 2011, Sex identification of slave sacrifice victims from Qin State tombs in the spring and autumn period of China using ancient DNA, *Archeometry*, 53: 600-613.
- Zimmermann B., Brandstätter A., Duftner N., Niederwieser D., Spiroski M., Arsov T., Parson W., 2007, Mitochondrial DNA control region population data from Macedonia. *Forensic Science International: Genetic* 1: e4-9.
- Zink A., Haas C.J., Reischl U., Szeimies U., Nerlich A.G., 2001, Molecular analysis of skeletal tuberculosis in an ancient Egyptian population, *Journal of Medical Microbiology*, 50: 355-366.
- Žak J., 1985, O kontynuacji i dyskontynuacji społecznej i kulturowej na ziemiach nadodrzańskich i nadwiślańskich w V-V/VI w. n.e. *Folia Praehistorica Posnaniensia* 1: 85-108.

Załączniki

Załącznik 1. Okres rzymski – nr próby 2/2b, osobnik Rogowo ob. 29 28/99.



Załącznik 2. Okres rzymski – nr próby 10/10b, osobnik Rogowo ob. 718 inw. 77/00.



Załącznik 3. Okres rzymski – nr próby 12/12b, osobnik Rogowo ob. 724 inw 80/00.



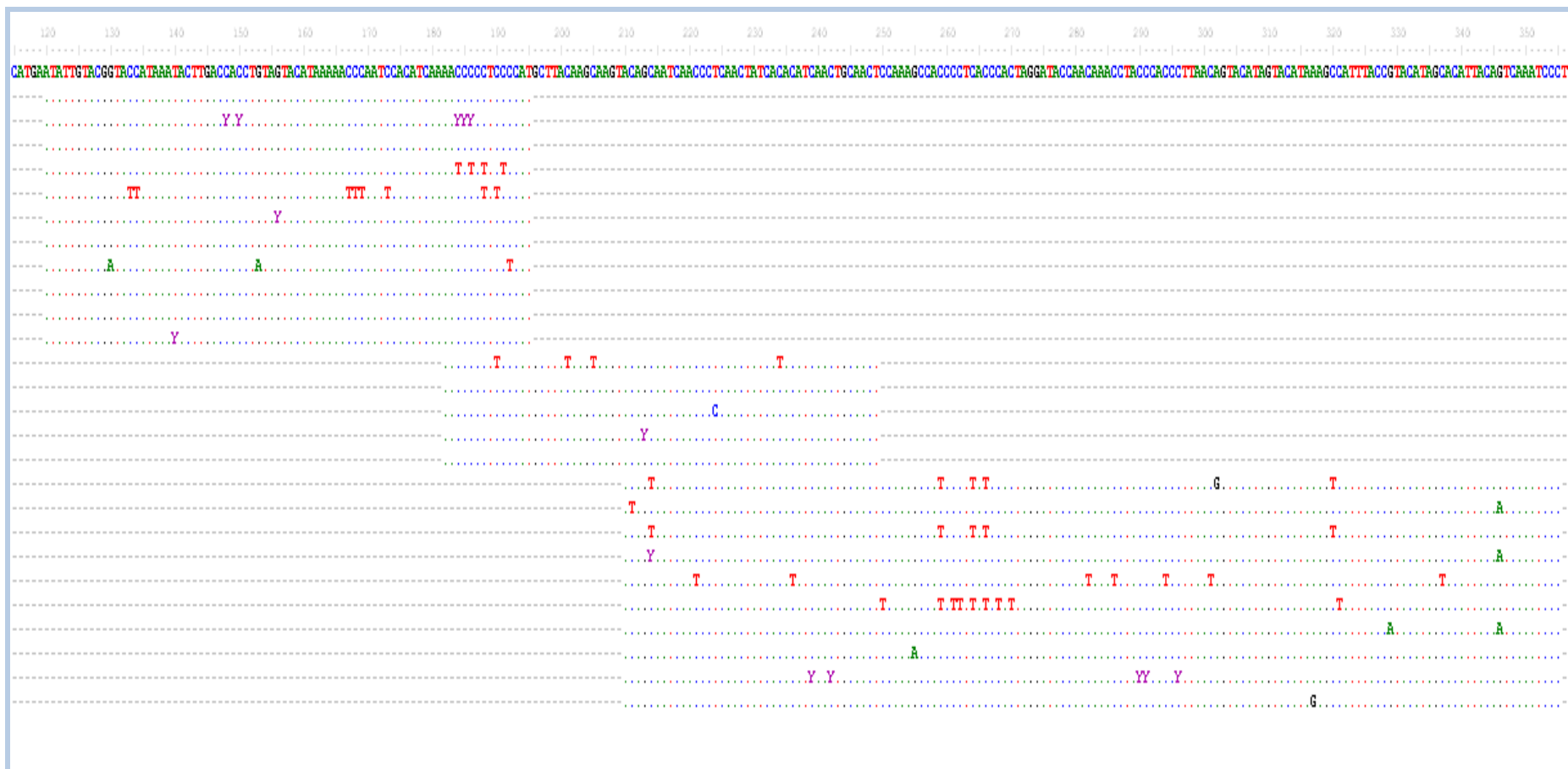
Załącznik 4. Okres rzymski – nr próby 13/13b, osobnik Rogowo ob. 680 inw 52/00.



Załącznik 5. Okres rzymski – nr próby 14/14b R, ob. 438 (gr.68) inw 78/K/99.



Załącznik 6. Okres rzymski – nr próby 20/20b, osobnik Rogowo ob. 96 13/99.



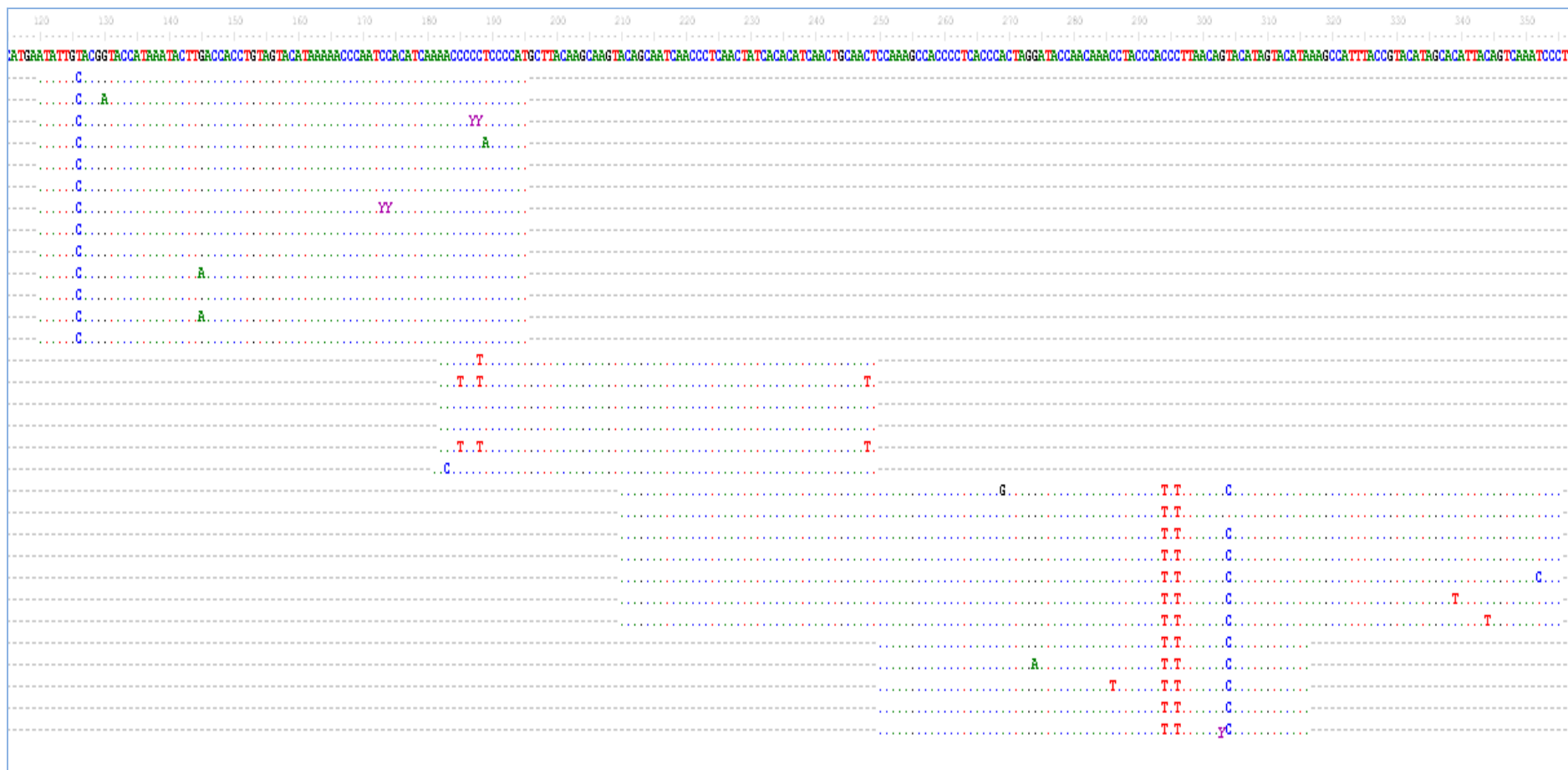
Załącznik 7. Okres rzymski – nr próby 21/21b, osobnik Rogowo ob. 11/99 ob. 24.



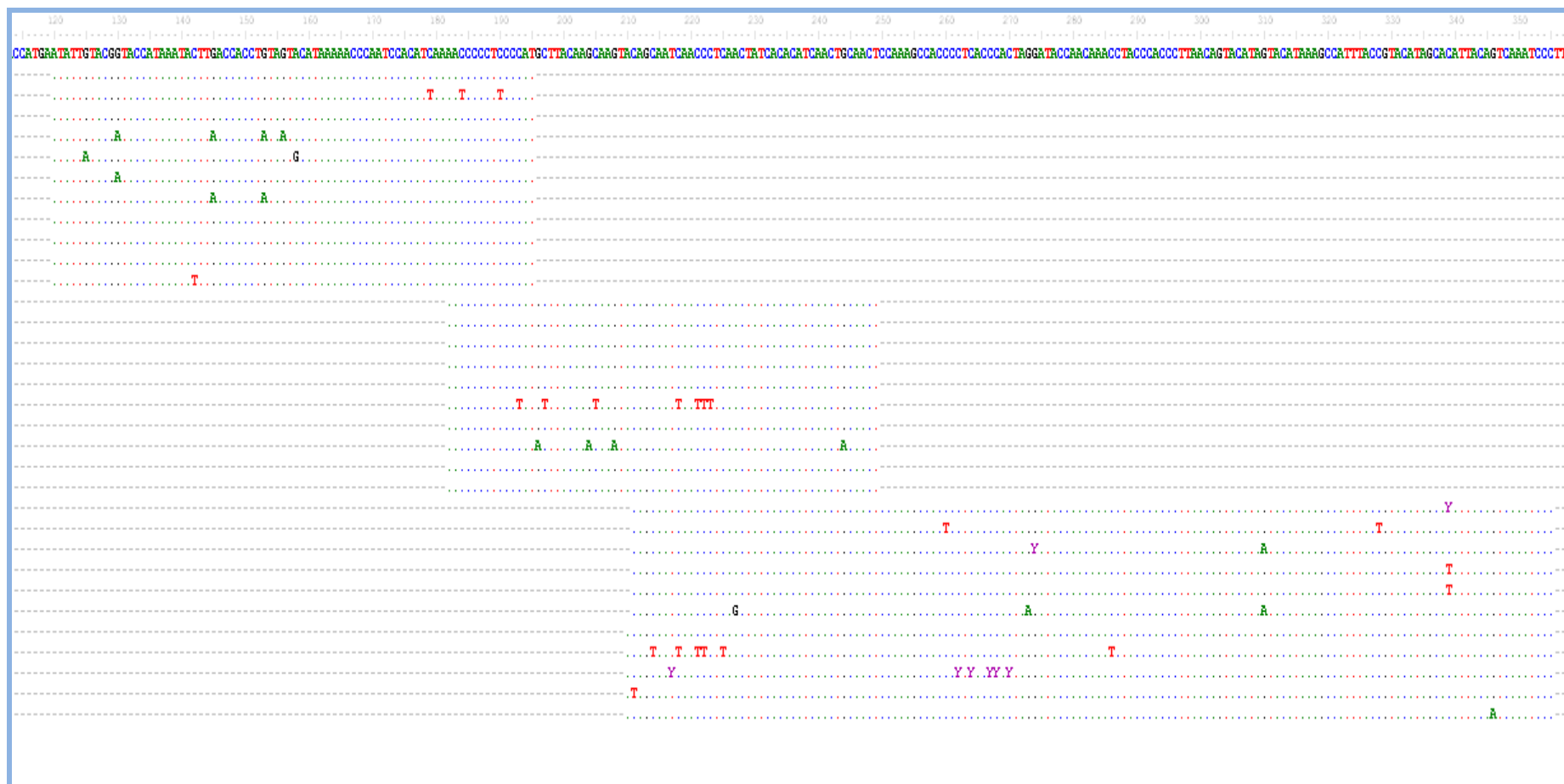
Załącznik 8. Okres rzymski – nr próby 23/23b, osobnik Rogowo ob. 37 inw 32/99.



