

藏獒线粒体细胞色素氧化酶亚基基因序列的测定与犬科动物系统发育分析

李隐侠, 钱 勇, 曹少先*

(江苏省农业科学院畜牧研究所, 南京 210014)

摘要: 旨在研究藏獒的起源、分类地位, 及其与世界上其他大型家犬品种间的系统发育关系, 根据家犬线粒体基因组序列设计引物, 扩增藏獒线粒体 3 个细胞色素氧化酶亚基基因(CO I、CO II 和 CO III)的全序列, 并以大熊猫为外类群, 运用邻接法和最大似然法分析包括藏獒在内的 20 个犬科动物的系统发育关系。结果发现, 藏獒线粒体基因组中 CO I、CO II 和 CO III 长度分别为 1 545、684 和 784 bp, 分别编码 514、227 和 261 个氨基酸; 系统发育分析发现, 藏獒、12 个家犬品种与灰狼聚在一起, 说明藏獒与家犬亚种内其他家犬品种一样起源于灰狼; 家犬亚种内的 13 个家犬品种可以分为 3 大类, 藏獒与圣伯纳犬、英国老式牧羊犬、兰伯格犬聚为一类, 说明藏獒与圣伯纳犬、英国老式牧羊犬、兰伯格犬的亲缘关系较近, 从分子水平上证实圣伯纳犬等大型家犬品种可能含有藏獒的血统。由此得出结论: 藏獒起源于灰狼, 在动物学分类地位上属于食肉目、犬科、犬属、狼种、家犬亚种; 圣伯纳犬等大型家犬品种在品种形成过程中可能引入了藏獒的血统。

关键词: 藏獒; 犬科; 线粒体细胞色素氧化酶亚基; 起源; 分类地位; 系统发育

中图分类号: S813.3; Q343.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)08-1246-07

Sequencing Mitochondrial Cytochrome Oxidase Subunit of Tibetan Mastiff and Phylogenetic Analysis of *Canidae*

LI Yin-xia, QIAN Yong, CAO Shao-xian*

(Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: Based on the sequence of mitochondrial DNA Cytochrome oxidase subunit, the origin, taxon of Tibetan Mastiff and the phylogenetic relationship between Tibetan Mastiff and other large breed dogs were studied. Primers were designed according to the mitochondrial sequence of domestic dog, to amplify COI (Cytochrome oxidase subunit 1), COII (Cytochrome oxidase subunit 2) and COIII (Cytochrome oxidase subunit 3) of the Tibetan Mastiff. Phylogenetic trees among Tibetan Mastiff and other 19 breeds of *Canidae* were constructed using giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) as the outgroup. The results shown that the length of COI, COII and COIII were 1 545, 684 and 784 bp, respectively, three genes coded 514, 227 and 261 AA, respectively. Phylogenetic analysis displayed that the Tibetan Mastiff, 12 domestic dog breeds and grey wolf clustered together, which indicated Tibetan Mastiff and other domestic dog breeds originated from grey wolf. In *Canis*, Tibetan Mastiff clustered together with Saint Bernard, Old English Sheepdog and Leonberger, but German Sheepdog, Swedish Elkhound and Black Russian Terrier clustered one group, middle and little breed dogs clustered together, which suggested that there were closer relationship between Tibetan Mastiff and Saint Bernard, Old English Sheepdog and Leonberger, it was confirmed that many large breed dogs in the world such as Saint Bernard were possible of

收稿日期: 2014-02-18

作者简介: 李隐侠(1979-), 女, 河南固始人, 博士, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: liyxxmh@126.com

* 通信作者: 曹少先, 研究员, E-mail: caoshaoxian@163.com

having blood lineage of Tibetan Mastiff based on molecular data. The result indicate that Tibetan Mastiff originates from grey wolf, about the zoological taxon, Tibetan Mastiff belongs to *Canis lupus familiaris*, *Canis lupus*, *Canis*, *Canidae*, *Carnivora*, the large breed dogs such as Saint Bernard probably have the blood lineage of Tibetan Mastiff in the breed forming.

