

萼花臂尾轮虫 (*Brachionus calyciflorus*) COI 基因序列变异及种群遗传结构分析*

董云伟 牛翠娟[†](生物多样性与生态工程教育部重点实验室 北京师范大学 北京 100875;
中国海洋大学教育部海水养殖重点实验室 青岛 266003)[†](生物多样性与生态工程教育部重点实验室 北京师范大学 北京 100875)

提要 利用线粒体细胞色素氧化酶亚基 I (cytochrome oxidase I, COI) 基因序列对北京地区和江汉湖群部分湖泊萼花臂尾轮虫 (*Brachionus calyciflorus*) 种群遗传结构进行了初步分析。以特异引物进行 PCR 扩增, 获得了 661bp 的基因片断序列, 所得序列与 Genbank 中 *B. calyciflorus* COI 序列的同源性为 82%—93%。在 6 个种群中, 共获得了 15 种单元型。序列分析结果表明, 不同季节单元型之间的遗传距离较大 (0.248—0.263), 而在同一季节单元型之间遗传距离较小 (0.002—0.031)。种群遗传结构分析表明, 各种群之间无共享的单元型, 同一季节不同湖泊种群之间存在着一定程度的遗传分化, 但未按照地理位置形成明显的地理格局。按采样时间分组进行 AMOVA 分析, 组间差异高达 94.09%; DH-I 与其他种群之间存在着明显的遗传分化。同一湖泊不同季节样品之间, 遗传变异较大, 这表明在同一湖泊存在着不同基因型的轮虫休眠卵, 当环境条件发生了变化后, 不同基因型之间会发生更迭。

关键词 萼花臂尾轮虫, COI, 种群遗传结构**中图分类号** Q178.51

浮游动物具有特殊的生态习性、繁殖方式、栖息地具有“岛屿”化特征, 对其种群遗传学进行研究具有重要的理论意义。目前关于浮游动物分子系统格局及进化动力的研究存在不同的观点: 一种观点认为由于缺乏基因流, 种群之间的遗传距离随着地理距离的增加而增加, 因此种群之间会产生地域性的分化, 形成一定的分子系统地理格局 (Vanoverbeke *et al.*, 1997; Gómez *et al.*, 2000); 另一种观点认为, 在风力、水流和水禽的作用下, 凭借休眠卵 (或繁殖体) 的扩散, 种群之间会存在一定的基因流, 从而抑制地域性的适应和物种分化 (Hatton-Ellis *et al.*, 1998; Jenkins *et al.*, 1998)。

有关浮游动物种群遗传领域的研究主要集中在枝角类 (Vanoverbeke *et al.*, 1997; Weider *et al.*, 1999; Straughan *et al.*, 2000)。与枝角类相比, 轮虫

生活周期更短, 遗传进化速率较快, 且缺乏种间杂交 (Roberto *et al.*, 1997; Kotani *et al.*, 2001), 是进行种群遗传学研究的更为理想的模式动物 (Gómez *et al.*, 2000)。有关轮虫种群遗传结构的研究较少, Gómez 等 (2000) 对伊比利亚半岛部分湖泊不同褶皱臂尾轮虫 (*Brachionus plicatilis*) 种群休眠卵的遗传结构进行了分析, 认为具有建群效应在轮虫种群分化过程中具有重要作用。总的来说, 关于轮虫种群遗传学方面的报道还很不系统, 有关淡水轮虫种群遗传学方面的研究更是鲜有报道。作者对北京地区和江汉湖群部分湖泊萼花臂尾轮虫 (*B. calyciflorus*) 线粒体细胞色素氧化酶亚基 I (cytochrome oxidase I, COI) 序列进行比较, 以初步分析淡水湖泊轮虫种群的遗传结构。

* 国家重点基础研究资助项目, G2000046804 号。董云伟, 博士, 讲师, 现工作单位: 中国海洋大学水产学院, E-mail: dongyw@ouc.edu.cn

收稿日期: 2003-06-30, 收修改稿日期: 2004-01-08

1 材料与方法

1.1 样品采集

2001年3月和10月分别在北京地区和江汉湖群的部分湖泊进行采样,采样地点及时间见表1。采样选用25号浮游生物网,在显微镜下选取

典型的蓴花臂尾轮虫,用微量移液器小心吸出,在自来水中放置过夜,去除体内食物,然后存放在盛有无菌水的0.2ml离心管中,密封后立即在液氮中冻存。回到实验室,于-70℃冰箱中保存备用。

