

https://doi.org/10.3799/dqkx.2018.333



广西地区晚更新世野猪对家猪的遗传贡献

侯新东¹, 盛桂莲^{1*}, 袁俊霞¹, 王元², 金昌柱², 赖旭龙¹

1. 中国地质大学生物地质与环境地质国家重点实验室, 湖北武汉 430074
2. 中国科学院古脊椎动物与古人类研究所, 北京 100044

摘要: 家猪是由居住在世界不同地区的人类对野猪的长期驯化而来, 考古学研究表明近东和中国可能是家猪的驯养中心。为了寻找野猪对家猪驯化遗传贡献的分子证据, 对采集于广西壮族自治区3个不同地点的30个晚更新世野猪化石样品开展了古DNA研究, 从化石样品中获得了线粒体基因组的D-loop部分序列, 结合现代家猪、野猪DNA同源序列信息, 构建了Network网络结构图和系统发育树。结果表明广西古代野猪与欧洲猪科动物之间存在历史基因流, 与亚洲家猪之间具有遗传的连续性, 在家猪的驯化过程中有遗传贡献。研究结果从新的地域角度为家猪的多地区驯化起源提供了分子证据。

关键词: 野猪; 晚更新世; DNA; 家猪驯化; 遗传贡献。

中图分类号: Q911

文章编号: 1000-2383(2018)11-3976-13

收稿日期: 2018-07-09

Genetic Contribution of Late Pleistocene Wild Boars in Guangxi to Domesticated Pigs

Hou Xindong¹, Sheng Guilian^{1*}, Yuan Junxia¹, Wang Yuan², Jin Changzhu², Lai Xulong¹

1. State Key Laboratory of Biogeology and Environmental Geology, China University of Geosciences, Wuhan 430074, China
2. Institute of Vertebrate Paleontology and Paleoanthropology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100044, China

Abstract: Pigs were domesticated from wild boars by humans living in different parts of the world. Archaeological studies show that the Near East and China may be the domestication centers of pigs. In order to find evidence for the genetic contribution of wild boars to pig domestication, ancient DNA study on 30 Late Pleistocene wild boar fossils collected from three caves in Guangxi, southern China was conducted. Through the use of the fragmented D-loop sequences and the homologous sequences of wild boars and domestic pigs across Asia and Europe, the network figure and phylogenetic trees of Suidae were reconstructed. The results show that the existence of historical gene flow between ancient Guangxi wild boars and European pigs, and there is a genetic continuity from ancient Guangxi wild boars to Asian domestic pigs, which suggests a genetic contribution of ancient wild boars to the pig domestication. Therefore, this study provides new molecular evidence of multiple and independent events for pig domestication in terms of geographic region.

Key words: wild boar; Late Pleistocene; DNA; pig domestication; genetic contribution.

0 引言

野猪(*Sus scrofa*)的原生种群广泛栖息于亚洲、欧洲及非洲北部(Herre and Rohrs, 1977), 人工引

入种群在美洲和大洋洲也有分布(Oliver *et al.*, 1993)。一般认为, 家猪是在距今一万多年前由居住在世界不同地区的人类经过长期对野猪驯化而来(Giuffra *et al.*, 2000; Groenen *et al.*, 2012)。考古

基金项目: 国家自然科学基金项目(Nos.41202013, 41472014, 41672017); 中国科学院重点部署项目(No.KZZD-EW-03)。

作者简介: 侯新东(1977-), 男, 副教授, 主要从事分子古生物学与分子生态学研究。ORCID: 0000-0001-5185-0812。

E-mail: houxd@cug.edu.cn

* **通讯作者:** 盛桂莲, ORCID: 0000-0003-2314-1650. E-mail: glsheng@cug.edu.cn

引用格式: 侯新东, 盛桂莲, 袁俊霞, 等, 2018. 广西地区晚更新世野猪对家猪的遗传贡献. 地球科学, 43(11): 3976-3988.

学证据表明近东和中国可能是家猪的驯养中心,家猪最早的遗骸发掘于土耳其安纳托利亚东南部 Cayonu 遗址,其年代距今约 9 000 a(Hongo and Meadow, 1998);在中国多个考古遗址也发现了家猪存在的证据,如河南舞阳贾湖遗址,距今约 9 000 a(罗运兵和张居中, 2008);内蒙古兴隆洼遗址和浙江萧山跨湖桥遗址,距今约 8 200 a(袁靖, 2006);河北武安磁山遗址,距今约 8 000 a(Yuan and Rowan, 2002).由于从野猪到家猪的驯化是一个渐进过程,处于驯化初期的家猪骨骼形态和大小非常接近野猪,很难通过形态鉴定的方法完全将二者区别开,基于形态学研究探讨家猪的驯养问题存在一定困难.

近年来,研究者先后通过分子生物学方法分析现代和古代猪科动物的线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)序列,以探讨家猪的起源、驯化和扩散等问题.Watanobe *et al.*(2001, 2002, 2004)分析了日本礼文岛 Kabukai 遗址(公元前 5~8 世纪)、冲绳 12 个考古遗址和佐渡岛 13 个绳纹时代遗址出土的猪科动物样本的 mtDNA 序列,结果表明亚洲大陆的家猪在公元前 3 世纪就已经通过商贸交易被引入到日本,有些猪种已在 2 000 a 前灭绝.有研究发现在世界范围内存在 6 个家猪独立驯化中心(Larson *et al.*, 2005),家猪的驯化最早可能出现在近东地区,然后在新石器时代进入欧洲大陆,但最终被驯养的欧洲野猪所取代(Larson *et al.*, 2007a).Ottoni *et al.*(2013)在分析 48 个考古地点的 393 个猪科动物的古线粒体 DNA 序列以及形态学数据的基础上,阐述了近东猪科动物的种群动态,为家猪在近东地区的驯化历史提供了分子证据.Larson *et al.*(2007b)分析了大洋洲和东南亚 781 个现代和古代家猪、野猪 D-loop 部分序列,发现在迁徙过程中将家猪从东南亚带到大洋洲.2010 年中国农业大学的研究者分析了 18 个古代猪和 1 500 个现代猪的线粒体 D-loop 序列,发现中国现代黄河中下游家猪和史前猪在遗传上具有延续性,确证近万年来家猪在我国中原地区延续性的驯化历史,揭示出在印度、东南亚、台湾岛沿线的 4 个独立的家猪驯化中心,此外,该研究还揭示出多个现存的、分布广泛的野猪支系,它们自始至终没有对家猪有遗传上的贡献(Larson *et al.*, 2010).王志等(2012)对黄河流域 3 个遗址出土的 14 个古代猪样本的线粒体 D-loop 序列进行分析,发现黄河上游与中下游的猪来自相同的驯化中心,但具体地点尚不能确定.近年来研究者在中国广西地区的晚更新世地层发现了很多野猪化石样

本,在开展线粒体细胞色素 b(cytochrome b, Cytb)的研究后发现广西野猪对当地家猪的驯化没有遗传贡献,但与华南野猪和亚洲家猪之间存在着遗传连续性(尹帅等, 2013; Hou *et al.*, 2014).Xiang *et al.*(2017).通过对中国 15 个考古地点猪科动物样品的线粒体 D-loop 和 Cytb 序列的研究,认为中国东北是家猪的一个驯化中心,随后向南扩展到河北和河南,支持欧洲和东亚地区家猪的早期驯化和长期遗传连续性.

