

中华攀雀线粒体基因组全序列测定与分析

高瑞瑞¹, 黄原^{1,*}, 雷富民²

1. 陕西师范大学 生命科学学院, 西安 710062;

2. 中国科学院动物研究所 动物系统与进化重点实验室, 北京 100101

摘要: 该研究使用长 PCR 扩增和引物步移法测定了中华攀雀 (*Remiz consobrinus*) 线粒体基因组全序列, 在对序列进行拼接和注释的基础上, 分析了其结构、序列组成及蛋白编码基因密码子使用情况等, 并对 22 个 tRNA 和 2 个 rRNA 的二级结构以及控制区结构进行了预测及系统发育分析, 为雀形目鸟类的系统发育研究提供了新信息。中华攀雀线粒体基因组全长 16 737 bp, GenBank 登录号 KC463856, 碱基 A、T、C、G 的含量分别为 27.8%、21.5%、35.4% 及 15.3%, 37 个基因排列顺序与已报道的其他鸟类基本一致, 包含 13 个蛋白编码基因、22 个 tRNA 基因、2 个 rRNA 基因及 1 个非编码的控制区 (D-loop), 有 18 对基因间共存在 77 bp 的间隔, 7 对基因间共存在 30 bp 的重叠。除 ND3 基因的起始密码子为 ATT 外, 其余均为标准的 ATG, 11 个蛋白编码基因的终止密码子为 TAA、TAG、AGA 或 AGG, 2 个为不完全终止密码子 T (*COIII*、*ND4*)。除 tRNA^{Ser-AGN} DHU 臂缺失外, 其余 21 个 tRNA 均可形成典型的三叶草结构, 在出现的 27 处碱基错配中有 19 处为常见的 G-U 错配。*SrRNA* 和 *LrRNA* 二级结构分别包含 3 个结构域 47 个茎环结构和 6 个结构域 60 个茎环结构, 与所发表的其他鸟类 rRNA 二级结构大体一致。中华攀雀控制区发现了同样存在于其他鸟类控制区的保守框 F-box、D-box、C-box、B-box、Bird similarity-box 和 CSB1-box。该研究支持将攀雀科作为独立的科, 同时, 支持莺总科与攀雀科的单系性。

关键词: 中华攀雀; 线粒体全基因组; 蛋白编码基因; tRNA 二级结构; rRNA 二级结构; 控制区

中图分类号: Q959.7⁺39; Q52 **文献标志码:** A **文章编号:** 0254-5853-(2013)03-0228-10

Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of *Remiz consobrinus*

Rui-Rui GAO¹, Yuan HUANG^{1,*}, Fu-Min LEI²

1. School of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China;

2. Key Laboratory of the Zoological Systematics and Evolution, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: The complete mitochondrial genome sequence of *Remiz consobrinus* was determined using long PCR and conserved primers walking approaches. Based on the results of assembling and annotation, the structure, sequence composition and codon usage of the genome protein-coding genes were analyzed, and the prediction of the secondary structure of 22 tRNA and 2 rRNA, the control region structure, and the phylogeny were also conducted, which provided new information for phylogenetic studies of passerine birds. The entire mitochondrial genome of *Remiz consobrinus* was 16 737 bp in length, the accession number was KC463856 and the content of A, T, C, and G were 27.8%, 21.5%, 35.4%, and 15.3%, respectively. The genome harbored the same gene order with that of other birds, and contained 13 protein coding genes (PCGs), 22 tRNA, 2 rRNA, and a non-coding control region. There were 77 bp intergenic intervals between 18 pair genes and 30 bp overlaps between 7 pair genes. Except for ND3 gene, which used ATT as the initiation codon, all other PCGs started with the typical ATG codon. Except for *COIII* and *ND4*, which used incomplete termination codon T, the other 11 PCGs used standard TAA, TAG, AGA or AGG as termination codons. The tRNAs all formed typical cloverleaf secondary structure, except for tRNA^{Ser-AGN}, which lost the DHU arm in its structure. A total of 27 base mismatches appeared, with 19 common G-U mismatches. The predicted secondary structure of *SrRNA* and *LrRNA* contained 3 domains with 47 helices and 6 domains with 60 helices, respectively. Besides F-box, D-box, C-box, and B-box, Bird similarity-box and CSB1-box were also found in the control region of *Remiz consobrinus*, as found in other bird species. Our results suggest Remizidae as a separate family. The monophyly of Sylviidae and Remizidae was supported.

Keywords: *Remiz consobrinus*; Complete mitochondrial genome; Protein-coding genes; tRNA secondary structure; rRNA secondary structure; Control region

收稿日期: 2012-12-23; 接受日期: 2013-01-13

基金项目: 国家杰出青年科学基金 (30925008); 中国科学院动物进化与系统学重点实验室开放课题 (O529YX5105)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: yuanh@snnu.cn

鸟类的线粒体基因组 (mitochondrial genome, mtDNA) 为闭合环状分子, 包括 13 个蛋白编码基因、2 个 rRNA 基因、22 个 tRNA 基因及一或二个非编码区, 即 D-loop 区 (Boore, 1999)。基因排列较为紧密, 无内含子, 除起调控作用的非编码区外, 整个基因组均具编码功能 (Quinn, 1997)。由于具有分子结构简单、母系遗传严格、碱基突变率高及进化速度快等特点, 线粒体基因组已成为从分子水平研究鸟类起源、进化及系统发育等的理想材料, 并取得了许多有意义的结果 (Avisé et al, 1990; Ramirez et al, 1993; Stoneking & Soodyall, 1996)。根据 NCBI 线粒体基因组数据统计, 截至 2012 年 3 月底, 已测出的鸟类全线粒体基因组序列~250 条, 其中雀形目鸟类为 39 个物种共 43 条。

雀形目鸟类是鸟纲中最大的一个类群 (Zheng, 2002), 有关该类群的起源及演化关系, 一直是鸟类学界关注的焦点。分子系统学在解决各种生物类群起源和演化方面极具优势, 许多有争议的问题均可通过分子手段加以解决。然而, 与雀形目鸟类相关的分子生物学研究还很薄弱, 相应的分子系统工作开展较少, 影响了该类群系统学问题的解决。因此, 补充该类群线粒体全序列有利于解决其现存的系统发育问题。

分布于我国东北部的中华攀雀 (*Remiz consobrinus*) 隶属于雀形目 (Passeriformes) 攀雀科 (Remizidae) 攀雀属 (*Remiz*)。关于其分类地位仍存在争议, 在 Sibley & Ahlquist (1990) 的分类系统中, 攀雀隶属于山雀科的亚科, 并隶属于莺总科, 而后来的系统发育研究 倾向于将攀雀作为独立的科 (Sheldon & Gill, 1996; Dai et al, 2010; Pakert et al, 2010), 并与山雀科一起从莺总科中分离 (Alström et al, 2006)。

