

# 萼花臂尾轮虫种复合体内三个姐妹种的形态差异

席贻龙\*, 李化炳, 程新峰

(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:**应用单因子方差分析和判别分析方法, 分别比较了采自芜湖市 3 个自然水体的萼花臂尾轮虫种复合体内 3 个姐妹种(分别以克隆 HE1 和 HE5、克隆 HE3 和 SE1、克隆 LE9 为代表)的成体和幼体的形态差异。结果表明, 克隆 HE3 成体的各形态参数均最小, 而克隆 HE1 和 LE9 成体的各形态参数间无显著的差异; 克隆 HE1 和 HE3 幼体的前中棘刺间距离和后侧棘刺长度、克隆 LE9 和 HE1 幼体的前侧棘刺间距离以及前中棘刺和侧棘刺间距离均无显著性差异, 轮虫幼体的其它形态参数均以克隆 LE9 最长, 克隆 HE1 次之, 克隆 HE3 最短。对克隆 HE1、HE3 和 LE9 幼体有明显差异的形态参数所作的分布图显示, 它们的分布区有很高程度的重叠。以判别分析建立的判别函数对 3 姐妹种成体的综合判别率中形态分析 I 为 47.8%, 形态分析 II 为 55.6%; 对 3 姐妹种幼体的综合判别率中形态分析 I 和 II 均为 71.1%; 两种形态分析对克隆 HE1 判别准确率均较低, 分别为 0—76.7% 和 0—74.2%; 依据形态特征无法准确甄别萼花臂尾轮虫姐妹种。

**关键词:**萼花臂尾轮虫种复合体; 姐妹种; 形态特征; 判别分析

## Morphometric differences among three sibling species in *Brachionus calyciflorus* species complex

XI Yilong\*, LI Huabing, CHENG Xinfeng

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

**Abstract:** Morphometric differences of neonates and adults of clone HE1 and HE5, clone HE3 and SE1, and clone LE9 which respectively represented three sibling species in *Brachionus calyciflorus* species complex collected from three water bodies in Wuhu City were compared by means of one-way ANOVA and discriminant analysis. The results showed that all morphometric parameters of clone HE3 adult were the smallest, but those of the other two clones were similar. The distance between the two anterior medial spines and the posterior lateral spine length of clone HE1 and HE3 neonates as well as the distances between the two anterior lateral spines and between anterior lateral and medial spines of clone LE9 and HE1 neonates were similar, but all the other morphometric parameters were the longest for clone LE9 neonates but the shortest for clone HE3 neonates. The distribution regions of morphometric parameters with statistical differences were extensive overlap. Discriminant analysis showed that the total discriminant accuracies of the discriminant functions for the adults of the three clones in morphometric analysis I and II was 47.8% and 55.6%, respectively, while those of neonates were both 71.1%. The identification accuracies based on morphometric analysis I and II for clone HE1 were low and 0—76.7% and 0—74.2%, respectively. The morphometric characteristics used in this study is unsuitable to accurately identify sibling species in *Brachionus calyciflorus* species complex.

**Key Words:** *Brachionus calyciflorus* species complex; sibling species; morphometric characteristics; discriminant analysis

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(30770352, 30499341); 安徽省优秀青年基金资助项目(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资助项目(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资助项目

收稿日期: 2009-04-12; 修订日期: 2009-06-16

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

在分子生物学等技术出现之前,人们主要依据形态学特征对动物进行分类学研究。由于某些物种间很难从形态上区分,Mayr<sup>[1]</sup>提出了姐妹种的概念。随着分子生物学技术的发展及其在轮虫和枝角类等水生无脊椎动物分类研究中的应用,人们发现姐妹种普遍存在于这些动物类群中<sup>[2-8]</sup>。对姐妹种的正确认识不仅是研究物种多样性的需要,也是人们对生态位划分、种群和群落生态学以及物种形成机制等进化生态学问题进行研究的前提和基础。因此,有必要寻找更多适合姐妹种甄别研究的方法。

已有的研究表明,以等位酶、线粒体 CO I 基因序列、rDNA ITS1 序列和核糖体 16S rDNA 序列等为分子标记的生化遗传和分子生物学方法在轮虫姐妹种甄别研究中具有明显的优势<sup>[6-7,9-11]</sup>,以生殖隔离为终点的交配实验也不失为姐妹种鉴定的有效途径<sup>[5-6,8-9,11-14]</sup>,而形态学方法是否适合此方面的研究尚无定论。目前已知,褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*)是一个至少包含 14 个姐妹种的种复合体<sup>[8]</sup>,而表明褶皱臂尾轮虫是一个由大、小两种形态型组成的种复合体的证据首次来自 Fu 等<sup>[15]</sup>的形态判别分析;Campillo 等<sup>[16]</sup>、Kotani 等<sup>[17]</sup>和 Fontaneto 等<sup>[18]</sup>的研究却表明褶皱臂尾轮虫种复合体内姐妹种间存在形态停滞,形态判别分析不适宜于褶皱臂尾轮虫种复合体内姐妹种的准确甄别。萼花臂尾轮虫(*B. calyciflorus*)也是一个种复合体<sup>[9,11]</sup>,且普遍存在周期性或地方性的形态变异<sup>[19]</sup>。如果可以依据形态特征对萼花臂尾轮虫种复合体内各姐妹种进行准确甄别,将有助于正确理解轮虫种群动态等的过程和机理;反之,人们通常揭示的轮虫种群变动规律等实质上停留在种复合体水平。然而,目前有关萼花臂尾轮虫种复合体内姐妹种间形态判别分析研究尚未见报道,此方法是否适宜也有待进一步研究。

