

太湖新银鱼线粒体 D-loop 和 Cyt *b* 片段 序列结构与进化速率比较

赵亮^{①②} 谢本贵^② 刘志瑾^② 许木后^② 李明^{②*}

(① 安徽宿州学院生命科学系 宿州 234000; ② 中国科学院动物研究所 动物生态与保护生物学国家重点实验室 北京 100101)

摘要:共获得 49 个太湖新银鱼 (*Neosalanx taihuensis*) 个体的线粒体细胞色素 *b* (Cyt *b*) 全序列和控制区 (D-loop) 部分序列。所测线粒体 D-loop 部分序列长度变化范围为 648 ~ 680 bp, 识别到位于前端的一个串联重复序列、一个终止相关序列 (ETAS), 3 个中央保守区保守序列 (CSB-F、CSB-E、CSB-D) 及一个保守序列区保守序列 (CSB-I), 结构与其他鱼类的研究结果类似。太湖新银鱼线粒体 Cyt *b* 和 D-loop 片段的相对进化速率的比较研究结果表明, 太湖新银鱼 D-loop 总的序列多态性位点的比例为 0.83%, 低于线粒体 Cyt *b* 部分总的序列多态性位点的比例 (1.31%)。假设太湖新银鱼 Cyt *b* 基因平均进化速率相对值为 1, 贝叶斯 (Bayes) MCMC 模拟给出 Cyt *b* 基因的相对速率区间估计为 1.000 ± 0.131 , 而 D-loop 基因的相对速率为 0.859 ± 0.261 , 表明太湖新银鱼 D-loop 基因的进化速率低于 Cyt *b* 基因, 同时, 后验概率分布的变异方差也比较大。说明 Cyt *b* 基因比 D-loop 基因具有相对较高的进化速率, 也相对更接近分子钟假设。因此, 可以认为 Cyt *b* 基因比 D-loop 基因更适于太湖新银鱼种内及近缘种间相关分子生态及系统地理格局的研究。

关键词:太湖新银鱼; D-loop; Cyt *b*; 进化速率

中图分类号:Q951 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2010)02-27-12

Molecular Structure and DNA Substitution Rate of the Mitochondrial Control Region and Cytochrome *b* in Taihu Salangid, *Neosalanx taihuensis*

ZHAO Liang^{①②} XIE Ben-Gui^② LIU Zhi-Jin^② XU Mu-Qi^② LI Ming^{②*}

(① Faculty of Biology, Suzhou College, Suzhou 234000; ② Key Laboratory of Animal Ecology and Conservation Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: The structure and related substitution rate of mitochondrial DNA displacement loop (D-loop) region and cytochrome *b* (Cyt *b*) were comparatively analyzed through Bayesian MCMC simulation in present study. Based on the sequence analysis of mtDNA D-Loop 648 ~ 680 bp, the D-Loop structure of this species is similar to that of other fish species containing the extended termination associated sequence domain (ETAS), the central conserved domain (CD) and several conserved sequence block (CSB-F、CSB-E、CSB-D、CSB-I).

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 30570256), 安徽省教育厅重点项目 (No. KJ2009A052Z), 宿州学院人才基金项目 (No. 2007YSS10);

* 通讯作者, E-mail: lim@ioz.ac.cn;

第一作者介绍 赵亮, 男, 博士, 副教授; 研究方向: 保护遗传学; E-mail: zhaoliang@ioz.ac.cn.

收稿日期:2009-10-12, **修回日期:**2009-12-23

According to comparative analysis of related substitution rate in *Neosalanx taihuensis*, the rate of polymorphic loci was lower in D-Loop (0.83%) than in Cyt *b* (1.31%) and the interval estimation of related substitution rate is 1.000 ± 0.131 in Cyt *b* and 0.859 ± 0.261 in D-Loop, respectively, which indicated that the mutation rates of D-loop were slower than that of Cyt *b* with large variance of Bayes posterior density distribution in *N. taihuensis*. It provided evidence that the substitution rate of Cyt *b* is higher than that of D-Loop, and is more approximate to molecular clock hypothesis, which indicated that Cyt *b* might be more appropriate molecular marker than D-Loop in studies on molecular ecology and phylogeography for this species.