表1 轮虫样品采集地点和时间

Tab. 1 The sites and time of rotifers sampling

| 种群名称 | 采集地 | 采集时间(年 月) | 样本数量 | 单元型 |
|-------|------|-----------|------|---------------------------------------------|
| BJ | 北京 | 2001.10 | 8 | BJ-1, BJ-2 |
| CH | 湖北荆州 | 2001.10 | 5 | CH-1, CH-2 |
| DH-I | 湖北武汉 | 2001.03 | 9 | DH-1, DH-2 |
| DH-II | 湖北武汉 | 2001.10 | 12 | DH-3, DH-4, DH-5, DH-6, DH-7, DH-8, DH-9 |
| HH | 湖北洪湖 | 2001.10 | 3 | HH-1, HH-2 |

1.2 DNA提取、PCR扩增和序列测定

采用 Wizard™ 基因组 DNA 纯化试剂盒 (Promega, USA) 提取轮虫总 DNA (董云伟等, 2002)。在装轮虫离心管中加 30μl 核裂解液 (nuclear lysis solution), 保温, 加入 10μl 蛋白沉降液 (protein precipitation solution)。取上清, 加入等体积异丙醇、0.5μl 糖元 (20mg/ml, sigma, USA), 15000g 离心 10min, 弃上清。70% 酒精洗涤, 15000g 离心 10min。室温晾干后加入 10μl 无菌水。

利用 PTC-100 和 PTC-200 热循环仪 (MIT, USA) 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (20μl): dNTP, 200mmol/L; Mg²⁺, 2mmol/L; 模板, 2μl; 引物, 2.5pmol/L; Taq 酶 0.5U。引物序列为 LCO1490 (5'-GGTCAAATCATAAAGATATTGG-3') 和 LCO2198 (5'-TAAACTTCAGGCTG ACCAAAAATCA-3') (Folmer *et al.*, 1994)。

PCR 产物使用 Concert™ 核酸纯化系统 (Life Technologies, USA) 进行纯化, 连接在 pGEM-T® 载体 (Promega, USA) 上。

使用 ABI PRISM® 310 全自动测序仪 (ABI, USA) 测定序列, 使用试剂盒为 BigDye™ Terminator Kit (Perkin-Elmer)。所有序列双向测试, 以确定其

准确性。

1.3 数据分析

利用 DNASTAR (DNASTAR, Inc. 1996) 中的 Seqman 和 Editseq 程序, 以及 DNAClub 软件进行序列编辑, 将从两端测定的序列合并为一个序列。利用 Clustal W 1.7 软件包 (Thompson *et al.*, 1997) 对所得的序列进行排序。排序后利用 Mega 2.1 (Kumar *et al.*, 2001)¹⁾ 统计不同样本之间的核苷酸组成, 利用 Kumar 双参数模型计算不同单元型之间的遗传距离, 利用邻接法 (Neighbor-joining, NJ) 形成基因树。NJ 参数的设置: 包括所有的颠换和转换位点, 进行 1000 次重抽样来检验系统树的可靠性。应用 Arlequin (Schneider *et al.*, 2000)²⁾ 中的分子变异分析 (analysis of molecular variance, AMOVA) 方法估算地理种群分化水平 (F-statistics, F_{ST}), 以揭示种群分化程度。用排列测验法 (permutation test) 检验变异组成及 F_{ST} 的显著性。

2 结果

2.1 轮虫 COI 基因序列的特点

扩增所得片断长度为 661bp, 所得 COI 基因片段中无终止密码子, 无移码突变。在 Genbank 中进行 BLAST 比较, 种群 DH-I 中单元型与蓴花臂尾

1) Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B *et al.*, 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA

2) Schneider S, Roessli D, Excoffier L, 2000. Arlequin ver. 2000: A software for population genetics data analysis, Genetics and Biometry laboratory, University of Geneva, Switzerland

轮虫序列 (AF499053) 的同源性达 82%, 其余单元型与 AF499053 序列的同源性达 93%。根据 Nicholas 等 (2000) 的理论, 证实作者所得的序列为线粒体 DNA, 而非核基因组内的假基因 (Zhang *et al.*, 1996)。

