

吉林通化万发拨子遗址出土家猪线粒体 DNA 分析

蔡大伟¹, 孙洋¹, 汤卓炜¹, 王列斌², 周慧^{1,2}

(1. 吉林大学边疆考古研究中心, 长春, 130012;
2. 吉林大学生命科学学院, 长春, 130012)

[摘要]: 为了探讨中国家猪的起源, 对吉林通化万发拨子遗址出土的 10 个年代从新石器时代晚期到春秋战国时期的古代家猪遗骸进行了古 DNA 研究。利用 PCR 技术分别扩增并测序了线粒体 DNA 控制区 189bp 序列, 并进行了 DNA 数据分析。从不同时期的古代猪线粒体 DNA 序列上看, 万发拨子地区的猪在线粒体 DNA 母系遗传上存在连续性。为了进一步研究古代猪与现代猪的关系, 我们从 GenBank 中选择了中东、欧洲的家猪序列进行对比, 系统发育分析显示中国古代猪与中国现代家猪聚集在一起, 并且与欧洲和中东地区的家猪之间形成明显的分离。结合考古证据以及广泛分布的东北野猪亚种, 我们认为万发拨子地区古代居民可能从新石器晚期独立开展了猪的驯化。

[关键词]: 家猪 线粒体DNA 古DNA

中图分类号: K871 **文献标识码:** A

一、前言

猪在动物分类学上属于偶蹄目 (Artiodactyla)、猪次目 (Suina)、猪科 (Suidae)、猪属 (Sus)。家猪是中国新石器时期出现最早的家畜之一, 从古至今一直是人类必不可少的重要肉食资源。家猪 (*Sus domesticus*) 起源于野猪 (*Sus scrofa*), 驯化时间大约在距今 10000~8000 年前, 这一时期正是人类社会经济形态的由采集、渔猎向农耕、定居转变的关键阶段。此外, 野猪被驯化后, 其移动与人群的迁徙与扩散密切相关。因此, 家猪的驯化与农业文明的起源与扩散密切相关, 一直是考古学家关注的焦点。考古证据表明家猪可能有多个驯化地点, 东南欧、近东、中国被认为是 3 个主要的家猪驯化中心^[1]。在中国, 有关家猪的考古记录最早可以追溯到大约 8000 年前的河北省武安县磁山遗址, 该遗址出土有家猪的头骨、牙齿以及整猪骨架^[2]。在一些年代相近或稍晚的遗址如内蒙古敖汉旗兴隆洼、甘肃秦安大地湾、河南新郑裴李岗、浙江余姚河姆渡等遗址中也都发现了猪的遗骸, 其中有家猪, 也有野猪。从遗址的分布上来看, 这一时期的家猪主要分布在黄河中下游和长江中下游以及内蒙古东南部地区, 而这些地区恰恰是农业文化集中的地区。另一方面, 考虑到野猪在中国的广泛分布, 以及家猪的不易移动性, 暗示中国家猪极有可能是中国古代先民在不同地域各自驯化当地野猪而形成的。

目前, 进行家猪起源研究主要依靠传统的动物考古学分析方法, 通过骨骼和牙齿测量、形态观察、年龄结构统计、性别比例、定量分析、考古学文化现象分析、病理学观

察等方法,对出土猪骨遗骸进行分析,以判断是否为家猪^[3-5]。上述研究方法主要都是基于骨骼的形态变异,而这种变异归根结底是由于遗传物质DNA的变化所引起的。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。理论上,通过分析不同历史时期、不同地点古代家猪的DNA序列变化规律及其与中国现代家猪和野猪之间遗传关系,结合中国野猪亚种的地理分布特征,我们可以在分子水平上揭示中国家猪驯化历史。本研究以吉林通化万发拨子遗址出土的家猪遗骸为研究对象进行了古DNA分析,以期为中国家猪的起源研究提供有价值的线索。