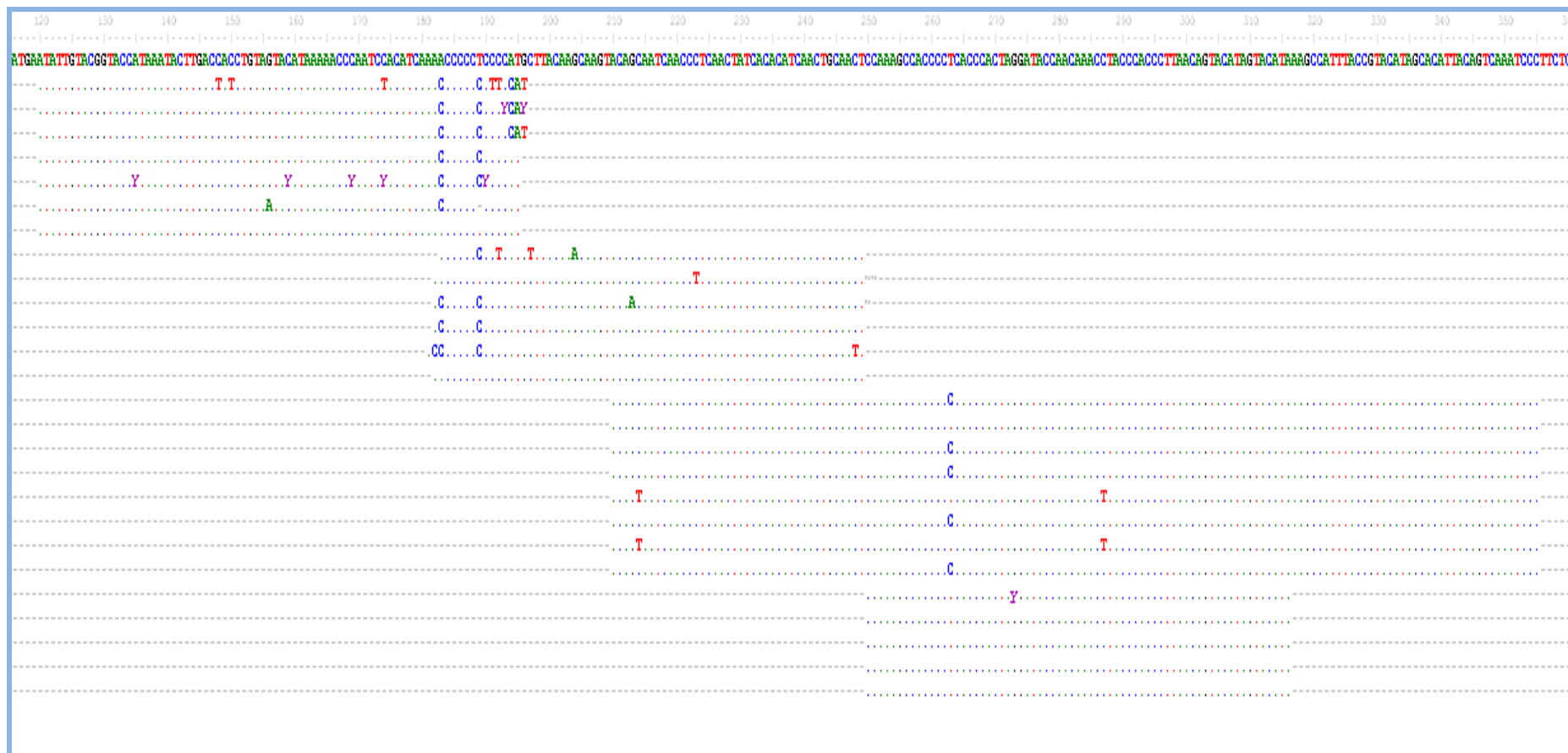
Załącznik 9. Okres rzymski – nr próby 24/24b, osobnik Rogowo ob. 705 inw 74/00.



Załącznik 10. Okres rzymski – nr próby 25/25b, osobnik Rogowo ob. 665 inw 43/00.



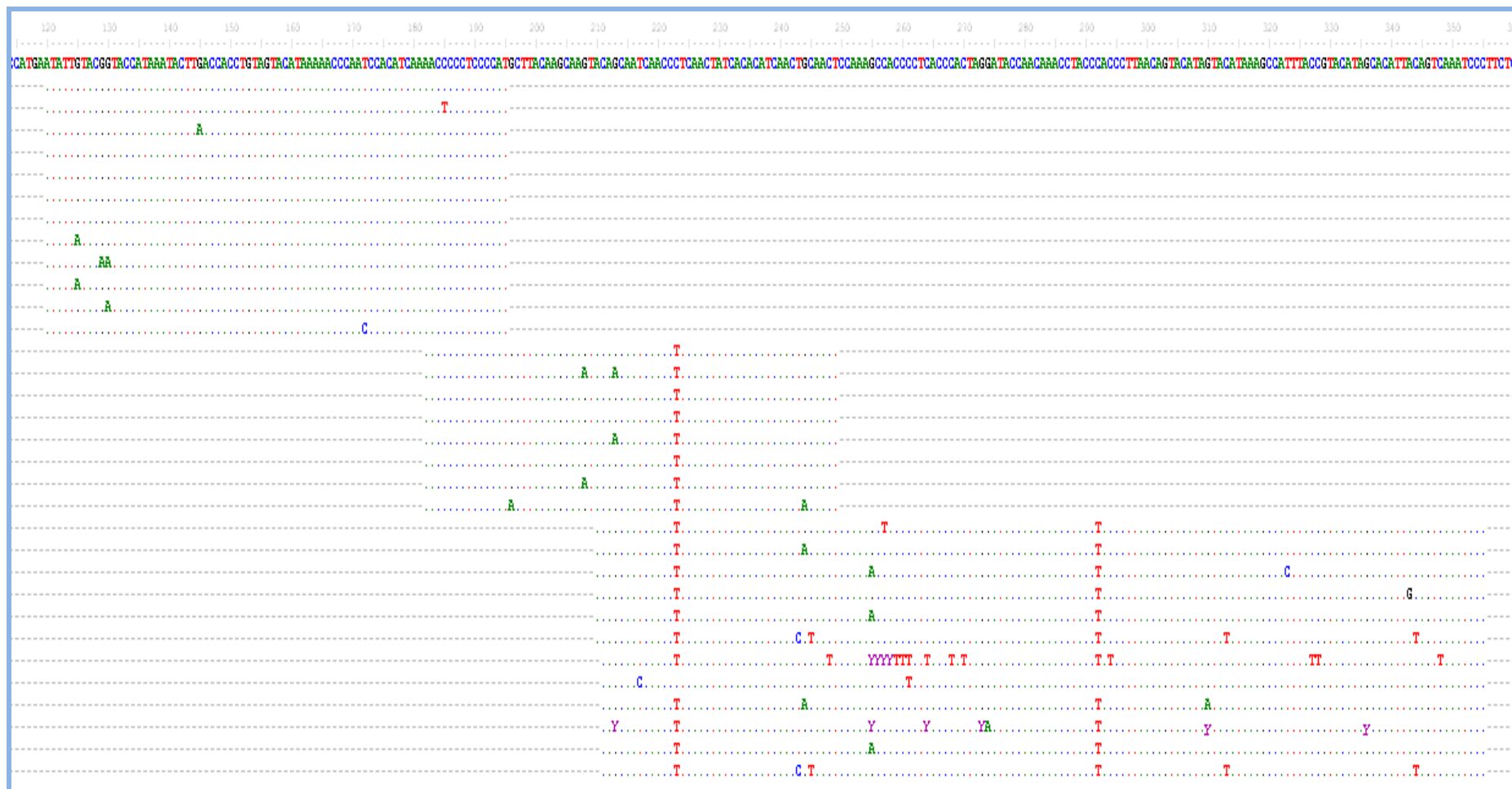
Załącznik 11.Okres rzymski - nr próby 30/30b, osobnik Rogowo ob. 45 16/99.



Załącznik 12. Okres rzymski - nr próby 31/31b, osobnik Rogowo ob. 421 nr inw. 68/K/99.



Załącznik 13. Okres rzymski - nr próby 28/28b, osobnik Kowalewko 466.



Załącznik 15. Okres rzymski - nr próby 85/85b, osobnik Kowalewko 167.



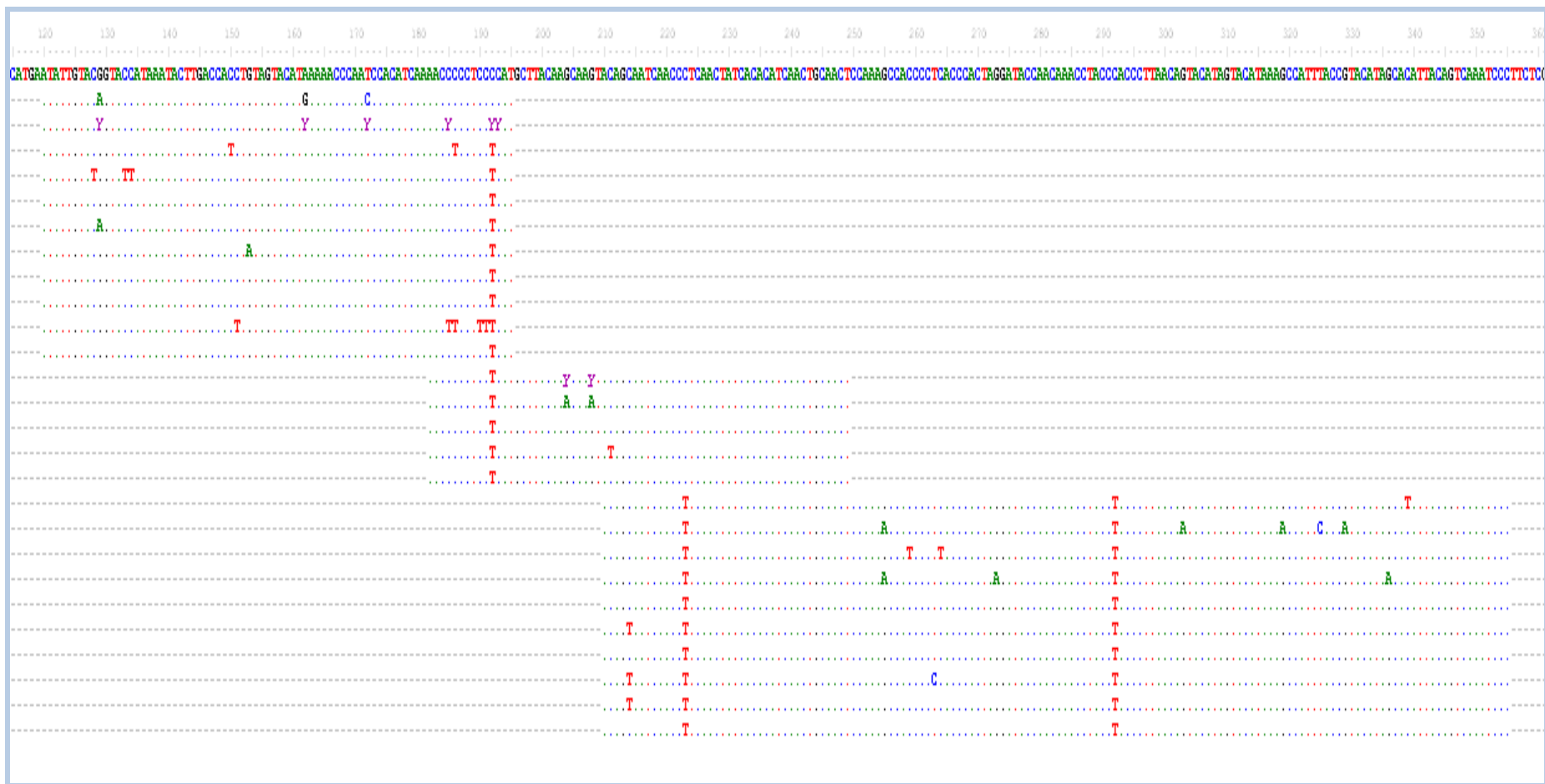
Załącznik 16. Okres rzymski nr próby 84/84b, osobnik Kowalewko stan.12 nr 1.



