

大型溞(*Daphnia magna*) 线粒体基因组的测定与序列分析*

程瑞雪¹, 邓斌¹, 王亚玲¹, 耿雪侠¹, 李俊², 张旭¹, 彭树英¹, 邓道贵¹, 张海军^{1**}

(1: 淮北师范大学生命科学学院资源植物生物学安徽省重点实验室, 淮北 235000)

(2: 安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230000)

摘要: 利用 Long-PCR 及普通 PCR 技术, 结合引物步移法测序, 经拼接、组装后获得中国淮河大型溞(*Daphnia magna*) 线粒体基因组全序列, 并对其基因组成、结构特点等进行初步分析. 大型溞线粒体基因组全长为 14948 bp, A、T、G、C 各碱基含量分别为 32.37%、34.73%、15.58%、17.31%, 表现出明显的 AT 偏倚. 13 个蛋白质编码基因、22 个 *tRNA* 基因、2 个 *rRNA* 基因和 1 个 D-loop 区(控制区)的排列方式与典型的节肢动物线粒体基因组的排列方式略有不同. 除 *COI* 基因以 CTG、*ATP8* 基因以 GTG、*ND3* 基因以 ATC 以及 *ND6* 基因以 ATT 为起始密码子以外, 其余 9 个蛋白质编码基因均以 ATG 作为起始密码子; 9 个蛋白质编码基因具有典型的完全终止子 TAG 或 TAA, *COI*、*COII*、*ND4* 和 *ND5* 等基因采用不完全终止密码子 T. 基因组包含 9 个基因间隔区, 共 81 bp, 长度 1~62 bp; 13 个基因重叠区, 共 77 bp, 重叠碱基数在 1~27 bp 之间, 最大重叠在 *16S rRNA* 和 *tRNA^{Val}* 基因之间. 在预测的 22 个 *tRNA* 基因的二级结构中, 发现只有 *tRNA^{Ser1}* 基因未能形成完整的二级结构, 其他 21 个基因均可形成典型的三叶草结构. *16S rRNA* 和 *12S rRNA* 基因长度分别为 1373 bp 和 752 bp, D-loop 区全长 289 bp. 本研究结果为探讨大型溞在溞属中的系统学地位及其与其他种间的系统发生关系等问题提供了数据资源.

关键词: 大型溞; 线粒体基因组; 序列分析; *tRNA* 二级结构

Complete mitochondrial genome sequence of *Daphnia magna* (Crustacea: Cladocera) from Huaihe in China

CHENG Ruixue¹, DENG Bin¹, WANG Yaling¹, GENG Xuexia¹, LI Jun², ZHANG Xu¹, PENG Shuying¹, DENG Daogui¹ & ZHANG Haijun^{1**}

(1: Anhui Key Laboratory of Plant Resource and Biology, School of Life Science, HuaiBei Normal University, HuaiBei 235000, P.R.China)

(2: School of Life Science, Anhui Agriculture University, Hefei 230000, P.R.China)

Abstract: The complete sequence of mitochondrial genome of *Daphnia magna* was determined using long PCR, normal PCR and primers walking approaches. The results showed that the entire mitochondrial genome of *Daphnia magna* is 14948 bp in size, in which the content of A, T, G, C is 32.37%, 34.73%, 15.58%, 17.31%, respectively. The mitochondrial genome organization and gene order of *Daphnia magna* were consistent with that of *Arthropod*, which contains 13 protein-coding genes (PCGs), 22 *tRNA* genes, 2 ribosomal RNA genes (large and small ribosomal RNAs), and a control region. Except for *COI* gene using CTG, *ATP8* with GTG, and *ND3* with ATC, and *ND6* with ATT as the initiation codon, and other 9 PCGs of the mtDNA in *Daphnia magna* started with the typical ATG codon. TAG and TAA were used in 9 PCGs as usual termination codons, except for *COI*, *COII*, *ND4* and *ND5* genes with incomplete termination codon (T). There are 9 intergenic spacer sequencer totaling 81 bp (1–62 bp for each sequence) and 13 overlapping sequences totaling 77 bp (1–27 bp for each sequence), scattered throughout the genome, respectively, and the largest overlap (27 bp) region is located between *16S rRNA* and *tRNA^{Val}* genes. The secondary structures of 22 *tRNAs* were predicted and it was found that *tRNA^{Ser1}* failed to form a complete secondary structure, others have typical

* 国家自然科学基金项目(81272377, 31370470)、安徽省自然科学基金项目(1208085MC45)和资源植物生物学安徽省重点实验室开放基金项目(ZYZWSW2014014)联合资助. 2015-01-23 收稿; 2015-04-14 收修改稿. 程瑞雪(1990~), 女, 硕士研究生; E-mail: chengrx2012@163.com.

