

纤毛虫分子系统发育学的研究进展*

缪 炜 余育和 沈韞芬**

(中国科学院水生生物研究所 武汉 430072)

摘要: 在回顾纤毛虫分子系统发育学产生发展历史的基础上,介绍了随后 20 年中 RFLP、RAPD 和 DNA 序列分析等分子生物学技术作为该学科的主要研究方法在种群遗传多样性与进化、种上阶元系统发育学两方面取得的研究成果和近期研究进展,最后在探讨纤毛虫分子系统发育学存在的一些问题和解决方法的同时,预测了纤毛虫分子系统发育学今后将极大地推动真核生物的起源与进化、内共生等重要生物进化问题的研究。

关键词: 纤毛虫;分子系统发育学;SSrRNA 基因序列

中图分类号: Q111 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2002)01-67-05

Molecular Phylogeny of Ciliates

MIAO Wei YU Yu-He SHEN Yun-Fen

(Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences Wuhan 430072, China)

Abstract: Molecular phylogeny of ciliates started in the early 1980s. Its methods, such as RFLP (restriction fragment length polymorphism), RAPD (random amplified polymorphic DNA) and DNA sequences, and its contents including two main parts (genetic diversity of population, and phylogeny) were summarized. Its developments will bring about a great advance in the original and the evolution of eukaryote, and other evolutionary focuses, such as endosymbiosis theory.

Key words: Ciliate; Molecular phylogeny; SSrRNA sequences

纤毛虫是一类在其生活史中至少有一段时期存在纤毛或纤毛器的单细胞真核生物,是原生动动物中特化程度最高的一大类群,其分布十分广泛,大多数种类在水体及土壤中营自由生活,共生种多存在于反刍动物瘤胃中^[1]。纤毛虫对于真核生物起源与进化的研究、水生生态系统与物种多样性的研究、水环境污染的监测与治理、鱼病的防治与渔业生产,以及反刍动物的饲养等方面有着重要意义,四膜虫(*Tetrahymena*)等纤毛虫作为真核生物基因表达调控的良好模式生物极大地推动了现代分子生物学的发展^[2,3]。然而由于纤毛虫复杂的生活史和丰富的多样性,关于纤毛虫间系统发育的关系一直存在着争议^[4,5],从而直接影响了其在基础理论研究和实际应用中的积极作用。20 世纪 60 年代,分子系统发育学(molecular phylogeny)的建立开创了利用分子标记研究生物系统发育的途径^[6,7]。随后 40 年

中,随着分子生物学技术和计算机数据处理技术的迅速发展,该学科在研究各种生物类群间亲缘关系、起源与进化等方面得到了广泛的应用。纤毛虫分子系统发育学正是在此背景下应运而生的,为从分子水平上探讨纤毛虫的系统发育学问题奠定了基础^[8-10]。本文在介绍分子系统发育学的产生、研究方法和研究内容的同时,着重阐述了纤毛虫分子系统发育学的研究与进展,最后针对纤毛虫中分子系统发育学结果与传统分类学间产生的矛盾讨论了纤毛虫分子系统发育学未来发展的方向。

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39730070);

** 通讯联系人;

第一作者介绍 缪炜,男,27 岁,博士生;研究方向:原生动动物分子系统发育学;E-mail: miao wei530@yeah.net.

收稿日期:2001-04-01,修回日期:2001-08-06

1 产生和研究方法

80年代初期, Sogin 和 Elwood 等^[9]利用小亚基核糖核酸(small subunit rRNA, SSUrRNA)作为分子标记对纤毛虫系统发育关系的研究标志着纤毛虫分子系统发育学的诞生。之后, 分子系统发育学在纤毛虫各个分类阶元的不同类群间的系统发育研究中得到了广泛的应用, 并解决了一些形态学无法解决或尚存争议的问题。

目前用于分子系统发育学研究的主要方法有 RFLP (restriction fragment length polymorphism 限制性片段长度多态性)分析, RAPD(random amplified polymorphic DNA 随机扩增多态性 DNA)分析和 DNA 序列分析等。

