

萼花臂尾轮虫种复合体遗传分化的空间格局

项贤领, 席贻龙*, 温新利, 张晋艳, 马 芹

(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, 安徽 芜湖 241000)

摘要: 对采自中国东部 8 个地理区域中的萼花臂尾轮虫种复合体 (*Brachionus calyciflorus* species complex) 内 124 个轮虫克隆的核 DNA ITS 区进行了测序和分析, 重建了萼花臂尾轮虫种复合体的系统发生树。研究发现, 73 个单倍型聚合为 3 个支系, 支系间序列差异百分比为 4.2%~25.3%, 表明萼花臂尾轮虫实际上是由 3 个隐种组成的种复合体, 在广州、儋州和芜湖采样点均具有隐种共存现象。萼花臂尾轮虫种复合体的核苷酸多样性和单倍型多样性均较高, 隐种 III 内各种群间遗传分化指数也较高, 这可能是由于栖息地片段化和有限的基因流导致的。另外在冰期瓶颈后拓殖种群的快速增长也阻碍了有效基因流, 并加速了地理种群间的遗传分化。巢式支系分析显示部分巢式支系具有一定的系统地理格局, 而 Mantel 检验表明, 种群间平均净遗传距离及遗传分化指数和地理距离间均无显著相关性。末次盛冰期之后的新仙女木事件 (Younger Dryas Event, YD) 可能对我国萼花臂尾轮虫隐种的分布和地理格局造成较大影响。在 YD 时期, 3 个萼花臂尾轮虫隐种可能退缩并共存于南岭以南地区的多个残遗种避难所, 而此后的休眠卵长距离拓殖并伴随后期的栖息地片段化可能是形成当前地理格局的主要原因。萼花臂尾轮虫种复合体在全球范围内的地理分布可能与大陆板块构造运动有关。

关键词: 萼花臂尾轮虫; 种复合体; 遗传分化; 空间格局; 巢式支系分析; 系统地理学

中图分类号: Q349.1; Q958.12; Q178.51 文献标志码: A 文章编号: 0254-5853-(2010)03-0205-016

Spatial Patterns of Genetic Differentiation in *Brachionus calyciflorus* Species Complex

XIANG Xian-Ling, XI Yi-Long*, WEN Xin-Li, ZHANG Jin-Yan, MA Qin

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

Abstract: To understand spatial patterns of genetic differentiation in the *Brachionus calyciflorus* species complex, the rDNA ITS regions of 124 rotifer clones collected from eight geographic regions in East China were sequenced and analyzed. A total of 73 haplotypes were defined, and were grouped into three clades by the phylogenetic trees. The divergences of ITS sequence among the three clades ranged from 4.2% to 25.3%, indicating the occurrence of three cryptic species (cryptic species I, cryptic species II and cryptic species III). The sympatric co-occurrence of these cryptic species was observed at Guangzhou, Danzhou and Wuhu. The nucleotide diversity in *B. calyciflorus* complex was higher, and so was haplotype diversity. Within cryptic species III, the higher genetic differentiation might be attributed to fragmentation and restricted gene flow. In addition, the rapid increase of colonizers after an ambiguous glacial bottleneck might interfere with effective gene flow and accelerate genetic differentiation of geographic populations. The nested clade analysis suggested to some extent the geographic structure, and the non-significant correlation existed between the geographic distance and the average pairwise difference between populations (D_a) as well as F_{st} . The Younger Dryas (YD) Event after the last full glacial period might has considerable effect on the patterns of geographic structure and distribution of cryptic *B. calyciflorus* species. During the YD event, the three cryptic species probably retreated and co-occurred in multiple relict refugia to the south of Nanling area. Long-distance colonization possibly coupled with subsequent fragmentation might be the main reason of the current patterns of geographic structure. The geographic distribution of *B. calyciflorus* complex on a global scale might be attributed to the motion of continental plates.

收稿日期: 2009-12-04; 接受日期: 2010-04-20

基金项目: 国家自然科学基金 (30770352, 30499341); 安徽省优秀青年基金 (08040106904); 安徽省教育厅自然科学基金 (KJ2009B089Z);

“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资助; 安徽师范大学青年基金资助项目 (2008xqn71)

*通讯作者 (Corresponding author), E-mail: ylx1965@yahoo.com.cn

第一作者简介: 项贤领 (1978 -), 男, 博士生, 讲师, 主要从事分子生态学和系统地理学研究

Key words: *Brachionus calyciflorus*; Species complex; Genetic differentiation; Spatial pattern; Nested clade analysis; Phylogeography

系统地理学是研究物种及物种内不同种群形成现有分布格局的历史原因和演化过程的一门学科,其研究的核心是遗传谱系空间分布的历史特征(Avise & Hamrick, 1996)。通过对种群遗传结构的分析来探讨种内系统地理格局的形成机制、系统发育关系以及现有分布特征,并结合种群的地理分布状况来发现和验证与其相关的地质事件,追溯和揭示种群的进化历程(Avise et al, 1987; Avise, 1998),这对理解种群分化、物种形成、生态适应和历史气候变化等进程具有重要意义(Avise, 2000)。生物体分布格局的形成原因不仅包括生物因素(如扩散、适应、物种形成、灭绝以及生物之间的相互作用等),还应当包括地理历史因素(如板块构造运动、海平面升降、气候变化和海洋洋流变化等)(Chen et al, 2006)。山脉、河流等自然地理条件对生物扩散具有一定的隔离屏障作用,维持甚至加速了种群的局域性分化(Hebert et al, 2003; Taylor et al, 1998; Cox & Hebert, 2001)。地理历史上的拓殖事件以及物种分布区的扩张或退缩也会对种群的遗传结构产生重要影响。我国是惟一跨越六大动物地理区(古北界、新北界、旧热带界、东洋界、新热带界和澳洲界)中两个主要地理区(古北界与东洋界)的国家,加之地处欧亚大陆东南端,地球地质历史上的一些重大事件(如印度板块与欧亚板块的碰撞、青藏高原的隆起以及末次盛冰期以来的新仙女木事件等)都对我国的气候和动物地理分布产生直接影响,使得我国成为研究世界动物区系演化与生物地理学的关键地区之一(Miao et al, 2003)。

目前,系统地理学研究主要集中在对高等动植物系统地理格局的分析上(Taberlet & Bouvet, 1994; Johnson et al, 1999; Fernando et al, 2000; Edwards & Gadek, 2001),而关于浮游动物系统地理学的研究仅局限于枝角类溞属(*Daphnia*)(Hebert, 1987; Innes, 1991; De Meester, 1996; Vanoverbeke & De Meester, 1997; Weider et al, 1999a, b; Hebert et al, 2003; Penton et al, 2004; De Gelas & De Meester, 2005)、褶皱臂尾轮虫种复合体(*Brachionus plicatilis* species complex)(Gómez et al, 2000, 2002a, b; Gómez, 2005; Mills et al, 2007)和蟥状独缩虫(Miao et al, 2003),其中的原因除了长期以来认为大多数浮游动物种

群可以休眠体形式通过风力、水流和水禽等介质传播而形成全球性分布以至于不存在地理分化外,还由于浮游动物个体小,寻找不同种群间形态结构差异相对比较困难(Miao et al, 2003)。迄今为止,关于浮游动物的系统地理格局主要包括以下两种不同的观点:一种观点认为少数有建群效应的休眠体在经历了历史拓殖事件后,种群会有一个快速增长期,从而有效阻止了由基因流引起的等位基因频率的变化(Boileau et al, 1992)。此外,这些定殖种群对栖息地环境的快速适应(De Meester, 1993, 1996; Okamura & Freeland, 2002)以及它们所拥有的庞大的休眠卵库(Hairston, 1996)均进一步强化了建群效应的持久性。因此,这些种群表现出高度的遗传分化和显著的系统地理格局(Gómez et al, 2000, 2002a, b, 2007; Gómez, 1997, 2005; Hebert, 1998; Mills et al, 2007),种群间的遗传距离随着地理距离的增加而增加。这些进程已由 De Meester et al (2002)整合定名为“独占假说”;另一种观点认为由于浮游动物在整个休眠卵阶段具有高度的扩散能力,休眠体的长距离拓殖限制了种群分化和局域性适应,从而使得种群间遗传距离比期望值小,遗传多样性降低,无法形成系统的地理格局,种群间遗传距离和地理距离间没有显著的相关性(Weider et al, 1999a; Innes, 1991; Dong & Niu, 2004; Mergéay et al, 2005; Ishida & Taylor, 2007; Muñoz et al, 2008)。

浮游动物多样的地理分布格局可能与其隐种混杂和季节替代有关。大多数浮游动物都具有高度的扩散能力和广泛的地理分布(Hebert, 1987; Ruttner-Kolisko, 1974; Koste, 1978; Wallace & Snell, 2001),广布种在其分布区常常表现出广泛的形态变异,如高度的表型可塑性或周期变形,以及由于高度的形态停滞而引起的形态学一致性(De Gelas & De Meester, 2005),这些均会导致我们对隐性物种形成的忽视(Hutchinson, 1967; Knowlton, 1993; Hebert, 1998),从而使得许多物种的确定可能存在错误。近期的分子系统学研究表明,这些在较大地理尺度上分布的广布种,尤其是来自不同大陆的地理种群间存在多个遗传谱系或隐种(Taylor et al, 1998; Gómez et al, 2000, 2002b; Cox & Hebert, 2001;

Hebert et al, 2003; Penton et al, 2004; Gilbert & Walsh, 2005), 所谓的广布种事实上可能是隐种复合体 (Gómez et al, 2002b; Gómez, 2005; Gilbert & Walsh, 2005; Ciroso-Pérez et al, 2001; Derry et al, 2003), 即使在较小的地理范围内, 这些广布种的地理种群间也存在高度的遗传分化 (Hebert, 1987; Carvalho, 1994; De Meester, 1996; Ortells et al, 2000, 2003; Gómez et al, 2002b; Suatoni, 2003; Gómez, 2005; Li et al, 2008)。另外, 在同一水体中还存在季节种群间的遗传分化或隐种共存 (Gómez et al, 1995; Ortells et al, 2003; Cheng et al, 2008)。因此, 种群遗传结构研究中必须首先进行物种分化的相关研究, 尤其是当该物种被怀疑可能存在隐种时 (Ortells et al, 2003), 从而避免隐种混杂和季节替代对轮虫种群遗传分化的空间格局分析产生干扰。

萼花臂尾轮虫 (*Brachionus calyciflorus*) 是常见的淡水轮虫种类之一, 具有典型的周期性孤雌生殖特点, 长期被看做是世界性分布的广布种。然而, 近期的研究表明, 它也是一个种复合体 (Gilbert & Walsh, 2005; Cheng et al, 2008; Li et al, 2008)。有关萼花臂尾轮虫的系统地理学研究目前只涉及少数

