

DOI: 10.5846/stxb201305221141

张洪海, 窦海龙, 陈磊, 沙未来, 赵俊杰. 中国狼不同地理种群遗传多样性及系统进化分析. 生态学报, 2015, 35(6): 1869-1881.

Zhang H H, Dou H L, Chen L, Sha W L, Zhao J J. Genetic diversity and phylogenetic analysis of wolves from different geographical regions of China. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(6): 1869-1881.

中国狼不同地理种群遗传多样性及系统进化分析

张洪海^{1,*}, 窦海龙^{1,2}, 陈磊¹, 沙未来¹, 赵俊杰¹

¹ 曲阜师范大学生命科学学院, 曲阜 273165

² 北京师范大学生命科学学院, 北京 100875

摘要: 为了解中国狼不同地理种群遗传多样性及系统发育情况, 从中国境内狼的主要分布区青海、新疆、内蒙古和吉林 4 个地区采集样品, 用分子生物学技术手段成功地获得 44 个个体线粒体 DNA 控制区第一高变区(HVR I)序列和 40 个线粒体 Cyt b 部分序列。线粒体控制区 HVR I 共检测到 51 个变异位点, 位点变异率为 8.76%; 线粒体 Cyt b 部分序列发现 31 个变异位点, 位点变异率为 5.33%, 未见插入及缺失现象, 变异类型全部为碱基置换。共定义了 16 个线粒体 HVR I 单倍型, 其中吉林与内蒙种群存在共享单倍型, 估计这两地间种群亲缘关系较近。4 个地理种群中新疆种群拥有较高的遗传多样性(0.94)。中国狼种群总体平均核苷酸多态性为 2.27%, 与世界其他国家地区相比, 中国狼种群拥有相对较高的遗传多样性。通过线粒体 HVR I 单倍型构建的系统进化树可以看出, 中国狼在进化上分为 2 大支, 其中位于青藏高原的青海种群独立为一支, 推测其可能长期作为独立种群进化。基于青海种群与新疆、内蒙种群的线粒体 Cyt b 遗传距离, 推测中国狼 2 个世系可能在更新世冰川时期青藏高原受地质作用急速隆起后出现分歧, 分歧时间大约在 1.1 MY 前。

关键词: 狼; 中国; 遗传多样性; 系统进化

Genetic diversity and phylogenetic analysis of wolves from different geographical regions of China

ZHANG Honghai^{1,*}, DOU Hailong^{1,2}, CHEN Lei¹, SHA Weilai¹, ZHAO Junjie¹

¹ College of Life Science, Qufu Normal University, Qufu 273165, China

² College of Life Science, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

Abstract: Wolves were once widely distributed throughout China. The number of Chinese wolves has drastically declined in recent years as a result of environmental destruction and habitat loss. At present, wolves in China are mainly distributed in sparsely populated western and northern regions of the country. To protect this species, an understanding of genetic diversity and phylogenetic relationships of wolf populations in China is necessary. In this study, we analyzed the partial mitochondrial DNA (mtDNA) D-loop region and the Cyt b (Cytochrome b) gene of wolves originating from four distinct geographical populations in Xinjiang, Qinghai, Inner Mongolia, and Jilin. Using standard molecular biology techniques, we generated sequences of the mtDNA control region hypervariable region I (HVR I) from 44 wolves, and sequences of the Cyt b gene from 40 wolves. The resulting 582-bp HVR I sequence alignment contained 51 variable sites, which corresponded to 8.76% polymorphic loci. Similarly, 31 variable sites, all base substitutions, were identified in the aligned Cyt b sequence data set. We detected 16 haplotypes among the 44 HVR I gene sequences. The Inner Mongolian population and the population from Jilin were found to share the same HVR I haplotype. When this data set was combined with previously generated Chinese

基金项目: 国家自然科学基金(31172119, 31372220); 山东省自然科学基金(ZR2011CM009, ZR2010CL014); 高等学校博士学科点专项基金(博导类)(20113705110001)

收稿日期: 2013-05-22; **网络出版日期:** 2014-04-25

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhanghonghai67@126.com

wolf sequences available in Genbank, a total of 28 haplotypes from approximately 91 Chinese wolves were identified. To explore the genetic diversity of these geographic populations, we calculated nucleotide diversity and haplotype diversity from the HVR I sequences. The population from XinJiang was found to have the highest genetic diversity. When we compared these results with previously reported nucleotide diversities of wolves from other countries and regions, we found that Chinese wolves had the highest nucleotide diversity. In the phylogenetic tree generated using the HVR I haplotypes, Chinese wolves are primarily divided into two lineages. The first lineage comprises haplotypes of wolf populations from the Qinghai-Tibet Plateau and surrounding areas. There is no obvious relationship with geographical structure among the remaining wolf haplotype groups. Considering their high level of genetic diversity and restricted geographic distribution, we speculate that the Qinghai-Tibet Plateau populations have evolved in isolation over a long period of time. To investigate the phylogenetic position of Chinese wolves, we downloaded 123 mtDNA partial control region sequences from Genbank, which were obtained from wolves primarily distributed in Eurasia and North America. In the phylogenetic tree generated from these sequences, wolf populations from the Qinghai-Tibet Plateau are clearly separated from wolves from other regions of China. The results of this phylogenetic analysis suggest that wolf populations in the Qinghai-Tibet Plateau of China comprise an ancient lineage that is still extant in these higher elevation regions. Based on genetic distances calculated using Cyt *b* sequence data, we estimate that the two lineages diverged about 1.1 million years ago, corresponding to the time period during which the Qinghai-Tibet Plateau was suddenly uplifted by geological processes. Based on these results, we propose that the wolves of the Qinghai-Tibet Plateau and the widespread wolf *Canis lupus chanco* are not the same subspecies.

Key Words: wolf; China; genetic diversity; evolution

灰狼简称狼,属于食肉目(*Carnivora*)、犬科(*Canidae*)、犬属(*Canis*),由于狼食谱宽、适应性强,曾在地球上广泛分布^[1]。狼在我国曾一度分布于除海南省、南中国海诸岛屿以及台湾省外的广大地区,但由于人为捕杀和生境破坏,现仅集中分布于人口较为稀少的内蒙古、新疆、青海、西藏等地区^[2]。我国关于狼的研究主要集中在宏观生态学方面,关于狼种群遗传多样性及系统分类地位的研究非常少,并且在狼亚种的划分上还存在着众多争议:很多学者认为中国狼或蒙古狼(*Canis lupus Chanco*)与欧亚狼(*Canis lupus Lupus*)是同一个亚种^[3];中国动物志引述 Pocock 等和 Ellerman 等的研究结论认为分布于中国境内的狼仅有蒙古狼(*C. l. chanco*)一个亚种^[4-5];王秀辉应用 RAPAD 方法将中国狼划分为 5 个亚种:云贵和东南集群亚种,东北河北群体亚种、甘肃群体亚种、内蒙古群体亚种和新疆群体亚种^[6];罗理杨等通过测定中国各个地区狼线粒体控制区部分序列得出分布于青海、西藏、云南的狼种群属于西南种群亚种,东北种群与华北种群作为一个亚种,内蒙古及新疆种群归属不能确定^[7]。国内对狼遗传多样性的研究未见报道,这对于野生狼种群的管理及保护非常不利。

线粒体 DNA(Mitochondrial DNA, mtDNA)不会发生遗传重组,较核 DNA 有更高的突变率,因此被公认为用来作为研究动物遗传进化的标记物质^[8]。线粒体细胞色素 *b*(Cytochrome *b*, Cyt *b*)基因全长大约在 1100—1200 bp 之间,并且不同物种间序列长度差异较大,但是在核苷酸组成上却具有偏好性。由于 Cyt *b* 基因中含有突变和保守区,并且存在较慢和较快的进化的密码子位点,所以 Cyt *b* 基因是对动物系统进化研究的较好的分子标记。犬科动物线粒体控制区(Control region displacement loop, D-loop)全长 1240—1360 bp,其中存在 3 个保守序列框(Conserved sequence block):CSB I、CSB II 和 CSB III^[9]。起始位点位于 CSB I 区 5'端的第一高变区(Hypervariable region, HVR I)序列变异速率较快,常被用来进行种群遗传结构及系统地理分析^[10]。近些年来,保护生物学研究已经深入到分子水平,要求使用分子实验技术从大量动物样本中提取 DNA 以获取动物的遗传信息。在采集分析样品的过程中,传统的取样方法(通过杀死动物来获取新鲜的组织或捕获动物抽取血液)对于野外动物种群特别是濒危珍稀动物种群较难实现。因此本研究采集了来自青海、新疆及内蒙、吉林 4 个地区 55 个样品,且多数样品采用非损伤取样的方法获得。通过分子生物学手段成功获得 44 个

