



新疆木垒县平顶山墓群出土马骨的 DNA 研究*

- ◆ 赵欣 (中国社会科学院考古研究所 西蒙菲莎大学考古学系古 DNA 实验室)
- ◆ 东晓玲 (中国社会科学院考古研究所)
- ◆ 韩雨 (首都师范大学历史学院)
- ◆ 尤悦 (中国社会科学院考古研究所)
- ◆ 李志鹏 (中国社会科学院考古研究所)
- ◆ 巫新华 (中国社会科学院考古研究所)
- ◆ 陈代明 (中国社会科学院考古研究所)
- ◆ 杨东亚 (中国社会科学院考古研究所 西蒙菲莎大学考古学系古 DNA 实验室)

摘要:运用古 DNA 技术对新疆木垒县青铜时代中晚期平顶山墓群出土马骨进行遗传学分析。共选取 8 匹马骨骼样本,从中提取 DNA 并对线粒体 DNA 控制区和毛色控制基因的核 DNA 进行 PCR 扩增。全部样本获得了线粒体 DNA 序列,在 8 个序列中共检测出 7 个不同的单倍型,可以归属到 5 个不同的谱系 A、D、E、F、G,均属于家马的范畴。毛色控制基因的 SNP 检测结果显示该墓群古代马的毛色有栗色(chestnut)、栗色有白斑(chestnut tobiano)、黑色(black)和金黄色(palomino)四种。平顶山墓群家马与年代稍晚但地域相近的石人子沟遗址家马一样,都具有相对较高的线粒体 DNA 和毛色的遗传多样性,推测这里应该是古代一个非常重要的产马地。此外这两个遗址家马毛色控制基因的核 DNA 研究都印证了古代人、马匹、墓葬、社会文化之间存在着复杂的关系。

关键词: 平顶山墓群 ; 家马 ; 古 DNA ; 毛色

Abstract: This research aimed to use an ancient DNA approach to genetically characterize ancient horse remains of the Middle and Late Bronze Age from Pingdingshan site in Mulei, Xinjiang, China. DNA was successfully recovered from 8 ancient horse skeletal remains in dedicated ancient DNA labs following vigorous protocols for contamination prevention. Both mitochondrial DNA (mtDNA) and single nucleotide polymorphic (SNP) markers for coat colors were PCR amplified and sequenced, resulting in a high success rate (100%) for both mtDNA and SNP markers. The obtained ancient DNA data revealed 7 haplotypes belonging to 5 different haplogroups (A, D, E, F and G) and 4 different coat colors (chestnut, chestnut tobiano, black and palomino), suggesting that all the ancient individuals belong to domesticated horse. The huge genetic diversity and composition of mtDNA and SNP markers for coat color of the horse remains from Pingdingshan site are found to be similar to those from nearby Shirenzigou site with slightly later antiquity, indicating this geographic region would be important for horse husbandry. A unique burial pattern (sex and coat color) of sacrificial horses strongly implied a complex relationship among people, horse, status and burial practices of the region.

Key Words: Pingdingshan site ; domesticated horses ; ancient DNA ; coat color

木垒哈萨克自治县是新疆维吾尔自治区昌吉回族自治州最东边的一个县,位于东天山北麓,准噶尔盆地东南缘,奇台县以东,巴里坤县以西,南倚天山与鄯善县隔山相望,北与蒙古人民共和国交界。木垒

是沟通吐鲁番盆地、哈密盆地、准噶尔盆地、蒙古高原、将军戈壁的交通枢纽地带。除了极为重要的战略地位,还拥有丰沛的天山来水和广大的山地草场,尤其以平顶山丘陵地带为代表的广大丘陵山是古代东

*项目号:中国社会科学院创新工程项目,第 51 批中国博士后科学基金面上资助二等资助(批准号:2012M510694),国家社会科学基金项目“中国家马起源的分子考古学研究”(14BKG023),Henry Luce Foundation 与 SFU SMALL SSHRC 共同资助。