二、材料与方法

1. 遗址概况及样品的采集

万发拨子(俗称“万发拨子”)遗址位于吉林省通化市郊金厂镇跃进村与环通乡江南村交界处,地理坐标为东经 $125^{\circ} 56' \sim 126^{\circ} 06'$,北纬 $41^{\circ} 40' \sim 41^{\circ} 41'$,地貌形态较为独特,西部为圆丘,东接平缓的漫岗山脊并与连绵的高山相连,形态近于俯卧的乌龟^[6]。遗址年代跨度较长,大致经历了新石器时代晚期、商周、春秋战国、西汉、魏晋等时期,是吉林省东南部鸭绿江中上游地区具有代表性的遗址之一,对于研究东北地区早期居民社会生活及古代民族尤其是高句丽的起源、发展具有重要意义。此外,该遗址出土了大量的动物遗骸,以马鹿、野猪、狍子和家猪等遗存为主,兼有狗、黄牛、水牛、马和鸡等家畜,为研究当地居民的生业模式及其对资源环境的利用提供了重要的实物资料^[7]。本研究选取新石器晚期、商周、春秋战国三个时期的10例猪的样本进行古DNA分析,骨骼的形态鉴定由汤卓炜先生完成,详见表1。

表 1 采集样本信息

序号	实验编号	考古编号	部位	牙齿	年代
1	P7	H30	右下颌骨	P3-M3	商周
2	P8	T498⑤:8	右下颌骨	dP2-M1	春秋战国
3	P12	T376⑥:8	右上颌骨	P3, M1	春秋战国
4	P14	H16:9	右下颌骨	M2-M3	商周
5	P22	T396⑧:2	右上颌骨	M3	春秋战国
6	P33	T370⑧:64	左下颌骨	P3-M1	春秋战国
7	P37	T368④:1	左上颌骨	M2-M3	商周
8	P41	T397⑫:2	左下颌骨	m3	商周
9	P42	TW H59:1	右上颌骨	M1、M2 (残)	新石器晚期
10	P43	TW H146:3	右上颌骨	M1、M2 (残)	新石器晚期

2. 样本处理

首先从颌骨上取下牙齿，用毛刷清理牙齿表面的灰尘和泥土，紫外线照射1 h。随后将牙齿样本置于5%次氯酸溶液中浸泡15min，依次用无水乙醇、超纯水清洗、晾干后用紫外线照射牙齿各侧面，每个侧面30min，在装有液氮的冷冻研磨机6850 SPEX CertiPrep Freezer/mill (美国)中打碎成粉末，分装成500mg/每管，-20℃冷冻保存。

3. 古 DNA 抽取、PCR 扩增和测序

古DNA抽提：每个样本取500 mg骨粉，按照蔡大伟等人的方法进行古DNA抽提[8]。

PCR扩增：根据参考序列AJ002189设计了一对引物扩增189bp的线粒体DNA D-loop序列(15439-15627)，正向引物PIG1F 5' CAAAACAAGCATTCCATTTCG 3'，反向引物PIG1R 5' TGGGGACTAGCAATTAATGC 3'。扩增程序：95℃3 min变性，随后36个循环：94℃ 40s变性，52-55℃退火45 s，72℃延伸45s，最后72℃充分延伸10 min，4℃保持。扩增体系：50 μL含2.5 mmol/L Mg²⁺，1×Buffer，200 μmol/L dNTPs，1.2 mg/mL BSA，0.4 μmol/L 每条引物，1 U *Taq*酶，3 μL DNA抽提模版

DNA 测序：PCR 扩增产物通过2%琼脂糖凝胶电泳检测，并用QIAEX® II GEL Extraction Kit 胶回收试剂盒纯化 PCR 产物。使用 ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer 全自动遗传分析仪通过Dyeprimer 试剂盒进行正反测序反应。

4. 数据分析

序列比对由 Clustal X 1.83 软件完成，并辅以人工校对，插入/缺失位点从所有分析中排除。系统发育树的构建分别采用 NJ 法用 Mega 4 软件构建。