目前尚无攀雀科全线粒体基因组的研究报道。本文首次测定了中华攀雀线粒体基因组全序列, 在对序列进行拼接、注释的基础上, 对其结构、序列组成及蛋白编码基因密码子使用情况等进行了分析, 对 22 个 tRNA 和 2 个 rRNA 的二级结构以及控制区结构进行了预测和分析, 以期对雀形目鸟类的系统发育研究提供新的基因组学信息。

1 材料与方法

1.1 研究对象

中华攀雀标本于 2009 年 5 月 13 日采集于辽宁

省盘锦市新兴镇躺岗子村, 标本浸泡于无水乙醇并保存于-20℃冰箱, 期间更换酒精数次。其相关凭证标本 (IOZ10652) 现保存于中国科学院动物研究所动物系统与进化重点实验室鸟类标本馆。

1.2 实验方法

1.2.1 总 DNA 提取

本研究以中华攀雀为实验材料, 采用传统的酚-氯仿-异戊醇法 (Dang et al, 2008) 提取和纯化总 DNA, 于-20℃冰箱保存备用。

1.2.2 引物设计和 PCR 扩增

以红原鸡 (*Gallus gallus*, NC_002069) 线粒体基因组全序列为模板, 结合从 GenBank 数据库中下载的 40 种雀形目鸟类线粒体基因组全序列, 利用 Clustal X 软件比对寻找保守性较高的序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件, 依据引物设计原则, 参考 Sorenson et al (1999, 2003) 发表文献中提供的引物位置综合设计了 29 对 PCR 扩增引物, 并且使用 Oligo 软件对每条引物进行评价和修改。从中选取 5 对作为 L-PCR 引物, 其余作为 Sub-PCR 引物。所有引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成, 它们在整个基因组中的大致位置和扩增片段的大约长度等详见附录 1 (本刊网站 Supporting info)。

使用 5 对 L-PCR 扩增引物将中华攀雀全线粒体基因组扩增为相互重叠的 5 个大片段 L1~L5, 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测所有 PCR 产物, 切胶检测结果好的条带并利用 DNA 纯化试剂盒进行纯化回收, 最后将回收的目的片段测序。对于大片段要保存部分样品, 以备 Sub-PCR 之需。对于 L-PCR 扩增效果不好、测序不通及 L-PCR 没有连接上的部分进行 Sub-PCR, 检测、回收及测序方法相同。PCR 扩增反应体系见附录 1 (本刊网站 Supporting info)。

L-PCR 反应程序为: 93℃ 预变性 2 min; (92℃ 10 s, 58~53℃ 30 s, 68℃ 10 min)×20; (92℃ 10 s, 53℃ 30 s, 68℃ 10 min, 且每一循环增加 20 s)×20; 68℃ 7 min; 4℃ 保温。

Sub-PCR 反应程序为: 95℃ 预变性, 4 min; (95℃ 45 s, 53~58℃ 60 s, 72℃ 60 s)×30/35; 72℃ 7/4 min, 4℃ 保温。

1.2.3 测序

L-PCR 得到的回收产物由公司采用引物步移法进行测序, 步移测序效果不好或没有连接上的部

分采用 Sub-PCR 扩增并测序, 测序工作均由上海生物工程技术有限公司完成。

1.2.4 序列拼接、注释及分析

使用 StadenPackage1.7 (Bonfield et al, 1995) 中的 Pregap4 子程序对中华攀雀序列进行拼接。使用 tRNAScan-SE1.21 (Desjardins & Morais, 1990) 在线预测并辅助人工校正, 得到了除 *tRNA^{Cys}* 和 *tRNA^{Ser-AGN}* 基因以外的其余 20 个 tRNA 基因的二级结构。而对于 *tRNA^{Cys}* 和 *tRNA^{Ser-AGN}* 基因、蛋白编码基因及 rRNA 基因和控制区, 则通过与已知斑胸草雀 (*Taeniopygia guttata*, NC_007897) 全线粒体基因组序列进行比对, 并使用 StadenPackage1.7 中的子程序 Spin 分析来确定其相应位置。使用 MEGA5.0 分析得到中华攀雀序列碱基组成及蛋白编码基因密码子使用情况等信息。以红原鸡 *SrRNA* 基因二级结构为模板, 并参考五彩绿咬鹃 (*Pharomachrus pavoninus*) (de los Monteros, 2003) 及黑尾地鸦 (*Podoces hendersoni*) (Ke et al, 2010) 等鸟类的 *SrRNA* 基因二级结构, 对中华攀雀 *SrRNA* 基因二级结构进行了预测。以黑尾地鸦 (*Podoces hendersoni*) 的 *LrRNA* 基因二级结构为模板, 并参考黄牛 (*Bos taurus*) (Burk et al, 2002) 和非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) (<http://www.rna.cccb.utexas.edu/>) 的 *LrRNA* 基因二级结构, 对中华攀雀 *LrRNA* 基因二级结构进行了预测。以红原鸡 (*Gallus gallus*) (Eberhard et al, 2001) 和蓝灰蚋鹛 (*Poliophtila caerulea*) (Ruokonen & Kvist, 2002) 控制区序列为基准, 参考先前报道的雪雁 (*Anser caerulescens*) (Quinn & Wilson, 1993)、亚马逊鸚鵡 (*Amazona*) (Eberhard et al, 2001) 及黑尾地鸦 (*Podoces hendersoni*) 等部分鸟类的控制区结构域, 将红原鸡及包括中华攀雀和蓝灰蚋鹛在内的 17 种雀形目鸟类控制区序列进行比对预测了中华攀雀线粒体控制区结构。

1.2.5 系统发育分析

从 GenBank 数据库中下载 38 个雀形目鸟类以及 2 个雁形目鸟类的全线粒体基因组序列 (附录 2, 见本刊网站 Supporting info)。将下载的 40 个物种及本文测定的中华攀雀的全线粒体基因组序列及其中的蛋白编码基因组成两个数据集: ALL 与 PCG。以雁形目鸟类鸚雁 (*Anseranas semipalmata*) 和白额雁 (*Anser albifrons*) 作为外群。利用软件 PAUP 4 beta、Modeltestv3.7、

MrModelTest22 及 MrMtgui, 估算出两个数据集的最佳模型均为 GTR+I+G ($-\ln L=161417.2812$, $K=10$)。利用软件 mrbayes-3.1.2, 以估算出的最优模型 GTR+I+G, 采用马尔柯夫蒙特卡罗方法 (Markov Chain Monte Carlo, MCMC), 分别构建两个数据集的贝叶斯树。利用软件 RAxML 和 PAUP 4 beta, 同样以估算出的最优模型, 分别采用最大似然法和启发式搜索, 构建两个数据集的最大似然 (maximum likelihood, ML) 树和最大简约 (maximum parsimony, MP) 树。

