

基于ND4和ND5基因序列研究八种臂尾轮虫的系统关系和分类地位

程双怀^{1,2,3*}, 魏世祥¹, 张逸¹, 孙道琴¹, 江静¹,
穆维平¹, 席贻龙^{1,2,3}, 葛雅丽^{1,2,3}

(1. 安徽师范大学生命科学学院, 安徽 芜湖 241000;

2. 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;

3. 安徽省重要生物资源保护与利用研究省级重点实验室, 安徽 芜湖 241000)

摘要: 通过对尾突臂尾轮虫、裂足臂尾轮虫、剪形臂尾轮虫、方形臂尾轮虫、红臂尾轮虫、镰形臂尾轮虫、矩形臂尾轮虫和十指臂尾轮虫8种臂尾轮虫的ND4和ND5基因序列进行扩增、测序, 结合GenBank数据库中的褶皱臂尾轮虫、蓼花臂尾轮虫、转轮虫和旋轮虫的ND4和ND5基因序列, 使用MEGA6.0软件构建这12种轮虫系统发生树(NJ树、ME树、UPGMA树), 探讨了8种臂尾轮虫之间的系统关系。结果显示, 本研究所涉及的轮虫ND4和ND5基因序列差异百分比均值为40.3%, 可作为分子标记应用于轮虫属内种间系统关系研究; 系统树所显示亲缘关系与形态学研究基本一致, 均支持将十指臂尾轮虫、裂足臂尾轮虫归入臂尾轮属。

关键词: 轮虫; 臂尾轮属; ND4; ND5; 系统发生关系

中图分类号: Q 781; Q 959.18

文献标志码: A

轮虫动物门(Rotifera)约有2000多种物种。早期的轮虫分类及系统关系研究主要依据轮虫的形态学特征。随着分子生物学技术的发展和DNA测序费用的降低, 分子分析手段被逐渐应用到轮虫的分类和系统关系研究中。

ND4和ND5基因片段是线粒体DNA(mtDNA)上编码蛋白质基因, 已经有研究者将其作为分子标记应用于动物系统发生关系研究, 例如鱼类^[1-3]、两栖类和爬行类^[4-6]。在轮虫系统进化研究中尚无利用ND4和ND5基因片段的报道。本研究探讨线粒体DNA ND4和ND5基因用于轮虫系统演化研究的可行性, 同时为臂尾轮属系统发生关系研究提供新的线索。

臂尾轮属(*Brachionus*)隶属于单巢纲(Monogononta)游泳亚目(Ploima)臂尾轮科(Brachionidae), 属中许多种类广泛分布于各类水体, 大多数为

优势种。本属目前已发现34种, 我国已记载的有10多种, 但常见的不到10种^[7], 属中壶状臂尾轮虫(*B. urceolaris*)、红臂尾轮虫(*B. rubens*)、十指臂尾轮虫(*B. patulus*)、裂足臂尾轮虫(*B. diversicornis*)和褶皱臂尾轮虫(*B. plicatilis*)等在种类划分和系统发生上一直存有争议^[8-17]。程双怀等^[16]基于16S *rDNA*部分序列重建分子系统发生树, 结果显示十指臂尾轮虫应隶属于臂尾轮属, 且与镰形臂尾轮虫(*B. falcatus*)亲缘关系最近, 此结果与Xiang等^[17]利用基因间隔序列(ITS序列)、程双怀等^[14-15]利用CO I序、28S *rDNA*得出的研究结果相反, 而与Wulfert^[18]和Koste等^[19]应用传统的分类学方法所得的研究结果一致, 不支持Turner^[11]和Segers等^[12]将它另立新属的观点。因此十指臂尾轮虫的分类地位在分子水平也存在争议, 有待于进一步研究。以上研究均基于单个基因片段, 有的研究中所用

收稿日期: 2016-01-20 修回日期: 2016-06-24

资助项目: 国家自然科学基金(31470015); 安徽省自然科学基金(1408085MC66)