所测得序列的碱基组成见表 2。A + T 碱基含

量较高, 平均为 65.6%。在三联密码子的不同位点上, 碱基组成变化较大, 在第 1、2、3 号位点, A + T 的平均含量分别为 56.8%、58.3% 和 81.4%。不同单元型间核苷酸组成有一定的变化。DH-1 种群 COI 序列 A + T 含量相对较低。

表 2 不同单元型的核苷酸组成

Tab. 2 The nucleotide composition of different haplotypes

| 样品名称 | T (%) | C (%) | A (%) | G (%) | A + T (%) | C + G (%) | 合计 |
|------|-------|-------|-------|-------|-----------|-----------|-----|
| BJ-1 | 42.2 | 16.5 | 24.7 | 16.6 | 66.9 | 33.1 | 661 |
| BJ-2 | 42.4 | 16.3 | 24.7 | 16.6 | 67.1 | 32.9 | 661 |
| CH-1 | 42.4 | 16.0 | 25.0 | 16.6 | 67.4 | 32.6 | 661 |
| CH-2 | 41.9 | 16.6 | 24.7 | 16.8 | 66.6 | 33.4 | 661 |
| DH-1 | 38.6 | 21.0 | 20.4 | 20.0 | 59.0 | 41.0 | 661 |
| DH-2 | 38.4 | 21.2 | 20.4 | 20.0 | 58.8 | 41.2 | 661 |
| DH-3 | 42.1 | 16.5 | 24.7 | 16.8 | 66.8 | 33.3 | 661 |
| DH-4 | 42.4 | 16.3 | 24.8 | 16.5 | 67.2 | 32.8 | 661 |
| DH-5 | 42.4 | 16.3 | 24.8 | 16.5 | 67.2 | 32.8 | 661 |
| DH-6 | 42.4 | 16.5 | 24.5 | 16.6 | 66.9 | 33.1 | 661 |
| HH-1 | 41.9 | 16.8 | 24.7 | 16.6 | 66.6 | 33.4 | 661 |
| HH-2 | 41.8 | 16.6 | 24.8 | 16.8 | 66.6 | 33.4 | 661 |
| 平均 | 41.6 | 17.2 | 24.0 | 17.2 | 65.6 | 34.4 | 661 |

2.2 种群遗传结构分析

在 37 个样品中共有 15 个单元型, 共有 163 个变异位点, 占总位点数的 24.6%, 在 6 个位点, 既发生了转换也发生了颠换, 共计转换 97 个, 颠换为 72 个, 无插入和缺失, 多态位点具体见图 1。碱基替代主要出现在 DH-1 种群与其他种群单元型之间, 种群内变异位点较少。DH-1 两个单元型 (DH-1 和 DH-2) 只在第 372 位点上发生转换 (T—C), 其它单元型之间, 变异位点为 35 个, 其中简约性位点 15 个, 转换为 22 个, 颠换为 13 个。

不同单元型之间的遗传距离在 0.002—0.263 之间 (表 3); 同一季节单元型之间的遗传距离较小, DH-1 和 DH-2 为 0.002; 其他单元型之间的遗传距离为 0.005—0.031。不同季节样品之间的遗传距离较大, DH-1 和 DH-2 与其他单元型之间的

遗传距离 0.248—0.263 之间。

利用 AMOVA 进行种群遗传结构分析。各种群之间无共享的单元型, 遗传分化程度见表 4, DH-1 与其他种群之间分化明显。按地理位置将 CH、DH-1 和 HH 分为南方组, 将 BJ 归为北方组, 分析结果表明, 组间的差异为 -32.77% ($P < 0.01$), 组内种群之间为 75.19% ($P < 0.01$), 种群内部的差异为 57.58% ($P < 0.01$), 这表明南北组间的遗传差异要低于同组内种群间的遗传差异。按采样时间将 DH-1 分为 3 月组, 将 CH、CH-1、HH、BJ 分为 10 月组。分析结果表明, 组间的差异为 94.09% ($P < 0.01$), 组内种群之间为 3.33% ($P < 0.01$), 种群内部为 2.58% ($P < 0.01$), 这说明不同季节的组群间具有明显的遗传分化。

