

# 辽宁海城小孤山披毛犀化石的古 DNA 分析

双小燕, 袁俊霞, 侯新东, 盛桂莲, 伊 剑, 赖旭龙

(中国地质大学生物地质与环境地质国家重点实验室, 武汉 430074)

**摘 要:**从采自辽宁省海城县小孤山晚更新世披毛犀化石样品中成功地获得了 1 080 bp 细胞色素 *b* 基因序列, 调用 Genbank 中已发表的披毛犀序列及 5 种现生犀牛的同源序列, 以马作为外类群, 采用邻接法(NJ 法)和最大似然法(ME 法)构建系统发育树, 结果均显示披毛犀与现生苏门答腊犀亲缘关系最近, 且辽宁省海城县小孤山样品处于披毛犀分支的根部; 对披毛犀样品进行基因分异度分析结果表明, 小孤山的披毛犀样品具有较高的基因分异度, 为探讨披毛犀的起源、迁徙及演化等问题提供了重要的分子依据。

**关键词:**披毛犀; 古 DNA; 系统发育分析; 晚更新世; 基因分异度

**中图分类号:** P534.63; Q915.87 **文献标志码:** A

**文章编号:** 1000-7849(2012)02-0040-05

披毛犀(*Coelodonta antiquitatis* Blumenbach)是冰缘气候的指示动物<sup>[1]</sup>, 在更新世时期, 它几乎遍布欧亚大陆北部, 最北界限大约在北纬 72°, 已知的南边界限达到北纬 33°<sup>[2]</sup>, 但披毛犀没能像猛犸象那样成功地穿越白令海峡而将其足迹延伸到北美洲的范围<sup>[3]</sup>。在欧亚大陆北部广大地区内发现的披毛犀化石, 绝大多数属更新世晚期, 其早期化石记录只有来自中国几个地点的少量材料<sup>[4]</sup>。由于化石记录的不完整性, 特别是早期化石记录的缺乏, 关于披毛犀的起源、迁移、演化等问题, 人们的认识还比较模糊。

近年来随着分子生物学技术的迅猛发展, 使人们可以从一个崭新的视野来了解已绝灭动物的演化历程。从分子水平上, 人们对与披毛犀形影相随的另一种绝灭的冰缘动物——猛犸象做了大量的研究工作<sup>[5-11]</sup>, 而对于披毛犀, 其古 DNA 研究工作开展得非常有限, 并且所研究样品的采集地点主要集中在欧洲(比利时)和北亚地区(俄罗斯的西伯利亚和雅库特)。

Orlando 等<sup>[12]</sup>首次对采自比利时 Scandia 洞穴的 7 个披毛犀牙齿化石(距今 13 万~4 万 a)进行了古 DNA 研究, 并从其中 3 个样品中获得了古 DNA 片段。他们利用所得到的完整 12S RNA 和(或)部分细胞色素 *b*(*cyt b*) 基因所构建的系统发育树显示, 披毛犀与现生的苏门答腊犀亲缘关系最近, 这一研究结果也与形态学的分析结论保持一致<sup>[13]</sup>; 同

时利用分子钟推算出披毛犀与苏门答腊犀牛在渐新世(距今 26~21 Ma)产生分歧。Binladen 等<sup>[14]</sup>对采自西伯利亚永久冻土中披毛犀骨骼样品的线粒体 DNA 与核 DNA 基因的错配情况进行了探讨, 研究表明在线粒体 DNA 和核 DNA 中都存在着由于受损而导致遗传密码错配的情况, 由胞嘧啶→胸腺嘧啶、鸟嘌呤→腺嘌呤的转换比胸腺嘧啶→胞嘧啶、腺嘌呤→鸟嘌呤转换出现的次数多得多。这一研究结果显示, 胞嘧啶的去氨基作用转变为尿嘧啶是古 DNA(无论是线粒体 DNA 还是核 DNA)错配的主要原因。最近, Willerslev 等<sup>[15]</sup>从采自雅库特永久冻土披毛犀的毛发中首次获取到完整线粒体基因组序列。他们利用披毛犀和现生 5 种犀牛的线粒体基因, 构建的系统发育树显示, 非洲的黑犀牛与白犀牛聚为一个分支, 亚洲的爪哇犀牛与印度犀牛聚为一支, 披毛犀与苏门答腊犀牛聚为另一个分支, 随构建系统发育树时所采取的基因序列不同(D-loop, *cyt b*, *cox1*, *cox2* 等), 上述 3 个分支之间的关系就会发生变化: 双角的披毛犀—苏门答腊犀牛分支到底是与同为双角的黑犀牛—白犀牛关系最近, 还是与同处亚洲但却为单角的爪哇犀牛—印度犀牛的关系最近尚不明确。另外, 构建系统发育树时选择的外类群不同也会影响到上述 3 个分支之间的关系。因此, 披毛犀—苏门答腊犀牛、爪哇犀牛—印度犀牛、黑犀牛—白犀牛之间的系统发育问题还存在一定的争议。