Key words: Tibetan Mastiff; *Canidae*; cytochrome oxidase subunit; origin; taxonomic status; phylogenetic relationship

藏獒又称为藏狗、番狗、羌狗,主要栖息在我国青藏高原海拔 3 000~5 000 m 的高寒地带,属国家二级保护动物,是目前世界上最古老、最凶猛的犬种,也是犬类动物中唯一没有被时间和环境所改变的雪域高原的“活化石”,素有“东方神犬”之称^[1-2]。由于暴利的驱使,自 20 世纪 80 年代起藏獒开始大量外流,致使藏獒的基础群数正在逐年下降,据估算目前现有藏獒的总数约为 30 万头,但优质纯种藏獒不超过 100 头,其中美国不超过 20 头,中国台湾地区不超过 10 头,纯种藏獒正濒临灭绝^[3]。因此,作为我国唯一的大型家犬品种和世界家犬种质资源基因库中的重要一员,藏獒的保护、利用和研究工作已迫在眉睫。

犬是人类最亲密的伙伴和朋友,也是被人类第一个驯化的家养动物^[4],因此有关犬的起源、进化和品种形成等问题一直是各国学者研究的热点之一^[5-7]。关于犬的起源问题已达成共识,即世界范围内的所有家犬都起源于灰狼^[7-9]。但关于家犬的发源地和具体起源时间各研究结果并不一致,存在较大的分歧。犬科动物第 1 次出现的化石记录大约在 33 000 年前的西伯利亚^[10]; C. Vila 等^[5]根据 261 bp 线粒体 D-loop 区序列研究发现,家犬的发源地可能在欧洲、东南亚和东亚,最早驯化时间大约是在 40 000~50 000 年前,认为家犬的起源是多地区、不同时间发生的驯化事件。A. H. Freedman 等^[11]从假定的犬科动物起源中心挑选了 3 个灰狼个体、2 个家犬个体和 1 个金豺个体进行基因组测序和分析,结果发现,家犬和灰狼的分歧时间大约在 11 000~16 000 年前。O. Thalmann 等^[12]分析了 18 个史前动物线粒体基因组序列,发现所有现代家犬与古代或者是欧洲的现代犬科动物在系统进化方面都有密切的关系,分子数据分析表明,家犬的起源时间大约在 18 800~32 100 年前,起源点可能在欧洲。

藏獒是目前世界上最古老的家犬品种之一,因此藏獒起源问题的研究对揭示家犬的起源、驯化和分化事件等都具有重要意义。但目前关于藏獒的起

源、驯化及其与世界其他大型家犬品种之间系统发育关系的报道不多,其中主要是对线粒体 DNA 全序列^[13]、COI 基因 DNA 条形码^[14]、线粒体基因组细胞色素 b 基因和 D-loop 区序列^[2]的研究结果。为了进一步研究藏獒的起源以及与其他大型家犬品种间的系统发育关系,本研究测定了藏獒线粒体细胞色素氧化酶亚基基因 CO I、CO II 和 CO III 全序列,并以熊科的大熊猫作为外类群对包括藏獒在内的 20 个犬种进行了系统发育分析,以期对藏獒种质资源的保护、利用提供理论依据,为进一步研究家犬的起源、驯化提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验动物为成年健康的纯种藏獒,来自南京西岗警犬基地,耳动脉采血 5 mL, ACD 抗凝, -20 °C 保存备用。选取犬科中已经测出细胞色素氧化酶亚基基因序列的、具有代表性的 19 个犬种与藏獒进行系统发育分析,其中大型家犬品种 6 个,包括圣伯纳犬、英国老式牧羊犬、德国牧羊犬、瑞典猎鹿犬、俄罗斯黑背更犬、兰伯格犬;中小型家犬品种 6 个,包括凯利蓝更犬、史宾格犬、标准雪纳瑞犬、平毛寻回猎犬、贵宾犬和喜乐蒂牧羊犬;灰狼个体 3 个,郊狼个体 3 个、赤狐个体 1 个。并选择与犬科亲缘关系较近的熊科大熊猫属的大熊猫作为系统发育分析的外类群。通过数据库搜索和文献追踪获得相应犬种序列(表 1)。

