

河北秦皇岛灵仙洞斑鬣狗化石的古 DNA 初步分析

盛桂莲¹, 袁俊霞¹, 伊 剑¹, 金昌柱², 刘金毅², 侯新东¹, 赖旭龙^{1*}

1. 中国地质大学生物地质与环境地质教育部重点实验室, 湖北武汉 430074

2. 中科院古脊椎动物与古人类学研究所脊椎动物进化系统学重点实验室, 北京 100042

摘要: 鬣狗科动物曾是一个数量十分可观的群体, 在 5 百万年前曾达到演化的鼎盛时期, 留下已鉴定化石种 100 余种。现生的鬣狗科动物仅有 4 种, 仅分布在亚洲和非洲部分地区。由于该科动物演化至今种类剧减、分布区退缩, 部分化石种与现生种的谱系演化关系尚不明确, 因此成为古生物学家和进化生物学家关注的生物类群之一。采用现代分子生物学方法, 提取扩增河北秦皇岛灵仙洞中鬣狗类化石的线粒体基因组古 DNA 片段, 通过与基因库中已有鬣狗科动物各属种同源序列的对比分析, 从分子水平确定该化石为斑鬣狗化石; 基于古 DNA 序列数据构建的系统进化树显示, 该地的斑鬣狗个体与我国东北地区及俄罗斯的化石斑鬣狗具有较近的亲缘关系, 而与西欧洞穴鬣狗及非洲现生斑鬣狗亲缘关系较远, 显示出斑鬣狗演化的分子地理谱系。

关键词: 斑鬣狗; 晚更新世; 秦皇岛灵仙洞; 古 DNA 分子谱系; 分子结构。

中图分类号: Q911

文章编号: 1000-2383(2009)06-0877-07

收稿日期: 2009-06-28

Ancient DNA Analyses of the Spotted Hyena (*Crocota crocuta*) from Lingxian Cave, Qinhuangdao, Hebei Province

SHENG Gui-lian¹, YUAN Jun-xia¹, YI Jian¹, JIN Chang-zhu², LIU Jin-yi², HOU Xin-dong¹, LAI Xu-long^{1*}

1. Key Laboratory of Biogeology and Environmental Geology of Ministry of Education, China University of Geosciences, Wuhan 430074, China

2. Laboratory of Evolutionary Systematic of Vertebrate, Institute of Vertebrate Paleontology and Paleoanthropology, Chinese Academy of Sciences Beijing 100042, China

Abstract The extant hyena species are the remnants of a formerly diverse group of Hyaenidae, which reached its peak about 5 MYA and contained more than 100 fossil species. Hyenas have been the subject of a number of evolutionary and systematic studies during the last two centuries, due in large part to the dramatical loss of its diversity and geography. The phylogenetic studies incorporating both morphological and molecular analysis have yielded different conclusions regarding the evolutionary relationship between extant and extinct hyenas. In this study, partial ancient DNA sequence of cytochrome *b* gene in mitochondrial genome was successfully retrieved from Pleistocene hyena bones collected from Hebei Province in North China. The BLAST result shows that the cracked specimen is the teeth of a spotted hyena (*Crocota crocuta*), which makes the classification of the specimen clear at the molecular level. Furthermore, both the obtained sequence and the homologous sequences extracted from GenBank were aligned and used as datasets for phylogenetic analyses. The phylogenetic tree shows that the two individuals from China and the one from Russia were joined together, appearing as a sister group of the branch combined by the west European fossils and the African extant hyenas, which suggests a phylogeographic pattern of the Pleistocene cave hyenas.

Key words: *Crocota crocuta*; Pleistocene; Lingxian cave in Qinhuangdao; ancient DNA phylogeography; molecular structure.

鬣狗科(Hyaenidae)动物约于 2000 万年前的中新世晚期从食肉目猫科动物分离而出开始独立演化, 并于晚中新世至上新世初期达到演化的鼎盛时

期, 遍布欧洲、亚洲和非洲, 也曾通过白令海峡入侵到北美洲(Werdelin and Solounias, 1991), 到晚更新世, 鬣狗科动物在欧洲及亚洲西部仍有着广泛的

基金项目: 国家自然科学基金项目(Nos. 40672006, 40902008); 生物地质和环境地质高等学校创新引智计划项目(No. B08030)。

作者简介: 盛桂莲(1975-), 女, 博士, 讲师, 主要从事古脊椎动物分子演化研究。* 通讯作者: 赖旭龙, E-mail: xllai@cug.edu.cn

