

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00935

基于 rDNA ITS 序列分析莲塘湖萼花臂尾轮虫两种形态型的分类地位

张晋艳 席贻龙 马 芹 项贤领

(安徽师范大学生命科学学院, 安徽省高校生物环境与生态安全省级重点实验室, 芜湖 241000)

摘要: 轮虫的周期变形是指种群内出现的轮虫形态随时间推移而发生的周期性变化, 包括轮虫个体大小的变化、轮虫后棘刺或后侧棘刺的有无及长度的变化等。广泛存在的周期变形使轮虫的分类更加复杂。利用分子标记对不同形态型轮虫的遗传分化进行研究将有助于正确认识它们的分类地位。为此, 研究对采自芜湖市莲塘湖水体中萼花臂尾轮虫(*Brachionus calyciflorus*) 30 个有棘刺型(Spined morphotype)的克隆(S1-S30)和 18 个无棘刺型(Unspined morphotype)的克隆(U1-U18)进行了 rDNA ITS 序列分析; 以十指臂尾轮虫(*B. patulus*) 为外群, 构建了 48 个克隆的系统发生树(NJ、MP、ML 和贝叶斯树)。结果表明, 所测 48 个克隆共包括 16 个单元型。在 ITS 序列中, T、C、A、G 碱基的平均含量分别为 28.6%、18.7%、35.9%、16.8%, 其中 A+T 含量为 64.5%, C+G 含量为 35.5%。单元型 U12 与其他单元型间的序列差异百分比为 26.2%—26.6%, 平均为 26.47%; 其中, 发生在 ITS1、5.8S 和 ITS2 区间的序列差异百分比分别为 26.9%—27.8%、2.9%—3.5%和 44.4%—45.0%, 平均依次为 27.27%、3.09%和 44.48%。而其他单元型间平均序列差异百分比为 0.41%。4 个系统树均支持将 48 个克隆分为 2 个支系: 无棘刺型克隆 U12 独成一支, 无棘刺型的其余克隆与所有有棘刺型克隆构成另一支系。单元型 U12 与其他单元型应分别属于两个不同的姐妹种; 但两种形态型并非不同的亚种或互为姐妹种, 它们间的形态差异主要由表型可塑性引起。

关键词: 萼花臂尾轮虫; 形态型; rDNA ITS 序列; 表型可塑性

中图分类号: Q951.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)05-0935-08

与其他生物相似, 作为各类水体中广泛分布的一类浮游动物, 轮虫也在形态结构和生理机能等方面具有适应其赖以生存的水环境的现象, 其中周期变形(Cyclomorphosis)便是较常见的一种适应现象。轮虫的周期变形是指种群内出现的轮虫形态随时间推移而发生的周期性变化, 包括轮虫个体大小的变化、轮虫后棘刺或后侧棘刺的有无及长度的变化等^[1], 变化所形成的各种形态被称为形态型(Morphotypes)。周期变形在轮虫中普遍存在, 其中臂尾轮属(*Brachionus*)、龟甲轮属(*Keratella*)和晶囊轮属(*Asplanchna*)等轮虫以其周期变形特征明显而格外引人关

注。周期变形使轮虫的分类更加复杂^[2], 给轮虫种群动态和群落结构等研究带来了严峻的挑战。

萼花臂尾轮虫(*B. calyciflorus*)是广泛分布于各类淡水水体中的常见轮虫种类之一。它是一个形态上变化很大的物种, 其变化主要表现在个体大小、背甲前端中央棘刺的长度、后棘刺和后侧棘刺的有无和长度等方面^[3,4]。前人曾根据萼花臂尾轮虫形态的变化情况将其分为无棘萼花臂尾轮虫(*B. calyciflorus dorcas* Gosse)和双棘萼花臂尾轮虫(*B. calyciflorus amphiceros* Ehrenberg)等亚种^[5], 但各亚种在分类上是否成立、各亚种间的遗传分化程度如

收稿日期: 2009-07-10; 修订日期: 2010-04-26

基金项目: 国家自然科学基金(30770352, 30499341); 安徽省优秀青年基金(08040106904); 安徽省高校生物环境与生态安全省级重点实验室专项基金(2004sys003); 重要生物资源保护和利用研究安徽省重点实验室专项基金项目资助

作者简介: 张晋艳(1984—), 女, 山西省洪洞县人; 硕士研究生; 主要从事浮游动物生态学。E-mail: zhangjinyan415@126.com

通讯作者: 席贻龙, E-mail: ylx1965@yahoo.com.cn

何仍无从知晓。近几年来,随着分子生物学的发展,人们已经发现有棘刺型和无棘刺型的螺形龟甲轮虫(*K. cochlearis*)是不同的姐妹种^[6]。因此,利用分子标记对不同形态型的萼花臂尾轮虫遗传分化进行研究将有助于我们正确认识它们的分类地位。