Key words: *Neosalanx taihuensis*; Mitochondrial DNA; D-loop; Cyt *b*; Substitution rate

线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 因为大体上呈进化中性、没有重组,特别是有相对恒定的进化速率,因此在种内水平及种间水平的分子生态学特别是分子系统地理学的研究中,是广泛应用的主流分子标记。脊椎动物线粒体基因组由 13 个蛋白质编码基因、22 个转运 RNA 基因(tRNA)、2 个核糖体基因(rDNA)和一段控制区(control region, CR;或 displacement loop, D-loop)组成。D-loop 位于 tRNA^{Pro} 及 tRNA^{Phe} 基因之间,长度一般在 880 ~ 1 400 bp 之间,某些物种由于大量重复序列的出现,控制区的长度可能会大大长于上述最大长度^[1-3]。脊椎动物控制区可分为 3 个结构区:终止相关序列区(extended termination associated sequence, ETAS)、中央保守区(central conserved sequence block domain, CD)和保守序列区(conserved sequence block domain, CSB)。在人类和一些哺乳动物的线粒体控制区中已分别识别了位于终止相关序列区的 ETAS,位于中间保守区域的 CSB-A、CSB-B、CSB-C、CSB-D、CSB-E、CSB-F 和位于保守序列区的 CSB-1、CSB-2、CSB-3。中间保守区(CD)长度在不同物种及种内个体间长度变异不大,而位于两端的终止相关序列区(ETAS)及保守序列区(CSB)往往具有较高的碱基替代速率,较多的插入和缺失,不同长度及拷贝数的重复序列^[1, 4-7]。在鱼类方面, Buroker 等^[8] 和 Broughton 等^[9] 分别识别了鲟鱼(*Acipenser transmontanus*)和雅罗鱼(*Cyprinella spiloptera*)线粒体控制区的终止相关序列 TAS 和保守序列 CSB1、CSB2、CSB3。Liu 等^[10] 识别了鲤形目(Cypriniformes) 2 种鳅科(Cobitiae)鱼类及 6 种亚口鱼科(Catostomidae)鱼类的保守序列

ETAS1、CSB-D、CSB-F、CSB-E、CSB-1、CSB-2 和 CSB-3。线粒体控制区中保守序列的存在,暗示具有一定程度的功能约束,其主要与线粒体 DNA 的复制及转录的起始有关^[11]。一般认为在线粒体基因组中控制区部分变异速率最快^[5, 12-13],因此 D-loop 被认为相对线粒体 DNA 细胞色素 *b* (cytochrome *b*, Cyt *b*) 等编码基因,更适于种内或近缘种水平种群遗传结构及系统地理分析^[14-15]。然而,随着多种动物线粒体基因组测序的完成及相关分析工作的开展,在鱼类、两栖类、鸟类、哺乳类中均发现线粒体基因组中控制区部分变异速率低于线粒体细胞色素 *b* 等编码基因的现象^[16-21]。

太湖新银鱼(*Neosalanx taihuensis*)为我国重要经济鱼类,目前自然资源严重下降,急需找出原因并进行保护。D-loop 和 Cyt *b* 同为线粒体基因组中进化较快的片段,动物线粒体 Cyt *b* 作为蛋白质编码基因,一般认为进化上符合分子钟或近似(松弛)分子钟假设,可以用来估计该物种与其近缘种谱系分化及其他相关地质历史事件发生的时间。D-loop 作为非功能约束序列,大多数动物 D-loop 片段进化速率高于 Cyt *b* 片段,但也有相反的例子^[5, 12-13, 16-21]。太湖新银鱼线粒体 Cyt *b* 序列及 D-loop 片段结构及变异情况的研究尚未见报道,为此我们初步研究了新银鱼线粒体 D-loop 的结构,并以太湖新银鱼线粒体编码基因 Cyt *b* 序列为参照,比较了太湖新银鱼线粒体 D-loop 与 Cyt *b* 基因的相对进化速率,为后续相关研究(如种群遗传结构、分子系统地理等)选择合适的分子标记提供依据,以促进太湖新银鱼及相关近缘种保护遗传学研究的有效开展。