历史上东南亚地区的两次人类迁徙,使得东亚大陆猪的谱系被引入到东南亚甚至大洋洲地区(Larson *et al.*, 2007a).广西是中国中部地区和东南亚之间的一个重要过渡区,李有恒和朝德芬(1978)在广西甑皮岩遗址动物群古生物学研究中发现了少量的猪化石样本,认为在广西地区存在猪的驯养,但其尚处于初期阶段.本研究以发掘于广西地区的 30 个野猪化石样本为研究材料,通过分子生物学方法获取它们的线粒体基因组的 D-loop 序列,与从 GenBank 得到的现生家猪与野猪的同源序列进行比较,开展猪科动物系统发育分析,探讨广西地区晚更新世的野猪对家猪驯化的遗传贡献,同时也为分析家猪在欧亚大陆驯化过程提供分子古生物学依据.

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用的 30 个野猪化石样品分别采自广西壮族自治区崇左市木榄山双坛洞、崇左市弄巴山洞、南宁市武鸣县楼山洞三个地点(Hou *et al.*, 2014),为牙齿样品.通过不平衡铀系法对洞穴钙板进行测定分析,获得测年结果为:弄巴山洞距今 3~5 万 a,楼山洞距今 1.3~2.4 万 a;根据木榄山双坛洞同期挖掘出土的亚洲象(*Elephas maximus*)、华南巨貘(*Megatapirus augustus*)等化石确定双坛洞野猪化石的年代是晚更新世.样品具体信息见表 1.

古 DNA 提取实验所用 GuSCN、EDTA、Silica、蛋白酶 K 等为 Sigma 公司产品;PCR 扩增引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成;Taq DNA 聚合酶、dNTPs 购自上海申能博彩生物科技有限公司;TA 克隆试剂盒购自 Takara 公司;PCR 产物纯化试剂盒为 QIAGEN 公司产品.水平电泳槽、电泳仪、凝胶图像分析系统、PCR 仪均为美国 Bio Rad 公司产品;台式冷冻离心机、微型离心机、移液器产自 Eppendorf 公司.

表 1 野猪化石样品信息

Table 1 Wild boar fossil sample information

样品编号	采集地点	年代
LSD-1~15	楼山洞, 广西武鸣	1.3~2.4 万 a
CMLST-0911-205-1~6	双坛洞, 广西崇左	晚更新世
CMLST-0911-304-1	双坛洞, 广西崇左	晚更新世
CMLST-0911-304-2	双坛洞, 广西崇左	晚更新世
CMLST-0911-321	双坛洞, 广西崇左	晚更新世
CMLST-0911-328	双坛洞, 广西崇左	晚更新世
CMLST-0911-385-1	双坛洞, 广西崇左	晚更新世
CMLST-0911-385-2	双坛洞, 广西崇左	晚更新世
CSN-0811-15	弄巴山洞, 广西崇左	3.0~5.0 万 a
CSN-0811-137	弄巴山洞, 广西崇左	3.0~5.0 万 a
CSN-0811-201	弄巴山洞, 广西崇左	3.0~5.0 万 a

注:在下文的数据分析中样品编号 CMLST-0911-将简写为 CMT;CSN-0811-将简写为 CSN-。

1.2 方法

1.2.1 古 DNA 提取 将野猪牙齿化石分别放入盛有 0.5% 次氯酸钠溶液的烧杯中浸泡 15 min, 取出放在铝箔上晾干, 然后用切割机打磨样品表面, 切割成小块, 放入已灭菌的研钵中研磨成粉末, 保证每处理完一个样品都要更换铝箔、切割机砂轮、手套等耗材, 通风橱桌面用次氯酸钠擦净, 以防样品之间的交叉污染。

每个样品称取 200~300 mg 已研磨好的粉末, 参照 Rohland *et al.* (2007) 的方法进行古 DNA 提取。基本步骤包括用提取溶液释放 DNA、用结合缓冲液(加入了二氧化硅)吸附 DNA、对吸附在硅粒上的 DNA

进行漂洗和洗脱, 最后将洗脱液保存在 -20 °C 的冰箱中。提取过程中设置空白对照, 在提取管中不加入实验样品, 提取步骤及加入试剂与样品一致。

1.2.2 PCR 扩增与产物纯化 从 NCBI 下载猪科动物的线粒体 D-loop 全序列 GenBank No. EF545591, 长度为 1 254 bp(base pair), 以其作为参考序列, 用 primer 5.0 软件来设计引物, 选择长度、GC 含量、退火温度等条件合适的引物共计 10 对交由生物公司合成(表 2)。

本研究采用多重 PCR 扩增方法 (Römpler *et al.*, 2006) 进行两次 PCR 扩增: 第 1 次扩增以 DNA 提取原液为模板, 在 PCR 反应体系中加入多对引物进行同步扩增; 第 2 次扩增以第 1 次 PCR 扩增产物的 1:20 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。PCR 反应体系和扩增条件在盛桂莲等(2009)的基础上进行了优化, 体系从 20 μ L 调整为 25 μ L, 包括 2 μ L 10 \times PCR buffer, 2.5 μ L MgCl₂ (25 mmol/L), 2 μ L BSA (10 mg/mL), 0.5 μ L dNTPs (10 mmol/L), 0.1 μ L Taq DNA 聚合酶 (5U), 3 μ L 引物混合物 (第 1 次 PCR 0.5 μ mol/L, 第 2 次 PCR 2.5 μ mol/L), 3 μ L DNA 模板, 其余部分为灭菌纯水。PCR 扩增条件为 94 °C 预变性 6 min; 94 °C 变性 25 s, 51 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 35 s; 72 °C 再延伸 10 min; 第 1 次 PCR 反应 30 个循环, 第 2 次

