

内蒙古凉城县春秋时期古代马线粒体 DNA 分析

蔡大伟¹, 曹建恩², 陈全家¹, 韩璐³, 周慧^{1,3}, 朱泓¹

(1 吉林大学边疆考古研究中心考古 DNA 实验室, 长春, 130023; 2 内蒙古自治区文物考古研究所, 呼和浩特, 010010; 3 吉林大学生命科学学院, 长春, 130023)

摘要: 为了揭示中国现代家马的起源, 我们分析了来自内蒙古凉城县小双古城和板城遗址春秋时期 11 个古代马线粒体 DNA。我们成功地获得了全部 11 个样品的古 DNA 序列, 为了进一步分析中国古代马与现代家马的母系遗传关系, 我们从“基因银行”里选取了东亚、中亚、近东、欧洲等地的代表性家马品种作为比对序列构建了系统发育网络。系统发育网络图显示 11 个中国古代马分布在 5 个现代家马线粒体 DNA 世系中, 暗示中国古代马具有广泛的母系来源, 并且对现代家马基因池的形成具有重要贡献。中国家马的起源比以前想象的要复杂, 可能既有本土起源的因素, 也受到外来家马线粒体 DNA 基因流的影响。

关键词: 线粒体 DNA; 家马; 系统发育网络; 世系

中图分类号: K871 **文献标识码:** A

1. 前言

2003 年 5 月至 10 月间, 内蒙古文物考古研究所对位于凉城县境内岱海南岸的小双古城墓地和北岸的板城墓地进行了抢救性考古发掘。

小双古城墓地面积很小, 占地仅 3000 平方米, 清理墓葬 16 座。墓穴底部放置殉牲的马、牛、羊头骨及蹄骨, 头骨均正置, 吻部朝前, 蹄骨散放于头骨之间。其中羊头骨最多, 马、牛头骨较少。根据墓葬的性质, 陪葬的器物, 推测此墓地的年代为战国早期^[1]。

板城墓地占地面积 15000 平方米, 共清理墓葬 67 座。除被破坏的墓葬外, 墓穴前部填土中均见殉牲, 种类有马、牛、羊、狗的头骨和蹄骨。动物头骨多下颌朝上摆放, 头向与人骨一致, 马、牛等大型动物的头骨置于前部, 羊、狗的头骨放在后边, 蹄骨散落于其间, 推测该墓地年代属春秋晚期^[1]。

受内蒙古文物考古所曹建恩先生委托, 吉林大学边疆考古研究中心考古 DNA 实验室对两处遗址出土的马骨进行了线粒体 DNA (mtDNA) 分析, 现将结果报告如下。

2. 材料和方法

2.1 样品的采集和处理

样品是由内蒙古文物考古所曹建恩先生提供, 一共是 11 个牙齿标本, 其中 7 个来自板城墓地(实验编号 LB1—6), 4 个来自小双古城墓地(实验编号 LS1—4)。首先用毛刷清理样品表面的灰尘和泥土, 紫外线照射 30 min, 用钻头 (Strong 90) 打磨骨样表面, 进一步除去骨表面的杂质以及外源 DNA (重复 3 遍打磨掉 2—3 mm 厚), 液氮中保存过夜, 第二天, 将样品放入球磨机的磨碗中打磨成骨粉, 分装成 2 g/管, -20℃ 冷冻保存。

2.2 古 DNA 抽取、扩增和测序

每个样品取 2 g 骨粉, 按照杨东亚等人的方法进行古 DNA 抽提^[2]。利用一对套叠引物扩增 300 bp 的 mtDNA 控制区片段 (位点 15473-15772)^[3]。PCR 扩增产物通过 2% 琼脂糖 (Biowest, German) 凝胶电泳检测, 用 QIAEX[®] II GEL Extraction Kit 胶回收试剂盒 (QIAGEN, Germany) 纯化 PCR 产物。使用 ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer 全自动遗传分析仪 (Applied Biosystems, USA) 通过 Dyeprimer 试剂盒进行测序反应。

2.3 数据分析

古马 DNA 序列被截取到位点 15494—15755 (262 bp) ，利用 Clustal X 1.83 软件进行序列对位比对，确定变异位点及单倍型。利用 NetWork 软件构建系统发育网络。

3. 结果

3.1 古马 mtDNA 序列变异

利用两对套叠引物从 11 个样品中成功的扩增出 300 bp 的线粒体控制区序列。所有的抽提和扩增的空白对照均为阴性，表明在骨样的抽提和扩增过程中无可观察到的污染发生。在所得到的 11 个序列中，共发现 11 个单倍型，与参考序列 X79547 相比，一共有 35 个变异位点，全部是转换，没有颠换发生(表 1)。