1.1 RFLP 分析 利用已知的限制性内切酶消化核 DNA、线粒体 DNA 或总 DNA, 然后根据得到的电泳酶切图谱计算彼此间遗传距离, 从而构建起系统发育树。RFLP 是一种很有效的遗传标记, 在真核生物中主要以 mtDNA 的 RFLP 作为遗传标记, 利用其揭示种间关系或种上系统发育的研究工作很多, 但有关纤毛虫 RFLP 分析的工作较少, 而且 RFLP 步骤繁琐, 工作量大, 且成本较高, 使其应用受到了一定的限制。

1.2 RAPD 分析 建立在 PCR(polymerase chain reaction, 多聚酶链反应)方法的 RAPD 分析技术问世于 1990 年, 它是利用人工合成的单链寡核苷酸为引物, 采用较低的退火温度对所研究的基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 得到多态性的 DNA 片段, 经分析处理后构建起系统发育树。RAPD 方法大多用于近缘种、复合种及种内生物型的遗传多样性和地理种群的遗传进化等方面的研究, 用在种以上类群间的比较时无法得到可靠的遗传距离^[15]。

1.3 DNA 序列分析 DNA 序列分析是通过比较各类群个体间同源基因或基因片段的核酸序列, 从而构建分子系统发育树, 推断类群间系统发育关系的方法。该方法是目前进行分子进化和系统发育研究最有效、最可靠的方法。

1.4 构建分子系统发育树的分析方法 主要有三种方法: 简约法(parsimony)、距离法(distance)和似然法(likelihood method)。简约法中常用的是最大简约法(maximum parsimony), 可用 PHYLIP 软件中 Fitch 程序执行; 距离法中的邻接法(neighbor-joining, NJ)和不加权对群分析法(unweighted pair group with mathematical average, UPGMA)最为常用, 其中邻接法可用 PHYLIP 软件中 NEIGHBOR 程序计算; 似然法中影响最大的是最大似然法(maximum likelihood method), 可用 PHYLIP 软件中

DNAML 程序执行。由于无法判断在某一具体情况下哪种方法最佳, 因而建议采用多种方法同时建树, 若多种方法所获的系统树一致, 将大大提高结果的可靠性。

2 研究的内容与进展

纤毛虫分子系统发育学研究的内容大致可分为以下两部分:

2.1 种群遗传多样性与进化的研究 利用分子标记研究种内各种群的遗传多样性, 探讨物种的形成与分化的机理。作者对缘毛目纤毛虫蝎状独缩虫(*Carchesium polypinum*)在武汉三镇的遗传多样性的 RAPD 分析表明其变异较大, 遗传相似度在 0.6522 至 0.7385 之间, 同时探讨了蝎状独缩虫较高的遗传多样性与环境间的关系^[16]。Kusesh 等用 RAPD 方法对 3 种游仆虫的种内和种间遗传多样性研究的结果显示, 种间的共享因子 D 为 0.38 ~ 0.48, 种内的为 0.60 ~ 0.78。同一种群 *E. daidaleos* 的 130 个个体间的遗传多样性很低, D 值达到 0.97, 显示出有性生殖在该种群中很少发生^[17]。Stoeck 等利用 RAPD 技术研究了 2 种双小核草履虫复合体(*Paramecium aurelia* species complex)的虫株在不同地区的种群结构^[18]。孙军等利用 RAPD 方法观察到绿草履虫-小球藻共生体两者间存在基因联系, 为研究彼此间进化关系提供了新思路^[19]。

2.2 种上阶元系统发育的研究 通过对 RAPD 或特定基因核酸序列的比较分析得到相应的分子系统发育树, 在对传统分类系统进行验证和补充的同时, 亦可为传统分类系统中存在的有争议的, 或者形态学尚不能解决的某些类群的系统发育学问题提供新的研究手段。

用于构建纤毛虫分子系统发育树的基因有 Hsp70 (heat-shock protein of 70 ku), 组蛋白 H4, DNA 聚合酶 α , EF-1 α (elongation factor 1 α), 以及 rRNA 基因等。Budin 等在证明 Hsp70 基因是一个很保守、可靠的系统发育标记的基础上, 以 *Paramecium tetraurelia* (Oligohymenophora) 和 *Euplotes aediculatus* (Hypotricha) 为材料, 将得到的 Hsp70 基因序列与其它真核生物类群比较, 结果显示纤毛虫是单系起源的, 而且是孢子门(Sporozoa)的姊妹群, 两者共同组成了具泡进化枝(alveolates clade)^[10]。Bernhard 等用组蛋白 H4 和 H3 基因研究了纤毛虫不同类群间的系统发育关系, 指出原来被认为在纤毛虫中较晚分化出来的异毛类纤毛虫(heterotrichs)实际是一支由纤毛虫系统发育树基部分化出来的类群^[20]。另外 DNA 聚合酶 α 及细胞周期蛋白等功能基因也被用在下毛类