地理分布,已发掘并有详细描述的各时期化石达到近 100 种(Werdelin and Solounias, 1991).这个盛极一时的群体,现在世界上却仅存于亚洲西南部和非洲撒哈拉沙漠以南的较开阔地区,种类也只包括斑鬣狗(*Crocota crocuta*)、缟鬣狗(*Hyaena hyaena*)、褐鬣狗(*Parahyaena brunnea*)和土狼(*Proteles cristatus*)4 个属种(Wozencraft, 1993).鬣狗科动物分布区的退缩、种类和数量的剧减等现象是引人关注的问题;现生的鬣狗科动物栖息地多样、食性各异、生态位广泛,加上部分成员类似于灵长类动物的社会生物学特征(Watts and Holekamp, 2007),更是引发了众多学者对其演化历史的浓厚兴趣(Diedrich, 2008; Turner *et al.*, 2008).然而,鬣狗科动物各属种内一些在形态上与现生种存在一定差异、分布广泛的化石种与现生种的演化关系尚未明确.其中发现于欧洲和亚洲洞穴堆积中、现已绝灭的洞穴鬣狗(*Crocota crocuta spelaea*)与非洲现生斑鬣狗之间的谱系关系更是一个备受争议的问题.有人认为洞穴鬣狗是斑鬣狗属中的一个亚种(Kurtén, 1957; Turner, 1984; Werdelin and Solounias, 1991);还有人则认为它们代表着一个独立的种(Markova *et al.*, 1995; Rohland *et al.*, 2005).Rohland *et al.* (2005)曾以现生鬣狗科动物及更新世洞穴鬣狗化石线粒体细胞色素 *b* 基因(*cytochrome b*, *Cyt b*)片段为研究载体,发现洞穴鬣狗与现生斑鬣狗尽管在头盖骨、下颌及牙齿等形态特征上存在一定区别,但是它与非洲现生斑鬣狗北部谱系在分子水平上并没有发生系统分化,认为在现有研究基础上将洞穴鬣狗作为亚种或独立列为一个种尚缺乏分子水平的支持数据.

在我国,鬣狗科动物的化石材料在整个更新世至全新世初期的地层中比较常见,它们在北方地区与披毛犀—猛犸象动物群(*Coelodonta-Mammuthus* Fauna)共存,在南方常为大熊猫—剑齿象动物群(*Ailuropoda-Stegodon* Fauna)中的一员(黄万波, 1989; 同号文, 2007).其中与欧亚洞穴鬣狗同期存在于我国更新世中晚期地层中的最后斑鬣狗(*Crocota crocuta ultima*),是我国鬣狗历史上的最后成员之一.我国北方地区年平均温度较低、土壤湿度小而且土壤条件偏碱性,既是比较有利于古 DNA 保存的地区,同时也是有丰富的鬣狗科动物化石出土的地区(Tseng *et al.*, 2008).本研究以我国河北秦皇岛灵仙洞出土的鬣狗类动物化石为材料,通过提取扩增该类动物化石的古 DNA,比较该化石群体、欧亚

洞穴鬣狗与非洲现生斑鬣狗同源序列之间的差异,进行鬣狗科动物的系统发育分析,从分子水平对该类化石进行种类鉴定,并为解决斑鬣狗化石种与现生种之间的谱系演化关系提供分子水平的依据.

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用鬣狗骨骼及牙齿样品于 2007 年 8 月在河北秦皇岛板厂峪景区灵仙洞的发掘过程中同步采集,采样地点见图 1.同期采集到的还有马鹿(*Cervus sp.*)、狼(*Canis lupus*)、野猪(*Sus sp.*)、熊(*Ursus sp.*)、獾(*Meles sp.*)、披毛犀(*Coelodonta sp.*)和狐(*Vulpus sp.*)等约 30 种共生动物,这些种类均属于华北晚更新世“最后斑鬣狗—赤鹿动物群”的常见和典型动物.

古 DNA 实验所用 BSA、EDTA、GuSCN、蛋白酶 K、Silica 等购自 Sigma 公司;Taq DNA 聚合酶购自 ABI 公司;Topo TA 克隆试剂盒购自 Invitrogen 公司;PCR 扩增引物由上海生工生物工程技术有限公司合成;用于 PCR 产物纯化的 QIA quick Gel Extraction kit 购自德国 QIAGEN 公司.Bio-Rad 电泳仪/水平电泳槽、凝胶图像分析系统(Gel-100)均为美国 Bio-Rad 公司产品;大型台式冷冻离心机(Centrifuge 5804 R)、微型离心机(Mini-spin)、精巧型恒温混匀仪(Thermomixer compact)、单道可调量程移液器(Eppendorf Research)产自德国 Eppendorf 公司;8 连管、96 孔板等为加拿大 BBI 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 样品前处理 样品去除表层浮土,即刻独立装入密封样品袋后带回实验室,清水冲洗后晾干并置于 UV 灯下照射 24 h,装入洁净样品袋后在专用