天山一带不可多得的优良草原。鉴于此,本文以新疆木垒平顶山墓群出土的马骨作为研究对象,对其进行了采集,DNA提取,并选择线粒体DNA控制区(mtDNA D-loop)和毛色控制基因的核DNA片段进行PCR扩增,以及DNA数据分析,以揭示该地区古代马的遗传结构和变化。

一、材料与方法

1、样本采集

平顶山墓群位于新疆木垒县照壁山乡平顶山村东南方圆10多平方公里的山地丘陵中。经新疆文物局审核同意并报国家文物局批准颁发证照,中国社会科学院考古研究所新疆考古队于2015年6月进入木垒县开展考古发掘工作。据发掘者介绍遗址共分布有6处古代墓葬遗址群,年代大约为青铜时代中晚期(¹⁴C年代测定为公元前一千纪至公元前六世纪),性质初步判断为天山寨人游牧文化墓葬与祭祀遗址。

在动物考古学家进行种属、性别、年龄鉴定的基础上,本文对出土于平顶山墓群的8匹马骨骼样本进行了采集,样本的具体信息见表一。

vitrogen)直接测序,正反引物双向测序。PCR产物所得到的序列使用Chromas Pro软件进行读取,通过Clustal X2软件进行序列比对,并使用BioEdit进行编辑。在全部实验过程中,严格按照防污染措施操作。具体的实验步骤详见。

二、结果

1、线粒体DNA控制区序列变异情况及单倍型类群归属

全部8个古代马骨样本都获得了线粒体DNA控制区的262bp序列(15493~15754,去除两端引物)。以X79547作为参考序列进行比对,实验结果见表二。共检测出24个多态性位点,23个位点为转换,1个位点(15532C)为缺失,没有颠换与插入,且转换主要在嘌呤之间,占60.9%(14/23),显示出较高的遗传多态性。这8个序列中共检测出7个单倍型,其中EQC87与EQC89共享同一单倍型。

根据Jansen等、McGahern等的关于单倍型类群的划分,基于线粒体DNA序列变异模式,本文的7个单倍型可以归属于6个不同的单倍型类群,分别为A6、A7、D2、E、F3、G,详见表二。

表一 平顶山墓群出土古代马样本采集情况

序号	实验编号	出土单位	取样部位	性别	年龄
1	EQC86	D区M1 殉马台马1	右后第一趾骨	雄性	10岁以上
2	EQC87	D区M1 殉马台马2	右前第一趾骨	雄性	较马1年轻
3	EQC88	D区M1 殉马台马3	右后第一趾骨	——	——
4	EQC89	D区M1 殉马台马4	左前第一趾骨	雄性	较马2年轻
5	EQC90	YBM5 墓口北侧石棺内侧	左后第一趾骨	——	——
6	EQC91	YAM2	左后第一趾骨	雄性	15岁以上
7	EQC92	YBM11	右后第一趾骨	——	——
8	EQC93	南梁M28	右第一趾骨	雄性	15岁以上

注:——表示由于骨骼保存情况所限,相关信息无法提供。

2、实验方法

首先取马骨上约1cm×1cm见方的小块,用钻头打磨骨骼表面和截面以去除骨骼表面尘垢,次氯酸钠溶液(有效氯6%)浸泡和紫外照射,以去除外源DNA污染,之后打磨成粉,在此基础上采用Yang等提出的硅柱离心法进行DNA提取,并选择线粒体DNA控制区(mtDNA D-loop)和毛色控制基因的核DNA片段进行PCR扩增,扩增产物用2%琼脂糖凝胶进行电泳检测。PCR阳性产物送到测序公司(In-

