

旋唇纲纤毛虫系统发育分子树构建的影响因素*

伊珍珍 陈子桂** 高珊 宋微波

中国海洋大学教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003

摘要 以 36 种旋唇类高等类群纤毛虫的核糖体小亚基核苷酸 (Small subunit ribosomal RNA, SS rRNA) 基因序列为素材, 比较研究了不同条件 (包括外类群、内类群的选择, 同一基因不同序列长度的组合, 不同建树方法和不同分析软件的使用) 对纤毛虫分子系统树构建结果的影响。结果表明, 上述因素均可不同程度地影响拓扑结构。结果同时提示, 在利用有限数据进行相关研究, 特别是在对未明类群的系统关系分析中, 必须充分考虑建树条件的不同所带来的影响。作者同时也建议, 在当前可用的分子信息欠充分的前提下, 对于纤毛虫任何类群的分子系统学探讨而言, 慎重形成结论并尽可能地结合和参照形态学、发生学等资讯, 仍是需优先考虑的工作路线 [动物学报 53 (6): 1031-1040, 2007]。

关键词 纤毛虫 分子进化 系统树 SS rRNA 基因 外类群

Impacts on the phylogenetic tree construction of ciliated protozoa inferred from the SS rRNA gene sequences of 36 spirotrichs*

YI Zhen-Zhen, CHEN Zi-Gui**, GAO Shan, SONG Wei-Bo

Laboratory of Protozoology, KLM, Ocean University of China, Qingdao 266003, Shandong, China

Abstract Molecular genetic studies alone are of limited value when assessing the evolutionary relationships of ciliated protozoa species, given that limited numbers and lengths of genes are available for analysis. Different algorithms and gene sequence matrixes typically yield different topologies. Using SS rRNA gene sequences of 36 spirotrichous ciliates belonging to three genera, *Holosticha*, *Euplotes* and *Oxytricha*, phylogenetic trees were constructed and compared in order to determine the effects of changing the tree topologies. In this work, different combinations of data sets were used, including different out-groups (i. e., *Aspidisca steini*, *Pseudokeronopsis flava*, *Kiitricha marina*, *Loxodes striatus*), different combinations of internal groups, different lengths of gene sequences, and different tree-construction algorithms (i. e., UPGMA, NJ and MP methods). Results indicate that these data sets could be used to construct different tree topologies. All of these should be seriously considered when assessing the molecular phylogenetic positions of some unknown/ambiguous ciliates based on gene sequences. Due to limited molecular information, morphological and morphogenetical characters of ciliated protozoa should also be taken into account prior to constructing phylogenetic trees and discussing the evolutionary relationships of any organisms inferred from limited genes and sequences [Acta Zoologica Sinica 53 (6): 1031-1040, 2007].

Key words Ciliate, Molecular evolution, Phylogenetic tree, SS rRNA gene, Outgroup

分子系统学是生物进化、现代发育生物学研究领域中最活跃的分支学科之一。然而作为一门年轻学科, 分子系统学无论在理论以及方法适用上仍存在着诸多有待完善和解决的问题 (王莹等, 2005)。由于纤毛虫极为复杂的结构分化、高度的多样性以及在低等真核生物中所处的独特地位, 关于纤毛门内以及相邻阶元间的系统发育关系长期以来一直备

受关注。20 世纪 80 年代初, Elwood et al. (1985) 首次利用核糖体小亚基核苷酸 (Small subunit ribosomal RNA, SS rRNA) 作为分子标记开展了对纤毛虫系统关系的探讨。之后, 分子系统学在纤毛虫各类群间的系统发育研究中得到了广泛的应用, 并解答或修正了大量经典手段长期未决或存在错误的问题。例如 Lynn and Small (2002) 依据超微结构及

2007-06-25 收稿, 2007-09-30 接受

* 国家自然科学基金课题资助 (No.30670280, No.40676076) [This research was funded by the National Natural Science Foundation of China (No.30670280, No.40676076)]

** 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: zigui@ouc.edu.cn

© 2007 动物学报 Acta Zoologica Sinica

分子生物学数据构建的纤毛虫分类系统, 与 Corliss (1979) 依据形态学为主的信息所建系统相比在高级阶元划分上体现了许多根本性的改变。

然而, 与之同时, 某些围绕系统构建出现的新问题也逐渐显现出来, 突出的问题包括单一基因的信息容量限制、因建树方法的不同所产生的偏差等。系统树构建不仅是生物信息学中的核心问题之一, 也是系统发育分析中的一个基础步骤和关键环节。系统树拓扑结构直接影响系统发育分析结论, 并在不同程度上影响着后续工作的开展。本文集中探讨了影响分子系统树构建的几种因素, 以期引起更为广泛的研究和深入的讨论。鉴于迄今围绕纤毛虫分子系统学研究的信息仍然不够完备, 而用系统学方法探讨具有重要意义的个体发生学研究也主要集中在高等类群(如腹毛类、游仆类等), 本工作选择了目前 GenBank 中标记性基因(SS rRNA 基因)信息相对丰富且个体发生属级模式研究较为详尽的 36 种旋唇类纤毛虫(游仆虫、全列虫、尖毛虫)为基本建树元素, 逐一就外类群、内类群的选择, 同一基因不同序列长度的组合, 不同建树方法和分析软件的使用等因素对系统树构建的影响做了比较和探讨。

1 材料和方法

本文所选择的高等类群纤毛虫在形态学上均具有稳定的、易于鉴别的纤毛图式, 从而确保阶元界定上的无争议性。

1.1 研究类群选择

1.1.1 数据集 1

12 种游仆虫 SS rRNA 基因序列的 GenBank 登录号。 *Euplotes aediculatus* (X03949), *E. crassus* (AJ310492), *E. charon* (AF492705), *E. eurystomus* pop-1 (AJ310491), *E. eurystomus* pop-2 (AF452707), *E. minuta* (AJ310490), *E. octocarinatus* (AJ310489), *E. parawoodruffi* (AF452708), *E. rariseta* (AF492706), *E. vannus* pop-1 (AY004772), *E. vannus* pop-2 (AJ310488), *E. woodruffi* XX (AF452710), *Euplotes woodruffi* BH (AF492707)。