真核生物的 *ITS* 序列为 rRNA 基因(rDNA)串联重复单位内不具转录功能的间隔区^[7],由于承受的选择压力小、进化速率快已被广泛用于轮虫种间、同种的不同地理居群和不同品系间分子系统发育关系研究^[8-12]。为此,本文对芜湖市莲塘湖中两种形态型萼花臂尾轮虫的 rDNA *ITS* 序列进行了比较研究,探讨了它们之间的遗传分化程度和分类地位。

1 材料与方法

1.1 轮虫的来源与培养

实验用萼花臂尾轮虫于 2007 年春季采自芜湖市莲塘湖。采样后,随机挑取带卵的、无后侧棘刺和有后侧棘刺两种形态型的轮虫非混交雌体,实验室内于(25±1)℃、自然光照(光照强度约 130 lx, L:D=14:10)条件下进行“克隆”培养。轮虫培养液采用参考文献[3]配方(pH 7.3),所用的饵料为 HB-4^[13]培养基培养的、处于指数增长期的斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*);最终建立了有后侧棘刺型的轮虫 30 个克隆(编号为 S1-S30)和无后侧棘刺型的轮虫 18 个克隆(编号为 U1-U18)。当各“克隆”轮虫的个体数达 1000 只以上时用轮虫培养液过滤冲洗,饥饿 24h 后用灭菌双蒸水冲洗, Eppendorf 管收集, -20℃ 保存备用。

1.2 轮虫总 DNA 的提取

用玻璃粉法^[14]提取基因组 DNA。

1.3 PCR 扩增及序列测定

ITS 基因的扩增反应在 MJ Research 公司生产的 PTC-100TM 扩增仪上进行,其扩增引物 LH2 为: 5'-GTCGAATTCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA-3', Dlam 为: 5'-CCTGCAGTCGACA(TG)ATGCTTAA(AG)TTCAGC(AG)GG-3'^[9], 于上海生工生物工程技术服务有限公司合成;其他试剂均购于上海生工生物工程技术服务有限公司。PCR 反应体系的总体积均为 50 μL, 包括 1×Buffer, 0.2 mmol/L dNTPs, 1.5 μmol/L 引物, 2 mmol/L Mg²⁺, DNA 模板 4 μL, 1 U 的 *Taq* 酶, 超纯水补至 50 μL。 *ITS* 序列扩增反应程序如下: 94℃ 预变性 5min; 94℃ 变性 1min, 55℃ 退火

1.5min, 72℃ 延伸 2min, 共 35 个循环;最后 72℃ 延伸 10min; 4℃ 保存。所有扩增产物均用 EZ-10 Spin Colum PCR 产物纯化试剂盒(上海生工生物工程技术服务有限公司)纯化,将纯化产物与质粒载体连接,质粒载体为 pMD18-T Vector, 按文献《分子克隆实验指南(第三版)》进行操作。用 Qiagen 公司的质粒提取试剂盒提取所要的克隆子质粒 DNA, ABI PRISM 377 型自动测序仪进行序列测定。

1.4 DNA 序列数据分析

使用 CLUSTAL X(1.8)软件^[15]进行 DNA 序列比对,用 DNASTAR 软件计算两两序列的差异百分比,再用 MEGA(version 3.1)软件^[16]计算不同序列间转换与颠换比。基因突变是否饱和采用 DAMBE 软件^[17]分析。构建系统树时,以十指臂尾轮虫(*B. patulus*)为外群,其 *ITS* 序列来自于 Xiang, et al.^[11]。使用 Modeltest 3.7^[18]检验数据并找出最适的参数模型。使用 PAUP 4.0b10 软件,经渐进式搜索(Heuristic research method)以邻接法(Neighbor-Joining method, NJ)、最大简约法(Maximum-Parsimony, MP)和最大似然法(Maximum-Likelihood, ML)构建系统发生树。NJ 树和 MP 树各结点的支持率以序列数据集 1000 次重复抽样检验的自引导值(Bootstrap value)表示;ML 树各结点的支持率以序列数据集 100 次重复抽样检验的自引导值表示。

用 MrBayes 3.1.2^[19] 软件构建贝叶斯树(Bayesian Tree)。依据 *ITS* 序列重建系统树时替换模型参数设置为 *nst*=6 (TVM 模型),位点速率变异设置为 *rates*=equal,同时建立 4 个马尔代夫链(Markov chain),以随机树为起始树,共运行 300000 代,每 100 代一次,重复两次。在舍弃老化样本后,根据剩余的样本构建一致树,并计算相关参数。