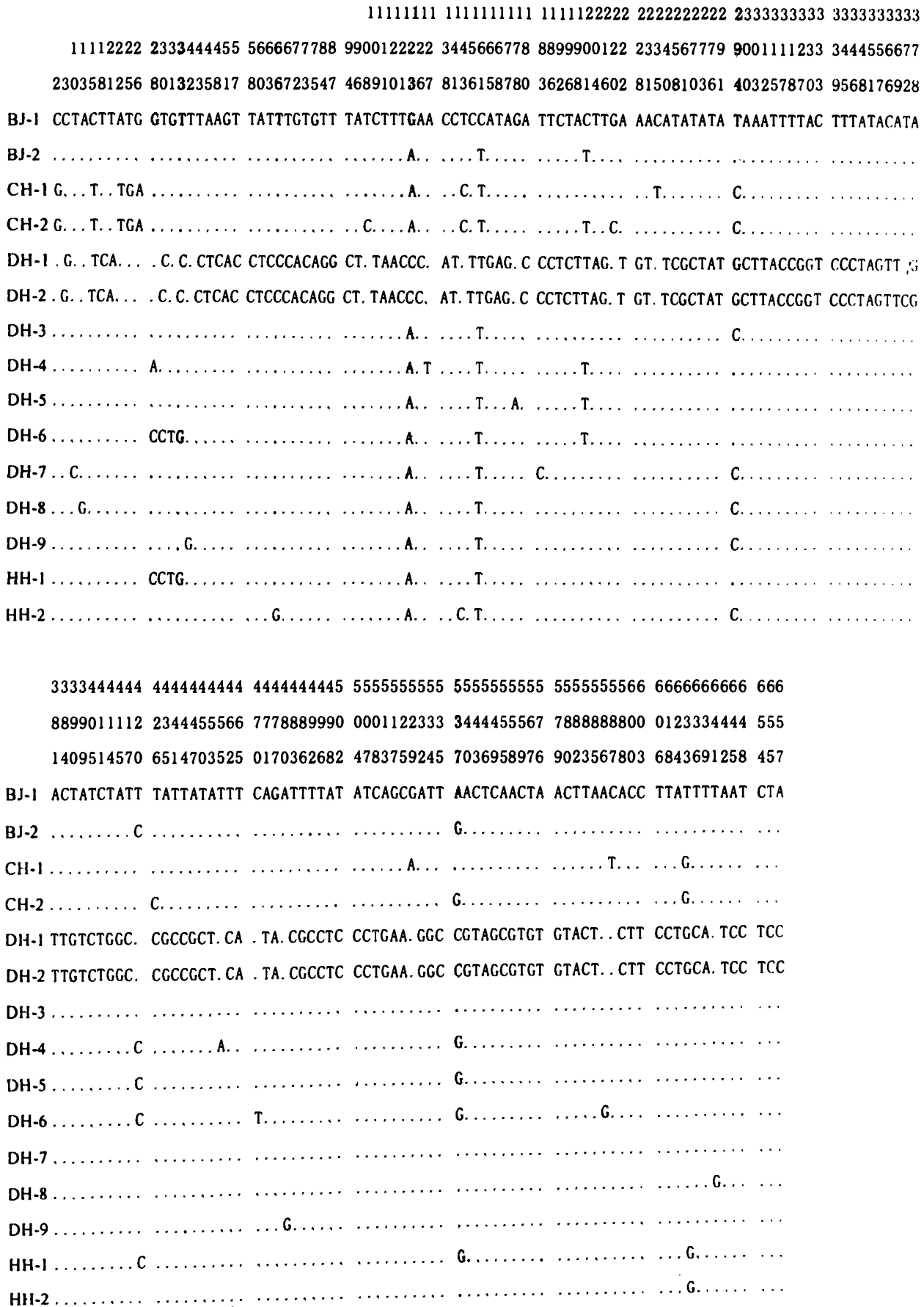


图 1 不同单元型 COI 序列之间变异位点
 Fig. 1 Variable sites among COI sequences of different haplotypes
 阴影部分为转换和颠换同时发生的位点