三、结果与讨论

1. 结果真实性

古 DNA 研究的关键是保证所得数据的真实性。本研究所有实验都在专门的古 DNA 实验室内进行，并采取了严格的防污染措施。例如在实验中穿双层防护服，戴一次性帽子和口罩、乳胶手套、每完成一步操作，立即更换手套；经常用次氯酸溶液擦拭超净台和用紫外线照射以消除污染；使用一次性实验耗材和不含外源 DNA 的试剂等。所有抽提空白对照、PCR 扩增空白对照都呈阴性，表明在样本的抽提和 PCR 扩增过程中没有收到外源 DNA 的污染，我们所获得的数据是真实可靠的。

2. 古代猪线粒体 DNA 序列变异

我们一共获得 10 个长度为 189bp 的古代家猪线粒体 DNA 序列，与参考序列 AJ002189 相比，一共发现 7 个变异位点，定义两个单倍型 H1 和 H2 (表 2)。H1 被 9 个古代猪个体所共享，频率高达 90%，这暗示 H1 是中国古代猪的主要线粒体单倍型。值得注意的是新

石器时代晚期的个体 P42，与商周时期 P7、P14、P41 以及春秋战国时期 P8、P12、P22、P33 共享单倍型 H1，这一结果表明从新石器时代晚期到春秋战国时期近几千年间里，万发拔子地区的家猪在线粒体 DNA 母系遗传方面存在连续性，从一个侧面反映了当地家猪饲养业的连续性以及人们对饲养品种的选择喜好。

表 2 古代猪的 mtDNA 变异位点

单倍型	变异位点							样本实验室编号
	1	1	1	1	1	1	1	
	5	5	5	5	5	5	5	
	5	5	5	5	5	5	5	
	4	5	6	7	7	8	9	
	3	8	5	1	9	7	2	
AJ002189	T	T	G	C	C	C	A	
H1	C	A	A	-	T	T	G	P7, P8, P12, P14, P22, P33, P37, P41, P42,
H2	C	A	A	-	T	T	.	P43

. 表示与参考序列相同的位点，- 表示缺失位点。

3. 系统发育分析

Larson 等对欧亚大陆 7 个地区 686 只家猪与野猪的线粒体 DNA 进行了比较，结果发现不同地区的家猪还是与本地区的野猪在基因上更加相似，并指出 6 个可能的独立驯化中心：中欧、亚平宁半岛、东亚、印度、东南亚半岛，太平洋新几内亚半岛^[9]。为了进一步分析古代猪与现代家猪的母系遗传关系，我们从 GenBank 上选取了东亚、中东、欧洲等地的代表性家猪品种作为比对序列，共 178 个序列，用 MEGA 4 软件构建系统发育树（图 1）。系统发育树显示了三个主要聚簇：东亚、中东、和欧洲，这暗示不同地区的猪有着不同的母系起源。中国古代猪全部与现代中国家猪聚集在一起，暗示其与中国现代家猪具有很近的遗传关系。

家猪的起源研究可以用于揭示人类的生活方式、经济发展模式以人群的及迁徙和融合。利用古 DNA 技术研究家猪的起源和驯化过程，使得我们可以直接了解群体历史变化动态，有助于探讨家猪的起源问题。考古资料显示万发拔子地区从新石器晚期就有猪出现，除了家猪还有一部分野猪，并且一直延续到魏晋时期。中国现有 5 个野猪亚种，且呈现明显的地理分布，在中国东北地区及周边地区就广泛分布有东北野猪亚种 (*S. s. ussuricus*)。值得注意的是，本次古 DNA 序列分析显示了该地区家猪从新石器晚

期到春秋时期在母系遗传上具有连续性。野猪是家猪的祖先，广泛栖息于亚洲、欧洲及非洲北部，全球共有 27 个亚种。结合考古学、遗传学、生物学等方面的证据，我们认为万发拨子地区古代居民可能从新石器晚期独立开展了猪的驯化与饲养。我国黄河流域和长江流域自古以来就是农业起源与发展的核心地区，而在这些地区广泛分布多个野猪群体，考古记录显示我国最早的家猪都出自上述地区，结合我们的分析结果暗示中国家猪极有可能在多个地区经历了独立的驯化时间。