2 结 果

2.1 DNA 序列特征

所测 48 个样品(克隆)共包括 16 个单元型(表 1);其中,克隆 U1、U3、U4、U7、U8、U10、U11、U12、U14、U16、S3、S15、S23 和 S27 为互不相同的单元型,而克隆 U2、U15、U17、S1、S4、S6、S7、S9、S12、S14、S17、S24、S25、S26 和 S28 为一相同的单元型(标记为 HAP1),克隆 U5、U6、U9、U13、U18、S2、S5、S8、S10、S11、S13、S16、S18、S19、S20、S21、S22、S29 和 S30 为另一相同

的单元型(标记为 HAP2); 这表明萼花臂尾轮虫两种形态型间有共享单元型。核苷酸组成分析显示, *ITS* 序列中 T、C、A、G 碱基的平均含量分别为 28.6%、18.7%、35.9%、16.8%, 其中 A+T 含量(64.5%)丰富, 明显大于 C+G 含量(35.5%)。

表 1 16 个单元型的基因序列登录号

Tab. 1 GenBank accession numbers for rDNA *ITS* gene sequences of 16 haplotypes

单元型 Haplotype	基因序列登录号 GenBank accession number
U1	EU978867
HAP1: U2、U15、U17、S1、 S4、S6、S7、S9、S12、S14、 S17、S24、S25、S26、S28	EU978873
U3	EU978874
U4	EU978875
HAP2: U5、U6、U9、U13、 U18、S2、S5、S8、S10、S11、 S13、S16、S18、S19、S20、 S21、S22、S29、S30	EU978876
U7	EU978877
U8	EU978878
U10	EU978868
U11	EU978869
U12	EU978870
U14	EU978871
U16	EU978872
S3	EU978866
S15	EU978863
S23	EU978864
S27	EU978865

经 CLUSTAL X(1.8)比对, 在 836 个位点中[其中克隆 U12 的 *ITS* 序列长度为 831 bp, 比其他克隆的 *ITS* 序列(761 bp)长 70 bp], 共发现 152 个变异位点(表 2), 多态位点 232 个, 简约信息位点 3 个。836 bp 中, 1—315 bp 为 *ITS1* 序列, 316—493 bp 为 5.8 S 序列, 494—836 bp 为 *ITS2* 序列。152 个变异位点中, *ITS1* 中有 68 个, 5.8S 中有 12 个, *ITS2* 中有 72 个。用 MEGA(version 3.1)软件分析碱基的转换与颠换比, 结果显示萼花臂尾轮虫两种形态型的所有样品的转换与颠换之比平均为 0.72。从遗传距离及转换、颠换数散点饱和图(图 1)中可以看出, 随着遗传距离的增加, 转换和颠换数均伴有线性增加, 未出现饱和现象。

经 DNASTAR 软件分析, 萼花臂尾轮虫不同单元型间序列差异百分比为 0.1%—26.6%, 平均为

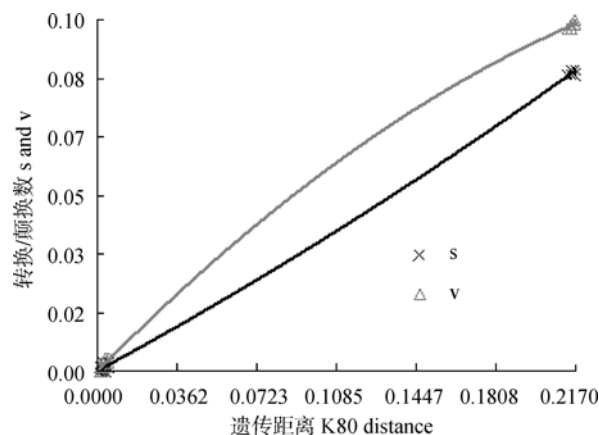


图 1 转换、颠换数对遗传距离的关系

Fig. 1 The relationship of the genetic distance vs. the numbers of transition and transversion

3.59%。U12 与其他单元型间的序列差异百分比为 26.2%—26.6%, 平均为 26.47%(表 2); 其中, 发生在 *ITS1*、5.8S 和 *ITS2* 区间的序列差异百分比分别为 26.9%—27.8%、2.9%—3.5%和 44.4%—45.0%, 平均依次为 27.27%、3.09%和 44.48%(图 2)。而其他单元型间平均序列差异百分比为 0.41%(表 2); 这表明 U12 与其他单元型间互为姐妹种, 而其他单元型间则不然。

2.2 基于 *ITS* 序列构建的系统发生树

利用 4 种方法(其中构建 ML 树采用的是 TVM 模型)构建的 16 个单元型的系统发生树显示, 除一些分支的置信值存在差异外, 所得 4 种系统树的拓扑结构基本一致(图 3)。4 个系统树均将 16 个单元型分为 2 个支系: 克隆 U12 构成独立的一个支系, 其余 15 个单元型构成另一个支系。结合上述各支系间 *ITS* 基因序列差异, 可以认为 2 个支系应属于 2 个不同的姐妹种; 由于其中的一个姐妹种包括了其余 15 个单元型, 而这 15 个单元型包括了 47 个具有两种形态型的萼花臂尾轮虫克隆, 因此两种形态型的萼花臂尾轮虫并非不同的亚种或互为姐妹种。