通信作者: 程双怀, E-mail: csh7311@mail.ahnu.edu.cn

分子标记片段较短, 如程双怀等^[16]基于16S *rDNA* 部分序列重建分子系统发生树时所用序列长度仅为389 bp。本研究拟扩增并测定臂尾轮属8个常见种类的*ND4*和*ND5*两种基因部分序列, 建立新的线粒体DNA分子标记用于轮虫种的鉴定和系统发生关系研究, 通过建立系统树探讨臂尾轮虫的系统发生关系, 解决一些传统分类学上的争议和物种的分类地位问题。

1 材料与方法

1.1 实验材料

研究用尾突臂尾轮虫(*B. caudatus*)、裂足臂尾轮虫、剪形臂尾轮虫(*B. forficula*)、方形臂尾轮

虫(*B. quadridentatus*)、矩形臂尾轮虫(*B. leydigi*)、红臂尾轮虫、镰形臂尾轮虫和十指臂尾轮虫分别采自芜湖市镜湖、汀棠湖、凤鸣湖和九莲塘等水体(表1)。轮虫采集后于实验室(25±1) °C、自然光照(光照强度约130 lx, L : D=14 : 10)条件下进行“克隆”培养。培养液采用Suga等^[21]的配方(pH=7.3), 以HB-4培养基^[7]培养至指数生长期的斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)为饵料, 当各“克隆”轮虫的个体数达100只以上时用轮虫培养液过滤冲洗, 饥饿72 h后用灭菌双蒸水冲洗, Eppendorf管收集, -20 °C保存备用。

1.2 总DNA提取

轮虫总DNA提取用纯化试剂盒(Wizard™)方

表 1 本研究中12个样本的核苷酸序列来源

Tab. 1 The origins of nucleotide sequences of 12 samples in this study

序号 number	种名 species	代号 code	GenBank 登录号 GenBank accession No.	序列来源 sequence source
1	十指臂尾轮虫 <i>B. patulus</i>	<i>B. pat</i>		本研究
2	镰形臂尾轮虫 <i>B. falcatus</i>	<i>B. fal</i>		本研究
3	矩形臂尾轮虫 <i>B. leydigi</i>	<i>B. ley</i>		本研究
4	尾突臂尾轮虫 <i>B. caudatus</i>	<i>B. cau</i>		本研究
5	剪形臂尾轮虫 <i>B. forficula</i>	<i>B. for</i>		本研究
6	红臂尾轮虫 <i>B. rubens</i>	<i>B. rub</i>		本研究
7	方形臂尾轮虫 <i>B. quadridentatus</i>	<i>B. qua</i>		本研究
8	裂足臂尾轮虫 <i>B. diversicornis</i>	<i>B. div</i>		本研究
9	褶皱臂尾轮虫 <i>B. plicatilis</i>	<i>B. pli</i>	AP009408	GenBank
10	萼花臂尾轮虫 <i>B. calyciflorus</i>	<i>B. cal</i>	JX463645 JX463643	GenBank
11	旋轮虫 <i>Philodina citrina</i>	<i>P. cit</i>	FR856884	GenBank
12	转轮虫 <i>Rotaria rotatoria</i>	<i>R. rot</i>	GQ304898	GenBank

法。具体步骤: 将轮虫从-20 °C的冰箱中取出, 在4 °C和室温梯度融化; 5000 r/min离心5 min, 在显微镜下用移液器小心吸去上层水; 加入30 μL预冷的核裂解液, 37 °C水浴30 min; 室温冷却5 min, 加入10 μL预冷蛋白沉淀液, 剧烈震荡10 s, 沉淀大量增多; 4 °C放置2 min, 18 °C 15 000 r/min离心5 min; 吸取上清液到新离心管中, 加入等量异丙醇和0.4 μL糖原(120 mg/mL)(加入后若无明显沉淀, 则加倍), 室温沉淀30 min; 15 000 r/min离心10 min, 这时离心管底部出现白色或褐色沉淀, 弃上清液, 干燥后加入30 μL 70%乙醇, 15000 r/min

离心5 min, 弃上清液, 室温干燥20 min, 10 μL无菌水溶解。

1.3 PCR扩增及序列测定

扩增反应在PTC-100TM扩增仪(MJ Research)上进行。参照褶皱臂尾轮虫^[21]和本实验室测序红臂尾轮虫的线粒体全序列合成PCR通用引物: ND4W1: 5'-CCTA(TAG)GGCTCATGTTGAGGC-3', ND5W2: 5'-ACAAGGGT(AG)GAAGAA TGAAC-3', 于上海Invitrogen公司合成。PCR相关试剂购于上海生工生物工程股份有限公司。PCR