1.1.2 数据集 2

6 种游仆虫 SS rRNA 基因序列的 GenBank 登录号。 *Euplotes harpa* pop-1 (AJ811016), *E. harpa* pop-2 (AJ811015), *E. kahli* (DQ309868), *E. magnicirratu* (AJ549210), *E. muscicola* (AJ305254), *E. parkei* (AJ305247)。

1.1.3 数据集 3

5 种全列虫 SS rRNA 基因序列的 GenBank 登录号。 *H. diademata* (DQ059583), *H. cf. warreni* (DQ059582), *H. multistilata* (AJ277876), *H. polystylata* (AF508760), *H. sp.* WJC-2003 (AY294647)。

1.1.4 数据集 4

13 种尖毛虫 SS rRNA 基因序列的 GenBank 登录号。 *Oxytricha ferruginea* (AF370027), *O. granulifera* 1 (AF164122), *O. granulifera* 2 (X53486), *O. granulifera* 3 (AF508762), *O. longa* 1 (AF164125), *O. longa* 2 (AF508763), *O. sp.* Aspen (AF164126), *O. sp.* LPJ-2005 (DQ022065), *O. sp.* Misty (AF508764), *O. sp.* Steamboat (AF508769), *O. sp.* unknown B (AF164683), *O. sp.* unknown F (AF164684), *O. saltans* (AF370028)。

1.1.5 外类群 SS rRNA 基因序列的 GenBank 登录号

Aspidisca steini (AF305625), *Kiitricha marina* (AY896768), *Loxodes striatus* (U24248), *Pseudokeronopsis flava* (DQ227798)。

1.2 系统树构建方法

SS rRNA 基因的多序列比对使用 BioEdit v7.0.5 (Hall, 1999) 的内嵌程序 CLUSTALW, 参数设置为默认。

应用 PHYLIP 软件包 (Felsenstein, 1995) 中的 SEQBOOT 程序生成自展数据集, 随机种子数为 9, 自展重复次数为 1 000, 采用 DNADIST 程序 (Kimura 2-parameter 距离) 和 NEIGHBOR 程序中的邻接法 (Neighbor-joining, NJ) 构建有外类群的距离树, 采用 CONSENSE 程序获得多数一致树。

应用 PHYLIP 软件包 (Felsenstein, 1995) 中的 SEQBOOT 程序生成自展数据集, 随机种子数为 9, 自展重复次数为 1 000, 采用 DNADIST 程序 (Kimura 2-parameter 距离) 和 NEIGHBOR 程序中的非加权的组平均法 (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean, UPGMA) 构建无外类群或有外类群的距离树, 采用 CONSENSE 程序获得多数一致树。

应用 PAUP * v4.0b10 软件 (Swofford, 2002) 构建最大简约树 (Maximum parsimony, MP), 搜索策略采用启发式搜索, 树二等分再连接的分支交换法, 采用逐步加入算法, 并将随机加入序列数设置为 10, 分值致信度采用自引导法, 自展重复次数为 1 000。

2 结 果

2.1 外类群选择对系统树拓扑结构的影响(图 1-5)

为增加可比性，本文中所选外类群按与内类群的亲缘关系远近形成梯度如下：游仆虫属 (*Euplotes*) 的三个外类群分别为：同一亚目的 *Aspidisca steini*，同一目但与其亲缘关系较远亚目的 *Kiitricha marina*，不同纲的 *Loxodes striatus*。全列虫属 (*Holosticha*) 的三个外类群分别为：同一亚目的 *Pseudokeronopsis flava*，同一目但与其亲缘关系较远亚目的 *K. marina*，不同纲的 *L. striatus*。尖毛虫属 (*Oxytricha*) 的三个外类群分别为：同一目与其亲缘关系较近亚目的 *P. flav*，同一目但与其亲缘关系较远亚目的 *K. marina*，不同纲的 *L. striatus*。

表 1 外类群选择对构建系统树的影响

Table 1 Difference in tree topologies with different “out-group” species for tree construction inferred from the same SS rRNA gene sequence matrix

分析程序 Program	PHYMLIP	PHYMLIP	PAUP
建树方法 Algorithm	UPGMA	NJ	MP
数据集 1 Matrix 1	1b, 1c, 1d	1e, 1f, 1g	1h, 1i, 1j
数据集 1 (修改后) Modified matrix 1	2b, 2c, 2d	2e ^① , 2f ^② , 2g ^③	2h, 2i, 2j
数据集 1 + 数据集 2 Matrixes 1 and 2	3b ^① , 3c ^① , 3d ^②	3e ^① , 3f ^② , 3g ^③	3h, 3i, 3j
数据集 3 Matrix 3	4b, 4c, 4d	4e ^① , 4f ^② , 4g ^③	4h, 4i, 4j
数据集 4 Matrix 4	5b ^① , 5c ^② , 5d ^③	5e ^① , 5f ^② , 5g ^③	5h, 5i, 5j

①, ②, ③: 不同的系统树拓扑结构。

①, ②, ③: different tree topologies.