(Hypotrichs)和草履虫(*Paramecium*)等的系统发育学研究中^[21,22]。

然而,目前被广泛采用的是 rRNA 基因。这是因为大分子 rRNA 不仅具有保守的结构,而且在序列上有高度的多态性,即核酸序列中随机或定向发生的突变可使该序列产生数量巨大、结构不完全相同的同源分子,记录了生物进化的过程,成为研究生物系统发育的分子生物学基础*。在大分子 rRNA 中,存在着不同进化速率的区域,即保守区和高变区,rRNA 基因的编码区(18S,5.8S,28S rRNA)和非编码区(转录间隔区 ITS1,ITS2;非转录间隔区 NTS)进化的速度和规律也不同。如编码区非常保守,进化速率慢,适合构建系统树的基部分枝。转录间隔区为中度保守,适合推算 5×10^6 年左右的进化事件,非转录间隔区进化速率较快,适合于种间关系研究。可根据不同的需要,选择合适的区域研究不同阶元类群的系统发育^[23]。

表 1 中列出的是截止到 2000 年 11 月份用于纤毛虫分子系统发育学研究的 rRNA 基因序列的统计结果。其中 SSUrRNA 基因是最早,也是目前最常采用的系统发育分子标记,SSUrRNA 在不同阶元的纤毛虫类群的系统发育研究中得到了广泛的应用,同时得到了一些有意义的结果。

表 1 用于纤毛虫分子系统发育学研究的 rRNA 基因序列的纤毛虫种类统计结果

纤毛门 Ciliophora	纤毛虫种类数			
	SSUrRNA	ITS1, ITS2	5.8S, 5SrRNA	LSUrRNA
肾形纲 Colpodea (9 种)	4			5
下毛类 Hypotrichs (48 种)	37	21	23	25
核残迹纲 Karyorelictea (6 种)	3			2
侧口纲 Litostomatea (25 种)	16	3	3	7
篮口纲 Nassophorea (7 种)	4			2
寡膜纲 Oligohymenophorea (99 种)	43	4	10	61
叶咽纲 Phyllopharynge(2 种)	2			
前口纲 Prostomatea (6 种)	6			1
旋毛类 Spirotrichea (30 种)	20	3	5	4
合计 (232 种)	105	31	41	107

Diggles 等对比了来自澳大利亚、爱尔兰和美国的 *Cryptocaryon irritans* 的 rDNA(包括部分 18S 和 5.8S 的序列:151 bp,以及 ITS1 的全序列:169 bp),结果 18S 中有 1 个碱基,ITS1 中有 11 个碱基发生了改变。尽管澳大利

亚的 *C. irritans* 与爱尔兰和美国的 *C. irritans* 在形态上不很相似,但它们间的变异度(1.8%和 2.3%)反而低于形态上很相似的来自澳大利亚 Moreton 港和 Heron 岛的 *C. irritans* 之间的变异度(4.1%)。另外在实验室培养形态一致、同于 1994 年来自 Moreton 港野生鱼身上的 *C. irritans* 的三个 isolates 间的变异度却达到了 2.9%和 3.5%,而在此时间段中,寄生在 Moreton 港野生鱼身上的 *C. irritans* 间保持不变,暗示着在实验室培养的 *C. irritans* 存在建立者效应(founder effect)^[24]。

Wright 等将获得的瘤胃纤毛虫(*Entodinium candatum*, *Epidinium candatum*, *Polyplastron multivesiculatum*)的 18S rRNA 基因序列与其它纤毛虫的进行比较得出瘤胃纤毛虫是单系起源的,且 *Entodinium candatum* 是最早分化出来的一类瘤胃纤毛虫,它与 *Polyplastron multivesiculatum* 而不是与 *Epidinium candatum* 构成姊妹群;同时指出瘤胃纤毛虫是自由生活的 *Loxophyllum*, *Spathicium* 和 *Homalozoom* 的姊妹群,它们共同组成的 Litostomes(Class Litostomatea)也是单系起源的^[25]。