** 通信作者; E-mail: haijunzhang@163.com.

leaf clover secondary structures. The length of 16S rRNA, 12S rRNA and D-loop were 1373 bp, 752 bp and 289 bp, respectively. The results of this study provide some useful molecular data to clarify the systematical status of *Daphnia*, as well as its phylogenetic relationships with other species.

Keywords: *Daphnia magna*; mitochondrial genome; phylogenetic analysis; tRNA secondary structure

大型蚤(*Daphnia magna*)属于节肢动物门(Arthropoda)、甲壳纲(Crustacea)、鳃足亚纲(Branchiopoda)、枝角目(Cladocera)、蚤科(Daphniidae)、蚤属(*Daphnia*),是微甲壳类浮游动物的重要组成部分^[1],主要生活在淡水中,具有分布广、生活周期短、繁殖快、易于在实验室培养且对水环境中多种有毒化学物质敏感性^[2]等特点,因此被广泛应用于水质监测和水生生物毒理研究^[3-4],也是生命科学和环境科学等研究领域较为理想的模式生物^[5]. 目前关于大型蚤的研究仍然是毒理研究和水质监测占主导^[6-10],关于蚤类的分子进化研究也是一个热点.

动物线粒体基因组由于具有分子量小、含量多、结构简单、进化速率快、母系遗传等特点,常被用于动物界的分类鉴定、物种多样性和不同等级阶元系统发育的研究^[11-14],它包含丰富的分子标记,如单个基因序列、基因重排模型和 RNA 二级结构等,被广泛应用于种群遗传学、物种鉴定、不同分类阶元的系统发育等研究^[15-16].

到目前为止,蚤属浮游动物中只有来自北美的蚤状蚤(*D. pulex*)线粒体 DNA 全序列已被测定分析并公布^[17],而对另一种蚤属浮游动物——大型蚤在分子生物学方向的研究尚属少见,并且蚤属动物依据形态学标准进行分类的方法有很多不足,出现了同名异种或者同种异名现象^[18]. 耿雪侠等^[19]基于 3 种蚤属动物线粒体基因组 COI 基因的测定与分析并构建系统进化树,结果表明来自中国的隆线蚤(*D. carinata*)和大型蚤具有较近的亲缘关系,而与北美蚤状蚤亲缘关系相对较远,因此需要选择更多的分子标记来进一步验证这个结果并揭示其真正原因. 基于此,本文对大型蚤线粒体基因组全序列进行测定和注释,并对其基因组组成和结构特征进行初步分析,以期对蚤科的系统分类学和系统进化研究提供新的分子生物学数据资料.

1 材料与方法

1.1 材料

实验用的大型蚤(*Daphnia magna*)采自淮河. 连续培养 3 代以上的单克隆品系用于基因组 DNA 的提取.

1.2 基因组 DNA 的提取

将经饥饿处理的单只大型蚤,置于 1.5 ml 离心管中,大型蚤基因组 DNA 的提取参照文献[20],并置于 -20℃ 保存备用.

1.3 PCR 扩增及序列测定

根据 Genbank 中已公布的北美蚤状蚤(*Daphnia pulex*)的线粒体基因组全序列(Genbank 登录号: AF117817. 1)^[17]设计出可覆盖大型蚤线粒体基因组全序列的引物(表 1). 扩增片段间均有部分重叠.