地理区域 (Dong & Niu, 2004), 在较大地理尺度上对其种群遗传分化的空间格局研究尚未见报道。

为了避免轮虫种群遗传结构的季节变异对空间格局分析可能产生的影响, 本研究选择在各采样点间水温差异最小 (28~35°C) 时 (2007 年 7 月和 8 月) 进行了样品采集。以核 DNA ITS 序列 (ITS1-5.8S-ITS2) 为分子标记, 对采自中国东部沿纬度梯度分布的 8 个地理区域的 124 个萼花臂尾轮虫克隆进行测序和分析, 以便我们正确认识轮虫种群遗传分化的空间格局和形成机制, 探明轮虫隐种同域共存的历史原因。

1 材料与方法

1.1 样品采集和 DNA 提取

实验用萼花臂尾轮虫于 2007 年 7—8 月分别采自中国天津、德州、泰安、徐州、南京、芜湖、安庆、南昌、赣州、广州和儋州 (图 1)。采集轮虫样品的同时, 测定水温、pH 值和氨氮浓度等水体理化因子 (表 1)。样品采集后, 于各地理种群内分别挑取约 200 个萼花臂尾轮虫雌体, 在自然光照 (光照强度约 130 lx, L:D=14:10 和与采样点水温相

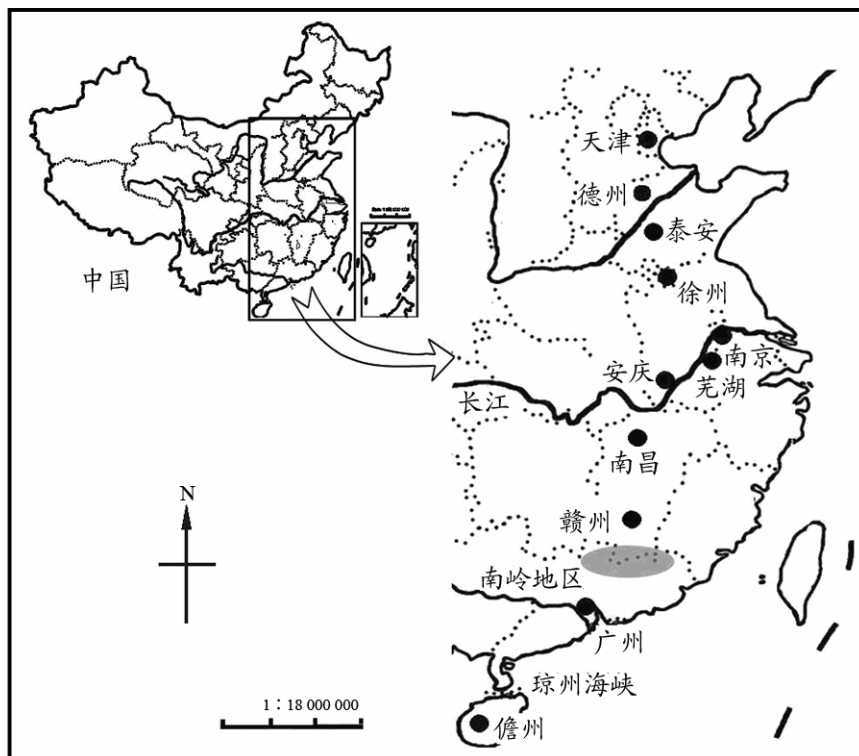


图 1 萼花臂尾轮虫种复合体采集点分布图

Fig. 1 Sampling localities for *Brachionus calyciflorus* species complex in this study

近的温度条件下进行克隆培养。培养液采用 Gilbert (1963) 配方 (pH=7.3), 所用饵料为 HB-4 培养基 (Li et al, 1959) 培养的、处于指数增长期的斜生栅藻 (*Scenedesmus obliquus*), 培养时间在 1 个月以上。当各克隆轮虫达较高密度 (200~300 ind./mL) 时, 用轮虫培养液过滤冲洗, 饥饿 24 h 后用 70% 酒精固定保存。由于实验室内轮虫克隆培养难度较大, 只有部分轮虫个体的克隆培养获得成功; 赣州、南昌和泰安等 3 个地理种群由于仅建立 1~2 个克隆而未使用, 最终 124 个轮虫克隆数据被纳入本次分析。

用玻璃粉法提取基因组 DNA (Xiang et al, 2006)。具体方法为: 离心获得轮虫样品, 置于 1.5 mL Eppendorf 管中, 加 500 μ L DNA 提取缓冲液 (0.5% SDS, 25 mmol/L EDTA, 25 mmol/L NaCl, 100 mmol/L Tris-HCl, pH8.0) 和 20 μ L 蛋白酶 K (20 μ g/mL), 置 60 $^{\circ}$ C 水浴 2 h; 加 500 μ L 8 mol/L 预热后的硫氰酸胍和 40 μ L (1:1) 的洁净玻璃粉乳液, 混匀后置 37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h, 不时摇动; 取出 4 000 r/min 离心 2 min, 弃去上清液; 沉淀用 70% 冰乙醇清洗 2

次, 再用丙酮清洗 1 次; 置真空干燥机中干燥。加 TE (pH8.0) 40 μ L, 置 56 $^{\circ}$ C 水浴 30 min, 取出, 8 000 r/min 离心 2 min, 吸上清液, 置 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2 PCR 扩增和测序

PCR 扩增在 Bio-Rad 公司生产的 iCycler 扩增仪上进行。ITS 序列 (ITS1-5.8S-ITS2) 引物为宝生物工程 (大连) 有限公司合成的 LH2 (5'-GTC-GAATTCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA-3') 和 Dlam (5'-CCTGCAGTCGACAKATGCTTAAR-TTCAGCRGG-3') (Xi et al, 2003)。反应体系包括 1 \times Buffer, 0.2 mmol/L dNTP, 0.2 μ mol/L 引物, 2 mmol/L Mg^{2+} , DNA 模板 4 μ L, 4 U 的 Taq 酶, 超纯水补至 50 μ L。扩增程序如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 1.5 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶 (含 0.5 μ g/mL EB) 中电泳检测, 并使用 AxyPrepTM PCR 纯化试剂盒 (AXYGEN) 纯化, 然后连接到 pMD 19-T 载体 (Takara) 并转化进入 DH5 α 大肠杆菌体内。用质粒提取试剂盒提取含有目的片段的质粒 DNA, ABI

表 1 采样点信息

Tab. 1 Summary information of sampling localities in this study

| 采样点 Sampling locality | 代码 Code | 采集日期 Collecting date (MM-DD-YY) | 地理坐标 Geographic coordinates | 栖息地特征 Habitat characteristics | | | |
|-----------------------------|------------|---------------------------------------|---|---|---|------------------|--|
| | | | | 水温 Water temp. ($^{\circ}$ C) | 年平均气温 Annually mean temp. ($^{\circ}$ C) | pH 值 pH Value | 氨态氮浓度 NH ₄ -N concentration (mg L ⁻¹) |
| 儋州 Danzhou | HN | 07-18-07 | 19 $^{\circ}$ 31'N 109 $^{\circ}$ 34'E | 35 | 25 | 8.15 | 1.56 |
| 广州 Guangzhou | GZ | 07-27-07 | 23 $^{\circ}$ 07'N 113 $^{\circ}$ 13'E | 33 | 23 | 8.02 | 1.50 |
| 安庆 Anqing | AQ | 08-04-07 | 30 $^{\circ}$ 31'N 117 $^{\circ}$ 03'E | 35 | 18 | 7.76 | 1.36 |
| 芜湖 Wuhu | WH | 08-06-07 | 31 $^{\circ}$ 21'N 118 $^{\circ}$ 22'E | 34 | 17.3 | 7.57 | 1.99 |
| 南京 Nanjing | NJ | 08-17-07 | 32 $^{\circ}$ 05'N 118 $^{\circ}$ 44'E | 28 | 16.9 | 8.07 | 1.41 |
| 徐州 Xuzhou | XZ | 08-14-07 | 34 $^{\circ}$ 14'N 117 $^{\circ}$ 09'E | 30 | 15.8 | 9.53 | 0.27 |
| 德州 Dezhou | DZ | 08-10-07 | 37 $^{\circ}$ 26'N 116 $^{\circ}$ 17'E | 33 | 14.2 | 9.06 | 0.82 |
| 天津 Tianjin | TJ | 08-09-07 | 39 $^{\circ}$ 05'N 117 $^{\circ}$ 10'E | 30 | 13.2 | 8.63 | 0.79 |

PRISM 3730 型自动测序仪进行序列测定。

1.3 数据分析

采用 CLUSTAL X (1.8) 软件 (Thompson et al, 1997) 进行序列对位排列, 并辅以人工校对; 用 DNASTAR 软件计算两两序列的序列差异百分比; 再用 DnaSP 5.1 软件 (Librado & Rozas, 2009) 分析变异位点、多态位点、简约信息位点、单倍型多样性 (h)、核苷酸多样性 (π) 和种群间平均净遗传距离 (D_a)。

为了在更大范围内探讨轮虫谱系关系, 本研究引用了 GenBank 中用于探讨芎花臂尾轮虫谱系关系的 ITS 序列, 它们分别采自乔治亚 (Georgia)、佛罗里达 (Florida)、德克萨斯 (Texas) 和澳大利亚 (Australia) (Gilbert & Walsh, 2005) 以及中国芜湖 (Wuhu) (Zhang, 2009), 序列登录号分别为 DQ071668-DQ071671 和 EU978878。以剪形臂尾轮虫 (*B. forficula*) 为外群, 运用 PAUP* 4.0b10 软件 (Swofford, 2002), 采用启发式搜索的方法, 分别以最大似然法 (maximum likelihood, ML)、最大简约法 (maximum parsimony, MP) 和邻接法 (neighbor joining method, NJ) 构建系统发生树。采用 Modeltest 3.7 (Posada & Crandall, 1998) 中的赤池信息准则 (Akaike information criterion, AIC) 检测用于 ML 分析的最佳模型, 模型检测表明, 最适模型为 TVM+G ($P < 0.001$), Base = (0.2953 0.1752 0.1806), Nst=6, Rmat=(1.1595 3.8251 2.5981 0.5005 3.8251), Rates=gamma, Shape=0.8567。MP 和 NJ 系统树各节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) (Felsenstein, 1985) 表示, 而 ML 系统树则以 100 次重复抽样检验的自引导值表示。贝叶斯法构建系统树利用 MrBayes 3.1.2 软件 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) 进行, 其中马尔科夫链的蒙特卡洛方法 (Markov Chain Monte Carlo) 设置为 4 条链 (3 条热链、1 条冷链) 同时运行, 重复一次。采用最适合的 DNA 进化模型 TVM+G, 以随机树为起始树, 运行 600 万代, 每 100 代抽样一次, 在舍弃老化样本后, 根据剩余的样本构建一致树, 节点置信度以后验概率 (posterior probability, PP) 评价。

应用 Arlequin 3.1 (Excoffier & Schneider, 2005) 中的分子变异分析 (analysis of molecular variance, AMOVA) 方法检测种群间和种群内的遗传变异组

成并估算地理种群遗传分化指数 (F-statistics, F_{st})。同时, 利用 Arlequin 软件包中的 Mantel 统计学检验 (Mantel, 1967), 分别比较平均净遗传距离 (D_a) 和遗传分化指数 (F_{st}) 与地理距离矩阵之间的相关性, 并进行 1000 次重复的显著性检验。采样点环境因子 (水温、年平均气温、pH 值和氨态氮浓度) 与种群遗传学参数 (单倍型多样性 h 、核苷酸多样性 π 以及遗传分化指数 F_{st}) 间的相关性分析采用 SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 完成。