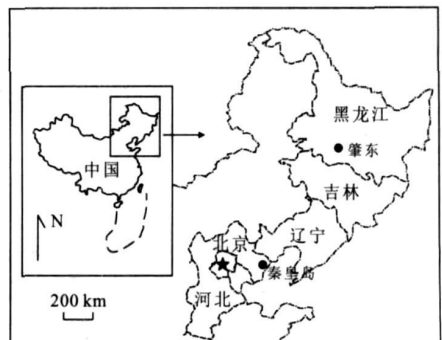


图 1 本研究的采样地点

Fig. 1 Location of the sampling site

古 DNA 样品柜中室温保存. 提取前在古 DNA 专用样品处理通风橱内用洁净刀片或金刚砂轮切割出小块, 用次氯酸钠溶液浸泡 30 min 后晾干, 用砂轮打磨去除 3~5 mm 表层, 更换洁净刀片或钻头取标本里层, 放入洁净研钵中研磨成粉末备用.

1.2.2 古 DNA 提取 古 DNA 提取参考 Rohland *et al.* (2007) 的方法并进行部分优化. 本研究尝试了 6 个鬣狗骨骼样品古 DNA 的提取, 为检测提取过程及引物扩增效率, 选用采自黑龙江肇东县同和乡, 其已经过前期研究证明确有古 DNA 存在的另一鬣狗样品 (编号: HS-29) 作为正对照. 此外, 设定不加入样品、所有提取步骤与样品提取同步进行的空白提取对照, 具体实验体系的设定方法参照盛桂莲等 (2009) 进行.

1.2.3 PCR 扩增及产物纯化 选择鬣狗线粒体基因组 *Cyt b* 基因片段为目标片段. 根据样品保存情况, 实验中选用 Rohland *et al.* (2005) 所用的 7 对针对较小目标片段的引物对提取物进行扩增, 采用 Römpler *et al.* (2006) 提出的多重 PCR 扩增方法: 第一步, 在 PCR 反应体系中加入目标序列前后不相邻的多对引物, 使之与模板各自结合, 进行同步扩增; 第二步, 以此扩增产物的稀释液为模板, 在 PCR 反应体系中分别加入单对引物进行扩增. 在 20 μL 的扩增反应体系中, 包含以下成分: 1×PCR buffer, 0.25 U Taq DNA polymerase, 250 μmol/L dNTPs, 250 mmol/L MgCl₂, 1.0 mg/mL BSA, 每条引物浓度为 250 nmol/L. PCR 反应条件为 94 °C 变性 20 s, 52 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s; 反应前 94 °C 预变性 9 min, 反应后 72 °C 延伸

5 min; 第一步反应 30 个循环, 第二步反应 40 个循环. 扩增结果的电泳检测用 2.5% 琼脂糖凝胶. 据结果选目标条带清晰、提取对照为阴性且无引物二聚体的 PCR 扩增产物, 用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳后, 切胶回收, 用纯化试剂盒纯化.

1.2.4 分子克隆 将纯化产物连接到 PMD18-T 载体 (含 M13 引物的扩增位点) 上, 再将连接产物转化至感受态细胞 DH5α, 用含氨苄青霉素、X-Gal 和 IPTG 的 LB 培养基 37 °C 过夜培养. 从每个平板上挑 6 个白色菌斑 37 °C 振荡培养, 取 1 μL 菌液 1:10 稀释后, 95 °C 加热 10 min, 取少量煮沸液为模板用 M13 引物进行扩增. 凝胶电泳检测选出含目的序列的克隆, 对应的菌液交由上海生工生物工程技术服务有限公司测序.

1.2.5 系统发育分析 将测序得到的序列分别提交 NCBI 数据库进行 BLAST 查询. 系统发育分析共调集 GenBank 中 *C. crocuta*, *H. hyaena*, *P. brunnea* 和 *P. cristatus* 四属种共 14 条同源序列 (表 1), 其中采样地点为比利时、德国、俄罗斯的序列来自于古代样品, 其他序列来自非洲的现生鬣狗科动物. 序列分析用 BioEdit 软件.