1.2 DNA 提取

采用常规的酚-氯仿法^[15]提取藏獒血液基因组 DNA,用紫外分光光度计和 0.5% 低熔点琼脂糖(Promega 公司)凝胶电泳检测提取质量。

1.3 PCR 扩增与测序

根据家犬线粒体基因组序列(GenBank 序列号:U96639),采用 Primer Premier 5.0 软件(Primer Biosoft International)设计引物,引物序列及退火温度见表 2。PCR 扩增的反应体系为 25 μ L,包括

表 1 试验样本

Table 1 Experimental samples used in this study

| 分类 Taxon | 犬种 Breed | GenBank 序列号 GenBank accession No. |
|----------------------|--|--------------------------------------|
| | 藏獒 Tibetan Mastiff | * |
| | 俄罗斯黑背更犬 Black Russian Terrier | DQ480493 |
| | 史宾格犬 English Springer Spaniel | AY656745 |
| | 平毛寻回猎犬 Flat Coated Retriever | DQ480490 |
| | 德国牧羊犬 German Sheepdog | DQ480489 |
| | 凯利蓝更犬 Kerry Blue Terrier | AY656740 |
| | 兰伯格犬 Leonberger | AY656750 |
| | 英国老式牧羊犬 Old English Sheepdog | AY656742 |
| | 贵宾犬 Poodle | DQ480494 |
| 犬科 <i>Canidae</i> | 犬属 <i>Canis</i> | |
| | 圣伯纳犬 Saint Bernard | AY656749 |
| | 喜乐蒂牧羊犬 Shetland Sheepdog | DQ480500 |
| | 标准雪纳瑞犬 Standard Schnauzer | AY656752 |
| | 瑞典猎鹿犬 Swedish Elkhound | DQ480501 |
| | 灰狼 1 Grey wolf, <i>Canis lupus</i> | DQ480503 |
| | 灰狼 2 | DQ480506 |
| | 灰狼 3 | DQ480507 |
| | 郊狼 1 Coyote, <i>Canis latrans</i> | DQ480510 |
| | 郊狼 2 | DQ480511 |
| | 郊狼 3 | NC008093 |
| | 狐属 <i>Vulpes</i> | |
| | 赤狐 Red fox, <i>Vulpes vulpes</i> | AM181037 |
| | 大熊猫 1 Giant panda, <i>Ailuropoda melanoleuca</i> | NC009492 |
| 熊科 <i>Ursidae</i> | 大熊猫属 <i>Ailuropoda</i> | |
| | 大熊猫 2 | FM177761 |
| | 大熊猫 3 | AM711896 |

表 2 扩增线粒体细胞色素氧化酶亚基基因的引物参数

Table 2 Parameters of oligo-nucleotide primer pairs used for amplification of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit gene

| 目标基因 Target gene | 引物序列(5'-3') Primer sequence | 退火温度/°C Annealing temperature | 片段长度/bp Length |
|---------------------|---|----------------------------------|-------------------|
| CO I | CACTGCCTTGAGCCTCCTCATC GGGGAGGTTGCGTCCTGTAATC | 55.9 | 1 639 |
| CO II | CTCCATACCACACGTTTGAAGA GTGTGCTAAGGATGCTTTGGTCT | 54.0 | 1 497 |
| CO III | TTTATTCCCAACACCCAGTCGC GGGGTCAAAACCACATTCGTAGG | 55.8 | 1 574 |

30 ng 基因组 DNA, 1.5 mmol · L⁻¹ MgCl₂, 1 × 缓冲液, 0.2 mmol · L⁻¹ dNTP, 0.01% 明胶, 1.0 U Taq DNA 聚合酶 (TaKaRa 公司), 引物 0.2 μmol · L⁻¹。反应条件: 94 °C 5 min 后, 进行 30 个循环 (94 °C 40 s, 退火 45 s, 72 °C 1 min), 最后 72 °C 再延伸 10 min。1.5% 低熔点琼脂糖 (Promega 公司) 凝胶电泳检测 PCR 产物, 用 Geneclean III 试剂盒 (Q. Biogene 公司) 回收纯化, 直接送往上海英骏生物技术有限公司进行测序。