表 1 扩增大型蚤线粒体基因组全序列的引物

Tab.1 Primers used for amplifying the complete mitochondrial genome sequence of *Daphnia magna*

编号	F 引物 起点	R 引物 起点	产物长度/ bp	F 引物序列	R 引物序列
1	1301	3885	2539	GTAAWTAATACTAAWARCCTTCAAA	CCACAAATTTCKGARCATTG
2	3885	7572	4000	ACAGCTGCTGACGTGATTGAT	GAGTGATCTTTAGGGGGAGGTAG
3	7572	13000	5450	AGAAGGGAATTTGAGCTCTTTTWT	TTACCCTAGGGATAACAGCGTAA
4	12523	14745	2021	TCGTCTCGTCATTCATACCAGC	GTGCCAGCAGYYGCGGTANAC
5	14610	1546	2269	ATAAYAGGTATCTAATCCTRGT	ACTTCCWGATTGTCCYAAYTC

PCR 反应总体积为 25 μ l,反应体系为:dNTP Mixture (10 mmol/L) 1 μ l、10 \times PCR buffer 缓冲液(Mg²⁺ plus)2.5 μ l、DMSO 2 μ l、DNA 模板 1 μ l、正反向引物(10 μ mol/L)各 1 μ l、LA-Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ l)0.25

μl, 补加 16.25 μl ddH₂O 至 25 μl.

PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 2~8 min, 30 个循环; 最后 72℃ 充分延伸 10 min, 4℃ 保存. 取 5 μl PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测并拍照. PCR 产物经割胶纯化, 产物委托上海美吉生物医药科技有限公司测序.

1.4 序列分析

利用 DNASTar 软件中的 SeqMan 和测序峰图结果分析软件 Chromas 1.62 将所得序列进行确认、拼接和组装, 最终获得大型蚤线粒体基因组的全序列 (Genbank 登录号: KP296147). 与北美蚤状蚤线粒体基因组全序列比对后, 运用在线软件 DOGMA (<http://dogma.cccb.utexas.edu/>) 和 MITOS (<http://mitos.bioinf.uni-leipzig.de>) 等对大型蚤线粒体基因组进行基因定位, 并预测 tRNA 基因的二级结构. 采用 MEGA 6.02^[21] 软件分析基因组各部分的碱基组成、蛋白质编码基因密码子使用频率、密码子相对使用频率 (RSCU) 等.

2 结果

2.1 大型蚤线粒体基因组组成与基因排列

大型蚤线粒体基因组全长 14948 bp, 包括 13 个蛋白质编码基因 (Protein-coding genes, PCGs)、22 个 tRNA 基因、2 个 rRNA 基因 (16S rRNA 和 12S rRNA) 和 1 个介于 tRNA^{Ile} 基因和 tRNA^{Gln} 基因之间的非编码区 (D-loop 区) (图 1). 其中, 23 个基因由 J 链编码, 另外的 15 个基因由 N 链编码. 大型蚤线粒体基因组的基因结构较为紧凑, 除控制区外, 基因间非编码间隔区仅 9 处 81 bp, 间隔长度为 1~62 bp 不等, 最大的基因间隔为 62 bp, 在 12S rRNA 和 tRNA^{Ile} 基因之间. 同时, 部分相邻基因间存在重叠现象, 共计 13 处 77 bp, 重叠长度在 1~27 bp 之间, 最长的基因重叠出现在 16S rRNA 和 tRNA^{Val} 基因之间, 为 27 bp (表 2).

大型蚤线粒体基因组中含腺嘌呤 (A) 4839 bp、鸟嘌呤 (G) 2329 bp、胸腺嘧啶 (T) 5192 bp、胞嘧啶 (C) 2588 bp, 分别占全长的 32.37%、15.58%、34.73%、17.31%, A+T 占 67.11%, G+C 占 32.89%, A+T 含量明显高于 G+C 含量 (表 3), 符合无脊椎动物线粒体 DNA 序列碱基组成的特点.