个体线粒体 D-Loop 区 HVR I 序列和 40 个线粒体 Cyt *b* 部分序列,对其进行遗传学分析,探讨各地种群遗传多样性高低并分析其系统进化地位。

1 材料与方法

1.1 样品采集

本研究于 2011 年 12 月至 2012 年 6 月分别在青新疆阿勒泰地区、内蒙古西旗、内蒙古达赉湖自然保护区、吉林图门市共采集样品 55 份,且样品多数来自于野外捕捉的圈养狼(样本详细资料见表 1)。所有粪便样品一律置于-20 ℃冰箱中保存,肌肉组织置于-80 ℃冰箱中保存,采集皮毛组织均为自然风干后置于常温干燥环境下保存,血液样品加入抗凝剂后使用生物低温采样箱运送至实验室-80℃冰箱中保存。

表 1 狼样品基本信息表

Table 1 Basic information of all the wolves samples

地理种群 Geographic group	样品来源地 Sample origin site	样品采集地 Sample collecting site	样品数 Sample number	样品类型 Sample type
青海种群 Qinghai population	青海刚察	中国科学院西高所	6	皮毛
	青海湖区	青海动物园	10	粪便
新疆种群 Xinjiang population	新疆阿勒泰地区	新疆青河县富疆狼园	8	粪便
	新疆青河县	新疆青河县富疆狼园	3	血液
内蒙种群 Inner mongolia population	内蒙达赉湖自然保护区	内蒙达赉湖自然保护区	3	肌肉组织
	内蒙西旗	哈尔滨野狼湖狼园	3	粪便
吉林种群 Jilin population	内蒙呼伦贝尔	内蒙呼伦贝尔	20	粪便
	吉林图门市	哈尔滨野狼湖狼园	2	粪便
总计 Total			55	

1.2 实验方法

1.2.1 样品 DNA 的提取

由于在分子生物学研究中,应用毛皮或者粪便样品为 DNA 来源时,获得的 DNA 含量相对于其他组织样品较低,可能会对后续实验造成影响以致无法获得准确的结果,因此针对这种情况,本研究采用重复提取的方法,对同一样品分别独立操作两次,获得的 DNA 分别置于-20℃冰箱保存并用于后续实验。粪便中总 DNA 的提取使用粪便提取试剂盒(QIAamp DNA Stool Mini Kit, USA)。血液,毛皮及肌肉组织 DNA 的提取使用血液及组织提取试剂盒(QIAamp DNeasy Blood & Tissue Kit, USA)。

1.2.2 PCR 扩增

狼线粒体控制区 HVR I 引物采用犬科动物 mtDNA D-loop 第一高变区的序列长度为 582 bp 通用引物对^[11]:

L15404: 5'-CTCTTGCTCCACCATCAGC-3'

H16118: 5'-AAACTATATGCTCCTGAAACC-3'

根据 Cyt *b* 内部的保守位点,选择性的扩增了位于细胞色素 *b* 后半部分长度大约 767 bp 的序列,其下游包含一段 tRNA^{pro} 序列。引物设计使用软件 Primer 5.0 及 Oligo 7.5。所得引物序列为:

L14666:5'-AGAGTGAATCTGAGGCGGCTT-3'

H15432:5'-GCTTTGGGTGCTGATGCTGG-3'

狼控制区 HVR I 和 Cyt *b* 区 PCR 反应体系相同: Taq 酶 0.25 μL (Takara), 10 × buffer 4 μL, 10 mmol/L dNTPs (Takara) 3 μL, 前/后引物各 0.8 μL, BSA (Takara) 0.25 μL, 以及模板 DNA 1 μL, 加灭菌超纯水至 50 μL。

狼控制区第一高变区(HVR I)PCR 反应条件为:94 ℃ 预变性 4 min; 接下来 40 个循环(94 ℃ 30 s, 53

℃ 45 s, 72℃ 45 s), 最后 72℃ 延伸 5 min。Cyt *b* 区 PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 4 min, 接下来 40 个循环 (94℃ 30 s, 57℃ 45 s, 72℃ 45 s), 最后 72℃ 延伸 5 min。

1.2.3 PCR 产物的回收及测序

PCR 产物采用 1.0% 的常规琼脂糖凝胶电泳检测, 上样量为 5 μL PCR 产物加 1 μL 6×Loading Buffer (Takara), 100 V 电压电泳 30 min, 凝胶经 EB 染色后置于紫外下观察将目的条带切下, 用凝胶回收试剂盒 (QIAquick Gel Extraction Kit, USA) 回收纯化后送至北京三博远志测序公司进行测序。

1.2.4 序列分析

测序所得序列结果在 Genbank 上经 Blast 比对后确定序列来源于狼。用 Clustal X 软件进行 DNA 序列排列^[12], 并辅以人工校对, 以去掉扩增的 Cyt *b* 序列中所包含的线粒体 tRNA^{pro} 序列。基于 Kimura 双参数距离模型 (Kimura-2-Parameter, K2P), 通过 MEGA 5.0 计算各地理种群狼控制区 HVR I 和 Cyt *b* 序列变异碱基比例、变异类型、转换和颠换比 (*R*) 及遗传距离等基础数据^[13]。基于狼 Cyt *b* 序列, 利用遗传距离和分子钟的分歧时间计算公式为 $t = D/2a$ (t 为分歧时间, D 为遗传距离, a 为分子钟) 并结合已经校正的哺乳动物细胞色素 *b* 序列的每百万年 2% 分子钟来计算中国各地计算各地理种群进化分歧时间^[14-15]。基于狼控制区 HVR I 序列用 DnaSP 5.0^[16] 软件划分单倍型, 将单倍型序列上传至 Genbank, 单倍型序列登陆号见表 4, 并计算核苷酸多样性 (Nucleotide diversity, *Pi*) 和单倍型多样性 (Haplotype diversity, *Hd*), 进而推算各地种群遗传多样性高低。为了研究中国各地狼的系统发育, 结合本研究中发现的中国狼线粒体 HVR I 单倍型及从 Genbank 中下载已有中国狼研究中 20 个 mtDNA 控制区序列, 然后重新划分单倍型, 用邻接法 (Neighbour-joining, NJ) 以 Genbank 下载的郊狼线粒体控制区序列 (Canis latrans, Genbank 登录号: NC_008093) 为外群构建单倍型的系统发生树, 其中各节点的支持率根据各序列 bootstrap^[17] 1000 次重抽样后数据计算。根据单倍型变异位点, 应用软件 Network 4.610 (<http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>) 构建基于 Median-Joining 法简约网络 (Statistical parsimony network) 关系图, 以期与已有研究进行比较。为了解中国狼在世界范围内的系统进化地位, 下载了 123 个世界各地狼线粒体控制区单倍型 (附表), 并以 8 个郊狼单倍型序列 (附表) 为外群使用 NJ 法构建系统发育树。

2 结果

2.1 线粒体控制区 HVR I 基因序列及其变异

实验获得 44 个中国狼线粒体控制区第一高变区 583 bp 序列, 其中内蒙西旗, 内蒙达赉湖自然保护区, 青海湖区, 青海刚察, 新疆青河县样品全部扩增测序成功 (表 2)。通过比对 44 个线粒体控制区 HVR I 序列发现共有变异位点 51 个, 占分析序列长度的 8.76%, 插入缺失位点 11 个, 碱基替换位点 40 个 (图 1)。研究表明, 通过扩增总 DNA 的方法有可能扩增出核基因组中线粒体基因插入拷贝^[18-20], 即线粒体假基因 (Numts)。