2、毛色控制基因的SNP位点检测

控制毛色的基因数量很多,本文仅选择常见的和研究相对较深入的6种毛色控制基因的8个SNP位点进行检测,包括MC1R(g.201)、ASIP(g.2183~2193del)、MATP(g.72)、KIT(g.786)、KIT(g.1120)、SILV(g.1457)、SILV(g.697)、EDNRB(c.323_333),其野生型为E/E、A/A、C/C、KM0/KM0、sb1/sb1、z/z、z/z、ov/ov。

本文选择的8个古代马骨样本获得了全部SNP变异结果,详见表三。在本文的检测中,所有样本的

表二 平顶山墓群出土古代马的线粒体 DNA 控制区序列情况

实验编号	变异位点	单倍型类群
EQC86	15495C, 15542T, 15597G, 15602T, 15650G, 15666A, 15720A	A7
EQC87, EQC89	15495C, 15521A, 15585A, 15596G, 15602T, 15720A, 15737C	E
EQC88	15495C, 15585A, 15602T, 15604A, 15703C, 15720A, 15740G	F3
EQC90	15494C, 15495C, 15496G, 15534T, 15585A, 15603C, 15649G, 15720A	D2
EQC91	15495C, 15532-, 15585A, 15600A, 15602T, 15604A, 15650G, 15720A	A6
EQC92	15495C, 15532-, 15585A, 15602T, 15720A	A6
EQC93	15495C, 15598C, 15602T, 15615G, 15616G, 15703C, 15720A	G

注: -表示该位点缺失。

基因型都与野生型不同,但发生变异的只有 MC1R (g.201), ASIP (g.2183~2193del), MATP (g.72) 和 KIT (g.786), 是分别控制栗色 (chestnut)、黑色 (black)、乳白色 (cream) 和白色斑点 (tobiano) 的基因。而 KIT (g.1120), SILV (g.1457), SILV (g.697) 和 EDNRB (c.323_333) 并未发生变异。

根据毛色基因 SNP 检测结果及其所控制的表型特征,结合已有的关于家马毛色基因的研究^{①②③④}, 本文对平顶山墓群出土古代马的毛色进行推测: EQC86 和 EQC88 这 2 个个体应该是黑色 (black), EQC87 和 EQC89 这 2 个个体应该是栗色带有白斑 (chestnut tobiano), EQC90、EQC91 和 E-

QC92 这 3 个个体应该是栗色 (chestnut), EQC93 应该是金黄色 (palomino)。

三、讨论

1、线粒体 DNA 研究

目前学术界关于马的线粒体 DNA 单倍型类群有几种不同的划分和命名方法。由于以往研究多集中在马的线粒体 DNA 控制区短片段序列分析上,特别是中国古代家马的线粒体 DNA 研究亦如是,并且都是依据 Jansen 等^⑤与 McGahern 等^⑥在线粒体 DNA 单倍型类群的命名原则,因此本文亦采用该命名原则。

表三 SNP 检测结果及马的毛色基因型与表型特征

实验编号	MC1R	ASIP	MATP	KIT	KIT	SILV	SILV	EDNRB	毛色
	g.201C>T	g.2183~2193del	g.72G>A	g.786G>C	g.1120T>A	g.1457C>T	g.697A>T	c.323_333TC>AG	
EQC86	E/e	a/a	C/C	KM0/KM0	sb1/sb1	z/z	z/z	ov/ov	黑色 (black)
EQC87	e/e	A/a	C/C	KM0/KM1	sb1/sb1	z/z	z/z	ov/ov	栗色有白斑 (chestnut tobiano)
EQC88	E/e	a/a	C/C	KM0/KM0	sb1/sb1	z/z	z/z	ov/ov	黑色 (black)
EQC89	e/e	A/a	C/C	KM0/KM1	sb1/sb1	z/z	z/z	ov/ov	栗色有白斑 (chestnut tobiano)
EQC90	e/e	A/A	C/C	KM0/KM0	sb1/sb1	z/z	z/z	ov/ov	栗色 (chestnut)
EQC91	e/e	A/A	C/C	KM0/KM0	sb1/sb1	z/z	z/z	ov/ov	栗色 (chestnut)
EQC92	e/e	A/a	C/C	KM0/KM0	sb1/sb1	z/z	z/z	ov/ov	栗色 (chestnut)
EQC93	e/e	A/A	C/Cr	KM0/KM0	sb1/sb1	z/z	z/z	ov/ov	金黄色 (palomino)