1 材料与方法

1.1 实验材料 实验样本为淮河流域 2 个种群的 49 个太湖新银鱼样本,其中 25 个样本来自洪泽湖(东经 118°42′12″,北纬 33°16′20″),24 个样本来自城东湖(东经 116°22′57″,北纬 32°18′41″),所采集的完整银鱼样本清洗后置于 250 ml 采样瓶中,加入适量的 95% 乙醇保存。

1.2 基因组总 DNA 提取、目的片段扩增、纯化及测序 取保存的太湖新银鱼样本背部肌肉 100 mg 左右切碎,置于 1.5 ml 离心管中,常规 SDS 蛋白酶 K 消化,使用酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提 3 次,乙醇沉淀获得基因组总 DNA。太湖新银鱼线粒体 Cyt b 前端扩增引物为 LI4321:5′-CAGTGACTTGAAAAACCG-3′,后端扩增引物为 H15634:5′-CTTAGCTTTGGGAGTTAAGGGT-3′。太湖新银鱼线粒体 D-loop 片段前端扩增引物为 L050801:5′-CCATCGCTGACACCGCCAGA-3′,后端扩增引物 H050801:5′-ACAGTGGCAGCGCAATGAT-3′。PCR 反应体系均为:10 × buffer 5 μl,10 mmol/L dNTPs 0.5 μl,前/后引物各 0.5 μmol/L,Taq 酶 1.25 U,以及模板 DNA 0.5 ~ 5 ng,加超纯水至 50 μl。PCR 反应条件为:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 45 s,56℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 45 min,共 30 ~ 35 个循环;最后 72℃ 延伸 7 min。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测,纯化试剂盒(UltraClean Agarose Gel DNA Purification Kit,MO BIO Laboratories, Inc)纯化后,送交北京华大生物技术有限公司测序,所用测序引物与 PCR 扩增引物相同。

1.3 数据分析 序列的比对、拼接使用 Clustal X^[22] 或 DNASTar 软件。控制区不同结构区的划分综合参照哺乳动物^[4, 23]、鱼类^[8-10, 24-25]的方法。用 MEGA 4^[26] 求得碱基组成变异位点数、碱基替换数等基本数据,并计算碱基偏倚性^[27]。最适合的 DNA 替代模型用嵌套似然率检验法由 Modeltest 3.06^[28] 给出。

重复序列区域具有与其他部分不同的进化

机制^[29],因此在进行太湖新银鱼线粒体 D-loop 与细胞色素 b 基因的进化速率的比较时,删去了相应的重复序列。太湖新银鱼线粒体 D-loop 与 Cyt b 基因的相对进化速率的比较,采用基于贝叶斯(Bayes)马尔可夫链蒙特卡罗(MCMC)方法,假定 Cyt b 基因的平均进化速率的相对值为 1,模拟 D-loop 基因的序列的相对速率及后验概率分布。运行 10 000 000 步链,前 1 000 000 步作为 burn-in 期,然后每 1 000 步取样一次,用 Tracer v1.4^[30] 分析运行结果并绘制相对速率的后验概率分布图。

2 结果与讨论

实验共获得 49 个太湖新银鱼样本的线粒体 Cyt b 全序列和 D-loop 部分序列。线粒体 Cyt b 全序列长度为 1 141 bp,参照 Zhang 等^[31]的标准,未发现假基因。所测线粒体 D-loop 部分序列长度变化范围为 648 ~ 680 bp,包括了鱼线粒体 DNA 控制区的前端终止相关序列区全部、中间保守区全部及后端保守序列区小部分(见附录)。D-loop 部分序列比对结果获得 26 种单元型。所获太湖新银鱼 DNA 控制区部分序列中识别到位于前端的一个串联重复序列、一个终止相关序列(ETAS),3 个中央保守区保守序列(CSB-F、CSB-E、CSB-D)及一个保守序列区保守序列(CSB-I)。

终止相关序列区因含有与 DNA 复制终止相关的序列而得名。太湖新银鱼的终止序列区长度约在 268 ~ 300 bp 之间。在此区段发现一段保守的终止结合序列 TAS(TACATA),对比其他鱼类中的保守序列,在终止序列区识别了 ETAS1 这一保守序列,其序列为 TACATATATGCCTTTAAACA AACTATGTA,与 Liu 等^[30]在鲤形目部分鱼类、Zhao 等^[25]在鳊鱼(*Siniperca kneri*)中识别出的序列有所不同。太湖新银鱼终止相关序列区 5′ 端为一串联重复序列,这段重复序列包含 10 个碱基(CTGCGCCACA)的完整重复单元及插入和缺失。在哺乳类、鸟类、爬行类、两栖类和鱼类等脊椎动物线粒体 D-loop 区域均发现有串联重复序列^[8, 32-35],这些重复