在中国, 披毛犀化石主要分布在东北松辽平原,

收稿日期: 2011-01-12 编辑: 杨 勇

基金项目: 国家自然科学基金项目(40672006; 40902008); 中国国家外事专家局“111”项目(B08030); 973 项目(2011CB808800); 中国科学院脊椎动物进化系统学重点实验室开放课题基金项目(2010LESV009)

作者简介: 双小燕(1983—), 女, 主要从事分子古生物学研究工作。E-mail: xyshang@gmail.com

通信作者: 赖旭龙(1964—), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事分子古生物学研究工作。E-mail: xllai@cug.edu.cn

此外,在华北平原、内蒙古高原、黄土高原陇东地区甚至青藏高原的西南部也都有分布<sup>[2]</sup>。笔者拟对中国披毛犀样品开展古 DNA 研究,分析披毛犀在地质历史时期的基因分异度,为从分子水平上探讨我国披毛犀在系统发育树上的位置以及提高其谱系精度提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

披毛犀化石样品分别采自辽宁省海城县小孤山、辽宁省昌图县 2 个地点(图 1)。辽宁海城小孤山的样品所处地层年龄为 4 万~5 万 a,都不超过古 DNA 的理论保存年限 10 万 a<sup>[16-18]</sup>,样品具体信息见表 1。

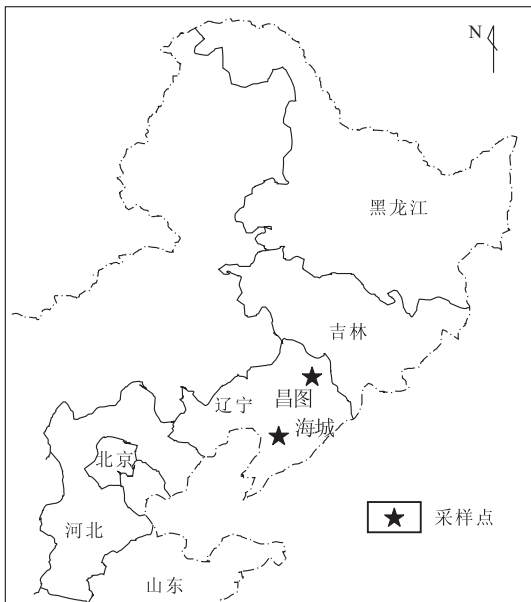


图 1 采样地点图

Fig. 1 Location of sampling site

### 1.2 引物合成

从 Genbank 中搜索到披毛犀 *cyt b* 基因全序列(登录号为 NC\_012681),使用 Primer Premier 5 软件设计了多对扩增引物,并通过 Oligo 软件对引物二聚、退火温度、GC 含量等进行了评估<sup>[19-21]</sup>,引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

### 1.3 样品前处理与 DNA 提取

样品的前处理与 DNA 提取工作具体实验步骤,参照文献<sup>[22]</sup>的方法。提取过程以无菌水作为空白提取对照,并将其作为 PCR 阴性对照模板,以检测外源 DNA 的污染。

### 1.4 PCR 扩增与纯化

考虑到古 DNA 大多呈高度片段化,本实验采用多重 PCR 扩增方法<sup>[23-24]</sup>。PCR 反应体系总量为

20  $\mu\text{L}$ ,包括 2  $\mu\text{L}$  10 $\times$  PCR buffer, 2.8  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  (25 mmol/L), 2.0  $\mu\text{L}$  BSA (10 mg/mL), 0.5  $\mu\text{L}$  dNTPs (10 mmol/L), 0.15  $\mu\text{L}$  Taq 酶 (5 U/ $\mu\text{L}$ ), 每条引物浓度为 250 nmol/L。PCR 反应条件参照文献<sup>[22]</sup>等。选取目标条带清晰、空白对照均为阴性的 PCR 扩增产物,用 2% 的琼脂糖凝胶电泳切胶回收,用 QIAGEN 纯化试剂盒进行纯化。