注: 有灰色阴影的基因型表示至少有一个等位基因的位点与野生型不同。

本文检测到的7个线粒体DNA单倍型可以归属于5个不同的谱系A、D、E、F、G,进一步可划分到6个不同的单倍型类群A6、A7、D2、E、F3、G,既有现代家马群体中高频出现的谱系A、D、F,又有现代家马群体中所占比例较低的谱系E、G,显示出平顶山墓群所在地区古代马群已有非常高的线粒体DNA遗传多样性。但是并没有检测到属于普氏野马的单倍型类群A2的个体。由此可以认为平顶山墓群出土的马骨均属于家马的范畴。

根据Cai等^①对18个马群的统计来看,谱系A在整个欧亚大陆的家马群体中都具有较高的频率;谱系D在伊比利亚半岛群体中的分布频率最高,其次为非洲,并从欧洲到亚洲呈递减的分布频率;谱系F在东亚的蒙古马和韩国济州马中有最高的分布频率,而在伊比利亚半岛、不列颠半岛群体中的频率最低,显示出从东亚向欧洲递减的分布频率。谱系E主要分布在现在冰岛、设得兰群岛和Fjord的矮种马中;谱系G主要分布在德国帕德伯恩附近的一种叫做Senner的马群中,而在其他马种中分布极少^②。

关于中国古代家马的线粒体DNA研究目前已发表的文章有5篇^{③④⑤⑥⑦}。我们将本文所发现的8匹马与其他中国古代家马的线粒体DNA序列进行了比较分析。本文样本检测到的谱系A、D、E、F、G在其他中国古代家马中均有分布,并且有一些单倍型在其他中国古代家马中找到了与之完全相同或仅相差一个位点的共享序列。其中,属于谱系A的E-QC92,与小双古城遗址LS02(GenBank NO.: EU931604,频率1/4;年代2500a B.P.)相比,仅有15532缺失这一个位点的区别。属于谱系F的E-QC88,与于家庄遗址YJZ02(GenBank NO.: EU931608,频率1/2;年代2500a B.P.),相差一个位点为15585,该位点为经常发生回复突变的突变热点,说明它们之间的母系亲缘关系非常近。

需要特别指出的是EQC87和EQC89,它们与新疆巴里坤县石人子沟遗址EQ16、EQ21和EQ24具有相同的线粒体DNA控制区序列,都属于谱系E。关于谱系E在中国古代家马中的分布研究,赵等^⑧的文章中已有详细阐述。本文研究发现的属于谱系E的两匹马与新疆石人子沟遗址的三匹马共享有相同的线粒体DNA序列,说明它们之间具有非常近的母系亲缘关系,甚至可能具有相同的母系来源。

平顶山墓群位于木垒哈萨克自治县,是新疆维吾尔自治区昌吉回族自治州最东边的一个县,巴里坤县以西,石人子沟遗址即位于新疆巴里坤县。这两个遗址位于相邻的县,都在东天山北麓。从年代上

看,据发掘者介绍平顶山墓群的年代大约为青铜时代中晚期(¹⁴C年代测定为公元前一千纪至公元前六世纪),石人子沟遗址中墓葬的年代约为西汉前期(¹⁴C年代测定为400~120BC),二者在年代上具有连续性。从文化面貌来看,这两个遗址都属于天山草原地带游牧文化性质。而马的DNA研究发现在这两个遗址中都有属于谱系E(然而E在现代马群中并不是一个常见的谱系)、并且共享有相同线粒体DNA序列的马匹作为殉牲埋于墓葬中,说明在该地区从青铜时代中晚期至西汉前期家马的DNA具有遗传连续性。人们生活于此应该一直都有养马、育马的传统。

