



论文

盘头类和伪小双虫类纤毛虫的进化关系: 小核糖体 rRNA 基因信息支持建立新亚目 *Pseudoamphisiellina* subord. nov.

苗苗^①, 邵晨^{①②}, 陈旭淼^①, 宋微波^{①*}

① 中国海洋大学海洋生物多样性与进化研究所原动物学研究室, 青岛 266003;

② 西安交通大学生命科学与技术学院生物科学与工程系, 西安 710049

* 联系人, E-mail: wsong@ouc.edu.cn

收稿日期: 2011-02-27; 接受日期: 2011-04-29

摘要 盘头类和伪小双虫类是旋唇纲(Spriotrichea)纤毛虫中系统进化地位长期存疑的两大类纤毛虫, 前者经常被认为与游仆类相关, 后者通常被归入腹毛类. 本文分析了 *Discocephalus*, *Leptoamphisiella* 和 *Paradisococephalus* 3 属纤毛虫及 2 种 *Pseudoamphisiella* 的 SSU rRNA 基因序列, 并在 GenBank 选取游仆亚纲(Hypotrichia)、寡毛亚纲(Oligotridia)、散毛亚纲(Choreotrichia)、排毛亚纲(Stichotrichia)下属 56 种纤毛虫的 SSU rRNA 序列, 利用贝叶斯法、最大似然法、邻接法和最大简约法 4 种方法构建系统关系树. 分析结果表明, 盘头类与伪小双虫类均为单源发生, 且表现出较近的系统关系; 两类纤毛虫应为排毛亚纲和游仆亚纲的边缘类群, 不支持 Lynn 将其作为游仆类姐妹群的安排. 结合形态学及细胞发生学资料, 本研究结论如下: 两类纤毛虫代表旋唇纲下的目级阶元, 即盘头目(Discocephalida Wicklow, 1982), 下辖 2 个亚目 Discocephalina 和 *Pseudoamphisiellina* n. subord.. 新亚目 *Pseudoamphisiellina* 特征如下: (1) 具有两列明显分离的中腹棘毛列, 以尾柱类模式发生; (2) 无迁移棘毛, 此结构在其他所有典型的尾柱类中, 来源于最后一列额腹横棘毛原基; (3) 多根尾棘毛, 来自于每列背触毛原基; (4) 右缘棘毛为特殊的独立发生; (5) 周丛生活.

关键词

纤毛门

Pseudoamphisiellina 亚目

新亚目

系统学

SSU rRNA 基因

旋唇纲纤毛虫广泛存在于各种生境, 结构高度多样、种类繁多. 盘头类和伪小双虫类纤毛虫, 具有独特的形态学和发生学特征, 在旋唇纲内是系统地位高度不定的类群, 长期以来, 盘头类被归类于游仆类, 伪小双虫类被归类于高度特化的腹毛类^[1-8]. 有

研究通过 SSU rRNA 基因分析发现盘头类和伪小双虫类有较近的亲缘关系, 可能代表 Urostylids 的祖先型^[7-9]. 但是由于选种范围过小(只涉及 *Prodiscocephalus* 属和 *Pseudoamphisiella* 属), 缺乏细胞发生学的资料, 很难对盘头类和伪小双虫类的系统关系

英文版见: Miao M, Shao C, Chen X M, et al. Evolution of discocephalid ciliates: all molecular, morphological and ontogenetic data support a sister group of discocephalids and pseudoamphisiellids (Protozoa, Ciliophora), with establishment of a new suborder Pseudoamphisiellina subord. n. Sci China Life Sci, 2011, 54, in press

作出综合评价。

本文分析了 5 种纤毛虫 (*Paradiscopephalus elongatus*, *Discocephalus ehrenbergi*, *Leptoamphisiella vermis*, *Pseudoamphisiella elongata* 和 *Pseudoamphisiella quadrinucleata*, 其中, 前 2 种为盘头类, 后 3 种为伪小双虫类) 的 SSU rRNA 基因序列, 以期从分子生物学的角度研究其系统分类地位, 并结合形态学以及细胞发生学的特征, 为盘头类和伪小双虫类纤毛虫的系统关系探讨提供更多信息。

1 材料与方法

Leptoamphisiella vermis 采自青岛海域沿岸(纬度 36°04'N, 经度 120°20'E)。研究材料由作者所在实验室细胞组提供, 分离鉴定^[10-12]后, 用 REDEExtract-N-Amp Tissue PCR Kit 试剂盒(Sigma, St.Louis, USA)提

取 DNA。用真核生物通用引物扩增基因组 DNA^[13], PCR 程序参照 Miao 等人^[14]的方法, PCR 产物用 1.5%~2.0% 的琼脂糖凝胶进行检测。对于扩增效果好且足量的样品进行回收和纯化。扩增片段导入 pUCm-T 载体(Sangon, Toronto, ON, Canada)中, 做克隆筛选。测序仪(ABI Prism 377 自动 DNA 测序仪, Biosystems Inc.)完成样品的测序, 提供波形图结果和拼接后的序列结果。对有疑问的序列, 通过反向测定互补序列以及对样品进行重复测序来检验。所测序列经确认后通过 Sequin 平台提交 GenBank。

本研究从 GenBank/EMBL 数据库中下载了 60 种其他纤毛虫的 SSU rRNA 基因序列(GenBank 登录号见图 1 和 2)构建系统发育树。用 Bioedit 软件^[15] 对序列进行编辑, 并参照四膜虫 *Tetrahymena canadensis* 的 SSU rRNA 二级结构, 通过肉眼校正, 对于排序中变异过于大的位点予以舍弃。