如表 1 所示：系统树拓扑结构不同的组合占组合总数的 40%；其中，在应用 UPGMA 法的五种组合中，系统树拓扑结构不同的组合有两组，占 40%；在应用 NJ 法的五种组合中，系统树拓扑结构不同的组合有四组，占 80%；而在应用 MP 法的五种组合中，没有系统树拓扑结构不一致的组合。结果表明：外类群与内类群的亲缘关系远近会对系统树部分分支的置信值，甚至系统树的拓扑结构造成一定影响。

2.2 外类群选用与否对系统树拓扑结构的影响 (图 1-5)

如表 2 所示：系统树拓扑结构不同的组合占组合总数的 40%。结果表明：有无外类群也会对系

统树部分分支的置信值，甚至系统树的拓扑结构造成一定影响。

表 2 有无外类群对构建系统树的影响

Table 2 Difference in tree topologies with and without the “out-group” species inferred from the same SS rRNA gene sequence matrix

数据集 Matrix	组合 Combination
数据集 1 Matrix 1	1a 与 1b, 1c, 1d
数据集 1 (修改后) Modified matrix 1	2a 与 2b, 2c, 2d
数据集 1 + 数据集 2 Matrixes 1 and 2	3a ^① 与 3b ^① , 3c ^① , 3d ^②
数据集 3 Matrix 3	4a 与 4b, 4c, 4d
数据集 4 Matrix 4	5a ^① 与 5b ^② , 5c ^① , 5d ^①

①, ②, ③: 不同的系统树拓扑结构; a: 无外类群的系统树; b, c, d: 有外类群的系统树。

①, ②, ③: different tree topologies; a: trees constructed without out-groups; b, c, d: trees constructed with out-groups.

2.3 内类群对系统树拓扑结构的影响 (图 2, 3)

我们在研究某些纤毛虫特定种类的系统地位时，其相近类群的数据往往是有限的。同时，当可选的内类群种类较多，而又无需全选时，我们的选择可能带有一定的随机性。为了研究随机选择的内类群对所研究的种类的系统地位造成的影响，我们选用了改变内类群的方式之一——增加内类群来进行研究。如表 3 所示：在系统树拓扑结构相同的组合中，部分分支的置信值有一定的差异。系统树拓扑结构不同的组合占组合总数的 60%；其中，在应用 UPGMA 法的四种组合中，系统树拓扑结构不同的组合均相同；而在应用 NJ 法、MP 法的组合中，所有的系统树拓扑结构均相异。

表 3 不考虑序列长度的影响的前提下，增加内类群对构建系统树的影响

Table 3 Difference in tree topologies by increasing the number of internal species inferred from the same SS rRNA gene sequence matrix

分析程序 Program	PHYMLIP	PHYMLIP	PAUP
建树方法 Algorithm	UPGMA	NJ	MP
无外类群 Without outgroup	1a, 2a		
外类群 1: <i>A. steini</i> Outgroup 1	1b, 3b	* 1e, 3e	* 1h, 3h
外类群 2: <i>K. marina</i> Outgroup 2	1c, 3c	* 1f, 3f	1i, 3i
外类群 3: <i>L. striatus</i> Outgroup 3	1d, 3d	* 1g, 3g	* 1j, 3j

* 系统树拓扑结构不同的组合。

* Assemblages containing different tree topologies.