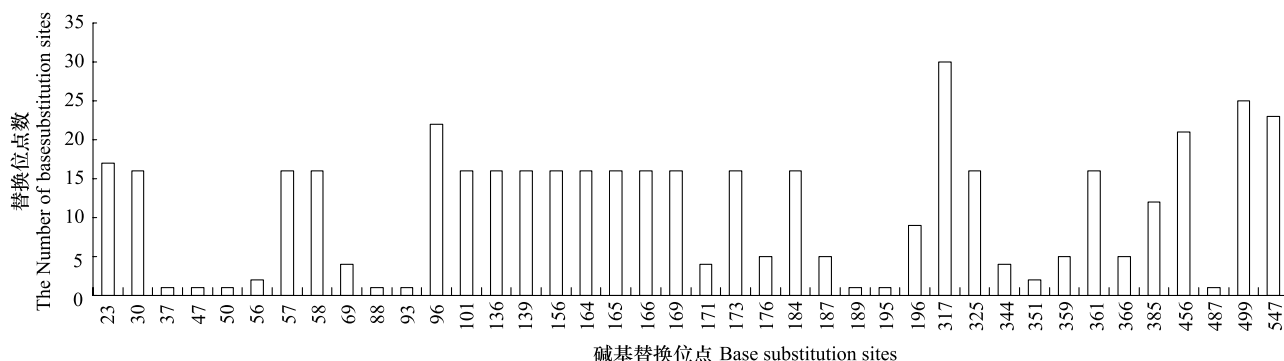


图 1 中国部分地区狼线粒体第一高变区多态位点分布图

Fig.1 Variable sites distribution of HVR I in mtDNA of China Wolf

由于线粒体假基因和线粒体基因分歧度较大,这时应考虑青海种群是否存在这样的假基因。将青海种群线粒体控制区 HVR I 基因分别与 Genbank 中下载先前研究的中国青海狼序列 (FJ032363) 以及中国内蒙狼序列 (GQ374438) 比对,发现青海狼与中国西藏狼序列相似度超过 97.5%,而与中国内蒙狼序列比对结果与表 4 结果相符,证明青海种群确实与其他种群存在较大的分歧。其中转换/颠换之比 R 为 5.71,说明序列突变未达到饱和状态^[21]。

各地区种群的线粒体控制区 HVR I 基因碱基组成分析:A,T,C,G 平均含量分别是 26.29%、30.24%、16.62%和 26.85%,其中 A+T 含量为 56.53%,符合脊椎动物线粒体基因组成特点,低于犬科动物线粒体全序列 A+T 含量(60.3%—60.5%)^[22],表明 HVR I 相对于其他保守的线粒体基因组区段来说较易突变。

表 2 狼样品测序结果信息表

Table 2 The wolf sample sequencing results table

地理种群 Geographic group	样品来源地 Sample origin site	编号 Number	样品数 Sample number	测序成功样品数 Successful sequencing sample No.	
				细胞色素 b Cytochrome b	控制区高变区 Hypervariable region
青海种群 Qinghai population	青海刚察	G	6	5	6
	青海湖区	HQ	10	7	10
新疆种群 Xinjiang population	新疆阿勒泰地区	A	8	7	7
	新疆青河县	Q	3	3	3
内蒙种群 Inner mongolia population	内蒙达赉湖自然保护区	D	3	2	3
	内蒙西旗	X	3	2	2
	内蒙呼伦贝尔	H	22	13	12
吉林种群 Jilin population	吉林图门市	T	2	1	1
总计 Total		8	55	40	44

2.2 线粒体 Cyt b 基因序列及其变异

实验共获得 40 个狼线粒体 Cyt b 序列(表 2)。将扩增测序所得到 40 条的长度为 767 bp 的序列经 Clustal X^[2] 比对去掉含有的 tRNA^{pro} 序列后得到 582 bp 的 Cyt b 部分序列。经分析后发现,没有发现碱基插入及缺失现象,表明这些 Cyt b 序列来自于线粒体,而不是核基因中的线粒体假基因^[23]。使用 MEGA 5.0 分析这 40 条 Cyt b 序列发现其碱基组成为:T 29.0%、C 29.6%、A 29.9%、G 11.6%。582 个碱基位点中共发现变异位点 31 个,占分析序列的 5.33%,且变异位点全部为简约信息位点,未发现单核苷酸变异位点。40 个个体的转换/颠换比(R)为 28.68,各地理种群转换/颠换比均大于 2.0,与动物线粒体碱基替换模式结论相符^[18]。狼 Cyt b 部分序列 G+C 含量为 41.2%,与脊椎动物基因序列 G+C 含量在 40%—50%之间的结论相符^[24]。密码子第一位点 G+C 含量(50.2%)明显高于第二位点(40.2%)和第三位点(38.2%)的含量,表明密码子第二三位点开始倾向于富含 AT(表 3)。

表 3 狼 Cyt b 部分序列基因密码子同位点的碱基组成平均值/%

Table 3 Base compositions averagement for Cyt b partial sequences of Wolf in the 1st, 2nd, 3rd position of the genetic codons

碱基类型 Base type	全序列 Complete sequence	第一位点 The 1 st position	第二位点 The 2 nd position	第三位点 The 3 rd position
胸腺嘧啶(Thymine, T)	29.0	22.0	44.0	21.0
胞嘧啶(Cytosine, C)	29.6	29.7	24.2	34.7
腺嘌呤(Adenine, A)	29.9	28.0	21.1	40.5
鸟嘌呤(Guanine, G)	11.6	20.5	10.8	3.5

2.3 基于线粒体控制区 HVR I 中国部分地区狼遗传多样性分析

使用软件 DnaSP 5.0 对 44 个成功获得目的个体样本片段序列进行分析,共确定 16 个单倍型,其中青海

种群内部青海刚察与青海湖区种群共享 3 个单倍型 (QH2, QH3, QH4), 新疆种群内部新疆阿勒泰地区及青河县种群共享 1 个单倍型 XJ2, 内蒙种群内部内蒙达赖湖自然保护区, 西旗及呼伦贝尔种群共享 2 个单倍型 NM2 和 NM4, 吉林图门与内蒙呼伦贝尔种群共享 1 个单倍型 NM3 (表 4)。吉林图门与内蒙呼伦贝尔种群之间共享 1 个单倍型, 说明两个种群之间表现为共同的母系来源或存在基因交流。

表 4 线粒体控制区 HVR I 单倍型及变异位点信息

Table 4 Haplotypes and variable sites within the HVR I of mitochondrial control region

单倍型 Haplotypes	多态位点				个体数 Individuals	Genbank 登录号 Genbank Accession No.	编号 No.
	2334555568 3077067898	111111111 9903356666 3605853458	1111111133 7778889912 0253684564	3333334445 4556685894 3080545686			
NM1	ACTGTGGTTG	TATTCTTCTT	ATCTAACGAC		H10	KC414564	W1
NM2		CCTACTCTTA			H1—H4, H6, H7, H11, H12, X1, D1,	KC414565	W2
NM3	G.....	G.....	G.....		D3	KC414566	W3
NM4	C.....	G.....	G.....		H5, T	KC414567	W4
NM5	C.....	G.....	T....C..CG		H8, X2, D2	KC414568	W5
QH1	T.....	G.....	G.....		H9	KC414569	W6
QH2	GT....AG..	..CCTCCTCC	.C.C....GT	...G.CTGC.	G1	KC414570	W7
QH3	GT...AAG..	..CCTCCTCC	.C.C....GT	...G..T.C.	G2, HQ9	KC414571	W8
QH4	GT....AG..	..CCTCCTCC	.C.C....GT	...G.CT.C.	G3, G5, G6, HQ4, HQ6, HQ7	KC414572	W9
QH5	GT....AG..	..GCCTCCTCC	.C.CG...GT	...G.CT.C.	G4, HQ2, HQ10	KC414573	W10
QH6	GT....AG..	..GCCTCCTCC	.C.CGCT.GT	...G.CT.C.	HQ1	KC414574	W11
QH7	GT....AG..	..CCTCCTCC	.C.CG...GT	.T.G.CT.C.	HQ3	KC414575	W12
QH8	GTGA..AA.C	A.CCTCCTCC	.C.CT...GT	...G.CT.C.	HQ5	KC414576	W13
XJ1	GT....AG..	..CCTCCTCC	.C.C....GT	.T.G.CT.C.	HQ8	KC414577	W14
XJ2	G.....	G.....	A.....		A1, A2, A3, A7	KC414578	W15
XJ3	T.G..A..	..C.TCT.CG			A4, A6, Q1, Q2, Q3	KC414579	W16
	C...C.	G.....	T....C..CG		A5		

