

雀形目 10 种鸟类线粒体的 DNA 变异及分子进化*

李庆伟 李爽 田春宇 王勇军 郭玉梅

(辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁 大连 116029) (深圳福田红树林自然保护区, 深圳 518040)

(School of Pharmacy, University of Southern California, Los Angeles, CA 90089, U. S. A.)

摘要 采用 14 种限制性内切酶 (*Apa*、*Bam*H、*Bgl*、*Eco*R I、*Eco*R、*Hind*、*Hpa*、*Kpn*、*Pst*、*Pvu*、*Sal*、*Sca*、*Xba* 和 *Xho*) 对雀形目 3 科 10 种鸟类 (蒙古百灵、喜鹊、小嘴乌鸦、白腰朱顶雀、锡嘴雀、朱雀、红腹灰雀、灰腹灰雀、红交嘴雀和黄喉鹀) 进行限制性片段长度多态分析 (RFLP 分析)。结果表明: 雀形目鸟类基因组大小存在遗传多态性, 不同类群在酶切类型上表现出各自的特点, 雀形目鸟类与非雀形目鸟类在线粒体 DNA 的进化速率有着相同的特点, 化石记录的地质年代与线粒体 DNA 分子时钟记录的年代有着惊人的吻合, 这两个互为独立事件的统一, 提示线粒体 DNA 作为分子进化的良好工具。

关键词 雀形目 线粒体 DNA 分子进化

动物线粒体 DNA 在大小、结构和基因组成上具有一致性特点, 这点有别于植物线粒体 DNA, 它是一个双链、共价、闭合环状分子, 为母系遗传。近年来在雀形目鸟类的分子进化研究过程中多采用线粒体 DNA 的限制性片段长度多态分析 (简称 RFLP), Zink *et al.* (1990, 1991) 在雀形目鸟类不同地理种群的遗传进化和亲缘关系探讨方面开辟了该领域的先河, Avise *et al.* (1991) 在种间多态性、近缘种的遗传距离、不同地理种群的多态性变化和母系遗传的微进化时间表方面做出了开创性工作, Harlid *et al.* (1997) 通过线粒体 DNA 细胞色素 *b* 序列分析提出雀形目是现代鸟类中最早分化出来的一个类群。

雀形目鸟类是鸟纲中最大的一个类群, 在自然界中有着广泛的适应辐射, 有关该类群的起源以及各科演化关系, 一直是鸟类学界争论的问题。以 Mayr 和 Amadon 等人为代表的形态分类学将该目分成阔嘴鸟亚目、霸鹟亚目、琴鸟亚目和燕雀亚目, 有的学者又补充了灶鸟亚目。80 年代后期美国学者 Sibley *et al.* (1988) 根据 DAN-DNA 杂交资料, 将雀形目划分为两个亚目——霸鹟亚目和燕雀亚目, 从而将鸟类分类学和系统学带入了分子时代。

本文报道雀形目 3 科 10 种鸟类线粒体 DNA 限制性片段长度多态分析, 并对它的亲缘关系和系统进化进行初步探讨。

1 材料和方法

1.1 样品材料

共采集雀形目鸟类 3 科 10 种, 共 27 个个体, 实验动物见表 1。

1.2 试剂

14 种限制性内切酶购自宝生物工程 (大连) 有限公司, RNase 为宝灵曼公司产品, 琼脂糖为 Promage 公司产品, SDS 为国产分析纯 (用时重结晶), 乙酸钾为上海试剂一厂产品, 其它试剂均为国产分析纯。

1.3 线粒体 DNA 提取

每个种类取 5 g 新鲜组织 (肝、肾、心脏、肌肉等) 加入 100 ml 匀浆缓冲液, 匀浆至组织和细胞破碎 (不要过于研磨, 以防核膜破裂); 5 000 × g 离心 20 min 去除沉淀取上清; 12 000 × g 离心 20 min 沉淀线粒体; 加入变性液 (终浓度 SDS 为 0.1%, NaOH 为 0.1 N), 冰浴 30 min; 加入复性液 (5 M 醋酸钾), 冰浴 60 min; 加入 2 倍体积的饱和酚, 振荡抽提 30 min, 12 000 × g 离心 10 min, 取上清液; 加入 2 倍体积氯仿抽提 10 min, 12 000 × g 离心 10 min, 取上清液; 取 2 倍体积的冰冻无水乙醇, 混匀后 -20℃ 静置 60 min; 12 000 × g 离心 10 min, 沉淀 mtDNA, 75% 冷乙醇漂洗一次, 风干后溶于含有 20 μg/ml RNase 的 TE 缓冲液中备用。

2001-05-28 收稿, 2002-04-06 修回

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39670394)