1.4 数据处理

用 DNASTar5.02 (DNASTAR Inc., 1996) 软件包中的 EditSeq 和 MegAlin 程序对所测序列和数据库中的序列进行拼接、比对分析和对位排列, 并计算不同物种间的序列差异百分比; 用 MEGA 5.1 软件包^[16] 统计序列的碱基组成、多态位点和转换/颠换比 (Transition/Transversion, Ts/Tv); 用 MEGA 5.1 软件包^[16] 中的邻接法 (Neighbor-joining, NJ) 和最大似然法 (Maximum parsimony, MP) 构建犬科系统发育树, 自举分析 (Bootstrap test) 1 000 次重复抽样检验获得置信度 (Bootstrap percentage, BP)。

2 结果

2.1 藏獒线粒体细胞色素氧化酶亚基基因序列

通过 PCR 扩增和克隆测序获得了藏獒线粒体细胞色素氧化酶 3 个亚基基因序列, 序列长度分别为 1 545、684 和 784 bp, 拼接后藏獒线粒体 CO 基因总长度为 3 013 bp, 与引物源序列的同源性为 99.8%。序列中 T、C、A、G 4 种碱基含量分别为 30.9%、24.6%、28.1% 和 16.4%, 其中 A + T = 59%, G + C = 41%, AT 含量明显高于 GC 含量。藏獒线粒体细胞色素氧化酶 3 个亚基基因分别编码

514、227 和 261 个氨基酸, 与引物源序列编码蛋白的氨基酸序列的同源性为 91.9%。藏獒线粒体细胞色素氧化酶 3 个亚基基因序列长度、碱基组成与犬科中的其他物种是一致的^[17-18], 可见犬科动物线粒体细胞色素氧化酶亚基基因比较保守。

2.2 犬科不同物种间线粒体细胞色素氧化酶亚基基因序列的变异分析

犬科 20 个物种线粒体细胞色素氧化酶亚基基因 3 013 bp 序列中有保守位点 (Conserved site) 2 482 个, 变异位点 (Variable site) 531 个。变异位点中简约信息多态位点 (Parsimony informative polymorphic site) 154 个, 占多态位点总数的 29.0%, 单一多态位点 (Single polymorphic sites) 377 个, 占多态位点总数的 71.0%。藏獒、12 个家犬品种线粒体细胞色素氧化酶亚基基因 3 013 bp 序列中共发现 24 个多态位点, 多态位点百分率为 0.8%, 其中单一多态位点 6 个, 占多态位点总数的 25.0%, 简约信息多态位点 18 个, 占多态位点总数的 75.0%。在藏獒、12 个家犬品种线粒体细胞色素氧化酶亚基基因序列的变异类型中, 没有发现碱基缺失/插入, 只有碱基替换, 而在碱基替换中转换 7 次, 颠换 1 次, 转换/颠换比 (Ts/Tv) 为 7.7 : 1, 明显大于转换/颠换比的临界值 2.0, 表现出较高的转换偏爱性^[19]。

2.3 犬科不同犬种间的系统发育关系分析

犬科 20 个犬种间线粒体细胞色素氧化酶亚基基因序列差异百分比结果见表 3。在家犬品种内藏獒与大型家犬品种的序列差异百分比较小 (0.25), 而与中小型家犬品种间的序列差异百分比较大 (0.35), 说明藏獒与大型家犬品种间有较高的遗传相似性, 亲缘关系较近。在大型家犬品种中, 藏獒与圣伯纳犬、英国老式牧羊犬、兰伯格犬间的序列差异