表 2 扩增 D-loop 序列的引物信息

Table 2 Primer information for amplification of D-loop sequences

引物编号	引物序列	引物扩增位置	扩增长度/去除引物后长度(bp)
PDL-3*	AATCGCCCACTCTTCCC	456	
PDL-4*	CATGGCTGAGTCCAAGCATC	586	131/93
PDL-5*	CGTGAAACCAGCAACCCG	333	123/82
PDL-6*	TTAGGTGAGATGGTCCTGAAGTA	455	
PDL-9	ACATGCGTATCACCACCATT	287	146/104
PDL-10	AGAACCAGATGCCTGTAAAGT	432	
PDL-13	CCAAAACAAGCATTCCATTTCGTATG	4	112/62
PDL-14	GGGGTCGCATATTTGTATGTTTGTG	115	
PDL-21	AGCATTCCATTTCGTATGCAAACC	11	119/72
PDL-22	ATGGTTAAATTTTTGGGGTCGCAT	129	
PDL-23	ACCCATAAAAAATTGCGCACAAACAT	75	121/71
PDL-24	GCATGGGGACTAGCAGTTAATGCAC	195	
PDL-27	TTATAGCCCTATGTACGTCGTGCAT	152	143/93
PDL-28	ACGCATGTTGACTGGAATTATTTGA	294	
PDL-29	TCATTATTGATCGTACATAGCACAT	239	130/80
PDL-30	AGAGGGATCCCTGCCAAGCGGGTTG	368	
PDL-31	GGCCATAAAATCGTGGGGGTTTCTA	379	132/82
PDL-32	TGATTAGTCATTAGTCCATCGAGAT	510	
PDL-39	TAGCCCTATGTACGTCGTGCATTAA	155	139/89
PDL-40	CGCATGTTGACTGGAATTATTTGAC	293	

注: 标“*”的为阿德莱德大学重复性实验引物。

表 3 获得 D-loop 序列结果统计
Table 3 Amplification result of D-loop fragments

引物样品	PDL-3,4	PDL-5,6	PDL-9,10	PDL-13,14	PDL-21,22	PDL-23,24	PDL-27,28	PDL-29,30	PDL-31,32	PDL-39,40
LSD-1	/	/	/	/	/	/	/	◆	◆	/
LSD-2	/	/	/	/	/	/	/	◆	◆	/
LSD-3	/	/	/	/	/	/	/	◆	/	◆
LSD-4	/	/	◆	/	/	◆	/	/	/	/
LSD-5	/	/	◆	◆	/	◆	/	/	/	/
LSD-6	/	/	/	/	/	◆	◆	◆	/	◆
LSD-7	/	/	/	/	/	◆	/	/	◆	◆
LSD-8	/	/	/	/	/	◆	/	◆	/	◆
LSD-9	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
LSD-10	/	/	◆	/	/	◆	/	◆	/	◆
LSD-11	/	/	/	/	/	◆	◆	/	◆	◆
LSD-12	/	/	/	/	/	/	◆	/	/	/
LSD-13	/	/	/	/	/	◆	◆	/	/	◆
LSD-14	/	/	/	/	/	/	◆	◆	◆	◆
LSD-15	/	/	/	/	/	◆	/	◆	/	/
CMT-205-1	◆	/	/	/	/	◆	/	◆	◆	/
CMT-205-2	◆	/	/	/	/	◆	◆	◆	/	/
CMT-205-3	◆	/	/	/	/	◆	/	◆	/	/
CMT-205-4	◆	/	◆	/	/	◆	/	/	◆	/
CMT-205-5	◆	/	/	/	◆	◆	/	/	/	/
CMT-205-6	/	/	/	/	/	◆	/	/	◆	◆
CMT-304-1	/	◆	◆	/	/	◆	/	/	/	/
CMT-304-2	◆	/	◆	/	/	◆	◆	/	/	◆
CMT-321	◆	◆	◆	/	/	◆	◆	◆	◆	◆
CMT-328	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
CMT-385-1	/	/	/	/	/	◆	/	/	/	/
CMT-385-2	/	/	/	/	/	◆	◆	/	/	◆
CSN-15	/	/	/	/	/	◆	◆	◆	◆	◆
CSN-137	◆	◆	◆	/	/	◆	/	/	/	◆
CSN-201	◆	/	/	◆	/	◆	/	/	/	◆

注:“◆”表示获得序列;“/”表示未获得序列.

PCR 反应 40 个循环.

PCR 扩增产物用 2.5% 琼脂糖凝胶进行检测,选取目标条带清晰、提取对照与 PCR 对照均为阴性的 PCR 扩增产物.将检测后全部剩余产物(约 20 μL)用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后,在紫外灯下切胶回收,用胶纯化试剂盒按照步骤纯化,用 Nano-Drop2000 超微量分光光度计测定纯化后 PCR 产物的浓度.

1.2.3 分子克隆与 PCR 检测 将纯化的 PCR 产物与 PMD18-T 载体按试剂盒指示进行连接,反应体积为 5 μL,4 °C 条件下放置 16~20 h.用热转化法将连接产物转化到感受态细胞 DH5α 中,再涂布到含有氨苄青霉素、X-Gal、IPTG 的 LB 固体培养基上,37 °C 过夜培养.挑选 8 个白色菌斑分别加入含有 LB 液体培养基(含 Amp)的离心管中,37 °C 振荡培养过夜.取 2 μL 菌液为模板,用 M13 引物进行 PCR 扩增,1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测选出含有目标条带的

克隆,对应的菌液送往南京金瑞斯生物科技有限公司测序.

1.2.4 系统发育分析 测序结果用 BioEdit 软件找出目标序列,然后提交 NCBI 进行 BLAST 查询,确定所获得 DNA 序列的真实性.从 NCBI 下载家猪和野猪线粒体 D-loop 序列共 1 121 条(补充信息表 S1),包括 680 个亚洲家猪序列、247 个亚洲野猪序列、129 个欧洲家猪序列、59 个欧洲野猪序列和 6 个大洋洲野猪序列,结合本研究 7 个样品得到的 167 bp D-loop 序列,这些序列所对应的地理分布见图 1,用 MEGA 7.0 软件(Kumar *et al.*, 2016)进行比对,找到同源序列,再使用 DnaSP6 软件(Rozas *et al.*, 2003)分析单倍型,最后用 Network 5.0 软件(Bandelt *et al.*, 1999)构建 Median-Joining Network 网络图.基于获得的 2 个样品 260 bp D-loop 序列,从之前下载的 1 121 条序列中选取 254 条序列(补充信息表 S2),以从 NCBI 获得的爪哇疣猪(*Sus verrucosus*)和非洲疣猪(*Phacoch-*

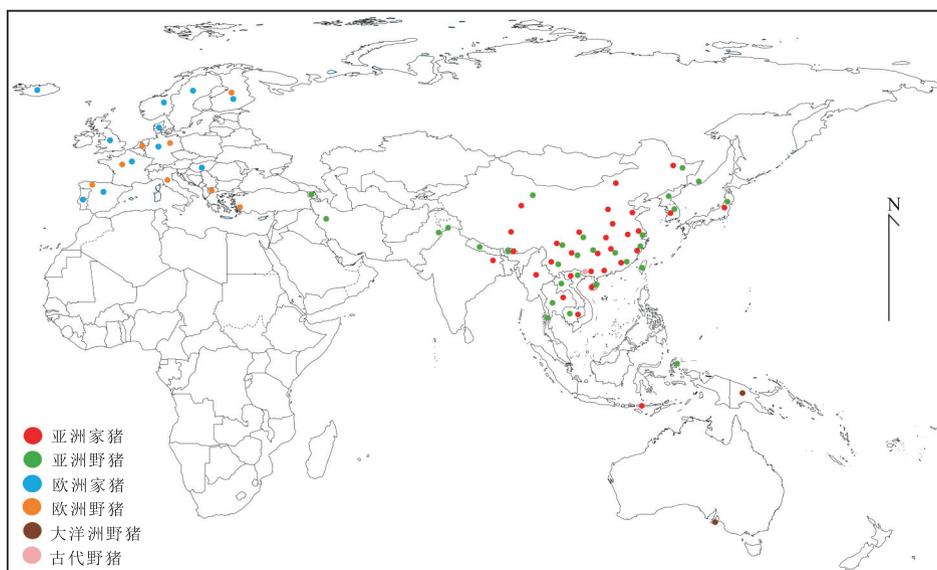


图 1 系统进化树所用家猪和野猪样品的地理位置分布示意图

Fig.1 The geographical distribution of domestic pigs and wild boar samples used in phylogenetic tree