第一作者简介 李庆伟, 男, 45 岁, 博士, 教授。研究方向: 细胞和分子生物学。E-mail: Liqw@yahoo.com.cn

表 1 本研究检测的物种

Table 1 Species examined in the present study

中文名 Chinese name	学名 Academic name	性别和数量 Sex and number	时间 Time	采集地点 Locality
蒙古百灵	<i>Melanocorypha mongolica</i>	2	1998.4	辽宁大连 (Dalian, Liaoning)
小嘴乌鸦	<i>Corvus corone</i>	1	1997.7	辽宁大连 (Dalian, Liaoning)
喜鹊	<i>Pica pica</i>	1 1	1997.4	辽宁大连 (Dalian, Liaoning)
朱雀	<i>Carpodacus erythrurus</i>	2 3	1998.5	辽宁大连 (Dalian, Liaoning)
白腰朱顶雀	<i>Carduelis flammea</i>	2 2	1996.10	辽宁大连 (Dalian, Liaoning)
锡嘴雀	<i>Coccothraustes coccothraustes</i>	2	1997.10	辽宁大连 (Dalian, Liaoning)
红交嘴雀	<i>Loxia curvirostra</i>	2	1998.10	辽宁大连 (Dalian, Liaoning)
灰腹灰雀	<i>Pyrrhula griseiventris</i>	1 1	1997.4	辽宁大连 (Dalian, Liaoning)
红腹灰雀	<i>Pyrrhula pyrrhula</i>	1 1	1997.4	辽宁大连 (Dalian, Liaoning)
黄喉鹀	<i>Emberiza elegans</i>	2 3	1997.10	辽宁大连 (Dalian, Liaoning)

1.4 线粒体 DNA 酶解

共采用 14 种限制性内切酶 *Apa*、*Bam*H、*Bgl*、*Eco*R、*Eco*R、*Hind*、*Hpa*、*Kpn*、*Pst*、*Pvu*、*Sal*、*Sca*、*Xba* 和 *Xho*，根据厂家提供的缓冲液和反应条件，反应体积为 20 μ l，37 酶解 6~8 h。

1.5 琼脂糖电泳

配制 0.8% 琼脂糖平板凝胶，采用 Tris-乙酸 (TAE) 电泳缓冲液，电泳电压为 3 V/cm，室温下电泳 10~12 h，分子量标记采用 DNA/*Hind*，溴化乙锭染色，紫外灯下观察并拍照。

1.6 限制性酶谱分析

按照 Nei *et al.* (1979) 的公式，计算片段共享度 *F* 和遗传距离 *P*：

$$F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$$

$$P = 1 - [(-F + (F^2 + 8F)^{1/2}) / 2]^{1/6}$$

式中 *P* 为每一个位点的平均碱基置换度，代表物种间的遗传距离，*F* 为物种间的限制性片段共享度，*N_x* 和 *N_y* 分别代表物种 *X* 和 *Y* 的限制性片段数，*N_{xy}* 为两物种间的共有片段数。

2 结果

2.1 酶切类型变化特点

部分鸟类 mtDNA 酶切电泳图谱见图 1，10 种鸟类线粒体 DNA 酶切片段大小及分子量见表 2。由于多次电泳条件的微小差异和实验本身的误差，我们用不同酶切处理后得到的 mtDNA 片段总长度也存在着微小的差异，所以各酶切反应均重复一次，以减少误差。另外，*Hind* 酶切片段总和小于标准基因组长度，解释为凝胶中有小的未检出片

段。在研种类中产生酶切片段最多的限制酶是 *Hind*，平均是 5 个片段，包括小的未检出片段。产生酶切片段最少的是 *Xba*，其中朱雀、锡嘴雀、灰腹灰雀、红腹灰雀和黄喉鹀未见酶切位点。产生酶切片段最多的种类是灰腹灰雀 (34 个)，最少的种类是锡嘴雀 (26 个)。其中产生单个酶切位点最多的种类是白腰朱顶雀 (8 个) (见表 2)。

2.2 种间遗传变异特点

从表 3 可知种间遗传距离最小的是红腹灰雀和灰腹灰雀 ($P = 0.0184$)，最大的是红腹灰雀与小嘴乌鸦 ($P = 0.1641$)，种间的平均遗传距离 $P = 0.0852$ 。从图 2 来看，在所涉及到的三科间关系中，百灵科首先作为独立的一支，然后再与雀科和鸦科聚类在一起，反映出百灵科较鸦科与雀科有更远的亲缘关系。百灵科虽然只涉及一个种，但是酶切类型与其它两科有着显著的不同，其中在 *Kpn* 切点，所有被测个体均有 1~2 个切点，而蒙古百灵则无切点；其二，在 *Xba* 切点是一个，而其它物种则有 2~3 个切点，另外在基因组大小方面也较其它种类不同。