2 结果

2.1 线粒体基因组结构

中华攀雀线粒体基因组全长 16737 bp, 包含 13 个蛋白编码基因 (PCGs)、22 个转运 RNA 基因 (tRNAs) 和 2 个核糖体 RNA 基因 (*SrRNA* 和 *LrRNA*) 等在内的共 37 个基因。此外, 在 *tRNA^{Phe}* 和 *tRNA^{Glu}* 之间有一个长度为 1169 bp 的非编码的控制区 (D-Loop 区)。37 个基因的排列顺序与注释与斑胸草雀一致, *ND5* 到 *SrRNA* 之间的基因排列顺序为: *Cytb*/ *tRNA^{Thr}*/*tRNA^{Pro}*/*ND6*/*tRNA^{Glu}*/*D-loop*/*tRNA^{Phe}*。中华攀雀线粒体全基因组结构较为紧密, 有 18 对基因间共存在 77 bp 的间隔, 除位于 *tRNA^{Ala}* 和 *tRNA^{Asn}* 基因间的间隔为 13 bp 外, 其余基因间的间隔长度均在 1~10 bp; 有 7 对基因间共存在 30 bp 的重叠, 除位于 *ND4L* 和 *ND4*、*ATP8* 和 *ATP6* 以及 *COI* 和 *tRNA^{Ser-UCN}* 基因间的重叠长度分别为 7、10 及 9 bp 外, 其余 4 处基因间的重叠长度均为 1 bp; 既没有重叠也没有间隔的紧密排列基因共 12 对 (见附录 3 图 1 和表 5, 本刊网站 Supporting info)。

2.2 核苷酸组成

基因组全序列的碱基百分含量为 C(35.4%)>A(27.8%)>T(21.5%)>G(15.3%), 不存在碱基偏向性, 该现象在鸟类中很普遍。蛋白编码基因 4 种碱基的百分含量与整个线粒体基因组最接近。密码子第一位点的 4 种碱基含量较为接近, 与 Amaiz et al (2001) 提出的密码子第一位点碱基出现的频率相似的结论一致; 第二位点 T 的含量为 40.0%, 其余 3 种碱基的含量均有所减少; 第三位点 C 的含量达到了 53.6%, G 的含量则只有 7.6%。可见, 密码子第三位点存在明显的碱基偏向性, 而第一位点的偏倚度最小。类似的碱基偏倚现象也见于其他鸟类

(Amaiz et al, 2001; Webb & Moore, 2005; Kornegay et al, 1993; Lovette & Bermingham, 1999)。

2.3 蛋白编码基因密码子使用及氨基酸组成

13 个蛋白编码基因全长 11 396 bp, 共有 3 787 个密码子(不包含终止密码子), 除 *ND6* 基因定位在轻链上外, 其余均定位在重链上。这些蛋白编码基因没有内含子, 某些相邻基因之间存在间隔和重叠现象。另外, 中华攀雀 *ND3* 基因第 174 位没有发现存在于某些鸟类中的额外胞嘧啶(C)插入现象。起始密码子除 *ND3* 基因为 ATT 外, 其余均为标准的 ATG; 有 2 个基因的终止密码子为 AGA(*ND1*、*ND5*), 1 个为 AGG(*CO I*), 2 个为不完全终止密码子 T (*CO III*、*ND4*), 其余为标准的 TAA (*ND2*、*CO II*、*ATP8*、*ATP6*、*ND3*、*ND4L*、*CytB*) 和 TAG (*ND6*)。使用最频繁的密码子为 CTC、CTA、ATC、GCC 和 TTC, 且并不总是与 tRNA 的反密码子完全对应。在所编码的 3 787 个氨基酸中, 使用最频繁的氨基酸为 Ala、Ile、Leu、Ser 和 Thr, 占有氨基酸的 49.88%。

2.4 tRNA 二级结构

22 个 tRNA 基因的长度在 66~78 bp, 其中 14 个由重链编码, 8 个由轻链编码, 它们绝大多数都位于蛋白编码基因之间。除 *tRNA^{His}* 和 *tRNA^{Ser-AGN}* 之间外, 相邻 tRNA 之间均存在重叠和间隔现象。除 *tRNA^{Leu}* 和 *tRNA^{Ser}* 对应 2 个 tRNA 外, 其余氨基酸均只有对应 1 个 tRNA。除 *tRNA^{Ser-AGN}* 缺失 DHU 臂外, 其余 21 个 tRNA 均可形成典型的三叶草结构。所有 tRNA 基因的二级结构中共出现 27 处碱基错配现象, 其中 19 对常见的 G-U 错配及 3 对 A-C 错配, 分别发生在 *tRNA^{Arg}* 和 *tRNA^{Ser-AGN}* 的氨基酸接受臂及 *tRNA^{Met}* 的 T Ψ C 臂; 两对 C-C 错配, 发生在 *tRNA^{Gly}* 的反密码子臂和 *tRNA^{Leu-UUR}* 的氨基酸臂; U-U 错配、U-C 错配及 A-A 错配各一对, 分别发生在 *tRNA^{Gly}* 的反密码子臂、*tRNA^{Glu}* 的氨基酸接受臂和 *tRNA^{Asp}* 的 T Ψ C 臂。

2.5 rRNA 二级结构

SrRNA 和 *LrRNA* 基因分别位于 *tRNA^{Val}* 和 *tRNA^{Phe}* 以及 *tRNA^{Leu-UUR}* 和 *tRNA^{Val}* 之间, 基因长度分别为 980 bp 和 1596 bp。预测的 *SrRNA* 基因二级结构包含三个结构域, 47 个茎环结构, *LrRNA* 基因二级结构包含 6 个结构域, 60 个茎环结构。该结果与所发表的其它鸟类 rRNA 二级结构大体一致。

2.6 控制区

基因组具有一个控制区, 位于 *tRNA^{Phe}* 和 *tRNA^{Glu}* 基因之间, 序列长度为 1 169 bp, A+T 含量 54.9%, 高于整个基因组的平均水平。控制区结构分析显示: 中华攀雀具有保守框 F-box、D-box、B-box、C-box、Bird similarity -box 及 CSB1-box。其中, CSB1 区 5'端存在 20 bp 的核苷酸插入现象。另外, 未发现对线粒体基因组复制和双链转录起始起重要作用的 O_H、LSP 和 HSP(见附录 3 图 3, 本刊网站 Supporting info)。