FigTree 1.43 软件编辑后输出图片。

2 结果

2.1 多重 PCR 扩增与分子克隆结果

本研究使用 10 对 D-loop 引物扩增 30 个野猪化石样品,对 PCR 扩增得到的目标条带经分子克隆后,将 PCR 检测得到的阳性克隆菌液送生物公司进行序列测定,测序结果用 BioEdit 软件去除引物序列后,提交 GenBank 进行 BLAST 查询,验证后有 10 对引物分别从 28 个样品中成功扩增获得 94 条 DNA 序列,这些序列都是通过分子克隆后再测序所获得。从获得序列的结果来看,引物对 PDL-23,24 扩增效果最好,从 23 个样品扩增得到了目标序列;其次是 PDL-39,40,从 15 个样品中得到有效扩增;PDL-29,30,从 13 个样品中得到有效扩增;扩增效果最差的引物对是 PDL-21,22,只从 1 个样品中扩增得到目标大小的条带;引物对 PDL-13,14 和 PDL-5,6 扩增得到目标大小条带的样品数分别为 2 个和 3 个。能成功获取古 DNA 的样品占 94.3%,最多的是 CMT-321,共有 8 对引物扩增得到了 DNA 序列,最差的是 LSD-9 和 CMT-328,10 对引物都没有发生扩增反应(表 3)。对 28 个样品所获得的 D-loop 序列进行分析后发现,虽然有 21 个样品都得到了 3 条或 3 条以上的序列,但连续性较差,经过拼接后,LSD-3、LSD-6、LSD-8、LSD-10、LSD-14、CMT-321 和 CSN-15 得到了 167 bp(引物 PDL-29,

30 与 PDL-39,40 或 PDL-27,28 的扩增序列)的连续片段;CMT-205-4 和 CMT-321 得到了 260 bp(引物 PDL-3,4、PDL-9,10 与 PDL-31,32 的扩增序列)的连续片段。

2.2 单倍型与 Network 分析

基于 167 bp 的 D-loop 同源序列(1 128 条序列),使用 DNASP6 软件计算单倍型,共得到了 98 个单倍型,分别命名为 H1~H98,单倍型多样性为 0.906 8,各个单倍型所包括的序列见补充信息表 S1。H2、H6、H8、H15 和 H17 为主要单倍型,共包括 739 条序列,占总序列数量的 65.5%。本研究的野猪样品 LSD-10、LSD-3 分别属于主单倍型 H2 和 H17,LSD-8 属于单倍型 H20,LSD-6 为独立单倍型 H98,而 LSD-14、CMT-321 和 CSN-15 同属于单倍型 H69。参照序列 DQ496262 比对分析了 98 个单倍型 D-loop 序列,共发现 45 个变异位点(表 4),其中单一变异位点(Single variable sites)20 个,简约信息位点(Parsimony informative sites)25 个,在这些变异位点中存在 42 个碱基转换、3 个碱基颠换,转换包括 13 个 A→G、15 个 T→C、9 个 C→T、5 个 G→A;颠换包括 2 个 A→T 和 1 个 T→A。单倍型中存在变异位点最多的是 H50,有 10 个变异位点;最少的是 H9 和 H17,只有 1 个变异位点。利用简约 Median-Joining Network 方法分析武鸣楼山洞野猪样品 LSD-3、LSD-6、LSD-8、LSD-10、LSD-14,崇左双坛洞野猪样品 CMT-321,崇左弄巴山洞样品 CSN-15 与所选现代欧洲家猪、欧洲野猪、亚洲

表 5 单倍型类型与物种组成

Table 5 Haplotype type and species composition

物种	单倍型类型	数量	单倍型名称
欧洲野猪	独立	5	H13, H38, H39, H40, H51
欧洲家猪	独立	8	H19, H21, H22, H36, H37, H41, H42, H60
亚洲野猪	独立	44	H4, H5, H7, H11, H12, H14, H27, H30, H32, H45, H46, H47, H49, H50, H52, H53, H54, H55, H56, H57, H58, H59, H61, H62, H63, H64, H70, H71, H72, H73, H74, H75, H76, H77, H78, H86, H87, H88, H89, H90, H93, H94, H95, H96
亚洲家猪	独立	22	H1, H9, H28, H33, H34, H35, H43, H44, H65, H66, H67, H68, H79, H80, H81, H82, H83, H84, H85, H91, H92, H97
大洋洲野猪	独立	1	H48
古代野猪	独立	1	H98
亚洲家猪, 亚洲野猪	共享	4	H16, H18, H25, H31
亚洲家猪, 欧洲家猪	共享	1	H23
亚洲野猪, 欧洲家猪	共享	1	H29
亚洲家猪, 古代野猪	共享	1	H69
亚洲野猪, 欧洲野猪, 欧洲家猪	共享	2	H3, H10
亚洲家猪, 亚洲野猪, 欧洲家猪	共享	2	H15, H24
亚洲家猪, 亚洲野猪, 古代野猪, 欧洲家猪	共享	3	H6, H17, H20
亚洲家猪, 亚洲野猪, 欧洲野猪, 大洋洲野猪	共享	1	H26
亚洲野猪, 欧洲家猪, 欧洲野猪, 古代野猪	共享	1	H2
亚洲家猪, 亚洲野猪, 欧洲家猪, 欧洲野猪, 大洋洲野猪	共享	1	H8