3 讨论

3.1 样本的代表性

在本研究中，我们使用了 10 种鸟的多个个体均未发现种内变异现象。这可能是由于多数供试物种的个体均来自同一区域，很可能属于同一地理种群，因此 mtDNA 的个体间差异很小。这显然与 mtDNA 呈母系遗传，在遗传过程中基本上不发生基因重组有关。选择一个个体基本上就可以代表一个遗传类群或一个母系集团。

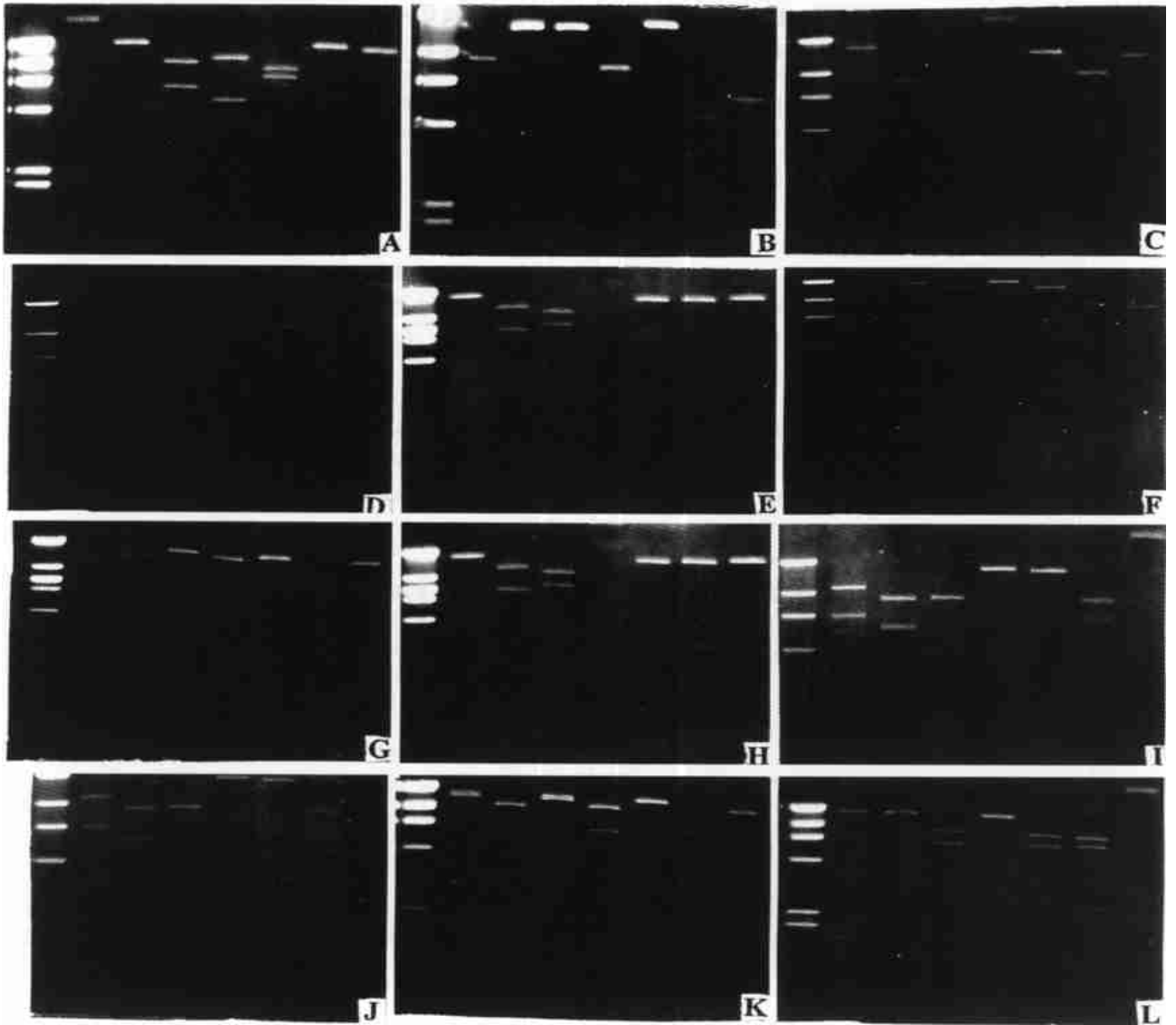


图 1 鸟类 mtDNA 部分酶切电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretic pattern of mtDNA from some birds