序列主要位于控制区的 ETAS 区和中央保守区之间^[62-33],或者是位于 CSB-2 之前^[64-35]及 CSB-3 之后^[68],但本研究结果发现串联重复序列位于终止相关区 5' 端的现象尚未见报道,相关功能有待进一步研究。

控制区的中央保守区是最为保守的区域。Southern 等^[66]首次在哺乳动物中识别了 mtDNA 控制区中央保守区中的 CSB-A、CSB-B、CSB-C、CSB-D、CSB-E、CSB-F,在大多鱼类线粒体 D-loop 中央保守区中仅识别了 CSB-D、CSB-E 和 CSB-F^[25, 37-40]。太湖新银鱼 D-loop 中央保守区长度为 330 bp,其中只有 3 个保守序列被识别出来,近 5' 端的是 CSB-F,其普遍形式为:ATGCGCAGTAAGAACCGACCA。紧接其后的是 CSB-E 和 CSB-D,它们的序列分别为:AGGGACAATAATCGTGGGGG 和 CTATTCCTGGCATTGTTGTTCTATTTTCAG。在太湖新银鱼 D-loop 中央保守区中未发现 CSB-A、CSB-B、CSB-C 相似序列,与上述鱼类方面的研究结果相似。

虽然重复序列标记信息已被研究者用于鲤形目部分鱼类^[60],3 种鲈鱼(黄金鲈 *Perca fluviatilis*、翘鲈 *Acerina cernua*、梭鲈 *Stizostedion lucioperca*)^[64],鲟鱼^[61]等谱系关系的分析,但由于不同拷贝重复序列的存在往往造成测序及比对困难,同时,重复序列区域可能具有与其他部分不同的进化机制^[69],因此限制了该部分序列信息在种群历史研究中的应用。在进行太湖新银鱼线粒体 D-loop 与 Cyt *b* 基因的相对进化速率的比较时,我们删去了相应的重复序列。

不包括 5' 端终止相关区(ETAS)重复序列区部分,太湖新银鱼 D-loop 序列其余 600 个碱基组成及变异分析结果见表 1,A、T、C、G 的平均含量为 32.5%、31.7%、20.5%、15.3%。A + T 的含量(64.2%)明显高于 C + G 的含量(35.8%),明显与线粒体 Cyt *b* 部分碱基组成不同。与其他鱼类 D-loop 部分 A、T 含量高,C、G 含量低的特点相似^[24, 41]。比较 D-loop 各区段的碱基组成情况,从所获得的终止相关区和中央保守区的碱基组成可以看出:A 的平均含

量在终止序列区(39.9%)显著高于中央保守区(27.8%),这与一般认为的终止序列区和保守序列区的 A 的含量应明显高于中央保守区的观点^[6, 24, 41]是一致的。中央保守区中 G 的含量(18.7%)明显高于终止序列区(9.8%)。

研究发现,所获得 D-loop 序列总的序列多态性位点的比例为 0.83%,低于线粒体 Cyt *b* 片段总的序列多态性位点的比例(1.31%),但简约信息位点的比例线粒体 D-loop 与 Cyt *b* 基因基本相等,分别为 0.67% 及 0.61%。D-loop 基因在终止相关序列区(ETAS)多态性位点的比例较高(1.48%),中央保守区(CD)多态性位点的比例较低(0.56%),这说明终止序列区变异较大,中央保守区较为保守。线粒体 Cyt *b* 部分突变主要发生在第一位和第三位密码子位置上,与其他脊椎动物的研究结果^[62-43]相似。D-loop 大多突变出现在简约信息位点,与此不同的是,线粒体 Cyt *b* 的大多突变为发生在非简约信息位点上的单碱基随机突变(表 1)。假定 Cyt *b* 基因的平均进化速率的相对值为 1,贝叶斯(Bayes)MCMC 模拟给出 Cyt *b* 基因的相对速率为 1.000 ± 0.131 ,而 D-loop 基因的相对速率为 0.859 ± 0.261 ,表明太湖新银鱼 D-loop 基因的平均进化速率低于 Cyt *b* 基因,同时变异方差也比较大。太湖新银鱼 Cyt *b* 基因及 D-loop 基因进化速率的后验概率分布(图 1)直观地显示了上述结果。