由于吉林图门种群数量小于 3, 不符合 *Tajima* 检验^[25] 要求至少 3 条同源原序列的要求, 所以选取符合条件的青海、内蒙和新疆种群进行遗传多样性分析。使用 DnaSP 5.0 软件对分布在中国青海、内蒙、新疆 3 个种群 44 个个体测得的线粒体控制区 HVR I 进行遗传分析后得出, 中国种群单倍型多态性 *Hd* 为 0.897, 核苷酸多态性 *Pi* 为 0.02278。新疆种群的核苷酸多样性为 0.942, 明显的高于另外两个种群, 说明新疆种群遗传多样性较高, 遗传资源丰富。通过 *Tajima's D* 和 *Fu and Li's D* 值检测结果无显著差异 ($P > 0.10$) 表明这 3 个中国狼种群相对于中性进化的歧异度没有明显的偏离 (表 5)。

表 5 中国狼 3 个地理种群 43 个粪便样品线粒体 DNA HVR I 遗传多样性分析

Table 5 Analysis of the genetic diversity of mitochondrial DNA HVR I for 42 individuals in three populations of Chinese wolves

地理种群 Geographic group	个体数 Number	单倍型多样性 Haplotype diversity (<i>Hd</i>)	核苷酸多样性 Nucleotide diversity (<i>Pi</i>)	核苷酸差异多样性 Average number of nucleotide differences (<i>K</i>)	<i>Tajima</i> 检验 <i>Tajima's D</i>	<i>Fu and Li</i> 检验 <i>Fu and Li's D</i>
青海种群 Qinghai population	16	0.842±0.075	0.00453±0.00108	2.64167	-1.49407 *	-1.70774 *
新疆种群 Xinjiang population	10	0.644±0.101	0.00942±0.00177	5.55556	0.56153 *	-0.13773 *
内蒙种群 Inner mongolia population	17	0.647±0.120	0.00511±0.00150	3.01471	-0.27259 *	0.19016 *
总体 Total	43	0.897±0.028	0.02278±0.00122	13.23699	1.05547 *	-0.29042 *

* $P > 0.10$ 无显著差异

从 Genbank 下载的中国各地区的基于线粒体控制区序列 20 个灰狼的线粒体控制区序列(附表)。由于下载的序列长度存在差异,所以我们将所有序列剪辑后得到长度为 582 bp 的线粒体控制区序列。基于 582 bp 的序列重新划分中国狼单倍型,发现 28 个单倍型,并重新对其进行编号,其中 NM2(W2),NM4(W4),QH2(W7),QH3(W8),QH4(W9),XJ3(W16)与以前研究中发现的单倍型完全匹配(附表)。

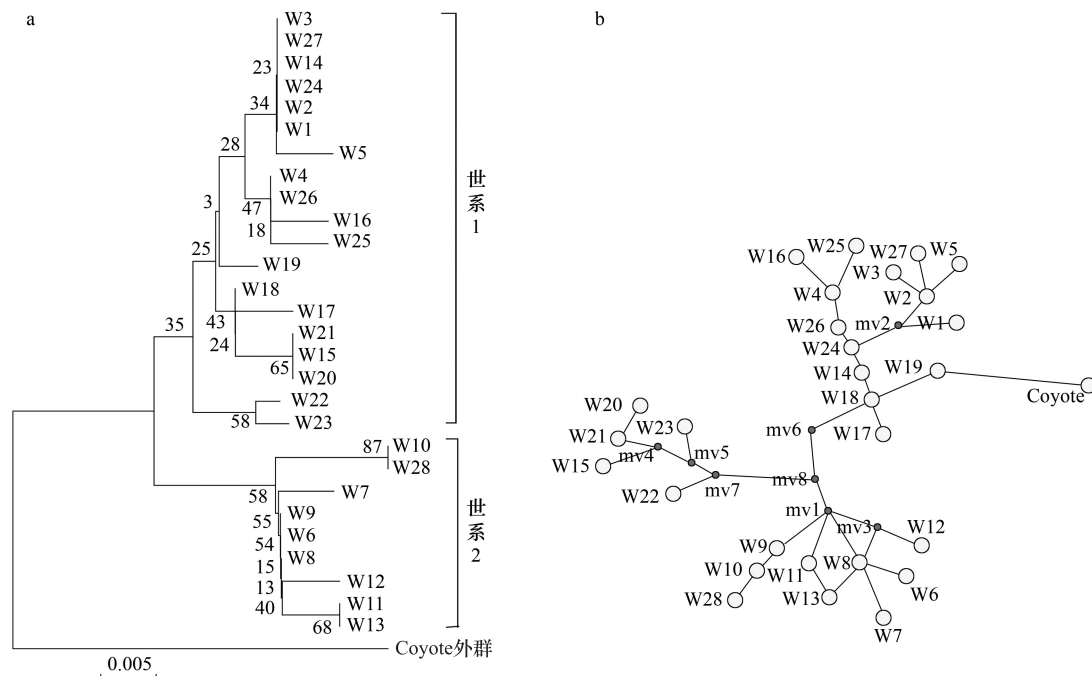


图 2 基于中国狼 mtDNA 控制区 28 单倍型序列构建的 NJ 树(a)和基于中国狼 mtDNA 控制区 28 单倍型序列构建的网络结构图(b)

Fig.2 Neighbor-joining tree of 28 mtDNA haplotypes based on mtDNA D-loop of China wolf (a) and Network of 28 mtDNA haplotypes based on mtDNA D-loop of China wolf (b)

圆圈代表的是单倍型,红点代表的是假定的中间单倍型,线代表一个替代突变,圈的大小与单倍型频率的大小成正比

2.4 分子系统树的构建

通过对 Genbank 下载的 20 条中国狼线粒体控制区序列与本研究发现的单倍型对后重新定义 28 个单倍型。通过比对后发现本研究发现的线粒体控制区单倍型与 Tsuda, K 等^[26]在蒙古乌兰巴托附近发现的狼单倍型共享 3 个单倍型,与罗理杨^[7]等发现的单倍型共享 4 个单倍型(附表)。使用 NJ 法构建 28 个中国狼单倍型系统进化树(图 2),除青海种群外,其他地区或亚地区的狼单倍型并没有聚集在一起,表明地区或亚地区狼在遗传学方面没有独特的遗传结构^[7]。通过进化树不难看出,青海种群单倍型与除青藏高原外的单倍型基于遗传距离分属两个不同的世系,这与罗理杨等所得的结果一致^[7]。把得到的 28 个中国狼单倍型与 Genbank 上下载的 123 个灰狼单倍型序列构建 NJ 树发现,位于青藏高原及其周边地区的狼与喜马拉雅山脉西侧的印度狼亲缘关系较近并为一支,而广布于中国其他地区的狼单倍型与欧亚狼亲缘关系较近,且没有表现出明显的与地理分布有关的差异(图 3)。

2.5 分化时间估计

基于 Cyt b 序列,利用已经校正的哺乳动物细胞色素 b 序列的每百万年 2% 分子钟来计算中国各地狼进化分歧时间。基于 Kimura 双参数距离模型,计算中国各地狼的遗传距离,其中内蒙、新疆与吉林种群遗传距离数值范围为 0.002—0.006 MYA Bp,其种群分歧时间大约为 0.05—0.15 MYA Bp。青海狼与本研究其他地理种群遗传距离较远,遗传距离为 0.043—0.048,由此得出青海种群与其他地理种群分歧时间大约在 1.08—1.2 MYA Bp,巧合的是这与青藏高原受地质作用的急速隆起时间(0.9—1.1 MY)相近^[27]。