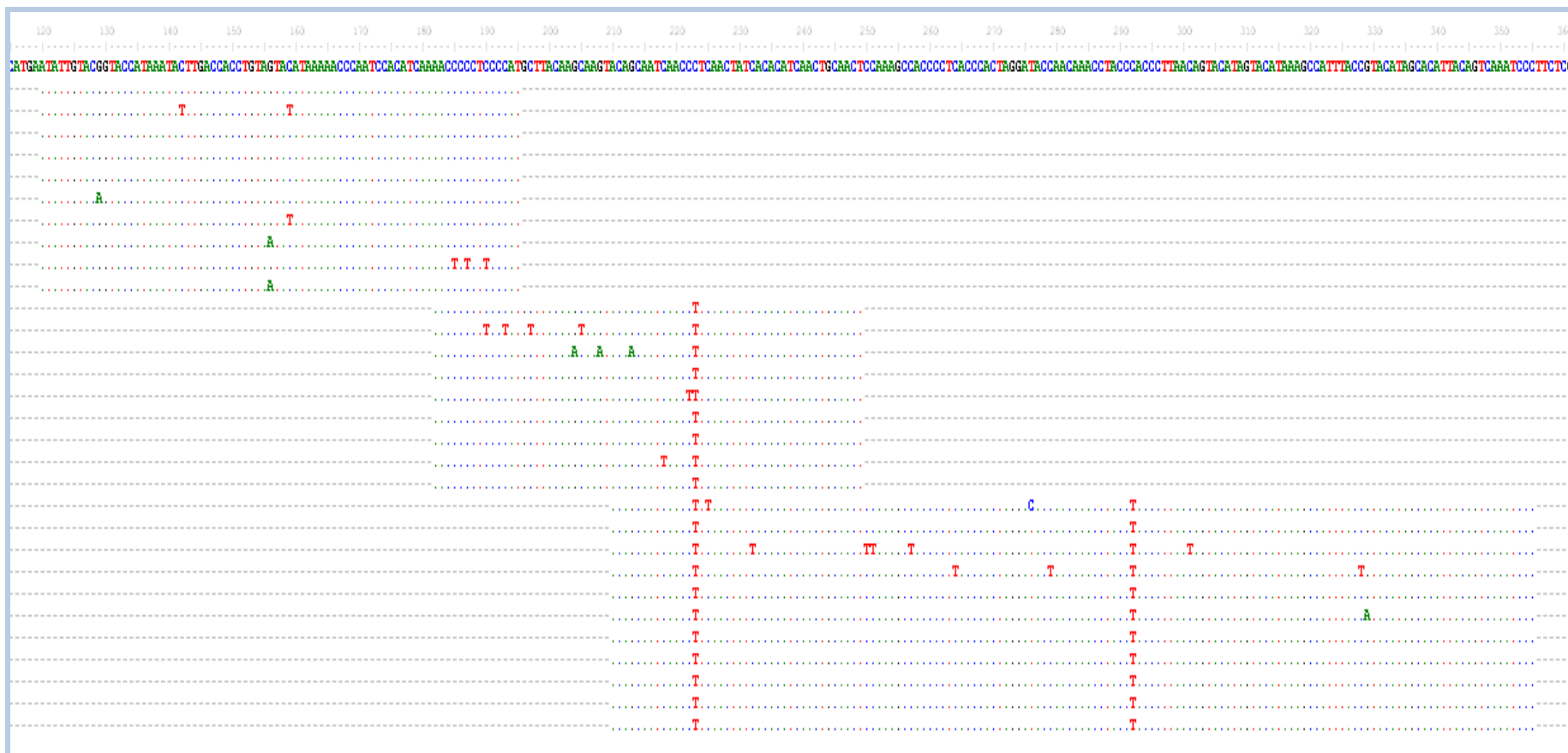
Załącznik 17. Okres rzymski - nr próby 87/87b, osobnik Kowalewko 314.



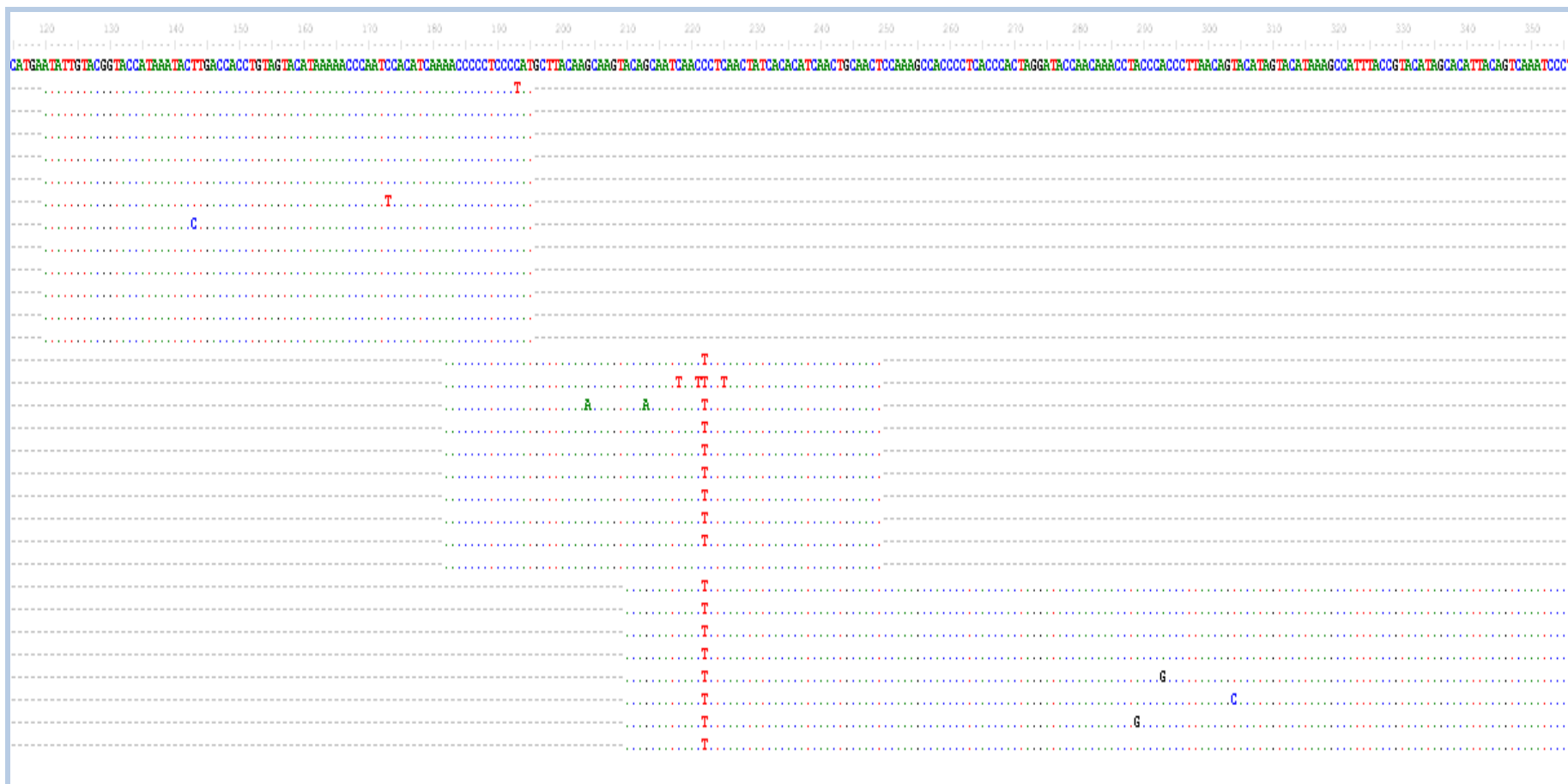
Załącznik 18. Okres rzymski - nr próby 88/88b, osobnik Kowalewko 189.



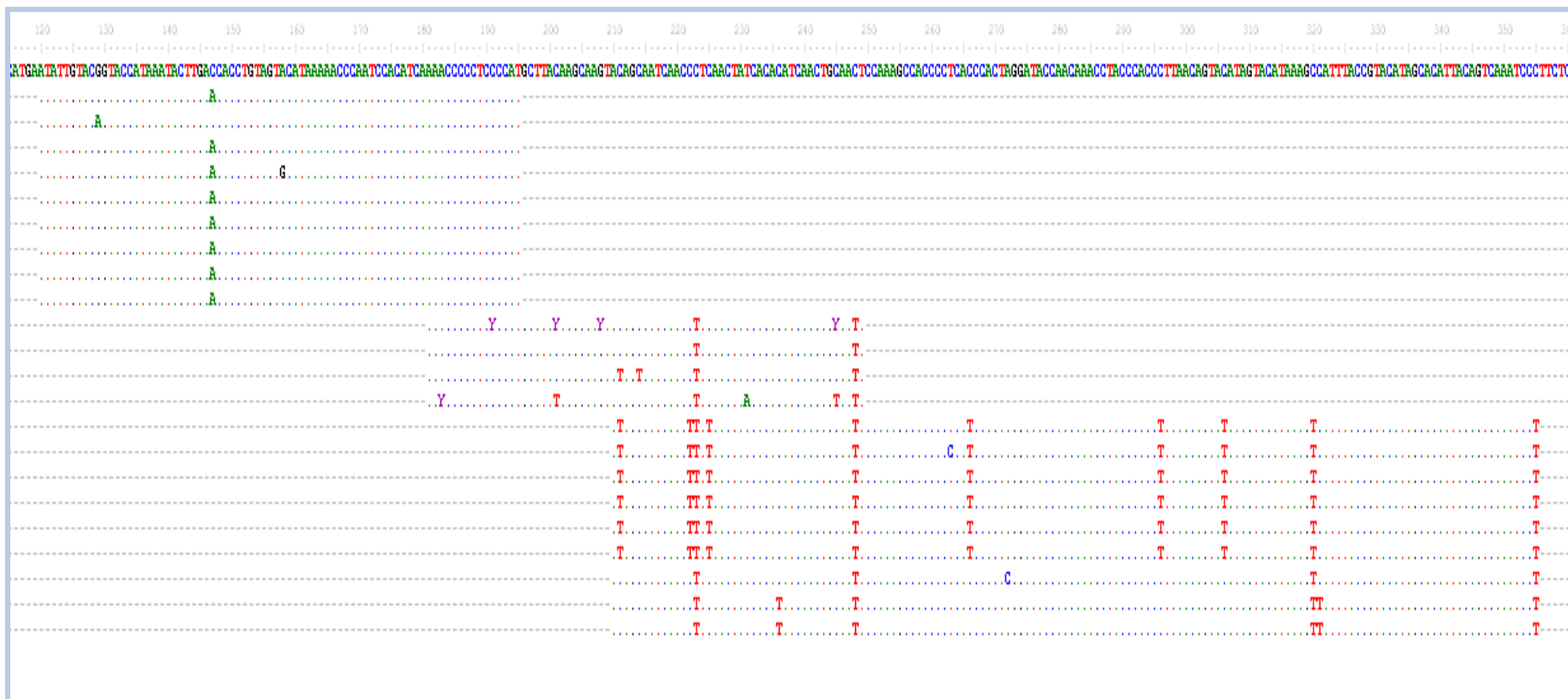
Załącznik 19. Okres rzymski - nr próby 89/89b, osobnik Kowalewko 188.