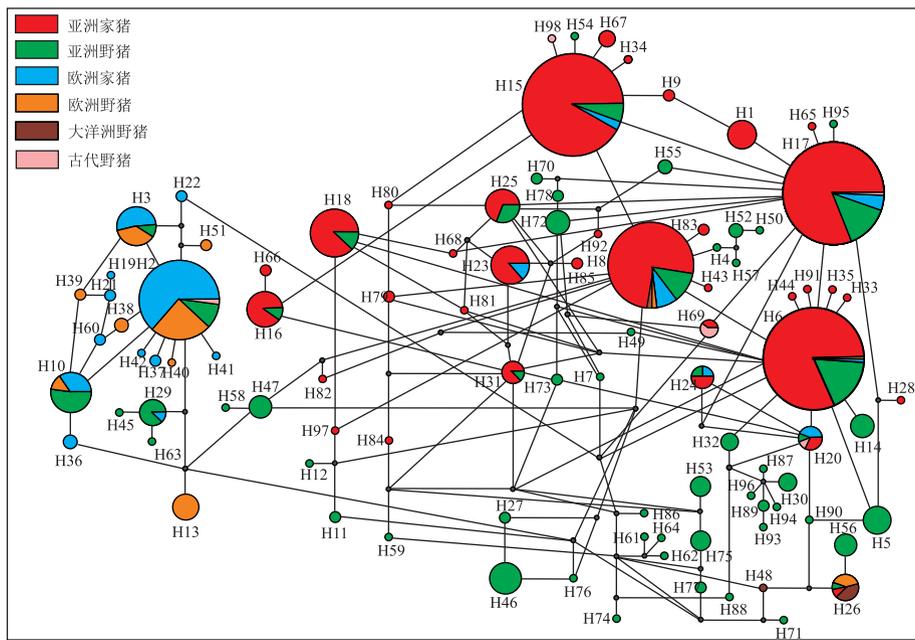


图 2 基于线粒体 D-loop 167 bp 序列构建的中介网络图

Fig.2 Median-joining network based on 167 bp sequence of mitochondrial D-loop

家猪、亚洲野猪、大洋洲野猪线粒体 D-loop 区的 167 bp 同源序列,生成中介网络图(图 2)。图中可见中间节点不连续,有很多中介节点,单倍型包括独立单倍型和共享单倍型,独立单倍型有 81 个,占总量的 82.7%;共享单倍型有 17 个,占总量的 17.3%。亚洲野猪独立单倍型最多,共有 44 个,其次是亚洲家猪有 22 个。主要单倍型 H2、H6、H8、H15 和 H17 都

属于共享单倍型,组成这些单倍型的物种见表 5。

2.3 系统进化树

基于从 CMT-205-4 和 CMT-321 获得的 260 bp 线粒体 D-loop 序列,再结合从 NCBI 下载的 254 条亚洲家猪、亚洲野猪、欧洲家猪与欧洲野猪的 D-loop 同源序列(补充信息表 S2),比对这些序列后用 ML 法构建了系统进化树,在 FigTree 软件中用不同颜

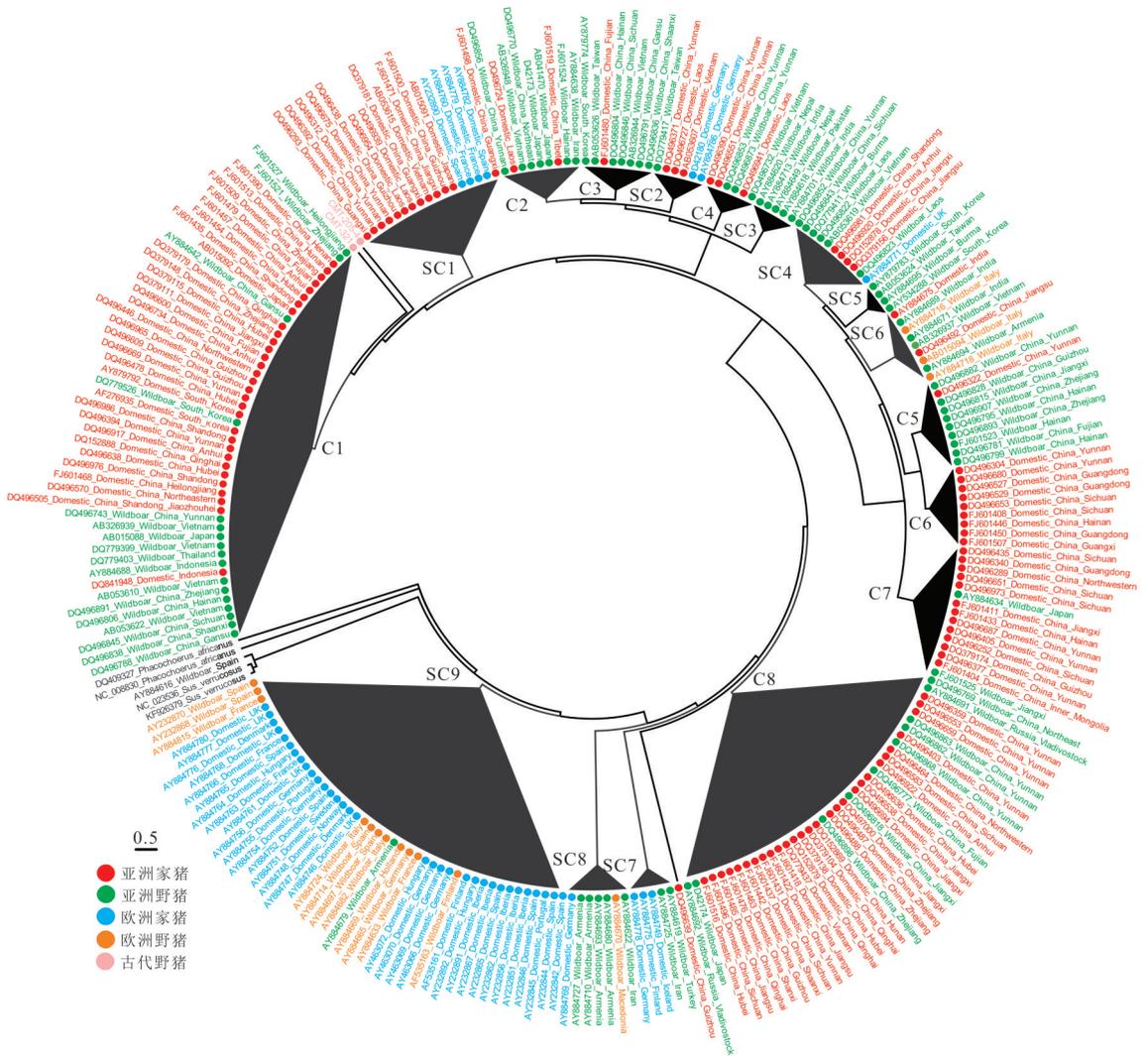


图 3 基于 260 bp D-loop 序列构建的环形进化树

Fig.3 A circular evolution tree based on 260 bp D-loop sequence

色标注了组成这些进化分枝的物种(图 3),进化分枝分成特别分枝(special clade, SC)和一般的分枝(clade, C),特别分枝标注为彩色,从 SC1~SC9;一般分枝标注为黑色,从 C1~C8.亚洲家猪和欧洲家猪构成了 SC1 分枝,SC2 与 SC4 由亚洲野猪、亚洲家猪和欧洲家猪组成,SC3 为南亚野猪分枝,SC5 为东亚野猪分枝,亚洲家猪、亚洲野猪和欧洲野猪组成了 SC6 分枝,SC7 和 SC8 包括近东地区的野猪和欧洲家猪,欧洲家猪和欧洲野猪聚为 SC9.一般分枝 C1~C8 都是由亚洲家猪和亚洲野猪所组成.本研究的两个样品 CMT-205-4 和 CMT-321 介于 SC1 与 C1 之间.有一个中国贵州的家猪样品位于 SC7 与 C8 之间,爪哇疣猪与非洲疣猪为姊妹分枝,位于进化树的根部.