2、毛色研究

平顶山墓群出土8匹马的毛色有栗色(chestnut)、栗色有白斑(chestnut tobiano)、黑色(black)和金黄色(palomino)四种,与线粒体DNA一样具有较高的遗传多样性,这一点也与新疆石人子沟遗址^⑨相似。在石人子沟遗址的5匹家马中检测到栗色(chestnut)、枣色(bay)和金黄色(palomino)3种不同的毛色。金黄色马从基因上来看主要是由原毛色栗色在乳白色基因MATP(g.72)等位基因的一个位点发生突变形成的,可以由父亲或母亲遗传给下一代。从表型上来看身上毛发为金黄色,四肢、鬃毛和尾毛为白色。与栗色、枣色、黑色等常见毛色相比,属于比较少见的毛色。这种比较罕见的金黄色马在平顶山墓群和石人子沟遗址都有出现,也反映了该地区从青铜时代中晚期至西汉前期家马具有遗传连续性。并且当时人们可能对金黄色马具有偏爱,在石人子沟遗址将它作为殉牲与墓主人一同埋葬于墓室内。当时人们应该有意识地一直在培育这一颜色的马,使其基因型始终能够遗传下去,但是根据目前的DNA资料我们还无法解释当时人们是如何实现这一目的的。因为从线粒体DNA上看,在我们发现的这两匹金黄色马中,平顶山墓群的属于谱系G,石人子沟遗址的属于谱系B,它们分别属于不同的母系来源,并且这两个谱系在现代家马中所占的比例都较低,在东亚家马中所占的比例更低。谱系B在中亚地区的家马中具有相对较高的分布频率^⑩;谱系G主要分布在德国一个特殊的马群中,在其他马种中分布极少^⑪。因此并不排除在年代相对较早的时期,新疆地区的古代人们为了获得金黄色的马而不断地从外面引进。

在平顶山墓群D区M1殉马台上共埋葬4匹家马,根据动物考古学家分析认为,马1、马2、马3、马4依次排列,除马3骨骼保存较差、比较零乱而较难

作进一步判断外,马1、马2和马4都保持着相似的姿势,头向和背向都一致,且均为雄性。毛色鉴定发现这4匹马的毛色似乎亦有规律可寻,马1至马4依次为黑色、栗色有白斑、黑色、栗色有白斑。因此我们推测在殉马台埋葬这4匹家马时,应该与石人子沟遗址将金黄色马与墓主人同葬于墓室^⑧、枣树沟脑遗址马坑中全部是枣色马^⑨一样,很可能都是当时人们有意识的行为。值得一提的是,马2和马4不仅颜色一致都是栗色有白斑,其线粒体DNA序列也是一样的,并且都是成年雄性马、年龄略有不同。目前我们无法推测血缘关系(特别是母系血缘关系)是否是当时选择它们作为殉牲一起埋葬的原因。

四、结论

通过对新疆马垒县平顶山墓群出土的家马进行线粒体DNA和毛色控制基因的核DNA分析,并与其他中国古代家马进行比较,本文得出以下认识:

(1)DNA分析揭示平顶山墓群家马与石人子沟遗址家马一样,都具有相对较高的线粒体DNA和毛色的遗传多样性。这两个遗址年代相近、地域相近,并且都属于天山草原地带游牧文化性质,高度依靠马匹。它们均位于东天山北麓,该地区拥有丰沛的天山水源和广大的山地草场,适宜养马。因此,推测这里可能是古代一个非常重要的产马地。

(2)毛色控制基因的核DNA研究除了显示出平顶山墓群家马毛色多样性较高以外,还进一步印证了古代人、马匹、墓葬、社会文化之间存在着复杂的关系。在古代,马匹不仅在生产生活中发挥着重要作用,而当马匹被选为殉牲动物进行殉葬时,亦不是随便埋葬的。马在古代人类社会祭祀、信仰、礼仪中总会被赋予特殊的含义。

致谢:感谢中国社会科学院考古研究所新疆考古队为本研究提供了宝贵的样本。

注释:

Yang D Y, Eng B, Wayne J S. Technical Note: Improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. *American Journal of Physical Anthropology*, 1998, 105(4): 539~543.