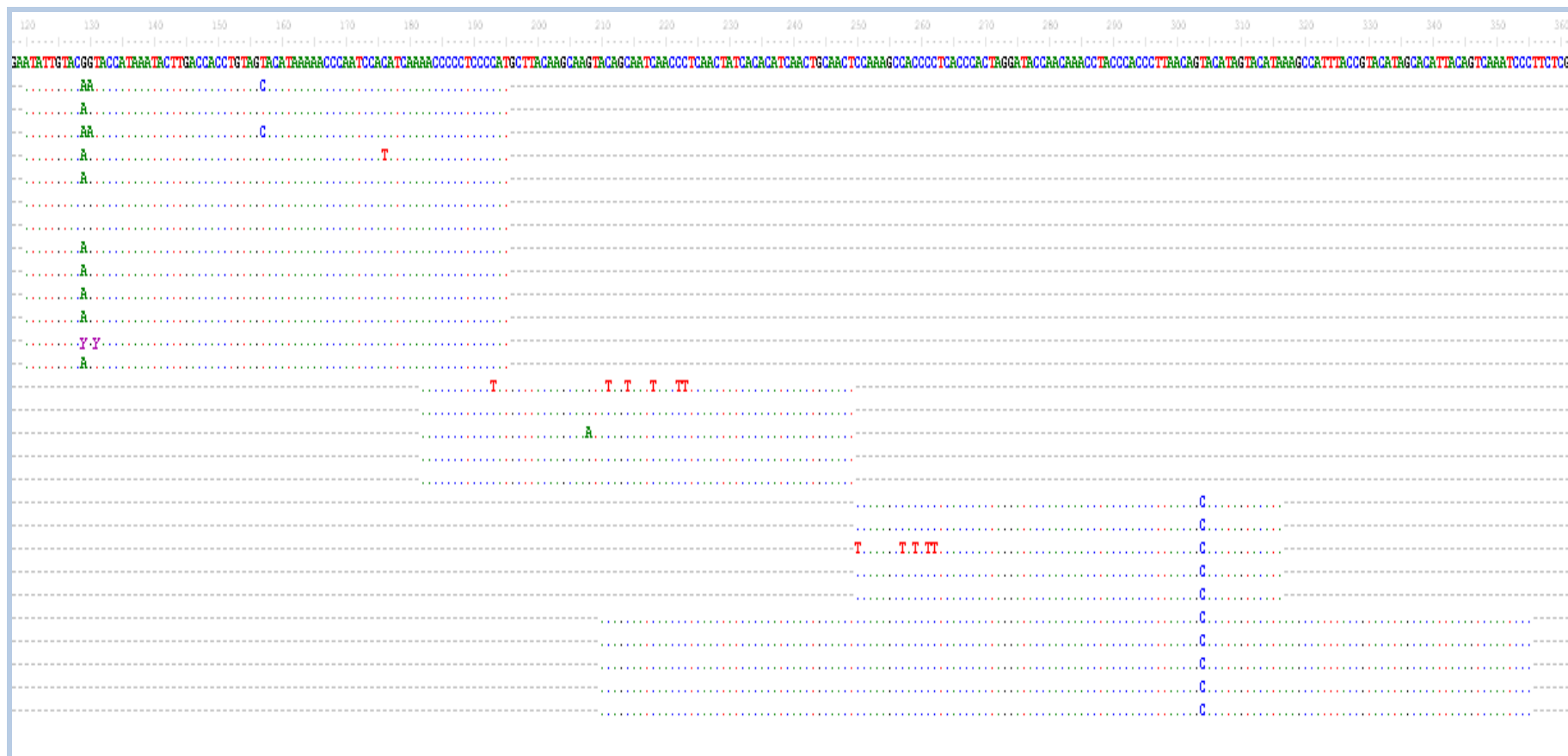
Załącznik 20. Okres rzymski - nr próby 61/61b, osobnik Karczyn ob.353 PET 30/580.



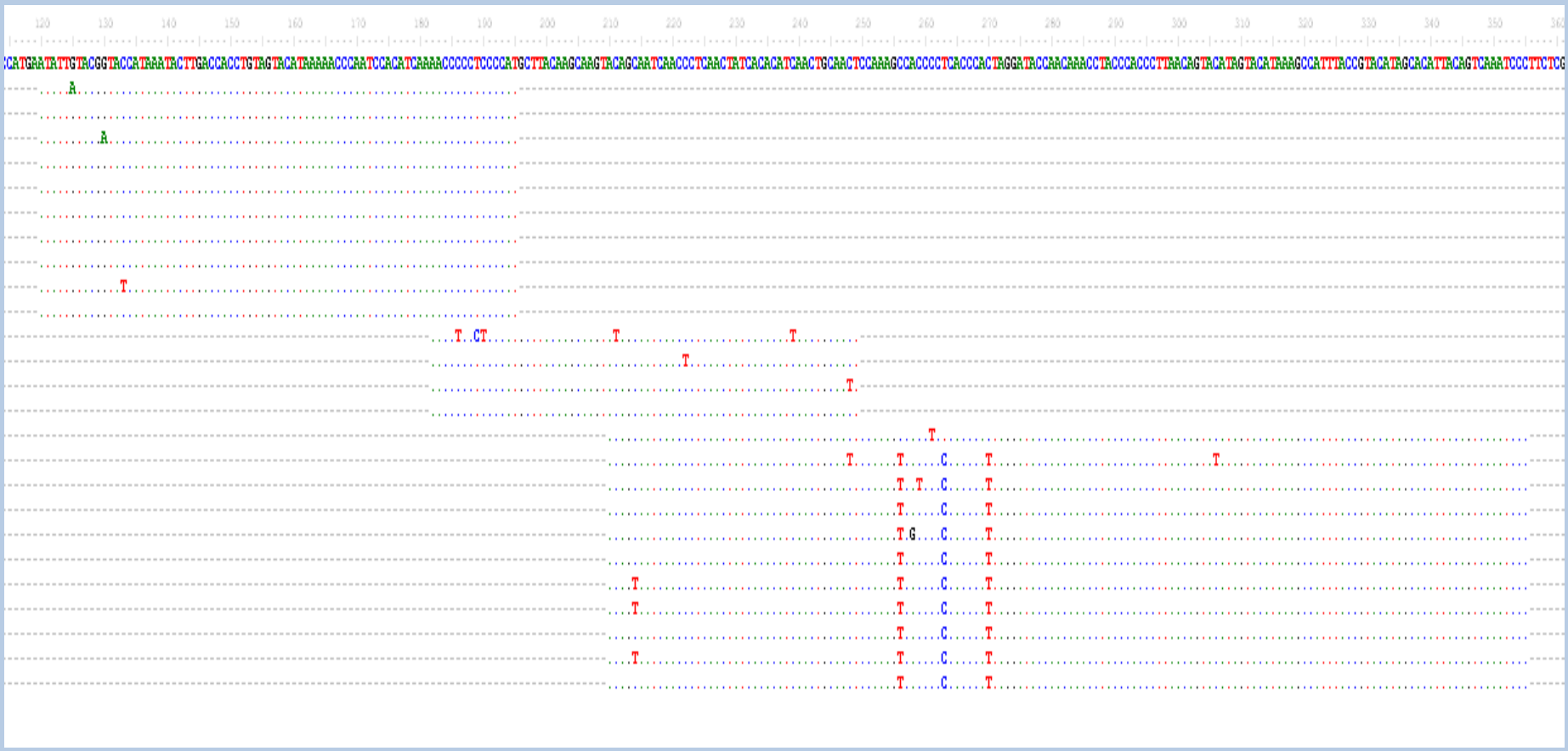
Załącznik 21. Okres rzymski - nr próby 69/69b, osobnik Karczyn PET 30/148 ob. 157.



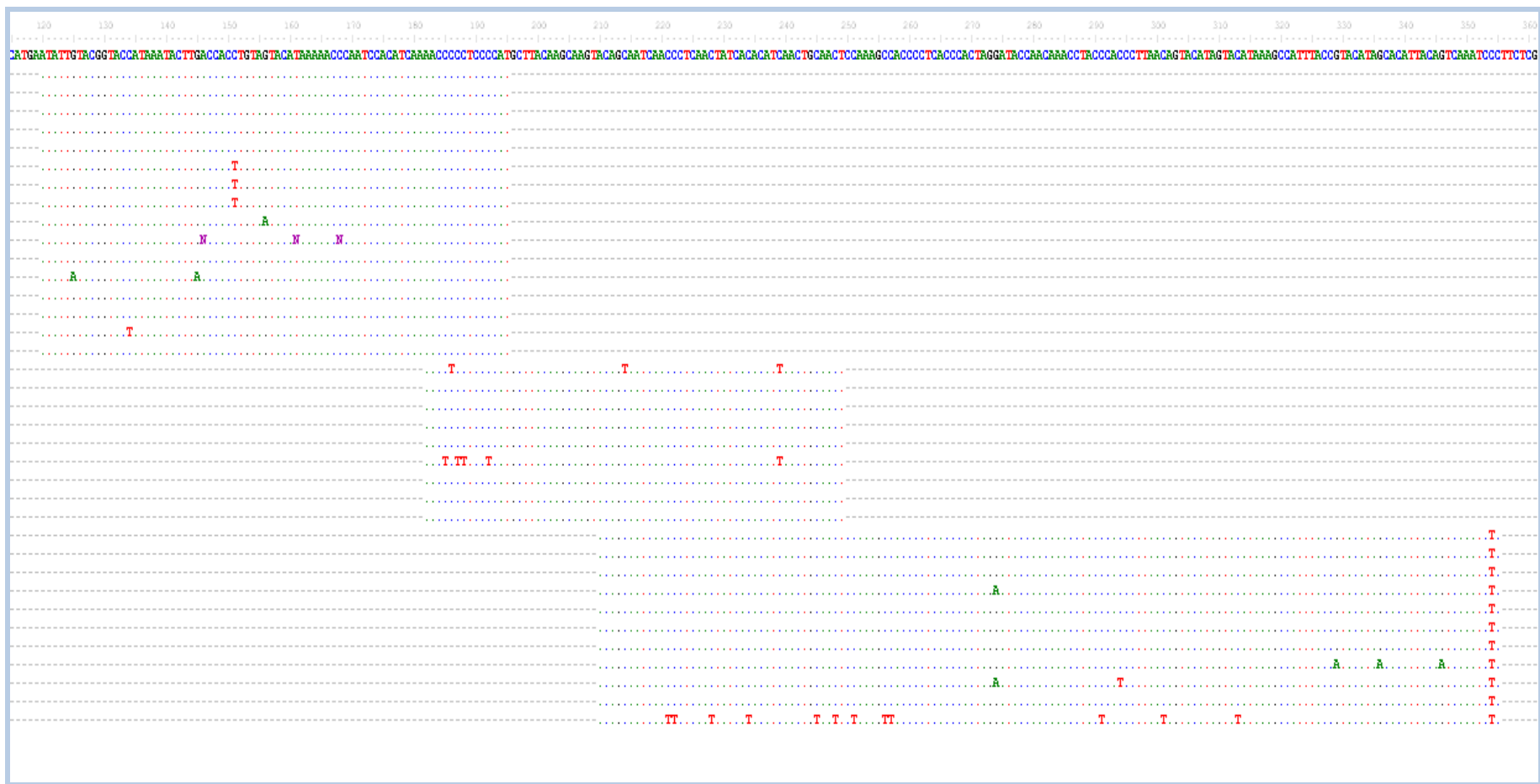
Załącznik 22. Okres rzymski - nr próby 49/49b, osobnik Gąski 18 ob. 23234 na NE od ob. 566.