反应体系总体积为25 μL , 采用宝生物TaKaRa LA Taq进行扩增, 包括1 $\times$ LA PCR Buffer (Mg^{2+} Plus) 2.5 μL , 0.4 mmol/L dNTP 2 μL , 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 每种引物各1 μL , 1.25 U LA Taq酶0.2 μL , 2 μL 基因组DNA。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s, 48 $^{\circ}\text{C}$ 退火50 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸3 min, 30个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

取5 μL PCR产物采用1%的琼脂糖凝胶进行电泳检验(图1), 得到目的条带后用Axyprep DNA凝胶回收试剂盒割胶纯化。将纯化产物与质粒载体pMD-T18连接, 蓝白筛选后送上海生工生物工程股份有限公司进行测序。

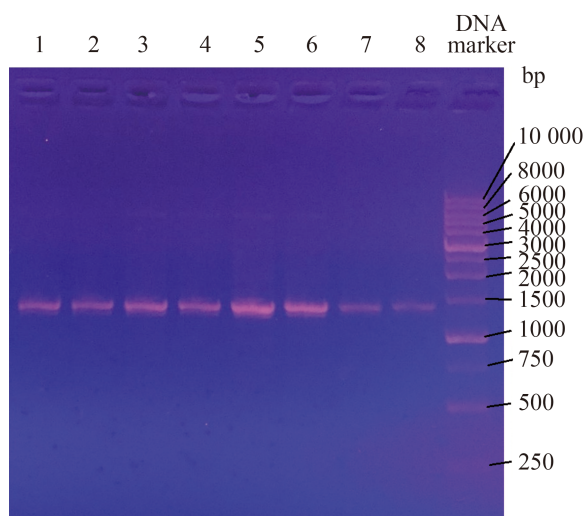


图1 PCR产物电泳图

1. 十指臂尾轮虫; 2. 镰形臂尾轮虫; 3. 矩形臂尾轮虫; 4. 尾突臂尾轮虫; 5. 剪形臂尾轮虫; 6. 红臂尾轮虫; 7. 方形臂尾轮虫; 8. 裂足臂尾轮虫

Fig. 1 Gel electrophoresis of PCR products

1. *B. patulus*; 2. *B. falcatus*; 3. *B. leydigi*; 4. *B. caudatus*; 5. *B. forficula*; 6. *B. rubens*; 7. *B. quadridentatus*; 8. *B. diversicornis*

1.4 系统发生分析

对测序结果进行处理并分析, 采用CLUSTAL X 1.81软件^[22]对DNA序列进行比对; 用Bioedit软件清除所有有缺失(gap)的同源序列, 用DNASTAR软件计算两两序列的序列差异百分比; 再用DnaSP3.5软件^[23]分析变异位点; 用MEGA 6.0软件^[24]计算不同序列间转换/颠换数; 采用DAMBE软件^[25]进行基因替换的饱和性分析。用邻接法/最小进化法和UPGMA法重建系统发生树。树的构建使用MEGA软件, 采用P-distance距离模型; 系统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。

2 结果

对本研究测序的8个轮虫样品和GenBank中萼花臂尾轮虫、褶皱臂尾轮虫、转轮虫(*Rotaria rotatoria*)、旋轮虫(*Philodina citrina*)ND4和ND5基因部分核苷酸序列分析显示, ND4和ND5基因序列中, A、C、G、T碱基的平均含量分别为23.5%、14.7%、13.6%和48.2%, 其中A+T含量(71.7%)较丰富, 明显大于C+G含量(28.3%)。经比对, 在1229个位点中共有168个保守位点, 占13.7%; 1061个变异位点, 占86.3%; 单一位点262个, 简约信息位点889个。用MEGA 6.0软件分析碱基的转换/颠换数, 转换与颠换之比平均为0.713。用DNASTAR软件分析发现, 序列差异百分比最大值为59.2, 最小值为23.7, 平均值为40.3(表2)。从遗传距离及转换、颠换数散点饱和图(图2)中可以看出, 颠换数高于转换数, 随着遗传距离的增加, 转换和颠换数均伴有线性增加, 颠换未出现饱和现象, 转换趋向饱和。构建的三种系统发生树中(图3, 4, 5), 外群的转轮虫和旋轮虫聚为一支, 所有的臂尾轮属轮虫聚为一支; 红臂尾轮虫和方形臂尾轮虫、剪形臂尾轮虫和尾突臂尾轮虫、裂足臂尾轮虫和十指臂尾轮虫总是分别两两聚在一起; 矩形臂尾轮虫总是和红臂尾轮虫、方形臂尾轮虫聚在一起。