3 讨论

3.1 古 DNA 序列的真实性

古 DNA 序列的真实性是指用 PCR 方法从含古 DNA 的抽提液中扩增所得到的 DNA 序列是真正的目的 DNA,而不是污染的外源 DNA.为了保证在本研究所获得真实可靠的古 DNA 序列,具体采取了如下的措施:(1)采集的化石样本在开展实验之前已进行了形态学鉴定;(2)样品保存和提取均在专用的古 DNA 实验室进行,所使用的仪器、试剂与耗材都做了无菌处理;(3)在 DNA 提取、PCR 扩增时均设置了空白对照,获得序列所对应的凝胶电泳结果在提取对照与 PCR 对照中均无目标条带出现,排除了实验中的污染;(4)测序结果经 Blast 比对,均与猪科动物的 DNA 序列有很高的相似性;(5)同样

的样品在生物地质与环境地质教育部重点实验室、澳大利亚阿德莱德大学古 DNA 研究中心开展了重复性实验(表 2),均获得了相同的实验结果。

3.2 样品古 DNA 保存情况

样品经过 3 次 DNA 提取,用 10 对引物开展了 4 次 PCR 扩增,获得的实验结果见表 3,CMT-321 的扩增成功率为 80%,而 LSD-9 和 CMT-328 为 0,其他样品均在 10%~50%之间,所有样品的平均扩增成功率为 31.3%。类似的情况也出现在野猪化石线粒体 Cytb 基因序列研究中(尹帅等, 2013; Hou *et al.*, 2014)。从测年结果来看,本研究的样品年代符合古 DNA 理论保存的年限范围,但实验结果表明古 DNA 保存情况较差,降解却较为严重。究其原因,脊椎动物死后其组织与细胞中的 DNA 在长期保存的过程中易受内源物质与外界环境的影响,呈现含量低、受损伤、高度降解等特点(Hofreiter *et al.*, 2001)。本研究样品采集地中国广西地区属于亚热带季风气候,气候温暖、雨水充沛、土壤偏酸性,这些环境条件加剧了古 DNA 的进一步降解(Callaway, 2015)。

后期,如再开展我国南方湿热地区古脊椎样品的古 DNA 研究时,要选择牙齿的牙骨质区域、其他骨骼样本的致密区用来提取 DNA,因为羟基磷灰石和胶原在骨骼和牙齿的 DNA 保存中起着重要作用(Brundin *et al.*, 2013)。骨骼致密区的骨细胞具有更好的羟基磷灰石和胶原层,能够降低 DNA 降解剂的影响,有利于 DNA 的保存;而骨骼松散区的骨细胞缺乏羟基磷灰石和胶原的保护,使 DNA 更容易受到降解剂的攻击(Misner *et al.*, 2009)。Gamba *et al.*(2014)以匈牙利考古点发掘的古人类(新时期时代到铁器时代)的颞骨(temporal bone)的岩部区域(petrous part)和牙齿为研究材料,发现颞骨岩部区域内源 DNA 含量是牙齿的 4~16 倍,认为主要是由于颞骨岩部区域比牙齿有更高的致密度,能够减弱微生物以及其他降解剂对 DNA 结构的影响。如果能够采集到合适的颞骨岩部化石,将提升广西地区古代材料古 DNA 研究成功的可能性。

3.3 家猪的驯化

约 10 000 a 前农业的兴起促进了人类社会的发展。进入新石器时代以后,随着多种动植物被驯化,使得人类社会从狩猎采集转变到了农耕生活模式(Frantz *et al.*, 2015),家猪是在这个重大转变过程中由野猪驯化而来,全球范围内家猪的驯化是一个多元的动态过程,欧洲和亚洲的家猪分别是由各地

区的野猪独立驯化而来,考古学的发现(罗运兵和张居中, 2008; Zeder, 2012)和基于线粒体序列的研究(Giuffra *et al.*, 2000; Kijas and Andersson, 2001)都证实了这一结论。Larson *et al.*(2005)研究认为在世界范围内存在中欧、亚平宁半岛、东亚、印度、东南亚半岛、太平洋新几内亚半岛这 6 个可能的家猪独立驯化中心,此结果也推动了中国家猪独立驯化的研究,已有研究表明在中国长江流域、黄河流域和青藏高原等多个地区也存在家猪的驯化(Wu *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2011; 王志等, 2012; Jin *et al.*, 2012)。在图 2 中亚洲家猪与亚洲野猪存在多个共享单倍型,这表明亚洲家猪由亚洲野猪驯化而来,这与 Kim *et al.*(2002)和 Fang and Andersson (2006)的研究结果一致。欧洲家猪与欧洲野猪所组成的共享单倍型有亚洲野猪的参与,如单倍型 H2、H3 和 H10,广西古代野猪也出现在共享单倍型 H2 中,说明欧洲野猪与亚洲野猪之间存在着历史的基因流,在欧洲野猪向欧洲家猪的驯化过程中这部分基因渗入得以保留。有研究表明野猪起源于东南亚地区,然后向西向北扩散,向西到达欧洲中部和巴尔干半岛(Larson *et al.*, 2005),受到阿尔卑斯山玉木冰期(2.4 万~1 万年前)气候变化的影响,野猪以巴尔干半岛为避难所来躲避寒冷的天气,随着间冰期气温的升高,最终扩散到了整个欧洲,而后形成了各种适应于当地环境的野猪种类(Scandura *et al.*, 2011),这也能解释在本研究 Network 网络图(图 2)中出现欧洲野猪、欧洲家猪与亚洲野猪共享一个单倍型的现象。在亚洲家猪和亚洲野猪个体为主构成的单倍型中,也存在一定比例的欧洲家猪个体(单倍型 H6、H8、H15、H17、H20、H24),这与 18、19 世纪欧洲引入大量中国家猪与欧洲家猪进行杂交培养生长快、抗病能力强的欧洲家猪新品种(Giuffra *et al.*, 2000; Groenen *et al.*, 2012)的事件相印证,中国家猪的基因渗入到欧洲家猪,已有研究证实了该基因渗入现象(Frantz *et al.*, 2015; Ai *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2017)。本研究的图 2、图 3 虽然呈现了亚洲和欧洲的家猪来自于各自地区野猪的独立驯化,但由于获得的古 DNA 片段较短,不能显著地显示家猪独立驯化的地理区域。