Załącznik 23. Okres rzymski - nr próby 50/50b, osobnik Gąski 18 ob. 58.



Załącznik 24. Średniowiecze - nr próby 4/4b, osobnik Cedynia 269.



Załącznik 25. Średniowiecze - nr próby 5/5b, osobnik Cedynia 02.



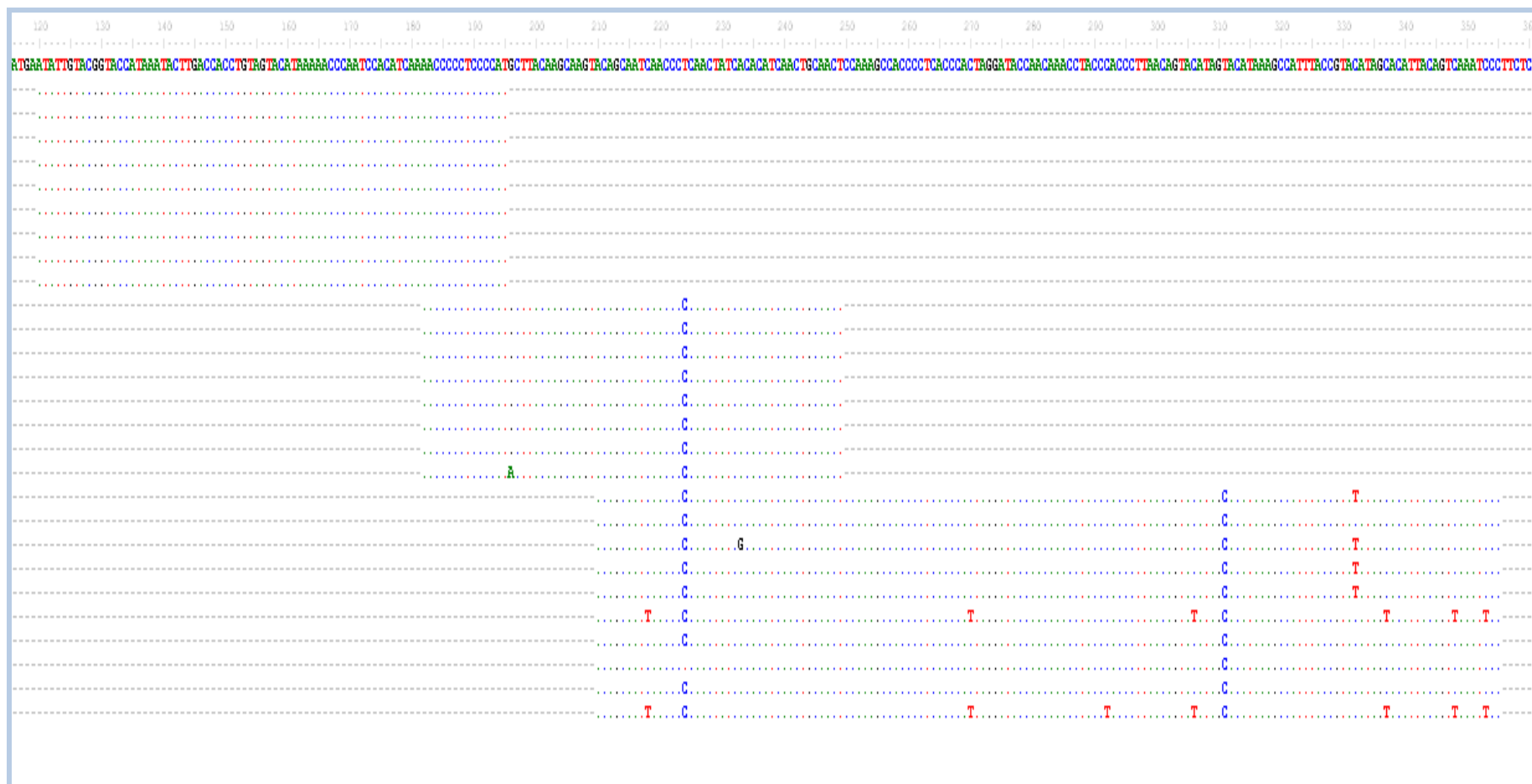
Załącznik 26. Średniowiecze - nr próby 6/6b, osobnik Cedynia 1008.



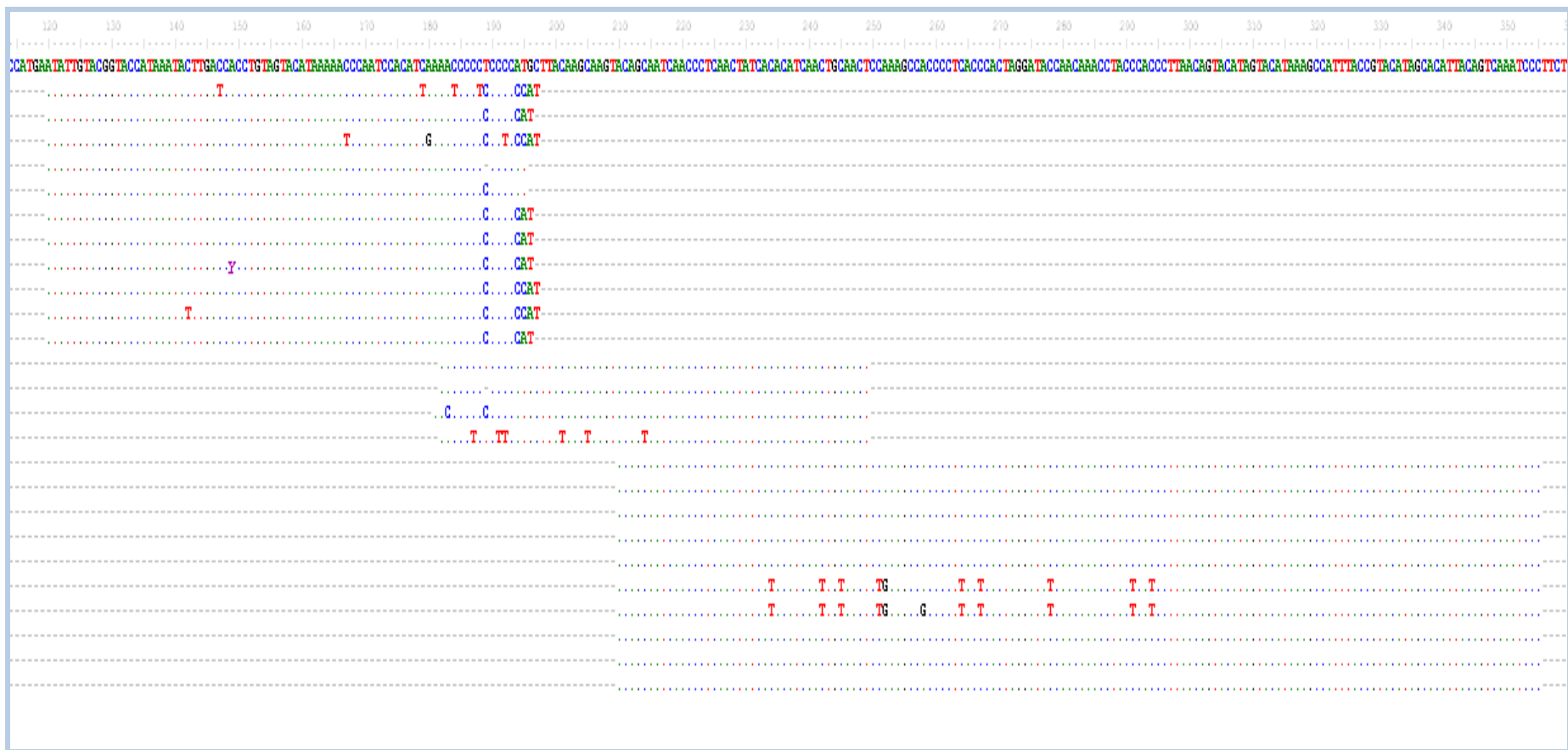
Załącznik 27. Średniowiecze - nr próby 11/11b, osobnik Cedynia 67.



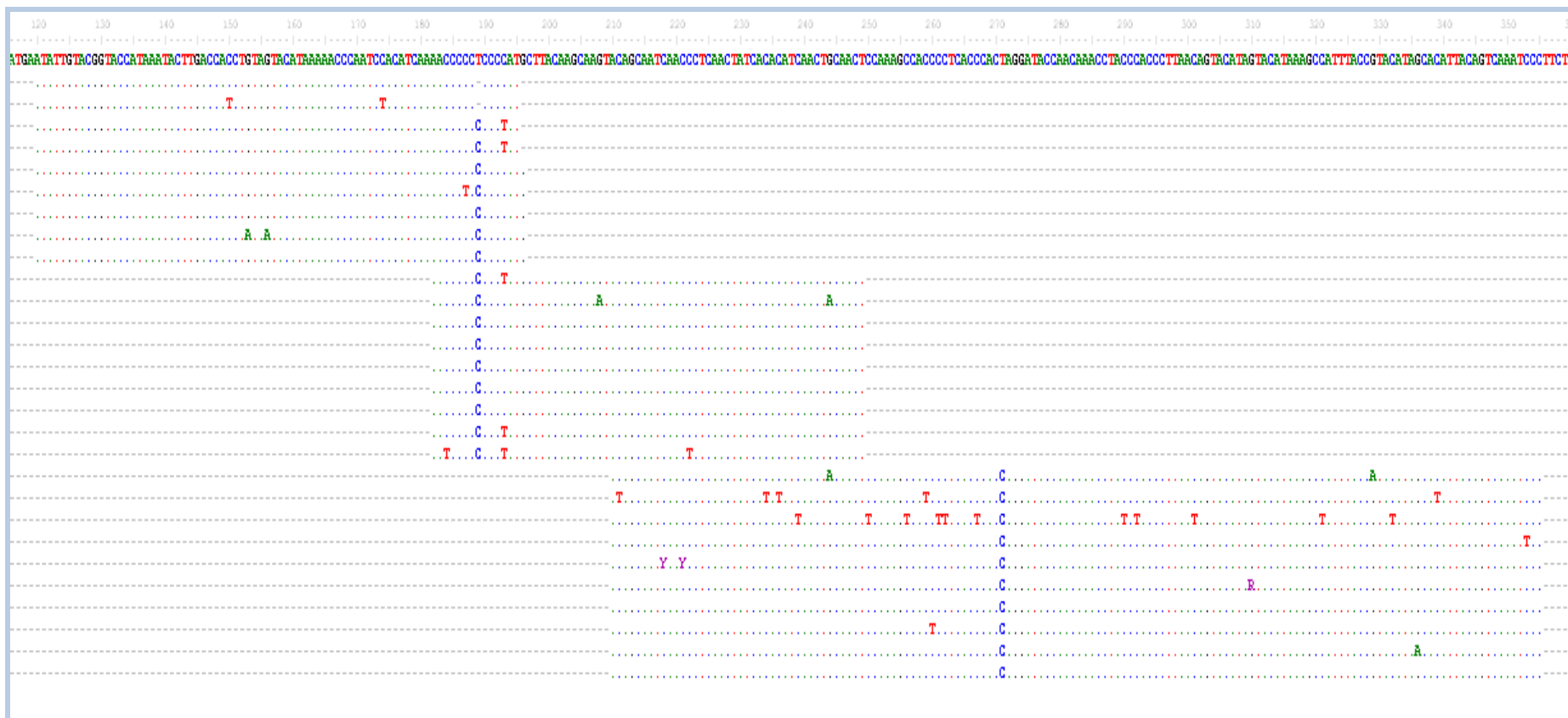
Załącznik 28. Średniowiecze - nr próby 32/32b, osobnik Cedynia 119.