3 讨论

通过比对褶皱臂尾轮虫和红臂尾轮虫线粒体序列的保守区域, 选择了处在同一个线粒体环(*B. plicatilis*和*B. rubens*均是双环线粒体结构)上, 进化速率适中且相邻的ND4和ND5基因作为标记, 来研究臂尾轮属种间系统进化关系。设计通用引物并扩增出8种臂尾轮属轮虫的ND4和ND5部分基因序列, 通过对所得序列进行处理及分析, 基于不同的替代模型和建树方法, 重建了此8种臂尾轮属轮虫的分子系统树。

本研究所设计的通用引物在多数臂尾轮虫中都有扩增产物, 表明引物设计较成功, 该引物还可用于其他臂尾轮虫ND4和ND5基因的扩增, 同时也可用于臂尾轮属轮虫的分子鉴定。

基于ND4和ND5双基因标记的系统进化树中各轮虫的亲缘关系与形态学的分类结果基本一致。红臂尾轮虫、方形臂尾轮虫和矩形臂尾轮虫都是具有一定吸附性的营固着生活的轮虫, 在三

表 2 12个样品ND4和ND5基因序列转换/颠换数(对角线上)及差异百分比(对角线下)

Tab. 2 Numbers of transitions/ transversions (above diagonal) and percentage of divergence (below diagonal) for ND4 and ND5 gene sequences in 12 samples

	<i>B. cal</i> 萼花臂 尾轮虫	<i>B. pat</i> 十指臂 尾轮虫	<i>B. fal</i> 镰形臂 尾轮虫	<i>B. pli</i> 褶皱臂 尾轮虫	<i>B. ley</i> 矩形臂 尾轮虫	<i>B. for</i> 剪形臂 尾轮虫	<i>B. cau</i> 尾突臂 尾轮虫	<i>B. rub</i> 红臂尾 轮虫	<i>B. qua</i> 方形臂 尾轮虫	<i>B. div</i> 裂足臂 尾轮虫	<i>R. rot</i> 转轮 虫	<i>P. cit</i> 旋轮 虫
<i>B. cal</i> 萼花臂尾轮虫	28/28	33/32	36/32	34/32	30/35	28/32	28/30	28/32	28/39	43/68	41/76	
<i>B. pat</i> 十指臂尾轮虫	39	22/25	26/23	23/20	17/26	18/23	20/21	17/21	16/25	40/64	41/66	
<i>B. fal</i> 镰形臂尾轮虫	43	34.4	22/25	19/21	18/25	17/22	18/20	17/22	19/25	40/59	37/60	
<i>B. pli</i> 褶皱臂尾轮虫	43.8	35	34.8	23/23	25/23	24/25	23/23	22/25	24/28	48/62	57/62	
<i>B. ley</i> 矩形臂尾轮虫	43.3	32	30.7	34.2	19/21	18/21	18/17	18/16	20/23	48/62	46/62	
<i>B. for</i> 剪形臂尾轮虫	43.3	32.4	32.8	35.3	30.7	16/18	16/20	17/20	16/23	43/60	41/65	
<i>B. cau</i> 尾突臂尾轮虫	41	31.6	30.5	35.4	29.9	26.7	16/18	15/21	20/21	38/59	37/62	
<i>B. rub</i> 红臂尾轮虫	40	31.1	29.7	34.4	27.2	28.5	27.5	14/15	19/23	39/58	39/57	
<i>B. qua</i> 方形臂尾轮虫	41.2	29.6	30.5	34.6	27.1	29	28.3	23.7	17/25	41/56	40/59	
<i>B. div</i> 裂足臂尾轮虫	44.4	31.5	33.2	37.2	32.6	30.3	31.3	31.9	32	40/65	42/63	
<i>R. rot</i> 转轮虫	58	56.2	54.7	57.4	57.5	55.9	54.2	54.2	54.2	56.4	13/22	
<i>P. cit</i> 旋轮虫	59.2	57	54.4	59.2	57	56.6	55	54.2	54.8	56.6	27.7	