2.7 系统发育分析

41 条全线粒体基因组序列所构建的不同系统发育树如图 1 所示, 其中的蛋白编码基因序列所构建的不同系统发育树见附录 3 图 2 (本刊网站 Supporting info)。因为不同数据集构建的 ML 树和贝叶斯树涉及中华攀雀的分支拓扑结构完全一致, 分支支持度均很高, 所以, 图中只给出贝叶斯树和 MP 树。两个数据集的 ML 树和贝叶斯树及 ALL 数据集的 MP 树显示莺总科的所有科聚为一支, 与中华攀雀互为姐妹群, 且这两支与雀总科与鹛总科汇聚的分支组成姐妹群。PCG 数据集的 MP 树与其余树涉及中华攀雀的分支拓扑结构有所不同, 中华攀雀与鹛总科互为姐妹群, 且二者汇成的分支与莺总科互为姐妹群。所有系统发育树均支持将攀雀科作为独立的科, 该结果与前人研究结论一致 (Sheldon & Gill, 1996; Dai et al, 2010; Pakert et al, 2010)。但有关中华攀雀的具体位置及是否应该将其从莺总科中分离出来, 本文并未确定, 还需进一步研究。同时, 本研究支持莺总科和攀雀科的单系性。

3 讨论

3.1 鸟类基因组排列顺序

与脊椎动物 mtDNA 的一般排序 (Desjardins & Morais, 1991) 相比, 鸟类 mtDNA 中的 *ND6* 和 *tRNA^{Glu}* 基因转移到了 *tRNA^{Pro}* 与控制区之间, *ND5* 到 *SrRNA* 之间的基因排列顺序为: *ND5/Cytb/tRNA^{Thr}/tRNA^{Pro}/ND6/tRNA^{Glu}/CR/tRNA^{Phe}/SrRNA*。自从 Desjardins & Morais (1990) 首次在红原鸡中发现鸟类的这一基因排列顺序, 随后在日本鹌鹑 (*Coturnix japonica*) (Desjardins & Morais, 1991)、血雁 (*Anser caerulescens*) (Wenink et al, 1994)、鹌类 (turnstones and dunlins) (Ruokonen & Kvist, 2002) 及雀形目其他鸟类 (Marshall & Baker, 1997) 中均发现

了这一排列顺序。本文所研究的中华攀雀与鸟类 mtDNA 的这一排列顺序相同,说明了鸟类线粒体基因组进化上相对保守性,也证明这种基因排列顺序在鸟类中可能是一个普遍现象,且这种现象一定发生在鸟类进化的早期 (Li & Ma, 2007)。Marshall et al (1997)认为这种排序可能是由于鸟类 mtDNA 发生了基因转座现象,同时认为这种排序增加了 $tRNA^{Glu}$ 基因序列的分化,他们发现苍头燕雀 (*Fringilla coelebs*) 和欧金翅雀 (*Carduelis chloris*) $tRNA^{Glu}$ 基因序列的差异达 17.6%。Quinn & Wilson (1993) 认为这可能是功能限制性减少的结果,因为 $tRNA^{Glu}$ 基因与任何基因的转录过程均无关。

然而, Mindell et al (1998) 在隼形目 (Falconiformes)、鸛形目 (Cuculiformes)、鸢形目 (Piciformes) 及雀形目的亚鸣禽 (suboscine Passerioformes), Bensch & Härlid (2000) 在 6 种柳莺属 (*Phylloscopus*), Eberhard et al (2001) 在亚马逊鸚鵡属 (*Amazona*) 等鸟类中发现了另一种基因排列顺序,即控制区转移到了 $tRNA^{Thr}$ 和 $tRNA^{Pro}$ 之间,且在 $tRNA^{Glu}$ 和 $tRNA^{Phe}$ 之间发现了一段类似于控制区的非编码序列 (NC),即 $Cyt\ b/tRNA^{Thr}/D-loop/tRNA^{Pro}/ND6/tRNA^{Glu}/NC/tRNA^{Phe}$ 。其中,在灰头阔嘴鸟 (*Smithornis sharpie*) (Mindell et al, 1998) 中, D-loop 和 NC 的相似度达 82%,暗示 NC 的出现很可能是由于 D-loop 的重排所致。因此,从脊椎动物线粒体基因组排列顺序到鸟类的第二种排列顺序至少经历了两次进化改变 ($ND6/tRNA^{Glu}$ 重排和 D-loop 重排)。Bensch & Härlid (2000) 认为不同鸟类基因组序列的这种重排具有多重起源,因此,鸟类线粒体基因重排在构建系统发育关系方面的价值仍不确定,这之前 Mindell et al (1998) 所认为的鸟类线粒体基因重排可用来区分雀形目中的鸣禽与亚鸣禽的观点不一致。

Moritz & Brown (1986) 认为鸟类线粒体基因重排是通过基因倍增—删除或倍增—退化而实现的。即倍增后的基因再被随机删除或退化,最终导致新的基因排列顺序。基因倍增可通过基因重组、转座、滑链错配和复制终止出错实现 (Levinson & Gutman, 1987; Stanton et al, 1994)。Bensch & Härlid (2000) 认为鸟类线粒体基因组的这种重排是在 $tRNA^{Pro}/ND6/tRNA^{Glu}/D-loop$ 倍增后,紧接着又删除部分 D-loop 外的其中一个拷贝形成的。此外, Haddrath & Baker (2001) 在凤头鸚 (*Eudromia*

formosa) 中发现了一种新的基因排列顺序 $Cyt\ b/tRNA^{Thr}/tRNA^{Pro}/D-loop\ 1/ND6/tRNA^{Glu}/D-loop\ 2$, Abbott et al (2005) 在鸛形目黑眉信天翁 (*Diomedea melanophris*) 中也发现了另一种新的基因排列顺序 $Cyt\ b/tRNA^{Thr}/tRNA^{Pro}/ND6/tRNA^{Glu}/D-loop\ 1/tRNA^{Thr2}/tRNA^{Pro2}/ND62/tRNA^{Glu2}/D-loop\ 2$ 。Gibb et al (2007) 认为,鸟类 mtDNA 的基因重排首先开始于 $tRNA^{Thr}/tRNA^{Pro}/ND6/tRNA^{Glu}/D-loop$ 的倍增,在此基础上可以通过删除拷贝的不同区域形成另外的三种重排。同时,他们提出,倍增的基因是不确定的,可以是 $tRNA^{Thr}$ 到 D-loop 的整个片段,也可以是它们之间的某一片段或只有 D-loop 片段,且这些倍增的基因需要重新插入到 $tRNA^{Thr}$ 与 $tRNA^{Pro}$ 之间,而不是紧跟第一个复制片段。Singh et al (2008) 对鸛科 3 种鸟类线粒体基因组的研究中发现,鸛科的这种重排可能先经过 D-loop 复制形成 D-loop 2,然后 D-loop 2 在不同物种中积累不同的碱基替换和删除,从而破坏两个拷贝的协同进化,最终使得 D-loop 2 形成一段类似于 D-loop 的非编码序列。