Simmons M P. Independence of alignment and tree search. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2004, 31(3): 874~879.

^{②④⑤⑧⑨} 赵欣、Antonia T Rodrigues、尤悦等:《新疆石人子沟遗址出土家马的DNA研究》,《第四纪研究》2014年第34卷第1期。

Xu X, Arnason U. The complete mitochondrial DNA

sequence of the horse, *Equus caballus*: extensive heteroplasmy of the control region. *Gene*, 1994, 148(2): 357~362.

^{⑫⑬⑭⑮} Jansen T, Forster P, Levine M A et al. Mitochondrial DNA and the origins of the domestic horse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(16): 10905~10910. doi:10.1073/pnas.152330099

^⑯ McGahern A, Bower M A M, Edwards C J et al. Evidence for biogeographic patterning of mitochondrial DNA sequences in Eastern horse populations. *Animal Genetics*, 2006, 37(5): 494~497. doi:10.1111/j.1365-2052.2006.01495.x

Ludwig A, Pruvost M, Reissmann M et al. Coat color variation at the beginning of horse domestication. *Science*, 2009, 324(5926): 485. doi:10.1126/science.1172750

Marklund L, Moller M J, Sandberg K et al. A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (MC1R) is associated with the chestnut coat color in horses. *Mammalian Genome*, 1996, 7(12): 895~899.

Rieder S, Taourit S, Mariat D et al. Mutations in the agouti (ASIP), the extension (MC1R), and the brown (TYRP1) loci and their association to coat color phenotypes in horses (*Equus caballus*). *Mammalian Genome*, 2001, 12(6): 450~455.

Mariat D, Taourit S, Guéring G. A mutation in the MATP gene causes the cream coat colour in the horse. *Genetics Selection Evolution*, 2003, 35(1): 119~133.

^⑰ Brooks S A, Terry R B, Bailey E. A PCR-RFLP for KIT associated with tobiano spotting pattern in horses. *Animal Genetics*, 2002, 33(4): 301~303.

^⑱ Brooks S A, Bailey E. Exon skipping in the KIT gene causes a Sabino spotting pattern in horses. *Mammalian Genome*, 2005, 16(11): 893~902.

^⑲ Reissmann M, Bierwolf J, Brockmann G A. Two SNPs in the SILV gene are associated with silver coat colour in ponies. *Animal Genetics*, 2007, 38(1): 1~6.

^⑳ Santschi E M, Purdy A K, Valberg S J. et al. Endothelin receptor B polymorphism associated with lethal white foal syndrome in horses. *Mammalian Genome*, 1998, 9(4): 306~309.

^㉑ Cai D, Tang Z, Han L et al. Ancient DNA provides new insights into the origin of the Chinese domestic horse. *Journal of Archaeological Science*, 2009, 36(3): 835~842. doi:10.1016/j.jas.2008.11.006

^㉒ Cai D, Han L, Xie C et al. Mitochondrial DNA analysis of Bronze Age horses recovered from Chifeng region, Inner Mongolia, China. *Progress in Natural Science*, 2007, 17(5): 544~550.

^㉓ Cieslak M, Pruvost M, Benecke N et al. Origin and history of mitochondrial DNA lineages in domestic horses. *PLOS ONE*, 2010, 5(12): e15311. doi:10.1371/journal.pone.0015311

^㉔ 赵欣、李悦、陈洪海等:《陕西省淳化县枣树沟脑遗址马坑出土马骨的DNA初步研究》,《南方文物》2015年第3期。