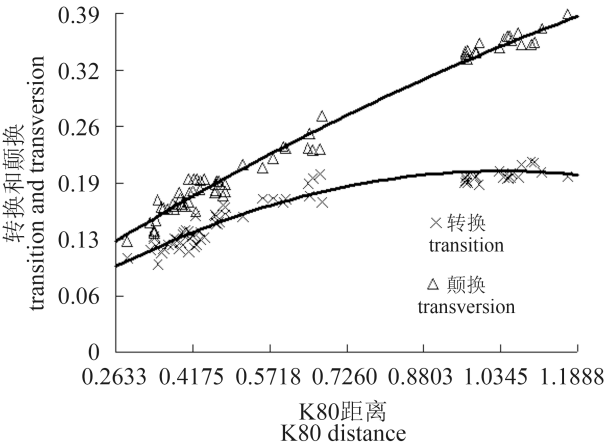


图 2 转换/颠换数与遗传距离的关系

Fig. 2 The relationship of the genetic distance vs. the numbers of transition and transversion

个系统树发生中均聚合在一起。剪形臂尾轮虫和尾突臂尾轮虫都是小型营浮游生活的轮虫，在三个系统发生树中也均聚合在一起。三个系统发生树中，十指臂尾轮虫均存在于臂尾轮属中间，和裂足臂尾轮虫聚在一起，支持十指臂尾轮虫隶属于臂尾轮属。在三个系统发生树中，萼花臂尾轮虫并未聚在臂尾轮属轮虫分支内部，可能原因是从GenBank得到的萼花臂尾轮虫数据来自于cDNA，带来了部分序列的偏差。

线粒体基因组由于其分子量小、易测序、母

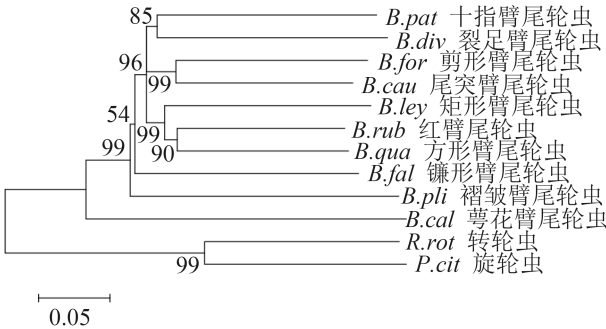


图 3 基于ND4和ND5基因序列构建的12种样本系统发生树(NJ树)

Fig. 3 The phylogenetic tree of twelve rotifers based on ND4 and ND5 gene sequences (NJ)

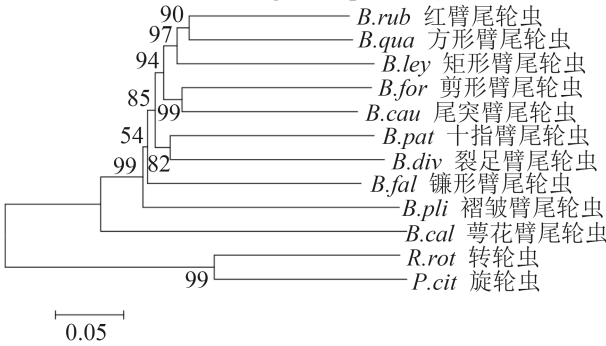


图 4 基于ND4和ND5基因序列构建的12种样本系统发生树(ME树)

Fig. 4 The phylogenetic tree of twelve rotifers based on ND4 and ND5 gene sequences (ME)