由于没有任何一个复制—删除模型可以解释所有重排现象, Mueller & Boore (2005) 认为很可能所有模式对于鸟类 mtDNA 的重排都是可行的。由于复制和删除是随机的,在此模型下鸟类 mtDNA 排列顺序应该有很多种,而目前仅发现了以上几种排列方式。Bensch et al (2000) 认为一种可能的解释是大部分线粒体基因的重排可能是有害的,只有少数的基因组合是可行的,从而达到固定。因而,鸟类中是否存在更多的基因排列模式以及少数部分片段倍增后的 mtDNA 如何最终在群体中达到固定还有待进一步研究。

3.2 蛋白编码基因密码子使用情况

中华攀雀 13 个蛋白编码基因的起始密码子有两种, ATT 和 ATG ($ND3$ 为 ATT), 以 ATG 的使用频率最高。其中 COI 的起始密码子为 ATG, 在已全测序的 39 种雀形目鸟类线粒体基因组中, 还有 6 个物种 COI 的起始密码子也为 ATG, 而非 GTG。这与一些学者认为的鸟类 mtDNA 中, COI 基因的起始密码子为 GTG, 而非通常的 ATG 的观点不一致。中华攀雀 13 个蛋白编码基因的终止密码子有 5 种, AGA、AGG、TAG、TAA 及 T ($COIII$ 和 $ND4$), 以 TAA 的使用频率最高。不完全终止密码子 (T 或 TA) 在脊椎动物中并不罕见 (Cui

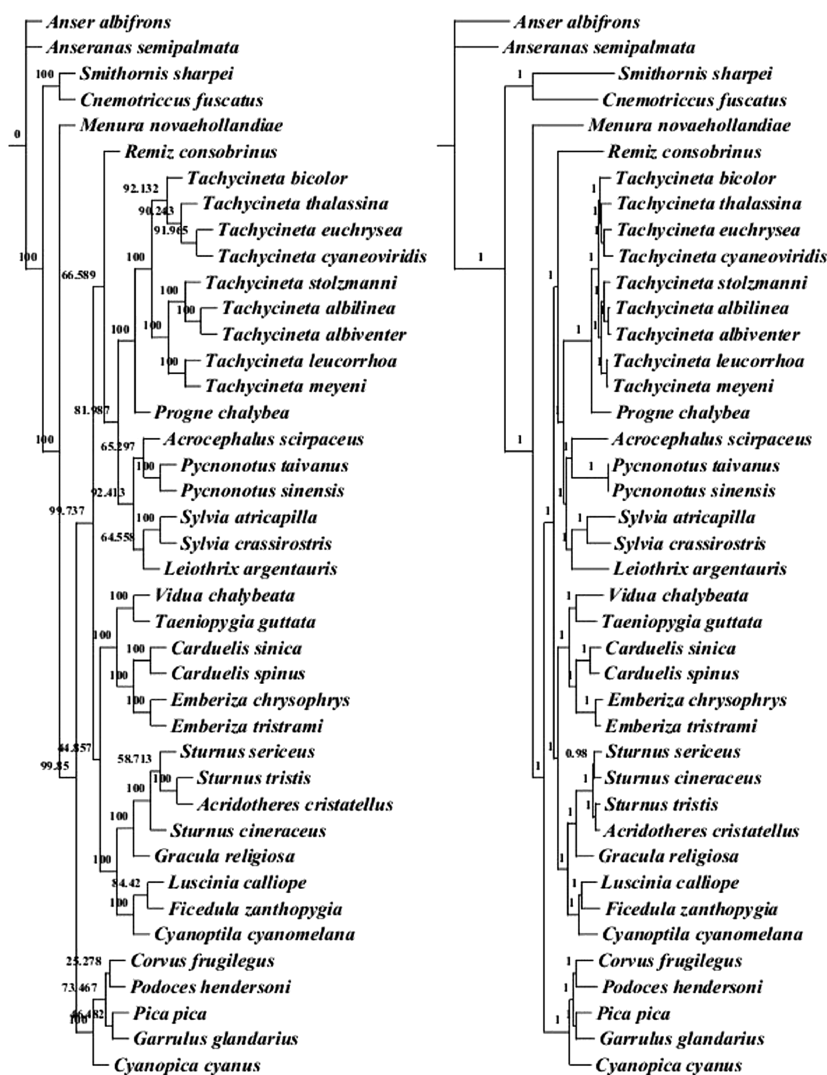


图 1 ALL 数据集的系统树(左为 MP 法, 右为贝叶斯法)

Figure 1 Phylogenetic trees based on ALL (left: MP method, right: Bayesian method)

et al, 2009)。通常不完全终止密码子是由于 3'端与 tRNA 紧密相连或重叠所致 (Wolstenholme, 1992b), 这种不完全的终止结构在转录过程将由 mRNA 3'端出现的 Poly(A)补全 (Ojala et al, 1981; Anderson et al, 1981)。

对密码子使用频率的研究表明: 密码子以 A 或 C 结尾的频率较高, 密码子 CTC、CTA、ATC、GCC 和 TTC 的使用较多, 并且这些密码子在其同义密码子中的相对使用频率也较高, 表明存在密码子使用偏好性。

3.3 tRNA 二级结构

中华攀雀 22 个 tRNA 基因的排列顺序、长度和二级结构与所报道的其他雀形目鸟类基本一致。除 $tRNA^{Ser-AGN}$ 缺失了 DHU 臂外, 其余 21 个 tRNA

均可形成典型的三叶草结构。这种情况在包括鸟类在内的后生动物中比较常见 (Wolstenholme, 1992a)。 $tRNA^{Ser-AGN}$ DHU 臂的长度从无脊椎动物到脊椎动物有逐渐变短的趋势, 红原鸡 $tRNA^{Ser-AGN}$ 的 DHU 臂只有一对碱基对 (Lowe & Eddy, 1997)。缺失 DHU 臂后的 $tRNA^{Ser}$ 仍可形成倒 L 型三级结构来维持 CCA 接受臂与反密码子间的距离 (Hanada et al, 2000)。而 Wolstenholme et al (1994)和 Dirheimer (1995) 认为, tRNA 转运特定氨基酸的功能及其倒 L 形三级结构主要由氨基酸臂和反密码子环决定, 而 T Ψ C 环和 DHU 环及其相应的臂似乎不会抑制 tRNA 的功能。

tRNA 基因碱基间的错配在许多后生动物中都存在, 在中华攀雀中也是如此, 中华攀雀线粒体基

基因组 tRNA 中共出现了 27 处碱基错配现象, 其中错配频率最高的为 G-U 错配 (19 对), 符合 G-U 摆动配对原则, 对于维系 tRNA 二级结构的稳定性起到了很重要的作用。目前有学者认为线粒体基因组中 tRNA 基因的部分错配可能是由于线粒体 DNA 重组机制缺乏, 难以清除这些突变现象, 但其可以通过 RNA 自我剪切来恢复基因功能, 不会引起氨基酸转运上的障碍 (Yokobori & Pääbo, 1995)。