2 结果

2.1 PCR 扩增结果

在灵仙洞采集的 6 个鬣狗样品中, 从 5 号样

表 1 本研究用到的核酸序列信息
Table 1 Data sets used in this paper

属名	种名	本文代码	序列长度 (bp)	GenBank 收录号	采样地点
	最后斑鬣狗	<i>C_crocuta_LXD_5</i>	79	/	中国河北
	<i>Crocota crocuta ultima</i>	<i>C_crocuta_HS_29</i>	225	/	中国黑龙江
斑鬣狗属 <i>Crocota</i>	洞穴鬣狗	<i>C_crocuta_DQ157554</i>	366	DQ157554	比利时
		<i>C_crocuta_AJ809326</i>	366	AJ809326	德国
	<i>Crocota crocuta spelaea</i>	<i>C_crocuta_DQ157555</i>	366	DQ157555	俄罗斯
		<i>C_crocuta_DQ157556</i>	366	DQ157556	塞内加尔
		<i>C_crocuta_DQ157557</i>	366	DQ157557	埃塞俄比亚
		<i>C_crocuta_DQ157560</i>	366	DQ157560	坦桑尼亚
		<i>C_crocuta_DQ157562</i>	366	DQ157562	卢旺达
<i>C_crocuta_DQ157566</i>	366	DQ157566	津巴布韦		
缟鬣狗属 <i>Hyaena</i>	缟鬣狗	<i>H_hyaena_DQ157584</i>	340	DQ157584	索马里
	<i>Hyaena hyaena</i>	<i>H_hyaena_DQ157578</i>	340	DQ157578	希腊
褐鬣狗属 <i>Parahyaena</i>	褐鬣狗	<i>P_brunnea_DQ157591</i>	340	DQ157591	纳米比亚
	<i>Parahyaena brunnea</i>	<i>P_brunnea_DQ157588</i>	340	DQ157588	南非
土狼属 <i>Proteles</i>	土狼	<i>P_cristatus_AY928679</i>	1 140	AY928679	南非
	<i>Proteles cristatus</i>	<i>P_cristatus_AY048792</i>	1 140	AY048792	南非

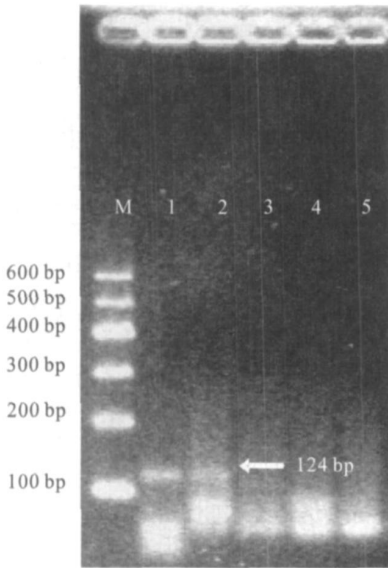


图 2 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 Gel electrophoresis image of PCR products
M: 100 bp DNA ladder; 1. 正对照; 2. LXD-5; 3. 空白提取对照; 4. 第一次 PCR H₂O 对照; 5. 第二次 PCR H₂O 对照

(LXD-5)中成功扩增得到引物对 *Cyt b* F3/R3 的目标序列, 在 2.0% 琼脂糖凝胶电泳中呈现较明显的目标条带(124 bp), 提取对照和两次 PCR H₂O 对照中无目标条带出现(图 2)。

2.2 GenBank 检索结果及同源序列比对

将测得序列去除引物序列后(79 bp)提交 GenBank 作 BLAST 查询, 结果与斑鬣狗 (*C crocuta*) *Cyt b* 基因片段有 93% 的相似度。经与同源序列比对(图 3), 发现该序列与作为正对照的 HS-29 的碱基组成差异为 2 个碱基位点(第 53 位: C→T; 第 72 位: T→C), 为碱基之间的转换; 与 GenBank 中采自俄罗斯的斑鬣狗个体也存在 2 个碱基位点(第 72 和 73 位)C→T 的转换; 与 GenBank 中采自比利时、德国、塞内加尔、埃塞俄比亚及卢旺达的斑鬣狗同源序列的碱基组成差异则有 5 个碱基位点, 并涉及到转换和颠换两种碱基变化类型(第 24 位 G→A; 第 50、72、73 及 75 位 T→C); 与坦桑尼亚、津巴布韦的斑鬣狗个体除前述 5 个碱基位点外, 还在第 15 位存在一个 C→T 的转换; 与缟鬣狗、褐鬣狗及土狼的碱基组成差异则更大(图 3)。

2.3 系统进化树

比对后的序列用距离矩阵法中的 UPGMA 法构建系统发育树如图 4 所示。

3 讨论

3.1 古 DNA 序列的可靠性论证

鉴于古 DNA 的高度片段化和微量特征, 所得序列的可靠性一直以来都是古 DNA 研究面临的巨大挑战(Golenberg *et al.*, 1990; DeSalle *et al.*, 1992; Cano *et al.*, 1993; Wayne *et al.*, 1999)。在本研究中, 所得古 DNA 序列的可靠性可从以下方面得以论证: 首先, 在野外严格按照古 DNA 研究规范采集样品, 样品的前处理、提取及 PCR 反应体系的配制等 PCR 前过程都在古 DNA 专用洁净实验室的独立空间中进行。其次, 实验过程中设定了提取负对照、PCR 水对照, 并将样品的提取和扩增操作放在提取正对照和负对照之前。凝胶电泳结果中提取负对照、PCR 水对照均无目标大小条带出现, 排除了来源于试剂、操作者本人及样品间的交叉污染。第三, 序列经 BLAST 查询, 结果显示该序列不仅为斑鬣狗的 *Cyt b* 基因片段, 而且与 GenBank 及正对照的同源序列存在数目不一的碱基差异, 说明该序列确为灵仙洞斑鬣狗样品的原生序列。最后, 尤为重要是该序列结果得到了重复性实验的验证。本研究的重复性实验包括: 同样的样品不仅在德国马普进化人类学研究所采用相同方法进行了重复, 还在生物地质与环境地质教育部重点实验室由不同研究人员进行了重复性操作, 均得到了相同的实验结果。