A. steini: *Aspidisca steini*. *K. marina*: *Kiitricha marina*. *L. striatu*: *Loxodes striatus*.

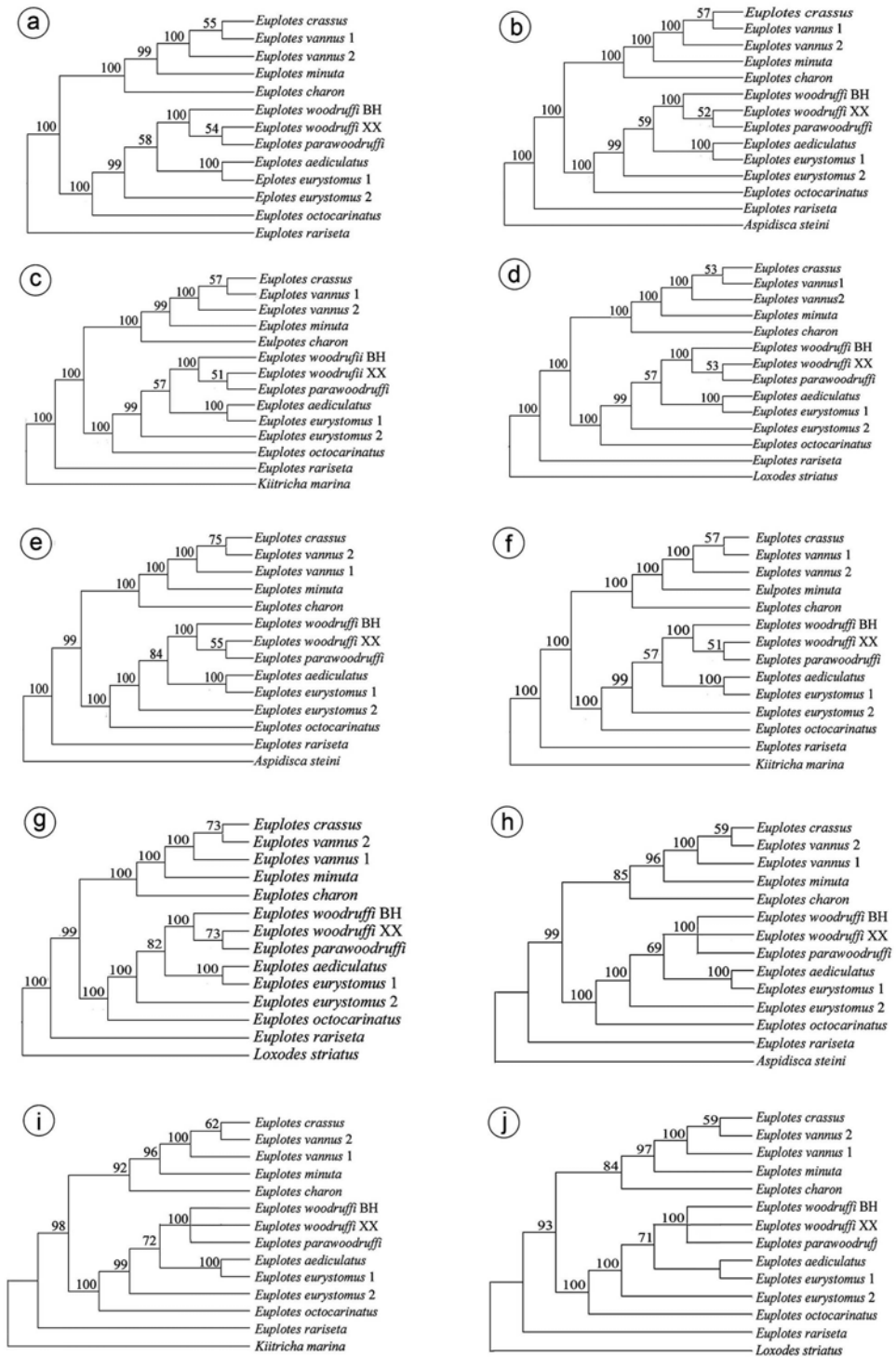


图 1 基于数据集 1 构建的分子系统树。

系统树构建方法依次采用 UPGMA 法 (1a, 1b, 1c, 1d)、NJ 法 (1e, 1f, 1g) 和 MP 法 (1h, 1i, 1j)

Fig.1 Phylogenetic trees of *Euplotes* spp. inferred from the SS rRNA gene sequences in the Matrix 1 using UPGMA (1a, 1b, 1c, 1d), NJ (1e, 1f, 1g) and MP methods (1h, 1i, 1j)

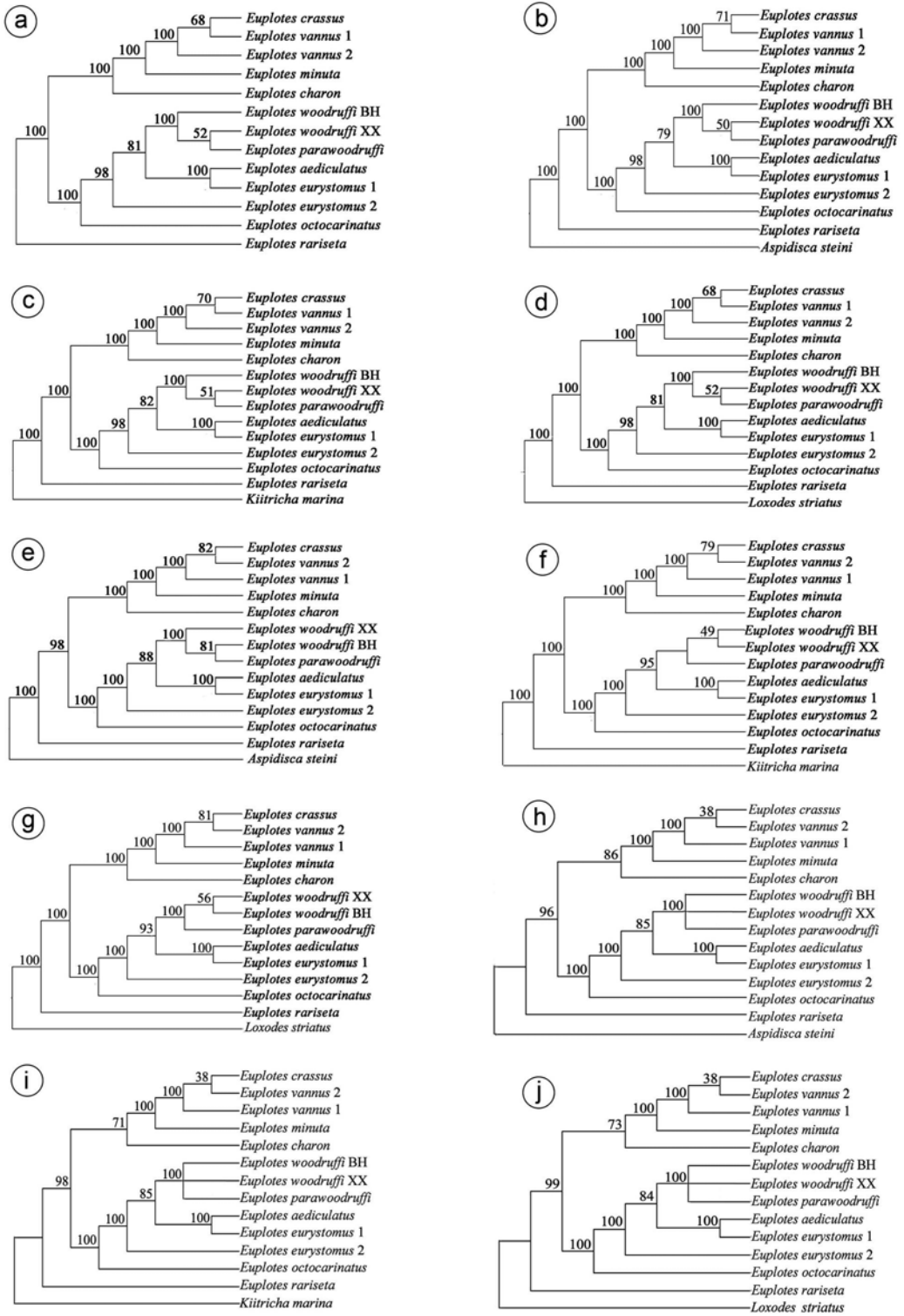


图2 基于修改后的数据集 1 构建的分子系统树，系统树构建方法依次采用 UPGMA (2a, 2b, 2c, 2d)、NJ 法 (2e, 2f, 2g) 和 MP 法 (2h, 2i, 2j)

Fig.2 Phylogenetic trees of *Euplotes* spp. inferred from the SS rRNA gene sequences in the modified Matrix 1 using UPGMA (2a, 2b, 2c, 2d), NJ (2e, 2f, 2g) and MP methods (2h, 2i, 2j)