Haplotypes	Variable nucleotide positions	Samples
	1111111111111111111111111111111111111	
	55555555555555555555555555555555555	
	4445555555555555666666666666667777777	
	999223344899999000011345566600122234	
	45616480255678123456590906739803670	
X79547	TTAGTCAACGAAATTCTGAACAATAGATCCGCGTA	
LB01	. C TA . G . T . . . T . G . A . C . A . . .	LB01
LB02	. C . C . G . A T G TA	LB02
LB03	. C A . . . CT A	LB03
LB04	CCG . . T TC . . . G A	LB04
LB05	. C CT A	LB05
LB06	. C T A	LB06
LB07	. C G . T . A GC . A	LB07
LS01	. C T . G . T . . . T . G . A . C . A . . .	LS01
LS02	. C A . . . T A	LS02
LS03	. C C . T . G . . C . C . A	LS03
LS04	. C T C . A . . G	LS04

表 1 古马 mtDNA 序列变异

3.2 系统发育网络

Vila^[4]等发现现代家马的世系具有广泛的起源，Jansen^[5]和McGahern^[6]等将现代家马划分为7个 mtDNA 谱系 (A, B, C, D, E, F, G)，其中几个较大的谱系之中又可以进一步划分为多个亚簇，谱系A共有7个亚簇A1—A7，谱系B和C各有2个亚簇B1—B2和C1—C2，谱系F和D各有3个亚簇F1—F3和D1—D3。谱系E和G是相对较小，没有进一步划分亚簇。为了进一步分析古马和现代家马的母系遗传关系，我们从GeneBank上选取了东亚、中亚、近东、欧洲等地的代表性家马品种作为比对序列，此外我们还选择了一些其它遗址（哈萨克斯坦BereI遗址、俄罗斯Yakutsk遗址、韩国Jeju遗址、Alaska遗址、瑞典南部几个考古遗址）出土的古马序列以及普氏野马的序列，共458个序列构建单倍型的系统发育网络（图1），我们发现11个凉城县古马的序列分布在5个世系中（A, C, D, F, G）及其亚簇中，其中LB5, LS3聚集在A1簇，LS1和LB6聚集在A6簇；LB1聚集在D1簇；LB4和LB7聚集在C2簇；LB3聚集在F1簇。普世野马全部分布在世系A的亚簇A2中，并没有古代马和现代马聚集