3.2 灵仙洞斑鬣狗样品古 DNA 的保存状况分析

本研究所用的 7 对引物中, 有 4 对在正对照中得到了有效扩增, 1 对在样品中扩增得到了目标条带, 引物与 DNA 模板的结合成功率在正对照中达 57.1%, 在研究样品中仅为 16.7%。从灵仙洞采集的 6 个样品中, 只从 5 号样(LXD-5)中得到了 1 对引物的目标扩增片段, 其他 5 个样品经过 2 次重复提取和 3 次 PCR 重复扩增均未显示阳性结果, 说明这些样品的古 DNA 保存情况较差, DNA 已高度降解, 不存在可作为扩增模板的古 DNA 分子。

灵仙洞中发掘的斑鬣狗样品, 根据地层年代推算其保存年限为 10 ka 左右, 符合古 DNA 的理论保存年限范围。为探讨该地样品保存状况较差的原因, 研究后期曾对该洞穴中的土壤样品进行了 pH 值测定, 并将土壤样品送交中国地质大学地质过程与矿产资源国家重点实验室用原子吸收光谱仪(日立 18070)进行 Ca²⁺/Mg²⁺/K⁺ 等离子含量分析。其中土壤 pH 值测定结果为 6.09, 呈弱酸性; 土壤中