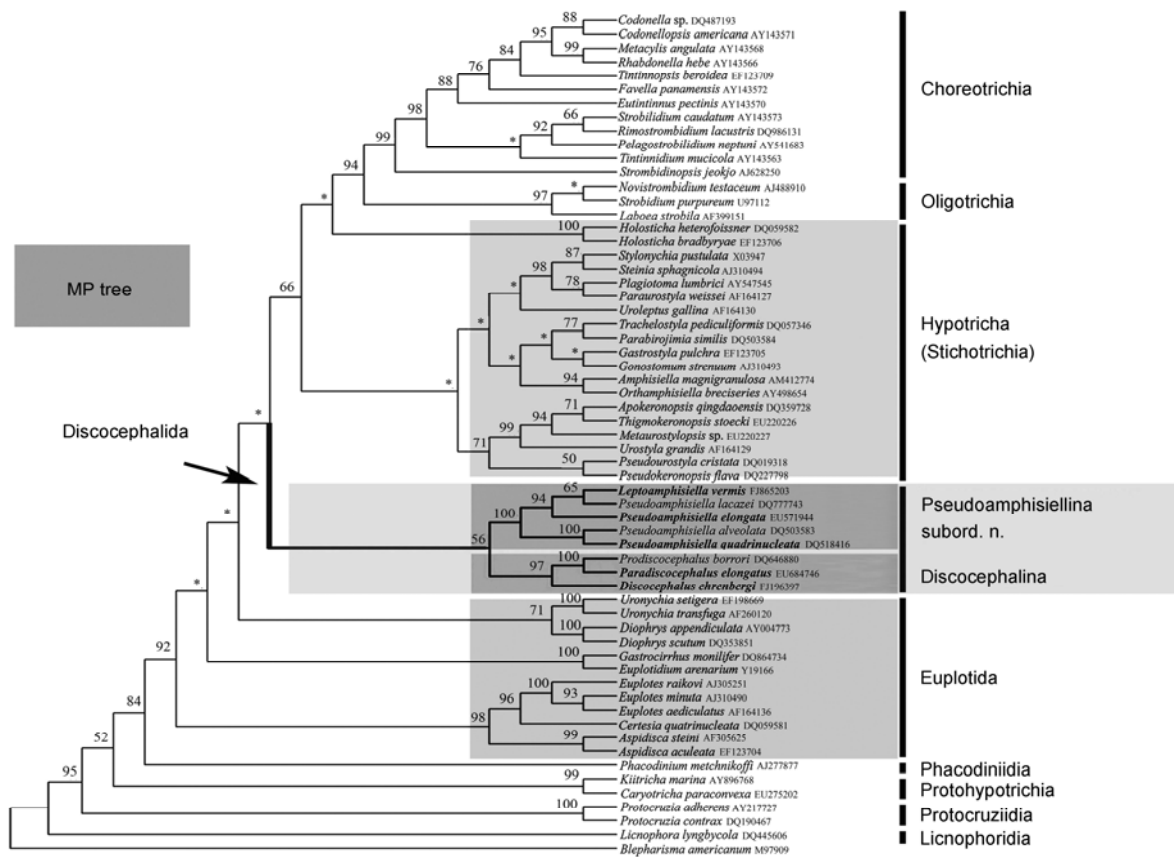


图 1 基于 SSU rRNA 基因序列采用 PAUP*4.05 软件构建的最大简约一致树
节点上数字为最大简约法分析的 1000 次运算的置信值。*表示置信值小于 50% 的数据

采用贝叶斯法(Bayesian inferences, BI)、最大似然法(maximum likelihood, ML)、最小二乘法(Least squares, LS)、邻接法(neighbor-joining, NJ)和最大简约法(maximum parsimony, MP)分别构建分子系统发育树. 使用程序 MrModeltest2.2^[16]从 24 种不同的核苷酸替代模型中选出最适模型(GTR 模型, $\gamma=0.4631$ ^[17], $I=0.2993$ ^[18])用于系统分析. ML 树的构建在 PHYML v 2.4.4 软件^[19]中进行, 树的搜索以邻接树(BIONJ)为起始树, 替代数设置为 4, 并以 1000 次非参数自展抽样分析. 应用 PAUP*4.0 beta 10 软件^[20]构建 MP 树, 搜索策略采用树二等分再连接(tree-bisection-reconnection, TBR), 启发式搜索(heuristic search)的分支交换法. BI 树的构建在 MrBayes3.0 软件^[21]中进行, 起始树设为随机树(random), 马尔科夫链的蒙特卡洛方法(Markovchain Monte Carlo process, MCMC)设置为 4 条链(3 条热链 1 条冷链)同时运行 1×10^6 代, 每 100 代对系统树进行抽样, 最终得到 10001 棵系统发育树, 重复一次以确保 MCMC 的收敛. 在舍弃 2500 棵老化样本后, 根据剩余的样本构建一致树(consensus tree), 并计算相关参数, 每个数据集重复运算至少一次. 以后验概率(posterior probability, PP)来表示各分支的可信性. 对于贝叶斯分析, 接受 95% 以上的 PP 值. 用邻接法(NJ)^[22]及 Kimura two-parameter 模型^[23]在 Phylip(版本号 3.66)^[24]软件包中计算各序列的遗传相似度和进化距离, 构建距离系统树(NJ), 并将此距离树整合入 Bayesian 树. TreeView v1.6.6^[25]和 MEGA 4.0^[26]用来显示系统树的拓扑结构. 最后, 应用 PAUP*4.0 beta 10 软件中的 AU 检验(approximately unbiased test)^[27]检验其他可能拓扑结构与最优结构是否有显著矛盾.