其中。

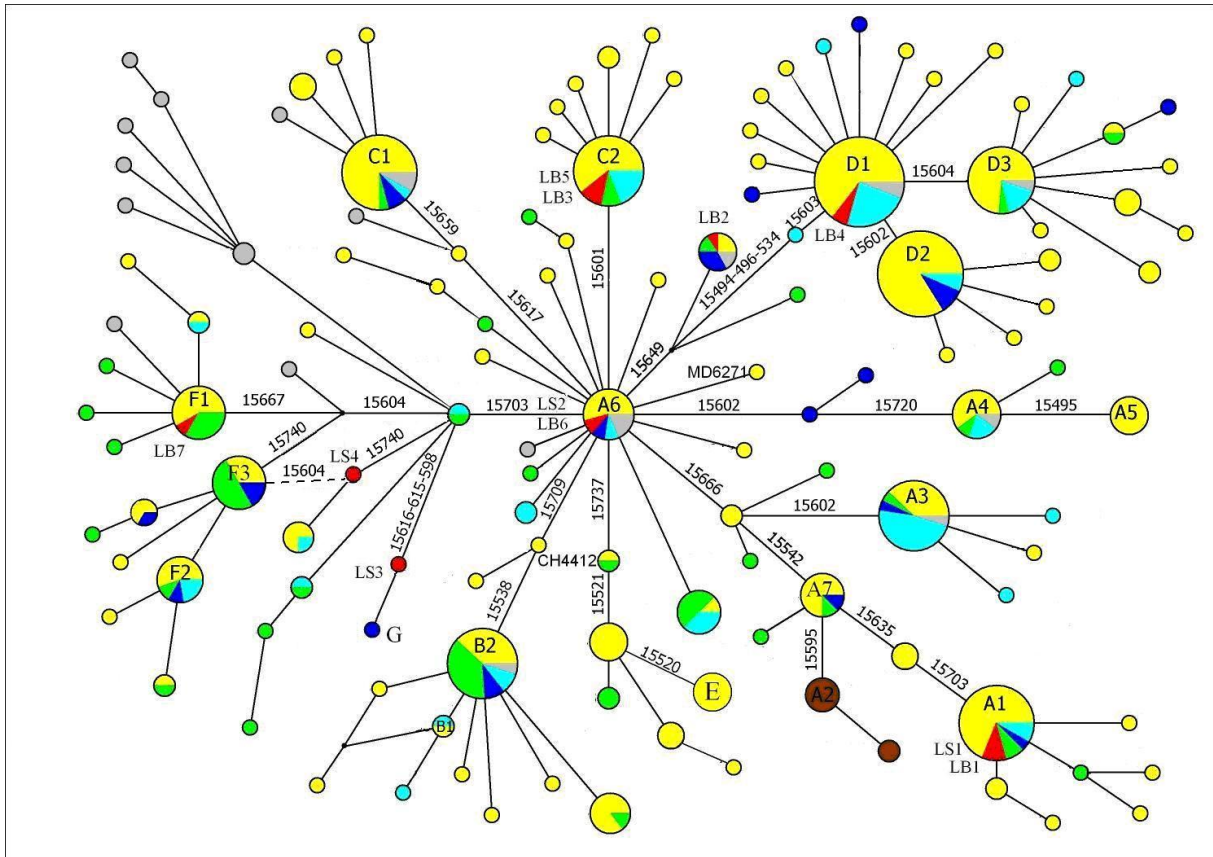


图 1 458 匹家马、野马、古马的系统发育网络图

图中的圆圈代表 mtDNA 的单倍型，圆圈的大小与单倍型的数量成正比，圆圈中的字母代表聚簇的名称。红色代表板城乡和小双古城遗址古马，灰色代表从 GeneBank 获得的古马，黄色代表欧洲家马，绿色代表东亚家马，蓝色代表中亚家马，浅蓝色代表近东家马，褐色代表普氏野马。

4. 讨论

在人类漫长的历史中，马的驯化是一个划时代的事件，家马的出现极大地提高了人类运输和战争能力，骑马民族的扩张活动导致人类的迁徙、种族的融合、语言和文化传播^[7]。然而，马是何时何地驯化的仍旧是个谜。在中国，家马和马车是商代晚期（大约 3000 年前）突然大量出现的，在河南安阳殷墟、陕西西安老牛坡、山东滕州前掌大等商代晚期的遗址中，发现了很多用于殉葬和祭祀的马坑和车马坑，在墓室中也出现了马骨^[8]。然而晚商之前有关马的考古材料非常少，虽然有零星的马骨记录，但数量极少，材料又很破碎，很难断定是家马还是野马，早期驯化阶段的缺失和商代晚期家马的“突然”出现，使中国驯马历史显得扑朔迷离。而且，关于中国家马的起源形成了两个截然不同的假说，一种观点认为，马和马车是从黑海和里海之间的中亚草原地带传入中国的，中国西北的甘青地区有可能是中亚家马进入中原地区的一个驿站^[9]；另一个观点认为，尽管中亚和西亚地区考古发现的家马较早，但中国内地的家马不一定是从西方或北方传来的，言外之意，中国是一个独立的马起源中心，普世野马可能是中国家马的野生祖先^[10-14]。

春秋时期是一个家马迅速发展的时期，战车和战马盛行，马已经成为军事上的首要动力。在家畜中，此时马已经成为六畜之首。内蒙古地区地处欧亚大陆草原地带，是蒙古马起源与驯化的中心地区。据陈全家先生观察，小双古城和板城墓地出土的古马，在颅骨形态上与小型的蒙古马十分接近。存在于古生物遗骸中的古 DNA 序列，可以直接反映古代群体中的遗传信息，是人们探寻漫长

年代中生物种群的系统发生与演变规律的重要资料^[15]。因此，我们希望用古 DNA 技术分析这些古马的 DNA，为揭示中国家马的起源提供一个有价值的线索。

本研究分析了古马的 mtDNA 世系的分布情况，mtDNA 是真核细胞内较为简单的 DNA 分子，具有母系遗传、极少发生重组、进化速率快等特点，作为动物进化研究的一类重要标记已经被广泛的用于家马的起源研究。本研究中，11 个古马的 mtDNA 序列落在现代家马的七个线粒体世系中的五个，其中一些序列分享世系亚簇的建立者单倍型，表明这些古马对现代家马基因池的形成具有重要的贡献。这些古马所在的谱系显示了一定的地理分布趋势，谱系 F 在亚洲，尤其是东亚家马中有着较高的分布频率，谱系 D 在伊比利亚半岛的家马中有着最高的分布频率。这一结果反映了中国家马具有广泛的母系来源，中国家马的起源比以前想象的要复杂，可能既有本土起源的因素，也有外来基因流入的因素。至于，中国家马的野生祖先问题，我们发普氏野马独自分部在 A2 亚簇中，并没有古马、甚至任何其他现代马聚集其中，这表明 A2 是普氏野马所特有的谱系，鉴于本研究的 DNA 数据较少，我们尚不能明确普氏野马与中国古代马的关系。