3.4 rRNA 二级结构

rRNA 基因是线粒体基因组中进化最慢和最为保守的基因 (Neefs et al, 1993), 一般环区的进化较快, 物种间差异较大, 而茎区则相对保守 (Woese et al, 1980; Noller, 1984), 这可能是由于茎区和环区所受选择压力不同。但一些茎区中的部分位点也具有较高的可变性, 而一些环区也会有相对保守的序列 (Vawter & Brown, 1993; Simon et al, 1994), 这些小的分歧是由其严格的结构或功能约束而形成(几乎没有位点可以随意变异), 而不是由低突变率所形成。

中华攀雀 *SrRNA* 基因二级结构整体上与红原鸡及黑尾地鸦很相似。但局部也存在差异, 如结构域 I 中的 1 区比红原鸡及黑尾地鸦多出了一个碱基对并且在第三位有一个胞嘧啶插入, 类似现象在五彩绿咬鹃中也出现过。中华攀雀在结构域 II 中的 24 区形成了 2 bp 的碱基配对, 而红原鸡和黑尾地鸦在此处均没有形成配对的茎, 在绿头鸭和扁嘴雁中该处形成了 3 bp 的碱基配对, 但在左端茎第一、二个碱基对之间存在一单核苷酸胞嘧啶插入形成的突出, 各物种的环区差异也较大, 黑尾地鸦的最大, 说明了这一区域的可变程度; 中华攀雀的 27 区比红原鸡和黑尾地鸦多出了两个碱基对, 且对应的环区比两者小了很多。结构域 III 中的 32 区在中华攀雀、红原鸡和黑尾地鸦中均形成了 10 bp 的配对且在上端第二、三个碱基对之间均有一个单核苷酸插入形成的突出, 但 3 个物种插入的单核苷酸却不同 (分别为 U、A、C); 茎 35、36 被认为是一个具有多凸出的连续结构, 至少存在 8bp 的碱基配对才能满足这种排列所需的最小自由能 (Hickson, 1996), 在红原鸡和黑尾地鸦中也有同样的发现; 39 区中, 中华攀雀与红原鸡和黑尾地鸦相比, 茎区明显增大, 环区相对缩小。通过对已发表鸟类的 *SrRNA* 基因二级结构分析发现, 多数茎区变异都倾向于碱基

补偿性突变, 这可以保证二级结构的保守性不受一级序列变化的干扰。

中华攀雀 *LrRNA* 基因二级结构与黑尾地鸦很相似, 只在局部存在一些差异, 如中华攀雀茎 1 形成了 1 bp 的碱基对, 而黑尾地鸦在此处并没有配对的碱基; 中华攀雀茎 14 比黑尾地鸦多一个碱基对且在左端第三、四个碱基对间有一个单核苷酸鸟嘌呤插入形成的突出; 对于茎 19, 中华攀雀形成了一个 15 bp 碱基配对的茎, 而在黑尾地鸦、非洲爪蟾和黄牛中此处茎的长度分别为 19、17 和 11 bp, 并且只有中华攀雀的茎形成了具有发夹结构的颈环; 对于茎 24, 中华攀雀形成了 3 bp 碱基的配对, 黄牛在此处没有配对的碱基, 而黑尾地鸦和非洲爪蟾对应的茎则分别形成了 4 和 6 bp 的配对; 茎 32 在不同物种中变异很大, 呈现出多种排列形式; 此外, 45 区域紧挨上端环的部分茎区变异也很大。Larsen (1992)发现了对应于中华攀雀线粒体 *LrRNA* 基因二级结构茎 49 的发夹环与茎 51 的 3'末端配对区域间的三级结构相互作用, 本研究进一步对雀形目鸟类中这种三级结构的相互作用提供了支撑。

3.5 控制区

中华攀雀和大多数鸟类一样有一个位于 *tRNA^{Phe}* 和 *tRNA^{Glu}* 之间的控制区。控制区是整个线粒体基因组序列变异最大、进化最快的一个区域, 对 mtDNA 的复制和转录起调控作用, 其序列差异可能是造成鸟类不同物种 mtDNA 序列差异的重要原因 (Xiao et al, 2006)。脊椎动物线粒体基因组控制区分为 domain I、domain II 和 domain III 三个结构域, domain I 和 domain III 有较高数量的碱基替换和长度变异, 所以进化较快 (Baker & Marshall, 1997), 而 domain II 是 3 个区域中最为保守的区域。

鸟类控制区 domain I 位于控制区 5'端, 包含一段与复制终止相关的序列 TAS (ETAS) (Doda et al, 1981; Sbisà et al, 1997), ETAS 序列保守性以及到终止位点的距离均是可变的 (Foran et al, 1988), 因此, 本研究没能定位 TAS (ETAS)。在 domain I 的 5'端还含有一段延伸的胞嘧啶区域, 通常被一个或几个胸腺嘧啶断开, 目前尚不清楚这一区域形成的原因。在鸡形目和雁形目, 这一区域与它下游的一小段序列可形成发夹结构 (Ruokonen & Kvist, 2002), 而在中华攀雀中没有发现类似现象。

绝大多数鸟类控制区 domain II 均可发现保守框 (conserved sequence blocks, CSB) B、D、F, 而

C、E 区只存在于部分鸟类中。中华攀雀中存在 F-box、D-box、B-box 及 C-box, 但没有发现 E-box。另外, 中华攀雀中发现了一段存在于部分鸟类 B-box 上游的比 B-box 序列更为保守但却不同于其他脊椎动物的鸟类相似框 (bird similarity -box) (Ruokonen & Kvist, 2002)。

鸟类控制区 domain III 位于控制区 3'端, 一般包含 3 个保守框 (conserved sequence blocks, CSB) 1、2、3, 重链复制起始(origin of H-strand replication, O_H), L-链启动子 (light strand promoter, LSP)和 H-链启动子 (high strand promoter, HSP)。CSB1 是最保守的成分, 几乎所有脊椎动物中都含有 CSB1,