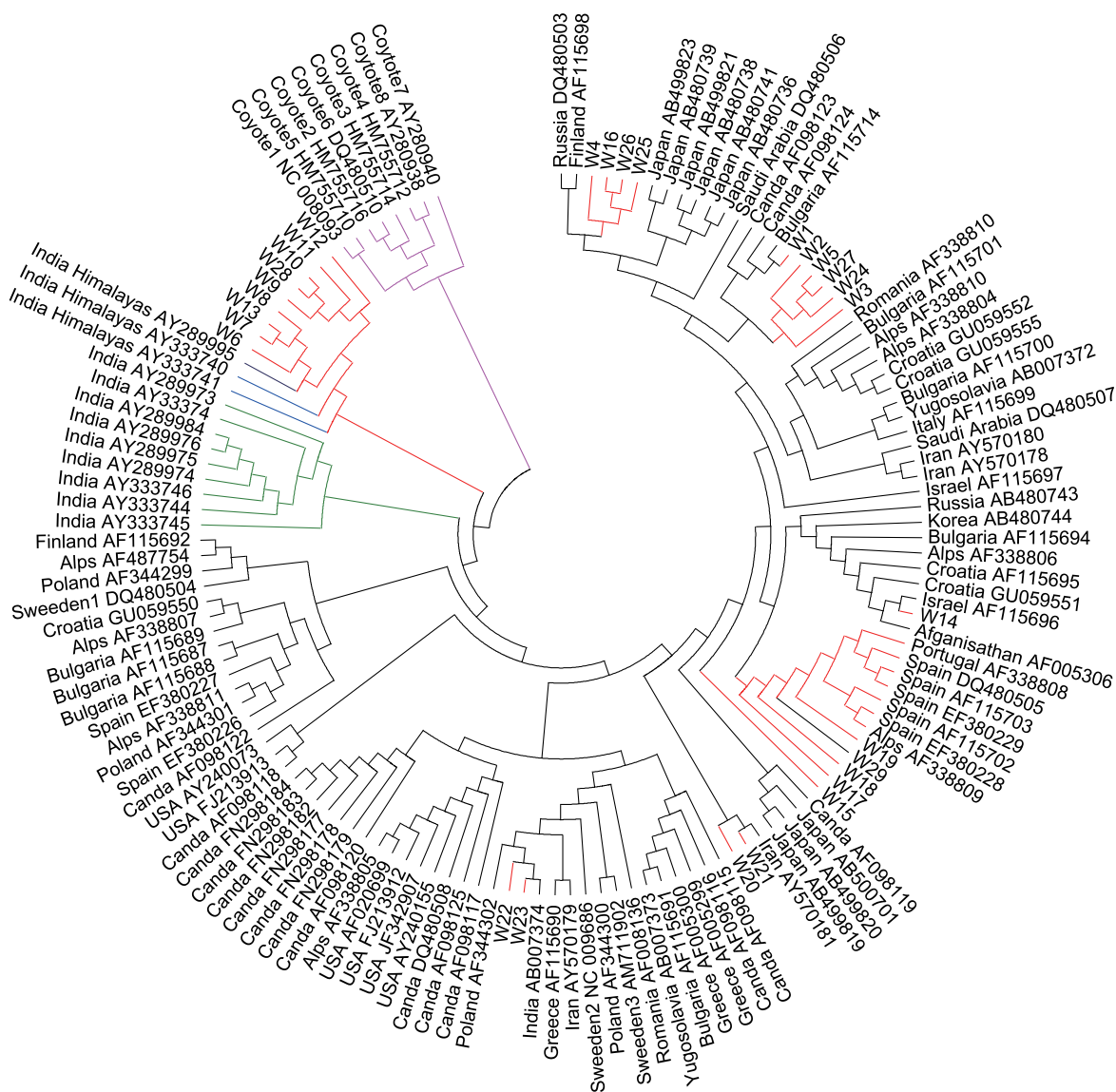


图3 基于从 Genbank 下载的 225bp 的线粒体控制区序列,使用 K2P 碱基替换模型构建的环形 NJ 树

Fig.3 Neighbor-joining original tree, computed using a nucleotide substitution model with Kimura 2 parameter distances, illustrating the phylogenetic relationship among wolf 225bp mtDNA control region haplotypes registered in GenBank

红线表示中国狼单倍型,粉红线代表郊狼外群,绿线代表分布于印度 *Canis lupus pallipes* 亚种

3 讨论

狼分布范围广,野外活体采样难度很大。本文尝试从粪便中成功的提取总 DNA,为今后通过使用粪便样品对狼进行遗传进化研究提供了依据。本研究从 55 个样品中成功的提取和扩增出 44 个个体的线粒体 HVR I 和 40 个 Cyt b 序列,其中未成功提取出 DNA 的样品全部为粪便样品,而且主要为内蒙呼伦贝尔地区样品。未提取出来的原因可能是采集的粪便样品时间过长,样品中的 DNA 降解或者粪便样品中含有可抑制后续反应的酶^[28]。

对种群进行遗传多样性评估,不仅有利于了解种群结构及动态,而且为制定种群保护和管理措施提供依据。通常考虑一个种群遗传多样的高低主要是通过对比种群内部单倍型间的遗传距离和核苷酸多态性,然而由于核苷酸多态性充分考虑到了单倍型在种群内的比例,所以一般使用核苷酸多态性来衡量一个种群遗传多样性的^[29]。本研究利用线粒体 HVR I 序列对中国 4 个地理狼种群进行遗传多样性检测,发现平均核苷

酸多态性为 2.27%, 与世界其他地区狼相比遗传多样性是较高的, 如 Randi 等^[30]通过分析 mtDNA 控制区序列发现保加利亚狼核苷酸多样性为 0.26%, Pilot^[31]等在东欧十多个国家采集到 643 只狼样品, 并成功地鉴定出 21 个线粒体 DNA 单倍型, 得出其核苷酸多样性为 1.7%, Tomislav 等^[32]分析了 91 只狼的线粒体控制区序列得出克罗地亚狼遗传多样性为 1.8%, 从而说明中国狼相对于世界其他国家和地区来说线粒体 D-loop 区存在丰富的多样性。

通过构建的中国狼分子系统发育树可以看出, 青海种群与西藏狼明显的并为一支, 而其他地区的狼则没有按照地理区划分成不同的谱系, 同时各个谱系间含有共同的单倍型, 说明其遗传基础一致, 存在着基因交流, 这与北美狼亚种分化的研究是一致的^[33]。 t 检验也显示了吉林, 内蒙, 新疆种群之间的遗传距离无显著差异, 而与青海种群差异明显。其中青海种群拥有较多的单倍型, 且通过世界狼系统进化树不难看出, 青海种群拥有的单倍型较为特殊, 不与除青藏高原及周边地区外的中国其他地区的狼单倍型相似, 而是与喜马拉雅山脉西部位于印度等国家地区的狼接近, 通过青海种群的分布区域考虑, 青海种群位于青藏高原东北部的青海湖周边地区, 北面为昆仑山和祁连山, 东面为横断山脉, 平均海拔在 3000m 以上, 山地可以达到 4000m 以上, 这些天然的地理屏障阻碍了青海种群与青藏高原外的其他地理种群进行基因交流, 长期的地理隔离造成青海种群独立进化形成了隔离种群。而青海种群与西藏狼, 云南狼共享单倍型, 说明了青海种群与西藏云南种群在起源进化上关系比较近。