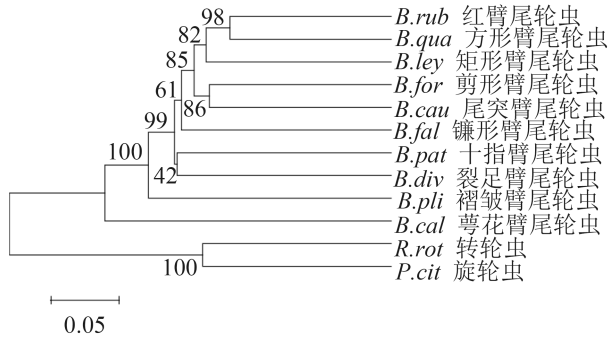


图 5 基于ND4和ND5基因序列构建的12种样本系统发生树(UPGMA)

Fig. 5 The phylogenetic tree of twelve rotifers based on ND4 and ND5 gene sequences (UPGMA)

系遗传和进化速率适中等方面的原因, 被广泛应用于分子系统学分析。ND4和ND5这两个基因都是线粒体基因组中的蛋白编码基因, 常用来作为分子系统学分析的分子标记^[1-6]。除此之外, 12S *rDNA*^[26]、16S *rDNA*^[26]、CO I^[14]和*Cytb*^[26]基因也经常被应用于分子系统学分析。有些类群甚至用线粒体基因组中的全部十二种蛋白编码基因序列进行系统发生关系分析, 这样分析的序列比较长, 得到的结果可信度高。但由于轮虫很多种类在实验室中尚未建立克隆培养方法, 且线粒体基因组全序列已经被测定的轮虫种类较少, 目前已报道的轮虫线粒体基因组全序列分别为: 褶皱臂尾轮虫^[21]、褶皱臂尾轮虫(*B. koreanus*)^[27]、旋轮虫^[28]和转轮虫^[29], 因此需要进一步研究。而如ND4和ND5等基因短片段序列的测定, 为线粒体基因组全序列的测定奠定了基础。

参考文献:

- [1] 丁言伟, 彭作刚, 张训蒲, 等. 黄颡鱼属两种鱼类的线粒体ND4基因序列变异性分析[J]. 水生生物学报, 2006, 30(4): 413-419.
Ding Y W, Peng Z G, Zhang X P, et al. Mitochondrial DNA ND4 gene sequences variation of two *Pelteobagrus* species[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2006, 30(4): 413-419(in Chinese).
- [2] 刘思情, 张家波, 唐琼英, 等. 基于ND4和ND5基因序列分析的鳅超科鱼类系统发育关系[J]. 动物学研究, 2010, 31(3): 221-229.
Liu S Q, Zhang J B, Tang Q Y, et al. Phylogenetic relationships among Cobitoidea based on mitochondrial ND4 and ND5 gene sequences[J]. Zoological Research, 2010, 31(3): 221-229(in Chinese).
- [3] 张四明, 张亚平, 郑向忠, 等. 12种鲟形目鱼类mtDNA ND4L-ND4基因的序列变异及其分子系统学[J]. 中国科学(C辑), 1999, 29(6): 607-614.
Zhang S M, Zhang Y P, Zheng X Z, et al. Molecular phylogenetic systematics of twelve species of Acipenseriformes based on mtDNA ND4L-ND4 gene sequence analysis[J]. Science in China Series C: Life Sciences, 1999, 29(6): 607-614(in Chinese).
- [4] Nie L W, Song J L, Zhang Y, et al. Phylogenetic relationships of the freshwater turtles (*Clemmys complex*) inferred from ND4 gene sequence of mtDNA[J]. Journal of Anhui Normal University (Natural Science), 2007, 30(3): 343-348.
- [5] 王湘君, 赵尔宓. 华北地区的短尾蝮分类地位的确定及短尾蝮种下分类的探讨[J]. 四川动物, 2008, 27(2): 172-177.
Wang X J, Zhao E M. Revised the taxonomic status of *Gloydius blomhoffii dubitatus* and infraspecific categories of *G. brevicaudus*[J]. Sichuan Journal of Zoology, 2008, 27(2): 172-177(in Chinese).
- [6] 胡启平, 黄程新, 许淑茹, 等. 基于线粒体ND4基因和核c-mos基因初步探讨广西拟水龟和艾氏拟水龟的系统发生[J]. 四川动物, 2013, 32(2): 180-186.
Hu Q P, Huang C X, Xu S R, et al. Primary phylogenies of *Mauremys guangxiensis* and *Mauremys iversoni* inferred from DNA sequences of mitochondrial ND4 gene and nuclear c-mos gene[J]. Sichuan Journal of Zoology, 2013, 32(2): 180-186(in Chinese).
- [7] 章宗涉, 黄祥飞. 淡水浮游生物研究方法[M]. 北京: 科学出版社, 1991.
Zhang Z S, Huang X F. Research Methods of Freshwater Plankton[M]. Beijing: Science Press, 1991(in Chinese).
- [8] 诸葛燕. 中国典型地带轮虫的研究[D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 1997.
Zhu G Y. Studies on taxonomy and distribution of Rotifer in the six typical zones of china[D]. Wuhan: Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, 1997(in Chinese).
- [9] 王家楫. 中国淡水轮虫志[M]. 北京: 科学出版社, 1961: 69-77.
Wang J J. The Freshwater Rotifers in China[M]. Beijing: Science Press, 1961: 69-77(in Chinese).