SSUrRNA 基因序列分析还成为解决纤毛虫中一些类群不确定的系统发育地位的有力工具。

例如咽膜类纤毛虫作为一类分类阶元较高的纤毛虫已有近 50 年了,但关于咽膜亚纲纤毛虫间的系统发育关系仍未解决。Struder-Kypke 等将缨尾虫(*Urocentrum turbo*)、4 种草履虫(*Paramecium*)、前口虫(*Frontonia* sp.)和舟形虫(*Lembadion bullinum*)的 SSUrRNA 基因序列进行比较,用距离矩阵、最大简约法和最大似然法三种方法构建的系统树均显示除 *U. turbo* 外的咽膜类都被强有力地证明是单系起源的,而 *U. turbo* 则与其它类群相联系,草履虫至少分成了四个枝。从而得出结论:咽膜亚纲应分为 *Urocentrida* 和 *Peniculida* 两个目,后一个目又分为 *Frontoniina* 和 *Peniculina* 两个亚目^[26]。

Lynn 等则利用 SSUrRNA 基因序列研究了肾形纲中各目间的系统发育关系,并对以往存在的三种假设作出了回答^[27]。Hirt 等利用构建的纤毛虫 SSUrRNA 系统树对纤毛门中的核残迹类纤毛虫的系统发育和两型核的进化,以及纤毛虫氢化酶体的起源与进化做了详尽阐述,并提出了一些饶有兴趣的研究方向^[28]。der Peer 等在考虑 18S rRNA 序列每个核酸置换率的基础上,对 500 种真核生物 SSUrRNA 基因序列进行了比较,研究了处于树冠阶元(crown taxa)的真核生物的进化关系^[29]。

* 屈良鸽,周惠,陈月琴. 基因的结构进化:rRNA 与 snoRNA. 全国生物进化理论研讨会论文集, 2000. 49-50.

还可以利用 SSUrRNA 分子钟估算纤毛虫起源与进化的年代。Wright 把淡水鱼的起源作为一个独立事件,对寄生在淡水鱼身上的小瓜虫 (*Ichthyophthirius*), 以及与其亲缘关系最近的自由生活的睫杆虫 (*Ophryoglena*) SSUrRNA 基因核酸置换率的估算, 得出核酸的置换率为: 每 72 至 80 百万年变化 1%。利用该数据推算出纤毛虫的起源比以前推测的要古老许多, 可追溯到早元古代 (Palaeoproterozoic), 大约在 1 980 到 2 200 百万年前。如今建立的纲 (Spirotrichea, Oligohymenophorea, Nassophorea, Colpodea, Heterotricha, Karyorelictea 和 Litostomatea) 大约是在 600 百万年内由处在真核生物进化主干上的纤毛虫的祖先演化来的^[30]。

3 研究前景

在分子系统发育学成为研究解决纤毛虫系统发育和进化问题的新手段, 并取得了一定成绩的同时, 我们也注意到分子系统发育学的结果时常与传统的观点不符, 有时甚至会出现完全对立的情况, 这种现象在以不同的基因序列, 基因序列与氨基酸序列为进化标记得到的系统发育结果间也存在。如何认识和解决这一问题已成为分子系统发育学发展的当务之急。

首先应该明确我们通过现在某一个基因序列构建的分子系统发育树, 由于该基因在漫漫历史长河中其本身也在进化, 它所提供的信息并不像古生物学中的生物化石反映的是生物进化时的原始特征, 因而分子系统树并非真正反映生物进化过程的系统树——物种树。我们只能通过对多基因、大量 DNA 序列的正确分析, 最大限度地缩小两者间的差别, 达到两者逐步接近, 统一的目的^[23]。

造成不同基因序列分析得到不同系统树的原因, 一方面是分析处理方法存在局限性, 由于对基因的许多进化规律尚不甚了解, 在进行分析时就可能忽略或根本没考虑这些因素; 另一方面, 不同基因本身就存在不同的进化率和突变饱和度, 对于不同分类阶元应有选择地使用不同基因作为分子标记, 也就是说目前还没有哪个基因可以完全作为分子标记对整个生物界进行建树。例如在纤毛虫中被广泛使用的 rRNA 系统树就存在对不同类群间 GC 含量过于敏感的问题, 也需要其它分子标记的结果加以补充和修正。对于多组基因序列数据的处理, 目前有“一致”和“联合”两种途径, 前者是先根据各个基因序列分别构建各自的分子系统树, 然后再根据它们间的共同处构建“一致”的系统树; 后者是先把多组序列数据合并为一组, 再建树。