ITS 序列单倍型之间的网络关系用 Network 4.510 (Bandelt et al, 1999; available from <http://www.fluxus-engineering.com>) 程序中的 Median-Joining 进行分析。这样得到的网络关系树是一种无根的系统进化树, 各单倍型之间由突变连接。然后按照 Templeton et al (1987) 和 Templeton & Sing (1993) 组巢原则构建单倍型巢式支系图: 处在网络关系树边缘、只与一个支系或单倍型连接的支系或单倍型称为末支 (tip clade); 而与一个以上支系或单倍型连接的支系或单倍型称为内支 (interior clade)。通常认为, 在同一支系内, 末支和内支分别代表了在进化上较晚和较早的支系或单倍型 (Castelloe & Templeton, 1994)。组巢的基本原则是从单倍型水平开始, 将末支与其相连的内支组为一个一级支系; 之后再对一级支系对应的末支、内支组巢成为二级支系, 直到单倍型网络关系树组为一个大的完整支系为止。基于巢式支系图, 进行巢式支系分析 (nested clade analysis, NCA): 首先利用 Geodis 2.5 程序 (Posada et al, 2000) 计算不同支系 (从一级支系到一个大的支系) 内两种类型的距离, 巢内距离 (D_c) 表示某支系或某单倍型所有个体与该支系或该单倍型地理分布中心的平均距离, 即该支系的地理分布范围; 巢间距离 (D_n) 表示某支系或某单倍型所有个体与包含该支系的高一级水平地理分布中心的平均距离, 即该支系与进化上相近的支系间的地理分布关系; 另外, 在所有组巢水平各个支系内还要计算内支两种距离均值与末支两种距离均值之差 (即各个支系内 I-T 的 D_c 和 D_n)。同时, 通过 1000 次的随机选择来检验上述数值的显著性大小; 最后, 根据上述的两种距离结果, 参照 Templeton (2004) 给出的对巢式支系图不同水平支系距离格局的检索表推测单倍型地理分布格局的历史成因。

2 结果

2.1 萼花臂尾轮虫种复合体的序列变异和遗传多样性

萼花臂尾轮虫种复合体内 124 个克隆的 ITS 区序列长度在 759~785 bp 之间, 比对后长 809 bp, 其中变异位点 253 bp, 多态位点 226 bp, 简约信息位点 185 bp, 从而定义了 73 个单倍型。A、T、C 和 G 碱基平均含量分别为 28.9%、36.2%、16.6% 和 18.3%, 其中 A+T 含量 (65.1%) 明显高于 C+G 含量 (34.9%), 表现出明显的反 G 偏倚。儋州样品的 A+T 含量稍有偏高 (65.9%), C+G 含量较平均值稍微偏低 (34.1%), 其它各采样点样品间的碱基组成变化不大。所有样品测序结果已提交至 GenBank (序列登录号 GU012678-GU012801)。大部分单倍型都分布在单一采样点中, 另外有 12 个共享单倍型分布在两个或两个以上的采样点 (表 2)。平均核苷酸多样性和单倍型多样性分别为 0.0529 (± 0.0078 SD) 和 0.960 (± 0.008 SD) (表 2), 各采样点样品的核苷酸多样性 (π) 与单倍型

多样性 (h) 之间并不呈现显著的相关关系。广州、儋州、南京和芜湖样品的核苷酸多样性均高于平均核苷酸多样性。对各采样点样品间净遗传距离 (D_a) 的分析显示, 芜湖样品和徐州样品与其他各采样点样品间具有较高的 D_a 值 (表 3)。

2.2 系统发生关系

运用贝叶斯法、最大似然法、最大简约法 (未示出) 和邻接法 (未示出) 构建的系统发生树的拓扑结构基本一致 (图 2—3), 均将 73 个单倍型分成 3 个支系: 支系 I (Clade I)、支系 II (Clade II) 和支系 III (Clade III), 且置信度较高。支系 I 涵盖的单倍型数最少 (7 个), 全部为来自儋州采样点的样品; 支系 II 包括了 13 个儋州单倍型、11 个广州单倍型、2 个芜湖单倍型和 1 个儋州与广州共享单倍型; 剩下的 39 个单倍型全部归入支系 III, 分布于 8 个采样点。所有 73 个单倍型间序列差异百分比为 0%~25.3%, 平均 5.97%, 最大的序列差异位于共享单倍型 SH9 和单倍型 HN14 间。支系 I、支系 II 和支系 III 内部的 ITS 区序列差异百分比分别为 0%~1.7%、0%~0.8% 和 0%~2.4%; 支系 I 和支

表 2 萼花臂尾轮虫种复合体各采样点的样品数、单倍型、核苷酸多样性和单倍型多样性 (\pm 标准差)
Tab. 2 Sample size, haplotypes, nucleotide and haplotype diversity (\pm SD) for each geographic population in *Brachionus calyciflorus* complex

| 采样点 Sampling locality | 样品数 Sample size | 单倍型及克隆数* Haplotypes and number of clones | 核苷酸多样性 Nucleotide diversity | 单倍型多样性 Haplotype diversity |
|-----------------------------|-----------------------|---|-----------------------------------|----------------------------------|
| AQ | 9 | SH1(3), SH3(1), SH4(1), SH5(1), AQ1(1), AQ3(1), AQ8(1) | 0.0043 \pm 0.0006 | 0.806 \pm 0.120 |
| DZ | 8 | SH1(2), SH5(3), SH8(3) | 0.0042 \pm 0.0011 | 0.750 \pm 0.096 |
| GZ | 15 | SH11(3), GZ1(1), GZ2(1), GZ3(1), GZ4(1), GZ5(1), GZ6(1), GZ7(1), GZ9(1), GZ10(1), GZ11(1), GZ12(1), GZ14(1) | 0.0099 \pm 0.0055 | 0.943 \pm 0.045 |
| HN | 29 | SH5(1), SH10(2), SH11(4), SH12(4), HN1(1), HN2(1), HN3(1), HN4(1), HN8(1), HN9(1), HN10(1), HN11(1), HN13(1), HN14(1), HN15(1), HN19(1), HN20(1), HN21(1), HN23(1), HN24(1), HN25(1), HN27(1) | 0.1069 \pm 0.0126 | 0.946 \pm 0.026 |
| NJ | 17 | SH1(7), SH6(6), NJ7(1), NJ13(1), NJ15(1), NJ17(1) | 0.0106 \pm 0.0014 | 0.735 \pm 0.077 |
| TJ | 14 | SH1(1), SH4(1), SH5(4), SH7(2), SH9(1), TJ2(1), TJ3(1), TJ6(1), TJ10(1), TJ11(1) | 0.0074 \pm 0.0018 | 0.912 \pm 0.059 |
| WH | 24 | SH1(1), SH2(5), SH3(1), SH4(2), SH5(2), WH2(1), WH3(1), WH7(1), WH9(1), WH13(1), WH16(1), WH17(1), WH18(1), WH20(1), WH21(1), WH22(1), WH23(1), WH24(1) | 0.0134 \pm 0.0043 | 0.935 \pm 0.039 |
| XZ | 8 | SH6(1), SH9(1), XZ1(1), XZ2(1), XZ3(1), XZ4(1), XZ6(1), XZ8(1) | 0.0043 \pm 0.0007 | 1.000 \pm 0.063 |
| 总体 Total | 124 | 73 | 0.0529 \pm 0.0078 | 0.960 \pm 0.008 |

*SH: 代表共享单倍型; 其他代码为各采样点的缩写, 与表 1 相对应。

*SH represents shared haplotype, and the other codes are abbreviations for geographic locations corresponding to Tab. 1.

表 3 萼花臂尾轮虫种复合体各采样点样品间平均净遗传距离 (D_a , 对角线上) 和分化程度 (F_{st} , 对角线下) 以及样品内分化程度 (F_{st} , 对角线)

Tab. 3 Average pairwise difference between populations (D_a , above diagonal), F_{st} among (below diagonal) and within (on the diagonal) geographic populations in *Brachionus calyciflorus* complex

| 种群 Populations | AQ | DZ | GZ | HN | NJ | TJ | WH | XZ |
|----------------|--------|---------|--------|---------|---------|--------|--------|--------|
| AQ | 0.4431 | 0.0103 | 0.0058 | 0.0107 | 0.0127 | 0.0126 | 0.0351 | 0.0469 |
| DZ | 0.6479 | 0.4437 | 0.0012 | -0.0001 | -0.0002 | 0.0004 | 0.0370 | 0.0467 |
| GZ | 0.4381 | 0.1255 | 0.4371 | 0.0014 | 0.0022 | 0.0030 | 0.0355 | 0.0454 |
| HN | 0.5532 | -0.0086 | 0.1045 | 0.3081 | 0.0002 | 0.0009 | 0.0314 | 0.0422 |
| NJ | 0.7576 | -0.0312 | 0.2361 | 0.0204 | 0.4369 | 0.0002 | 0.0384 | 0.0478 |
| TJ | 0.7699 | 0.0801 | 0.3110 | 0.0968 | 0.0535 | 0.4399 | 0.0377 | 0.0469 |
| WH | 0.8340 | 0.8208 | 0.7819 | 0.7383 | 0.8542 | 0.8574 | 0.4341 | 0.0231 |
| XZ | 0.4589 | 0.4530 | 0.4382 | 0.4153 | 0.4656 | 0.4622 | 0.2855 | 0.4436 |

系 II, 支系 I 和支系 III 以及支系 II 和支系 III 间的序列差异百分比分别为 23.7%~25.3%、23.9%~25.3% 和 4.2%~6.2%。根据 Gilbert & Walsh (2005) 对不同地理品系萼花臂尾轮虫的交配实验和 ITS 区序列分析结果, 不同地理品系萼花臂尾轮虫间 ITS 区序列差异百分比大于 4% 时具有生殖隔离, 为不同的隐种。因此本研究中的这 3 个支系应该属于不同的隐种, 在本文中分别临时命名为隐种 I、II 和 III。

来自乔治亚 (Georgia DQ071668) 和佛罗里达 (Florida DQ071669) 的萼花臂尾轮虫隐种被归入支系 III, 它们与支系 III 内部各克隆间序列差异百分比为 0.8%~3.2%; 与支系 II 间序列差异百分比为 5.5%~6.7%; 与支系 I 间序列差异百分比为 24.8%~25.6%。因此, 乔治亚和佛罗里达的萼花臂尾轮虫隐种与支系 III 为同一谱系。来自中国芜湖的萼花臂尾轮虫隐种 (Wuhu China EU978878) 被归入支系 II, 其与支系 II 内部各克隆间序列差异百分比为 0.1%~0.5%; 与支系 I 内部各克隆间序列差异百分比为 24.4%~25.2%; 与支系 III 内部各克隆间序列差异百分比为 4.6%~6%。因此, 中国芜湖的萼花臂尾轮虫隐种与支系 II 为同一谱系; 而来自德克萨斯和澳大利亚的萼花臂尾轮虫隐种均作为一个单独的支系被独立出来, 德克萨斯萼花臂尾轮虫隐种 (Texas DQ071670) 与支系 I、支系 II 和支系 III 间的序列差异百分比分别为 25.9%~26.7%、4.5%~5.1% 和 3.8%~4.5%; 澳大利亚萼花臂尾轮虫隐种 (Australia DQ071671) 与支系 I、支系 II 和支系 III 间的序列差异百分比分别为 25%~25.8%、7.1%~7.8% 和 5.6%~6.9%。