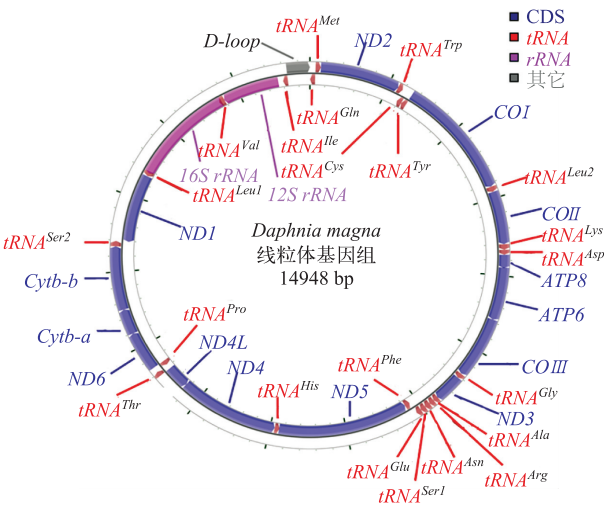


图 1 大型蚤线粒体基因组组织结构 (COI、COII、COIII 分别表示细胞色素氧化酶亚基 I~III; ATP8 和 ATP6 分别表示 ATP 合成酶亚基 8 和 6; ND1~ND6 和 ND4L 分别表示 NADH 脱氢酶亚基 1~6 和 4L; Cytb 表示细胞色素 b; 12S rRNA 和 16S rRNA; tRNA 基因用氨基酸代码表示)

Fig.1 Circular map of the mitochondrial genome of *Daphnia magna*

表 2 大型溞线粒体基因组组成*
Tab.2 Organization of the *D. magna* mitogenome

编号	基因	起始	终止	位置	长度	基因重叠/ 基因间隔	起始密码子	终止密码子
1	<i>tRNA^{Gln}</i>	1	68	N	68			
2	<i>tRNA^{Met}</i>	70	134	J	65	1		
3	<i>ND2</i>	135	1121	J	0		ATG	TAG
4	<i>tRNA^{Tyr}</i>	1120	1183	J	64	-2		
5	<i>tRNA^{Cys}</i>	1187	1250	N	64	3		
6	<i>tRNA^{Tyr}</i>	1251	1314	N	64			
7	<i>COI</i>	1313	2849	J	1537	-2	CTG	T____
8	<i>tRNA^{Leu2}</i>	2850	2917	J	68			
9	<i>COII</i>	2919	3597	J	679	1	ATG	T____
10	<i>tRNA^{Lys}</i>	3598	3667	J	70			
11	<i>tRNA^{Asp}</i>	3668	3730	J	63			
12	<i>ATP8</i>	3731	3898	J	168		GTG	TAG
13	<i>ATP6</i>	3892	4566	J	675	-7	ATG	TAG
14	<i>COIII</i>	4566	5354	J	789	-1	ATG	TAA
15	<i>tRNA^{Gly}</i>	5357	5419	J	63	2		
16	<i>ND3</i>	5420	5773	J	354		ATC	TAG
17	<i>tRNA^{Ala}</i>	5772	5833	J	62	-2		
18	<i>tRNA^{Arg}</i>	5834	5897	J	64			
19	<i>tRNA^{Asn}</i>	5898	5964	J	67			
20	<i>tRNA^{Sec1}</i>	5965	6029	J	65			
21	<i>tRNA^{Glu}</i>	6030	6094	J	65			
22	<i>tRNA^{Phe}</i>	6100	6167	N	68	5		
23	<i>ND5</i>	6168	7881	N	1714		ATG	T____
24	<i>tRNA^{His}</i>	7876	7938	N	63	-6		
25	<i>ND4</i>	7939	9253	N	1315		ATG	T____
26	<i>ND4L</i>	9253	9558	N	306	-1	ATG	TAA
27	<i>tRNA^{Thr}</i>	9561	9623	J	63	2		
28	<i>tRNA^{Pro}</i>	9624	9687	N	64			
29	<i>ND6</i>	9690	10193	J	504	2	ATT	TAA
30	<i>Cytb-a</i>	10193	10513	J	321	-1	ATG	TAG
	<i>Cytb-b</i>	10513	11325	J	813			
31	<i>tRNA^{Sec2}</i>	11325	11393	J	69	-1		
32	<i>ND1</i>	11392	12318	N	927	-2	ATG	TAG
33	<i>tRNA^{Leu1}</i>	12322	12388	N	67	3		
34	<i>16S rRNA</i>	12366	13738	N	1373	-23		
35	<i>tRNA^{Val}</i>	13712	13783	N	72	-27		
36	<i>12S rRNA</i>	13782	14533	N	752	-2		
37	<i>tRNA^{Ile}</i>	14596	14659	N	64	62		
38	<i>D-loop</i>	14660	14948	J	289			

* J 表示 J 链 (Majority strand), N 表示 N 链 (Minority strand).