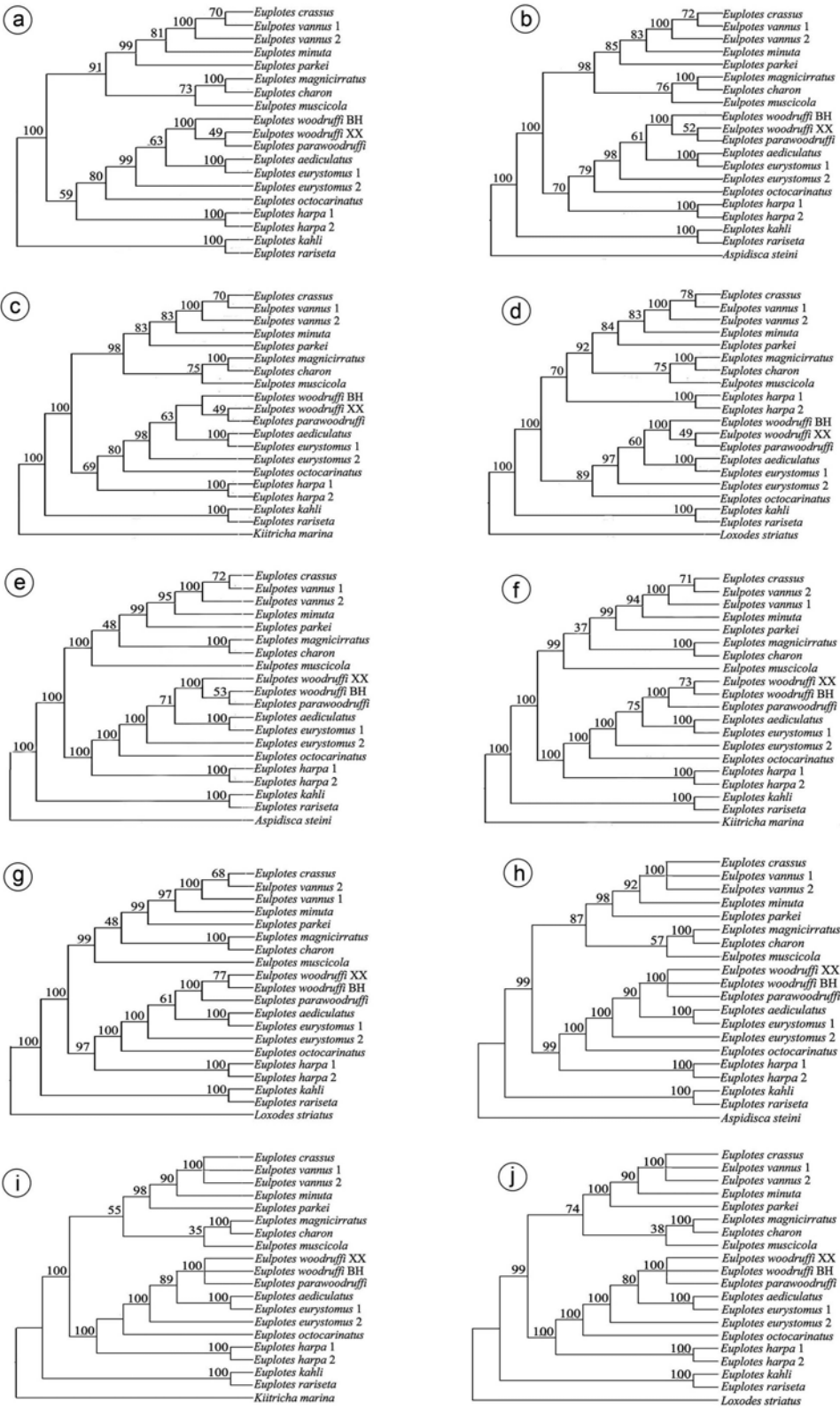


图 3 基于数据集 1, 2 构建的分子系统树, 系统树构建方法依次采用 UPGMA 法 (3a, 3b, 3c, 3d)、NJ 法 (3e, 3f, 3g) 和 MP 法 (3h, 3i, 3j)

Fig.3 Phylogenetic trees of *Euplotes* spp. inferred from the SS rRNA gene sequences in the Matrix 1 and 2 using UPGMA (3a-3b, 3c, 3d), NJ (3e, 3f, 3g) and MP methods (3h, 3i, 3j)