2.3 种复合体内隐种 III 的遗传多样性、种群遗传

分化和系统地理结构

考虑到隐种 I 内仅含有儋州种群, 隐种 II 内含有儋州、广州和芜湖种群, 且芜湖种群仅有两个单倍型 (WH21 和 WH23)。因此, 下面的种群遗传分化和系统地理格局分析仅包括隐种 III 内的 6 个地理种群的 38 个单倍型 (由于儋州和广州种群都仅含有一个单倍型, 因此未被包括在内)。

隐种 III 的平均核苷酸多样性和单倍型多样性分别为 (0.0096 ± 0.0008) 和 (0.918 ± 0.018) , 均低于萼花臂尾轮虫种复合体的核苷酸多样性和单倍型多样性, 尤其是核苷酸多样性。各种群的核苷酸多样性 (π) 与单倍型多样性 (h) 之间并不呈现显著的相关关系。AMOVA 分析显示, 隐种 III 内各种群间具有较高的遗传分化水平 (种群间变异为 32.61%, 种群内变异为 67.39%, $F_{st}=0.3261$)。种群间净遗传距离 (D_a) 的分析显示, 徐州种群与其他各地种群间具有很高的 D_a 值; 种群间的分化程度 (F_{st}) 也同样遵循这种规律 (表 4)。

Mantel 检验结果表明, 隐种 III 内各地理种群间的遗传距离 (D_a) 和遗传分化程度 (F_{st}) (表 4) 并不随空间距离的增加而增大, 两对矩阵未发现有显著的相关性 ($P=0.999$); 萼花臂尾轮虫种复合体的 D_a 和 F_{st} (表 3) 与各采样点间的距离也无显著的相关性 ($P=0.923$)。

相关分析表明, 隐种 III 内地理种群的遗传学参数 (单倍型多样性、核苷酸多样性以及遗传分化指数) 与采样点的环境因子 (水温、年平均气温、pH 值和氨态氮浓度) 间均没有显著的相关性; 但采样点的年平均气温与萼花臂尾轮虫种复合体的核苷酸多样性呈显著正相关 ($r=0.720$, $P<0.05$), 与遗传分化指数呈显著负相关 ($r=-0.717$, $P<0.05$)。

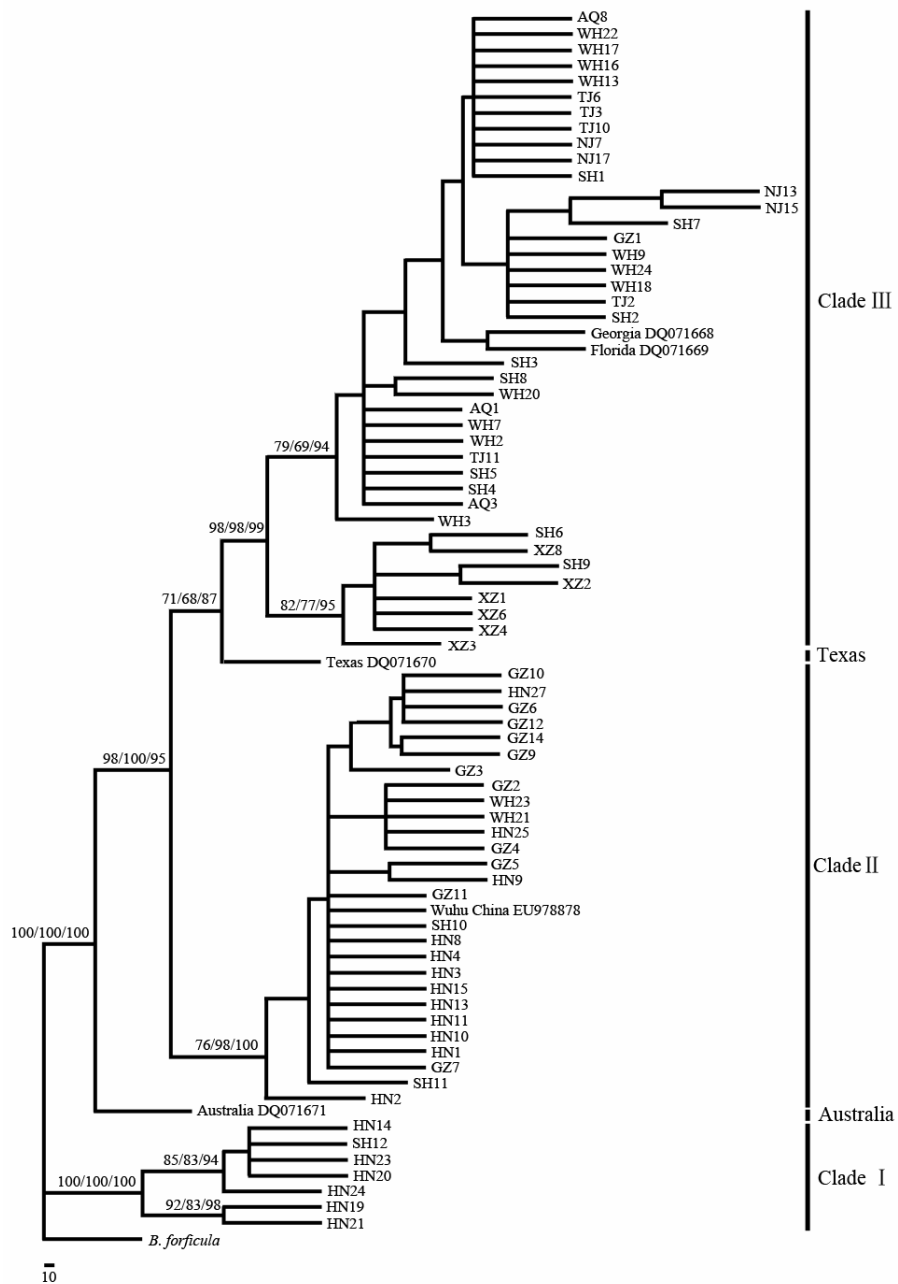


图 2 基于 ITS 序列的蓼花臂尾轮虫种复合体的 ML 系统发生树

Fig. 2 ML phylogenetic tree of *Brachionus calyciflorus* species complex based on ITS sequences

图中用斜杠隔开的数值分别代表 ML、MP 和 NJ 的自展值。

Values isolated by slashes represent ML, MP and NJ bootstrap support, respectively.

2.4 巢式支系分析

根据组巢原则得到的蓼花臂尾轮虫种复合体内 73 个单倍型的巢式支系图的拓扑结构(图 4)与贝叶斯及最大似然法系统树(图 2—3)基本一致。73 个单倍型组成了 16 个一级支系、6 个二级支系和 3 个三级支系。根据 Templeton et al (1992) 的

判断程序, 由于 3 个三级支系之间的分歧已超过 95% 的简约性连接置信限度, 因此这 3 个支系之间并没有连接。

经巢支设计, 蓼花臂尾轮虫种复合体内 73 个单倍型组成 3 个网络图(图 4)。网络图 I 仅由 7 个来自儋州的单倍型组成, 其中共享单倍型 SH12 可

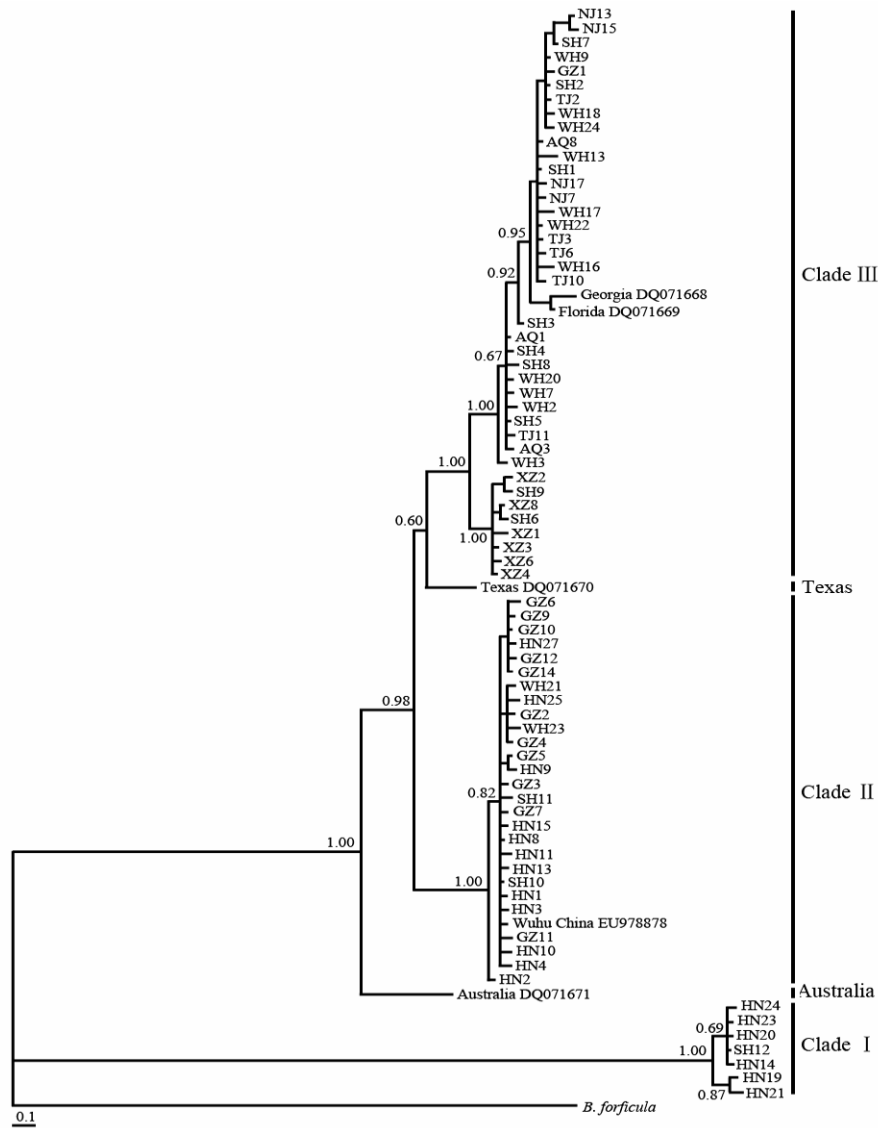


图 3 基于 ITS 序列的萼花臂尾轮虫种复合体的贝叶斯系统发生树

Fig. 3 Bayesian phylogenetic tree of *Brachionus calyciflorus* species complex based on ITS sequences