2 结果

Leptoamphisiella vermis 的 SSU rRNA 基因序列长度为 1776 bp, GenBank/EMBL 登录号 FJ865203. 本研究比较了盘头类和伪小双虫类纤毛虫 SSU rRNA 基因序列. *Paradisoecephalus elongatus* 和 *Prodiscocephalus borrori* 基因序列相差 36 bp, *P. elongatus* 和 *Discocephalus ehrenbergi* 相差 154 bp, *D. ehrenbergi* 和 *P. borrori* 相差 154 bp. *Pseudoamphisiella* 属内各种相差 6~103 bp. 相似度的范围为 84.0%~98.0%. *L. vermis* 和 *Pseudoamphisiella* 属内各种间相差 56~88 bp.

序列比对产生了 1 个含有 61 个长度为 1885 bp 的 SSU rRNA 基因序列矩阵. 在 1885 个位点中, 保守位点 895 个, 变异位点 901 个, 简约信息位点 654 个, 分别占整个序列的 47.5%, 47.8%, 34.7%. 所有序列的平均碱基组成为 A=26.5%, C=19.8%, G=26.1%, T=27.6%; A+T(54.1%)含量高于 G+C(45.9%)含量.

本研究以 *Blepharisma americanum* 为外类群, 经 Modeltest 模型筛选, 得出 GTR+I+r 模型是最合适的数学模型. 采用最大简约法、邻接法、贝叶斯法和最大似然法 4 种方法构建系统发育树(图 1 和 2).

图 2 显示, 旋唇纲是单源发生系, 包括至少 8 个亚纲. 4 个亚纲(Protocruziidia 亚纲, Licnophoridia 亚纲, Protohypotrichia 亚纲, Phacodiniidia 亚纲)为较早分化支. 其余 4 个亚纲(Stichotrichia 亚纲, Hypotrichia 亚纲, Oligotrichia 亚纲, Choreotrichia 亚纲)分支清晰. Stichotrichia 亚纲是一单源发生系, 与 oligotrichs-choreotrichs 为姐妹群. Stichotrichia 亚纲内包括该群体的典型代表, 如 *Apokeronopsis*, *Amphisiella*, *Holosticha*, *Stylonychia* 等. Hypotrichia 亚纲为单源发生系, 包括 *Uronychia*, *Diophrys*, *Euplotes*, *Certesias*, *Aspidisca* 属. 不过, 在 MP 分析中, Hypotrichia 亚纲中各属并不聚在一起(图 1).

Pseudosmphiellids-discocephalines 独立聚为一支(0.92BI, 56%MP), 尽管该支与其他类群的关系仍不明朗. 在该支内部, *Prodiscocephalus* 先与 *Paradisoecephalus* 聚在一起, 然后与 *Discocephalus* 相聚. *Pseudoamphisiella lacazei* 先与 *Leptoamphisiella vermis* 聚在一起(53%ML, 65%MP, 1.00BI, 64%NJ), 然后再与 *Pseudoamphisiella* 的其他种聚在一起.

应用 AUtest 检验比较 5 种拓扑结构与最优结构, (1) 腹毛类为单系发生; (2) 盘头类归入腹毛类; (3) 盘头类归入游仆类; (4) *Leptoamphisiella* 与 *Pseudoamphisiella* 属相聚; (5) *Pseudoamphisiella* 属为单系发生. 第 1 种($P=0.078$), 第 3 种($P=0.122$), 第 4 种($P=0.122$)拓扑结构可能存在, 但是另外两种被强烈拒绝($P=0.022$, $P=0.004$).