本研究应用 Motic 图像采集和测量装置分别对采自芜湖市莲塘湖和安徽师范大学荷花塘等水体中的萼花臂尾轮虫 3 个姐妹种<sup>[11,20]</sup>成体和幼体的各形态参数进行了测量,并对成体和幼体进行了判别分析,旨在弥补国内外此方面研究之不足,为轮虫姐妹种的甄别研究积累形态学资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 轮虫的来源

实验用萼花臂尾轮虫于 2006 年采自芜湖市 3 个自然水体中。采样后,随机挑取样品中的非混交雌体,并于 18℃、自然光照(光照强度约 130lx, L:D = 14:10)条件下进行克隆培养。培养液采用 Gilbert<sup>[21]</sup>配方(pH 值 7.3),所用的饵料为 HB-4 培养基培养的、处于指数增长期的斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)。对最终建立的 17 个克隆进行 COI 和 ITS1 基因序列分析,结合生殖隔离,共发现 3 个姐妹种<sup>[11]</sup>。本研究中,分别以克隆 HE1 和 HE5、克隆 HE3 和 SE1、克隆 LE9 代表 3 个姐妹种。

### 1.2 形态测量分析

从处于指数增长期的试管中随机吸取大量带卵的非混交雌体,其中一部分(约 50 个)直接用 4% 甲醛固定后于 4℃ 冰箱中保存,用于成体形态测量;另一部分置于特制的玻璃杯中培养,培养条件同上。培养过程中,每间隔 2h 观察 1 次,取刚孵化出的轮虫幼体约 50 个用 4% 甲醛固定后于 4℃ 冰箱中保存,用于幼体形态测量。

本实验用 Motic 图像采集和测量装置分别对各克隆成体和幼体(样本量均为 30 个)进行了形态测量。参照 Fu 等<sup>[15]</sup>和 Ciro-Pérez 等<sup>[4]</sup>的方法,本研究所测 10 个形态参数包括:(A)前中棘刺长;(B)前侧棘刺长;(C)两前中棘刺间距离;(D)两前侧棘刺间距离;(E)前中、侧棘刺间距离;(F)背凹深度;(G)头部口径;(H)被甲宽度;(I)被甲长度;(J)后侧棘刺长(图 1)。

### 1.3 数据的处理和分析

应用 Excel 2003 统计软件,以单因素方差分析法分别对克隆 HE1、HE3 和 LE9 轮虫成体和幼体各形态参数的差异显著性进行统计学分析,用 SNK-q 检验法对有显著性差异的样本均数间进行多重比较,分别对 3 克隆轮虫有明显差异的形态特征做分布图。为了探讨轮虫种复合体的形态特点在不同姐妹种之间分类的贡献程度,应用 SPSS11.5 统计软件对 3 克隆轮虫的形态测量结果进行判别分析。根据 Ciro-Pérez 等<sup>[4]</sup>的观点,一些常用的轮虫形态测量指标会因固定剂的作用而发生变化从而影响测量的准确性和结果的真实性,因此,在

本统计分析的过程中,作者使用两次聚类分析和判别分析,第 1 次(形态分析 I)使用的是原始数据,即包含所有的形态测量指标(A-J);第 2 次(形态分析 II)有选择地使用一些受固定剂作用而易发生变化的形态测量指标(F、H、I)。

将克隆 HE5、SE1 轮虫的相应形态测量参数代入上述处理所得的典型判别函数进行预测分类,以函数值最大的判别函数所对应的姐妹种名作为判别结果,分别计算判别准确率:

判别准确率  $P_1 = O / M \times 100\%$

判别准确率  $P_2 = O / N \times 100\%$

综合判别率 =  $\sum_{i=1}^k Ai / \sum_{i=1}^k Bi$

式中, $O$  为某克隆轮虫判别正确的个体数, $M$  为该克隆轮虫实际个体数, $N$  为判入该克隆轮虫实际个体数, $A_i$  为第  $i$  克隆轮虫判别正确的个体数, $B_i$  为第  $i$  克隆轮虫实际个体数, $k$  为克隆数。

2 结果与分析

2.1 萼花臂尾轮虫种复合体内 3 姐妹种的形态差异

2.1.1 成体形态差异

单因子方差分析和多重比较表明,姐妹种 HE3 轮虫成体的各形态参数值均最小,而其余两姐妹种轮虫成体的各形态参数值间均无显著的差异(表 1)。

表 1 萼花臂尾轮虫种复合体内 3 姐妹种成体的形态特征(均数 ± 标准误)