表 3 不同单元型之间的遗传距离

Tab.3 The genetic distances among different haplotypes

| | BJ-1 | BJ-2 | CH-1 | CH-2 | DH-1 | DH-2 | DH-3 | DH-4 | DH-5 | DH-6 | DH-7 | DH-8 | DH-9 | HH-1 | HH-2 |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| BJ-1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| BJ-2 | 0.008 | | | | | | | | | | | | | | |
| CH-1 | 0.020 | 0.022 | | | | | | | | | | | | | |
| CH-2 | 0.023 | 0.015 | 0.012 | | | | | | | | | | | | |
| DH-1 | 0.250 | 0.248 | 0.261 | 0.259 | | | | | | | | | | | |
| DH-2 | 0.252 | 0.250 | 0.263 | 0.261 | 0.002 | | | | | | | | | | |
| DH-3 | 0.008 | 0.009 | 0.018 | 0.022 | 0.252 | 0.254 | | | | | | | | | |
| DH-4 | 0.009 | 0.002 | 0.023 | 0.017 | 0.250 | 0.252 | 0.011 | | | | | | | | |
| DH-5 | 0.012 | 0.005 | 0.026 | 0.020 | 0.254 | 0.257 | 0.014 | 0.006 | | | | | | | |
| DH-6 | 0.017 | 0.009 | 0.031 | 0.025 | 0.254 | 0.256 | 0.018 | 0.011 | 0.012 | | | | | | |
| DH-7 | 0.008 | 0.009 | 0.018 | 0.022 | 0.248 | 0.250 | 0.003 | 0.014 | 0.011 | 0.018 | | | | | |
| DH-8 | 0.008 | 0.009 | 0.018 | 0.022 | 0.252 | 0.254 | 0.003 | 0.014 | 0.011 | 0.018 | 0.006 | | | | |
| DH-9 | 0.008 | 0.009 | 0.018 | 0.022 | 0.252 | 0.254 | 0.003 | 0.014 | 0.011 | 0.018 | 0.006 | 0.006 | | | |
| HH-1 | 0.014 | 0.009 | 0.025 | 0.021 | 0.250 | 0.252 | 0.012 | 0.012 | 0.011 | 0.006 | 0.015 | 0.015 | 0.015 | | |
| HH-2 | 0.009 | 0.011 | 0.014 | 0.017 | 0.248 | 0.250 | 0.005 | 0.015 | 0.012 | 0.020 | 0.008 | 0.008 | 0.007 | 0.014 | |

表 4 五个种群之间的遗传分化程度 (F_{ST})

Tab.4 F_{ST} values among five populations

| | BJ | CH | DH-I | DH-II | HH |
|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| BJ | | | | | |
| CH | 0.736 | | | | |
| DH-I | 0.989 | 0.987 | | | |
| DH-II | 0.190 | 0.599 | 0.975 | | |
| HH | 0.500 | 0.610 | 0.988 | 0.219 | |

根据遗传距离建立各单元型之间的 NJ 树 (图 2), NJ 树形成两个进化枝, 对应不同的季节。同一季节不同湖泊样品未能形成明显的地理格局。

3 讨论与结论

由于样品小, 为防止 DNA 污染, 作者从单只轮虫提取, DNA 进行 PCR 扩增, 得到的序列与以前发表的序列相比, 同源性高, 可证实所得序列为蓼花臂尾轮虫 COI 序列。

3.1 不同湖泊蓼花臂尾轮虫的遗传分化

F_{ST} 值表明种群之间具有一定程度的遗传分化, 但 BJ 种群与 DH-II 之间的 F_{ST} 值较低, 为 0.190 ($P=0.016$), 按照地理位置分组发现遗传差异主要发生在组内, 种群未形成明显的地理格局。利用 NJ 法构建的系统进化树也表明, 在南北湖泊之间也未形成相对独立的进化枝。这与 Cómez