3 讨 论

3.1 轮虫姐妹种的分化

与褶皱臂尾轮虫(*B. plicatilis*)等相似^[7,20], 不同地理品系的萼花臂尾轮虫存在着姐妹种的分化^[10], 同一地理区域不同湖泊内以及同一湖泊不同季节内生活的萼花臂尾轮虫也存在着姐妹种的分化^[21,22]。以 rDNA *ITS* 序列为标记, 当该序列差异百分比达 3.8%时, 不同地理品系的萼花臂尾轮虫已分化为姐

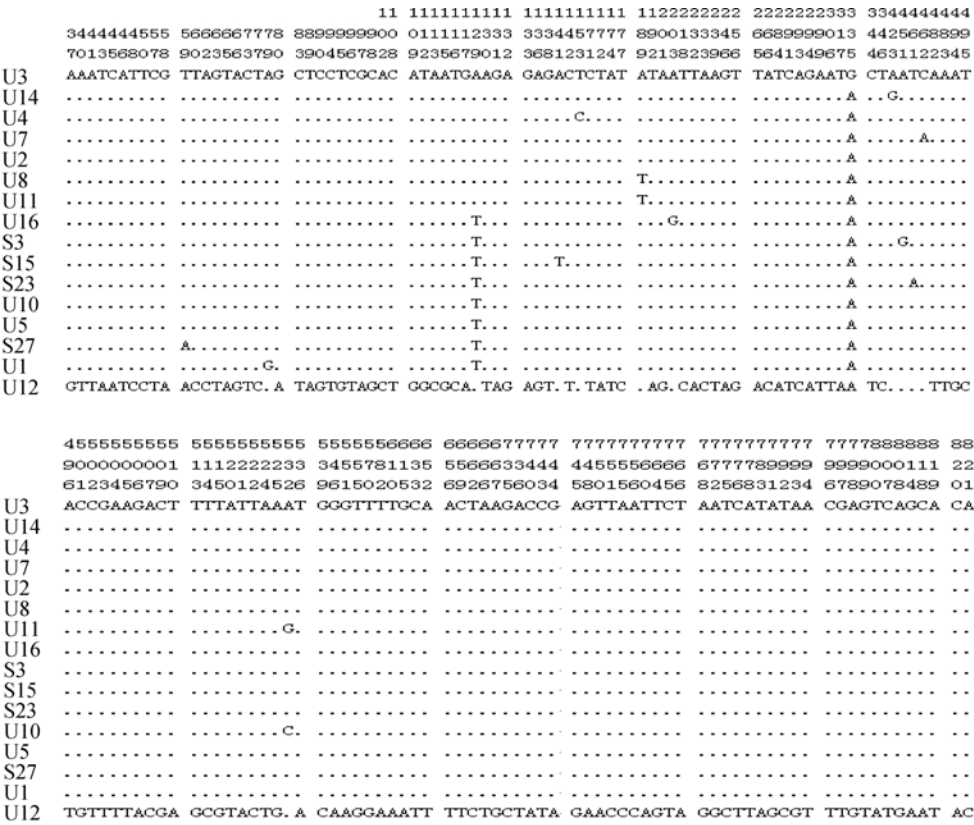


图 2 16 个单元型 rDNA ITS 序列的核苷酸序列变异位点
Fig. 2 Variable sites of rDNA ITS gene sequences in 16 haplotypes

表 2 16 个单元型 ITS 序列转换/颠换比(对角线上)及差异百分比(对角线下)

Tab. 2 The ratio of conversions and transversions (above diagonal) and percentage of divergence (below diagonal) for ITS sequences in 16 haplotypes