3 讨论

3.1 盘头类纤毛虫与游仆类及腹毛类显著分离

长期以来, 盘头类纤毛虫由于缺乏纤毛图式和形

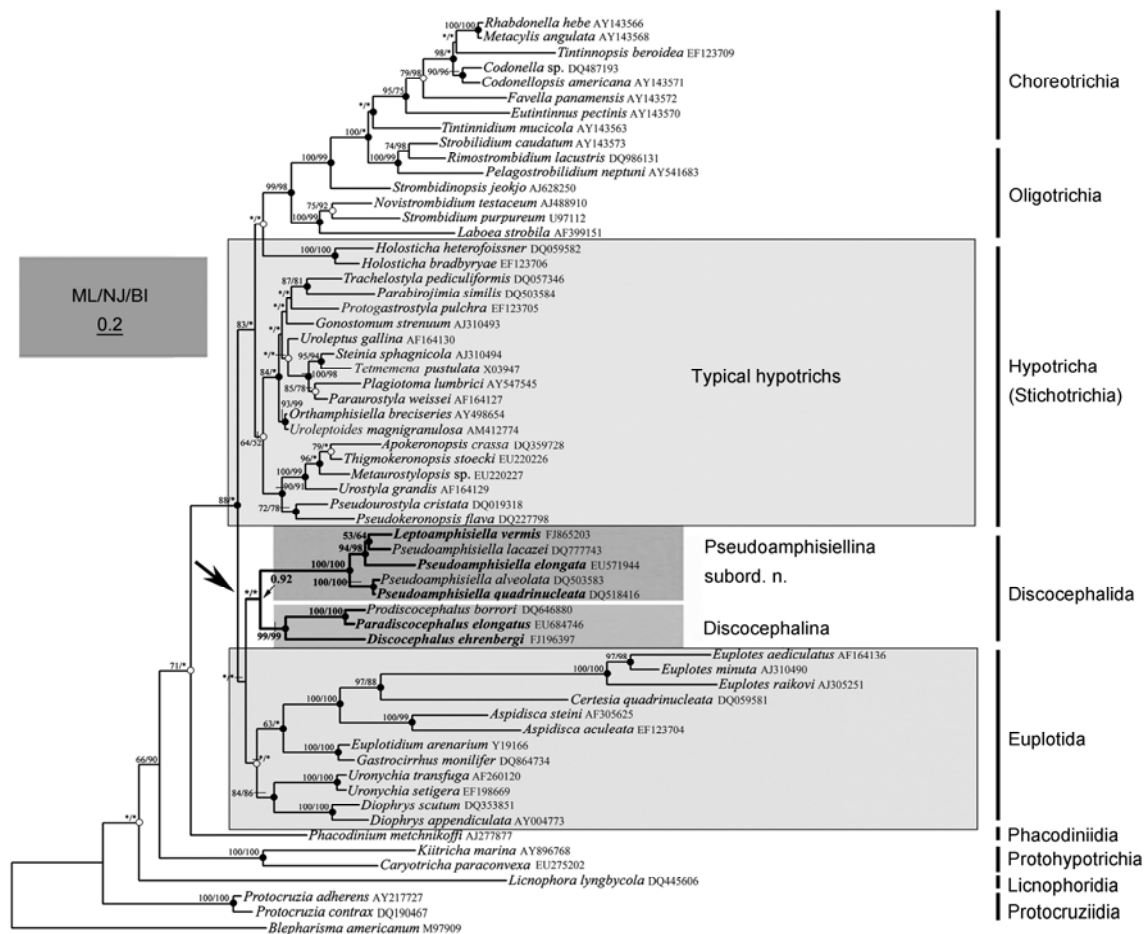


图 2 基于 SSU rRNA 基因序列构建的 ML 树、NJ 树以及 Bayesian 树

节点上数值分别表示: (1) ML 方法的 bootstrap 值(1000 次重复); (2) NJ 方法的 bootstrap 值(1000 次重复). 节点处点状结构表示 Bayesian 树的后验概率: 实心点表示 1.00BI, 空心点表示 0.95~0.99BI. *表示置信值小于 50%以及拓扑结构不同于 ML 树的情况. 标尺表示每 100 个核苷酸中有 20 个替代

态发生学的资料, 其形态分类及系统地位非常混乱. Jankowski^[28]将盘头类作为一个科放入 Oxytrichidea 超科里, 与游仆类相分离. 基于形态学特征, 盘头类曾被放入游仆亚目^[3,29], 游仆科^[1]或者腹毛目内^[5,30]; 作为一个目归入尖毛亚目^[31]或者腹毛目^[5].

目前, 形态学和细胞发生研究表明, 盘头类具有游仆类和腹毛类的混合特征(表 1). 盘头类和大多数腹毛类共有以下特征: (1) 左, 右缘棘毛存在, 并在老结构中产生, 即多数腹毛类共有的特点; (2) 后仔虫口原基在细胞表面产生, 即表层远生型模式; (3) 最左侧额棘毛源于波动膜原基前端; (4) 形成多列额腹横(FVT)棘毛原基, 而非游仆类的 5-FVT 模式; 这一特征被普遍认为是祖征, 被低等腹毛类所共享; (5)

背触毛原基以次级模式发生^[9,11,12,32]. 另一方面, 盘头类也有一些典型的游仆类特征: (1) 尾棘毛是由最右边的背触毛原基以多次断裂模式形成的; (2) 该 FVT-原基发生模式是初级模式, 虽然这一特点也出现在少数低等腹毛类中^[10-12,33-35]. 另外, 考虑到发生模式和进程, 盘头类也显示了既不同于游仆类也不同于腹毛类的特点: (1) 不形成迁移棘毛, 而在所有传统的腹毛类里, 迁移棘毛总是由最右侧的额腹横棘毛原基形成; (2) 波动膜原基横向分化从而形成口内膜和口外膜, 而非通常的纵向分裂^[5,9].

分子信息给出了两种树形关系, 尽管两种关系的支持度都较低(<50%): 在 ML/NJ 树中伪小双虫-盘头虫支与游仆亚纲关系紧密(图 2); 而在 MP 树中伪

小双虫-盘头虫支为一居间类群, 与腹毛类-环毛类-寡毛类相分离(图 1).

不同的结构和发育特征一般会以相同的速率进化. 因此, 盘头虫所呈现的混合特征可能是不同特征的进化速率导致的, 由此支持 Shao 等人^[9]提出的目级单元.

总之, 上述形态特征和分子信息都表明, discocephalids 可以代表 euplotids 和 hypotrichs 两个分类单元之间的中间体. 然而, 由于 AU 检验拒绝将该类虫子归入腹毛亚纲, 建议在腹毛亚纲里提升 Discocephalina 亚目的位置.