尽管目前纤毛虫系统发育学尚存在许多难点和疑

点, 但由于已有上百种基因用于分子系统树的建立, 同时 2000 年 Kung 等通过突变体的功能互补建立的草履虫大核 DNA 基因库, 已获得了有长 6 000 到 12 000 bp 插入片段的 61 440 个克隆^[31], 为通过大量 DNA 序列构建纤毛虫分子系统树打下了坚实的基础, 可以预测纤毛虫分子系统发育学的未来发展将推动以下几方面研究。

3.1 推动真核生物起源与进化的研究 由作为单细胞真核生物模式生物的草履虫和四膜虫所获得的大量遗传信息必将带动纤毛门、乃至整个原生动物界系统发育学研究的大发展, 进而加深我们对真核生物起源与进化的认识。

3.2 纤毛虫将成为研究生物及基因进化的良好材料 纤毛虫是分化程度最高的单细胞真核生物, 对外界环境的变化不仅十分敏感, 而且有较强的适应能力, 因而通过对纤毛虫赋予一定的外界刺激考察其 DNA 序列的变化, 来探索基因进化, 尤其是非编码区 DNA 序列的变化规律, 将直接推动纤毛虫分子系统发育学中方法学的发展; 而且作为研究生物进化的良好材料的纤毛虫甚至让我们梦想有朝一日通过模拟适当的环境再现某一时期生物进化的历史。

另外, 利用分子生物学方法对厌氧异毛类纤毛虫的氢化酶体起源于它们好氧祖先的线粒体, 厌氧异毛类纤毛虫-甲烷菌互利共生体的起源及与宿主生态位间关系的揭示^[32,33], 都预示着纤毛虫分子系统发育学具有广阔的研究空间和发展前景。

参 考 文 献

- [1] 沈韞芬编著. 原生动物学. 北京: 科学出版社, 1999.
- [2] 沈韞芬, 章宗涉, 龚循矩等. 微型生物监测新技术. 北京: 中国建筑工业出版社, 1990.
- [3] Cech T R. RNA as an Enzyme. *Sci Amer*, 1986, **255**(1): 64 ~ 75.
- [4] Corliss J O. *The Ciliated Protozoa. Characterization, Classification and Guide to the Literature* 2nd. Ed. London: Pergamon Press, 1979.
- [5] Lynn D H, Small E B. A revised classification of the phylum Ciliophora Doflein 1901. *Rev Soc Mex Hist Nat*, 1997, **47**(1): 65 ~ 78.
- [6] Zuckerkandl E, Pauling L. Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: V. Brysem, H. J. Vogel eds. *Evolving Genes and Proteins*. New York: Academic Press, 1965. 97 ~ 166.
- [7] Fitch W M, Margoliash E. Construction of phylogenetic trees. A method base on mutation distances as estimated from cyto-