### 1.5 PCR 产物克隆及测序

将纯化所得片段连接到 PMD18-T 载体上,4 $^{\circ}\text{C}$  过夜,连接产物转化至感受态细胞 DH5- $\alpha$ ,再用含氨苄青霉素、IPTG、X-Gal 的 LB 培养基 37 $^{\circ}\text{C}$  过夜培养。显色后从每个平板上挑选 8 个白色菌斑于 37 $^{\circ}\text{C}$  振荡培养,取 1  $\mu\text{L}$  菌液稀释后,95 $^{\circ}\text{C}$  加热 10 min,再取 5  $\mu\text{L}$  的煮沸液为模板用 M13 引物扩增,电泳检测挑选含目标序列的克隆产物,送南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。

### 1.6 数据分析

从 Genbank 数据库中检索已发表的披毛犀及 5 种现生犀牛线粒体 *cyt b* 序列(表 1),用 BioEdit 软件<sup>[25]</sup>对现生犀牛 *cyt b* 序列与披毛犀序列进行对位排列,并辅以手工校正,根据已有的研究结果和外类群的选择原则,选取马作为系统发育分析的外类群。使用 Clustal X1.81 软件<sup>[26]</sup>进行比对分析,用 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Version 3.1 软件<sup>[27]</sup>统计序列的碱基组成、转化/颠换比率  $R$  (transition/transversion, 简称 Ts/Tv); 选择 Kimura 的双参数模型进行数据处理,分别采用邻接法 (neighbor-joining, 简称 NJ) 和最大似然法 (maximum likelihood, 简称 ME) 构建系统发育树,系统树各个分支的置信度由“重抽样 (boot-strap)”进行循环检验,重抽样的次数为 1 000 次。

表 1 研究中所用到的序列信息

Table 1 Data sets used in this paper						
样品名称	采样地点	样品年代/ka	样品部位	序列长度	Genbank 登录号	资料来源
<i>C. a. LC</i>	辽宁昌图		下颌骨	183 bp		本文
<i>C. a. LH</i>	辽宁海城	40~50	下白齿根	1 080 bp		本文
<i>C. a. Orlando</i>	比利时	60~70	牙齿齿根	668 bp	AY178623 AY178624 AY178625	文献[13]
<i>C. a. Binladen</i>	西伯利亚	>49	肢骨	1 140 bp	DQ318533	文献[15]
<i>C. a. Willerslev</i>	雅库特		毛发	1 140 bp	NC_012681	文献[16]
<i>Dicerorhinus sumatrensis</i>				1 140 bp	AJ245723	文献[28]
<i>Rhinoceros sondaicus</i>				1 140 bp	AJ245725	文献[28]
<i>Rhinoceros unicornis</i>				1 140 bp	NC_001779	文献[29]
<i>Ceratotherium simum</i>				1 140 bp	Y07726	文献[30]
<i>Diceros bicornis</i>				1 140 bp	X56283	文献[31]
<i>Equus grevyi</i>				1 140 bp	X56282	文献[31]

## 2 结果与分析

## 2.1 碱基组成与基因变异

本研究设计的引物对辽宁省海城县小孤山样品 *C. a. LH* 有较好的扩增, 辽宁省昌图县样品 *C. a. LC* 由于保存情况较差, 获得的序列较短。辽宁省海城县小孤山样品所得序列中 T(U)、C、A、G 4 种碱基含量分别为 26.4%、33.1%、28.6%、11.9%, 其中 A+T 含量 (55.0%) 明显高于 G+C 含量 (45.0%)。本研究基于共有序列 608 bp 对不同地区披毛犀的基因分异度和碱基差异情况进行了统计, 结果见表 2。

表 2 不同地区披毛犀 *cyt b* 基因的碱基差异情况(转换/颠换, 上对角线)和基因分异度(下对角线)

Table 2 Numbers of transitions/transversions(upper triangle) and divergence of gene (lower triangle) for *cyt b* gene sequences in this study

	<i>C. a.</i> Binladen	<i>C. a.</i> Willerslev	<i>C. a.</i> Orlando	<i>C. a.</i> LH
<i>C. a.</i> Binladen	—	3/2	1/2	13/3
<i>C. a.</i> Willerslev	0.822%	—	4/0	14/1
<i>C. a.</i> Orlando	0.493%	0.658%	—	14/1
<i>C. a.</i> LH	2.632%	2.467%	2.467%	—