本研究所涉及的 D-loop 基因片段简约信息位点的比例与 Cyt *b* 基因基本相等,但序列多态性位点的比例低于线粒体 Cyt *b* 基因的多态性位点的比例。同时,基于贝叶斯(Bayes)MCMC 方法的太湖新银鱼线粒体 D-loop 与 Cyt *b* 基因的相对进化速率的比较结果表明,太湖新银鱼 D-loop 基因的进化速率低于 Cyt *b* 基因,同时变异方差也比较大(图 1),说明对于太湖新银鱼来说,Cyt *b* 基因片段比 D-loop 基因片段具有相对较高的进化速率,也相对更接近近似分子钟假设。因此,可以认为 Cyt *b* 标记比 D-loop 片段更适于太湖新银鱼种内分子系统地理格局及近缘种间比较系统地理格局的研究。

表 1 太湖新银鱼线粒体 D-loop 及 Cyt b 碱基组成及变异分析

Table 1 Composition and variability of the analyzed mtDNA of <i>Neosalanx taihuensis</i>										
基因片段 Region	位点 Sites	NS	A (%)	C (%)	G (%)	T (%)	NPS (%)	NIS (%)	Model	Ts/Tv
细胞色素 <i>b</i> Cyt <i>b</i>	合计 Total	1 141	21.0	33.6	17.4	28.0	15 (1.31)	7 (0.61)	F81	7.8
	第一密码子 1st code	381	21.8	26.6	27.3	24.4	6 (1.57)	4 (1.05)		
	第二密码子 2nd code	380	20.3	23.4	13.4	42.9	3 (0.79)	0		
	第三密码子 3rd code	380	21.1	50.7	11.6	16.6	6 (1.58)	3 (0.79)		
	多态位点 Polymorphic	15								
控制区 D-loop	合计 Total	600	32.5	20.5	15.3	31.7	5 (0.83)	4 (0.67)	F81	8.6
	终止相关区 ETAS	203	39.9	20.7	9.8	29.6	3 (1.48)	2 (0.99)		
	中央保守区 CD	359	27.8	21.2	18.7	32.3	2 (0.56)	2 (0.56)		
	多态位点 Polymorphic	5								

NS: 比对碱基位数; NPS: 多态位点数及百分比; NIS: 简约信息位数及百分比; Model: 进化模型; Ts/Tv: 转换颠换比。
NS: Number of sites of aligned sequences, except in the VNTRs; NPS: Number and percent of polymorphic sites; NIS: Number and percent of parsimony informative sites; Model: hLRT-estimated model of sequence evolution; Ts/Tv: Estimated transition/transversion (Ts/Tv) ratio.