- A. 蒙古百灵部分酶切类型, 从左至右依次为: DNA, *Kpn*, *Pst*, *Pvu*, *Sal*, *Sca*, *Xba* 和 *Xho* (Restriction fragments of mtDNA from *M. mongolica*. Left to right: marker, *Kpn*, *Pst*, *Pvu*, *Sal*, *Sca*, *Xba* and *Xho*)
- B. 小嘴乌鸦部分酶切类型, 从左至右依次为: DNA, *Apa*, *BamH*, *Bgl*, *EcoR*, *EcoR*, *Hind* 和 *Hpa* (Restriction fragments of mtDNA from *C. corone*. Left to right: marker, *Apa*, *BamH*, *Bgl*, *EcoR*, *EcoR*, *Hind* and *Hpa*)
- C. 喜鹊部分酶切类型, 从左至右依次为: DNA, *Kpn*, *Pst*, *Pvu*, *Sal*, *Sca*, *Xba* 和 *Xho* (Restriction fragments of mtDNA from *P. pica*. Left to right: marker, *Kpn*, *Pst*, *Pvu*, *Sal*, *Sca*, *Xba* and *Xho*)
- D. 朱雀部分酶切类型, 从左至右依次为: DNA, *Apa*, *BamH*, *Bgl*, *EcoR*, *EcoR*, *Hind* 和 *Hpa* (Restriction fragments of mtDNA from *C. erythrinus*. Left to right: marker, *Apa*, *BamH*, *Bgl*, *EcoR*, *EcoR*, *Hind* and *Hpa*)
- E. 白腰朱顶雀部分酶切类型, 从左至右依次为: DNA, *Apa*, *BamH*, *Bgl*, *EcoR*, *EcoR*, *Hind* 和 *Hpa* (Restriction fragments of mtDNA from *C. flammea*. Left to right: marker, *Apa*, *BamH*, *Bgl*, *EcoR*, *EcoR*, *Hind* and *Hpa*)
- F. 锡嘴雀部分酶切类型, 从左至右依次为: DNA, *Apa*, *BamH*, *Bgl*, *EcoR*, *EcoR*, *Hind* 和 *Hpa* (Restriction fragments of mtDNA from *C. coccythraustes*. Left to right: marker, *Apa*, *BamH*, *Bgl*, *EcoR*, *EcoR*, *Hind* and *Hpa*)
- G~H. 红交嘴雀全部部分酶切类型, 从左至右依次为: DNA, *Apa*, *BamH*, *Bgl*, *EcoR*, *EcoR*, *Hind*, *Hpa*, *Kpn*, *Pst*, *Pvu*, *Sal*, *Sca*, *Xba* 和 *Xho* (Restriction fragments of mtDNA from *L. curvirostra*. Left to right: marker, *Apa*, *BamH*, *Bgl*, *EcoR*, *EcoR*, *Hind*, *Hpa*, *Kpn*, *Pst*, *Pvu*, *Sal*, *Sca*, *Xba* and *Xho*)
- I. 灰腹灰雀部分酶切类型, 从左至右依次为: DNA, *Kpn*, *Pst*, *Pvu*, *Sal*, *Sca*, *Xba* 和 *Xho* (Restriction fragments of mtDNA from *P. griseiventris*. Left to right: marker, *Kpn*, *Pst*, *Pvu*, *Sal*, *Sca*, *Xba* and *Xho*)
- J. 红腹灰雀部分酶切类型, 从左至右依次为: DNA, *Kpn*, *Pst*, *Pvu*, *Sal*, *Sca*, *Xba* 和 *Xho* (Restriction fragments of mtDNA from *P. pyrrhula*. Left to right: marker, *Kpn*, *Pst*, *Pvu*, *Sal*, *Sca*, *Xba* and *Xho*)
- K~L. 黄喉鹀全部酶切类型, 从左至右依次为: DNA, *Apa*, *BamH*, *Bgl*, *EcoR*, *EcoR*, *Hind*, *Hpa*, *Kpn*, *Pst*, *Pvu*, *Sal*, *Sca*, *Xba* 和 *Xho* (Restriction fragments of mtDNA from *E. elegans*. Left to right: marker, *Apa*, *BamH*, *Bgl*, *EcoR*, *EcoR*, *Hind*, *Hpa*, *Kpn*, *Pst*, *Pvu*, *Sal*, *Sca*, *Xba* and *Xho*)