Table 1 Morphometric characteristics of adult of three sibling species in <i>B. calyciflorus</i> species complex (Mean ± SE)			
形态参数 Morphometric parameters	姐妹种 LE9 Sibling species LE9	姐妹种 HE1 Sibling species HE1	姐妹种 HE3 Sibling species HE3
前中棘刺长 Anterior medial spine length/ $\mu\text{m}$	84.5 ± 3.2a	84.3 ± 3.1a	52.3 ± 2.0b
前侧棘刺长 Anterior lateral spine length/ $\mu\text{m}$	62.6 ± 2.6a	61.7 ± 2.6a	41.9 ± 1.8b
前中棘刺间距离 Distance between anterior medial spines/ $\mu\text{m}$	63.8 ± 3.0a	63.9 ± 3.0a	33.0 ± 1.6b
前侧棘刺间距离 Distance between anterior lateral spines/ $\mu\text{m}$	186.6 ± 7.1a	187.3 ± 7.3a	117.6 ± 4.1b
前中、侧棘刺间距离 Distance between anterior lateral and medial spines/ $\mu\text{m}$	61.2 ± 2.2a	60.6 ± 2.2a	41.3 ± 1.6b
背凹深度 Dorsal sinus depth/ $\mu\text{m}$	84.0 ± 3.2a	82.3 ± 3.2a	49.2 ± 2.0b
头部口径 Head aperture/ $\mu\text{m}$	153.0 ± 5.4a	151.6 ± 5.1a	108.4 ± 2.6b
被甲宽度 Lorica width/ $\mu\text{m}$	185.2 ± 5.1a	183.3 ± 4.6a	159.1 ± 2.1b
被甲长度 Lorica length/ $\mu\text{m}$	293.4 ± 5.2a	293.4 ± 5.2a	238.7 ± 2.5b
后侧棘刺长 Posterior lateral spine length/ $\mu\text{m}$	46.4 ± 1.3a	47.2 ± 1.0a	27.6 ± 1.2b

相同字母表示同一行数据的组间无显著差异

2.1.2 幼体形态差异

克隆 HE1 和 HE3 幼体的前中棘刺间距离和后侧棘刺长度、克隆 LE9 和 HE1 幼体的前侧棘刺间距离以及前中棘刺和侧棘刺间距离均无显著性差异,轮虫幼体的其它形态参数均以克隆 LE9 最长,克隆 HE1 次之,克隆 HE3 最短(表 2)。

对 3 姐妹种幼体的 6 个有明显差异的形态特征所作的分布图表明,它们的分布区有很大的重叠(图 2)。

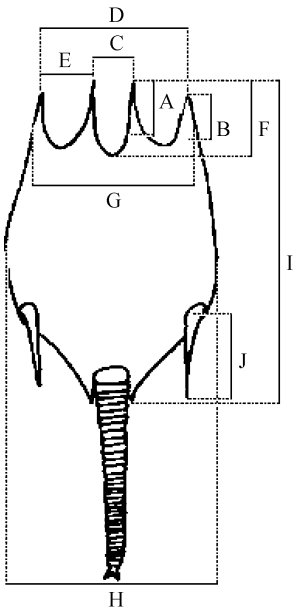


图 1 萼花臂尾轮虫的形态测量参数

Fig. 1 Morphometric parameters of *B. calyciflorus*

A: 前中棘刺长, B: 前侧棘刺长, C: 两前中棘刺间距离, D: 两前侧棘刺间距离, E: 前中、侧棘刺间距离, F: 背凹深度, G: 头部口径, H: 被甲宽度, I: 被甲长度, J: 后侧棘刺长

表 2 萼花臂尾轮虫种复合体内 3 姐妹种幼体的形态特征(均数 ± 标准误)

Table 2 Morphometric characteristics of neonates of three sibling species in *B. calyciflorus* species complex (Mean ± SE)

形态参数 Parameters	姐妹种 LE9 sibling species LE9	姐妹种 HE1 sibling species HE1	姐妹种 HE3 sibling species HE3
前中棘刺长 Medial spine length/ $\mu\text{m}$	73.4 ± 2.7c	51.9 ± 2.4b	39.5 ± 1.9a
前侧棘刺长 Lateral spine length/ $\mu\text{m}$	50.4 ± 1.8c	40.3 ± 2.0b	32.5 ± 1.7a
前中棘刺间距离 Distance between medial spines/ $\mu\text{m}$	34.7 ± 2.0b	28.0 ± 2.0a	27.1 ± 2.2a
前侧棘刺间距离 Distance between lateral spines/ $\mu\text{m}$	119.9 ± 4.6b	113.4 ± 4.6b	89.6 ± 3.4a
前中、侧棘刺间距离 Distance between lateral and medial spines/ $\mu\text{m}$	41.7 ± 1.6b	40.3 ± 1.9b	30.5 ± 1.6a
背凹深度 Dorsal sinus depth/ $\mu\text{m}$	68.4 ± 2.9c	47.1 ± 2.6b	37.7 ± 1.9a
头部口径 Head aperture/ $\mu\text{m}$	115.7 ± 4.1c	99.3 ± 3.1b	85.6 ± 2.8a
被甲宽度 Lorica width/ $\mu\text{m}$	145.5 ± 4.4c	126.7 ± 3.9b	107.6 ± 2.6a
被甲长度 Lorica length/ $\mu\text{m}$	230.7 ± 5.1c	196.2 ± 4.9b	176.8 ± 2.5a
后侧棘刺长 Posterior lateral spine length/ $\mu\text{m}$	39.7 ± 1.1b	31.0 ± 2.2a	27.4 ± 1.1a