编号 Number	U1	HAP1	U3	U4	HAP2	U7	U8	U10	U11	U12	U14	U16	S3	S15	S23	S27
U1		/	/	1.00	/	1.00	2.00	2.00	2.00	0.50	0.50	0.50	1.00	0.50	2.00	0.95
HAP1	0.3		/	1.00	/	1.00	2.00	2.00	2.00	0.50	0.50	0.50	1.00	0.50	2.00	0.95
U3	0.4	0.1		1.00	/	1.00	2.00	2.00	2.00	0.50	0.50	0.50	1.00	0.50	2.00	0.95
U4	0.4	0.1	0.3		/	/	0.50	0.50	0.50	/	/	/	/	/	0.50	0.92
HAP2	0.1	0.1	0.3	0.3		/	1.00	1.00	1.00	/	/	/	/	/	1.00	0.93
U7	0.4	0.1	0.3	0.3	0.3		/	0.50	0.50	/	/	/	/	/	0.50	0.92
U8	0.4	0.1	0.3	0.3	0.3	0.3		1.00	1.00	0.33	0.33	/	0.50	0.33	1.00	0.93
U10	0.3	0.3	0.4	0.4	0.1	0.4	0.4		/	1.00	1.00	1.00	/	1.00	/	0.93
U11	0.5	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.1	0.4		1.00	1.00	1.00	/	1.00	/	0.93
U12	26.6	26.2	26.4	26.4	26.4	26.4	26.4	26.6	26.6		/	/	/	/	1.00	0.90
U14	0.4	0.1	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4	26.4		/	/	/	1.00	0.90
U16	0.3	0.3	0.4	0.4	0.1	0.4	0.4	0.3	0.5	26.6	0.4		/	/	1.00	0.90
S3	0.3	0.3	0.4	0.4	0.1	0.4	0.4	0.3	0.5	26.6	0.4	0.3		/	/	0.92
S15	0.3	0.3	0.4	0.4	0.1	0.4	0.4	0.3	0.5	26.6	0.4	0.3	0.3		1.00	0.93
S23	0.3	0.3	0.4	0.4	0.1	0.4	0.4	0.3	0.5	26.6	0.4	0.3	0.3	0.3		0.93
S27	0.3	0.3	0.4	0.4	0.1	0.4	0.4	0.3	0.5	26.2	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3	

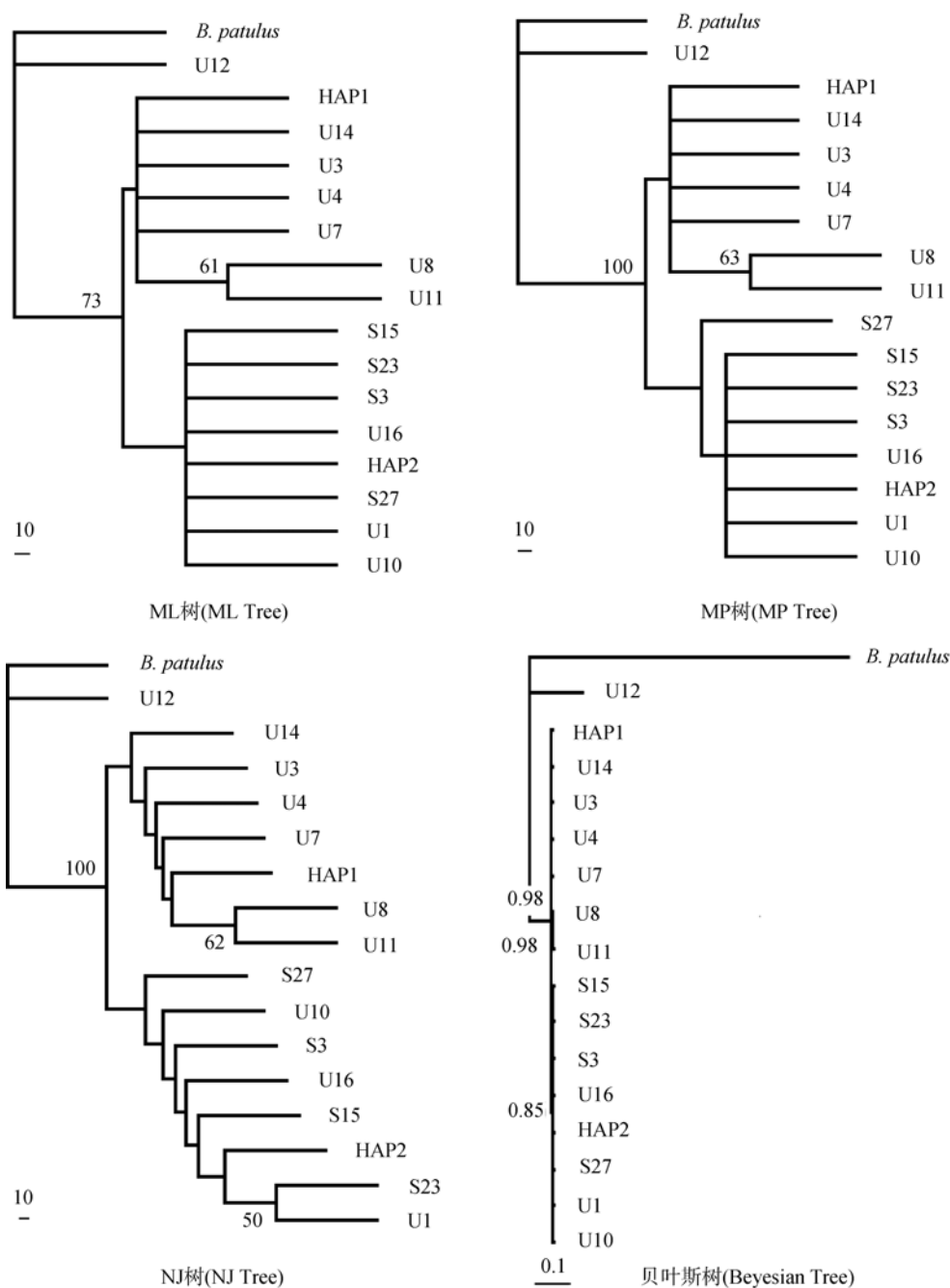


图3 基于 rDNA ITS 序列构建的萼花臂尾轮虫系统发生树(只显示置信度大于 50%的分枝)