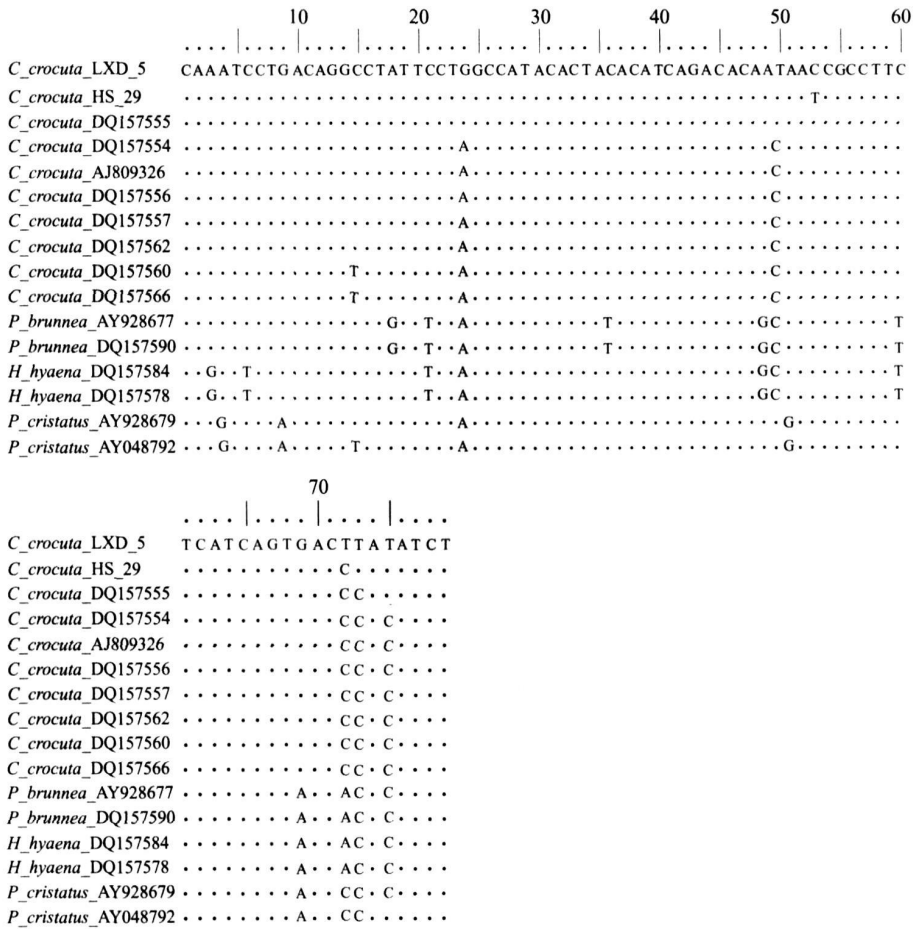


图 3 鬣狗科动物各属种 79 bp 同源序列碱基组成比对

Fig. 3 Aligned DNA sequence of the 79 bp fragment of Cyt b from Hyaenidae

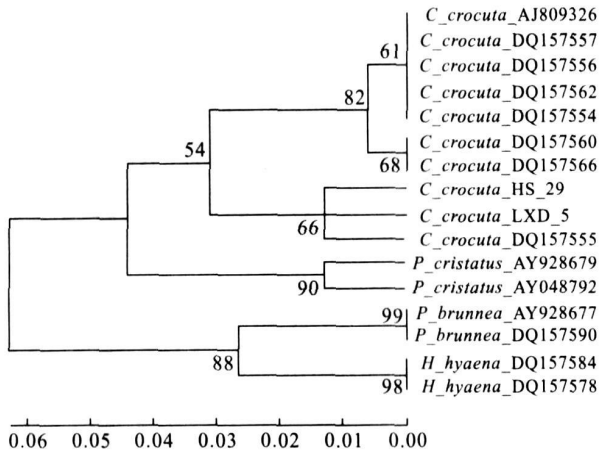


图 4 基于 Cyt b 基因部分序列构建的鬣狗科 UPGMA 系统进化树(图中数字代表重复次数为 1 000 时的自展支持率)

Fig. 4 Distance matrix phylogenetic tree based on the partial sequences of Cyt b gene in Hyaenidae

CaO、MgO、K₂O 含量分别为 3.64%、1.76%、2.98%，显示该洞穴的土壤环境不利于古 DNA

的保存(杨周岐等, 2006), 成为本研究中古 DNA 扩增效率较低的原因。

然而, 该洞穴中斑鬣狗样品古 DNA 小片段的成功提取和扩增, 显示了分子古生物学方法应用于灵仙洞穴鬣狗样品从分子水平进行分类鉴定、谱系演化乃至群体遗传学研究的可行性。后期研究采样时应收集破损程度低、质地更为致密、更有利于古 DNA 保存的牙齿作为研究样品, 可弥补样品保存环境的不足而得到相对完整的序列数据。

3.3 鬣狗科动物系统发育分析

从图 4 可以看出, 在系统进化树中缟鬣狗 (*H. hyaena*) 与棕鬣狗 (*P. brunnea*) 形成关系较近的姊妹群, 显示缟鬣狗与棕鬣狗亲缘关系较近。在此问题上, Jenks and Werdelin(1998) 基于 4 种现生鬣狗的线粒体基因组 Cyt b 基因序列构建的系统进化树曾得到与本文一致的结论; Koepfli *et al.* (2006) 对现生鬣狗的核基因和线粒体基因同时进行研究, 也得到上述系统进化结果。因此, 本研究所得序列片段能

够作为鬣狗分类演化的分子标记,初步指示鬣狗科各属种的系统演化关系。

由于斑鬣狗化石种和现生种的种级分类存在不同观点,为与非洲现生斑鬣狗(*Crocuta crocuta*)相区别,国外研究学者将采自欧亚大陆更新世及全新世初期的化石斑鬣狗称为洞穴鬣狗(*Crocuta crocuta spelaea*)。而我国学者将我国与洞穴鬣狗同期的化石种称为最后斑鬣狗(*Crocuta crocuta ultima*)。在图 4 中,采自中国的两个最后斑鬣狗样品(*C_crocuta_LXD_5* 和 *C_crocuta_HS_29*)在系统进化树上与采自俄罗斯的洞穴鬣狗(*C_crocuta_DQ157555*)聚类形成独立的分支。采自德国(*C_crocuta_AJ809326*)和比利时(*C_crocuta_DQ157554*)的两个洞穴鬣狗与多个非洲现生斑鬣狗个体共同聚类。上述结果既不支持最后斑鬣狗与欧亚洞穴鬣狗存在分子水平的显著差异,也说明欧亚洞穴鬣狗与非洲现生斑鬣狗不存在分子水平的系统分化,从地域角度加强了 Rohland 等的结论。图 5 显示了本研究中用于系统发育分析的来自亚洲和欧洲的鬣狗化石地点以及来自非洲的现生种的地理分布。从空间角度来衡量,与西欧两个洞穴鬣狗聚类的非洲现生斑鬣狗,除一个(*C_crocuta_DQ157562*)来自赤道线附近的卢旺达外,其他个体分别来自塞内加尔(*C_crocuta_DQ157556*)和埃塞俄比亚(*C_crocuta_DQ157557*),属于赤道线以北的非洲北部地区;彼此聚类的坦桑尼亚(*C_crocuta_DQ157560*)和津巴布韦(*C_crocuta_DQ157566*)斑鬣狗个体,则属于赤道线以南的非洲南部地区;我国的最后斑鬣狗个体与地理位置相距