3.2 关于 3 个属的盘头类纤毛虫: *Discocephalus*, *Paradisococephalus* 和 *Prodisococephalus*

Discocephalids 盘头类纤毛虫体前端具有显著的盘状“头”^[3]. *Paradisococephalus* 不仅有普通的盘头虫特征(如盘状“头”, 背缘棘毛列, 发达的横棘毛, 类似的纤毛图式模式), 还有伪小双虫类的相应特征(特殊的皮层颗

粒, 腹棘毛以之字形形式排列). *Discocephalus* 和 *Prodisococephalus* 与 *Paradisococephalus* 结构类似, 但在腹棘毛排列上有细微差别(腹棘毛分散排列 vs. 之字形排列)^[6,36]. 本研究之前, 尚无关于这 3 个属基于分子信息得到的系统关系. 本研究的 SSU rRNA 基因序列分析表明, *Prodisococephalus*, *Paradisococephalus* 和 *Discocephalus* 可能拥有一个共同的祖先(99% ML, 1.00 BI, 99% NJ, 97% MP). 另外, *Prodisococephalus* 更接近于 *Paradisococephalus*, 但这与它们的形态特征不相符合.

3.3 Pseudoamphisiellidae 科属于 Discocephalida 目

Pseudoamphisiella 属和 Pseudoamphisiellidae 科的系统地位至今为止尚未确定. 在最新修订中, Berger^[12]和 Shao 等人^[32]认为该科是 urostylids 周边的一类纤毛虫. 在最近的系统分析中, Yi 等人^[7]认为, Pseudoamphisiellidae 应纳入 Discocephalida, 同时 Discocephalida 还包括 Discocephalidae 科. 从形态上看, 由于 *Pseudoamphisiella* 在细胞发生过程中腹棘

表 1 细胞发生特征比较

特征	腹毛类	游仆类 ^{§)}	伪小双虫类	盘头虫类
老口围带的命运	完全保留 ^{a)} 部分或全部更新 ^{b)}	完全保留(Eup&Asp) 部分更新(Diop&Uron)	全部更新(Lac&Elon) 部分更新(Alv)	完全保留(Dis) 部分更新(Mar&Prod)
老波动膜的命运	全部更新	保留(Eup&Asp) 全部更新(Diop&Uron)	全部更新	全部更新
后仔虫口原基的起源	细胞表面	位于表膜之下的小龛之中, 皮膜之下	细胞表面	细胞表面
最左端额棘毛的来源	典型地来自 UM-原基	在老 UM 附近独立发生	来自 UM-原基	来自 UM-原基
FVT-anlagen 数目	5 原基 ^{a)} 和 多于 5 列原基 ^{b)}	稳定的 5 原基	多于 5	多于 5
FVT-anlagen 发生模式	几乎全部为 次级发生模式 ^{a)}	初级模式	初级模式(Alv&Elon) 次级模式(Lac)	初级模式
缘棘毛原基	大部分来自老结构 少数独立发生	独立发生	来自老结构	来自老结构
背触毛原基	多为两组式 ^{#a)} 少数为一组式 ^{b)}	一组式	一组式	一组式
背触毛发生模式*	次生型	初级	次级	次级
背触毛来源	来自左面的老结构, 伴随着最右端一系列的片段化 ^{a)} 来自老结构或独立发生 ^{b)}	在每列老结构中, 无片段化	在每列老结构中, 无片段化	在每列老结构中, 无片段化
尾棘毛的形成	**	最右端的形成一或多根 尾棘毛(euplotid-模式)	**	***
参考文献	[12,13]	[33,34,37,38]	[32,39]	[5,9]

a) 基本涵盖广义尖毛类的各属; b) 典型的尾柱类模式; §) 包括细胞发生过程特征明确的各个属(例如: 游仆虫属(*Euplotes*), 双眉虫属(*Diophrys*), 尾刺虫属(*Uronychia*)和楯纤虫属(*Aspidisca*)). #. 一部分来自每列老的背触毛, 另一部分在背缘独立发生; *, 起初是作为一组(初级模式), 随后分成两组, 前后仔虫各一, 或者起初即为两组, 前后仔虫各一(次级模式); **, 如存在, 每列背触毛原基只产生一根尾棘毛; ***, 多次片段化模式. Alv: *Pseudoamphisiella alveolata*; Asp: *Aspidisca*; AZM: 口围带; Diop: *Diophrys*; Dis: *Discocephalus*; DK: 背触毛; Elon: *Pseudoamphisiella elongata*; Eup, *Euplotes*; FVT-anlagen: 额腹横棘毛原基; Lac: *Pseudoamphisiella lacazei*; Mar: *Marginotricha*; Prod: *Prodisococephalus*; UM: 波动膜; Uron: *Uronychia*

毛列分散排布, 非之字形结构, 特别是在发生过程中没有由最右侧一列额腹横棘毛原基形成的迁移棘毛产生, 因此被认为与典型的 *urostylid* 腹毛类(如 *Holosticha*, *pseudokeronopsids*, *Urostyla*, 等)不同^[40]. 此外尾棘毛, 这在所有典型 *urostylids* 都缺失的结构, 从每个背触毛原基的后端形成, 同时右缘棘毛列是独特的独立发生(即以临近额腹横棘毛原基的独立原基形式出现 vs. 在其他腹毛类中, 总是在老结构中产生^[12,32,41~45]). 所有这些结构都强烈质疑 *Pseudoamphisiella* 乃至 *Pseudoamphisiellidae* 的归属.