- [10] 鲍蕾, 牛翠娟, 马蕊, 等. 裂足轮虫还是裂足臂尾轮虫[J]. 北京师范大学学报(自然科学版), 2003, 39(3): 397-401.
- Bao L, Niu C J, Ma R, *et al.* Rotifer *Brachionus diversicornis* or *Schizocerca diversicornis*[J]. Journal of Beijing Normal University (Natural Science), 2003, 39(3): 397-401(in Chinese).
- [11] Turner P. The rotifer genus *Platyias* Haring (1913) in the neotropics[J]. Acta Limnologica Brasiliensia, 1990, 3: 741-756.
- [12] Segers H, Murugan G, Dumont H J. On the taxonomy of the brachionidae: Description of *Platyonus* n. gen. (Rotifera, Monogononta)[J]. Hydrobiologia, 1993, 268(1): 1-8.
- [13] Hagiwara A, Kotani T, Snell T W, *et al.* Morphology, reproduction, genetics, and mating behavior of small, tropical marine *Brachionus* strains (Rotifera)[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1995, 194(1): 25-37.
- [14] 程双怀, 席貽龙, 项贤领, 等. 基于线粒体CO I基因序列探讨臂尾轮属的系统发生和几种轮虫的分类地位[J]. 动物分类学报, 2007, 32(2): 328-334.
- Cheng S H, Xi Y L, Xiang X L, *et al.* Phylogenetic relationships within *Brachionus* and taxonomical status of several rotifer species based on analyses of the mitochondrial CO I gene[J]. Acta Zootaxonomica Sinica, 2007, 32(2): 328-334(in Chinese).
- [15] 程双怀, 席貽龙, 项贤领, 等. 基于28S *rDNA*基因序列研究十种臂尾轮虫的系统关系和分类地位[J]. 动物分类学报, 2007, 32(3): 599-605.
- Cheng S H, Xi Y L, Xiang X L, *et al.* Phylogenetic relationship and taxonomic status of ten *Brachionus* species (rotifera) inferred from 28S *rDNA* gene[J]. Acta Zootaxonomica Sinica, 2007, 32(3): 599-605(in Chinese).
- [16] 程双怀, 席貽龙. 基于16S *rDNA*序列探讨十种臂尾轮虫的系统关系和分类地位[J]. 动物分类学报, 2009, 34(4): 934-940.
- Cheng S H, Xi Y L. Phylogenetic relationship and taxonomic status of ten *Brachionus* species (rotifera) inferred from 16S *rDNA* sequence[J]. Acta Zootaxonomica Sinica, 2009, 34(4): 934-940(in Chinese).
- [17] 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.
- [18] Wulfert K. Revision der rotatorien-gattung *Platyias* Haring 1913[J]. Limnologica, 1965, 3: 41-64.
- [19] Koste W, Shiel R J. Rotifera from Australian inland waters. II. Epiphanidae and Brachionidae (Rotifera: Monogononta)[J]. Invertebrate Taxonomy, 1987, 1(7): 949-1021.
- [20] Gilbert J J. Mictic female production in the rotifer *Brachionus calyciflorus*[J]. Journal of Experimental Zoology, 1963, 153(2): 113-123.
- [21] Suga K, Welch D B M, Tanaka Y, *et al.* Two circular chromosomes of unequal copy number make up the mitochondrial genome of the rotifer *Brachionus plicatilis*[J]. Molecular Biology and Evolution, 2008, 25(6): 1129-1137.
- [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 analyses tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 24: 4876-4882.
- [23] Rozas J, Sánchez-Delbarrio J C, Messeguer X, *et al.* DnaSP DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods[J]. Bioinformatics, 2003, 19(18): 2496-2497.
- [24] Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al.* MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [25] Xia X H. Data Analysis in Molecular Biology and Evolution[M]. New York: Kluwer Academic Publishers, 2000.
- [26] 罗育发. 线粒体DNA标记技术及其在蛛形学研究中的应用[J]. 赣南师范学院学报, 2005, 26(6): 58-60.
- Luo Y F. A mark technology of mitochondrial DNA and it's application of study on arachnology[J]. Journal of Gannan Teachers' College, 2005, 26(6): 58-60(in Chinese).
- [27] Hwang D S, Suga K, Sakakura Y, *et al.* Complete mitochondrial genome of the monogonont rotifer, *Brachionus koreanus* (Rotifera, Brachionidae)[J]. Mitochondrial DNA, 2014, 25(1): 29-30.
- [28] Weber M, Wey-Fabrizius A R, Podsiadlowski L, *et al.* Phylogenetic analyses of endoparasitic Acanthocephala