表 4 隐种 III 内各地理种群间平均净遗传距离 (D_a , 对角线上)、种群间遗传分化程度 (F_{st} , 对角线下)、种群内遗传分化程度 (F_{st} , 对角线)、核苷酸多样性和单倍型多样性

Tab. 4 Average pairwise difference between populations (D_a , above diagonal), F_{st} among (below diagonal) and within (on the diagonal) populations, nucleotide diversity and haplotype diversity in cryptic species III

| 种群 Populations | AQ | DZ | NJ | TJ | WH | XZ | 核苷酸多样性 Nucleotide diversity | 单倍型多样性 Haplotype diversity |
|-------------------|---------|--------|--------|---------|---------|--------|--------------------------------|-------------------------------|
| AQ | 0.3510 | 0.0003 | 0.0026 | -0.0002 | -0.0001 | 0.0139 | 0.0048±0.0031 | 0.917±0.092 |
| DZ | 0.0657 | 0.3575 | 0.0039 | 0.0006 | 0.0010 | 0.0144 | 0.0042±0.0028 | 0.750±0.097 |
| NJ | 0.2589 | 0.3451 | 0.2813 | 0.0015 | 0.0019 | 0.0061 | 0.0112±0.0061 | 0.735±0.077 |
| TJ | -0.0349 | 0.0978 | 0.1411 | 0.3153 | -0.0002 | 0.0113 | 0.0081±0.0046 | 0.923±0.060 |
| WH | -0.0071 | 0.1631 | 0.1797 | -0.0286 | 0.3284 | 0.0130 | 0.0066±0.0037 | 0.948±0.036 |
| XZ | 0.7648 | 0.7704 | 0.4498 | 0.6589 | 0.7098 | 0.3566 | 0.0043±0.0028 | 1.000±0.063 |

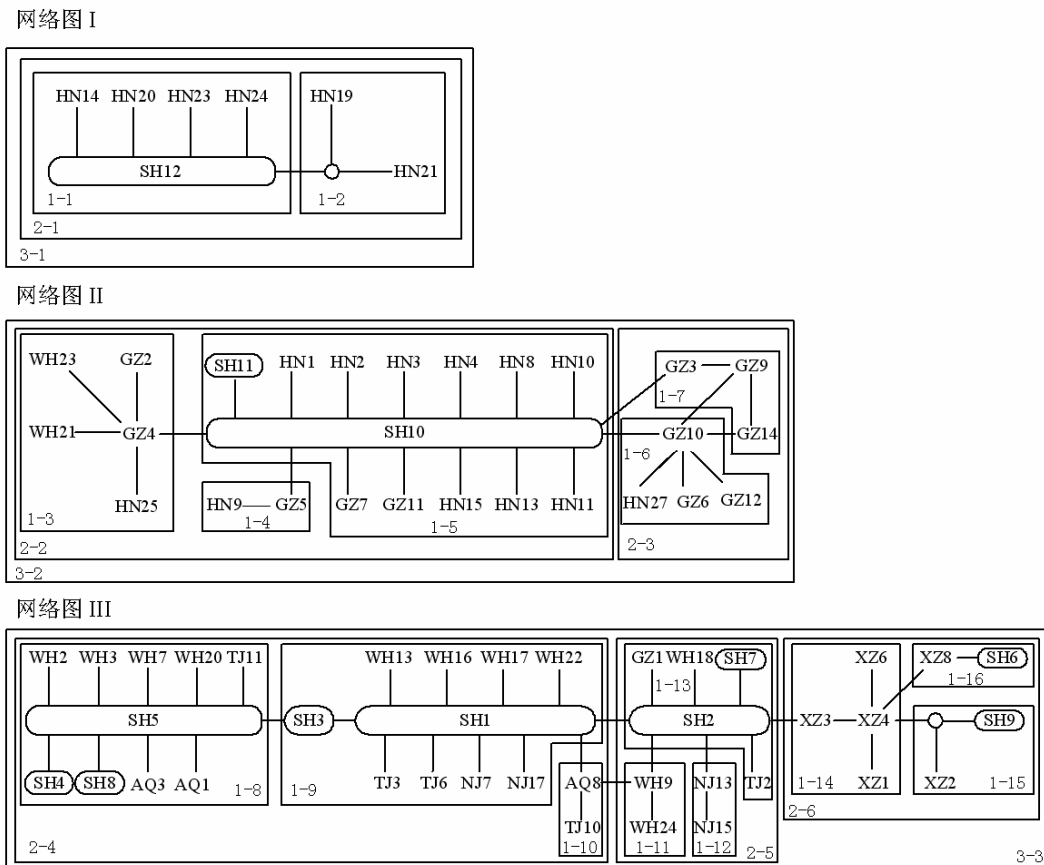


图 4 萼花臂尾轮虫种复合体内单倍型网络图和巢支设计

Fig. 4 Haplotype networks and nested clade design for all unique *Brachionus calyciflorus* species complex haplotypes. 圆角长方形圈围的是共享单倍型 (与表 2 相对应), 无框的为非共享单倍型, 巢式支系采用直角长方形圈围, 未采集到的单倍型用封闭的圆表示。

The shared haplotypes are enclosed in smooth-angle rectangles (shared haplotypes corresponding to Tab. 2), and non-shared haplotypes are unboxed. Nested clades are enfolded in square-edged rectangles. Unsampled haplotypes are represented by closed circles.

能为祖先单倍型; 网络图 II 中大部分是来自儋州 (13 个) 和广州 (11 个) 的单倍型, 此外还有两个来自芜湖的单倍型和一个共享单倍型 SH11; 剩下的所有单倍型被归入网络图 III, 其中在多个采样点间共享的单倍型 SH5 可能是最原始的单倍型。3 个网络图间具有显著的遗传分歧, 与单倍型系统发生分析结果相一致。

巢式支系分析 (NCA) 得到的所有组巢水平各个支系内的内支、末支和内外支的巢内距离 (D_c) 和巢间距离 (D_n) 之差以及显著性大小值 (P) 的结果见表 5。单倍型分布与其地理位点间的随机关系零假设在部分巢支中被拒绝, 呈现出一定的系统地理格局。根据检索表分析推测到的各个单倍型地理分布格局的一系列历史成因见表 6。支系 2-2、2-4 和 3-3 由长距离拓殖并可能伴随后期的栖息地片段

化形成; 支系 2-5, 由于距离隔离情况下有限的基因流造成的; 支系 3-2, 由于样本量有限而无法辨别是距离隔离还是长距离扩散影响了其地理分布格局。支系 3-1, 由于代表的是隐种 I, 且只包括一个地理种群, 故无法分析其地理格局。

3 讨论

3.1 萼花臂尾轮虫种复合体和隐种 III 的遗传多样性

由于遗传多样性大小会影响到物种的进化潜力, 所以通常被看作是判断种群历史和种群适应能力的间接指标 (Allendorf & Ryman, 2002; Bazin et al, 2006)。在种群遗传学中, 通常以杂合度或单倍型多样性 (h) 来检测种群的遗传变异。然而, 就线粒体 DNA 而言, 通过计算核苷酸多样性指数——

表 5 基于巢式支系图 (图 4), 应用程序 Geodis 2.5 对芎花臂尾轮虫种复合体内 73 个单倍型数据进行巢式支系分析 (NCA) 得到的有显著差异水平的巢内距离 (D_c) 和巢间距离 (D_n)

Tab. 5 Two distances with significant difference obtained from the nested cladistic analysis (NCA) of 73 haplotypic data of *Brachionus calyciflorus* complex based on the nested cladogram given in Fig. 4 and Geodis 2.5 program*

| 支系 Clade | 位置 Position | D_c | P | D_n | P | I-T D_c | P | I-T D_n | P |
|-------------|----------------|----------------------|-------|-----------------------|-------|-----------------------|-------|-----------------------|-------|
| 1-3 | T | | | 561.837 ^L | 0.030 | | | | |
| 1-5 | I | 262.338 ^S | 0.015 | | | | | | |
| 1-8 | T | | | 435.706 ^L | 0.031 | | | | |
| 1-9 | I | 318.768 ^S | 0.007 | 363.622 ^S | 0.004 | | | | |
| 1-12 | T | | | 145.362 ^S | 0.011 | | | | |
| 1-13 | I | 525.356 ^L | 0.019 | 513.576 ^L | 0.019 | 0.000 ^S | 0.018 | -414.706 ^S | 0.012 |
| 2-2 | T | 345.193 ^L | 0.010 | 344.145 ^L | 0.010 | -175.837 ^S | 0.041 | | |
| 2-3 | T | 80.182 ^S | 0.017 | 174.717 ^S | 0.010 | | | | |
| 2-4 | T | 405.342 ^L | 0.001 | 403.097 ^L | 0.002 | -102.438 ^S | 0.003 | -73.885 ^S | 0.005 |
| 2-5 | I | | | 460.237 ^L | 0.014 | 525.356 ^L | 0.006 | 343.432 ^L | 0.019 |
| 2-6 | T | 120.778 ^S | 0.001 | 114.799 ^S | 0.000 | | | | |
| 3-1 | T | 0.000 ^S | 0.000 | 1418.447 ^L | 0.000 | | | | |
| 3-2 | I | 299.187 ^S | 0.000 | 1066.926 ^L | 0.000 | | | | |
| 3-3 | T | 341.809 ^S | 0.000 | 458.412 ^S | 0.000 | | | 122.663 ^L | 0.034 |

* I: 内支; T: 末支; I-T: 内支两种距离与末支两种距离均值之差。对数据进行 1000 次随机选择以检测巢内距离 (D_c) 或巢间距离 (D_n) 是显著大或显著小, 显著性水平是 $P < 0.05$ (P 是一个随机产生的概率值, 它表示与观察值相等或更大 (更小), “S” 和 “L” 分别表示显著性小和大。

I, interior clade; T, tip clade; I-T, the average difference between interior vs. tip clades for both distance measures. Tests determine whether the within-clade distances (D_c) or nested clade distances (D_n) are significantly large (L) or significantly small (S) based on 1000 randomizations of the data, with their level of significance $P < 0.05$ where P is the probability of a randomly generated value being equal to or larger (smaller) than the observed value.