相同字母表示同一行数据的组间无显著差异

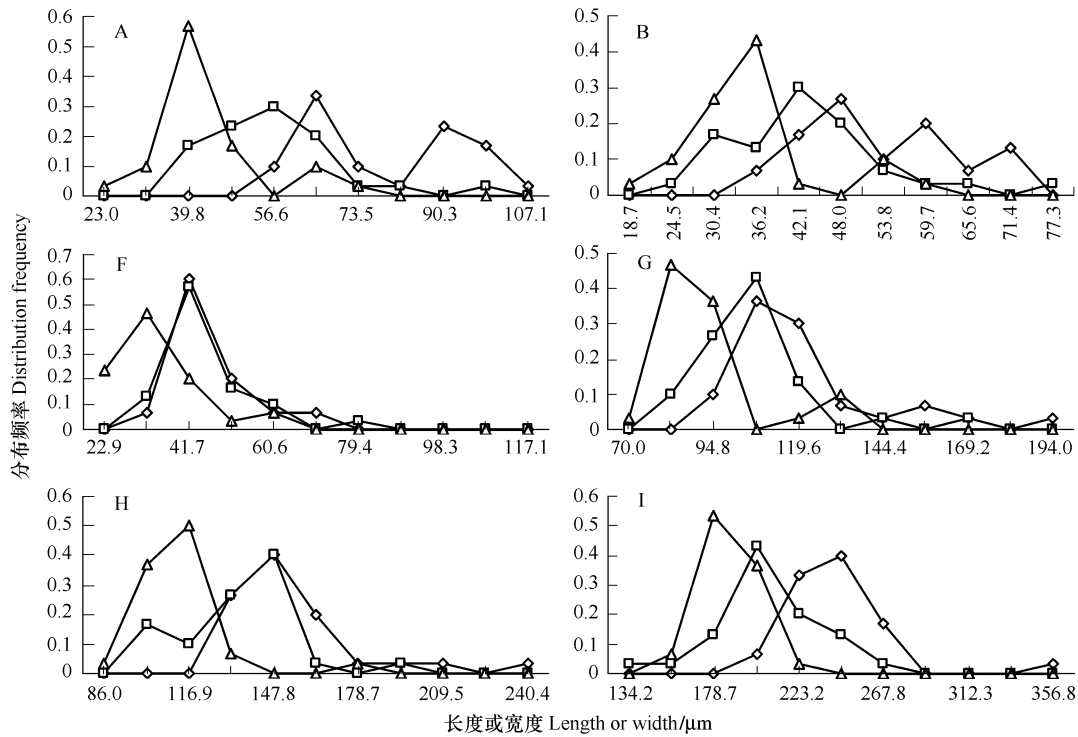


图 2 萼花臂尾轮虫种复合体内 3 姐妹种幼体的 6 个有明显差异的形态参数的分布

Fig. 2 Distribution in the discriminant axis selected by step-wise discriminant analysis on 6 differently morphometric characteristics of neonates of three sibling species in *B. calyciflorus* species complex

◇ 姐妹种 LE9; △ 姐妹种 HE3; 姐妹种 HE1; A:前中棘刺长,B:前侧棘刺长,F:背凹深度,G:头部口径,H:被甲宽度,I:被甲长度

## 2.2 萼花臂尾轮虫种复合体内 3 姐妹种形态特征的判别分析

### 2.2.1 成体形态特征判别分析

在两次判别分析中,函数 1 的累计方差均较大,均为 99.8%。在形态分析 I 中,得到的 2 个判别函数的特征值分别为 6.690 和 0.765;在形态分析 II 中,得到的 2 个判别函数的特征值分别为 1.849 和 0.004(表 3)。为验证上述判别公式的实用性,对测量样本按判别公式进行预测分类,判别结果见表 4。判别准确率  $P_1$  为 46.7%—100%,判别准确率  $P_2$  为 47.1%—100%,形态分析 I、形态分析 II 的综合判别率分别为 68.9% 和 66.7%。经交叉验证后, $P_1$  为 20.0%—100%, $P_2$  为 15.4%—100%,形态分析 I 和形态分析 II 的综合判别率分别为 47.8% 和 55.6%。将克隆 HE5 和 SE1 轮虫成体的相应形态测量参数典型判别函数进行外验证后, $P_1$

和  $P_2$  均为 0—100%, 形态分析 I 和形态分析 II 的综合判别率分别为 50.0% 和 46.7%。除姐妹种 HE3 外, 其余两姐妹种的交叉验证结果、原判别结果及外判别结果差别较大且准确率很低, 说明上述判别公式不稳定且不可靠。

表 3 萼花臂尾轮虫种复合体内 3 姐妹种成体形态特征的判别分析

Table 3 Discriminant analysis on morphometric characteristics of adult of three sibling species in <i>B. calyciflorus</i> species complex								
参数 Parameters	形态分析 I Discrimination I				形态分析 II Discrimination II			
	函数 1 Function 1		函数 2 Function 2		函数 1 Function 1		函数 2 Function 2	
	系数 Coefficients	典型相关性 R	系数 Coefficients	典型相关性 R	系数 Coefficients	典型相关性 R	系数 Coefficients	典型相关性 R
A	1.252	0.545 *	-0.413	-0.151	—	—	—	—
B	-2.186	0.412 *	0.974	0.261	—	—	—	—
C	-0.430	0.412 *	0.645	0.233	—	—	—	—
D	1.039	0.382 *	-1.687	0.297	—	—	—	—
E	-1.371	0.370 *	0.421	0.162	—	—	—	—
F	1.648	0.401	0.621	0.690 *	0.613	0.764 *	0.580	0.552
G	0.218	0.287	-0.023	0.478 *	—	—	—	—
H	-0.256	0.203	0.515	0.459 *	-0.396	0.387	1.054	0.463 *
I	0.730	0.326	-0.327	0.430 *	0.875	0.783 *	-1.086	-0.177
J	0.730	0.332	-0.190	0.428 *	—	—	—	—
特征值 Eigenvalue	6.690		0.765		1.849		0.004	
累计方差 Cumulative proportion of variance/%	99.8		0.2		99.8		0.2	