2.2 蛋白质编码基因

大型溞线粒体基因组所包含的 13 个蛋白质编码基因总长度为 10582 bp,除 *COI* 基因以 CTG、*ATP8* 基因以 GTG、*ND3* 基因以 ATC 和 *ND6* 基因以 ATT 为起始密码子以外,其余 9 个蛋白质编码基因均以 ATG 作为

起始密码子. 9 个蛋白质编码基因具有典型的完全终止子 TAG 或 TAA, *COI*、*COII*、*ND4* 和 *ND5* 基因则以 T 作为终止信号. 在这 13 个蛋白质编码基因中, *ND1*、*ND4*、*ND4L* 和 *ND5* 由 N 链编码, 其余 9 个基因均由 J 链编码. 蛋白质编码基因没有内含子, 相邻基因之间出现重叠现象, 如 *ATP6* 和 *COIII* 基因间重叠 1 bp, *ND4* 和 *ND4L* 基因间重叠 1 bp (表 2). *Cytb* 基因在 10513 位置缺失 1 个碱基 T, 在翻译时, 可以通过 RNA 编辑过程中尿苷酸的添加来形成完整的细胞色素 b mRNA 序列, 进而翻译成有功能的蛋白质.

大型蚤线粒体基因组不同蛋白质编码基因的碱基组成见表 3. 13 个蛋白质编码基因的平均 A+T 含量为 66. 18%, 其中, 密码子第 1、2、3 位点的 A+T 含量基本一致. 大型蚤线粒体基因组各个不同区域的 A+T 含量均高于 G+C 含量, 除 *tRNA* 和 *rRNA* 基因外, 它们的 AT skew 均为负值, 呈现出一致的 A/T 碱基使用偏向性 (表 3).

运用 MEGA 6. 02 软件对这 13 个蛋白质编码基因进行统计分析, 得出总共有 3526 个密码子 (不包含 4 个不完全的终止密码子), 其中 NNU 和 NNA 密码子的 RSCU 值均大于等于 1, 表明其第 3 位点全部是 A 或 U, 该密码子使用的偏向性与蛋白质编码基因第 3 位点 A+T (66. 6%) 偏向性有一定的正相关性.

表 3 大型蚤线粒体基因组不同区域的碱基组成*

Tab.3 Nucleotide composition in different regions of the *D. magna* mitochondrial

线粒体基因组	碱基组成						AT skew	GC skew
	A/%	T/%	G/%	C/%	A+T/%	G+C/%		
全基因组	32. 37	34. 73	15. 58	17. 31	67. 11	32. 89	-0. 0352	-0. 0526
PCGs	25. 94	40. 24	17. 17	16. 65	66. 18	33. 82	-0. 2161	0. 0154
密码子第 1 位点	26. 70	39. 00	17. 50	16. 40	65. 70	33. 90	-0. 1872	0. 0324
密码子第 2 位点	25. 50	40. 00	17. 00	17. 60	65. 50	34. 60	-0. 2214	-0. 0173
密码子第 3 位点	25. 60	41. 00	17. 00	15. 90	66. 60	32. 90	-0. 2312	0. 0334
<i>tRNA</i>	34. 47	34. 33	17. 41	13. 80	68. 79	31. 21	0. 0020	0. 1157
<i>16S rRNA</i>	36. 05	35. 25	17. 41	11. 29	71. 30	28. 70	0. 0112	0. 2132
<i>12S rRNA</i>	34. 84	34. 31	18. 09	12. 77	69. 15	30. 85	0. 0077	0. 1724
<i>rRNA</i>	35. 62	34. 92	17. 65	11. 81	70. 54	29. 46	0. 0099	0. 1982
D-loop	36. 33	37. 37	11. 42	14. 88	73. 70	26. 30	-0. 0141	-0. 1316

* AT skew = (A - T) / (A + T), GC skew = (G - C) / (G + C).