表 6 基于对芎花臂尾轮虫种复合体内 73 个单倍型数据的巢式支系分析结果 (表 5), 应用 Templeton (2004) 的检索表分析得到的一系列推论

Tab. 6 Chain of inference from the nested clade analysis of 73 haplotypic data of *Brachionus calyciflorus* complex (Tab. 5) using Templeton's (2004) inference key

| 分支 Clade | 卡方统计 Chi-square statistic | 概率 P-value | 推理链 Chain of inference | 推论 Inference |
|-------------|------------------------------|---------------|---------------------------|--|
| 2-2 | 11.386 | 0.031 | 1-2-3-5-6-13-Yes | 长距离拓殖并可能伴随后期的栖息地片段化 Long-distance colonization possibly coupled with subsequent fragmentation |
| 2-4 | 17.242 | 0.059 | 1-2-3-5-6-13-Yes | 长距离拓殖并可能伴随后期的栖息地片段化 Long-distance colonization possibly coupled with subsequent fragmentation 有限的基因流 |
| 2-5 | 15.400 | 0.019 | 1-2-3-4- No | Restricted gene flow with isolation by distance (restricted dispersal by distance in non-sexual species) 由于采样不足从而无法辨别是距离隔离还是长距离扩散 |
| 3-2 | 7.253 | 0.053 | 1-2-3-5-6-7-8-No | Sampling design inadequate to discriminate between isolation by distance (short-distance movements) vs. long-distance dispersal |
| 3-3 | 62.586 | 0.000 | 1-2-3-5-6-13-Yes | 长距离拓殖并可能伴随后期的栖息地片段化 Long-distance colonization possibly coupled with subsequent fragmentation |

在两个随机选择的 DNA 序列间平均每个核苷酸位点的差异数, 也许更能反映种群的遗传变异水平 (Nei & Li, 1979)。单倍型多样性和核苷酸多样性越高, 种群遗传多样性就越丰富。本研究中, 萼花臂尾轮虫种复合体的核苷酸多样性较高, 单倍型多样性也很高; 而萼花臂尾轮虫种复合体内隐种 III 的平均核苷酸多样性和单倍型多样性均低于萼花臂尾轮虫种复合体的核苷酸多样性和单倍型多样性, 尤其是核苷酸多样性指数; 这可能是由于萼花臂尾轮虫种复合体已分化为 3 个隐种的缘故。

3.2 萼花臂尾轮虫种复合体的系统发生关系

隐性物种形成在许多桡足类和枝角类等微型无脊椎动物中已被广泛研究 (Taylor & Hebert, 1992; Lee, 2000; Knowlton, 2000; Lee & Frost, 2002; Dodson et al, 2003; Penton et al, 2004; Kim et al, 2006)。此前的分子生物学研究已经表明在世界性分布的轮虫种复合体内, 核 DNA ITS 序列分歧较大, 萼花臂尾轮虫为 4%~6.8% (Gilbert & Walsh, 2005) 和 5.1%~8.8% (Cheng et al, 2008), 褶皱臂尾轮虫的 ITS1 区间序列差异为 3%~20% (Gómez et al, 2002b)。与此相似, 本研究中萼花臂尾轮虫种复合体内单倍型间序列差异百分比为 0%~25.3%, 平均 5.97%; 3 个支系间序列差异百分比为 4.2%~25.3%, 表明萼花臂尾轮虫实际上是一个包含 3 个隐种的种复合体。由于以其他种类无脊椎动物的分歧速率作为参考是不可靠的 (Thomas et al, 2006), 所以很难由 ITS 序列数据估测得到这 3 个隐种的分歧时间。在广州、儋州和芜湖采样点发现有萼花臂尾轮虫隐种的同域共存现象, 在儋州采样点有 3 个隐种同域共存 (隐种 I、隐种 II 和隐种 III), 广州和芜湖采样点各两个隐种 (隐种 II 和隐种 III), 其他各采样点均只有一个隐种。

3.3 隐种 III 的种群遗传分化和系统地理结构

栖息地片段化和有限的基因流是形成当前物种分布格局的主要原因, 它们可以阻碍种群间的基因交流而使其产生遗传分化, 甚至导致生殖隔离, 形成新的物种。在本研究中, 较高的遗传分化指数 ($F_{st}=0.3261$) 表明隐种 III 在各地理种群间分化显著; 根据 Templeton (2004) 检索表推测到的隐种 III 地理分布格局的历史成因包括长距离拓殖并可能伴随后期的栖息地片段化以及在距离隔离情况下的有限基因流。此外, 冰期瓶颈后拓殖种群优先到达并占领栖息地, 快速的种群增长阻碍了来自种

群间的有效基因流, 从而加速了地理种群间的遗传分化。

有些环境因子, 如水体的盐度和水温, 对姐妹种的分布和种群的遗传分化程度有重要影响 (Gómez et al, 1995; Lowe et al, 2007; Yu et al, 2008)。运用乙酸纤维素电泳法, Gómez et al (1995) 研究了西班牙卡斯特隆沿海 Torreblanca 湿地的 3 个间歇性池塘的褶皱臂尾轮虫种群的遗传变异, 结果发现克隆群之间的生态学特性存在特化现象, 且对应着特定的盐度和温度。在本研究中, 统计学分析表明, 采样点年平均气温与萼花臂尾轮虫种复合体的核苷酸多样性指数 (π) 呈显著的正相关, 与遗传分化指数 (F_{st}) 呈显著的负相关; 而其余环境因子与遗传多样性指数间均没有显著的相关性, 这表明萼花臂尾轮虫种复合体在各采样点间的遗传分化程度可能受到诸如气温等环境因子的影响。

一般来说, 轮虫、桡足类、枝角类和介形类动物均具有持久的奠基者效应、地域性的特有分布现象以及伴随着基因流潜在减少而存在的显著地理格局 (Boileau et al, 1992; Hebert & Wilson, 1994; Weider et al, 1999a; Gómez et al, 2000; Schon et al, 2000; Mills et al, 2007), 轮虫种群的遗传谱系间具有较强的地理空间结构, 基因流小, 且地理距离和遗传距离间具有显著的相关性 (Gómez et al, 2000)。然而, Hatton-Ellis et al (1998) 研究的淡水苔藓动物 *Cristatella mucedo* 以及 Dong & Niu (2004) 研究的萼花臂尾轮虫却没有呈现出显著的系统地理格局。在本研究中, 巢式支系分析表明, 有些单倍型 (如 SH1、SH2 和 SH5) 以较高的频率在多个采样点同时出现, 这些单倍型可能是祖先单倍型, 它们可能参与了冰期后的栖息地扩张, 并作为奠基者在各采样点保留下来, 从而形成了相似的地理分布格局。因此, 遗传距离和地理距离间并无显著的相关性。

3.4 萼花臂尾轮虫种复合体的演化历史

生物种群内和种群间的遗传变异在地理上的分布模式一直是进化遗传学家关注的核心问题之一 (Avise, 2000)。历史过程和环境因素均对物种分化和现有分布格局的形成具有重要影响。物种在进化史上发生的一些事件, 如物种分布区的扩张与退缩、奠基者效应、生境的片段化和重大地质事件等都会对种群现存的遗传变异水平产生影响。另外, 环境因素, 如山脉、河流等自然地理条件对生物扩

散具有一定的隔离屏障作用, 维持甚至加速了种群的局域性分化 (Hebert et al, 2003; Taylor et al, 1998; Cox & Hebert, 2001)。通过比较物种间或种群间的系统地理分布模式可以勘察物种或种群进化历史的一般模式, 揭示物种或种群的进化进程 (Bermingham & Avise, 1986; Hewitt, 2000)。

本研究发现, 网络图部分巢支呈现出一定的系统地理格局, 其所揭示的物种演化历史与通过分子系统学方法得到的萼花臂尾轮虫复合体的遗传分化是一致的; 但是种群遗传距离和地理距离间并无显著的相关性。在儋州采样点有 3 个隐种同域共存, 而在广州和芜湖地区均有两个隐种同域共存。

广州、儋州和芜湖地区的隐种共存可能与这些地理种群的进化历史、扩散和适应能力有关。通过孢粉学研究发现, 末次盛冰期以来的新仙女木事件 (Younger Dryas Event, YD) 在我国华南地区也有所表现, 这一事件在欧洲、北美和我国北方都早有记载 (Xiao et al, 1998)。约在 10 400 a BP 前后, 在我国南方南岭地区 (24° 15' N, 115° 2' E)——广东省和江西省的交界处 (图 1 阴影部分) 有一次持续数百年的气候降温波动, 但这一事件在我国南北方不同的气候带内的表现形式是不一样的, 南方地区不如北方地区明显和剧烈, 南方地区表现为凉、湿, 而北方地区表现为冷、干, 这可能与东亚季风活动效应有关 (Xiao et al, 1998)。因此, 本研究中的 3 个萼花臂尾轮虫隐种可能是在 YD 时期退缩并遗存于包括儋州和广州在内的南岭以南地区的多个残遗种避难所。在南岭山地屏障阻碍下, 3 个隐种在儋州和广州地区共存。新仙女木事件之后, 萼花臂尾轮虫复合体开始向中国北方地区扩散。隐种 III 的少数具有高拓殖能力的休眠体可能首先到达并占领北方各栖息地, 拓殖事件之后, 这些休眠体对局域环境的高度适应能力和快速的种群增长减少了来自种群间的基因流, 并且有效地增加了奠基者效应的持久性, 使得最初的建群者所携带的等位基因频率可以延续上万代。由于初期的拓殖者有能力快速地增长到较大的种群数量, 从

参考文献:

而在若干代以后迅速饱和和被占领的栖息地并独占特定的生态位, 这样就冲淡了后来的迁徙者的影响。在隐种 III 的“优先效应 (priority effects)” (Boileau et al, 1992; Muñoz et al, 2008) 作用下, 隐种 II 中只有两个单倍型通过长距离扩散拓殖到芜湖采样点, 没有繁殖体拓殖到更远的长江以北地区, 这可能与长江的阻隔或隐种 II 的扩散和适应能力较差有关。相比较而言, 隐种 I 仅仅分布于儋州地区, 连具有相似生境特点的栖息地, 如广州地区也未能成功拓殖, 这可能是由于种群过小、扩散能力差以及琼州海峡 (图 1) 的屏障作用导致的。

浮游动物的世界性分布已在多个种类中被证实, 这可能与其横贯大陆的长距离扩散或拓殖能力有关 (Gómez et al, 2002b; De Gelas & De Meester, 2005)。本研究发现, 萼花臂尾轮虫复合体在全球范围内的地理分布还可能与大陆板块构造运动有关。中生代晚期, 印度从马达加斯加分离, 正加速撞向劳亚大陆 (Laurasia)。值得注意的是, 此时北美仍与欧亚大陆相连, 澳大利亚仍然是南极洲的一部分。因此, 推测广泛分布在我国境内的萼花臂尾轮虫由于近似的自然地理条件和无明显的天然阻碍可能时常与北美大陆种群间发生基因交流, 并未发生隐种和种群间的遗传分化; 但由于特提斯海 (Tethys sea) 的阻隔, 劳亚大陆和澳洲大陆间的萼花臂尾轮虫发生了种群分化。新生代早期, 印度-欧亚板块的碰撞导致了青藏高原和喜马拉雅山脉的隆升, 使亚洲, 甚至全球范围内古地理、古气候和生物区系格局发生了剧烈的调整, 原本与南极洲相连的澳洲, 此时也开始迅速向北移动, 此后就再也未与其它大陆相连, 因此推测澳洲板块上的萼花臂尾轮虫隐种即澳大利亚隐种形成的时间最早, 与本研究结果吻合。此后全球大陆板块变化较小, 北美大陆和欧亚大陆的萼花臂尾轮虫未发生隐种分化, 同为隐种 III。本研究中 Texas 隐种、隐种 I 和隐种 II 的出现可能为萼花臂尾轮虫隐种 III 在北美大陆和欧亚大陆的同域性物种形成的产物。

Allendorf F, Ryman N. 2002. The Role of Genetics in Population Viability Analysis [M]// Beissinger SR, McCullough DR. Population Viability Analysis. Chicago: The University of Chicago Press, 50-85.