基于 SSU rRNA 基因序列构建的系统发育树中, 伪小双虫类与盘头类聚为姐妹群, 虽然没有强有力的支持. 不过, 拓扑结构与形态(例如有头的形态, 具有高度发达的纤维结构用以连接棘毛, 一般是两列明确分开腹棘毛列, 高度发达的横棘毛, 见表 2 和图 3)和细胞发生信息(例如腹棘毛的独特发生与其他典型的腹毛类截然不同)(表 1)是一致的^[5,9,32]. 所有这些相似性表明, *Pseudoamphisiellidae* 和 *Discocephalidae* 两个科应该被归入同一类群, 即 *Discocephalidae*. 尽管, 这两类在形态、细胞发生和 SSU rRNA 基因序列上均有明显不同(表 2 和图 3).

3.4 建议建立新亚目 *Pseudoamphisiellina* subord. n.

根据形态学、细胞发生学以及分子信息, *Pseudoamphisiellidae* 科代表了 *Discocephalida* 目内进化独特的一支^[5,6,9,32,39,44~46], 因此, 本文建议新亚目 *Pseudoamphisiellina*.

伪小双虫亚目的定义: 略具或不具头部的盘头类, 具有不典型的中腹棘毛列, 即两棘毛列明显分离而在发生上是尾柱类模式, 右侧的中腹棘毛列来自每一列额腹横棘毛原基的前端, 没有来自最右一列额腹横棘毛原基的额前棘毛产生, 海水生, 周丛生.

模式科: *Pseudoamphisiellidae* Song *et al.*, 1997

该新亚目是一个单系类群, 目前仅包含 *Pseudoamphisiellidae* 科, 两个属: *Leptoamphisiella* Li *et al.*, 2007 和 *Pseudoamphisiella* Song, 1996. 它与姐妹亚目 *Discocephalina* 在身体形态(轻微或不典型有头 vs. 有头), 纤毛图式(存在 vs. 缺失不迁移的腹棘毛列 absence; 缘棘毛列无分化 vs. 明显分开或退化)和许多其他形态特征^[5,9,32,44,45]上有明显不同. 此外, 分子数据亦表明, 这两类确有分开的必要^[46].

表 2 盘头类和其他旋唇纲各属系统进化树(图 3)中代表的形态和细胞发生学特征^[5,6,9,11,12,32,33,38~40,43,47~51]

衍征	祖征
口器发生为深层远生型	表层远生型
前仔虫形成新的口原基	前仔虫不形成新的口原基
前仔虫的波动膜独立发生	波动膜原基来自反分化的老结构
体纤毛以 5 原基模式形成,具 5 根横棘毛	非 5 原基模式
尾棘毛以 euplotid-模式 ^{a)} 形成	以普通的 stichtrichous 模式
无右缘棘毛	有右缘棘毛
背触毛原基通常成组形成	来自每列老结构
左右各一列缘棘毛	每边不止一列
背触毛次级模式发生	初级模式
额腹横棘毛元及次级模式发生	初级模式
有两片波动膜	仅一片波动膜
细胞有头部	无头部
细胞发生过程中大核不融合为一团	融为一团
无中腹棘毛列	有中腹棘毛列
腹棘毛列数稳定	数目多变