2. 3 *tRNA* 基因和 *rRNA* 基因

利用 DOGMA (<http://dogma.cccb.utexas.edu/>) 和 MITOS (<http://mitos.bioinf.uni-leipzig.de/index.py>) 等软件及人工辅助校正得到大型蚤线粒体基因组的 22 个 *tRNA* 基因的准确位置和二级结构的预测结果, 基因长度为 62~72 bp 不等. 其中 13 个由 J 链编码, 其余的由 N 链编码. 除 *tRNA^{Ser1}* 外, 其余的 *tRNA* 均能形成典型的三叶草结构 (图 2). *tRNA^{Ser1}* 缺少二氢尿嘧啶臂 (DHU stem), 在其相应位置上只形成 1 个简单环. 除典型的 A · U, G · C 配对外, 在大型蚤的 17 个 *tRNA* 基因中还发现了 25 对错配, 其中 10 对在氨基酸臂上, 5 对在 DHU 臂上, 4 对在反密码子臂上, 6 对在 T ϕ C 臂上, 主要是 G · U 和 U · G 错配.

rRNA 基因的位置相对固定, 在无脊椎动物线粒体中比较保守. 大型蚤线粒体的 *16S rRNA* 基因位于 *tRNA^{Leu1}* 基因和 *tRNA^{Val}* 基因之间, *12S rRNA* 基因位于 *tRNA^{Val}* 基因和 *tRNA^{Ile}* 基因之间 (图 1). *16S rRNA* 和 *12S rRNA* 基因长度分别为 1373 和 752 bp.

2. 4 D-loop 区

大型蚤 mtDNA 的 D-loop 区位于 *tRNA^{Ile}* 基因和 *tRNA^{Gln}* 基因之间 (图 1), 全长 289 bp, A+T 含量为 73. 70%, 高于线粒体基因组其他区域的 A+T 含量 (表 3), 因此, 也称 A+T 丰富区. 该区不编码蛋白质, 但对基因的转录和复制起着调控作用, 所以又称为控制区.

3 讨论

大型蚤线粒体基因组全序列长度为 14948 bp. 通过分析发现, 基因组成与典型节肢动物线粒体基因组

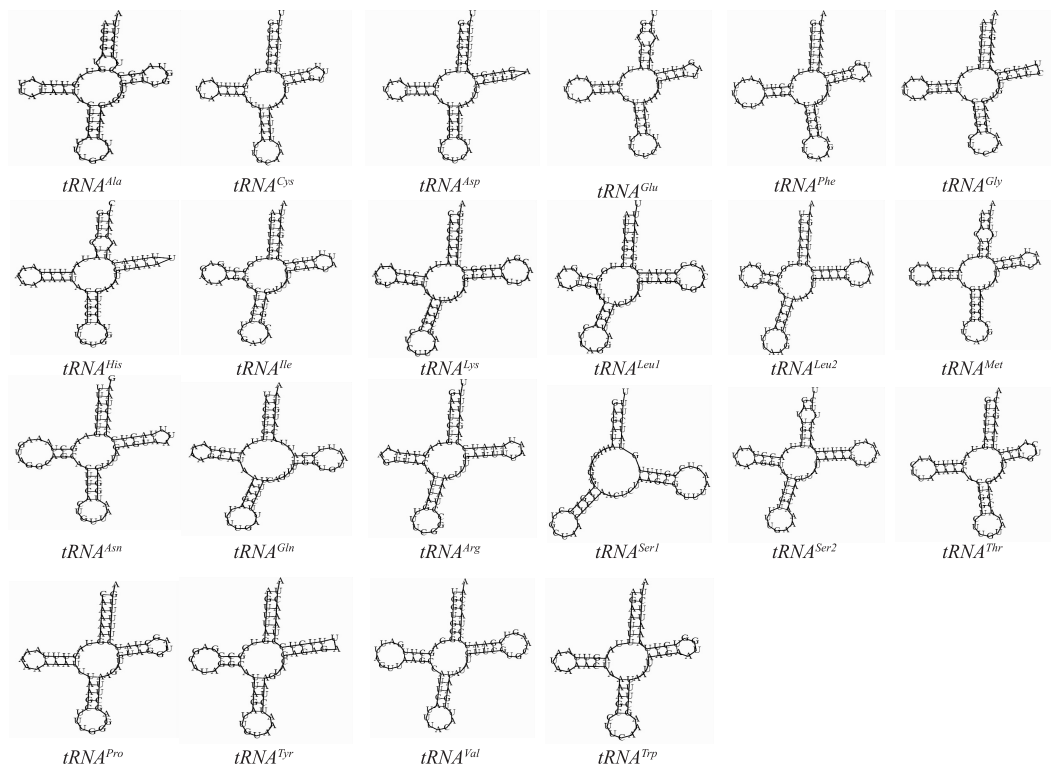


图2 大型蚤 22 个 *tRNA* 基因二级结构

Fig.2 Predicted clover-leaf secondary structures for 22 *tRNA* genes of *D. magna*