Avise JC, Arnold J, Ball RM. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics [J]. *Annu Rev Ecol Evol S*, 18: 489-522.

Avise JC, Hamrick JL. 1996. Conservation Genetics: Case Histories from

Nature [M]. New York: Chapman and Hall, 1-490.

Avise JC. 1998. The history and preview of phylogeography: A personal reflection [J]. *Mol Ecol*, 7: 371-379.

Avise JC. 2000. Phylogeography: The History and Formation of Species [M]. Cambridge: Harvard University Press, 447.

Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies [J]. *Mol Biol Evol*, 16: 37-48.

- Bazin E, Glémin S, Galtier N. 2006. Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals [J]. *Science*, **5773**: 570-572.
- Bermingham E, Avise JC. 1986. Molecular zoogeography of freshwater fishes in the southeastern United States [J]. *Genetics*, **113**: 939-965.
- Boileau MG, Hebert PDN, Schwartz SS. 1992. Non-equilibrium gene frequency divergence: Persistent founder effects in natural populations [J]. *J Evol Biol*, **5**: 25-39.
- Carvalho GR. 1994. Evolutionary Genetics of Aquatic Clonal Invertebrates: Concepts, Problems and Prospects [M]// Beaumont AR. Genetics and Evolution of Aquatic Organisms. London: Chapman and Hall, 291-322.
- Castelloe J, Templeton AR. 1994. Root probabilities for intraspecific gene trees under neutral coalescent theory [J]. *Mol Phylogenet Evol*, **3**: 102-113.
- Chen YF, Chen YY, He DK, Sui XY. 2006. Current status and perspective of biogeography study in Taiwan strait, China [J]. *Chn J Zool*, **41**(1): 118-122. [陈毅峰, 陈宜瑜, 何德奎, 隋晓云. 2006. 台湾海峡两岸生物地理学现状与展望. 动物学杂志, **41**(1): 118-122.]
- Cheng XF, Xi YL, Li HB. 2008. Seasonal changes in the genetic structure of a *Brachionus calyciflorus* population in Lake Liantang based on ITS sequences [J]. *Acta Zool Sin*, **54**(2): 245-255. [程新峰, 席贻龙, 李化炳. 2008. 基于 rDNA ITS 序列分析莲塘湖蓴花臂尾轮虫种群遗传结构的季节变化. 动物学报, **54**(2): 245-255.]
- Ciros-Pérez J, Gómez A, Serra M. 2001. On the taxonomy of three sympatric sibling species of the *Brachionus plicatilis* (Rotifera) complex from Spain, with the description of *B. ibericus* n. sp [J]. *J Plankton Res*, **23**: 1311-1328.
- Cox AJ, Hebert PDN. 2001. Colonization, extinction, and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean [J]. *Mol Ecol*, **10**: 371-386.
- De Gelas K, De Meester L. 2005. Phylogeography of *Daphnia magna* in Europe [J]. *Mol Ecol*, **14**: 753-764.
- De Meester L, Gómez A, Okamura B, Schwenk K. 2002. The monopolization hypothesis and the dispersal - gene flow paradox in aquatic organisms [J]. *Acta Oecol*, **23**: 121-135.
- De Meester L. 1993. Inbreeding and outbreeding depression in *Daphnia* [J]. *Oecologia*, **96**: 80-84.
- De Meester L. 1996. Local genetic differentiation and adaptation in freshwater zooplankton populations: Patterns and processes [J]. *Ecoscience*, **3**: 385-399.
- Derry AM, Hebert PDN, Prepas EE. 2003. Evolution of rotifers in saline and subsaline lakes: A molecular phylogenetic approach [J]. *Limnol Oceanogr*, **48**: 675-685.
- Dodson SI, Grishanin AK, Gross K, Wyngaard GA. 2003. Morphological analysis of some cryptic species in the *Acanthocyclops vernalis* species complex from North America [J]. *Hydrobiologia*, **500**: 131-143.
- Dong YW, Niu CJ. 2004. Sequence variability of mitochondrial COI region and population genetic structure of rotifer *Brachionus calyciflorus* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, **35**: 473-480. [董云伟, 牛翠娟. 2004. 蓴花臂尾轮虫(*Brachionus calyciflorus*) COI 基因序列变异及种群遗传结构分析. 海洋与湖沼, **35**(5): 473-480.]
- Edwards KJ, Gadek PA. 2001. Evolution and biogeography of *Alectryon* (Sapindaceae) [J]. *Mol Phylogenet Evol*, **20**: 14-26.
- Excoffier Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. version 3.0 [J]. *Evol Bioinform Online*, **1**: 47-50.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap [J]. *Evolution*, **39**: 783-791.
- Fernando P, Pfrender ME, Encalada SE, Lande R. 2000. Mitochondrial DNA variation, phylogeography and population structure of the Asian elephant [J]. *Heredity*, **84**: 362-372.
- Gilbert JJ, Walsh EJ. 2005. *Brachionus calyciflorus* is a species complex: Mating behavior and genetic differentiation among four geographically isolated strains [J]. *Hydrobiologia*, **546**: 257-265.
- Gilbert JJ. 1963. Mictic female production in the rotifer *Brachionus calyciflorus* [J]. *J Exp Zool*, **153**: 113-124.
- Gómez A, Adcock GJ, Lunt DH, Carvalho GR. 2002a. The interplay between colonization history and gene flow in passively dispersing zooplankton: Microsatellite analysis of rotifer resting egg banks [J]. *J Evol Biol*, **15**: 158-171.
- Gómez A, Carvalho GR, Lunt DH. 2000. Phylogeography and regional endemism of a passively dispersing zooplankton: Mitochondrial DNA variation in rotifer resting egg banks [J]. *Proc R Soc Lond B*, **267**: 2189-2197.
- Gómez A, Montero-pau J, Lunt DH, Serra M, Campillo S. 2007. Persistent genetic signatures of colonization in *Brachionus manjavacas* rotifers in the Iberian Peninsula [J]. *Mol Ecol*, **16**: 3228-3240.
- Gómez A, Serra M, Carvalho GR, Lunt DH. 2002b. Speciation in ancient cryptic species complexes: Evidence from the molecular phylogeny of *Brachionus plicatilis* (rotifera) [J]. *Evolution*, **56**: 1431-1444.
- Gómez A, Temprano M, Serra M. 1995. Ecological genetics of a cyclical parthenogen in temporary habitats [J]. *J Evol Biol*, **8**: 601-622.
- Gómez A. 1997. Ecological factors affecting gene flow in the *Brachionus plicatilis* complex (rotifera) [J]. *Oecologia*, **111**: 350-356.
- Gómez A. 2005. Molecular ecology of rotifers: From population differentiation to speciation [J]. *Hydrobiologia*, **546**: 83-99.
- Hairston NG. 1996. Zooplankton egg banks as biotic reservoirs in changing environments [J]. *Limnol Oceanogr*, **41**: 1087-1092.
- Hatton-Ellis TW, Noble LR, Okamura B. 1998. Genetic variation in a freshwater bryozoan. I: Populations in the Thames basin, UK [J]. *Mol Ecol*, **7**: 1575-1585.
- Hebert PDN, Wilson C. 1994. Provincialism in plankton: Endemism and allopatric speciation in Australian *Daphnia* [J]. *Evolution*, **48**: 1333-1349.
- Hebert PDN, Witt JDS, Adamowicz SJ. 2003. Phylogeographical patterning in *Daphnia ambigua*: Regional divergence and intercontinental cohesion [J]. *Limnol Oceanogr*, **48**: 261-268.
- Hebert PDN. 1987. Genetics of *Daphnia* [J]. *Mem Ist Ital Idrobiol*, **45**: 439-460.
- Hebert PDN. 1998. Variable Environments and Evolutionary Diversification in Inland Waters [M]// Carvalho GR. Advances in Molecular Ecology. Amsterdam: IOS Press, 267-290.
- Hewitt GM. 2000. The genetic legacy of the quaternary ice ages [J]. *Nature*, **405**: 907-913.
- Hutchinson GE. 1967. A Treatise on Limnology II: Introduction to Lake Biology and Limnoplankton [M]. New York: John Wiley and Sons, 1-1115.
- Innes DJ. 1991. Geographic patterns of genetic differentiation among sexual populations of *Daphnia pulex* [J]. *Can J Zool*, **69**: 995-1003.
- Ishida S, Taylor DJ. 2007. Mature habitats associated with genetic divergence despite strong dispersal ability in an arthropod [J]. *BMC Evol Biol*, **7**: 52.
- Johnson WE, Slattery JP, Eizirik E, Kim J, Raymond MM, Bonacic C, Cambre R, Crawshaw P, Nunes A, Seuánez HN, Moreira MAM, Seymour KL, Simon F, Swanson W, O'brien SJ. 1999. Disparate phylogeographic patterns of molecular genetic variation in four closely related South American small cat species [J]. *Mol Ecol*, **8**: 79-94.
- Kim K, Kotov AA, Taylor DJ. 2006. Hormonal induction of undescribed males resolves cryptic species of cladocerans [J]. *Proc R Soc Lond B*, **273**: 141-147.
- Knowlton N. 1993. Sibling species in the sea [J]. *Annu Rev Ecol Evol Syst*, **24**: 189-216.
- Knowlton N. 2000. Molecular genetic analyses of species boundaries in the sea [J]. *Hydrobiologia*, **420**: 73-90.