表 2 雀形目 10 种鸟类线粒体 DNA 酶切片段大小

Table 2 Molecular size (kb) of mitochondrial DNA in 10 species of Passeriformes

酶 Enzymes 种类 Species	Enzymes														大小 size
	<i>Apa</i>	<i>Bam</i> H	<i>Bgl</i>	<i>Eco</i> R	<i>Eco</i> R	<i>Hind</i>	<i>Hpa</i>	<i>Kpn</i>	<i>Sal</i>	<i>Sca</i>	<i>Pst</i>	<i>Pvu</i>	<i>Xba</i>	<i>Xho</i>	
蒙古百灵 (<i>M. mongolica</i>)	17.96	10.32	20.30	18.27	15.05	12.09	12.82	0	20.30	11.55	13.52	9.42	20.30	18.15	20.30
	2.34	4.37		2.03	5.25	3.98	4.17			6.56	5.37	7.94		2.15	
		3.16				2.32	3.31			2.19	1.41	1.58			
		2.45				1.91						1.36			
小嘴乌鸦 (<i>C. corone</i>)	9.04	14.74	14.60	8.34	16.45	4.68	5.75	16.45	11.88	16.45	16.45	6.61	14.97	未做	16.45
	5.01	1.71	1.85	3.00		3.70	3.98		4.57			4.46	1.48		
	2.40			2.00		2.71	3.72					2.75			
				1.70		?	3.10					2.63			
				1.41											
喜 鹊 (<i>P. pica</i>)	9.04	9.37	16.45	6.03	13.29	6.56	9.80	16.45	8.93	16.45	0	16.45	9.40	14.16	16.45
	7.41	7.08		4.31	3.16	3.70	3.10		4.57				4.17	2.29	
				3.00		2.71	2.04		2.95				2.88		
				1.70		2.03	1.51								
				1.41		1.4									
朱 雀 (<i>C. erythrinus</i>)	6.81	10.41	10.04	6.31	13.97	9.33	10.09	10.07	8.43	5.97	10.72	17.28	8.51	0	17.28
	4.68	3.63	7.24	4.36	3.31	4.00	3.72	6.56	5.13	5.75	6.56		6.61		
	2.40	3.24		?		3.95	3.47	?	3.72	3.24			?		
	2.51									2.32					
	?														
白腰朱顶雀 (<i>C. flammea</i>)	20.81	23.13	23.13	18.12	23.13	7.94	23.13	23.13	23.13	9.16	23.13	21.57	20.38	23.13	23.13
	2.32			5.01		4.27				7.08		1.31	2.75		
						2.69				4.75		1.25			
						2.51				2.14					
						1.58									
						?									
锡嘴雀 (<i>C. coccothraustes</i>)	16.73	16.73	13.19	19.73	13.42	9.24	8.17	10.17	16.73	8.79	16.73	16.73	8.51	0	16.73
			3.54		3.31	3.30	3.47	6.56		7.94			4.57		
					2.45	3.00							3.16		
					1.74	2.09							?		
红交嘴雀 (<i>L. curvirostra</i>)	9.50	10.31	19.37	12.00	16.37	7.08	13.00	16.37	10.06	9.12	0	16.37	13.80	16.37	16.37
	4.67	6.06		4.37		4.20	3.31		6.31	7.25			2.57		
	2.20					3.00									
						2.09									
灰腹灰雀 (<i>P. griseiventris</i>)	6.41	11.25	16.85	9.77	8.57	7.08	16.85	10.29	8.51	8.59	16.85	16.85	8.32	0	16.85
	4.68	3.40		4.37	8.28	4.20		6.56	5.40	3.16			6.31		
	2.40	2.20		2.71		3.00			3.02	3.05			2.22		
	1.78				2.09				2.05						
	?					?									
红腹灰雀 (<i>P. pyrrhula</i>)	6.41	13.18	16.42	12.05	8.57	5.94	16.42	9.86	8.00	8.16	16.42	16.42	9.86	0	16.42
	5.33	3.24		4.37	8.28	5.57		6.56	5.40	3.16			6.56		
	4.68					?			3.02	3.05					
										2.05					
黄喉鹀 (<i>E. elegans</i>)	15.90	14.50	15.51	12.03	18.20	6.61	13.11	18.20	18.20	9.36	18.20	9.98	8.51	0	18.20
	2.30	3.72	2.69	6.17		3.30	3.00			6.60		6.60	6.81		
						2.40	2.09			2.24		1.62	2.71		
						1.74									
						?									

表中“0”为无识别位点 (“0” represents no restriction site) “?”为未检出片段 (“?” represents undetected fragments)