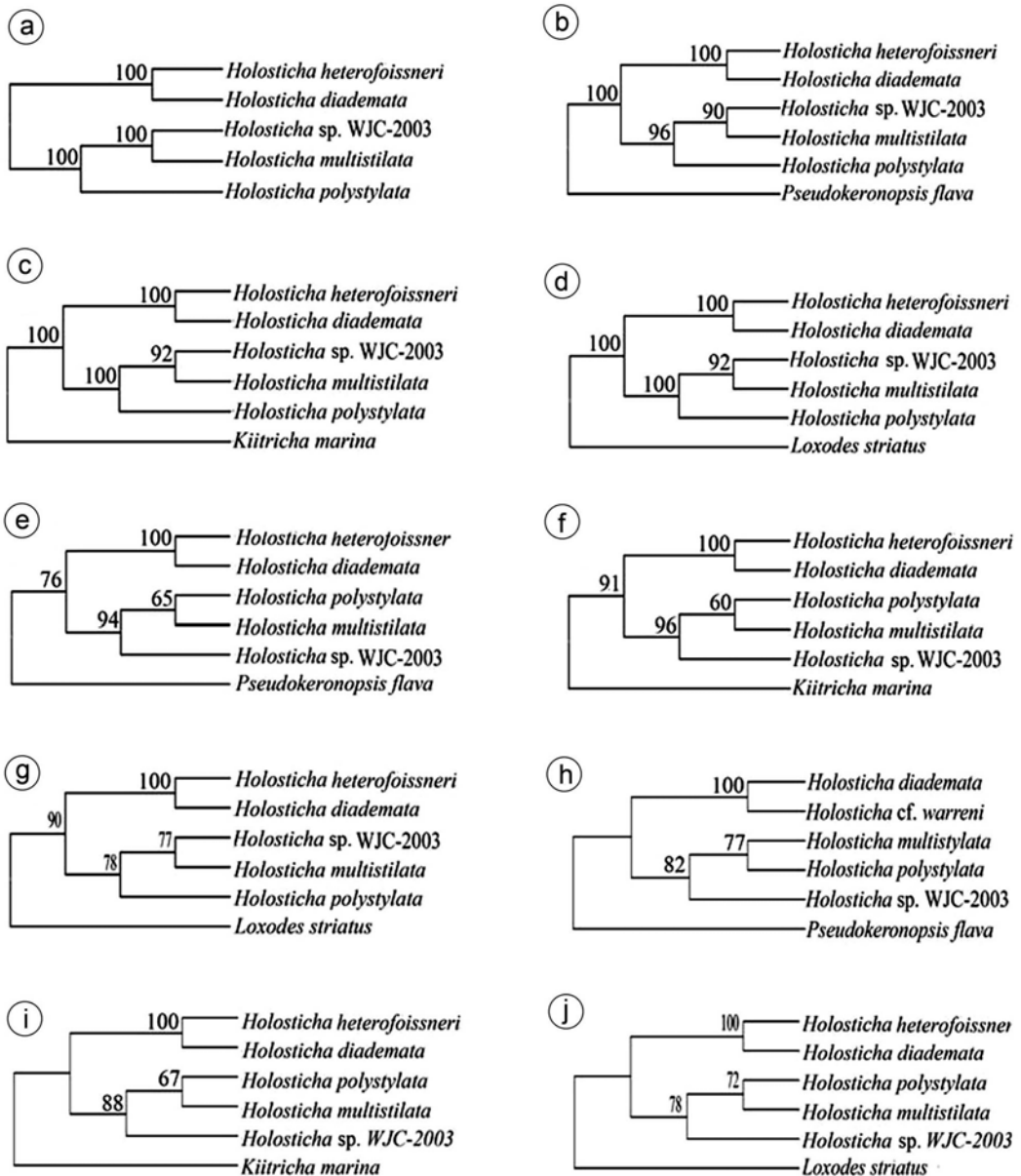


图 4 基于数据集 3 构建的分子系统树，系统树构建方法依次采用 UPGMA 法 (4a, 4b, 4c, 4d)、NJ 法 (4e, 4f, 4g) 和 MP 法 (4h, 4i, 4j)

Fig.4 Phylogenetic trees of *Holosticha* spp. inferred from the SS rRNA gene sequences in the modified Matrix 3 using UPGMA (4a, 4b, 4c, 4d), NJ (4e, 4f, 4g) and MP methods (4h, 4i, 4j)

排除序列长度影响后的分析结果如表 4 所示：系统树拓扑结构不同的组合占组合总数的 30%；其中，在应用 UPGMA 法、NJ 法的组合中，所有系统树的拓扑结构均相同；而在应用 MP 法的组合则构建了不同系统树拓扑结构的系统树。

结果表明，增加内类群，会对系统树部分分支的置信值，甚至系统树的拓扑结构造成一定影响。

2.4 不同序列长度对系统树拓扑结构的影响 (图 1, 2)

通常情况下，进行比对的序列由于所采用的扩增引物不同，比对排序后要要进行末端修改，而修改后的长度会因所选序列的不同而有所差异。为排除这种差异对研究的影响，我们根据数据集 1 加数据集 2 比对排序修改后的序列，重新进行对数据集 1 (修改后) 的比对排序。