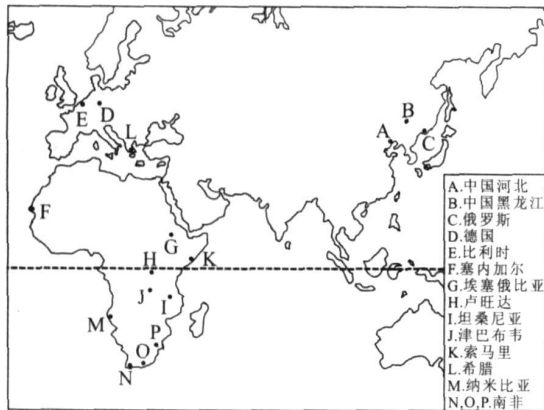


图 5 本研究中用于系统发育分析的鬣狗科动物化石种和现生种地理分布

Fig. 5 Geographical distribution of the extinct and extant Hyaenidae which have been used in phylogenetic analyze in this study

较近的俄罗斯洞穴鬣狗个体处于相同的进化支,而且位于前述两个进化支的根部。上述结果不仅为 Kurtén(1956)提出亚洲是斑鬣狗起源地的观点初步提供了分子水平的证据,更为重要的是我国斑鬣狗化石样品的序列数据进一步反映了斑鬣狗分子演化上的谱系地理格局。鉴于我国最后斑鬣狗化石在研究斑鬣狗化石种和现生种系统演化关系中的重要作用,我们在后续研究中将增加我国北方地区化石斑鬣狗样品的采样地点,得到最后斑鬣狗更多的同源序列数据,进一步明确我国最后斑鬣狗、欧亚洞穴鬣狗及非洲现生斑鬣狗的系统演化关系。

此外,图 4 中部分结点的自展支持率较低(< 80%),且土狼(*P. cristatus*)所在的系统演化位置与已有研究有较大差别。根据现有的关于现生鬣狗科动物 4 个属种间的演化关系研究,多数学者认为土狼是鬣狗科成员中高度特化、最先分化出来的类群(Wurster and Benirschke, 1968; Werdelin and Solounias, 1991; Jenks and Werdelin, 1998; Werdelin, 1999; Koepfli *et al.*, 2006)。结合本研究小组的猛犸象系统发育分析研究实例(杨淑娟和赖旭龙, 2003; Yang *et al.*, 2006; Sheng *et al.*, 2009),分析矛盾结果的产生及较低自展支持率的出现是由序列的短片段效应所致。若能结合灵仙洞的发掘工作,在该地采集保存情况相对理想的斑鬣狗牙齿材料,用于古 DNA 的提取和扩增,有望得到所研究目标基因更长的序列片段,并将之用于系统发育分析,解决上述问题。

致谢:秦皇岛板厂峪景区许国华先生在本研究采样过程中提供了莫大帮助,现任职英国约克大学(The University of York)的 Michael Hofreiter 教授在德国马普进化人类学研究所(Max Planck Institute for Evolutionary Anthropology)工作期间曾为本研究的重复性实验提供了实验条件和技术支持,在此一并表示衷心的感谢!

References

- Cano, R. J., Poinar, H. N., Pieniazek, N. J., *et al.*, 1993. Amplification and sequencing of DNA from a 120-135-million-year-old weevil. *Nature*, 363(6429): 536-538.
- DeSalle R., Gatesy, J., Wheeler, W., *et al.*, 1992. DNA sequences from a fossil termite in Oligo-Miocene amber and their phylogenetic implications. *Science* 257(5078): 1933-1936.
- Diedrich, C., 2008. The holotypes of the upper Pleistocene *Crocuta crocuta spelaea* and *Panthera leo spelaea* of the zoolithen ca-