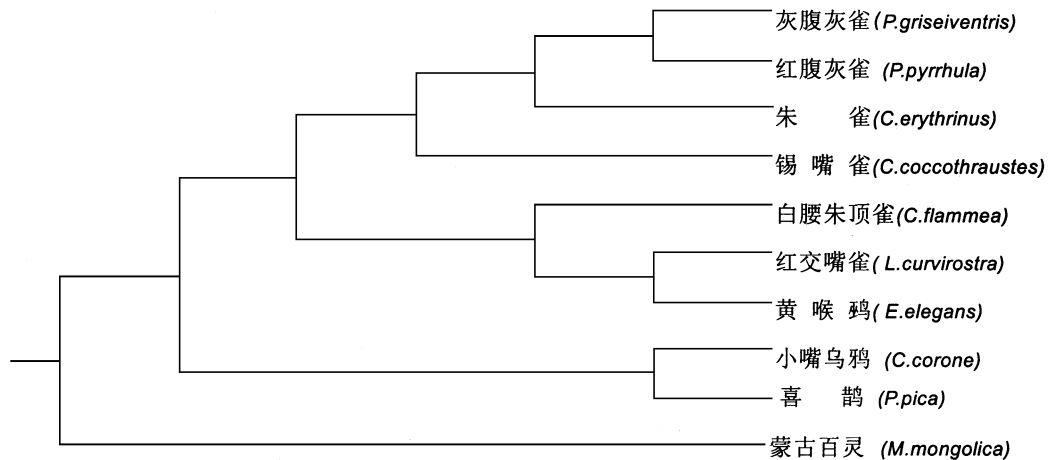


图 2 基于 P 距离, 用 UPGMA 法构建雀形目 10 种鸟类分子系统树

Fig. 2 Phylogenetic tree of 10 species of Passeriformes using the UPGMA method with P-distance

表 3 雀形目 10 种鸟类线粒体 DNA 遗传距离 (对角线下) 和片段共享度 (对角线上)

Table 3 Mitochondrial DNA genetic distances (below diagonal) and shared fragments (above diagonal)

	蒙古百灵 <i>M. mongolica</i>	小嘴乌鸦 <i>C. corone</i>	喜鹊 <i>P. pica</i>	朱雀 <i>C. erythrinus</i>	白腰朱顶雀 <i>C. flammea</i>	锡嘴雀 <i>C. coccothraustes</i>	红交嘴雀 <i>L. curvirostra</i>	灰腹灰雀 <i>P. griseiventris</i>	红腹灰雀 <i>P. pyrrhula</i>	黄喉鹀 <i>E. elegans</i>
蒙古百灵 (<i>M. mongolica</i>)	—	0.1270	0.1563	0.1846	0.3448	0.1404	0.1429	0.2188	0.1034	0.2668
小嘴乌鸦 (<i>C. corone</i>)	0.1264	—	0.2857	0.1875	0.2105	0.1786	0.2545	0.1905	0.0702	0.2712
喜鹊 (<i>P. pica</i>)	0.1132	0.0750	—	0.2462	0.1724	0.2456	0.2500	0.2188	0.1724	0.3000
朱雀 (<i>C. erythrinus</i>)	0.1026	0.1016	0.0844	—	0.1017	0.3448	0.2456	0.4923	0.4407	0.2951
白腰朱顶雀 (<i>C. flammea</i>)	0.0632	0.0943	0.1069	0.1406	—	0.2353	0.4400	0.3103	0.1923	0.4444
锡嘴雀 (<i>C. coccothraustes</i>)	0.1200	0.1047	0.0845	0.0632	0.0872	—	0.2857	0.3509	0.2353	0.4151
红交嘴雀 (<i>L. curvirostra</i>)	0.1189	0.0823	0.0884	0.0845	0.0482	0.0750	—	0.3214	0.2000	0.4615
灰腹灰雀 (<i>P. griseiventris</i>)	0.0918	0.1006	0.0918	0.0413	0.0698	0.0622	0.0676	—	0.7241	0.4000
红腹灰雀 (<i>P. pyrrhula</i>)	0.1395	0.1641	0.1069	0.0481	0.1000	0.0872	0.0975	0.0184	—	0.2593
黄喉鹀 (<i>E. elegans</i>)	0.0793	0.0783	0.0719	0.0730	0.0476	0.0518	0.0453	0.0540	0.0811	—

3.2 mtDNA 基因组多态性

前人的工作中已涉及到鸟类 mtDNA 基因组大小的变化。Shields *et al.* (1988) 统计了 3 目 40 种鸟类线粒体基因组的大小, 发现其变化范围为

16.3 ~ 17.3 kb, Dittman *et al.* (1991) 报道的鹤形目 10 种鸟类 mtDNA 基因组大小为 18.2 ~ 19.3 kb, *Zenaida macroura* 个体间 mtDNA 基因组的变化在 19.3 ~ 20.7 kb 之间 (Ball *et al.*, 1992); 李

庆伟等 (1998) 报道了鸺形目鸟类线粒体基因组大小的变化, 其中短耳鸺 (*Asio flammeus*) 基因组大小为 23.5 kb, 与通常的鸟类 mtDNA 基因组相比, 约增大 6 kb 左右, 在脊椎动物中已实属罕见。本文报道的雀科白腰朱顶雀 DNA 基因组大小为 23.13 kb, 百灵科的蒙古百灵为 20.30 kb, 这在雀形目当中是首次报道的线粒体 DNA 基因组增大的现象。在雀科的白腰朱顶雀的酶切类型表现突出的特点之一是 57% 的酶切类型为单一切点, 二是基因组大小较本科其它种类大 6~7 kb 左右, 这在雀形目中是首次发现的。尽管鸟类线粒体 DNA 基因组增大的分子机制目前仍不清楚, 但是这种变异在进化过程中得以保存下去, 并在该类群中广泛分布, 提示这种遗传变异在长期的进化过程和物种形成当中有着不可缺少的调控作用, 有待进一步深入探讨。