长久以来, 研究认为中国狼只有一个亚种即 *C. l. Chanco*^[4-5]。Tsuda K 等^[26]通过研究狼的 3 个亚种 (*C. l. lupus*, *C. l. pallipes* and *C. l. Chanco*) 发现中国狼 (*C. l. Chanco*) 的线粒体控制区变异较其他两个亚种较大, 而我们通过对比线粒体控制区部分序列发现, 除青海地区序列与另外两个亚种序列差异较大外, 其他地区种群单倍型与另外两个亚种差别不大。Ramesh K Aggarwal 等^[34]利用 Tsuda K 等^[26]从蒙古国乌兰巴托发现的狼的线粒体单倍型与印度西部喜马拉雅山脉狼进行比较, 得出印度西部喜马拉雅山脉狼是与蒙古狼是完全不同的, 并推测其是世界上最古老的狼世系, 这与研究结果一致。基于线粒体 DNA 的研究结果, Dinesh 等^[35]认为可以将位于印度喜马拉雅山脉附近狼种群从中国狼或蒙古狼亚种 (*C. l. Chanco*) 中剥离出来一起划归为西藏亚种 (*C. l. langier*)。通过本文研究, 并结合以前形态学及解剖学上的研究结果^[36]推测青藏高原种群的狼可能与印度喜马拉雅山附近的狼同属于西藏狼亚种 (*C. l. langier*), 当然这只是推测, 具体的情况还需要从解剖生理学, 基因组学乃至古生物学的证据来证实。同时通过构建的系统进化树 (图 3) 也能看到除青藏高原及周边地区的狼外中国其他地区的狼单倍型广布于欧亚大陆乃至北美大陆狼分支中, 说明这些地区的狼起源进化关系较为复杂。

4 结论

基于线粒体控制区部分序列测定及分析, 研究结果表明中国狼较世界其他国家地区拥有较高的遗传多样性。系统进化分析表明中国狼可以分为两个世系, 且位于青藏高原及其周边地区的狼与中国其他地区的狼遗传结构差异较大, 且其遗传多样性较其他地区低。推测其在进化上与中国其他地区狼较早出现分歧, 并形成独立进化种群。利用线粒体 Cyt *b* 部分序列推算各地理种群的进化分歧时间得出, 位于青藏高原种群与其他地理种群分歧时间大约在 1.1 MY 前, 与青藏高原受地质作用急速隆起时间相近。

致谢:中国科学院西北高原生物所、青海动物园、哈尔滨野狼湖狼园、新疆富疆狼园、内蒙古达赉湖自然保护区提供研究样品, 东北林业大学高中信教授、曲阜师范大学刘广帅同学为采集样品提供指导与帮助, 特此致谢。

参考文献 (References):

- [1] Wilson D E, Reeder D M. Mammal Species of the World (MSW): A Taxonomic and Geographic Reference. 3rd ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2005.
- [2] 张洪海, 张培玉, 王振龙, 车启来. 世界狼的分布、种群数量及保护现状. 曲阜师范大学学报, 1999, 25(1): 101-103.

- [3] Busch R H. The Wolf Almanac. New York; The Lyons Press;1993, 241-241.
- [4] Ellerman J R, Morrison-Scott R C.S. Checklist of Palaearctic and Indian Mammals 1758—1960. London; British Museum (Natural History) publications,1951.
- [5] Pocock R I. The Fauna of British India, Including Ceylon and Burma, Mammalia(2 vols, Primates and Carnivora Only). London; Taylor and Francis, 1940
- [6] 王秀辉,高中信,于学伟,崔岩. 狼亚种分化的 RAPD 分子证据.东北林业大学学报,2000,28(5) :110-113.
- [7] 罗理杨,金煌,杨公社.中国狼的种内系统发育关系与亚种分化.东北林业大学学报, 2003,31(5) :81-83.
- [8] Avis J C,Arnold J,Ball R M,Birmingham E,Lamb T,Nigel J E,Reba C A,Saunders N C. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematic. Annual Review of Ecology and Systematic,1987,18(1) : 489-522.
- [9] Kim K S, Lee S E, Jeong H W, Ha J H. The complete nucleotide sequence of the domestic dog (Canis familiars) mitochondrial genome. Molecular Phylogenetics and Evolution, 1998, 10(2) : 210- 220.
- [10] Lunt D H,Whipple L E,Hyman B C. Mitochondrial DNA variable number tandem repeats(VNTRs) : utility and problems in molecular ecology. Molecular Ecology, 1998, 7(11) :1441-1455.
- [11] ROERDINK A R,ALDSTADT J H. Sensitive method for the determination of roxarsone using solid-phase micro extraction with multi-detector gas chromatography. Journal of Chromatography A, 2004, 1057(1/2) : 177-183.
- [12] Jeanmougin F,Thompson J D,Gouy M,Higgins D G,Gibson T J. Multiple sequence alignment with Clustal X. Trends in Biochemical Sciences, 1998, 23 (10) : 403-405.
- [13] Tamura K,Dudley J,Nei M,Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24 (8) :1596-1599.
- [14] Li W H,Gokobori T,Nei M. Pseudogenes as a paradigm of neutral evolution. Nature, 1981, 292(5820) : 237-239.
- [15] Wayne R K, Geffen E, Girman D J, Koepfli K P, Lau LM, Marshall C R. Molecular systematics of the canidae. Systematic Biology, 1997, 46 (4) : 622-653.
- [16] Librado P,Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics, 2009, 25 (11) : 1451-1452.
- [17] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap.Evolution,1985, 39(4) : 783-791.
- [18] Irwin D M,Koehler T D, Wilson A C. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. Journal of Molecular Evolution, 1991, 32(2) : 128-144.
- [19] Woischnik M, Moraes C T. Pattern of organization of human mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome . Genome Research, 2002, 12 (6) : 885-893.
- [20] Tourmen Y, Baris O, Dessen P, Jacques C, Malthiery Y, Reynar P. Structure and chromosomal distribution of human mitochondrial pseudogenes. Genomics, 2002, 80 (1) : 71-75.
- [21] Knight A,Mindell D P. Substitutions bias,weighting of DNA sequence evolution,and the phylogenetic positions of Fea's viper. Systems Biology,1993, 42(1) : 18-31.
- [22] 陈磊,张洪海,马建章. 蒙古狼线粒体基因组序列分析及其系统发育地位.生态学报,2010,30(6) :1463-1471.
- [23] Stadelmann B,Jacobs D S,Schoeman C, Ruedi M. Phylogeny of African Myotis bats (Chiroptera, Vespertilionidae) inferred from cytochrome b sequences. Acta Chiropterologica, 2004, 6(2) : 177-192.
- [24] Sueoka N. On the genetic basis of variation and heterogeneity of DNA base composition. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1962, 48(4) : 582-592.
- [25] Tajima F .Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics,1989,123(3) : 585-595.
- [26] Tsuda K, Kikkawa Y, Yonekawa H, Tanabe Y. Extensive interbreeding occurred among multiple matriarchial ancestors during the domestication of dogs: evidence from interand intraspecies polymorphisms in the d-loop region of mitochondrial DNA between dogs and wolves. Genes & Genetic System, 1997, 72(4) : 229-238.
- [27] Sun J, Liu T. Stratigraphic evidence for the uplift of the Tibetan Plateau between ~1.1 and ~0.9 myr ago. Quaternary Research,2000,54(3) : 309-320.
- [28] 刘艳华,张明海. 基于线粒体 Cyt b 基因的西藏马鹿种群遗传多样性研究.生态学报,2011,31(7) : 1976-1981.
- [29] Neigel J E,Avise J C. Application of a random walk model to geographic distributions of animal mitochondrial DNA variation.Genetics,1993,135 (4) : 1209-1220.
- [30] Randi E, Lucchini V, Christensen M F, Mucci N, Funk S M, Dolf G, Loeschke V. Mitochondrial DNA variability in Italian and East European wolves: detecting the consequences of small population size and hybridization. Conservation Biology, 2000,14(2) : 464-473.
- [31] Pilot M, Jedrzejewski W, Branicki W, Sidorovich W E, Jedrzejewska B, Stachura K, Funk S M. Ecological factors influence population genetic structure of European grey wolves. Molecular Ecology, 2006,15(14) : 4533-4553.