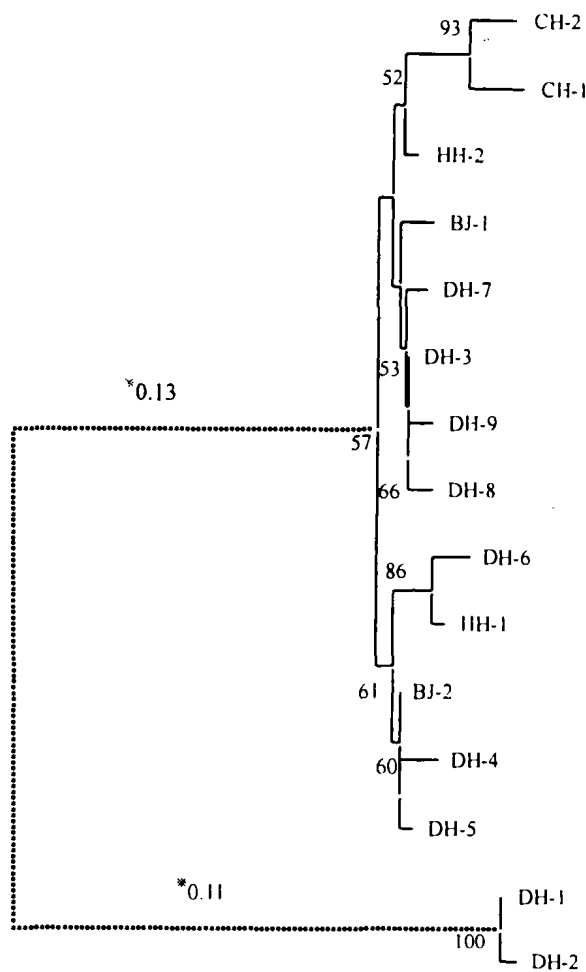


图 2 邻接法构建的蓼花臂尾轮虫 COI 基因的系统进化树
Fig.2 Neighbor-joining tree phylogram representing the relationships of *B. calyciflorus* COI sequences
枝上显示 bootstrap 1000 个循环的置信度; * 表示分子系统树的枝长

等(2000)的研究结果有所不同,Cómez 认为种群之间缺乏基因流,在建群效应的作用下造成了种群分化。

南北湖泊萼花臂尾轮虫种群之间的遗传变异较小,表明种群之间存在着基因流。北京的两个采样点与江汉湖群相距遥远,中间无水流交汇,因此基因流不可能是凭借水流而产生的。Jenkin 等(1998)认为除水流以外,风、候鸟也可能将水生无脊椎动物在大范围内扩散,从而阻止不同地区的种群独立进化。De Meester 等(2002)也认为在水禽的帮助下,不同栖息地之间的浮游生物之间存在着长距离的扩散和建群效应。关于南北湖泊之间基因流产生的原因还需进行深入研究。

在 DH-II 与 HH 种群之间的遗传分化比较小($F_{ST} = 0.219, P = 0.049$),这与东湖和洪湖的地理位置有关。在 20 世纪 60 年代之前,洪湖和东湖都与长江相通(谢平等,1996),借助水流的作用,东湖与洪湖轮虫之间的扩散应相当频繁。此外洪水、候鸟和人类活动也是轮虫扩散的重要媒介。CH 种群与其他种群遗传分化比较大(表 4),这可能与其独立进化的时间有关。长湖在明代(1542 年)开始成湖的,有 460 多年的历史,独立进化的时间相对较长。

总的来说,萼花臂尾轮虫种群的遗传分化程度与其地理位置、进化时间之间的关系并不明显,这预示着有更为重要的因子在起作用。DeMeester (1996)提出了一个假说:扩散和基因流之间没有直接的关系,即使种群之间存在着很强的扩散,但在到达新栖息地后,入侵者由于受到生物和非生物因子的制约而无法生存,从而无法形成有效的基因流。制约入侵者生存的生物因子包括来自原来种群的竞争压力和消费者的捕食压力,非生物因子包括各种理化因子、营养元素含量、有机污染物等因素。因此,在轮虫种群遗传分化的过程中,环境因子可能具有更为重要的作用。

3.2 不同季节萼花臂尾轮虫的遗传分化

在褶皱臂尾轮虫种群中,发现存在着同域物种形成现象,不同物种(品系)之间存在着生态位分化(Cómez *et al.*, 2002)。实验室研究也表明,不同物种(品系)之间在温度、盐度、食性等方面存在着差异(Cómez *et al.*, 1997; 席貽龙等,2000; 胡好远等,2003)。King 等(2001)总结了关于轮虫遗传进化研究的进展,提出了非完全遗传不连续模

型(incomplete genetic discontinuity model)和完全遗传不连续模型(complete genetic discontinuity model)来解释同域物种形成的现象,并利用“超基因”模型来解释环境因子和基因型在决定种群遗传进化时的相互作用。

本研究发现,东湖不同季节样品之间的遗传变异较大。不同季节样品之间遗传差异如此之大,说明在同一湖泊中间种轮虫存在着不同的基因型,不同的基因型适应不同的环境,当环境发生变化时,不同的基因型之间会发生演替。轮虫的休眠卵库是不同的基因型个体的混合体(Harison, 1996),在环境条件发生变化后,借助于高的生长率,适合于特定环境的基因型就会发展起来,成为优势种群。