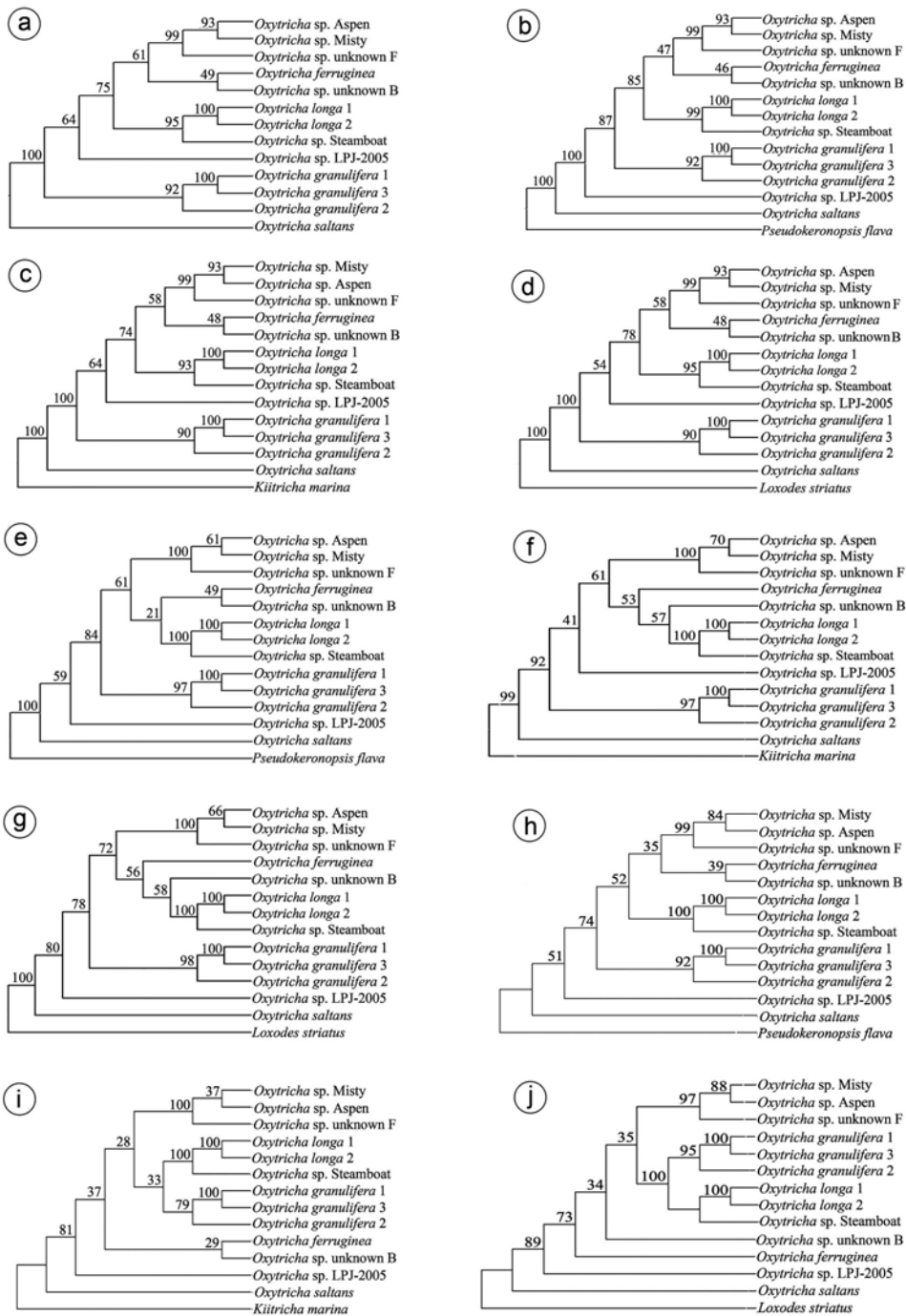


图 5 基于数据集 4 构建的分子系统树，系统树构建方法依次采用 UPGMA 法 (5a, 5b, 5c, 5d); NJ 法 (5e, 5f, 5g) 和 MP 法 (5h, 5i, 5j)

Fig.5 Phylogenetic trees of *Oxytricha* spp. inferred from the SS rRNA gene sequences in the modified Matrix 4 using UPGMA (5a, 5b, 5c, 5d), NJ (5e, 5f, 5g) and MP methods (5h, 5i, 5j)

如表 5 所示：系统树拓扑结构不同的组合占组合总数的 30%；其中，在应用 UPGMA 法、MP 法的组合中，所有系统树的拓扑结构均相同；而在应用 NJ 法的三种组合中，系统树拓扑结构互不相

同。结果表明：数据集 1（修改后）与数据集 1 仅相差约 80 个碱基（数据集 1 的序列长度均约为 1.7 kb），但系统树部分分支的置信值甚至系统树的拓扑结构都存在一定差异。

表 4 序列长度的影响下, 增加内类群对构建系统树的改变

Table 4 Difference in tree topologies inferred from combinations of different number of internal species and different length of SS rRNA gene sequences

分析程序 Program	PHYLIP	PHYLIP	PAUP
建树方法 Algorithm	UPGMA	NJ	MP
无外类群 Without outgroup	2a, 3a		
外类群 1: <i>A. steini</i> Outgroup 1	2b, 3b	* 2e, 3e	* 2h, 3h
外类群 2: <i>K. marina</i> Outgroup 2	2c, 3c	* 2f, 3f	* 2i, 3i
外类群 3: <i>L. striatus</i> Outgroup 3	2d, 3d	* 2g, 3g	* 2j, 3j

* 系统树拓扑结构不同的组合。

* Assemblages containing different tree topologies.

A. steini: *Aspidisca steini*. *K. marina*: *Kütricha marina*. *L. striatus*: *Loxodes striatus*.

表 5 不同序列长度对构建系统树的影响

Table 5 Difference in tree topologies inferred from different SS rRNA gene sequence matrix in length

分析程序 Program	PHYLIP	PHYLIP	PAUP
建树方法 Algorithm	UPGMA	NJ	MP
无外类群 Without outgroup	1a, 2a		
外类群 1: <i>A. steini</i> Outgroup 1	1b, 2b	* 1e, 2e	* 1h, 2h
外类群 2: <i>K. marina</i> Outgroup 2	1c, 2c	* 1f, 2f	* 1i, 2i
外类群 3: <i>L. striatus</i> Outgroup 3	1d, 2d	* 1g, 2g	* 1j, 2j

* 系统树拓扑结构不同的组合。

* Assemblages containing different tree topologies.

A. steini: *Aspidisca steini*. *K. marina*: *Kütricha marina*. *L. striatus*: *Loxodes striatus*.

2.5 不同建树程序对系统树拓扑结构的影响 (图 1-5)

如表 6 所示: 系统树拓扑结构不同的组合占组合总数的 100%。结果表明, 在其余条件完全一致的情况下, 采用不同的建树方法/程序也会对系统

表 6 不同建树程序对构建系统树的影响

Table 6 Difference in tree topologies using different tree construction algorithms

数据集 Matrixes	外类群 Outgroups		
	<i>A. steini</i> or <i>P. flava</i>	<i>K. marina</i>	<i>L. striatus</i>
数据集 1 Matrix 1	1b ^① , 1e ^② , 1h ^③	1c ^① , 1f ^② , 1i ^③	1d ^① , 1g ^② , 1j ^③
数据集 3 Matrix 3	4b ^① , 4e ^② , 4h ^③	4c ^① , 4f ^② , 4i ^③	4d ^① , 4g ^② , 4j ^③
数据集 4 Matrix 4	5b ^① , 5e ^② , 5h ^③	5c ^① , 5f ^② , 5i ^③	5d ^① , 5g ^② , 5j ^③

①, ②, ③: 不同的系统树拓扑结构。

①, ②, ③: different tree topologies.

A. steini: *Aspidisca steini*. *P. flava*: *Pseudokeronopsis flava*. *K. marina*: *Kütricha marina*. *L. striatus*: *Loxodes striatus*.