a) 需考虑到尾棘毛来自最右一列或几列背触毛原基. DK: 背触毛; FVT: 额腹横棘毛; Ma: 大核; OP: 口原基; TC: 横棘毛; UM: 波动膜

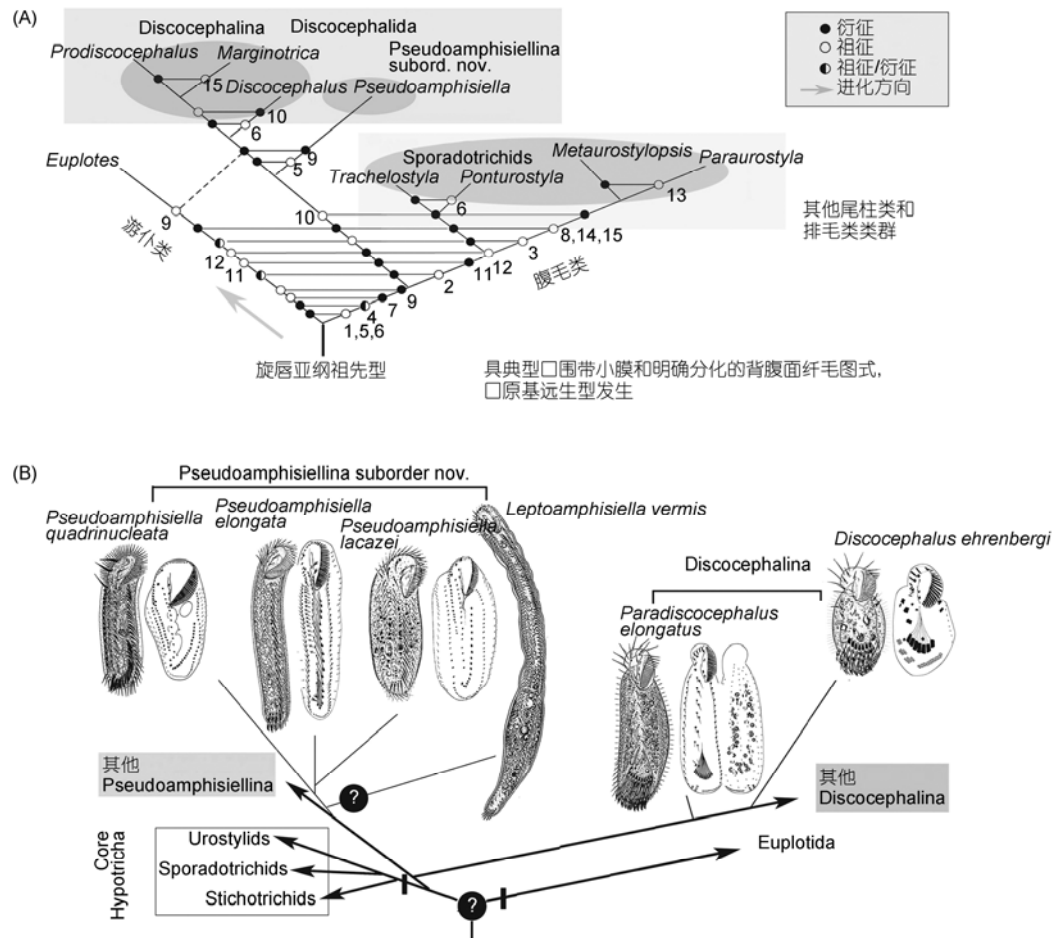


图 3 显示 Discocephalids 和其他 Stichotrichs-euplotids 代表种聚类关系所涉及的形态和细胞发生学信息

参考文献

- 1 Corliss J O. The Ciliated Protozoa: Characterization, Classification and Guide to the Literature, 2nd Edition. New York: Pergamon Press, 1979
- 2 Jankowski A W. Phylum Ciliophora Doflein, 1901. In: Alimov A F, ed. *Protista*. Part 2, Handbook on Zoology (in Russian with English summary). Russian Academy of Sciences, Zoological Institute, St. Petersburg, 2007. 415–993
- 3 Lynn D H. The ciliated Protozoa. New York: Pergamon Press, 2008
- 4 Small E B, Lynn, D H. Phylum Ciliophora Doflein, 1901. In: Lee J J, Hutner S H, Bovee E C, eds. *An Illustrated Guide to the Protozoa*. Lawrence press: Kansas, 1985. 393–575
- 5 Wicklow B J. The Discocephalina (n. subord.): ultrastructure, morphogenesis and evolutionary implications of a group of endemic interstitial hypotrichs (Ciliophora, Protozoa). *Protistologica*, 1982, 18: 299–330
- 6 Li L, Song W, Al-Rasheid K A S, et al. Two discocephalid ciliates, *Paradiscocephalus elongatus* nov. gen., nov. spec. and *Discocephalus ehrenbergi* Dragesco, 1960, from the Yellow Sea, China (Ciliophora, Spirotrichea, Discocephalidae). *Acta Protozool*, 2008, 47: 353–362
- 7 Yi Z, Song W, Warren A, et al. A molecular phylogenetic investigation of *Pseudoamphisiella* and *Parabirojimia* (Protozoa, Ciliophora, Spirotrichea), two genera with ambiguous systematic positions. *Eur J Protistol*, 2008, 44: 45–53
- 8 Yi Z, Lin X, Warren A, et al. Molecular phylogeny of *Nothoholosticha* (Protozoa, Ciliophora, Urostylida) and systematic relationships of the *Holosticha*-complex. *Syst Biodivers*, 2010, 81: 149–155
- 9 Shao C, Song W, Li L, et al. Systematic position of *Discocephalus*-like ciliates (Ciliophora: Spirotrichea) inferred from SS rRNA gene and