一致,但排列顺序略有差别(图1)。大型蚤 *tRNA^{Ile}* 基因由 N 链编码,位置在 14596~14659 bp 处,而北美蚤状蚤的 *tRNA^{Ile}* 由 J 链编码,在 1~64 bp 处。其余各基因的位置与北美蚤状蚤类似。

在蚤类线粒体蛋白质编码基因中,至少有 3 种不同的起始密码子(ATG、ATT 和 GTG),在其他动物线粒体 DNA 中也普遍存在^[22-23]。大型蚤 *COI* 基因以 CTG 作为起始密码子,而北美蚤状蚤以 ATTA 起始。已报道过的 *COI* 基因的起始密码子有三联体密码子、四联体密码子和六联体密码子^[24]等。目前,关于 *COI* 基因起始密码子的多样性机理尚不明确,仍需做进一步研究来检测验证。在大型蚤 13 个蛋白质编码基因中,9 个基因以完全终止密码子(TAA 和 TAG)作为终止信号,只有 *COI*、*COII*、*ND5* 和 *ND4* 基因使用不完全终止密码子 T。而在北美蚤状蚤中 *ND2* 基因也使用不完全终止密码子 T, *ATP6* 和 *ND3* 基因则使用另一个不完全终止密码子 TA。不完全终止密码子可能通过 mRNA 加工过程中的多聚腺苷酸化形成完全终止密码子^[25-27]。

大型蚤的 *tRNA^{Ser1}* 缺少二氢尿嘧啶臂(DHU stem),在欧洲蚤状蚤里也发现该现象,这在后生动物中普遍存在。其他 21 个 *tRNA* 均形成了典型的三叶草结构。17 个 *tRNA* 基因共有 25 对 G·U 或 U·G 错配。A+T 含量 68.79%,远高于 G+C 含量。

大型蚤 *16S rRNA* 和 *12S rRNA* 基因长度分别为 1373 bp 和 752 bp,两者长度与已公布的北美蚤状蚤的 *16S rRNA*(1314 bp)和 *12S rRNA*(753 bp)基因长度相似。*16S rRNA* 和 *12S rRNA* 基因的 A+T 含量分别为 71.30%和 69.15%,与北美蚤状蚤的 *16S rRNA*(68.19%)和 *12S rRNA*(67.20%)基因的 A+T 含量基本相似。

大型蚤 D-loop 区长度为 289 bp, A+T 含量 73.70%,高于线粒体基因组其他区域。北美蚤状蚤 D-loop 区长 689 bp, A+T 含量 67.05%。在脊椎动物和无脊椎动物中,该区包含复制起始点。D-loop 区因不受编码限制,因此含有丰富的变异位点,且该区长度的差异是导致整个基因组全序列长度多态性的主要原因。