而 CSB2 和 CSB3 只存在于部分鸟类中 (Randi & Lucchini, 1998)。中华攀雀中存在 CSB1, 未发现有 CSB2 和 CSB3。18 种鸟类 CSB1 区 3'端序列大体一致, 但在 5'端都存在 17~20 bp 不等的核苷酸插入现象, 本研究中的中华攀雀存在 20 bp 的核苷酸插入。这在其他雀形目鸟类中也有发现 (Ruokonen & Kvist, 2002)。Ruokonen & Kvist (2002)认为这种现象可能是经过不止一次的独立插入而形成, 并推测在 CSB1 区真正受功能约束的碱基只有~20 bp。中华攀雀也未发现对线粒体基因组复制和转录起始起重要作用的 O_H 、LSP 和 HSP, 这种情况也存在于鸚形目鸟类中 (Xiao et al, 2006)。

参考文献:

- Abbott CL, Double MC, Trueman JWH, Robinson A, Cockburn A. 2005. An unusual source of apparent mitochondrial heteroplasmy: Duplicate mitochondrial control regions in *Thalassarche albatrosses*. *Molecular Ecology*, **14**(11): 3605-3613.
- Alström, P, Ericson PGP, Olsson U, Sundberg P. 2006. Phylogeny and classification of the avian Superfamily Sylvioidea. *Mol Phylogenet Evol*, 38:381-397.
- Amaiz-Villena A, Guillen J, Ruiz-del-Valle V, Lowy E, Zamora J, Varela P, Stefani D, Allende LM. 2001. Phylogeography of crossbills, bullfinches, grosbeaks, and rosefinches. *Cell and Molecular Life Sciences*, **58**(8): 1159-1166.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, **290**(5806): 457-465.
- Avisé JC, Ankney CD, Nelson WS. 1990. Mitochondrial gene trees and the evolutionary relationship of mallard and black ducks. *Evolution*, **44**(4): 1109-1119.
- Baker AJ, Marshall HD. 1997. Mitochondrial control region sequences as tools for understanding evolution. In: Mindell DP. Avian Molecular Evolution and Systematics. San Diego: Academic Press, 51-82.
- Bensch S, Hårlid A. 2000. Mitochondrial genomic rearrangements in songbirds. *Molecular Biology and Evolution*, **17**(1): 107-113.
- Bonfield JK, Smith KF, Staden R. 1995. A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Research*, **23**(24): 4992-4999.
- Boore JL. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, **27**(8): 1767-1780.
- Burk A, Douzery EJP, Springer MS. 2002. The secondary structure of mammalian mitochondrial 16S rRNA molecules: refinements based on a comparative phylogenetic approach. *Journal of Mammalian Evolution*, **9**(3): 225-252.
- Cui ZX, Liu Y, Li CP, You F, Chu KH. 2009. The complete mitochondrial genome of the large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Perciformes, Sciaenidae): unusual features of its control region and the phylogenetic position of the Sciaenidae. *Gene*, **432**(1-2): 33-43.
- Dang JP, Liu N, Ye W, Huang Y. 2008. Complete mitochondrial genome sequence of *Gastrimargus marmoratus* (Thunberg) (Orthoptera: Acridoidea). *Acta Entomologica Sinica*, **51**(7): 671-680. [党江鹏, 刘念, 叶伟, 黄原. 2008. 云斑车蝗线粒体基因组全序列测定与分析. 昆虫学报, **51**(7): 671-680.]
- Dai CY, Chen K, Zhang RY, Yang XJ, Yin ZH, Tian HJ, Zhang ZM, Hu Y, Lei FM. 2010. Molecular phylogenetic analysis among species of Paridae, Remizidae and Aegithalos based on mtDNA sequences of COI and cyt b. *Chinese Birds*, **1**(2): 112-123.
- de los Monteros AE. 2003. Models of the primary and secondary structure for the 12S rRNA of birds: A guideline for sequence alignment. *DNA Sequencing*, **14**(4): 241-256.
- Desjardins P, Morais R. 1990. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. A novel gene order in higher vertebrates. *Journal of Molecular Biology*, **212**(4): 599-634.
- Desjardins P, Morais R. 1991. Nucleotide sequence and evolution of coding and noncoding regions of a quail mitochondrial genome. *Molecular Evolution*, **32**(2): 153-161.
- Dirheimer G, Keith G, Dumas F, Westhof E. 1995. Primary, secondary and tertiary structures of tRNAs. In: Hill WE, Dahlbert A, Garrett RA, Moore PB, Schlessinger D, Warner JR. tRNA: Structure, Biosynthesis and Function. Washington DC: American Society for Microbiology Press, 93-126.
- Doda JN, Wright CT, Clayton DA. 1981. Elongation of displacement-loop strands in human and mouse mitochondrial DNA is arrested near specific template sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **78**(10): 6116-6120.
- Eberhard JR, Wright TF, Bermingham E. 2001. Duplication and concerted evolution of the mitochondrial control region in the parrot genus *Amazona*. *Molecular Biology and Evolution*, **18**(7): 1330-1342.
- Foran DR, Hixson JE, Brown WM. 1988. Comparison of ape and human sequences that regulate mitochondrial DNA transcription and D-loop DNA synthesis. *Nucleic Acids Research*, **16**(13), 5841-5861.
- Gibb GC, Kardailsky O, Kimball RT, Braun EL, Penny D. 2007.