图 2 中单倍型 H26 属共享单倍型,由大洋洲野猪、欧洲野猪、亚洲野猪、亚洲家猪所构成,在 Ramos-Onsins *et al.*(2014)的研究中也呈现了欧洲野猪与大洋洲野猪组成共享单倍型的结果。究其原因,可能与新石器时代亚洲野猪随人类迁徙(Larson

et al., 2007a) 以及 18 世纪欧洲移民将本地野猪带入大洋洲有关 (Meijaard *et al.*, 2011)。从图 2 单倍型 H2、H17、H20 和 H69 的组成以及图 3 的系统树的分支组成来看, 广西古代野猪在家猪的驯化过程中有遗传贡献, 但与广西当地现代家猪群体没有明确的遗传关系, 可能原因有以下两点: 其一, 广西古代野猪向西向北扩散 (Larson *et al.*, 2005), 在扩散过程中被驯化为家猪; 其二, 广西古代野猪向南向东扩散, 在东南亚地区以及台湾被驯化, 随人类的迁徙到达东南亚诸岛、新几内亚岛以及夏威夷岛等 (Dobney *et al.*, 2008; Larson *et al.*, 2010)。欧洲家猪的驯化最早起源于近东地区, 在新石器时代被引入欧洲, 而在同一时期欧洲的野猪也在被驯化, 由于存在不断的基因交流, 欧洲野猪被驯化后迅速取代了引入的近东家猪 (Larson *et al.*, 2007b; Zeder, 2012)。在图 3 中, SC7、SC8 与 SC9 分枝的进化关系显示了与上述结论相对应的结果, C1 分枝主要由亚洲野猪和亚洲家猪构成, 广西古代野猪的两个样品中 CMT-321 与进化分枝 C1 互为姊妹分枝, 而 CMT-205-4 的拓扑位置位于该姊妹分枝的根部, 表明广西古代野猪与亚洲家猪之间存在着遗传的连续性。图 3 中也显示了广西古代野猪与亚洲家猪、亚洲野猪的亲缘关系较近, 而与欧洲家猪、欧洲野猪的亲缘关系较远, 这一发现与基于广西同批样品开展线粒体 Cytb 基因研究结果一致 (Hou *et al.*, 2014)。

本研究中的野猪化石样本年代都超过了 1.3 万年, 样品中所保存的古 DNA 分子片段化非常严重, 通过 PCR 扩增和分子克隆, 部分样本获得了 167 bp 和 260 bp 的连续序列。与全基因组以及线粒体基因组相比, 本研究得到的短序列中存在的变异位点相对较少, 但基于本研究所获序列及现代群体的同源序列的系统发育分析结果, 能为广西古代野猪与欧洲猪科动物之间存在历史基因流、与亚洲家猪之间具有遗传的连续性、在家猪的驯化过程中有遗传贡献等群体遗传学事件提供一定的分子证据。相信在结合杂交捕获方法与高通量测序技术 (Hofreiter *et al.*, 2014) 后, 必将有望从该地区野猪化石中获得更多且连续性更好的序列, 为家猪的驯化研究提供更加有力的古基因组水平的数据支持。

致谢: 感谢澳大利亚阿德莱德大学 (The University of Adelaide) 古 DNA 研究中心 (Australian Centre for Ancient DNA) 的 Alan Cooper 教授为本研究重复性实验所提供的实验条件和技术支持! 感谢澳大利亚古 DNA 研究中心的 Jeremy Austin 博

士在重复性实验期间给予的帮助! 本论文得到国家留学基金资助 (201706415009), 在此表示衷心的感谢! 感谢德国波茨坦大学生物化学与生物学研究所 Michael Hofreiter 教授在数据分析时提供的帮助! 感谢审稿老师提出的宝贵意见!

附补充信息表 S1、S2 见: <http://www.earth-science.net/WebPage/view.aspx?id=20181031060758.pdf>

References

- Ai, H. S., Fang, X. D., Yang, B., et al., 2015. Adaptation and Possible Ancient Interspecies Introgression in Pigs Identified by Whole-Genome Sequencing. *Nature Genetics*, 47(3): 217–225.
- Bandelt, H. J., Forster, P., Röhl, A., 1999. Median-Joining Networks for Inferring Intra-Specific Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1): 37–48.
- Brundin, M., Figdor, D., Sundqvist, G., et al., 2013. DNA Binding to Hydroxyapatite: A Potential Mechanism for Preservation of Microbial DNA. *Journal of Endodontics*, 39(2): 211–216.
- Callaway, E., 2015. Hot Climes Yield Ancient DNA. *Nature*, 526(7573): 303.
- Chen, M. H., Su, G. S., Fu, J. L., et al., 2017. Population Admixture in Chinese and European *Sus Scrofa*. *Scientific Reports*, 7(1): 13178.
- Dobney, K., Cucchi, T., Larson, G., 2008. The Pigs of Island Southeast Asia and the Pacific: New Evidence for Taxonomic Status and Human-Mediated Dispersal. *Asian Perspectives*, 47(1): 59–74.
- Fang, M., Andersson, L., 2006. Mitochondrial Diversity in European and Chinese Pigs is Consistent with Population Expansions That Occurred Prior to Domestication. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1595): 1803–1810.
- Frantz, L. A., Schraiber, J. G., Madsen, O., et al., 2015. Evidence of Long-Term Gene Flow and Selection during Domestication from Analyses of Eurasian Wild and Domestic Pig Genomes. *Nature Genetics*, 47(10): 1141–1148.
- Gamba, C., Jones, E. R., Teasdale, M. D., et al., 2014. Genome Flux and Stasis in a Five Millennium Transect of European Prehistory. *Nature Communications*, 5: 5257.
- Giuffra, E., Kijas, J. M., Amarger, V., et al., 2000. The Origin of the Domestic Pig: Independent Domestication and Subsequent Introgression. *Genetics*, 154: 1785–1791.
- Groenen, M. A., Archibald, A. L., Uenishi, H., et al., 2012. Analyses of Pig Genomes Provide Insight into Porcine Demography and Evolution. *Nature*, 491: 393–398.