4 参考文献

- [1] Forró L, Korovchinsky NM, Kotov AA *et al.* Global diversity of cladocerans (Cladocera; Crustacea) in freshwater. *Hydrobiologia*, 2008, **595**: 177-184.
- [2] 苏乃洲. 氯化铝处理镉污染水体对大型溞 (*Daphnia magna*) 毒性效应研究[学位论文]. 济南: 山东师范大学, 2013.
- [3] Dietrich S, Ploessl F, Bracher F *et al.* Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna*—A multigenerational study. *Chemosphere*, 2010, **79**(1): 60-66.
- [4] Fan W, Wu C, Zhao C *et al.* Application of enriched stable isotope technique to the study of copper bioavailability in *Daphnia magna*. *Journal of Environmental Science*, 2011, **23**(5): 831-836.
- [5] Miner BE, Knapp RA, Colbourne JK *et al.* Evolutionary history of alpine and subalpine *Daphnia* in western North America. *Freshwater Biology*, 2013, **58**(7): 1512-1522.
- [6] 丁婵娟. 铜、铅、锌对大型溞毒性效应研究[学位论文]. 济南: 山东师范大学, 2013.
- [7] 杨晓凡, 陆光华, 刘建超等. 环境相关浓度下的药物对大型蚤的多代慢性毒性. 中国环境科学, 2013, **33**(3): 538-545.
- [8] 李 华, 李秀环, 张大侠等. 不同剂型高效氯氟氰菊酯对大型溞的毒性效应. 环境科学学报, 2014, **34**(6): 1615-1620.
- [9] 马金奉, 邓春生, 张广格等. 利用藻-溞系统去除富营养水体中磷的研究. 中国农业科技导报, 2014, **16**(1): 148-156.
- [10] 王 鑫. 不同温度下大型溞 (*Daphnia magna*) 抑藻净水效应的研究. 中国农学通报, 2014, **30**(2): 105-109.
- [11] Cameron SL, Lambkin CL, Barker SC *et al.* A mitochondrial genome phylogeny of Diptera: whole genome sequence data accurately resolve relationships over broad time scales with high precision. *Systematic Entomology*, 2007, **32**(1): 40-59.
- [12] Ballard JW. Comparative genomics of mitochondrial DNA in members of the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Journal of Molecular Evolution*, 2000, **51**(1): 64-75.
- [13] Buckley TR, Simon C, Chambers GK. Phylogeography of the New Zealand cicada *Maoricicada campbelli* based on mitochondrial DNA sequences: ancient clades associated with cenozoic environmental change. *Evolution*, 2001, **55**(7): 1395-1407.
- [14] 吴孝兵, 王义权, 周开亚. 扬子鳄的线粒体全基因组与鳄类系统发生. 科学通报, 2003, **48**(18): 1954-1958.
- [15] Footitt RG, Maw HEL, Von Dohlen CD *et al.* Species identification of aphids (Insecta; Hemiptera; Aphididae) through DNA barcodes. *Molecular Ecology Resources*, 2008, **8**: 1189-1201.
- [16] Wei SJ, Min S, Sharkey MJ *et al.* Comparative mitogenomics of Braconidae (Insecta; Hymenoptera) and the phylogenetic utility of mitochondrial genomes with special reference to Holometabolous insects. *BMC Genomics*, 2010, **11**: 371.
- [17] Crease TJ. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Daphnia pulex* (Cladocera; Crustacea). *Gene*, 1999, **233**(1/2): 89-99.
- [18] 徐 敏. 七种枝角类分子系统分类的初步研究[学位论文]. 淮北: 淮北师范大学, 2014.
- [19] 耿雪侠, 张 立, 徐 敏等. 3种溞属动物线粒体 *COI* 基因及其侧翼序列的 PCR 扩增与分析. 南京农业大学学报: 自然科学版, 2014, **37**(3): 44-50.
- [20] 彭树英, 邓道贵, 金显文. 单只大型溞 DNA 的提取及 *COI* 基因部分序列的测定分析. 淮北师范大学学报: 自然科学版, 2011, **32**(3): 40-43.
- [21] Tamura K, Stecher G, Peterson D *et al.* Mega 6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6. 0. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, **30**(12): 2725-2729.
- [22] 杨 超, 汪青雄, 黄 原等. 棕头鸥线粒体基因组全序列测定与分析. 遗传, 2012, **34**(11): 1434-1446.
- [23] 夏 靖, 胡 静, 朱国萍等. 大卫绢蝶线粒体基因组全序列测定和分析. 昆虫学报, 2011, **54**(5): 555-565.
- [24] 毛增辉, 郝家胜, 朱国萍等. 菜粉蝶线粒体基因组全序列测定和分析. 昆虫学报, 2010, **53**(11): 1295-1304.
- [25] Ojala D, Merkel C, Gelfand R *et al.* The tRNA genes punctuate the reading of genetic information in human mitochondrial DNA. *Cell*, 1980, **22**: 393-403.
- [26] Moritz C, Dowing TE, Brown WM. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematic. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1987, **18**: 269-292.
- [27] 鲁 成, 刘运强, 廖顺尧等. 家蚕线粒体基因组全序列测定与分析. 农业生物技术学报, 2002, **10**(2): 163-170.