## 2.2 分子进化树

由于辽宁省昌图县披毛犀样品保存情况较差, 其内含 DNA 降解较为严重, 获得的基因序列较短, 为避免短序列效应, 构建系统发育树时仅选用辽宁省海城县小孤山的样品。以马作为系统发育分析的外类群, 使用 Mega3.0 软件, 选用 Kimura 的双参数模型, 分别采用邻接法(NJ 法)和最大似然法(ME 法)构建系统发育树。2 种不同构树法构出的系统发育树的拓扑结构基本一致, 仅在置信度水平上有些细微差异, 表明犀科系统发育关系的稳定性以及本文的亲缘关系分析是可信的(图 2)。

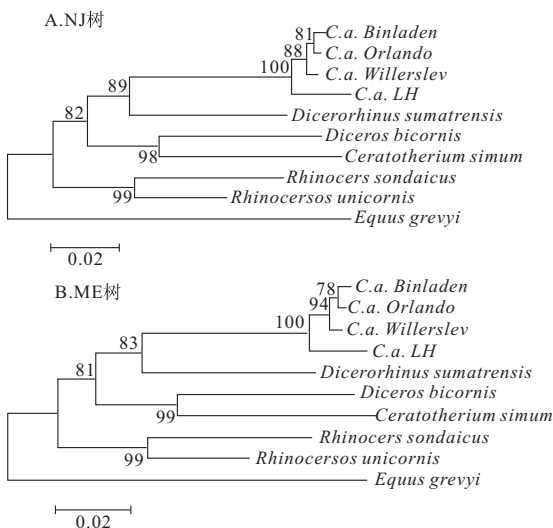


图 2 基于 608 bp *cyt b* 基因片段构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic trees based on 608 bp partial se-

## 3 讨论

### 3.1 序列真实性

经历了漫长历史年代, 古代生物化石材料由于受到水、氧化等作用的影响, 其 DNA 含量非常低且呈高度片段化, 这就使得在古 DNA 研究过程中存在较高的污染风险, 证明所获得的 DNA 序列的真实性, 就成为古 DNA 研究中一个非常重要的环节<sup>[32]</sup>。我们确信本研究所获得的序列为披毛犀的基因序列, 主要基于以下理由: ①从样品的采集到样品的实验室存放, 均注意避免样品间的交叉污染; 在整个实验操作过程中注意实验器材、耗材及试剂的灭菌。②每个样品至少进行 2 次提取操作, 而且在每次提取过程中都设立提取空白对照组, 在进行 PCR 操作时, 设置 PCR 空白对照组, 空白对照呈阴性, 以避免样品的交叉污染和外源 DNA 的污染。③从样品的处理到 PCR 反应液的配制, 都在专用的古 DNA 实验室进行, 本实验室从未开展过现生犀科样品的研究。④每段 PCR 扩增产物都进行克隆测序, 每次挑选 4 个克隆菌落测序, 至少要有 3 个克隆测序结果保持一致, 以保证测序结果的准确性。

### 3.2 遗传多样性分析

种群内基因分异度可以反映种群内个体的数目、种群的历史、演化及对环境的适应能力等<sup>[33-35]</sup>, 生物群体的遗传多样性是评价生物资源状况的一个重要依据, 它是物种适应多变的环境条件、维持长期生存和进化的遗传基础。如果遗传多样性越高, 则种群内可提供环境选择的基因愈多, 对于环境适应能力就愈强, 愈有利于种群的生存及演化; 相反, 如果遗传多样性越低, 则种群内可提供环境选择的基因愈少, 对于环境的适应能力愈差, 不利于种群的生存以及演化。

从表 2 可以看出, 西伯利亚披毛犀(*C. a. Binladen*)与雅库特披毛犀(*C. a. Willerslev*)的基因分异度为 0.822%; 与比利时披毛犀(*C. a. Orlando*)的基因分异度为 0.493%; 雅库特披毛犀(*C. a. Willerslev*)与比利时披毛犀(*C. a. Orlando*)的基因分异度为 0.658%; 显示了这 3 种披毛犀具有较小的基因分异度。而辽宁省海城县小孤山披毛犀(*C. a. LH*)与西伯利亚披毛犀(*C. a. Binladen*)的基因分异度为 2.632%; 与雅库特披毛犀(*C. a. Willerslev*)的基因分异度为 2.467%; 与比利时披毛犀(*C. a. Orlando*)的基因分异度也为 2.467%。通过对比得出, 辽宁省海城县小孤山披毛犀样品的基因分异度远远高于其他披毛犀样品的基因分异度(均 < 0.9%)。在晚更新世时期, 披毛犀曾在我国东北和北方地区很繁盛, 酷冷的环境为耐寒的披毛犀的迁入和生活提供