Fig. 3 The phylogenetic tree of *B. calyciflorus* based on rDNA ITS sequence (Bootstrap values > 50% were indicated above branches)

妹种^[10]; 而当该序列差异百分比为 5.1%—8.8%时, 萼花臂尾轮虫两季节种群的部分个体间已分化为姐妹种^[21,22]。与其相似的是, 在本研究中, 于同一季节采自莲塘湖的两种形态型的萼花臂尾轮虫克隆中, 无棘刺型克隆 U12 的 ITS 序列与其他克隆的 ITS 序列差异达到 26.47%。因此, 它们应属于不同的姐妹种; 但两种形态型的萼花臂尾轮虫并非互为姐妹种,

这与冷淡龟甲轮虫(*K. hiemalis*)单侧棘刺型和双侧棘刺型间没有出现姐妹种的分化相一致, 而与有棘刺型和无棘刺型的螺形龟甲轮虫互为姐妹种的结论不同^[5]。

在本研究中, 18 个无棘刺型克隆中只有 U12 克隆为另一姐妹种。该克隆在所研究的全部克隆中所占的比例为 1/48, 这与程新峰等有关莲塘湖夏季和

秋季水体中相对丰度较低的萼花臂尾轮虫姐妹种所占的比例分别为 1/30 和 1/20 的研究结果相似^[22]。张晋艳等基于 16S rRNA 基因序列及其与 rDNA ITS 的联合序列对莲塘湖萼花臂尾轮虫两种形态型的分类地位所作的研究也得出了与此一致的结果^[23]。

3.2 影响轮虫不同形态型产生的因素

由于环境因子和遗传因素均能导致轮虫形态发生较大的变化,所以不同形态型的轮虫的分类地位难以借助形态特征加以界定^[23];分子生物学技术为我们准确界定不同形态型的轮虫的分类地位提供了强有力的工具。有棘刺型和无棘刺型的螺形龟甲轮虫互为姐妹种使人们相信其形态型的产生主要由遗传因素决定,而冷淡龟甲轮虫单侧棘刺型和双侧棘刺型之间无显著的遗传分化提示不同的形态型主要由环境因子利用轮虫的表型可塑性(Phenotypic plasticity)诱导产生^[6]。在本研究中,两种形态型的萼花臂尾轮虫之间无显著的遗传分化也提示其不同的形态型主要由环境因子诱导产生。

有关诱导轮虫不同形态型产生的主要环境因子研究已有一些报道。目前已知,晶囊轮虫及一些浮游甲壳动物的捕食和竞争能诱导一些种类的轮虫形成后(侧)棘刺^[24-28]。诱导作用是由捕食者或竞争者释放的利它信息素(Kairomones)调节的。诱导产生的后(侧)棘刺给捕食者设置了一个障碍,减少了捕食者的捕食^[26]。在本研究中,作者在采样时发现,莲塘湖中萼花臂尾轮虫多为有棘刺型,无棘刺型很少;湖中存在有晶囊轮虫、大量的柴氏秀体蚤(*Diaphanosoma sarsi*)和桡足类幼体,推测莲塘湖中萼花臂尾轮虫有棘刺型的产生一方面是由于受到枝角类和桡足类中的哲水蚤(*Calanus*)等与其竞争食物,另一方面是由于捕食性的晶囊轮虫和剑水蚤(*Cyclops*)等对其施加的捕食作用。

3.3 表型可塑性

表型可塑性是有机体在生物或非生物环境下不同表型的表达能力。Bradshaw^[29]把有机体多样的形态变化归因于发育的不稳定性,并用一个假说即在不同环境中一种基因型可以产生多种表现型对表型可塑性进行解释。以往一直认为单个基因型在不同环境条件下基于对发育和生理过程的调节,产生不同表型,能在一定程度上降低生物有机体在异质生境中所承受的环境压力,维持其适合度;但由于不涉及遗传物质的改变,因而不能够稳定遗传,也不