表 3 犬科动物、外类群间线粒体细胞色素氧化酶基因序列差异百分比

Table 3 The sequence divergence between species of *Canidae* and outgroups

| | 藏獒 Tibetan Mastiff | 大型家犬 Large breed dogs | 中小型家犬 Middle and small breed dogs | 灰狼 Grey wolf | 郊狼 Coyotes | 赤狐 Red fox |
|--------------------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------------------|-----------------|---------------|---------------|
| 大型家犬 Large breed dogs | 0.25 | | | | | |
| 中小型家犬 Middle and small breed dogs | 0.35 | 0.38 | | | | |
| 灰狼 Grey wolf | 0.40 | 0.45 | 0.38 | | | |
| 郊狼 Coyotes | 4.50 | 4.60 | 4.59 | 4.50 | | |
| 赤狐 Red fox | 17.20 | 17.20 | 17.12 | 17.0 | 17.3 | |
| 大熊猫 Giant panda | 23.90 | 23.78 | 23.80 | 23.70 | 23.20 | 24.60 |

百分比为 0.13, 小于藏獒与其他大型家犬品种间的序列差异百分比(0.37), 说明藏獒与圣伯纳犬、英国老式牧羊犬、兰伯格犬间的亲缘关系较近。

以熊科大熊猫属的大熊猫为外类群, 采用 NJ 法和 MP 法构建了犬科 20 个物种的系统发育树(图 1 和图 2), 结果发现, NJ 树和 MP 树的拓扑结构基本一致。藏獒与犬科 19 个物种聚在一起, 而外类群大熊猫自成一类, 节点的自举支持率(BP)为 100% 和 99%; 在犬科中, 犬属动物(藏獒、12 个家犬品种、

灰狼和郊狼)聚在一起, BP 值为 100% 和 99%, 而赤狐自成一类; 在犬属内, 藏獒、12 个家犬品种和灰狼聚为一类, BP 值为 100% 和 99%, 而郊狼自成一类, BP 值为 100% 和 99%; 藏獒、12 个家犬品种可以分为 3 大类, 藏獒与圣伯纳犬、英国老式牧羊犬、兰伯格犬聚为一类, BP 值为 100% 和 97%, 德国牧羊犬与瑞典猎鹿犬、俄罗斯黑背更犬聚为一类, BP 值为 92% 和 95%; 而中、小型家犬品种聚为一类, BP 值为 100% 和 98%。

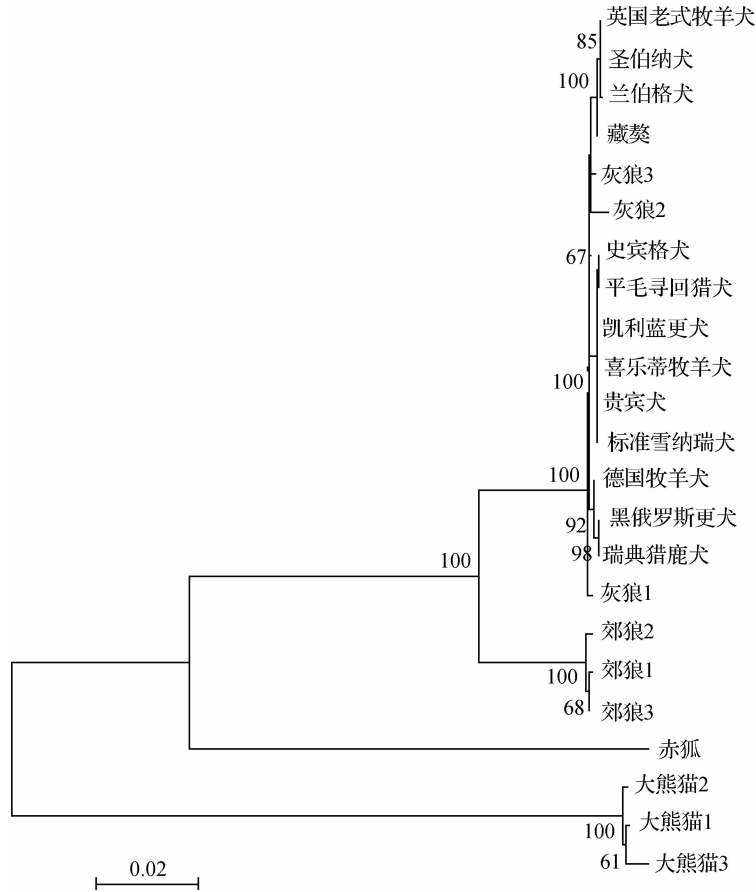


图 1 基于线粒体细胞色素氧化酶亚基基因序列采用 NJ 法构建的犬科系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of *Canidae* based on cytochrome oxidase subunit gene sequences by Neighbor-joining method