5. 结论

我们分析了内蒙古凉城县两个春秋时期遗址出土古马的线粒体 DNA，我们发现中国古代马的母系来源十分广泛，表明在驯化的过程中，有来自不同地域的线粒体 DNA 基因流进入，中国家马的起源比以前想象的要复杂，可能既有本土起源的因素，也有外来的因素。普氏野马与中国古代马的关系尚有待于进行大规模的古马线粒体 DNA 分析来确定。

附记：该成果得到国家基础科学人才培养基金资助项目（批准号：J0030094）和教育部重点研究基地项目（批准号：05JJD780004）资助。

本研究的马骨标本由内蒙古考古研究所曹建恩先生提供，吉林大学边疆考古研究中心的陈全家负责进行了形态学鉴定，作者在此并致谢忱。

参考文献

- [1] 曹建恩：《内蒙古中南部商周考古的新进展》，待刊。
- [2] Yang DY, Eng B, Wayne J, et al., Technical Note: improved DNA extraction from Ancient Bones using silica-based spin columns. *American Journal of Physical Anthropology*, 1998. 105: 539-543
- [3] 蔡大伟、韩璐、谢承志等：《内蒙古赤峰地区青铜时代古代马线粒体 DNA 分析》，《自然科学进展》2007 年 17（3）：385-389 页。
- [4] Vila C, Leonard JA, Gotherstrom A, et al, Widespread Origins of Domestic Horse Lineages. *Science*, 2001. 291(5503): 474-477.
- [5] Jansen T, Forster P, Levine MA, et al, Mitochondrial DNA and the origins of the domestic horse. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002. 99(16): 10905-10910.
- [6] McGahern AM, Edwards CJ, Bower MA, Heffernan A, Park SDE, et al. 2006. Mitochondrial DNA sequence diversity in extant Irish horse populations and in ancient horses. *Animal Genetics* 37:498-502
- [7] Anthony DW. The "Kurgan culture," Indo-European origins, and the domestication of the horse: a reconsideration. *Curr Anthropol* 1986. 27: 291-313.
- [8] 陈星灿：《也谈家马的起源及其他》，《中国文物报》1999 年 6 月 23 日。
- [9] 袁靖，安家瑗：《中国动物考古学研究的两个问题》，《中国文物报》1997 年 4 月 27 日。

- [10] 王宜涛:《也谈中国马类动物历史及相关问题》,《中国文物报》1998年8月12日.
- [11] 美, 斯坦利丁·奥尔森, 殷志强译:《中国北方的早期驯养马》,《考古与文物》1986年1期.
- [12] 日, 吉崎昌一, 曹兵海、张秀萍译:《马和文化》,《农业考古》,1987年2期.
- [13] 王志俊, 宋澎:《中国北方家马起源问题的探讨》,《考古与文物》2001年2期,25-30页.
- [14] 张春生:《野马、家马及东亚养马中心》,《农业考古》2004年1期,252-254页.
- [15] 常娥:古DNA分析技术在考古学研究中的应用,《文物春秋》2004年1期,22-31页.

Mitochondrial DNA analysis of horses excavated from Liangcheng County, Inner Mongolia, during the Spring and Autumn Period

Dawei Cai¹, Janen Cao², Quanja Chen¹, Lu Han³, Hui Zhou^{1,3}, Hong Zhu¹

(1. Ancient DNA Laboratory, Research Center for Chinese Frontier Archaeology of Jilin University, Changchun 130023; 2. Institute of Cultural and Historical Relics and Archaeology Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot 010010; 3. College of Life Science, Jilin University, Changchun 130023)

Abstract: In order to explore the origin of Chinese domestic horses, mitochondrial DNA (mtDNA) analysis was carried out on 11 horses recovered from Xiaoshuangguchen and bancheng archaeological sites in Liangcheng County, Inner Mongolia, during the Spring and Autumn Period. Ancient DNA sequences were successfully retrieved from all samples. Combining mtDNA D-loop sequences from GenBank representing different breeds from East Asia, Central Asia, Near East and Europe, we constructed a phylogenetic network to investigate the relationship between ancient and modern horses. The phylogenetic network showed that the 11 horses were distributed into five lineages (A, C, D, F, G), suggesting that the Chinese ancient horses have the widespread origins and contributed to the gene pool of modern domestic horses. We think that the origin of Chinese domestic horses was more complex than previously thought. Both the native origin and external mtDNA gene flow input have been probably involved in the domestication of Chinese domestic horses.

Keywords: mitochondrial DNA, domestic horse, phylogenetic, lineage

收稿日期: 2008-05-25

基金项目: 国家基础科学人才培养基金资助项目资助(批准号: J0030094)

作者简介: 蔡大伟, 男, 汉族, 吉林大学边疆考古研究中心讲师。