在万发拨子遗址中，我们不仅发现了家猪，而且也发现了一些野猪的遗骸，目前，我们尚未对野猪遗骸进行古 DNA 分析。从时间跨度上看，一些魏晋时期的样本我们尚未开展研究。此外，我们所扩增的 DNA 片段较短，提供遗传信息有限。上述问题都是我们今后研究的重点，对于我们揭示该地区家猪的驯化具有重要的意义。

附记：本研究先后受到以下基金项目的资助：教育部人文社会科学重点研究基地 2009 年度重大项目《东北地区古代动物遗存综合研究》（批准号：2009JJD780003）、教育部人文社会科学研究项目基金资助《中国家猪起源的分子考古学研究》（批准号：09YJC780003）、“十一五”国家科技支撑计划重点项目“中华文明探源工程（二）”《3500BC-1500BC 中国文明形成与早期发展阶段的技术与经济研究》（批准号：2006BAK21B03）、国家基础科学人才培养基金项目（批准号：J0930002）、中国博士后科学基金资助项目（批准号：20080430156）、中国博士后科学基金特别资助项目（批准号：200902491）。

注 释

- [1] 李相运. 家猪的起源与驯化 [J]. 畜牧兽医杂志, 1998年第17卷第3期。
- [2] Yuan J. Rowan K. Flad. Pig domestication in ancient China [J]. *Antiquity* 第76卷293期。
- [3] 袁靖. 中国新石器时代家畜起源的问题 [J], 文物, 2001年第5期。
- [4] 袁靖. 古代家猪的判断标准 [M]. 中国文物报, 2003年8月1日。
- [5] 凯斯·道伯涅, 袁靖, 安东·欧富恩克等. 家猪起源研究的新视角 [J]. 考古, 2006年第11期。
- [6] 吉林省文物考古研究所、通化市文物管理委员会办公室. 吉林通化市万发拨子遗址二十一号墓的发掘 [J]. 考古, 2003年第8期。
- [7] D. M. Suratisa、汤卓炜、高秀华. 吉林通化万发拨子聚落遗址区古生态概观 [M]. 边疆

考古研究（第5辑），北京：科学出版社，2006年。

[8] Dawei Cai, Lu Han, Xiaolei Zhang, et al. DNA analysis of archaeological sheep remains from China [J]. Journal of archaeological science, 2007年第34卷第9期。

[9] Larson G, Dobney K, Albarella U, et al. Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication [J]. Science, 2005年第307卷5715期。

Mitochondrial DNA analysis of Pig remains excavated from Wanfabozi Archaeological Site, Tonghua City, Jilin Province

Dawei Cai Yang Sun Zhuowei Tang Liebin Wang Hui Zhou

Abstract:In order to investigate the origin of Chinese domestic pig, we analyzed 10 pig remains excavated from Wanfabozi archaeological sites dating from the Late Neolithic Period to the Spring and Autumn and Warring States Period in Tonghua City, Jilin Province. PCR amplification, sequencing and DNA analysis were performed by using 189bp mitochondrial DNA D-loop fragment. Our result showed the continuity of maternal heritage in ancient pigs. For further reveal the relationship between ancient and modern pig, phylogenetic analysis were carried out based on sequences of pig from East Asia, Near East and Europe. Phylogenetic tree showed that ancient pigs were grouped into modern Chinese pigs, and clearly separated from pigs in Near East and Europe. Together the abundant archaeological evidences and the distribution of wild boar in Northeast China, our results suggest that Wanfabozi ancient inhabitants may have domesticated pig from the late Neolithic Period.