要进一步分析萼花臂尾轮虫同域物种形成的机制,需做几方面的工作:(1)采集底泥中不同深度的休眠卵,测定大量基因序列,了解总基因库的组成。分析不同季节样品中不同基因型的更迭;(2)对不同基因型个体生理生态学进行分析;(3)分析不同基因型个体之间是否存在生殖隔离。这三个领域均值得进行深入探讨。

在研究轮虫分子系统地理格局时,应考虑季节因素。采集样品时,应选择同一季节,如果对不同季节样品进行比较,季节之间的差异可能会掩盖真实的系统地理分化格局。此外,在研究休眠卵库时,需要采集不同深度底泥中的样品,而且采集的数量要足够大,否则无法获得完整的基因库信息,会得出不恰当的结论。

致谢 中国科学院水生生物研究所谢平研究员、倪乐意副研究员、龚志军同学、陈非洲同学在样品采集中提供了大量帮助;中国科学院动物研究所李明研究员在数据分析中提供帮助,谨致谢忱。

参 考 文 献

- 胡好远,席貽龙,耿 红,2003. 三个品质角突臂尾轮虫生长和发育的比较研究. 应用生态学报,14(4):565—568
- 席貽龙,黄祥飞,2000. 温度对壶状臂尾轮虫种群动态的影响. 海洋与湖沼,31(1):23—28
- 董云伟,牛翠娟,鲍 蕾等,2002. 单只轮虫 DNA 提取及其细胞色素 C 氧化酶 I 亚基部分序列测定. 动物学研究,23(1):81—83

- 谢平, 诸葛燕, 戴莽等, 1996. 水体富营养化对浮游生物群落多样性的影响. 水生生物学报, 20(增刊): 30—37
- De Meester L, 1996. Local genetic differentiation and adaption in freshwater zooplankton population: pattern and process. *Ecoscience*, 3: 385—399
- De Meester L, Gómez A, Okamura B *et al*, 2002. The monopolization hypothesis and the dispersal-gene flow paradox in aquatic organisms. *Acta Oecol*, 23(3): 121—135
- Folmer O, Black M, Hoeh W, *et al*, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrate. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 3: 294—299
- Gómez A, Carmona M J, Serra M, 1997. Ecological factors affecting gene flow in the *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera). *Oecologia*, 111: 350—356
- Gómez A, Carvalho C R, David D H, 2000. Phylogeography and regional endemism of a passively dispersing zooplanktoner; mitochondrial DNA variation in rotifer resting egg banks. *Proc R Soc Lond B*, 267: 2189—2197
- Gómez A, Serra M, Carvalho C R, 2002. Speciation in ancient cryptic species complexes: evidence from the molecular phylogeny of *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Evolution*, 56(7): 1431—1444
- Harrison N G, 1996. Zooplankton egg banks as biotic reservoirs in changing environments. *Limnol Oceanogr*, 41: 1087—1092
- Hatton-Ellis T, Noble L R, Okamura B, 1998. Genetic variation in a freshwater bryozoan. I. populations in the Thames Basin. *Molecular Ecology*, 7: 1575—1585
- Jenkins D G, Underwood M O, 1998. Zooplankton may not disperse readily in wind, rain, or waterfowl. *Hydrobiologia*, 387: 15—21
- King C E, Schonfeld, 2001. The approach to equilibrium of multilocus genotype diversity under clonal selection and cyclical parthenogenesis. *Hydrobiologia*, 446/447: 323—331
- Kotani T, Ozaki M, Matsuoka K *et al*, 201. Reproductive isolation among geographically and temporarily isolated marine *Brachionus* strains. *Hydrobiologia*, 446/447 (Dev hydrobiol 153): 283—290
- Nicholas M, Pissinatti A, Woodruff D S, 2000. Multiple nuclear insertions of Mitochondrial Cytochrome b sequences in callitrichine primate. *Mol Biol Evol*, 17(7): 1075—1080
- Roberto Rico-Mart, Snell T W, 1997. Comparative binding of antibody to a mate recognition pheromone on female *Brachionus plicatilis* and *Brachionus rotundiformis* (Rotifera). *Hydrobiologia*, 358: 71—76
- Straughan D J, Lehman N, 2000. Genetic differentiation among Oregon lake populations of the *Daphnia pulex* species complex. *J Hered*, 9: 8—17
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F *et al*, 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24: 4876—4882
- Vanoverbeke J, De Meester L, 1997. Among-population genetic differentiation in the cyclical parthenogen *Daphnia magna* (Crustacea, Anomopoda) and its relation to geographic distance and clonal diversity. *Hydrobiologia*, 360: 135—142
- Weider L J, Hobak A, Colbourne J K *et al*, 1999. Holarctic phylogeography of an asexual species complex. I. Mitochondrial DNA variation in Arctic *Daphnia*. *Evolution*, 53: 777—792
- Zhang D X, Hewitt G M, 1996. Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *TREE*, 11(6): 247—251