“系数”指典型判别函数标准化后的系数, \* 该变量与任一判别函数之间存在着最大的绝对相关性, “—”表示未检测的参数, A: 前中棘刺长, B: 前侧棘刺长, C: 两前中棘刺间距离, D: 两前侧棘刺间距离, E: 前中、侧棘刺间距离, F: 背凹深度, G: 头部口径, H: 被甲宽度, I: 被甲长度, J: 后侧棘刺长

表 4 萼花臂尾轮虫种复合体内 3 姐妹种成体判别分析正确率

Table 4 Accuracy of discriminant analysis on morphometric characteristics of adult of three sibling species in <i>B. calyciflorus</i> species complex							
验证方法 Tests methods	判别正确率 Accuracy/%	形态分析 I Discrimination I			形态分析 II Discrimination II		
		LE9	HE1	HE3	LE9	HE1	HE3
内验证 Original test	$P_1$	46.7	60.0	100	46.7	56.7	96.7
	$P_2$	53.8	47.1	100	50.0	51.5	100
	综合 Total		68.9			66.7	
交互验证 Cross-validated test	$P_1$	23.3	20.0	100	20.0	50	96.7
	$P_2$	22.6	15.4	100	19.4	51.7	96.7
	综合 Total	47.8	55.6				
外验证 Outgroup test	$P_1$	—	0	100	—	0	93.3
	$P_2$	—	0	50	—	0	100
	综合 Total	50.0	46.7				

“—”表示没有检测; LE9、HE1 和 HE3 分别代表姐妹种 LE9、姐妹种 HE1 和姐妹种 HE3

以典型判别函数为坐标并将各姐妹种轮虫成体进行分类的散点图显示, 所测量的轮虫分为 2 个类群, 姐妹种 HE3 与姐妹种 LE9、HE1 区分得较为明显, 而后两者的分布区有不同程度的重叠现象(图 3); 形态分析 I 和 II 散点图基本一致, 只是在各类的类重心上有不同程度的偏移。

2.2.2 幼体形态特征判别分析

在两次判别分析中, 函数 1 的累计方差均较大, 分别为 88.9% 和 97.7%。在形态分析 I 中, 得到的 2 个判别函数的特征值分别为 2.841 和 0.355; 在形态分析 II 中, 得到的 2 个判别函数的特征值分别为 1.285 和 0.029(表 5)。为验证上述判别公式的实用性, 对测量样本按判别公式进行预测分类, 判别结果见表 6。判别

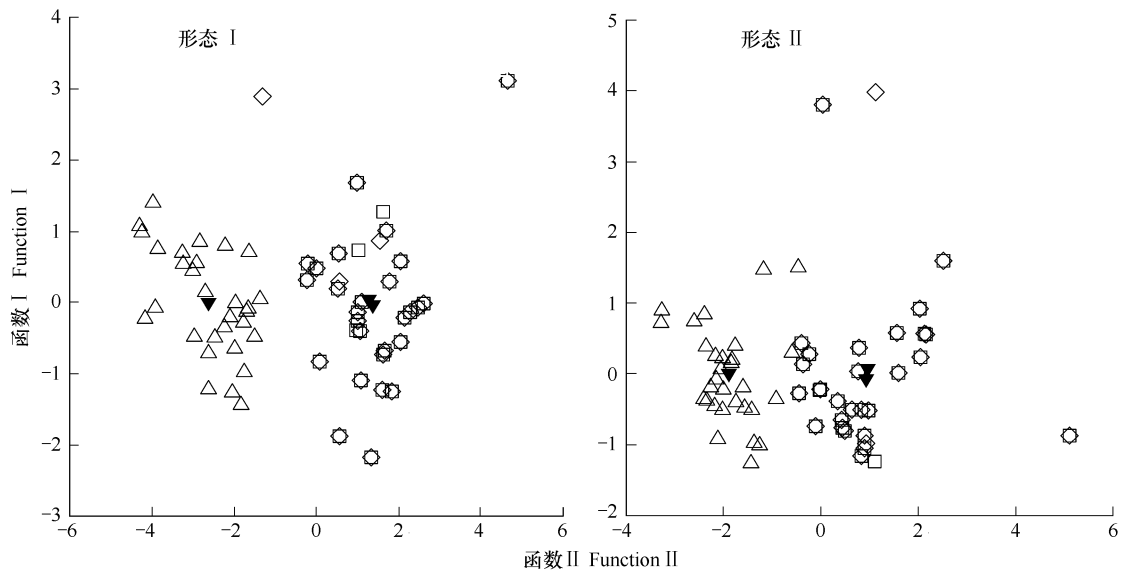


图 3 以两个典型判别函数为坐标对所测量轮虫成体进行分类的散点图

Fig. 3 Scatter plot of measured adults in the space defined by two canonical discriminate functions

◇ 姐妹种 LE9; △ 姐妹种 HE3; 姐妹种 HE1; ▼ 类重心

表 5 萼花臂尾轮虫种复合体内 3 姐妹种幼体形态特征的判别分析

Table 5 Discriminant analysis on morphometric characteristics of neonates of three sibling species in <i>B. calyciflorus</i> species complex								
参数 Parameters	形态分析 I Discrimination I				形态分析 II Discrimination II			
	函数 1 Function 1		函数 2 Function 2		函数 1 Function 1		函数 2 Function 2	
	系数 Coefficients	典型相关性 R	系数 Coefficients	典型相关性 R	系数 Coefficients	典型相关性 R	系数 Coefficients	典型相关性 R
A	2.039	0.641 *	-0.182	0.336	—	—	—	—
B	-1.592	0.562 *	0.176	0.190	—	—	—	—
C	-0.004	0.560 *	-0.371	0.285	—	—	—	—
D	-0.305	0.422 *	1.193	0.322	—	—	—	—
E	-0.333	0.384 *	0.741	0.317	—	—	—	—
F	0.689	0.362 *	-0.852	0.110	0.521	0.849 *	-0.601	-0.337
G	-0.132	0.178 *	-0.812	-0.037	—	—	—	—
H	0.139	0.234	0.386	0.609 *	0.247	0.677	1.089	0.729 *
I	0.163	0.268	0.207	0.583 *	0.457	0.855 *	-0.266	-0.011
J	0.099	0.430	0.345	0.435 *	—	—	—	—
特征值 Eigenvalue	2.841		0.355		1.285		0.029	
累计方差 Cumulative proportion of variance/%	88.9		11.1		97.7		2.3	