3 讨论

3.1 藏獒的起源

犬是人类最亲密的伙伴和最忠实的朋友, 与人类关系密切, 因此犬的起源和进化是人类关注的热点, 经过多年的争论和深入研究, 目前已基本达成共识, 即世界范围内的所有家犬都起源于灰狼^[7,9]。在古生物学研究方面, 到目前为止, 发掘较早的犬化石有 2 个: 一是来自于中国 10 000~26 000 年前的家犬化石^[20], 另外一个来源于中东大约 12 000 年前的 1

个小型犬科动物骨架化石^[21], 这些考古学证据表明家犬可能起源于东亚、西南亚或北欧^[5,22]。在分子生物学研究方面, P. Savolainen 等^[7]利用 582 bp 的线粒体序列对来自欧洲、亚洲、非洲和北美洲的 654 只狗进行分析, 结果发现, 家犬的驯化地点是在东亚的某一地区; 罗理扬^[9]利用 597 bp 的线粒体 DNA 序列对来自世界各地(澳洲除外)1 218 个家犬样品进行分析, 将家犬的发源地进一步缩小为: 以泰国为中心的欧亚大陆部分、东南亚的岛屿, 以及以中国西南地区为中心的部分省份(包括云南、贵州、广西、西藏和海南)。

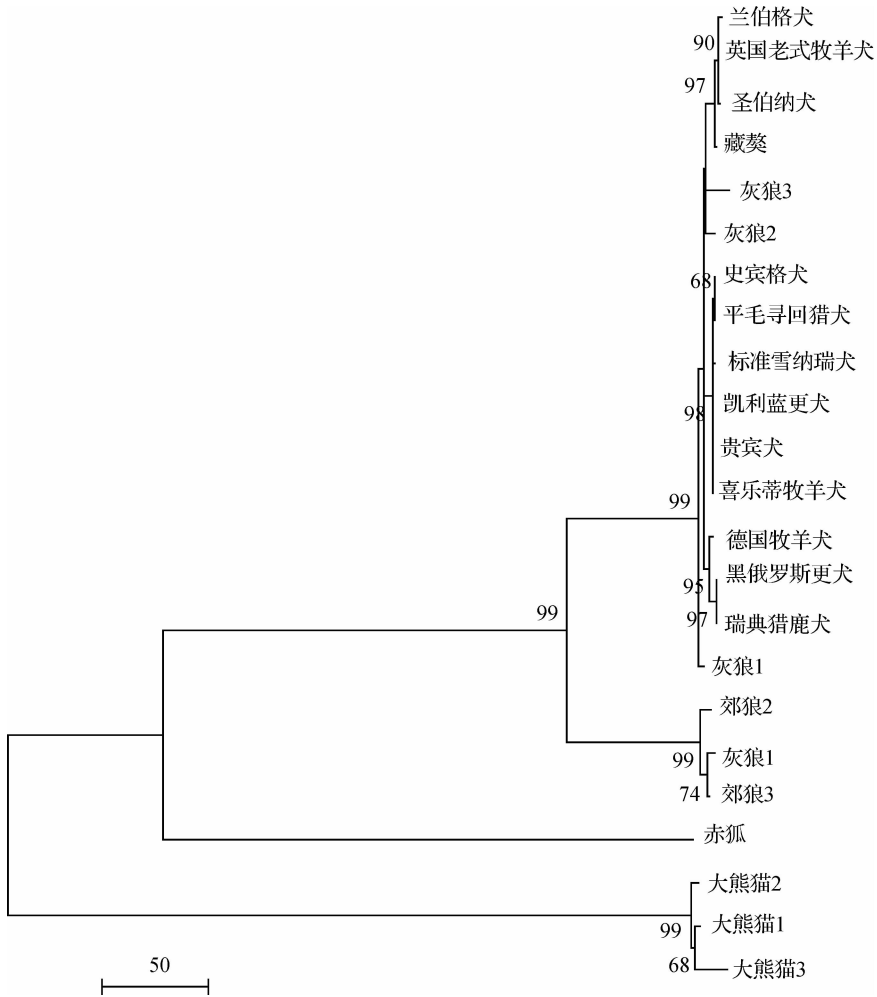


图 2 基于线粒体细胞色素氧化酶亚基基因序列采用 MP 法构建的犬科系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *Canidae* based on cytochrome oxidase subunit gene sequences by Maximum Parsimony method