Załącznik 29. Średniowiecze - nr próby 37/37b, osobnik Cedynia 645.



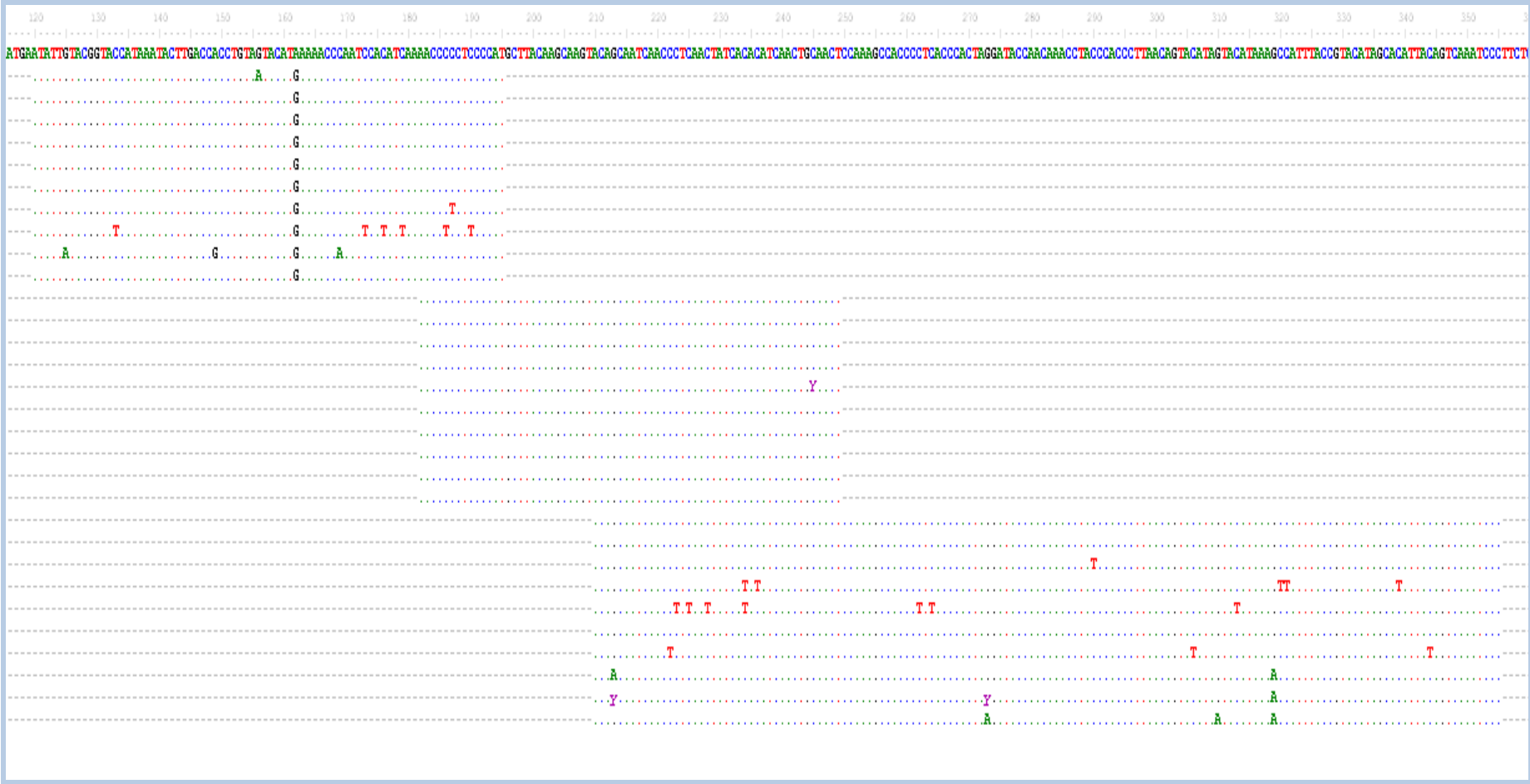
Załącznik 30. Średniowiecze - nr próby 38/38b, osobnik Cedynia 615.



Załącznik 31. Średniowiecze - nr próby 39/39b, osobnik Cedynia 936.



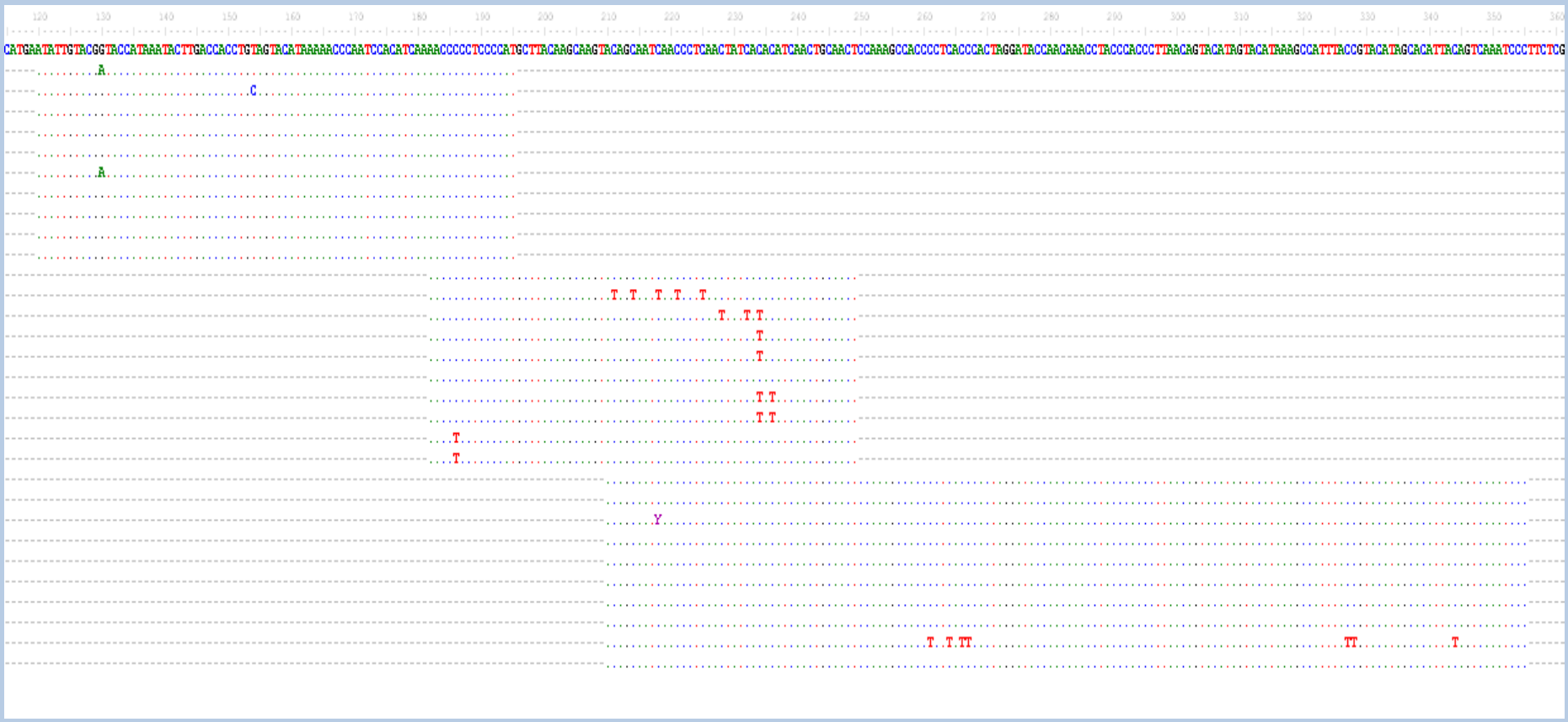
Załącznik 32. Średniowiecze - nr próby 42/42b, osobnik Cedynia 805.



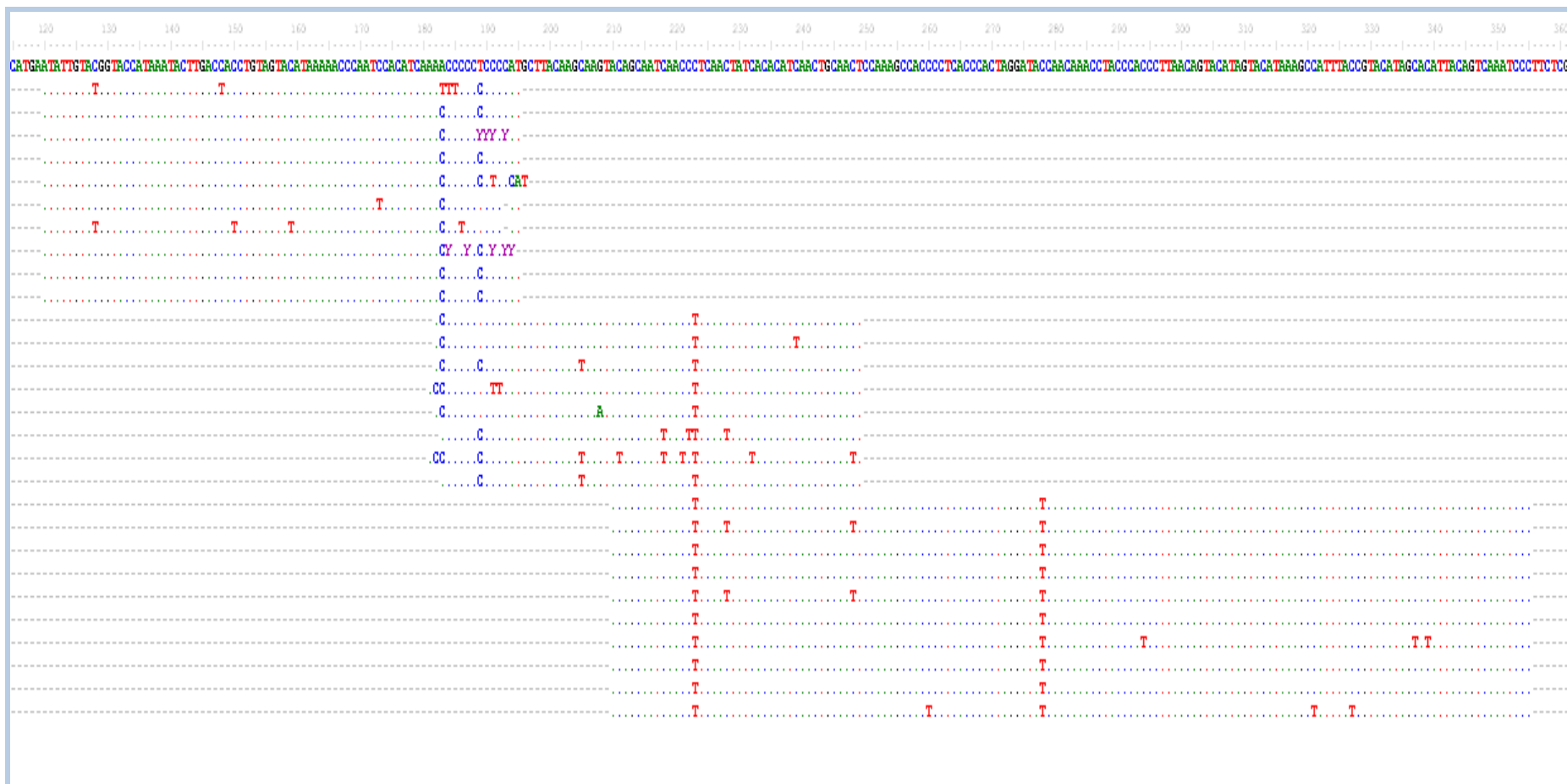
Załącznik 33. Średniowiecze - nr próby 43/43b, osobnik Cedynia 695.