了有利条件,这也与该地区大量晚更新世披毛犀化石材料的发现相吻合。全新世时期,随着气候转暖,再没有披毛犀的化石材料被发现。Lister 等<sup>[35]</sup>指出许多大型哺乳动物在其绝灭过程中都伴随着基因变化的缺失。前人曾对披毛犀的绝灭提出过多种假说<sup>[36-37]</sup>,从我们获得的披毛犀古DNA数据及 Genbank 中其同源序列来看,遗传多样性的缺失也许是造成披毛犀绝灭的原因之一。

### 3.3 披毛犀的系统发育位置

中国披毛犀在披毛犀的演化发展历史中占有非常重要的地位。20世纪20年代到40年代,不少古生物学者推测披毛犀这个物种起源于亚洲南部。从我国的最新资料来看,这个种属很可能起源于亚洲北部而不是南部,披毛犀最早的化石记录是发现于临夏盆地古老黄土中距今约有2.55Ma BP的完整头骨化石材料<sup>[4]</sup>,它属于泥河湾腔齿犀(*C. nihowanensis*)。另外,在中国的其他几个地点也相继发现了属于早更新世时期泥河湾腔齿犀的化石材料<sup>[2,4,38]</sup>,这些都为披毛犀的中国北部起源说提供了化石证据。披毛犀的另一种演化学说是起源于Tologoj腔齿犀(*C. tologojensis*),其化石材料发现于贝加尔湖地区Tologoj的早中更新世地层中<sup>[1]</sup>。Deng<sup>[39]</sup>对甘肃临夏盆地的泥河湾腔齿犀与Tologoj腔齿犀的化石材料进行了比较,研究结果显示泥河湾腔齿犀和Tologoj腔齿犀属于不同的种:从颅骨和牙齿来看泥河湾腔齿犀比Tologoj腔齿犀具有更原始的性状,泥河湾腔齿犀具有更小的体态、纤细的四肢,奔跑速度更快,而Tologoj腔齿犀具有发育更完善的鼻骨。据此,Deng<sup>[39]</sup>、Kahlke等<sup>[1]</sup>认为分布于早中新世贝加尔湖地区的Tologoj腔齿犀是由泥河湾腔齿犀演化而来。由亚洲起源的这种腔齿犀在中更新世首次到达欧洲的东部和中部,随着气候条件的转冷,披毛犀逐渐发展成为非常适应寒冷气候的典型披毛犀<sup>[1-2,4]</sup>,并且在欧洲由于它对寒冷气候的适应能力更强而取代了当地的草原犀<sup>[1]</sup>。周本雄<sup>[2]</sup>比较我国与欧洲披毛犀化石标本的形态特征后指出,在更新世晚期欧亚大陆的典型披毛犀没有种一级的差别,所以,目前所发现的化石材料支持披毛犀的中国起源学说<sup>[2]</sup>。为了从分子水平上探讨披毛犀的起源问题,我们分别采用1个欧洲样品、2个北亚样品与1个中国披毛犀样品构建了系统发育树,从图2-A可以看出:北亚的披毛犀样品与比利时披毛犀聚为一个分支,构成披毛犀的北亚及欧洲谱系;其中,西伯利亚披毛犀(*C. a. Binladen*)与比利时披毛犀(*C. a. Orlando*)聚为一个小分支,从地理位置来看,西伯利亚与比利时同属于中高纬度,说明在此纬度上,披毛犀在这两地有一定的基因交流;而中国

辽宁省海城县小孤山的披毛犀样品处于整个披毛犀分支的根部,这从分子水平上说明披毛犀可能起源于中国。由于构建系统发育树时,样品数量相对比较缺乏,特别是欧洲的样品只有1个,且与其他样品的共有序列较短,要构建更为清晰的披毛犀地理谱系图,还需要从更多地点采集样品来进行研究。