3.3 种系发生关系

雀形目鸟类起源及其演化历史一直是鸟类学界争论的热点。尽管如此, 大多数学者仍认为, 雀形目鸟类可能是起源于佛法僧目的祖先 (Olson, 1985)。Harlid *et al.* (1997) 采用线粒体 DNA 细胞色素 *b* 全序列的分析对 6 个目鸟类的种系发生关系的研究结果表明, 雀形目鸟类是现代鸟类中最早分化出来的一个类群。Sibley *et al.* (1988) 根据 DNA/DNA 杂交资料, 将雀形目鸟类划分成二个亚目——霸鹟亚目 (亚鸣禽) 和燕雀亚目 (鸣禽) 两大类群。本文所涉及的种类均为燕雀亚目中的雀总科, 其中包括百灵科、鸺科和雀科。雀类的祖先大约在 4 000~4 500 万年前从其它鸣禽中分支出来, 这一分支大约在 4 000~4 500 万年前于

始新世 (Eocene) 开始分化成现存的种类, 百灵科是其中最早分支出来的一个类群 (大约 3 500 万年)。百灵科的鸣管缺少一块骨化的鸣骨, 而且其附蹼的后部为网状鳞片, 这些特征在其它雀类是绝无仅有的。本文采用 MEGA 2.1 构树软件, 用遗传距离 *P* 作为构树的基数, 采用 UPGMA 法构建分子系统树。从系统树反映的关系上看, 百灵科作为独立的一支首先分支出来, 鸺科的种类和雀科的七个种类作为三个主要类群而平行存在, 基本上反映了雀总科的系统关系, 与 Sibley 等人的 DNA/DNA 杂交结果相一致, 提示线粒体 DNA RFLP 作为鸟类分子进化研究是较好的工具。目前关于核基因组和线粒体之间的相互影响的关系还不十分清楚, 但是根据笔者对雀形目 120 种鸟类核型的研究表明 (李庆伟, 1994): 凡是在染色体核型表现特殊的种类在线粒体 DNA RFLP 方面也同样有着特殊性。另外, 在本文研究中涉及到两个以上同种鸟个体间未检出遗传多态性。化石资料表明: 百灵科、鸺科和雀科出现的地质年代大致在中更新世到上新世 (Brodkorb, 1978; Olson, 1985)。Shields *et al.* (1987) 在研究北美洲鹞类线粒体 DNA 的 RFLP 的资料, 并结合化石记录, 首次提出鸟类 mtDNA 的进化速率约为每百万年变化 2% 的模型, 笔者在探讨猛禽类 mtDNA 速率也约为 2.5% 左右 (李庆伟等, 1998, 2000)。如果按鸟类线粒体 DNA 进化速率为每百万年变化 2% 来计算的话, 本文涉及到的这些种类分歧年代距今约 300~400 万年前, 与化石记录的地质年代相吻合, 提示线粒体 DNA 作为鸟类分子进化的“时钟”, 具有独特的作用。

参 考 文 献 (References)

- Avise, J. C. and R. M. Ball 1991 Mitochondrial DNA and avian microevolution. *Acta XX Congressus Internationalis Ornithologici* 514~524.
- Ball, R. M. and J. C. Avise 1992 Mitochondrial DNA phylogeographic differentiation among avian populations the evolutionary significance of subspecies. *Auk* **109**: 626~636.
- Brodkorb, K. P. 1978 Catalogue of Fossil birds, Part 5 (Passeriformes). *Bull. Florida State Mus. Biol. Sci.* **L3** (3): 139~228.
- Dittman, D. L. and R. M. Zink 1991 Mitochondrial DNA variation among phalaropes and allies. *Auk* **108**: 771~779.
- Harlid, A., A. Janke and U. Arnason 1997 The mtDNA sequence of the Ostrich and the divergence between paleognathous and neognathous birds. *Mol. Biol. Evol.* **14**: 754~761.
- Nei, M. and W. H. Li 1979 Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 5 269~5 273.
- Olson, S. L. 1985 The fossil record of birds. In: Farner, D., S. King Jr and K. C. Parkes ed. Orlando, Florida: Avian Biology Vol. . Academic Press, 79~238.
- Li, Q. W., H. Q. Zhang, Y. J. Wang, X. Z. Bian, X. K. Xiong, A. H. Liu, S. Y. Lin and L. Yang. 1994 Studies on the karyotypes of birds . The 12 species of Passeriformes. *Zoological Research* **15**: 33~37.
- Li, Q. W., J. Lin., W. Wei, W. Z. Li and Y. Z. Zheng 1998 Diversity of mitochondrial DNA in eight species of Strigiformes. *Acta Zool.*