- Mitochondrial genomes and avian phylogeny: complex characters and resolvability without explosive radiations. *Molecular Biology and Evolution*, **24**(1): 269-280.
- Haddrath O, Baker AJ. 2001. Complete mitochondrial DNA genome sequences of extinct birds: ratite phylogenetics and the vicariance biogeography hypothesis. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **268**(1470): 939-945.
- Hanada T, Suzuki T, Watanabe K. 2000. Translation activity of mitochondrial tRNA with unusual secondary structure. *Nucleic Acids Symposium Series*, (44): 249-250.
- Hickson RE, Simon C, Cooper A, Spicer GS, Sullivan J, Penny D. 1996. Conserved sequence motifs, alignment and secondary structure for the third domain of animal 12S rRNA. *Molecular Biology and Evolution*, **13**(1): 150-169.
- Ke Y, Huang Y, Lei FM. 2010. Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of *Podoces hendersoni*. *Hereditas*, **32**(9): 951-960. [柯杨, 黄原, 雷富民. 2010. 黑尾地鸦线粒体基因组序列测定与分析. 遗传, **32**(9): 951-960.]
- Kornegay JR, Kocher TD, Williams LA, Wilson AC. 1993. Pathways of lysozyme evolution inferred from the sequences of cytochrome b in birds. *Journal of Molecular Evolution*, **37**(4): 367-379.
- Larsen N. 1992. Higher order interactions in 23S rRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**(11): 5044-5048.
- Levinson G, Gutman GA. 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution*, **4**(3): 203-221.
- Li QW, Ma F. 2007. Birds Molecular Evolution and Molecular Systematics. Beijing: Science Press. [李庆伟, 马飞. 2007. 鸟类分子进化与分子系统学. 北京: 科学出版社.]
- Lovette IJ, Bermingham E. 1999. Explosive speciation in the New World *Dendroica* warblers. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **266**(1429): 1629-1636.
- Lowe TM, Eddy SR. 1997. tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Research*, **25**(5): 955-964.
- Marshall HD, Baker AJ. 1997. Structural variation and conservation in the mitochondrial control region of fringilline finches (*Fringilla* spp.) and the greenfinch (*Carduelis chloris*). *Molecular Biology and Evolution*, **14**(2): 173-184.
- Mindell D P, Sorenson M D, Dimcheff D E. 1998. Multiple independent origins of mitochondrial gene order in birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**(18): 10693-10697.
- Moritz C, Brown WM. 1986. Tandem duplication of D-loop and ribosomal RNA sequences in lizard mitochondrial DNA. *Science*, **233**(4771): 1425-1427.
- Mueller RL, Boore JL. 2005. Molecular mechanisms of extensive mitochondrial gene rearrangement in plethodontid salamanders. *Molecular Biology and Evolution*, **22**(10): 2104-2122.
- Neefs JM, Van de Peer Y, De Rijk P, Goris A, De Wachter R. 1993. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequence. *Nucleic Acids Research*, **18**(S1): 2237-2317.
- Noller HF. 1984. Structure of ribosomal RNA. *Annual Review of Biochemistry*, **53**(253): 119-162.
- Ojala D, Montoya J, Attardi G. 1981. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature*, **290**(5806): 470-474.
- Pakert M, Martens J, Sun YH. 2010. Phylogeny of long-tailed tits and allies inferred from mitochondrial and nuclear markers (Aves: Passeriformes, Aegithalidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **55**(3): 952-967.
- Quinn MTW. 1997. Molecular Evolution of the Mitochondrial Genome. In: Mindell DP. Avian Molecular Evolution and Systematics. San Diego: Academic Press, 5: 3-28.
- Quinn TW, Wilson AC. 1993. Sequence evolution in and around the mitochondrial control region in birds. *Journal of Molecular Evolution*, **39**(4): 417-425.
- Ramirez V, Savoie P, Morais R. 1993. Molecular characterization and evolution of a duck mitochondrial genome. *Journal of Molecular Evolution*, **37**(3): 296-310.
- Randi E, Lucchini V. 1998. Organization and evolution of the mitochondrial DNA control region in the avian genus *Alectoris*. *Journal of Molecular Evolution*, **47**(4): 449-462.
- Ruokonen M, Kvist L. 2002. Structure and evolution of the avian mitochondrial control region. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **23**(3): 422-432.
- Sbisa E, Tanzariello F, Reyes A, Pesole G, Saccone C. 1997. Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: Identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene*, **205**(1-2): 125-140.
- Sheldon FH, Gill FB. 1996. A reconsideration of songbird Phylogeny, with emphasis on the evolution of titmice their sylvioid relatives. *Systems Biology*, **45**(4): 473-495.
- Sibley CG, Ahlquist JA. 1990. The Phylogeny and Classification of Birds: A Study in Molecular Evolution. New Haven: Yale University Press.
- Simon C, Frati F, Bekenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P. 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a complication of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, **87**: 651-701.
- Singh TR, Shneor O, Huchon D. 2008. Bird mitochondrial gene order: insight from 3 warbler mitochondrial genomes. *Molecular Biology and Evolution*, **25**(3): 475-477.
- Sorenson MD. 2003-02-14 [2010-1-8]. Avian mtDNA primers. Boston: Boston University, <http://people.bu.edu/msoren/Bird.mt.Primers.pdf>.
- Sorenson MD, Ast JC, Dimcheff DE, Yuri T, Mindell DP. 1999. Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **12**(2): 105-114.
- Stanton DJ, Daehler LL, Moritz CC, Brown WM. 1994. Sequences with the potential to form stem-and-loop structures are associated with coding-region duplications in animal mitochondrial DNA. *Genetics*, **137**(1): 233-241.
- Stoneking M, Soodyall H. 1996. Human evolution and the mitochondrial genome. *Current Opinion in Genetics & Development*, **6**(6): 731-736.
- Vawter L, Brown WM. 1993. Rates and patterns of base change in the small subunit ribosomal RNA gene. *Genetics*, **134**(2): 597-608.
- Webb DM, Moore WS. 2005. A Phylogenetic analysis of wood Peckers and their allies using 12S, Cytb, and COI nucleotide sequences (class Aves;

- order Piciformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **36**(2): 233-248.
- Wenink PW, Baker AJ, Tilanus MG. 1994. Mitochondrial control region sequences in two shorebird species: the turnstone and the dunlin, and their utility in population genetic studies. *Molecular Biology and Evolution*, **11**(1): 22-31.
- Wolstenholme DR. 1992a. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *International Review of Cytology*, **141**: 173-216.
- Wolstenholme DR. 1992b. Genetic novelties in mitochondrial genomes of multicellular animals. *Current Opinion in Genetics & Development*, **2**(6): 918-925.
- Wolstenholme DR, Okimoto R, Macfarlane JL. 1994. Nucleotide correlations that suggest tertiary interactions in the TV-replacement loop-containing mitochondrial tRNAs of the nematodes, *Caenorhabditis elegans* and *Ascaris suum*. *Nucleic Acids Research*, **22**(20): 4300-4306.
- Woese CR, Magrum LJ, Gupta R, Siegel RB, Stahl DA, Kop J, Crawford N, Brosius J, Gutell R, Hogan JJ, Noller HF. 1980. Secondary structure model for bacterial 16S ribosomal RNA phylogenetic, enzymatic and chemical evidence. *Nucleic Acids Research*, **8**(10): 2275-2293.
- Xiao B, Ma F, Sun Y, Li QW. 2006. Comparative analysis of complete mitochondrial DNA control region of four species of Strigiformes. *Acta Genetica Sinica*, **33**(11): 965-974.
- Yokobori S, Pääbo S. 1995. Transfer RNA editing in land snail mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**(22): 10432-10435.
- Zheng GM. 2002. The World Birds Classification and Distribution List. Beijing: Science Press, 103-243. [郑光美. 2002. 世界鸟类分类与分布名录. 北京: 科学出版社, 103-243.]