藏獒的近祖是羌狗,大约在公元前 7 世纪,吐蕃王朝统一诸羌后,在人工培育下羌狗逐渐演变成现在的藏獒^[1,7]。但是,关于藏獒的祖先和起源方面的研究很少,目前还没有直接的、明确的证据。本试验研究发现,藏獒、家犬亚种内 12 个家犬品种与灰狼聚在一起,而郊狼自成一类(图 1 和图 2),说明藏獒与其他家犬品种一样,也起源于灰狼^[5,8]。

3.2 藏獒的分类地位

关于家犬的分类地位,较早的分类方法是 1758 年瑞典分类学家林奈(Carl Linnaeus)提出的,将家犬划分为动物界(*Animalia*)、脊索动物门(*Chordata*)、哺乳纲(*Mammalia*)、食肉目(*Carnivora*)、犬科(*Canidae*)、犬属(*Canis*)、犬种(*Canis familiaris*),但 1993 年史密森学会(Smithsonian Institution)对哺乳动物进行重新分类时,将家犬划分为犬属(*Ca-*

nis)、狼种(*Canis lupus*)下的一个亚种,即家犬亚种(*Canis lupus familiaris*)。藏獒的分类地位与藏獒的起源一样,至今没有直接的证据来证实。张昱等^[23]指出,藏獒属于食肉目、犬科,王永奇等^[3]进一步指出,藏獒属于犬科、犬属、犬种,这也是目前关于藏獒分类地位的最详细描述,但更详细的分类还未见报道。本研究根据线粒体细胞色素氧化酶亚基基因序列构建的犬科系统发育树(图 1 和图 2)发现,藏獒、12 个家犬品种与灰狼聚在一起,且藏獒与家犬亚种中 12 个家犬品种间线粒体细胞色素氧化酶亚基基因的序列差异百分比(0.30)大于 12 个家犬品种间的序列差异百分比(0.27),而小于与灰狼间的序列差异百分比(0.40),初步认为藏獒应该是家犬亚种中的一个特殊的品种,根据史密森学会(1993)的最新分类方法,将藏獒的分类地位确定为:食肉目(*Carnivora*)、犬

科(*Canidae*)、犬属(*Canis*)、狼种(*Canis lupus*)、家犬亚种(*Canis lupus familiaris*),与 Q. Li 等^[2]和 Y. Li 等^[13-14]的研究结果一致。

3.3 藏獒与其他大型家犬品种间的系统发育关系

藏獒是世界上最古老的珍稀犬种之一,对世界许多大型家犬品种的形成起到了非常重要的作用,例如瑞士的圣伯纳犬、英格兰的英国牧羊犬等在品种形成过程中都可能引入了藏獒的血统,因此藏獒又被称为“世界种犬”^[1,9]。本研究根据线粒体细胞色素氧化酶亚基基因全序列采用 NJ 法和 MP 法构建的犬科动物系统发育树(图 1 和图 2)发现,藏獒与圣伯纳犬、英国老式牧羊犬、兰伯格犬聚为一类(BP 为 100%和 97%),且藏獒与圣伯纳犬、英国老式牧羊犬、兰伯格犬的序列差异百分比(0.13)小于藏獒与其他大型家犬品种(0.37)、中小型家犬品种间的序列差异百分比(0.35),说明藏獒与圣伯纳犬、英国老式牧羊犬、兰伯格犬等大型家犬的亲缘关系较近,从分子水平上证实了圣伯纳犬、英国老式牧羊犬和兰伯格犬等大型家犬品种在品种形成过程中可能引入了藏獒的血统^[1,14]。