“—”表示没检验

表 6 萼花臂尾轮虫种复合体内 3 姐妹种幼体判别分析正确率

Table 6 Accuracy of discriminant analysis on morphometric characteristics of neonates of three sibling species in <i>B. calyciflorus</i> species complex							
验证方法 Tests methods	判别正确率 Accuracy/%	形态分析 I Discrimination I			形态分析 II Discrimination II		
		LE9	HE1	HE3	LE9	HE1	HE3
内验证 Original test	$P_1$	93.3	76.7	80.0	73.3	60.0	83.3
	$P_2$	93.3	74.2	82.8	78.6	58.1	80.1
	综合 Total		83.3			73.3	
交互验证 Cross-validated test	$P_1$	86.7	50.0	76.7	73.3	60.0	80.0
	$P_2$	89.7	57.0	92.0	78.6	60.0	80.0
	综合 Total	71.1	71.0				
外验证 Outgrpup test	$P_1$	—	70.0	66.7	—	0	66.7
	$P_2$	—	73.1	90.5	—	0	83.3
	综合 Total	63.3	45.0				

“—”表示没检测

准确率  $P_1$  为 60.0%—93.3%, 判别准确率  $P_2$  为 58.1%—93.3%, 形态分析 I 和 II 的综合判别率分别为 83.3% 和 73.3%。经交叉验证后, 判别准确率  $P_1$  为 50.0%—86.7%, 判别准确率  $P_2$  为 57.7%—92.0%, 形态分析 I 和 II 的综合判别率均为 71.1%。经外验证后,  $P_1$  为 23.3%—70.0%,  $P_2$  为 50.0%—90.5%, 形态分析 I 和 II 的综合判别率分别为 63.0% 和 45.0%。交互验证结果与原判别结果差别不大, 但两种形态分析对姐妹种 HE1 判别分析的准确率均较低, 形态分析 I 中的外验证判别准确率较高。

以典型判别函数为坐标并将各姐妹种轮虫幼体进行分类的散点图显示, 所测量的轮虫分为 3 个种类, 姐妹种 LE9 与姐妹种 HE3、HE1 区分的较为明显, 而后两者的分布区有不同程度的重叠现象(图 4)。形态分析 I 和 II 散点图的差异主要体现在各个种类轮虫聚集的程度上, 形态分析 I 的散点图中各种类聚集效果较好, 形态分析 I 和 II 散点图在各类的类重心上也有不同程度的偏移。

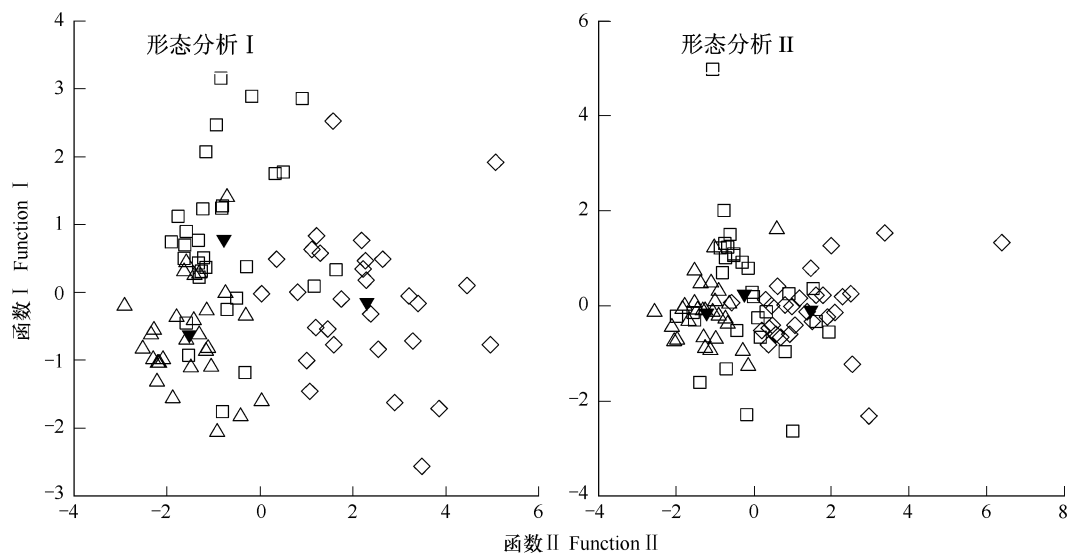


图 4 以两个典型判别函数为坐标对所测量轮虫幼体进行分类的散点图

Fig. 4 Scatter plot of measured neonates in the space defined by two canonical discriminant functions