- chrome c sequences is of general applicability. *Science*, 1967, **155**(2): 279 ~ 284.
- [8] Wosese C R, Fox G E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1977, **74**: 5 088 ~ 5 090.
- [9] Sogin M L, Elwood H J, Gunderson J H. Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1986, **83**: 1 383 ~ 1 387.
- [10] Budin K, Philippe H. New insights into the phylogeny of eukaryotes based on ciliate Hsp70 sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 1998, **15**: 943 ~ 956.
- [11] Kahl A. Ciliata libera et ectocommensalia. In: Grimpe G, Wagler E eds. Die Tierwelt der Nord-und Ostsee, Lief 23. Leipzig, 1933. 29 ~ 146.
- [12] Levine N D, Corliss J O, Cox F E G *et al.* A newly revised classification of the Protozoa. *J Protozool*, 1980, **27**(1): 37 ~ 58.
- [13] Lee J J, Hutner S H, Bovee E C. An Illustrated Guide to the Protozoa. Lawrence: Allen Press, 1985.
- [14] Corliss J Q. An interim utilitarian ("user-friendly") hierarchical classification and characterization of the protists. *Acta Protozool*, 1994, **33**(1): 1 ~ 51.
- [15] Zande L, Bejlsma J. Limitations of the RAPD technique in phylogeny reconstruction in *Drosophila*. *J Evol Biol*, 1995, **8**(5): 645 ~ 656.
- [16] 张锡元, 孙羽中, 缪炜等. 鳃状独缩虫 (*Carthesium polypinum*) 遗传多样性的 RAPD 分析. 生物多样性, 2000, **8**(3): 257 ~ 261.
- [17] Kusch J, Heckmann K. Population structure of *Euplotes* ciliates revealed by RAPD fingerprinting. *Ecoscience*, 1996, **3**: 378 ~ 384.
- [18] Stoeck T, Przybos E, Schmidt H J. A combination of genetic with inter- and intra-strain crosses and RAPD-fingerprints reveals different population structures within the *Paramecium aurelia* species complex. *Europ J Protistol*, 1998, **34**: 348 ~ 355.
- [19] 孙军, 顾福康. 含小球藻和无小球藻绿草履虫的基因组 DNA 多态性的研究. 动物学研究, 2000, **21**(4): 257 ~ 261.
- [20] Bernhard D D, Schlegel M. Evolution of histone H₄ and H₃ gene in different ciliate lineages. *J Mol Evol*, 1998, **46**: 344 ~ 354.
- [21] Hoffman D C, Prescott D M. Phylogenetic relationships among Hypotrichous ciliates determined with the macronuclear gene encoding the large, catalytic subunit of DNA polymerase α . *J Mol Evol*, 1997, **45**: 301 ~ 310.
- [22] Hong Zhang, Sina M A, James D B. Two distinct classes of mitotic cyclin homologs, Cyc1 and Cyc2, are involved in cell cycle regulation in the ciliate *Paramecium tetraurelia*. *J Euk Microbiol*, 1999, **46**(6): 585 ~ 596.
- [23] 张亚平. 从 DNA 序列到物种树. 动物学研究, 1996, **17**(3): 247 ~ 252.
- [24] Benjamin K D, Robert D A. Intraspecific variation in *Cryptocaryon irritans*. *J Euk Microbiol*, 1997, **44**(1): 25 ~ 32.
- [25] Wright A D G, Dehority B A, Lynn D H. Phylogeny of the rumen ciliates *Entodinium*, *Epidinium* and *Polyplastron* (Littosomata: Entodiniomorpha) inferred from small subunit ribosomal RNA sequences. *J Euk Microbiol*, 1997, **44**(1): 61 ~ 67.
- [26] Strüder-Kypke M C, Wright A D G, Fokin S I *et al.* Phylogenetic relationships of the Subclass Peniculia (Oligohymenophorea, Ciliophora) inferred from small subunit rRNA gene sequences. *J Euk Microbiol*, 2000, **47**: 419 ~ 429.
- [27] Lynn D H, Wright A D G, Schlegel M *et al.* Phylogenetic relationships of orders within the Class Colpodea (Phylum Ciliophora) inferred from Small Subunit rRNA Gene Sequences. *J Mol Evol*, 1999, **48**: 605 ~ 614.
- [28] Hirt R P, Wilkinson M, Embley T M. Molecular and cellular evolution of ciliates: a phylogenetic perspective. In: Coombs G H, Vickerman K, Sleight M A *et al.* eds. Evolutionary Relationships among Protozoa, London, 1999.
- [29] de Peer Y V, Wachter R D. Evolutionary relationships among the Eukaryotic Crown taxa taking into account site-to-site rate variation in 18S rRNA. *J Mol Evol*, 1997, **45**: 619 ~ 630.
- [30] Wright A D G, Lynn D H. Maximum ages of lineages estimated using a small subunit rRNA molecular clock: Crown eukaryotes date back to the paleoproterozoic. *Archiv Fuer Protistenkunde*, 1997, **148**: 329 ~ 341.
- [31] Kung C, Saimi Y, Haynes W J *et al.* Recent advances in the molecular genetics of paramecium. *J Euk Microbiol*, 2000, **47**: 11 ~ 15.
- [32] Hackstein J H P, Akhmanova A S, Boxma B *et al.* Hydrogenosomes: eukaryotic adaptations to anaerobic environments. *Trends Microbiol*, 1999, **7**: 441 ~ 447.
- [33] van Hoek A H A M, van Alen T A, Sprakel V S I *et al.* Multiple acquisition of methanogenic archaeal symbionts by anaerobic ciliates. *Mol Biol Evol*, 2000, **17**: 251 ~ 258.