SEQUENCE VARIABILITY OF MITOCHONDRIAL COI REGION AND POPULATION GENETIC STRUCTURE OF ROTIFER *BRACHIONUS CALYFLORUS*

DONG Yun-Wei, NIU Cui-Juan[†]

(Laboratory for Biodiversity Science and Ecological Engineering, Ministry of Education, Beijing Normal University, Beijing, 100875; Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao, 266003)

[†](Laboratory for Biodiversity Science and Ecological Engineering, Ministry of Education, Beijing Normal University, Beijing, 100875)

Abstract Phylogeography structure of *Brachionus calyciflorus* populations sampled from several lakes in Beijing and Jiangnan lake region were studied on mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene (COI) par-

tial sequences. 661bp of the COI gene were amplified and sequenced. Sequences were moderately A + T rich (mean A + T content = 65.6%), and the mean A + T contents were 56.8%, 58.3% and 81.4% in the first, second and third codon positions of the genetic codes, respectively. The A + T contents of DH-1 and DH-2 were lower than those of other haplotypes.

15 haplotypes were identified from 37 samples with 163 variation sites. According to the sample time, these haplotypes could be divided into two groups, "March" and "October". Most substitutions of nucleotides occurred between the "March" group and "October" group. On the contrary, there were fewer substitutions among haplotypes within the same group. Calculated with Kumur 2-parameters model by software MEGA, pairwise sequences genetic distances among sequences ranged from 0.002 to 0.263. Pairwise sequences genetic distances among haplotypes sampled in same season ranged from 0.002 to 0.031; however, genetic distances among haplotypes sampled in different seasons were rather high, ranging from 0.248 to 0.263.

There was no shared haplotype among different populations. The population genetic structure among different populations was analyzed with AMOVA method using Arelequin software. The genetic divergences between the "March" and "October" group, among populations within same groups and among haplotypes within the same population were 94.09% ($P < 0.01$), 3.33% ($P < 0.01$) and 2.58% ($P < 0.01$), respectively. According to geographical position, populations sampled in October were divided into "Northern" and "Southern" groups. Genetic divergences between the "Northern" and "Southern" group, among populations within the same groups and among haplotypes within the same population were 32.77% ($P < 0.01$), 75.19% ($P < 0.01$) and 57.58% ($P < 0.01$), respectively. Most genetic variations occurred within the same groups. There were rather strong gene flows among *B. calyflorus* populations in Beijing and the lakes in Jiangnan region. The results showed there was no positive correlation between genetic and geographic distances.

Neighbor-joining tree phylograms also showed that there were apparent genetic divergences between the "March" group and the "October" group. Furthermore, the neighbor-joining phylogram of these sequences showed that there was no localized differentiation.

The Beijing lakes are far from the lakes in Jiangnan region and there is no direct surface connection between their water flows, suggesting the importance of other environmental factors in the gene flow process of the *B. calyflorus* populations. Future research should consider the role of waterfowls and winds on the gene flow of *B. calyflorus*. Some researchers have speculated that sometimes there is no direct relationship between population migrations and gene flows. When organisms enter new habitats, population growth was dominated by biotic and abiotic factors, if the environment proved unfavourable the population would decline or become extinct.

The apparent genetic divergences between the "March" group and "October" group suggested that there were several kinds of genotypes of rotifer resting eggs, all acclimatized to different environments conditions in Donghu Lake, Wuhan. Along with varied environmental conditions, resting eggs of given genotype would hatch in turn, so the genotypes of free-living rotifers would change in the lake accordingly. This hypothesis could be explained by the incomplete genetic discontinuity model and complete genetic discontinuity model. Researchers should, therefore, take into consideration the effect of sampling date on the phylogeographic structure of zooplankton when carrying out this type of investigation.

Key words *Brachionus calyflorus*, COI, Population genetic structure