参考文献:

- [1] 倪正. 藏獒[M]. 北京:中国青年出版社,2004.
- [2] LI Q, LIU Z, LI Y, et al. Origin and phylogenetic analysis of Tibetan Mastiff based on the mitochondrial DNA sequence[J]. *J Genet Genomics*, 2008, 35(6): 335-340.
- [3] 王永奇,史丽颖,于大永,等. 藏獒的考证[J]. 大连大学学报, 2003, 24(6): 108-112.
- [4] MOREY D F. The early evolution of the domestic dog[J]. *Am Sci*, 1994, 82: 336-347.
- [5] VILÀ C, SAVOLAINEN P, MALDONADO J E, et al. Multiple and ancient origins of the domestic dog[J]. *Science*, 1997, 276(5319): 1687-1689.
- [6] LEONARD J A, WAYNE R K, WHEELER J, et al. Ancient DNA evidence for Old World origin of New World dogs[J]. *Science*, 2002, 298(5598): 1613-1616.
- [7] SAVOLAINEN P, ZHANG Y P, LUO J, et al. Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs[J]. *Science*, 2002, 298(5598): 1610-1613.
- [8] WAYNE R K, GEFFEN E, GIRMAN D J, et al. Molecular systematics of the Canidae[J]. *Syst Biol*, 1997, 46(4): 622-653.
- [9] 罗理扬. 现代家犬的起源——线粒体 DNA 的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2003.
- [10] OVODOV N D, CROCKFORD S J, KUZMIN Y V, et

al. A 33,000-year-old incipient dog from the Altai mountains of siberia; Evidence of the earliest domestication disrupted by the last glacial maximum[J]. *PLoS ONE*, 2011, 6: e22821.

- [11] FREEDMAN A H, GRONAU I, SCHWEIZER R M, et al. Genome sequencing highlights the dynamic early history of dogs[J]. *PLoS Genet*, 2014, 10(1): e1004016.
- [12] THALMANN O, SHAPIRO B, CUI P, et al. Complete mitochondrial genomes of ancient canids suggest a European origin of domestic dogs[J]. *Science*, 2013, 342(6160): 871-874.
- [13] LI Y, LI Q, ZHAO X, et al. Complete sequence of the Tibetan Mastiff mitochondrial genome and its phylogenetic relationship with other *Canids* (*Canis, Canidae*)[J]. *Animal*, 2011, 5(1): 18-25.
- [14] LI Y, ZHAO X, PAN Z, et al. The origin of the Tibetan Mastiff and species identification of *Canis* based on mitochondrial COI gene and COI barcoding[J]. *Animal*, 2011, 5(12): 1868-1873.
- [15] SAMBROOK J, RUSSELL D W. Molecular Cloning: A laboratory manual[M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [16] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [17] BJÖRNERFELDT S, WEBSTER M T, VILÀ C. Relaxation of selective constraint on dog mitochondrial DNA following domestication[J]. *Genome Res*, 2006, 16(8): 990-994.
- [18] KIM K S, LEE S E, JEONG H W, et al. The complete nucleotide sequence of the domestic dog (*Canis familiaris*) mitochondrial genome[J]. *Mol Phylogenet Evo*, 1998, 10(2): 210-220.
- [19] ZHANG Y P, RYDER O A. Mitochondrial DNA sequence evolution in the Arctoidea[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1993, 90(20): 9557-9561.
- [20] 郭鄂, 李约瑟, 成庆泰. 中国古代动物学史[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [21] DAVIS S J M, VALLA F. Evidence for domestication of the dog 12,000 years ago in the Natufian of Israel[J]. *Nature*, 1978, 276: 608-610.
- [22] BANNASCH D L, BANNASCH M J, RYUN J R, et al. Y chromosome haplotype analysis in purebred dogs[J]. *Mamm Genome*, 2005, 16(4): 273-280.
- [23] 张昱, 袁宁, 王文青, 等. 藏獒的核型研究[J]. 青海医学院学报, 1997, 18(4): 225-226.