- Herre, W., Rohrs, M., 1977. Zoological Considerations on the Origins of Farming and Domestication. In: Reed, C. A., ed., *Origins of Agriculture*. The Hague, Mouton, 245—279.
- Hofreiter, M., Pajmians, J. L. A., Goodchild, H., et al., 2014. The Future of Ancient DNA: Technical Advances and Conceptual Shifts. *Bio Essays*, 37(3): 284—293.
- Hofreiter, M., Serre, D., Poinar, H. N., et al., 2001. Ancient DNA. *Nature Reviews Genetics*, 2(5): 353—359.
- Hongo, H., Meadow, R. H., 1998. Pig Exploitation at Neolithic Cayonu Tepesi (South-eastern Anatolia). In: Nelson S., ed., *Ancestors for the Pigs: Pigs in Prehistory*. MAS-CA Research Papers in Science and Archaeology. University of Pennsylvania, Museum Applied Science Center for Archaeology, Philadelphia, 77—98.
- Hou, X. D., Sheng, G. L., Yin, S., et al., 2014. DNA Analyses of Wild Boar Remains from Archaeological Sites in Guangxi, China. *Quaternary International*, 354: 147—153.
- Jin, L., Zhang, M. W., Ma, J. D., et al., 2012. Mitochondrial DNA Evidence Indicates the Local Origin of Domestic Pigs in the Upstream Region of the Yangtze River. *PLoS One*, 7(12): e51649.
- Kijas, J. M. H., Andersson, L., 2001. A Phylogenetic Study of the Origin of the Domestic Pig Estimated from the Near-Complete MtDNA Genome. *Journal of Molecular Evolution*, 52(3): 302—308.
- Kim, K. I., Lee, J. H., Li, K., et al., 2002. Phylogenetic Relationships of Asian and European Pig Breeds Determined by Mitochondrial DNA D-Loop Sequence Polymorphism. *Animal Genetics*, 33(1): 19—25.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7): 1870—1874.
- Larson, G., Albarella, U., Dobney, K., et al., 2007a. Ancient DNA, Pig Domestication, and the Spread of the Neolithic into Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(39): 15276—15281.
- Larson, G., Cucchi, T., Fujita, M., et al., 2007b. Phylogeny and Ancient DNA of *Sus* Provides Insights into Neolithic Expansion in Island Southeast Asia and Oceania. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(12): 4834—4839.
- Larson, G., Dobney, K., Albarella, U., et al., 2005. Worldwide Phylogeography of Wild Boar Reveals Multiple Centers of Pig Domestication. *Science*, 307(5715): 1618—1621.
- Larson, G., Liu, R. R., Zhao, X. B., et al., 2010. Patterns of East Asian Pig Domestication, Migration, and Turnover Revealed by Modern and Ancient DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(17): 7686—7691.
- Li, Y. H., Han, D. F., 1978. The Ruins Fauna from Zengpiyan at Guilin, Guangxi. *Vertebrata Palasiatica*, 16(4): 244—254 (in Chinese).
- Luo, Y. B., Zhang, J. Z., 2008. Restudy of the Pigs' Bones from the Jiahu Site in Wuyang County, Henan. *Archaeology*, 1: 90—96 (in Chinese with English abstract).
- Meijaard, E., Huart, J. P., Oliver, W. L. R., 2011. Family Suidae (Pigs). In: Wilson, D. E., Mittermeier, R. A., eds., *Hand Book of the Mammals of the World (Volume 2)*. Lynx Edicions Barcelona, Spain, 248—291.
- Misner, L. M., Halvorson, A. C., Dreier, J. L., et al., 2009. The Correlation between Skeletal Weathering and DNA Quality and Quantity. *Journal of Forensic Sciences*, 54(4): 822—828.
- Oliver, W. L. R., Brisbin, I. L. J., Takahashi, S., 1993. The Eurasian Wild Pig (*Sus scrofa*). In: Oliver, W. L. R., ed., *Status Survey and Conservation Action Plan: Pigs, Peccaries and Hippos (Chapter 5.2)*. IUCN, Gland, Switzerland, 112—121.
- Otonari, C., Flink, L. G., Evin, A., et al., 2013. Pig Domestication and Human-Mediated Dispersal in Western Eurasia Revealed through Ancient DNA and Geometric Morphometrics. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4): 824—832.
- Ramos-Onsins, S. E., Burgos-Paz, W., Manunza, A., et al., 2014. Mining the Pig Genome to Investigate the Domestication Process. *Heredity*, 113(6): 471—484.
- Rohland, N., Malaspina, 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.
- Römpler, H., Krause, J., Dear, P. H., et al., 2006. Multiplex Amplification of Ancient DNA. *Nature*, 1(2): 720—728.
- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X., et al., 2003. DnaSP, DNA Polymorphism Analyses by the Coalescent and Other Methods. *Bioinformatics*, 19(18): 2496—2497.
- Scandura, M., Iacolina, L., Apollonio, M., et al., 2011. Genetic Diversity in the European Wild Boar *Sus Scrofa*: Phylogeography, Population Structure and Wild x Domestic Hybridization. *Mammal Review*, 41(2): 125—137.
- 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).
- Wang, Z., Xiang, H., Yuan, J., et al., 2012. Exploring the Origin

- of Domesticated Pigs in the Yellow River Area Using Information from Ancient DNA. *Chinese Science Bulletin*, 57(12): 1011–1018 (in Chinese with English abstract).
- Watanobe, T., Ishiguro, N., Nakano, M., et al., 2002. Prehistoric Introduction of Domestic Pigs onto the Okinawa Islands: Ancient Mitochondrial DNA Evidence. *Journal of Molecular Evolution*, 55(2): 222–231.
- Watanobe, T., Ishiguro, N., Nakano, M., et al., 2004. Prehistoric Sado Island Populations of *Sus Scrofa* Distinguished from Contemporary Japanese Boar by Ancient Mitochondrial DNA. *Zoological Science*, 21(2): 219–228.
- Watanobe, T., Ishiguro, N., Okumura, N., et al., 2001. Ancient Mitochondrial DNA Reveals the Origin of *Sus Scrofa* from Rebun Island, Japan. *Journal of Molecular Evolution*, 52(3): 281–289.
- Wu, G. S., Yao, Y. G., Qu, K. X., et al., 2007. Population Phylogenomic Analysis of Mitochondrial DNA in Wild Boars and Domestic Pigs Revealed Multiple Domestication Events in East Asia. *Genome Biology*, 8(11): R245.
- Xiang, H., Gao, J. Q., Cai, D. W., et al., 2017. Origin and Dispersal of Early Domestic Pigs in Northern China. *Scientific Reports*, 7(1): 5602.
- Yang, S. L., Zhang, H., Mao, H. M., et al., 2011. The Local Origin of the Tibetan Pig and Additional Insights into the Origin of Asian Pigs. *PLoS One*, 6(12): e28215.
- Yin, S., Sheng, G. L., Hou, X. D., et al., 2013. Ancient DNA from Wild Boar Fossils in Guangxi and Its Implication for Pig Domestication. *Vertebrata Palasiatica*, 51(4): 321–330 (in Chinese with English abstract).
- Yuan, J., 2006. The Origins of Pigs in Ancient China. *West Archaeology*, 43–49 (in Chinese with English abstract).
- Yuan, J., Rowan, F., 2002. Pig Domestication in Ancient China. *Antiquity*, 76(293): 724–732.
- Zeder, M. A., 2012. The Domestication of Animals. *Journal of Anthropological Research*, 68(2): 161–190.

附中文参考文献

- 李有恒, 韩德芬, 1978. 广西桂林颤皮岩遗址动物群. 古脊椎动物学报, 16(4): 244–254.
- 罗运兵, 张居中, 2008. 河南舞阳县贾湖遗址出土猪骨的再研究. 考古, 1: 90–96.
- 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.
- 王志, 向海, 袁靖, 等, 2012. 利用古代 DNA 信息研究黄河流域家猪的起源驯化. 科学通报, 57(12): 1011–1018.
- 尹帅, 盛桂莲, 侯新东, 等, 2013. 广西地区野猪化石古 DNA 及猪的驯化初探. 古脊椎动物学报, 51(4): 321–330.
- 袁靖, 2006. 中国古代的家猪起源. 西部考古, 43–49.