- [32] Gomerčić T, Sindičić M, Galov A, Arbanasić H, Kusak J, Kocijan I, Gomerčić M D, Huber D. High genetic variability of the grey wolf (*Canis lupus* L.) population from Croatia as revealed by mitochondrial DNA control region sequences. *Zoological Studies*, 2010, 49(6): 816-823.
- [33] Vila C, Amorim J R, Leonard J A, Posada D, Castroviejo J, Petrucci-Fonseca F, Crandall K A, Ellegren H, Wayne R K. Mitochondrial DNA Phylogeography and Population History of the Grey Wolf *Canis lupus*. *Molecular Evolution*, 1999, 8(12): 2089-2103.
- [34] Aggarwal R K, Ramadevi J, Singh L. Ancient origin and evolution of the Indian wolf: evidence from mitochondrial DNA typing of wolves from Trans-Himalayan region and Peninsular India. *Genome Biology*, 2003, 4: 6-6.
- [35] Sharma D K, Maldonado J E, Jhala Y V, Fleischer R C. Ancient wolf lineages in India. *Biology Letters*, 2004, 271(S3): S1-S4.
- [36] Pocock R I, F R S, F Z S. The races of *Canis lupus*. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 1935, 105(3): 647-686.

附表 从 Genbank 下载的用于分析中国狼系统发育序列信息

Table Reference mitochondrial control-region sequences obtained from Genbank and used in the phylogenetic analysis

样品编号 Sample code	Genbank 登录号 Genbank Acc. No.	亚种 Subspecies	国家或地区/洲 Country or region/Continent		D-loop (bp)	单倍型编号 Haplotypes No.	控制区位置 D-loop region
1-CHW1	AY916807	<i>C. l. chanco</i>	中国	亚洲	597	W17	Most of 5'-CR-I
2-CHW2	AY916808	<i>C. l. chanco</i>	中国	亚洲	597	W18	Most of 5'-CR-I
3-CHW3	AY916810	<i>C. l. chanco</i>	中国	亚洲	597	W19	Most of 5'-CR-I
4-CHW4	AY916811	<i>C. l. chanco</i>	中国	亚洲	597	W20	Most of 5'-CR-I
5-CHW5	AY916812	<i>C. l. chanco</i>	中国	亚洲	597	W21	Most of 5'-CR-I
6-CHW6	AY916806	<i>C. l. chanco</i>	中国	亚洲	597	W22	Most of 5'-CR-I
7-CHW7	AY916813	<i>C. l. chanco</i>	中国	亚洲	597	W23	Most of 5'-CR-I
8-CHW8	AY916814	<i>C. l. chanco</i>	中国	亚洲	597	W24	Most of 5'-CR-I
9-CHW9	AY916805	<i>C. l. chanco</i>	中国	亚洲	597	W2	Most of 5'-CR-I
10-CHW11	AY916816	<i>C. l. chanco</i>	中国	亚洲	597	W4	Most of 5'-CR-I
11-CHW12	AY916817	<i>C. l. chanco</i>	中国	亚洲	597	W25	Most of 5'-CR-I
12-CHW13	AY916804	<i>C. l. chanco</i>	中国	亚洲	597	W26	Most of 5'-CR-I
13-CHW14	AY916819	<i>C. l. chanco</i>	中国	亚洲	597	W2	Most of 5'-CR-I
14-CHW15	AY916818	<i>C. l. chanco</i>	中国	亚洲	597	W27	Most of 5'-CR-I
15-CHW16	AY916820	<i>C. l. chanco</i>	中国	亚洲	597	W8	Most of 5'-CR-I
16-CHW17	AY916822	<i>C. l. chanco</i>	中国	亚洲	597	W28	Most of 5'-CR-I
17-CHW18	AY916821	<i>C. l. chanco</i>	中国	亚洲	597	W7	Most of 5'-CR-I
18-CT1	FJ032363	<i>C. l. langier</i>	中国西藏	亚洲	1263	W9	Complete D-loop
19-CT2	NC_011218	<i>C. l. langier</i>	中国西藏	亚洲	1263	W9	Complete D-loop
20-CN	GQ374438	<i>C. l. chanco</i>	中国	亚洲	1250	W2	Complete D-loop
21-ch1	AB007375	<i>C. l. chanco</i>	蒙古	亚洲	673	W29	Complete 5'-CR-I
22-ch2	AB007376	<i>C. l. chanco</i>	蒙古	亚洲	673	W2	Complete 5'-CR-I
23-ch3	AB007377	<i>C. l. chanco</i>	蒙古	亚洲	673	W4	Complete 5'-CR-I
24-ch4	AB007378	<i>C. l. chanco</i>	蒙古	亚洲	673	W18	Complete 5'-CR-I
25-ch5	AB007379	<i>C. l. chanco</i>	蒙古	亚洲	673	W16	Complete 5'-CR-I
26-Rw1	DQ480503		俄罗斯	欧洲	1269		Complete D-loop
27-Wo251	AB480743	<i>C. l. chanco</i>	俄罗斯	欧洲	598		Most of 5'-CR-I
28-Wo252	AB480744	<i>C. l. chanco</i>	朝鲜	亚洲	598		Most of 5'-CR-I
29-Jw229	AB480736	<i>C. l. hodophilax</i>	日本	亚洲	598		Most of 5'-CR-I
30-Jw237(1)	AB480738	<i>C. l. hodophilax</i>	日本	亚洲	590		Most of 5'-CR-I
31-Jw240(1)	AB480739	<i>C. l. hodophilax</i>	日本	亚洲	598		Most of 5'-CR-I
32-Jw257	AB480741	<i>C. l. hodophilax</i>	日本	亚洲	598		Most of 5'-CR-I
33-Jw233	AB499819	<i>C. l. hodophilax</i>	日本	亚洲	1231		Complete D-loop
34-Jw235	AB499820	<i>C. l. hodophilax</i>	日本	亚洲	1271		Complete D-loop
35-Jw237(2)	AB499821	<i>C. l. hodophilax</i>	日本	亚洲	1102		Most of D-loop
36-Jw240(2)	AB499823	<i>C. l. hodophilax</i>	日本	亚洲	1270		Complete D-loop
37-Jw	AB500701	<i>C. l. hattai</i>	日本	亚洲	599		Most of 5'-CR-I
38-Sw1	DQ480506		沙特阿拉伯	亚洲	1269		Complete D-loop
39-Sw2	DQ480507		沙特阿拉伯	亚洲	1270		Complete D-loop
40-W3Tr	AY570178		伊朗	亚洲	586		Most of 5'-CR-I