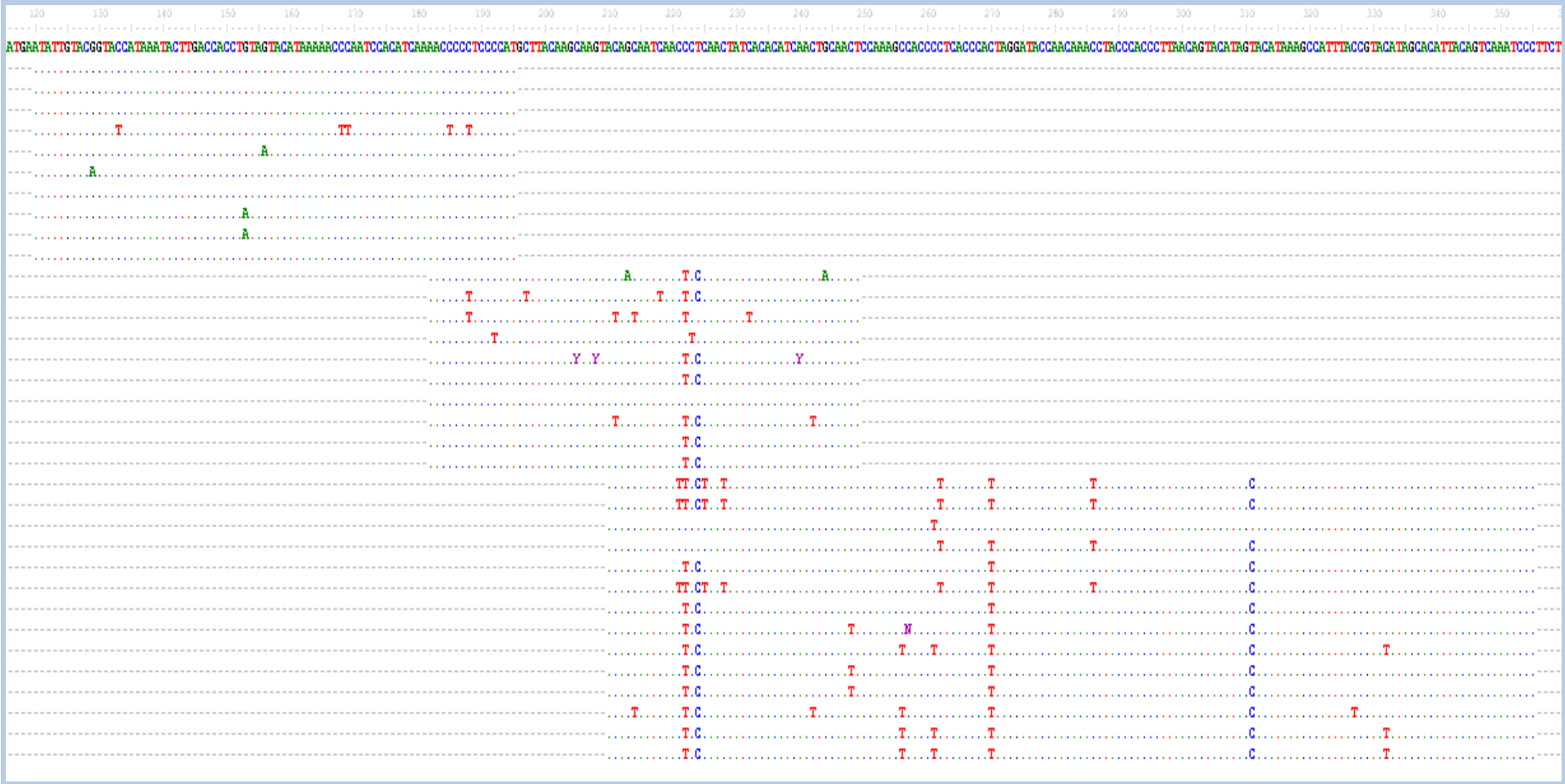
Załącznik 34. Średniowiecze - nr próby 52/52b, osobnik Cedynia 323.



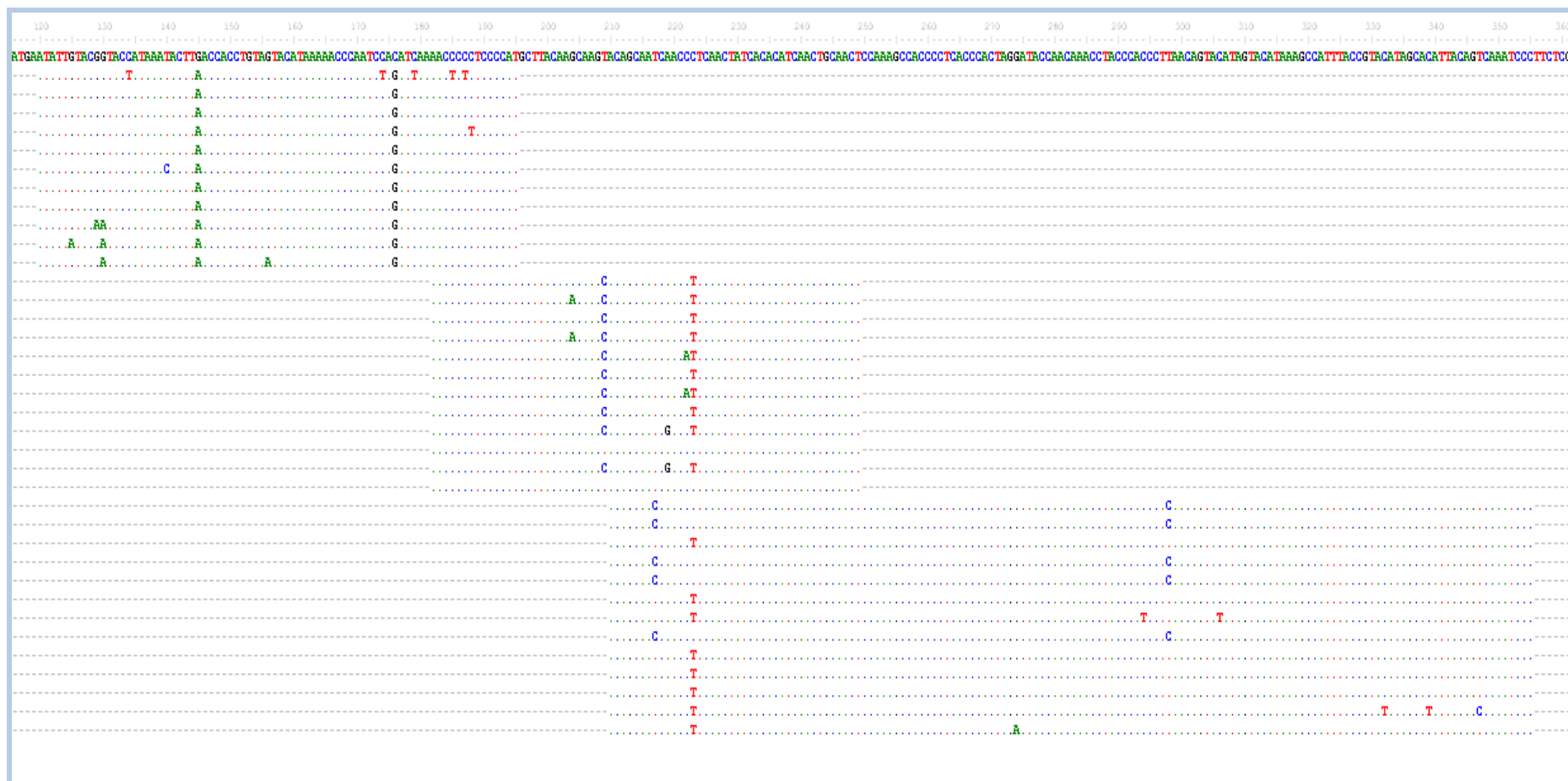
Załącznik 35. Średniowiecze - nr próby 53/53b, osobnik Cedynia 708.



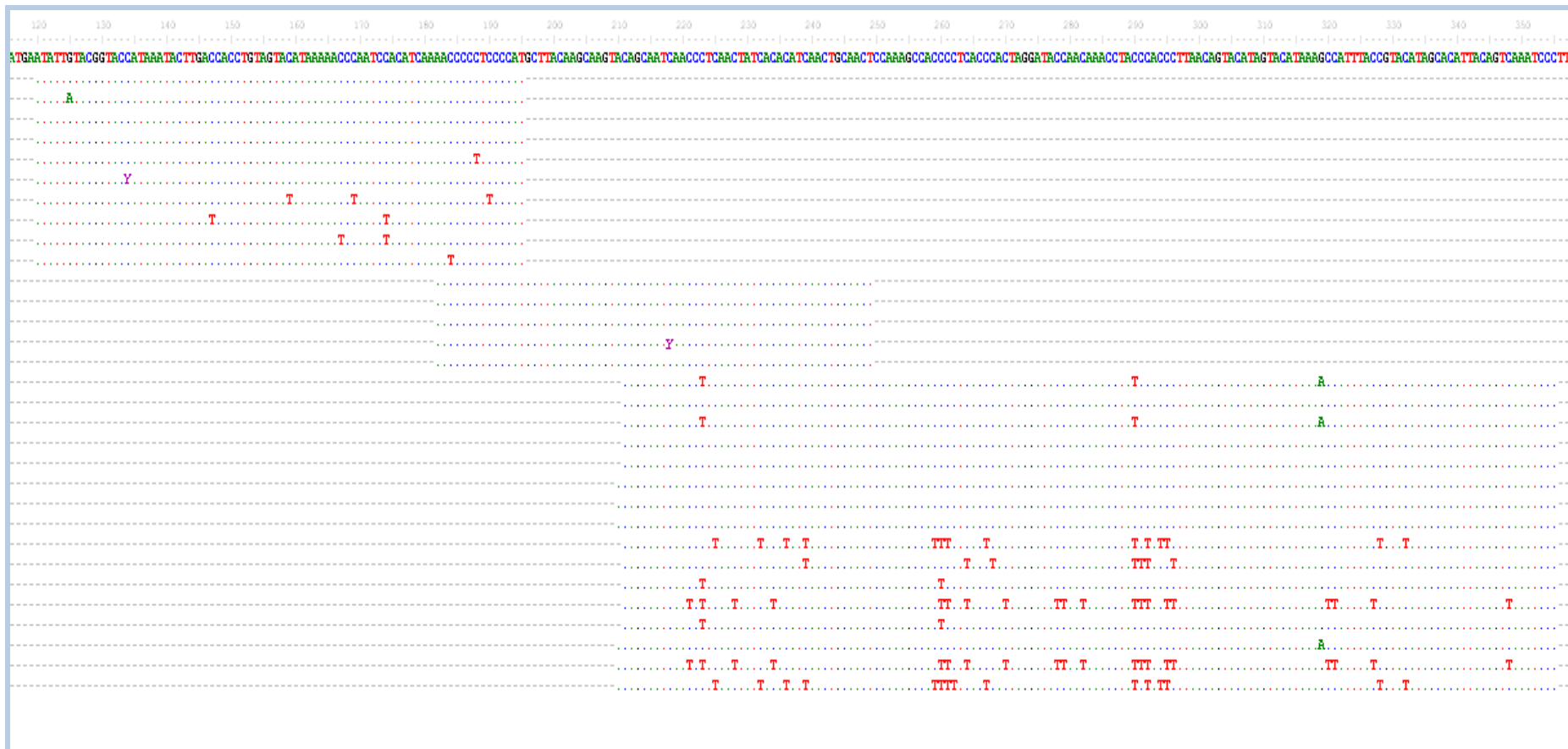
Załącznik 36. Średniowiecze - nr próby 54/54b, osobnik Cedynia LX 19.