Key words:pig; Mitochondrial DNA; ancient DNA

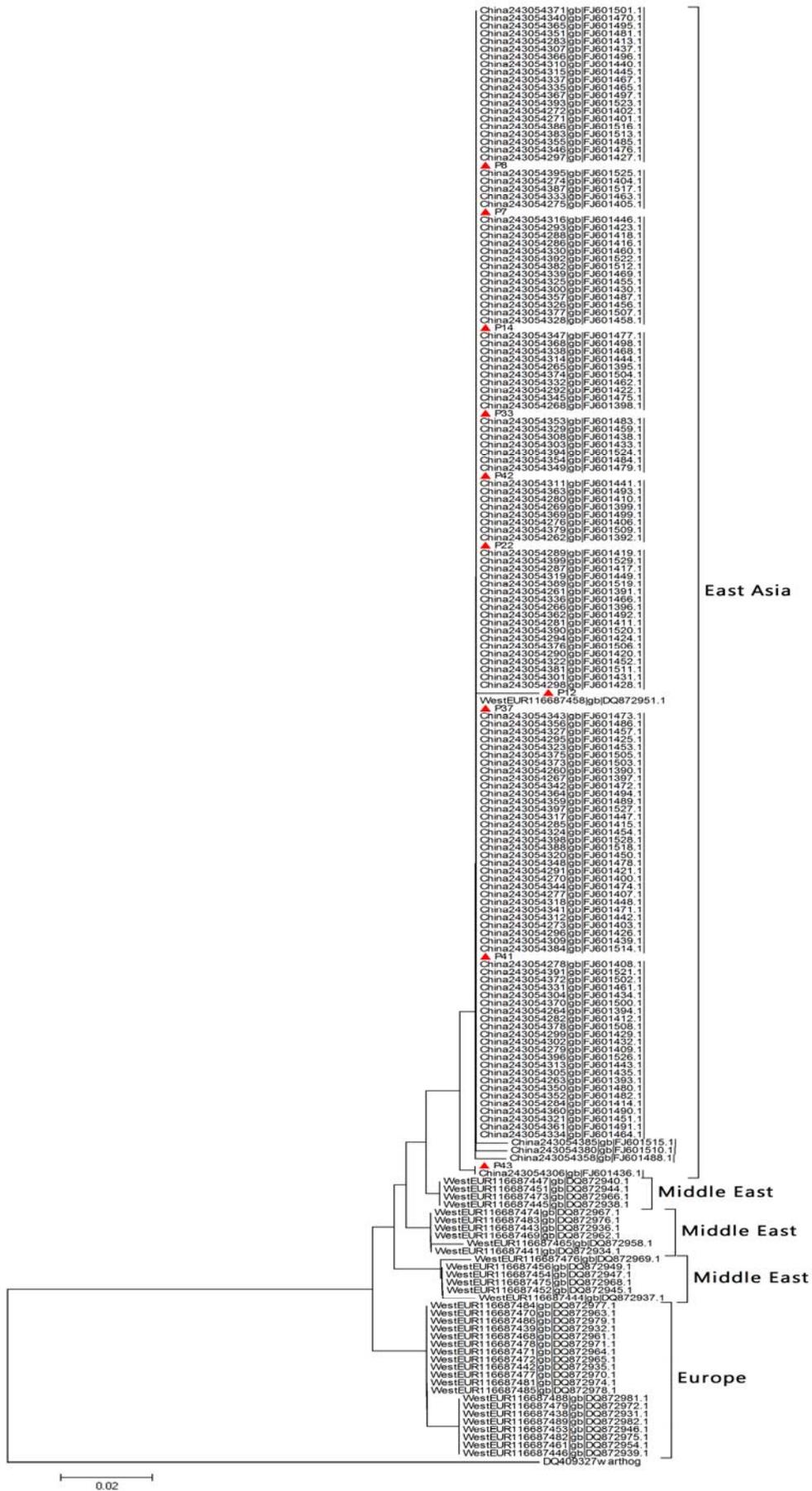


图 1 188 个中国古代和现代以及欧亚大陆西部猪的系统发育树（非洲疣猪为外类群，三角代表中国古代猪）