会对物种的适应性进化产生影响。然而,随着对可塑性变异发生机制及发育途径研究的深入,这个传统的认识面临挑战。有证据表明很多可塑性变异与发育调控基因在不同环境条件下的“可塑性”表达密切相关,并能通过表观遗传(Epigenetic)途径传递给子代;有些可塑性变异还可能通过遗传同化(Genetic assimilation)过程得以固定,从而对个体发育式样、种群遗传组成和结构以及物种的进化潜力等产生显著影响^[30-33]。

参考文献:

- [1] Black R W, Slobodkin L B. What is cyclomorphosis [J]. *Freshwater Biology*, 1987, **18**: 373—378
- [2] Serra M, Galiana A, Gómez A. Speciation in monogonont rotifers [J]. *Hydrobiologia*, 1997, **358**: 63—70
- [3] Gilbert J J. Mictic female production in rotifer *Brachionus calyciflorus* [J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1963, **153**: 113—124
- [4] Hu H Y, Xi Y L, Geng H. Effects of temperature on life history strategies of three strains of *Brachionus angularis* gosse [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(3): 284—288 [胡好远, 席贻龙, 耿红. 温度对三品系角突臂尾轮虫生活史策略的影响. 水生生物学报, 2004, **28**(3): 284—288]
- [5] Koste W. Rotatoria. Die Radertiere Mitteleuropas [M]. Borntraeger, Berlin. 1978, pp 673
- [6] Derry A M, Hebert P D N, Prepas E E. Evolution of rotifers in saline and subsaline lakes: A molecular phylogenetic approach [J]. *Limnology & Oceanography*, 2003, **48**(2): 675—685
- [7] Fellisen R S. Comparative sequence analysis of the 5.8S rDNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa [J]. *Parasitology*, 1997, **115**: 111—119
- [8] Gómez A, Serra M, Carvalho G R, et al. Speciation in ancient cryptic species complexes: evidence from the molecular phylogeny of *Brachionus plicatilis* (Rotifera) [J]. *Evolution*, 2002, **56**(7): 1431—1444
- [9] Tang B P, Zhou K Y, Song D X. Application of sequences of nrDNA ITS to molecular systematics of invertebrates [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2002, **37**(4): 67—73 [唐伯平, 周开亚, 宋大祥. 核 rDNA ITS 序列在无脊椎动物分子系统学研究中的应用. 动物学杂志, 2002, **37**(4): 67—73]
- [10] Xi Y L, Chen Y Q, Zhuge Y, et al. Sequence analysis of rDNA 18S-28S intergenic spacer regions from *Brachionus calyciflorus*, *B. bidentata*, *B. diversicornis* and *B. angularis* in Lake Donghu, China [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*. 2003, **27**(4): 427—430 [席贻龙, 陈月琴, 诸葛燕, 等. 四种臂尾轮虫 rDNA 18S-28S 基因间隔区的序列测定与分析. 水生