- Koste W. 1978. Rotatoria - die Rädertiere Mitteleuropas [M]. 2nd ed. Berlin: Bornträger, 673.
- Lee CE, Frost BW. 2002. Morphological stasis in the *Eurytemora affinis* species complex (Copepoda: Temoridae) [J]. *Hydrobiologia*, **480**: 111-128.
- Lee CE. 2000. Global phylogeography of a cryptic copepod species complex and reproductive isolation between genetically proximate 'populations' [J]. *Evolution*, **54**: 2014-2027.
- Li HB, Xi YL, Cheng XF, Xiang XL, Hu CB, Tao LX. 2008. Sympatric speciation in rotifers: Evidence from molecular phylogenetic relationships and reproductive isolation among *Brachionus calyciflorus* clones [J]. *Acta Zool Sin*, **54**(2): 256-264. [李化炳, 席贻龙, 程新峰, 项贤领, 胡存兵, 陶李祥. 2008. 轮虫同域性物种形成: 来自芡花臂尾轮虫克隆间的分子系统发育关系和生殖隔离的证据. *动物学报*, **54**(2): 256-264.]
- Li SH, Zhu H, Xia YZ, Yu MJ, Lin KE, Liu KS, Le ZY, Chen YX. 1959. The mass culture of unicellular green algae [J]. *Acta Hydrobiol Sin*, **4**: 462-472. [黎尚豪, 朱 蕙, 夏宜琤, 俞敏娟, 林坤二, 刘昆山, 乐正亚, 陈云霞. 1959. 单细胞绿藻的大量培养试验. *水生生物学集刊*, **4**: 462-472.]
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP version 5.0: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. *Bioinformatics*, **25**: 1451-1452.
- Lowe CD, Kemp SJ, Diaz-Avalos C, Montagnes DJS. 2007. How does salinity tolerance influence the distributions of *Brachionus plicatilis* sibling species? [J]. *Mar Biol*, **150**: 377-386.
- Mantel N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach [J]. *Cancer Res*, **27**: 209-220.
- Mergeay J, Verschuren D, De Meester L. 2005. Cryptic invasion and dispersal of an American *Daphnia* in East Africa [J]. *Limnol Oceanogr*, **50**: 1278-1283.
- Miao W, Yu YH, Shen YF, Zhang XY. 2003. Intraspecific phylogeography of *Carchesium polypinum* (Peritrichia, Ciliophora) from China, inferred from 18S-ITS1-5.8S ribosomal DNA [J]. *Sci Chin Ser C: Life Sci*, **47**(1): 11-17. [缪 炜, 余育和, 沈温芬, 张锡元. 2003. 螳状独缩虫种内分子系统地理学的研究. *中国科学 (C 辑)*, **33**(2): 151-159.]
- Mills S, Lunt DH, Gómez A. 2007. Global isolation by distance despite strong regional phylogeography in a small metazoan [J]. *BMC Evol Biol*, **7**: 225.
- Muñoz J, Gómez A, Green AJ, Figuerola J, Amat F, Rico C. 2008. Phylogeography and local endemism of the native Mediterranean brine shrimp *Artemia salina* (Branchiopoda: Anostraca) [J]. *Mol Ecol*, **17**: 3160-3177.
- Nei M, Li WH. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**: 5269-5273.
- Okamura B, Freeland J. 2002. Gene Flow and the Evolutionary Ecology of Passively Dispersing Aquatic Invertebrates [M]// Bullock JM, Kenward RE, Hails RS. Dispersal. London: Blackwell Scientific Publications, 194-218.
- Ortells R, Gómez A, Serra M. 2003. Coexistence of cryptic rotifer species: Ecological and genetic characterisation of *Brachionus plicatilis* [J]. *Freshw Biol*, **48**: 2194-2202.
- Ortells R, Snell TW, Gómez A, Serra M. 2000. Patterns of genetic differentiation in resting egg banks of a rotifer species complex in Spain [J]. *Arch Hydrobiol*, **149**: 529-551.
- Penton EH, Hebert PDN, Crease TJ. 2004. Mitochondrial DNA variation in North American populations of *Daphnia obtusa*: Continentalism or cryptic endemism? [J]. *Mol Ecol*, **13**: 97-107.
- Posada D, Crandall KA, Templeton AR. 2000. GeoDis: A program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes [J]. *Mol Ecol*, **9**: 487-488.
- Posada D, Crandall KA. 1998. Modeltest: Testing the model of DNA substitution [J]. *Bioinformatics*, **9**: 817-818.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. *Bioinformatics*, **19**: 1572-1574.
- Ruttner-Kolisko A. 1974. Plankton Rotifers [M]// Elster HJ, Ohle W. Die Binnengewässer. Stuttgart: Schweizerbartsche Verlagsbuchhandlung, 1-146.
- Schon I, Gandolfi A, Di Masso E, Rossi V, Griffiths HI, Martens K, Butlin RK. 2000. Persistence of asexuality through mixed reproduction in *Eucypris virens* (Crustacea, Ostracoda) [J]. *Heredity*, **84**: 161-169.
- Suatoni E. 2003. Patterns of Speciation in the Rotifer Species Complex, *Brachionus plicatilis* [M]. New Haven: Yale University, 115.
- Swofford DL. 2002. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods) [M]. Sunderland: Sinauer Associates.
- Taberlet P, Bouvet J. 1994. Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetics the brown bear (*Ursus arctos*) in Europe [J]. *Proc R Soc Lond B*, **255**: 195-200.
- Taylor DJ, Finston TL, Hebert PDN. 1998. Biogeography of a widespread freshwater crustacean: Pseudocongruence and cryptic endemism in the North American *Daphnia leavis* complex [J]. *Evolution*, **52**: 1648-1670.
- Taylor DJ, Hebert PDN. 1992. *Daphnia galeata mendotae* as a cryptic species complex with interspecific hybrids [J]. *Limnol Oceanogr*, **37**: 658-665.
- Templeton AR, Boerwinkle E, Sing CF. 1987. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I: Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila* [J]. *Genetics*, **117**: 343-351.
- Templeton AR, Crandall KA, Sing CF. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III: Cladogram estimation [J]. *Genetics*, **132**: 619-633.
- Templeton AR, Sing CF. 1993. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV: Nested analysis with cladogram uncertainty and recombination [J]. *Genetics*, **134**: 659-669.
- Templeton AR. 2004. Statistical phylogeography: Methods of evaluating and minimizing inference errors [J]. *Mol Ecol*, **13**: 789-809.
- Thomas JA, Welch JJ, Woolfit M, Bromham L. 2006. There is no universal molecular clock for invertebrates, but rate variation does not scale with body size [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **103**: 7366-7371.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Res*, **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 [J]. *Hydrobiologia*, **360**: 135-142.
- Wallace RL, Snell TW. 2001. Rotifera [M]// Thorp JH, Covich AP. Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 195-254.
- Weider LJ, Hobaek A, Colbourne JK, Crease TJ, Dufresne F, Hebert PDN. 1999a. Holarctic phylogeography of an asexual species complex. I: Mitochondrial DNA variation in arctic *Daphnia* [J]. *Evolution*, **53**: 777-792.
- Weider LJ, Hobaek A, Hebert PDN, Crease TJ. 1999b. Holarctic phylogeography of an asexual species complex. II: Allozymic variation and clonal structure in Arctic *Daphnia* [J]. *Mol Ecol*, **8**: 1-13.
- Xi YL, Chen YQ, Zhuge Y, Huang XF. 2003. Sequence analysis of rDNA

- 18s - 28s intergenic spacer regions from *Brachionus calyciflorus*, *B. bidentata*, *B. diversicornis* and *B. ngularis* in lake Donghu, China [J]. *Acta Hydrobiol Sin*, **27**(4): 427-430. [席贻龙, 陈月琴, 诸葛燕, 黄祥飞. 2003. 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*, **27**(4): 427-430.]
- Xiang XL, Xi YL, Hu HY. 2006. Phylogenetic relationships of *Brachionus* rotifers based on rDNA ITS 1 gene sequences [J]. *Acta Zool Sin*, **52**(6): 1067-1074.
- Xiao JY, Wang J, An ZS, Wu XH, Zhou WJ. 1998. Evidence for the Younger Dryas Event in the eastern part of Nanling Region [J]. *Acta Bot Sin*, **40**: 1079-1082. [萧家仪, 王建, 安芷生, 吴锡浩, 周卫建. 1998. 南岭东部新仙女木事件的孢粉学证据. *植物学报*, **40**(11): 1079-1082.]
- Yu Y, Yan Q, Feng W. 2008. Spatio-temporal heterogeneity of plankton communities in lake Donghu, China, as revealed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and its relation to biotic and abiotic factors [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, **63**: 328-337.
- Zhang JY. 2009. Taxonomical status and ecological difference of two *Brachionus calyciflorus* morphotypes [D]. Master thesis, Anhui Normal University, Wuhu. [张晋艳. 2009. 两种形态型萼花臂尾轮虫的分类地位和生态差异研究. 硕士学位论文, 安徽师范大学, 芜湖.]

2006—2009 年《动物学研究》发表论文被 SCI 期刊引用情况

近期, 本所图书馆通过 Web of Knowledge 中的 Web of Science, 在 SCI-e 上检索到 2006—2009 年《动物学研究》发表论文共有 65 篇被 SCI 期刊引用, 其引用的 SCI 期刊有 71 种, 总引次数为 109 次。其中, 英文论文 22 篇, 占全部引用文章的 32%。在这 65 篇文章中, 有的文章被引用次数达 6 次。

2006—2009 年《动物学研究》发表论文被引用的 SCI 期刊刊名及其 2008 年影响因子 (括号内)

- | | |
|--|--|
| Acta Chimica Sinica (0.682) | Journal of Alloys and Compounds (1.510) |
| Acta Ornithologica (0.882) | Journal of Chemical Ecology (2.327) |
| African Journal of Biotechnology (0.547) | Journal of Chemical Technology and Biotechnology (1.682) |
| American Journal of Primatology (1.681) | Journal of Experimental Marine Biology and Ecology (2.074) |
| Aquaculture (1.678) | Journal of Experimental Zoology Part B-Molecular and Developmental Evolution (3.364) |
| Aquatic Ecology (1.105) | Journal of Field Ornithology (0.991) |
| Archives of Iranian Medicine | Journal of Fish Biology (1.246) |
| Behavioural Brain Research (3.171) | Journal of Freshwater Ecology (0.331) |
| Behavioural Processes (1.441) | Journal of Genetics And Genomics (0.358) |
| Biochemical Systematics and Ecology (1.136) | Journal of Industrial And Engineering Chemistry (1.235) |
| Biodiversity and Conservation (1.473) | Journal of Materials Science (1.181) |
| Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2.531) | Journal of Molecular Evolution (2.762) |
| Bird Conservation International (0.965) | Journal of Physical Chemistry B (4.189) |
| Chemico-Biological Interactions (3.077) | Journal of Transcultural Nursing (1.000) |
| Childs Nervous System (1.351) | Journal of Wildlife Management (1.323) |
| Chinese Science Bulletin (0.683) | Journal of Zoology (1.669) |
| Chromosome Research (3.405) | Landscape and Urban Planning (1.953) |
| Climate Research (1.725) | Molecular Phylogenetics and Evolution (3.871) |
| Comparative Biochemistry and Physiology A—Molecular & Integrative Physiology (1.709) | Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine |
| Conservation Genetics (2.408) | Nanotoxicology (3.720) |
| Developmental Neurobiology (2.333) | Neurobiology of Learning and Memory (3.757) |
| Ecological Engineering (1.836) | Oryx (1.381) |
| Environmental Biology of Fishes (1.133) | Physiological Measurement (1.691) |
| Estuarine Coastal and Shelf Science (2.072) | Polish Journal of Ecology (0.443) |
| Fatigue & Fracture Of Engineering Materials & Structures (0.934) | Primates (1.670) |
| Fish Physiology and Biochemistry (0.841) | Progress in Biochemistry and Biophysics (0.211) |
| Fisheries Science (0.781) | Reviews in Fish Biology And Fisheries (1.792) |
| Folia Primatologica (1.548) | Romanian Journal of Legal Medicine |
| Free Radical Research (2.826) | Science in China Series C—Life Sciences (0.661) |
| Gene (2.578) | Sensors And Actuators A—Physical (1.724) |
| Genome Biology (6.153) | Sexual Development (1.000) |
| Hematology-Oncology Clinics of North America (2.108) | Toxicology and Industrial Health (0.700) |
| Human Immunology (3.061) | Zoological Science (1.100) |
| Ibis (1.443) | Zoological Studies (0.772) |
| Ichthyological Research (0.624) | Zootaxa (0.740) |
| International Journal of Primatology (1.788) | |

(corrected)