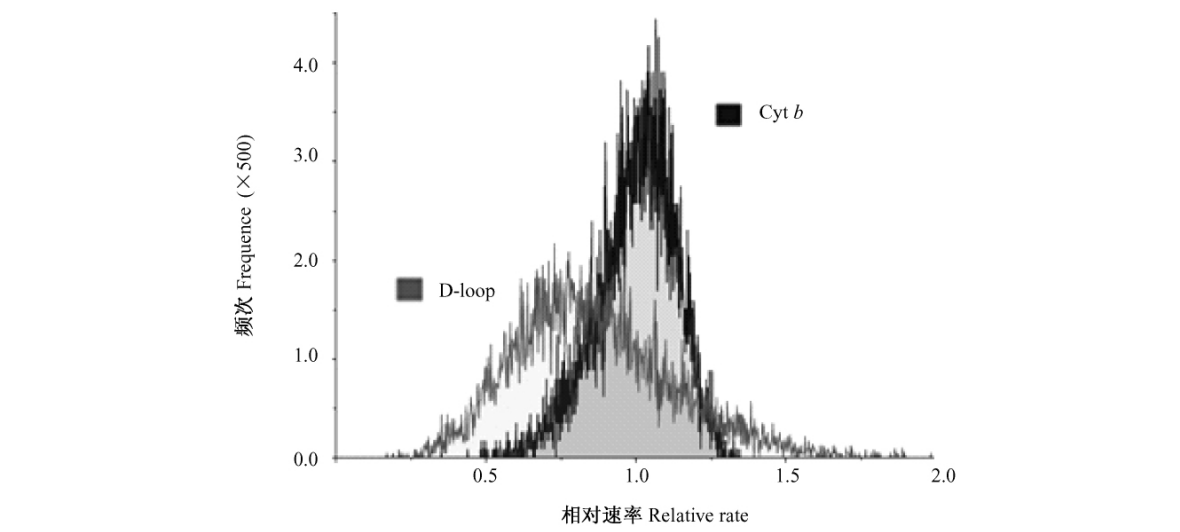


图 1 线粒体 D-loop 与 Cyt b 进化速率后验概率分布

Fig. 1 The plots of the posterior density of the rates of Cyt *b* and D-loop

参 考 文 献

- [1] Saccone C, Carla D G, Carmela G, et al. Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene*, 1999, 238(1):195–209.
- [2] Pereira S L. Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. *Genet Mol Biol*, 2000, 23: 745–752.
- [3] Rest J S, Ast J C, Austin C C, et al. Molecular systematics of primary reptilian lineages and the tuatara mitochondrial genome. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2003, 29(2): 289–297.
- [4] Sbis E, Tanzariello F, Reyes A, et al. Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene*, 1997, 205(1/2): 125–140.
- [5] 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.
- [6] Zardoya R, Meyer A. Cloning and characterization of a microsatellite in the mitochondrial control region of the African side-necked turtle, *Pelomedusa subrufa*. *Gene*, 1998, 216(1):149–153.
- [7] SanMauro D, García-París M, Zardoya R. Phylogenetic relationships of discoglossid frogs (Amphibia: Anura: Discoglossidae) based on complete mitochondrial genomes and nuclear genes. *Gene*, 2004, 343(2):357–366.
- [8] Buroker N E, Brown J R, Gilbert T A, et al. Length heteroplasmy of Sturgeon mitochondrial DNA: An illegitimate elongation model. *Genetics*, 1990, 124(1): 157–163.
- [9] Broughton R E, Dowling T E. Length variation in mitochondrial DNA of the Minnow *Cyprinella spiloptera*. *Genetics*, 1994, 138(1):179–190.
- [10] Liu H Z, Tzeng C S, Teng H Y. Sequence variations in the mitochondrial DNA control region and their implications for the phylogeny of the Cypriniformes. *Can J Zool*, 2002, 80:569–581.
- [11] Taanman J W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA): Bioenergetics*, 1999, 1410(2): 103–123.
- [12] Aquadro C F, Greenberg B D. Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics*, 1983, 103(2):287–312.
- [13] Cann R L, Brown W M, Wilson A C. Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA. *Genetics*, 1984, 106(3):479–499.
- [14] Avise J C, Arnold J, Ball R M, et al. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1987, 18:489–522.
- [15] Baker A J, Marshall H D. Mitochondrial control region sequences as tools for understanding evolution//Mindell D P. *Avian Molecular Systematics*. San Diego, Calif: Academic Press, 1987, 51–82.
- [16] Shedlock A M, Parker J D, Crispin D A, et al. Evolution of the salmonid mitochondrial control region. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1992, 1(3):179–192.
- [17] Randi E, Lucchini V. Organization and evolution of the mitochondrial DNA control region in the avian genus *Alectoris*. *Journal of Molecular Evolution*, 1998, 47(4): 449–462.
- [18] Crochet P A, Desmarais E. Slow rate of evolution in the mitochondrial control region of Gulls (Aves: Laridae). *Mol Biol Evol*, 2000, 17(12):1797–1806.
- [19] Pereira S L, Grau E T, Wajntal A. Molecular architecture and rates of DNA substitutions of the mitochondrial control region of cracid birds. *Genome*, 2004, 47:535–545.
- [20] Samuels A K, Weisrock D W, Smith J J, et al. Transcriptional and phylogenetic analysis of five complete ambystomatid salamander mitochondrial genomes. *Gene*, 2005, 349:43–53.
- [21] Bernatchez L, Danzmann R G. Congruence in control-region sequence and restriction-site variation in mitochondrial DNA of Brook Charr (*Salvelinus fontinalis* Mitchill). *Mol Biol Evol*, 1993, 10(5):1002–1014.
- [22] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl Acids Res*, 1997, 25(24):4876–4882.
- [23] Hixson J E, Clayton D A. Initiation of transcription from each of the two human mitochondrial promoters requires unique nucleotides at the transcriptional start sites. *PNAS*, 1985, 82(9):2660–2664.
- [24] Nesbo C L, Arab M O, Jakobsen K S. Heteroplasmy, length and sequence variation in the mtDNA control regions of three Percid fish species (*Perca fluviatilis*, *Acerina cernua*, *Stizostedion lucioperca*). *Genetics*, 1998, 148(4):1907–1919.
- [25] Zhao J L, Wang W W, Li S F, et al. Structure of the mitochondrial DNA control region of the Siniperine Fishes and their phylogenetic relationship. *Acta Genetica Sinica*, 2006, 33(9):793–799.
- [26] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(8):1596–1599.
- [27] Irwin D, Kocher T, Wilson A. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *J Mol Evol*, 1991, 32:

128 – 144.

[28] Posada D, Crandall K A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 1998, 14 (9) :817 – 818.

[29] Goricki S, Trontelj P. Structure and evolution of the mitochondrial control region and flanking sequences in the European cave salamander *Proteus anguinus*. *Gene*, 2006, 378:31 – 41.

[30] Rambaut A, Drummond A. Tracer v1. 4 [CP/OL]. Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>. 2007.

[31] Zhang D X, Hewitt G M. Nuclear integrations challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends of Ecology and Evolution*, 1996, 11:247 – 251.

[32] 张四明, 吴清江, 张亚平. 中华鲟及相关种类的 mtDNA 控制区串联重复序列及其进化意义. *生物化学与分子生物学报*, 2000, 16 (4) :458 – 461.

[33] 彭巧玲, 蒲友光, 王志方, 等. 中华鲟线粒体基因组序列分析. *生物化学与分子生物学报*, 2005, 21 (5) :591 – 596.

[34] Árnason Ú, Johnsson E. The complete mitochondrial DNA sequence of the harbor seal, *Phoca vitulina*. *Journal of Molecular Evolution*, 1992, 34 (6) :493 – 505.

[35] Arnason U, Gullberg A, Janke A, et al. Pinniped phylogeny and a new hypothesis for their origin and dispersal. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2006, 41 (2) :345 – 354.

[36] Southern S, Southern P, Dizon A. Molecular characterization of a cloned dolphin mitochondrial genome. *Journal of Molecular Evolution*, 1988, 28 (1) :32 – 42.

[37] Lee J S, Miya M, Lee Y S, et al. The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of the self-fertilizing fish *Rivulus marmoratus* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) and the first description of duplication of a control region in fish. *Gene*, 2001, 280 (1/2) :1 – 7.

[38] 曾青兰, 刘焕章. 大口胭脂鱼线粒体 DNA 控制区序列的研究. *湖北大学学报: 自然科学版*, 2001, 23 (3) : 261 – 264.

[39] 刘焕章. 鱼类线粒体 DNA 控制区的结构与进化: 以鳊鲃鱼类为例. *自然科学进展*, 2002, 12 (3) :266 – 270.

[40] 郭新红, 刘少军, 刘巧, 等. 鱼类线粒体研究新进展. *遗传学报*, 2004, 31 (9) :983 – 1000.

[41] Arne L, Bernie M, Lutz D, et al. Heteroplasmy in the mtDNA control region of Sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*). *Genetics*, 2000, 156 (4) : 1933 – 1947.

[42] Wolstenholme D R. Animal mitochondrial DNA: Structure and evolution//Wolstenholme D R, Jeon K W. *International Review of Cytology: Mitochondrial Genomes*. San Diego, CA: Academic Press, 1992, 173 – 216.

[43] Nei M, Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford: Oxford University Press, 2000, 29 – 42.

Appendix Sequence and structure of the mitochondrial DNA control region

[illegible]

ETAS1

[illegible]

[illegible]

CSB-D

CSB-E

CSB-F

附录 接上页

[illegible]