◇ 姐妹种 LE9; △ 姐妹种 HE3; 姐妹种 HE1; ▼ 类重心

### 3 讨论

近几年来, 以形态测量数据和分子标记研究轮虫的种内分化均时有报道。Fu 等<sup>[15]</sup>依据形态测量数据首次指出褶皱臂尾轮虫包含大小两种形态(L型和S型)的姐妹种, 并且把S型褶皱臂尾轮虫分为两个类群, 但是它们的形态差异与遗传差异并不一致<sup>[15,22]</sup>。依据DNA分子标记的系统关系分析显示, 褶皱臂尾轮虫复合体内至少含有14个姐妹种, 且分为3个大进化枝<sup>[6,8]</sup>。这些姐妹种可以区分为大(L)、中(SM)、小(SS)3种与分子系统树中主要的进化枝相对应的形态<sup>[4,8,12]</sup>。但是在比较分析了进化枝内姐妹种间的形态测量差异与报道的遗传差异后, Campillo 等<sup>[16]</sup>发现形态测量差异相对较小, 形态测量不能作为褶皱臂尾轮虫姐妹种鉴别的可靠方法。与上述研究结果相似, 本研究发现, 姐妹种 HE3 轮虫成体的各形态参数均最大, 而其余两克隆间无显著的差异, 形态测量差异与报道的遗传差异<sup>[11]</sup>不一致; 依据蓼花臂尾轮虫种复合体内3个姐妹种成体形态特征的两种形态分析均不能将其明显地区分开。

本研究中, 虽然3姐妹种轮虫成体间形态差异较小, 但依据3姐妹种幼体形态特征分析却可以将其区分开, 表明3姐妹种间幼体的形态差异大于成体, 轮虫幼体某些形态特征在发育过程中可能存在着异速增长。Yin 和 Niu<sup>[23]</sup>发现从同一克隆轮虫休眠卵孵化出的雌体有3种形态(无后侧棘刺、单个后侧棘刺和两个后侧棘刺), 而且每种形态雌体的无性繁殖后代中均或多或少含有其余两种形态型的个体; 但在相同的培养环境中分隔培养一段时间后绝大多数轮虫长有两个后侧棘刺<sup>[24]</sup>。从休眠卵孵化的矩形龟甲轮虫(*Keratella quadrata*)、多肢轮虫(*Polyarthra*)与其雌性后代间也存在形态差异<sup>[25-26]</sup>。学者们认为这种形态变化是对相对

稳定(食物充足、无竞争者和捕食者)的环境的适应<sup>[23,27-30]</sup>。轮虫形态特征受生态因子和遗传背景双重因素的影响<sup>[31]</sup>,较大的遗传差异和稳定培养环境可能是本研究中各姐妹种间幼体形态差异明显大于成体的原因。

作为一种实用性很强的分析方法,判别分析是在分类已知的条件下,寻找客观分类判别依据。由于对轮虫种复合体内姐妹种的认识时间不长,有关姐妹种间形态特征判别分析的研究仍很少见。Campillo 等<sup>[16]</sup>对大型(L型)褶皱臂尾轮虫姐妹种间形态特征进行了判别分析,发现该姐妹种间存在形态停滞现象,依据形态特征不能准确区分该姐妹种;殷旭旺和赵文<sup>[32]</sup>却发现依据形态特征可以准确区分褶皱臂尾轮虫姐妹种。本研究依据萼花臂尾轮虫姐妹种幼体的形态特征进行的形态分析发现,形态分析 I 与形态分析 II 的交互验证综合判别率相等,但形态分析 I 的内验证和外验证综合判别率均高于形态分析 II。这与已报道的研究结果<sup>[16]</sup>类似。鉴于 3 个姐妹种间即便是有明显差异的形态特征的分布区存在广泛重叠以及幼体形态分析 I 对姐妹种 HE1 交互验证准确率较低( $P_1$  为 50.0%、 $P_2$  为 57.7%),作者认为本文涉及的形态特征分析不适宜于萼花臂尾轮虫种复合体内姐妹种的准确甄别。依据形态特征分析无法准确甄别萼花臂尾轮虫种复合体内的姐妹种尤其是同一水体中存在的姐妹种,使得人们通常揭示的轮虫种群数量变动及其规律等实际上是轮虫种复合体的数量变动及其规律,通常报道的自然水体中轮虫的物种数量低于实际存在的物种数量。