树部分分支的置信值甚至系统树的拓扑结构造成一定影响。如表 1、3、4 和 5 中系统树均存在不同拓扑结构的组合, 在应用 UPGMA 法构建的系统树的组合中有 2 个, 在应用 NJ 法构建的系统树的组合中有 10 个, 在应用 MP 法构建的系统树的组合中有 6 个。

3 讨论

相对于经典的以形态学为基础的系统分类, 由于生物大分子本身就是遗传信息的载体, 含有庞大的信息量, 且趋同效应弱, 因而分子系统学的结论更具有可比性和客观性 (王莹等, 2005)。在利用形态学或发生学资料构建纤毛虫的系统进化树时, 系统学家主要基于大量的性状样本的比较研究来推测类群间的进化、演化时序, 虽然在权重判断上难免包含有主观因素在内, 但其长处在于信息来自众多的特征, 体现了“全部基因”或“多数基因”所表达的综合结果 (例如, Shao et al., 2006); 而就分子系统学而言, 前述的优点受限于下列因素: 即人们目前只能选用纤毛虫有限的基因库所提供的样本、往往是使用单一的基因 (如 SS rRNA 基因) 的分子信息来探讨系统关系。本工作利用 36 种旋唇类纤毛虫的 SS rRNA 基因序列, 比较研究了不同条件对纤毛虫分子系统树的构建影响。结果表明, 很多因素 (尤其是样本量不足时) 都会影响到系统树的拓扑结构。因此, 我们必须通过多基因、大量 DNA 序列的正确分析, 最大限度地缩小纤毛虫分子系统树与物种树间的差别 (张亚平, 1996)。同时, 在探讨纤毛虫的分子系统时, 我们通常需要选择合适的外类群以确定系统发生树的基部位置。而随机选择的外类群, 可能会因为与内类群亲缘关系较远, 增加结果的不确定性。而理想的外类群应该是与该内类群拥有较多共近裔性状的姐妹群; 在较复杂的分析中, 则应选择复合外类群, 以保证所得结论的可靠性 (王莹等, 2005)。

钟扬等 (1999) 在对金缕梅科风香亚科的分析中指出: 不同系统树所反映的信息量大小可能和外类群与内类群亲缘关系的远近有关。但该分析是以分支置信值取 50%, 且仅限于一组对比得出的结论。本文对基于 SS rRNA 基因序列的旋唇类纤毛虫系统树的统计表明, 存在分支置信值小于 50% (或并系) 的树与外类群的选择并无直接关系, 故此结论有待商榷。另外, 不同建树方法/程序均有不同的适用范围, 而我们很难判断在某一具体情况

下哪种方法更佳 (Felsenstein, 1988); 利用多种方法所获系统树的一致, 将大大提高结果的可靠性 (Kim, 1993; Zhang and Ryder, 1994)。结果同时表明外类群的选择与否、内类群的不同组合、同一基因的不同序列长度等因素均会不同程度地影响纤毛虫分子系统树的构建。因此, 在当前可用的分子信息欠充分的前提下, 对于任何类群纤毛虫分子系统学的探讨, 慎重形成结论并尽可能地结合和参照形态学、发生学的资讯, 仍是需优先考虑的工作路线。

参考文献 (References)

- Corliss JO, 1979. The ciliated protozoa: characterization, classification, and guides to the literature. 2nd ed. Oxford and New York: Pergamon Press.
- Elwood HJ, Olsen GJ, Dogin ML, 1985. The small-subunit ribosomal RNA gene sequence from the hypotrichous ciliates *Oxytricha nova* and *Stylonychia pustulata*. Mol. Biol. Evol. 2: 399–410.
- Felsenstein J, 1988. Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. Ann. Rev. Genet. 22: 521–565.
- Felsenstein J, 1995. PHYLIP: Phylogeny inference package, ver 3. 572. University of Washington, Seattle, WA.
- Hall TA, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 41: 95–98.
- Kim J, 1993. Improving the accuracy of phylogenetic estimation by coming different methods. Syst. Biol. 42: 331–340.
- Lynn DH, Small EB, 2002. Phylum Ciliophora Doflein, 1901. In: Lee JJ, Leedale GF, Bradbury PC ed. An Illustrated Guide to The Protozoa, 2nd ed. Lawrence, Kansas: Society of Protozoologists, 371–656.
- Shao C, Song W, Warren A, Al-Rasheid, Yi Z, Gong J, 2006. Morphogenesis of the marine ciliate, *Pseudoamphistella alveolata* (Kahl, 1932) Song & Warren, 2000 (Ciliophora, Stichotrichia, Urostylelida) during binary fission. J. Eukaryot. Microbiol. 53: 388–396.
- Swofford DL, 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods). Sunderland, Sinauer.
- Wang Y, Zhao HB, Hao JS, 2005. Theory method and perspective of molecular phylogenetics. J. Anhui Norm. Univ. (Natural Science edition) 28: 84–88 (In Chinese).
- Zhang YP, Ryder OA, 1994. Phylogeny relationships of bears (the Ursidea) inferred from mitochondrial DNA sequences. Mol. Phylogen. Evol. 3: 351–359.
- Zhang YP, 1996. From DNA sequence to species tree. Zool. Res. 17: 247–252 (In Chinese).
- Zhong Y, Tang XH, Shi SH, Huang Y, 1999. Effect of outgroups on construction of gene trees. Acta Sci. Univ. Sunyatseni 38: 124–127 (In Chinese).
- 王莹, 赵华斌, 郝家胜, 2005. 分子系统学的理论、方法及展望. 安徽师范大学学报 (自然科学版) 28: 84–88.
- 张亚平, 1996. 从 DNA 序列到物种树. 动物学研究 17: 247–252.
- 钟扬, 唐先华, 施苏华, 黄椰林, 谈凤笑, 1999. 外类群选择对构建基因树的影响. 中山大学学报 (自然科学版) 38: 124–127.