- 生物学报, 2003, 27(4): 427—430]
- [11] Gilbert J J, Walsh E J. *Brachionus calyciflorus* is a species complex: mating behavior and genetic differentiation among four geographically isolated strains [J]. *Hydrobiologia*, 2005, 546: 257—265
- [12] Xiang X L, Xi Y L, Hu H Y. Phylogenetic relationships of *Brachionus* rotifers based on rDNA ITS 1 gene sequences [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2006, 52(6): 1067—1074
- [13] Zhang Z S, Huang X F. Study Methods on Freshwater Plankton [M]. Beijing: Science Press. 1991 [章宗涉, 黄祥飞. 淡水浮游动物研究方法. 北京: 科学出版社. 1991]
- [14] Hao J S, Yang Q, Li C X, et al. Molecular phylogeny of Lophotrochozoa based on 18S rRNA gene sequences—with comment on the phylogenetic position of Bryozoa [J]. *Journal of Genetics and Molecular Biology*, 2003, 14(2): 64—72
- [15] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL X multiple sequence alignment program [M]. Version 1.8. 1999
- [16] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5: 150—163
- [17] Xia X H, Xie Z. DAMBE: data analysis in molecular biology and evolution [J]. *Journal of heredity*, 2001, 92: 371—373
- [18] Posada D, Crandall K A. Modeltest: testing the model of DNA substitution [J]. *Bioinformatics*, 1998, 9: 817—818
- [19] Ronquist F, Huelsenbeck J P. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. *Bioinformatics*, 2003, 19: 1572—1574
- [20] Gómez A, Snell T W. Sibling species and cryptic speciation in the *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera) [J]. *Journal of Evolutionary Biology*, 1996, 9: 953—964
- [21] Li H B, Xi Y L, Cheng X F, et al. Sympatric speciation in rotifers: evidence from molecular phylogenetic relationships and reproductive isolation among *Brachionus calyciflorus* clones [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2008, 54(2): 256—264 [李化炳, 席贻龙, 程新峰, 等. 轮虫同域性物种形成: 来自萼花臂尾轮虫克隆间的分子系统发育关系和生殖隔离证据. 动物学报, 2008, 54(2): 256—264]
- [22] Cheng X F, Xi Y L, Li H B. Seasonal changes in the genetic structure of a *Brachionus calyciflorus* population in Lake Li-antang based on ITS sequences [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2008, 54(2): 245—255 [程新峰, 席贻龙, 李化炳. 基于 rDNA ITS 序列分析莲塘湖萼花臂尾轮虫种群遗传结构的季节变化. 动物学报, 2008, 54(2): 245—255]
- [23] Pennak R W. Rotifera (Rotifers). In: Pennak R W (Eds.), *Freshwater invertebrates of the United States: Protozoa to mollusca* [M]. 3rd ed. Wiley. 1989, 169—225
- [24] Gilbert J J. *Asplanchna* and posterolateral spine induction in *Brachionus calyciflorus* [J]. *Archiv Für Hydrobiologie*, 1967, 64: 1—62
- [25] Gilbert J J, Stemberger R S. *Asplanchna*-induced polymorphism in the rotifer *Keratella slacki* [J]. *Limnology & Oceanography*, 1984, 29(6): 1309—1316
- [26] Gilbert J J. Spine development in *Brachionus quadridentatus* from an Australian billabong: genetic variation and induction by *Asplanchna* [J]. *Hydrobiologia*, 2001, 19(28): 446—447
- [27] Halbach U. Die Ursachen der temporalvariation von *Brachionus calyciflorus* Pallas (Rotifera) [M]. *Oecologia*, 1970, 4: 262—318
- [28] Stemberger R S, Gilbert J J. Spine development in the rotifer *Keratella cochlearis*: induction by cyclopoid copepods and *Asplanchna* [J]. *Freshwater Biology*, 1984, 14: 639—647
- [29] Bradshaw A D. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants [J]. *Advances in genetics*, 1965, 13: 115—155
- [30] Sultan S E. Phenotypic plasticity for plant development, function and life history [J]. *Trends in Plant Science*, 2000, 5: 537—542
- [31] Schlichting C D, Smith H. Phenotypic plasticity: linking molecular mechanisms with evolutionary outcomes [J]. *Evolutionary Ecology*, 2002, 16: 189—211
- [32] Pigliucci M, Murren C J, Schlichting C D. Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2006, 209: 2362—2367
- [33] Richards E J. Inherited epigenetic variation-revisiting soft inheritance [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2006, 7: 395—401

TAXONOMICAL STATUS OF TWO *BRACHIONUS CALYCIFLORUS* MORPHOTYPES IN LAKE LIANTANG BASED ON ITS SEQUENCE

ZHANG Jin-Yan, XI Yi-Long, MA Qin and XIANG Xian-Ling

(Provincial Key Laboratory of Biotic Environment and Ecological Safety, College of Life Sciences,
Anhui Normal University, Wuhu 241000, China)

Abstract: Cyclomorphosis of rotifer defines the temporal cyclic morphological changes that occur within a rotifer population, including variation in body size, presence or absence and lengths of lateral spines and posteriolateral spines. This widespread phenomenon has complicated rotifer taxonomy. The study on genetic differentiation among different rotifer morphotypes by using molecular markers can help us to recognize their taxonomical status correctly. In the present study, the *ITS* sequences of 30 (S1-S30) spined and 18 (U1—U18) unspined *Brachionus calyciflorus* clones, collected from Lake Liantang, were analyzed, and their molecular phylogenetic trees were constructed by Neighbor-Joining (NJ), Maximum-Parsimony (MP), Maximum-Likelihood (ML) and Bayesian methods using *B. patulus* as an outgroup. The results showed that all the 48 clones belonged to 16 haplotypes. Within *ITS* sequence, the average content of T, C, A and G base was 28.6%, 18.7%, 35.9% and 16.8%, respectively. The content of A base plus T base was 64.5%, but that of C base plus G base was 35.5%. The sequence divergence was 26.2%—26.6% between haplotype U12 and the other haplotypes, with an average of 26.47%. The sequence divergence occurred in *ITS*1, 5.8S and *ITS*2 was 26.9%—27.8%, 2.9%—3.5% and 44.4%—45.0%, and the mean value was 27.27%, 3.09% and 44.48%, respectively. However, the average sequence divergence was 0.41% among the other haplotypes. All the four phylogenetic trees supported that 48 clones should be obviously divided into two different clades. The first clade included clone U12, and the second one included all the spined clones and the other unspined clones. Haplotype U12 and the other haplotypes belonged to two sibling species, but the two *B. calyciflorus* morphotypes were not different subspecies or sibling species, and their variation in morphology attributed mainly to phenotypic plasticity.

Key words: *Brachionus calyciflorus*; Morphotype; *ITS* sequence; Phenotypic plasticity