## References:

- [1] Mayr E. Systematics and the origin of species. Columbia University Press, New York, 1942: 334.
- [2] Lee C E. Global phylogeography of a cryptic copepod species complex and reproductive isolation between genetically proximate "populations". *Evolution*, 2000, 54: 2014-2027.
- [3] Lee C E, Frost B W. Morphological stasis in the *Eurytemora affinis* species complex (Copepoda: Temoridae). *Hydrobiologia*, 2002, 480: 111-128.
- [4] Ciroso-Pérez J, Gómez A, Serra M. On the taxonomy of three sympatric species of the *Brachionus plicatilis* (Rotifera) complex from Spain, with the description of *B. ibericus* n. sp. *Journal of Plankton Research*, 2001, 23: 1311-1328.
- [5] Gómez A, Snell T W. Sibling species and cryptic speciation in the *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera). *Journal of Evolutionary Biology*, 1996, 9: 953-964.
- [6] Gómez A, Serra M, Carvalho G R, Lunt D H. Speciation in ancient cryptic species complexes: evidence from the molecular phylogeny of *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Evolution*, 2002, 56 (7): 1431-1444.
- [7] Derry A M, Hebert P D N, Prepas E E. Evolution of rotifers in saline and subsaline lakes: a molecular phylogenetic approach. *Limnology & Oceanography*, 2003, 48(2): 675-685.
- [8] Suatoni L. Patterns of speciation in the rotifer species complex, *Brachionus plicatilis*. Yale University, New Haven, 2003, 115.
- [9] Gilbert J J, Walsh E J. *Brachionus calyciflorus* is a species complex: mating behavior and genetic differentiation among four geographically isolated strains. *Hydrobiologia*, 2005, 546: 257-265.
- [10] Papakostas S, Triantafyllidis A, Kappas I, Abatzopoulos T J. The utility of the 16S gene in investigating cryptic speciation within the *Brachionus plicatilis* species complex. *Marine Biology (Berlin)*, 2005, 147(5): 1129-1139.
- [11] Li H B, Xi Y L, Cheng X F, Xiang X L, Hu C B, Tao L X. Sympatric speciation in rotifers: evidence from molecular phylogenetic relationships and reproductive isolation among *Brachionus calyciflorus* clones. *Acta Zoologica Sinica*, 2008, 54(2): 256-264.
- [12] Gómez A, Serra M. Behavioral reproductive isolation among sympatric strains of *Brachionus plicatilis* Muller 1786: insights into the status of this taxonomic species. *Hydrobiologia*, 1995, 313/314: 111-119.
- [13] Rico-Martínez R, Snell T W. Copulatory behavior and mate recognition pheromone blocking of male receptors in *Brachionus plicatilis* Muller (Rotifers). *Hydrobiologia*, 1995, 313/314: 105-111.
- [14] Rico-Martínez R, Snell T W. Mate discrimination of female *Brachionus plicatilis* Muller and *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff (Rotifers). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1995, 190: 39-49.
- [15] Fu Y, Hirayama K, Natsukari Y. Morphological differences between two types of the rotifer *Brachionus plicatilis* O. F. Muller. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1991, 151: 29-41.
- [16] Campillo S, García-Roger E M, Martínez-Torres E, Serra M. Morphological stasis of two species belonging to the L-morphotype in the *Brachionus plicatilis* species complex. *Hydrobiologia*, 2005, 546: 181-187.
- [17] Kotani G, Yoshinaga T, Yanagawa Y, Kinoshita S, Tsukamoto K, Watabe S. Molecular characterization of Mn-superoxide dismutase and gene



- expression studies in dietary restricted *Brachionus plicatilis* rotifers. *Hydrobiologia*, 2005, 546: 117-123.
- [18] Fontaneto D, Giordani I, Melone G, Serra M. Disentangling the morphological stasis in two rotifer species of the *Brachionus plicatilis* species complex. *Hydrobiologia*, 2007, 583: 297-307.
- [19] Wang J J. Fauna of rotifers in China. Beijing: Science Press, 1961.
- [20] Li H B, Xi Y L, Cheng X F. Comparative studies on life history characteristics of three sibling species in *Brachionus calyciflorus* species complex. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(2): 581-588.
- [21] Gilbert J J. Mictic female production in rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Journal of Experimental Zoology*, 1963, 153: 113-124.
- [22] Fu Y, Hirayama K, Natsukari Y. Genetic divergences between S and L type strains of the rotifer *Brachionus plicatilis* O. F. Muller. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1991b 151: 43-56.
- [23] Yin X W, Niu C J. Polymorphism in stem females and successive parthenogenetic generations in *Brachionus calyciflorus* Pallas. *Aquatic Ecology*, 2008, 42: 415-420.
- [24] Yin X W, Niu C J. Polymorphism and morphotype transformations in the rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Zoological Research*, 2007, 28: 68-72.
- [25] Pejler B. Variation in the genus *Keratella*. *Hydrobiologia*, 1980, 73: 207-213.
- [26] Gilbert J J, Schröder T. Rotifers from diapausing, fertilized eggs: unique features and emergence. *Limnology & Oceanography*, 2004, 49: 1341-1354.
- [27] Green J. Morphological variation of *Keratella cochlearis* (Gosse) in a backwater of the River Thames. *Hydrobiologia*, 2005, 546: 189-196.
- [28] Stemberger R S, Gilbert J J. Spine development in the rotifer *Keratella cochlearis*: induction by cyclopoid copepods and *Asplanchna*. *Freshwater Biology*, 1984, 14: 639-647.
- [29] Gilbert J J. Escape response of the rotifer *Polyarthra*: a high-speed cinematographic analysis. *Oecologia*, 1985, 66: 322-331.
- [30] Williamson CE. Predator-prey interactions between omnivorous diaptomid copepods and rotifers. *Limnology & Oceanography*, 1987, 32: 167-177.
- [31] Serra M, Galianna A, Gómez A. Speciation in monogonont rotifers. *Hydrobiologia*, 1997, 358: 63-70.
- [32] Yin X W, Zhao W. Species composition and population dynamics of rotifer *Brachionus plicatilis* complex in a coastal lagoon. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2005, 20: 1-10.

#### 参考文献:

- [11] 李化炳, 席貽龙, 程新峰, 项贤领, 胡存兵, 陶李祥. 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.
- [19] 王家楫. 中国淡水轮虫志. 北京: 科学出版社, 1961: 72.
- [20] 李化炳, 席貽龙, 程新峰. 萼花臂尾轮虫种复合体内三个姐妹种生活史特征比较. *生态学报*, 2009, 29(2): 581-588.
- [32] 殷旭旺, 赵文. 沿海混盐水体褶皱臂尾轮虫的复合类群及其种群动态. *大连水产学院学报*, 2005, 20: 1-10.