沈阳师范大学傅仁义为本研究项目提供了样品并在野外样品采集过程中给予了大力帮助,在此深表谢意。

### 参考文献:

- [1] Kahlke R D, Lacombe F. The earliest immigration of woolly rhinoceros (*Coelodonta tologojensis*, Rhinocerotidae, Mammalia) into Europe and its adaptive evolution in Palaeartic cold stage mammal faunas[J]. *Quaternary Science Reviews*, 2008, 27(21/22): 1951-1961.
- [2] 周本雄. 披毛犀和猛犸象的地理分布、古生态与有关的气候问题[J]. *古脊椎动物与古人类*, 1978, 16(1): 47-59.
- [3] Elias S A, Crocker B. The Bering Land Bridge: A moisture barrier to the dispersal of steppe - tundra biota? [J]. *Quaternary Science Reviews*, 2008, 27(27/28): 2473-2483.
- [4] 邓涛. 甘肃临夏盆地发现已知最早的披毛犀化石[J]. *地质通报*, 2002, 21(10): 604-608.
- [5] Noro M, Masuda R, Dubrovo I A, et al. Molecular phylogenetic inference of the woolly mammoth *Mammuthus primigenius*, based on complete sequences of mitochondrial cytochrome *b* and 12S ribosomal RNA genes[J]. *J. Mol. Evol.*, 1998, 46(3): 314-326.
- [6] Lister A M, Sher A V. The origin and evolution of the woolly mammoth[J]. *Science*, 2001, 294: 1094-1097.
- [7] Debruyne R, Barriel V, Tassy P. Mitochondrial cytochrome *b* of the Lyakhov mammoth (Proboscidea, Mammalia): New data and phylogenetic analyses of Elephantidae[J]. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2003, 26(3): 421-434.
- [8] Xue Y, Zerjal T, Bao W, et al. Male demography in East Asia: A north-south contrast in human population expansion times [J]. *Genetics*, 2006, 172(4): 2431-2439.
- [9] Enk J M, Yesner D R, Crossen K J, et al. Phylogeographic analysis of the mid-Holocene Mammoth from Qagnax cave, St. Paul Island, Alaska [J]. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 2009, 273(1/2): 184-190.
- [10] Miller W, Drautz D I, Ratan A, et al. Sequencing the nuclear genome of the extinct woolly mammoth[J]. *Nature*, 2008, 456: 387-390.
- [11] Gilbert M T P, Drautz D I, Lesk A M, et al. Intraspecific phylogenetic analysis of Siberian woolly mammoths using complete mitochondrial genomes [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, 10(24): 8327-8332.
- [12] Orlando L, Leonard J A, Thenot A, et al. Ancient DNA analysis reveals woolly rhino evolutionary relationships [J]. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2003, 28(3): 485-499.
- [13] Kurten B. Microevolution of teeth [J]. *Apollonia*; Malmö, 1968, 16(4): 31-33.
- [14] Binladen J, Wiuf C, Gilbert M, et al. Assessing the fidelity of ancient DNA sequences amplified from nuclear genes [J]. *Genetics*, 2006, 172(2): 733-741.