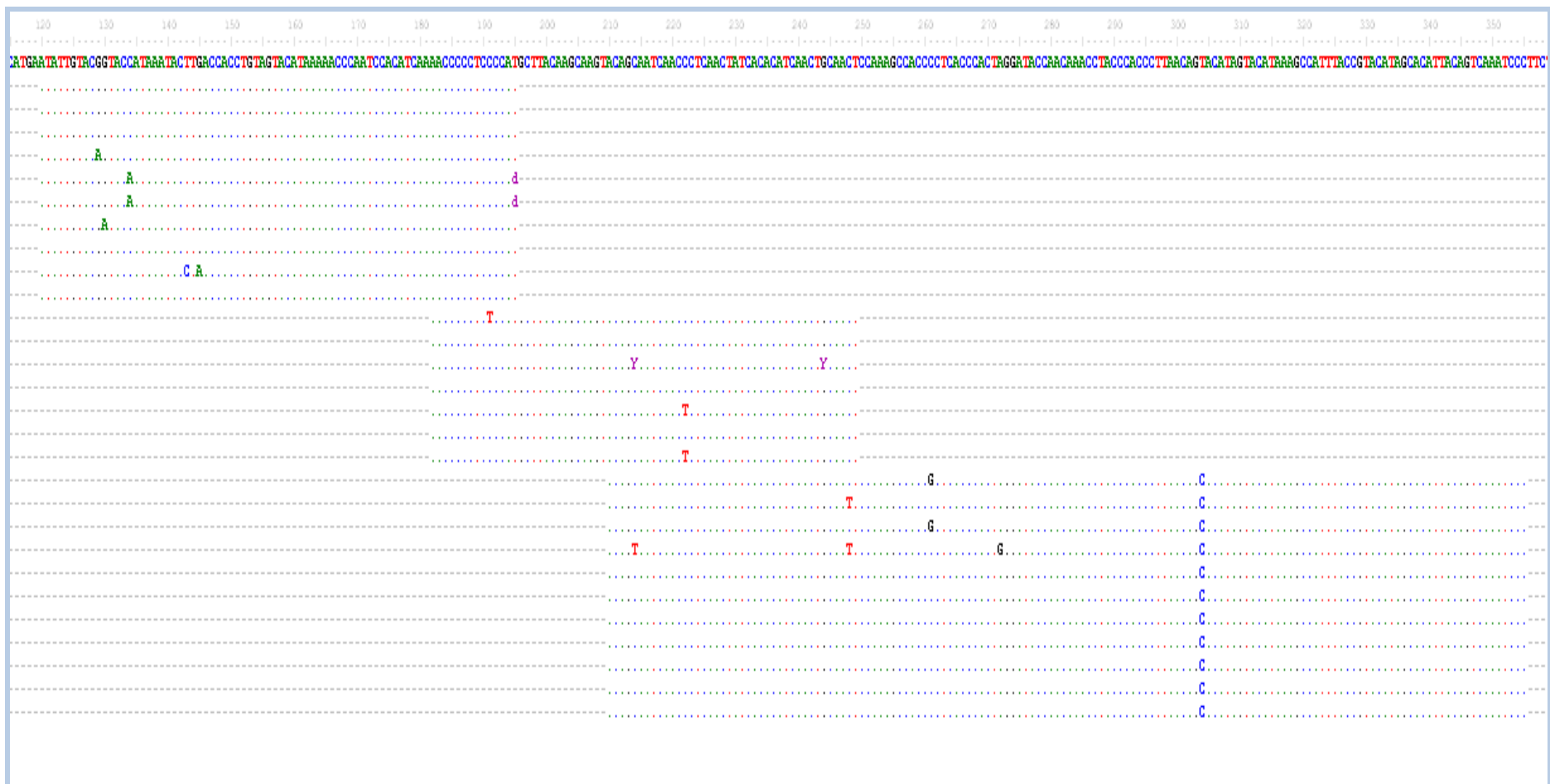
Załącznik 37. Średniowiecze - nr próby 55/55b, osobnik Cedynia 773.



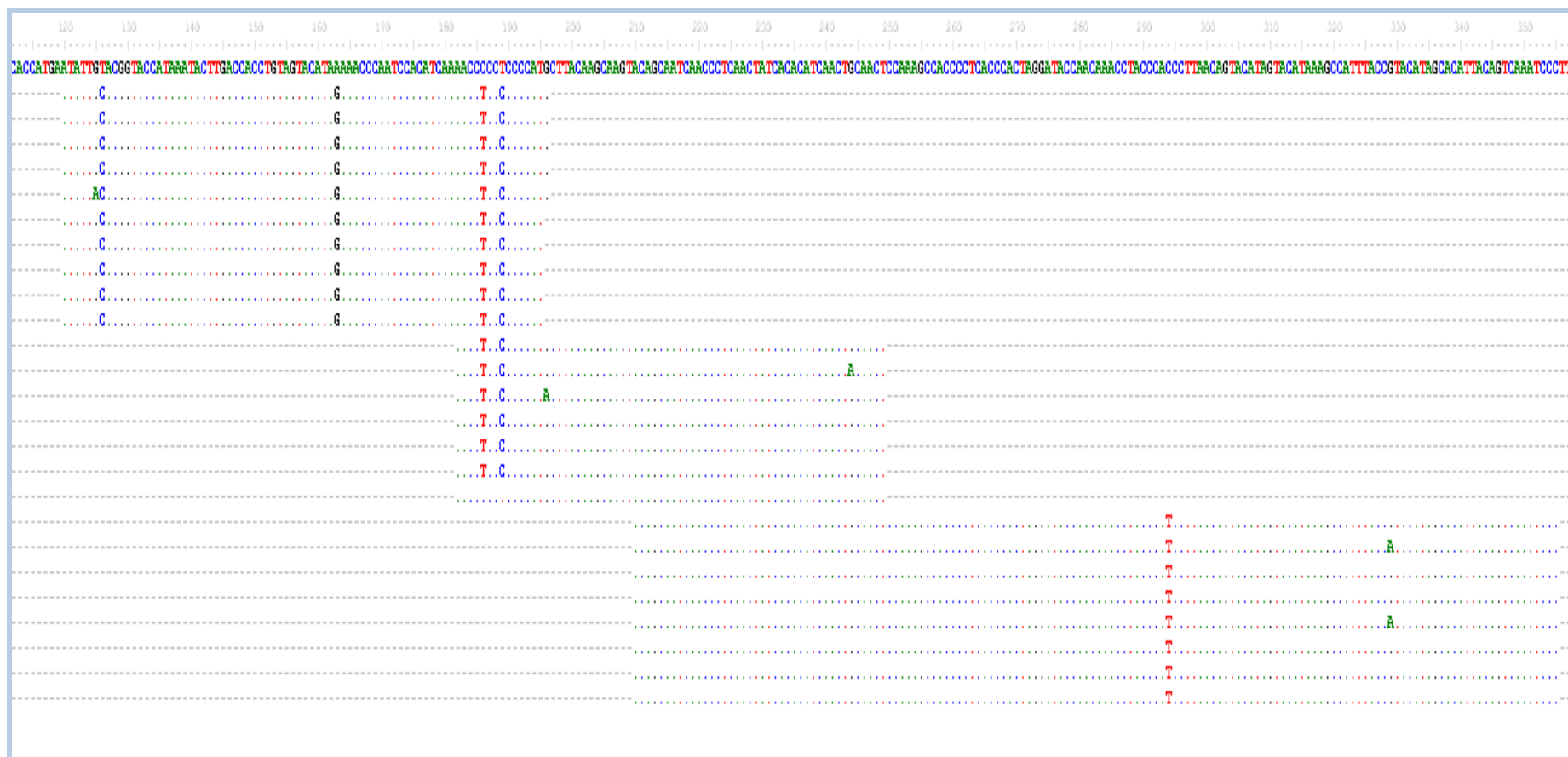
Załącznik 38. Średniowiecze - nr próby 56/56b, osobnik Cedynia 172.



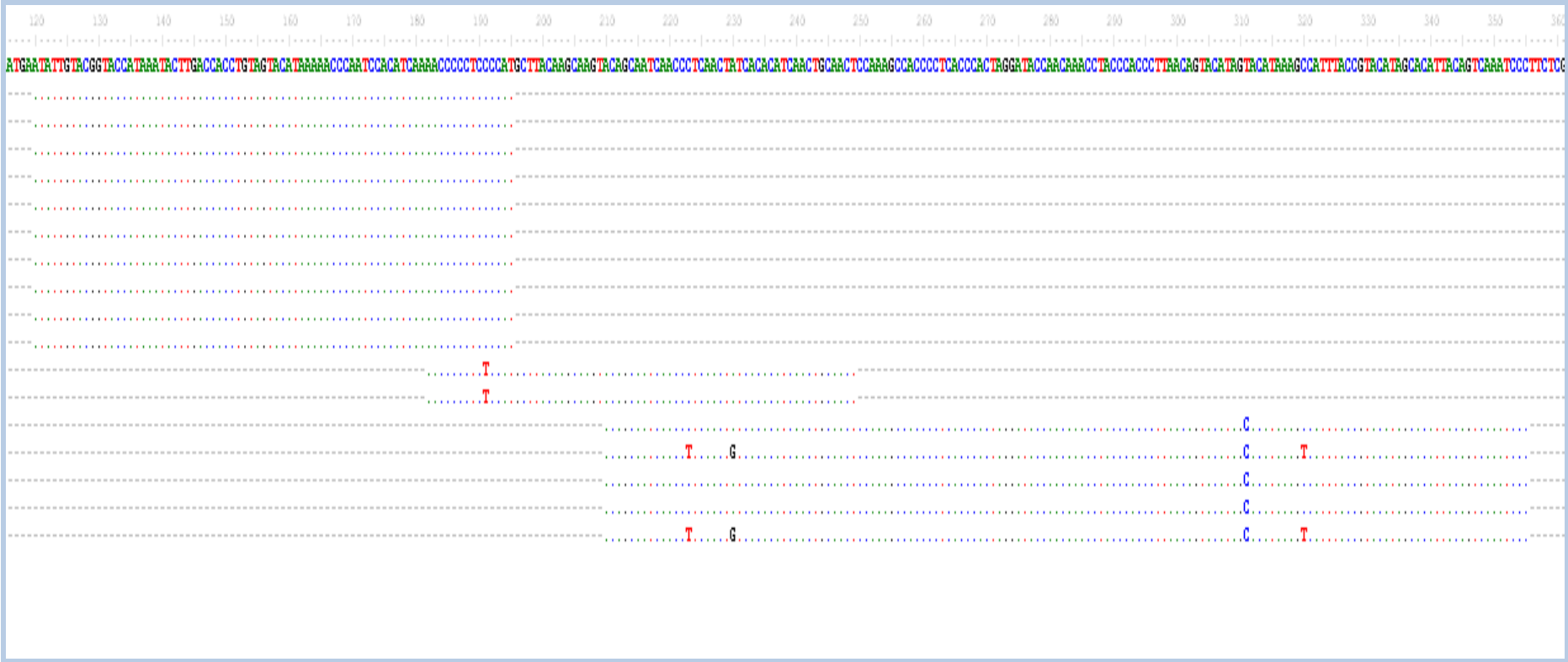
Załącznik 39. Średniowiecze - nr próby 16/16b, osobnik Lednica/Dzieskanowice 9/92 adult.



Załącznik 40. Średniowiecze - nr próby 68/68b, osobnik Lednica czaszka female "10".



Załącznik 42. Średniowiecze - nr próby 66/66b, osobnik Lednica male "5".



Załącznik 43.Średniowiecze - nr próby 18/18b, osobnik 1554 Lednica/Dzieskanowice.