- Sin.* **44**: 94 ~ 101.
- Li, Q. W., J. Lin., S. Li, Y. J. Wang, W. Z. Li and Y. Z. Zeng 2000 Studies on the evolution of mitochondrial DNA in 11 species of *Acipitridae*. *Acta Zool. Sin.* **46** (2): 209 ~ 220.
- Olson, S. L. 1985 The fossil record of birds. In: Farner, D. S., J. R. King and K. C. Parkes ed. *Avian Biology* Vol. . Orlando, Florida. Academic Press, 79 ~ 238.
- Shields, G. F. and A. C. Wilson 1987 Calibration of mitochondrial DNA evolution in geese. *J. Mol. Evol.* **24**: 212 ~ 217.
- Shields, G. F. and K. M. Helmrbychowski 1988 Mitochondrial DNA of birds. In: Johnston, R. F. ed. *Current Ornithology*. Vol. 5. New York: Plenum Press, 237 ~ 295.
- Sibley, C. G., J. E. Ahlquist and B. L. Monroe Jr. 1988 A classification of the living birds of the world based on DNA-DNA hybridization studies. *Auk* **105** (3): 409 ~ 423.
- Zink, R. M. and J. C. Avise 1990 Patterns of mitochondrial DNA and allozyme evolution the avian genus *Ammodramus*. *Syst. Zool.* **39**: 148 ~ 161.
- Zink, R. M. and D. L. Dittmann 1991 Evolution of brown towhees: mitochondrial DNA evidence. *Condor* **93**: 98 ~ 105.

外 文 摘 要 (Abstract)

MOL ECULAR EVOL UTION AND VARIABILITY IN MITOCHONDRIAL DNA IN 10 SPECIES OF PASSERIFORME *

LI Qing-Wei ** LI Shuang TIAN Chun-Yu WANG Yong-Jun GUO Yu-Mei

(College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China)

(Shenzhen Hongshulin National Research Administration, Shenzhen 518040, China)

(School of Pharmacy University of Southern California, Los Angeles, CA 90089, USA)

The mitochondrial RFLP analyzing method was used to study the phylogenetic relationships of ten species from three families of passeriformes, including *Melanocorypha mongolica*, *Corvus corone*, *Pica pica*, *Carpodacus erythrinus*, *Carduelis flame*, *Coccothraustes coccothraustes*, *Loxia curvirostra*, *Pyrrhula griseiventris*, *Pyrrhula pyrrhula*, and *Emberiza elegans*. Fourteen restriction enzymes were used in this study. Based on the electrophoretic patterns of mtDNA in ten species, phylogenetic trees were constructed using the computer program MEGA 2.1.

Mitochondrial genome polymorphism. mtDNA fragments from different species showed different restriction endonuclease maps. The length of the mitochondrial genome of *Carduelis flamme*, *Melanocorypha mongolica* and other eight species was 23.13 kb, 20.3 kb and 16 ~ 17 kb, respectively. The mtDNA genome enlargement observed in this study has never been previously reported. It was initially thought that this result was due to the opposite replication of the non-coding region, but this requires more detailed sequence analysis.

Interspecific heredity and mutation. Though the Alaudidae were represented by only one species (*Melanocorypha mongolica*) in our study, Alaudidae was obviously different from the other two families in restriction endonuclease type: all species had 1 ~ 2 *Kpn* sites except *Melanocorypha mongolica* which had no *Kpn* sites; *Melanocorypha mongolica* had 1 *Xba* site while other species had 2 ~ 3 *Xba* sites. From a morphological perspective, the scale of the tarsometatarsus in the Alaudidae was significantly different from other families. Furthermore, the karyotype of the Alaudidae also displayed some unique features. As far as *Carduelis flamme* was concerned, there were two apparent characters of restriction endonuclease type: one was that 57% of restriction sites belonged to a single site; the other was that genome length was longer (6 ~ 7 kb) than

* This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 39670394)

** Corresponding author. Liqw @yqhoo.com.cn

the other species in the Fringillidae family. Consistent to a study of the karyotypes of 120 passeriforms species by other researchers, we found that the species demonstrating unique karyotypes showed the the same uniqueness in mtDNA RFLP.

Phylogenetic analysis. The mitochondrial gene tree constructed in this study suggests that the Alaudidae are a single branch separate from the other two families, and the Fringillidae are more related to the Corvidae than the Alaudidae. It has been reported that mitochondrial DNA evolves at a rate of 2 % per million years. Using this evolutionary rate, our results indicate that these taxa diverged 4 million years ago, which is identical to what is suggested by the fossil record. This suggests that mitochondrial DNA may provide an appropriate molecular clock for research on the evolutionary history of birds.

Key words Passeriformes, mtDNA, Molecular evolution