- ve hyena den and their palaeo-ecological interpretation. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 154(4): 822–831.
- Golenberg, E. M., Giannasi, D. E., Clegg, M. T., et al., 1990. Chloroplast DNA sequence from a Miocene Mag-nolia species. *Nature*, 334(6267): 656–658.
- Huang, W. B., 1989. Taxonomy of the hyaenidae (*hyaena* and *crocuta*) of the pleistocene in China. *Vertebrata Palasiatica*, 27(3): 197–204 (in Chinese with English abstract).
- Jenks S. M., Werdelin L., 1998. Taxonomy and systematics of living hyaenas (Family Hyaenidae). In: Mills M. G. L., Hofer H., compilers. Hyaenas: Status survey and conservation action plan. IUCN/ SSC Hyaena Specialist Group, IUCN Gland Switzerland 8–17.
- Koepfli K. P., Jenks S. M., Eizink E., et al., 2006. Molecular systematics of the hyaenidae: Relationships of a relictual lineage resolved by a molecular supermatrix. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 38(3): 603–620.
- Kurén B., 1956. The status and affinities of *Hyaena sinensis* Owen and *Hyaena ultima* Matsumoto. *Amer. Mus. Novit.*, 1764: 1–48.
- Kurén B., 1957. The bears and hyenas of the interglacials. *Quaternaria*, 4: 69–81.
- Markova A. K., Smirnov, N. G., Kozharinov, A. V., et al., 1995. Late Pleistocene distribution and diversity of mammals in northern Eurasia. *Paleontol. Evol.*, 28(29): 5–134.
- Rohland, N., Malaspinas A., Pollack J. L., et al., 2007. Proboscidean mitogenomics: Chronology and mode of elephant evolution using mastodon as outgroup. *Plos Biology*, 5(8): 1663–1671.
- Rohland, N., Pollack, J. L., Nagel, D., et al., 2005. The population history of extant and extinct hyenas. *Molecular Biology and Evolution*, 22(12): 2435–2443.
- Römpler H., Krause, J., Dear, P. H., et al., 2006. Multiplex amplification of ancient DNA. *Nature* 1(2): 720–728.
- Sheng, G. L., Lai, X. L., Hou, X. D., 2009. Standard experimental system and new technologies on ancient DNA research. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 25(2): 116–125 (in Chinese with English abstract).
- Sheng, G. L., Wu, L. J., Hou, X. D., et al., 2009. Short sequence effect of ancient DNA on mammoth phylogenetic analyses. *Frontier of Earth Science in China*, 3(1): 100–106.
- Tong H. W., 2007. Occurrences of warm-adapted mammals in North China over the Quaternary period and their paleo-environmental significance. *Science in China (Series D)*, 50(9): 1327–1340.
- Tseng, Z. J., Jin, C. Z., Liu, J. Y., et al., 2008. Fossil Hyaenidae (mammalia; carnivora) from Huainan, Anhui Province, China. *Vertebrata Palasiatica*, 46(2): 133–146.
- Turner, A., 1984. The interpretation of variation in fossil specimens of spotted hyena (*Crocuta crocuta* Erxleben, 1777) from Sterkfontein valley sites (mammalian; carnivora). *Ann. Transvaal Mus.*, 33(27): 399–418.
- Turner, A., Anón, M., Werdelin, L., 2008. Taxonomy and evolutionary patterns in the fossil Hyaenidae of Europe. *Geobios* 41(5): 677–687.
- Wayne, R. K., Leonard J. A., Cooper, A., 1999. Full of sound and fury: History of ancient DNA. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 30: 457–477.
- Watts H. E., Holekamp K. E., 2007. Hyena societies. *Current Biology*, 17(16): 657–660.
- Werdelin, L., 1999. Studies of fossil hyaenas: Affinities of *Lycyaenops rhomboideae* Kretzoi from Pestőrinc, Hungary. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 126(3): 307–317.
- Werdelin, L., Solounias N., 1991. The hyaenidae: Taxonomy, systematics and evolution. *The Fossils and Strata*, 30: 1–104.
- Wozencraft, W. C., 1993. Carnivora. In: Wilson, D. E., Reeder, D. M., eds., Mammal species of the world: A taxonomic and geographic reference. Smithsonian Institution Press, Washington DC, 279–348.
- Wurster, D. H., Benirschke, K., 1968. Comparative cytogenetic studies in the order carnivora. *Chromosoma* 24(3): 336–382.
- Yang, S. J., Lai, X. L., 2003. The first ancient DNA study of mammoth in China. *Earth Science—Journal of China University of Geosciences*, 28(2): 136, 142 (in Chinese with English abstract).
- Yang, S. J., Lai, X. L., Shi, S. H., et al., 2006. New ancient DNA sequences suggest high genetic diversity for the Woolly Mammoth (*Mammuthus primigenius*). *Progress in Nature Science*, 16(4): 380–386.
- Yang, Z. Q., Zhang, H. Q., Zhang, J., et al., 2006. Degradative factor analysis of ancient DNA preserved in human bones. *J. Fourth Mil. Med. Univ.*, 27(1): 90–92 (in Chinese with English abstract).

附中文参考文献

- 黄万波. 1989. 我国更新世两属鬣狗(*Hyaena*, *Crocuta*)的关系与分类. 古脊椎动物学报, 27(3): 197–204.
- 盛桂莲, 赖旭龙, 侯新东, 2009. 古DNA实验体系与技术. 中国生物化学与分子生物学报, 25(2): 116–125.
- 同号文. 2007. 第四纪以来中国北方出现过的喜暖动物及其古环境意义. 中国科学(D辑), 37(7): 922–933.
- 杨淑娟, 赖旭龙, 2003. 中国首例猛犸象古DNA序列. 地球科学——中国地质大学学报, 28(2): 136, 142.
- 杨周岐, 张虎勤, 张金, 等, 2006. 古人类骨骼DNA降解因素分析. 第四军医大学学报, 27(1): 90–92.