- based on mitochondrial genomes suggest secondary loss of sensory organs[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2013, 66(1): 182-189.
- [29] Min G S, Park J K. Eurotatorian paraphyly: revisiting phylogenetic relationships based on the complete mitochondrial genome sequence of *Rotaria rotatoria* (Bdelloidea: Rotifera: Syndermata)[J]. *BMC Genomics*, 2009, 10: 533.

Phylogenetic relationship and taxonomic status of eight *Brachionus* species (Rotifera) inferred from ND4 and ND5 genes

CHENG Shuanghuai ^{1,2,3*}, WEI Shixiang ¹, ZHANG Yi ¹, SUN Daoqin ¹,
JIANG Jing ¹, MU Weiping ¹, XI Yilong ^{1,2,3}, GE Yali ^{1,2,3}

(1. College of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China;

2. Provincial Key Laboratory of Biotic Environment and Ecological Safety in Anhui, Wuhu 241000, China;

3. Anhui Provincial Key Laboratory of the Conservation and Exploitation of Biological Resources, Wuhu 241000, China)

Abstract: Partial portions of ND4 and ND5 genes from *Brachionus caudatus*, *B. diversicornis*, *B. forficula*, *B. quadridentatus*, *B. rubens*, *B. falcatus*, *B. leydigi*, *B. patulus* were amplified and sequenced. Combined with ND4 and ND5 genes of *B. plicatilis*, *B. calyciflorus*, *Rotaria rotatoria* and *Philodina citrina* from GenBank, phylogenetic trees of neighbor-joining (NJ), minimum-evolution (ME) and unweighted pair-group method using an arithmetic average (UPGMA) methods were built with MEGA6.0 software to reveal their phylogenetic relationships and resolve some taxonomy problems. The results showed that the average percentage of divergence for ND4 and ND5 genes sequences in 12 samples was 40.3%. ND4 and ND5 genes were suitable for researching the phylogenesis and evolution of rotifera species in the genus. The relationships of *Brachionus* showing from the phylogenetic trees were basically consistent with morphological studies. All the three trees showed that *B. patulus* and *B. diversicornis* were confirmed to belong to the genus *Brachionus*.

Key words: Rotifera; *Brachionus*; ND4; ND5; phylogenetic relationship

Corresponding author: CHENG Shuanghuai. E-mail: csh7311@mail.ahnu.edu.cn

Funding projects: Natural Science Foundation of China (31470015); Natural Science Foundation of Anhui Province (1408085MC66)