- [15] Willerslev E, Gilbert M T, Binladen J, et al. Analysis of complete mitochondrial genomes from extinct and extant rhinoceroses reveals lack of phylogenetic resolution[J]. *BMC Evol. Biol.*, 2009, 9(95). doi:10.1186/1471-2148-9-95.
- [16] Willerslev E, Hansen A J, Christensen B, et al. Diversity of Holocene life forms in fossil glacier ice[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96(14):8017-8021.
- [17] Willerslev E, Hansen A J, Binladen J, et al. Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments[J]. *Science*, 2003, 300:791-795.
- [18] Hofreiter M, Serre D, Poinar H N, et al. Ancient DNA[J]. *Nat. Rev. Genet.*, 2001, 2(5):353-359.
- [19] Rychlik W. OLIGO 7 primer analysis software[J]. *Methods Mol. Biol.*, 2007, 402:35-60.
- [20] Estruch J J. OLIGO. Primer selection[J]. *Methods Mol. Biol.*, 1997, 70:279-285.
- [21] Barnard R, Southard J N, Talamantes F. Two-step PCR amplification of multiple specific products from cDNA using one specific primer and oligo dT[J]. *Biotechniques*, 1994, 16(2):251-252.
- [22] 盛桂莲, 赖旭龙, 侯新东. 古 DNA 实验体系及技术[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2009, 25(2):116-125.
- [23] Krause J, Dear P H, Pollack J L, et al. Multiplex amplification of the mammoth mitochondrial genome and the evolution of Elephantidae[J]. *Nature*, 2006, 439:724-727.
- [24] Ouml H R, Mpler, Dear P H, et al. Multiplex amplification of ancient DNA[J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(2):720-728.
- [25] Tippmann H F. Analysis for free: Comparing programs for sequence analysis[J]. *Brief Bioinform.*, 2004, 5(1):82-87.
- [26] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL\_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Res.*, 1997, 25(24):4876-4882.
- [27] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5(2):150-163.
- [28] Tougaard C, Delefosse T, Hanni C, et al. Phylogenetic relationships of the five extant rhinoceros (*Rhinocerotidae*, perissodactyla) based on mitochondrial cytochrome *b* and 12s rRNA genes[J]. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2001, 19(1):34-44.
- [29] Xu X, Janke A, Arnason V. The complete mitochondrial DNA sequence of the greater indian rhinoceros, *Rhinoceros unicornis*, and the phylogenetic relationship among carnivora, perissodactyla, and Artiodactyla (plus cetacea)[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1996, 13(9):1167-1173.
- [30] Xu X, Arnason U. The complete mitochondrial DNA sequence of the white rhinoceros, *ceratotherium simum*, and comparison with the mt DNA sequence of the india rhinoceros, *Rhinoceros unicornis*[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1997, 7(2):189-194.
- [31] Irwin D M, Kocher T D, Wilson A C. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1991, 32(2):128-144.
- [32] Cooper A, Poinar H M. Ancient DNA: Do it right or not at all[J]. *Science*, 2000, 289:1139.
- [33] Hadly E A, Ramakrishnan U, Chan Y L, et al. Genetic response to climatic change: Insights from ancient DNA and phylochronology[J]. *Plos. Biology*, 2004, 2(10):1600-1609.
- [34] Cai D, Tang Z, Han L, et al. Ancient DNA provides new insights into the origin of the Chinese domestic horse[J]. *Journal of Archaeological Science*, 2009, 36(3):835-842.
- [35] Lister A M, Stuart A J. The impact of climate change on large mammal distribution and extinction: Evidence from the last glacial/interglacial transition[J]. *C. R. Geoscience*, 2008, 340(9/10):615-620.
- [36] 姜鹏. 东北猛犸象披毛犀动物群初探[J]. *东北师范大学学报: 自然科学版*, 1982, 1:105-115.
- [37] 张虎才. 我国东北地区晚更新世中晚期环境变化与猛犸象: 披毛犀动物群绝灭研究综述[J]. *地球科学进展*, 2009, 24(1):49-60.
- [38] 谷祖刚, 沈光隆, 李克定. 青海共和腔齿犀 (*Coelodonta*) 化石[J]. *兰州大学学报*, 1979, 1:135-138.
- [39] Deng T. Comparison between woolly rhino forelimbs from Longdan, Northwestern China and Tologoi, Transbaikalian region[J]. *Quaternary International*, 2008, 179(1):196-207.

## Ancient DNA Analysis of Woolly Rhinoceros in Xiaogu Mountain, Haicheng City, Liaoning Province

SHUANG Xiao-yan, YUAN Jun-xia, HOU Xin-dong, SHENG Gui-lian, YIN Jian, LAI Xu-long

(State Key Laboratory of Biogeology and Environmental Geology,  
China University of Geosciences, Wuhan 430074, China)

**Abstract:** In this study, 1 080 bp sequence of mitochondrial cytochrome *b* gene was successfully retrieved from a Late Pleistocene woolly rhinoceros fossil excavated from Xiaogu Mountain, Haicheng City, Liaoning Province. Analysis of phylogenetic tree with horse as out group showed the same topological of phylogenetic trees using Neighbor-Joining and Maximum likelihood methods. Our results suggested that woolly rhinoceros has relatively close relationship with extant sumatran rhinoceros. Furthermore, the phylogenetic position of Xiaogu Mountain sample was always at the root of this branch. Finally, our data revealed that the woolly rhinoceros from China showed higher gene divergency than European and Northern Asian counterparts. Our study provides molecular evidence for the origin and extinct of woolly rhinoceros.

**Key words:** woolly rhinoceros; ancient DNA; phylogenetic analysis; Late Pleistocene; gene divergency