续表

样品编号 Sample code	Genbank 登录号 Genbank Acc. No.	亚种 Subspecies	国家或地区/洲 Country or region/Continent		D-loop(bp)	单倍型编号 Haplotypes No.	控制区位置 D-loop region
41-W1Ks	AY570179		伊朗	亚洲	586		Most of 5'-CR-I
42-W2Qv	AY570180		伊朗	亚洲	587		Most of 5'-CR-I
43-W4Hd	AY570181		伊朗	亚洲	586		Most of 5'-CR-I
44-Iw	AB007374	<i>C.l. pallipes</i>	印度	亚洲	672		Complete 5'-CR-I
45-Iwb	AY333744	<i>C.l. pallipes</i>	印度	亚洲	336		3'-CR-II
46-Iwc	AY333745	<i>C.l. pallipes</i>	印度	亚洲	336		3'-CR-II
47-Iwd	AY333746	<i>C.l. pallipes</i>	印度	亚洲	336		3'-CR-II
48-GW-AMM	AY289973	<i>C.l. indica</i>	印度	亚洲	1323		Complete D-loop
49- GW-AP-1	AY289974	<i>C.l. indica</i>	印度	亚洲	1253		Complete D-loop
50- GW-AP-2	AY289975	<i>C.l. indica</i>	印度	亚洲	1272		Complete D-loop
51- GW-AP-3	AY289976	<i>C.l. indica</i>	印度	亚洲	1262		Complete D-loop
52- GW-gujarat	AY289984	<i>C.l. indica</i>	印度	亚洲	1292		Complete D-loop
53-HW-TW5	AY289995	<i>C.l. chanco</i>	印度喜马拉雅山	亚洲	1296		Complete D-loop
54-HWD1	AY333740	<i>C.l. chanco</i>	印度喜马拉雅山	亚洲	335		3'-CR-II
55-HWD2	AY333741	<i>C.l. chanco</i>	印度喜马拉雅山	亚洲	335		3'-CR-II
56-Wo1	AF098115	<i>C.l. tundrarum</i>	加拿大	北美洲	707		Complete 5'-CR-I
57-Wo2	AF098116	<i>C.l. lupus</i>	加拿大	北美洲	706		Complete 5'-CR-I
58-W03	AF098117	<i>C.l. lupus</i>	加拿大	北美洲	706		Complete 5'-CR-I
59-Wo4	AF098118	<i>C.l. columbianus</i>	加拿大	北美洲	706		Complete 5'-CR-I
60-Wo5	AF098119	<i>C.l. columbianus</i>	加拿大	北美洲	708		Complete 5'-CR-I
61-Wo6	AF098120	<i>C.l. columbianus</i>	加拿大	北美洲	706		Complete 5'-CR-I
62-Wo8	AF098122	<i>C.l. columbianus</i>	加拿大	北美洲	708		Complete 5'-CR-I
63-Wo9	AF098123	<i>C.l. crassodon</i>	加拿大	北美洲	707		Complete 5'-CR-I
64-Wo10	AF098124	<i>C.l. crassodon</i>	加拿大	北美洲	707		Complete 5'-CR-I
65-Wo11	AF098125	<i>C.l. crassodon</i>	加拿大	北美洲	707		Complete 5'-CR-I
66-Cw	DQ480508		加拿大	北美洲	1270		Complete D-loop
67-Lu68	FN298177		加拿大	北美洲	425		Part of 5'-CR-I
68-H173	AY240155		美国	北美洲	1254		Complete D-loop
69-H919	AY240073		美国	北美洲	1282		Complete D-loop
70-Coy13	JF342907	<i>C.l. lycaon</i>	美国	北美洲	1300		Complete D-loop
71-w6	FJ213912		美国	北美洲	603		Most of 5'-CR-I
72-w7	FJ213913		美国	北美洲	602		Most of 5'-CR-I
73-Uw	AF020699		美国	北美洲	402		Most of 5'-CR-I
74-w6	AF008136		罗马尼亚	欧洲	712		Complete 5'-CR-I
75-Sw1	AM711902	<i>C.l. lupus</i>	瑞典	欧洲	1357		Complete D-loop
76-Sw2	NC_009686	<i>C.l. lupus</i>	瑞典	欧洲	1357		Complete D-loop
77-Sw3	DQ480504		瑞典	欧洲	1249		Complete D-loop
78-Spw1	DQ480505		西班牙	欧洲	1269		Complete D-loop
79-ClupMIT1	EF380226	<i>C.l. signatus</i>	西班牙	欧洲	647		Most of 5'-CR-I
80-ClupMIT2	EF380227	<i>C.l. signatus</i>	西班牙	欧洲	647		Most of 5'-CR-I
81-ClupMIT3	EF380228	<i>C.l. signatus</i>	西班牙	欧洲	647		Most of 5'-CR-I
82-ClupMIT4	EF380229	<i>C.l. signatus</i>	西班牙	欧洲	647		Most of 5'-CR-I
83-w1	AF344299		波兰	欧洲	257		Part of 5'-CR-I
84-w2	AF344300		波兰	欧洲	257		Part of 5'-CR-I
85-w3	AF344301		波兰	欧洲	257		Part of 5'-CR-I

续表

样品编号 Sample code	Genbank 登录号 Genbank Acc. No.	亚种 Subspecies	国家或地区/洲 Country or region/Continent		D-loop(bp)	单倍型编号 Haplotypes No.	控制区位置 D-loop region
86-w4	AF344302		波兰	欧洲	257		Part of 5'-CR-I
87-w8	AF005299		希腊	欧洲	257		Part of 5'-CR-I
88-w9	AF005300		希腊	欧洲	257		Part of 5'-CR-I
89-w18	AF005306		阿富汗	亚洲	257		Part of 5'-CR-I
90-WCR01	GU059550		克罗地亚	欧洲	280		Part of 5'-CR-I
91-WCR02	GU059551		克罗地亚	欧洲	280		Part of 5'-CR-I
92-WCR03	GU059552		克罗地亚	欧洲	281		Part of 5'-CR-I
93-WCR06	GU059555		克罗地亚	欧洲	281		Part of 5'-CR-I
94-Yw1	AB007372	<i>C. l. lupus</i>	斯洛文尼亚	欧洲	673		Complete 5'-CR-I
95-Yw2	AB007373	<i>C. l. lupus</i>	斯洛文尼亚	欧洲	372		Part of 5'-CR-I
96-w1	AF338803		法国/意大利	欧洲	343		Part of 5'-CR-I
97-w2	AF338804		阿尔卑斯山	欧洲	343		Part of 5'-CR-I
98-w3	AF338805		阿尔卑斯山	欧洲	342		Part of 5'-CR-I
99-w4	AF338806		克罗地亚	欧洲	342		Part of 5'-CR-I
100-w5	AF338807		克罗地亚	欧洲	342		Part of 5'-CR-I
101-w6	AF338808		葡萄牙	欧洲	342		Part of 5'-CR-I
102-w7	AF338809		西班牙	欧洲	342		Part of 5'-CR-I
103-w8	AF338810		罗马尼亚	欧洲	342		Part of 5'-CR-I
104-w9	AF338811		波兰	欧洲	342		Part of 5'-CR-I
105-w10	AF338812		西班牙	欧洲	342		Part of 5'-CR-I
106-w11	AF487754		阿尔卑斯山	欧洲	342		Part of 5'-CR-I
107-w1	AF115687		保加利亚	欧洲	543		Most of 5'-CR-I
108-w2	AF115688		保加利亚	欧洲	542		Most of 5'-CR-I
109-w3	AF115689		保加利亚	欧洲	542		Most of 5'-CR-I
110-w4	AF115690		希腊	欧洲	542		Most of 5'-CR-I
111-w5	AF115691		保加利亚	欧洲	542		Most of 5'-CR-I
112-w7	AF115692		芬兰	欧洲	542		Most of 5'-CR-I
113-w8	AF115693		意大利/东欧	欧洲	542		Most of 5'-CR-I
114-w9	AF115694		保加利亚	欧洲	542		Most of 5'-CR-I
115-w10	AF115695		克罗地亚	欧洲	542		Most of 5'-CR-I
116-w11	AF115696		以色列	亚洲	542		Most of 5'-CR-I
117-w12	AF115697		以色列	亚洲	542		Most of 5'-CR-I
118-w13	AF115698		芬兰	欧洲	542		Most of 5'-CR-I
119-w14	AF115699		意大利	欧洲	543		Most of 5'-CR-I
120-w15	AF115700		保加利亚	欧洲	543		Most of 5'-CR-I
121-w16	AF115701		保加利亚	欧洲	543		Most of 5'-CR-I
122-w19	AF115702		西班牙	欧洲	542		Most of 5'-CR-I
123-w20	AF115703		西班牙	欧洲	542		Most of 5'-CR-I
124-Coytoe 1	NC_008093	<i>C. l. latrans</i>	美国	北美洲	1265		Complete D-loop
125-Ccr21	HM755710	<i>C. l. latrans</i>	加拿大	北美洲	342		Part of 5'-CR-I
126-Ccr23	HM755712	<i>C. l. latrans</i>	加拿大	北美洲	340		Part of 5'-CR-I
127-Ccr25	HM755714	<i>C. l. latrans</i>	加拿大	北美洲	340		Part of 5'-CR-I
128-Ccr27	HM755716	<i>C. l. latrans</i>	加拿大	北美洲	340		Part of 5'-CR-I
129-Coytoe 2	DQ480510	<i>C. l. latrans</i>	美国	北美洲	1262		Complete D-loop
130-Cla25	AY280938	<i>C. l. latrans</i>	美国	北美洲	324		Part of 5'-CR-I
131-Cla27	AY280940	<i>C. l. latrans</i>	美国	北美洲	323		Part of 5'-CR-I