- ontogenetic information. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2008, 58: 2962–2972
- 10 Song W, Shao C, Yi Z, et al. The morphology, morphogenesis and SS rRNA gene sequence of a new marine ciliate, *Diophrys apoligothrix* spec. nov. (Ciliophora; Euplotida). *Eur J Protistol*, 2009, 45: 38–50
 - 11 Berger H. Monograph of the Oxytrichidae (Ciliophora, Hypotrichia). *Monograph Biol*, 1999, 78: 1–1080
 - 12 Berger H. Monograph of the Urostyloidea (Ciliophora, Hypotricha). *Monograph Biol*, 2006, 85: 1–1304
 - 13 Medlin L, Elwood H L, Stickel S, et al. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*, 1988, 71: 491–499
 - 14 Miao M, Shao C, Jiang J, et al. *Caryotricha minuta* (Xu et al., 2009) nov. comb., a unique marine ciliate (Protista, Ciliophora, Spirotrichea), with phylogenetics analysis of the ambiguous genus *Caryotricha* inferred from the small-subunit rRNA gene sequence. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2009, 59: 430–438
 - 15 Hall T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser*, 1999, 41: 95–98
 - 16 Nylander J A A. MrModeltest version 2. Distributed by the author. Uppsala: Department of Systematic Zoology, Evolutionary Biology Centre, Uppsala University. 2004
 - 17 Yang Z. Maximum-likelihood estimation of phylogeny from DNA sequences when substitution rates differ over sites. *Mol Biol Evol*, 1993, 10: 1396–1401
 - 18 Gu X, Fu X, Li H. Maximum likelihood estimation of the heterogeneity of substitution rate among nucleotide sites. *Mol Biol Evol*, 1995, 12: 546–557
 - 19 Guindon S, Gascuel O. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Syst Biol*, 2003, 52: 696–704
 - 20 Swofford D L. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony. Sunderland, MA: Sinauer, 2002
 - 21 Huelsenbeck J P, Ronquist F, Nielsen R, et al. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*, 2001, 294: 2310–2314
 - 22 Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstruction phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 1997, 4: 406–25
 - 23 Kimura, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*, 1990, 16: 111–120
 - 24 Felsenstein J. PHYLIP (phylogeny inference package) Version 3.66. Seattle: Department of Genetics, University of Washington, 2006
 - 25 Page R D M. TREEVIEW: An application to view phylogenetic trees on personal computers. *Cabios*, 1996, 12: 357–358
 - 26 Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 2007, 24: 1596–1599
 - 27 Shimodaira H, Hasegawa M. CONSEL: for assessing the confidence of phylogenetic tree selection. *Bioinformatics*, 2001, 17: 1246–1247
 - 28 Jankowski A W. Revision of the order Hypotrichida Stein, 1859. Generic catalogue, phylogeny, taxonomy (in Russian). *Trudy Zool Inst, Akad Nauk SSSR*, 1979, 86: 46–85
 - 29 Lynn D H, Small E. Phylum Ciliophora Doflein, 1901. In: Lee J J, Bradbury P C, Leedale G F, eds. *An Illustrated Guide to the Protozoa*, 2nd. Lawrence, KS: Allen Press, 2002. 371–656
 - 30 Tuffrau M. Proposition d'une classification nouvelle de l'ordre Hypotrichida (Protozoa, Ciliophora), fondée sur quelques données récentes. *Anna Sci Nat Zool*, 1987, 8: 111–117
 - 31 Puytorac P de, Batisse A, Deroux G, et al. Proposition d'une nouvelle classification du phylum des protozoaires Ciliophora Doflein, 1901. *C R Acad Sci II, Sci Vie*, 1993, 316: 716–720
 - 32 Shao C, Song W, Warren A, et al. Morphogenesis of the marine ciliate, *Pseudoamphisiella alveolata* (Kahl, 1932) Song & Warren, 2000 (Ciliophora, Stichotrichia, Urostylida) during binary fission. *J Eukaryot Microbiol*, 2006, 53: 388–396
 - 33 Jiang J, Shao C, Xu H, et al. Morphogenetic observations on the marine ciliate *Euplotes vannus* during cell division (Protozoa: Ciliophora). *J Mar Biol Assoc UK*, 2010, 90: 683–689
 - 34 Jiang J, Zhang Q, Warren A, et al. Morphology and SSU rRNA gene-based phylogeny of two marine *Euplotes* species, *E. orientalis* spec. nov. and *E. raikovi* Agamaliyev, 1966 (Ciliophora, Euplotida). *Eur J Protistol*, 2010, 46: 121–132
 - 35 Song W, Wilbert N, Chen Z, et al. Considerations on the systematic position of *Uronychia* and related euplotids based on the data of ontogeny and 18 S rRNA gene sequence analyses, with morphogenetic redescription of *Uronychia setigera* Calkins, 1902 (Ciliophora, Euplotida). *Acta Protozool*, 2004, 43: 313–328
 - 36 Lin X, Song W, Warren A. Redescription of the rare marine ciliate, *Protodiscocephalus borrori* (Wicklow, 1982) from shrimp-culturing waters

- near Qingdao, China, with redefinitions of the genera *Discocephalus*, *Prodiscocephalus* and *Marginotricha* (Ciliophora, Hypotrichida, Discocephalidae). *Eur J Protistol*, 2004, 40: 137–146
- 37 Jiang J, Song W. Two new *Diophrys*-like genera and their type species, *Apodiophrys ovalis* n. g., n. sp. and *Heterodiophrys zhui* n. g., n. sp. (Ciliophora: Euplotida), with notes on their molecular phylogeny. *J Eukaryot Microbiol*, 2010, 57: 354–361
- 38 Song W, Wilbert N, Al-Rasheid K A S, et al. Redescriptions of two marine hypotrichous ciliates, *Diophrys irmgard* and *D. hystrix* (Ciliophora, Euplotida), with a brief revision of the genus *Diophrys*. *J Eukaryot Microbiol*, 2007, 54: 283–296
- 39 Hu X, Suzuki T. Observation on a Japanese population of *Pseudoamphisiella alveolata* (Kahl, 1932) Song & Warren, 2000 (Ciliophora: Hypotrichida): morphology and morphogenesis. *Acta Protozool*, 2006, 45: 41–52
- 40 宋微波. 海洋纤毛虫新属, 伪小双虫属及新组合——拉氏伪小双虫. *海洋与湖沼*, 1996, 27: 18–22
- 41 Chen X, Gao S, Song W, et al. *Parabirojimia multinucleata* spec. nov. and *Anteholosticha scutellum* (Cohn, 1866) Berger, 2003, two marine ciliates (Ciliophora, Hypotrichida) from tropical waters in southern China, with note on their SSU rRNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2010, 60: 234–243
- 42 Chen X, Hu X, Kutsoka Y, et al. Morphology, morphogenesis and gene sequence of a freshwater ciliate, *Pseudourostyla cristata* (Ciliophora, Urostylida) from the ancient Lake Biwa, Japan. *Eur J Protistol*, 2010, 46: 43–60
- 43 Li L, Shao C, Song W, et al. Does *Kiitricha* (Protista, Ciliophora, Spirotrichea) belong to Euplotida or represent a primordial spirotrichous taxon? With suggestion to establish a new subclass Protohypotrichia. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2009, 59: 439–446
- 44 Li L, Song W, Al-Rasheid K A S, et al. Morphology and morphogenesis of a new marine hypotrichous ciliate (Protozoa, Ciliophora, Pseudoamphisiellidae), including a report on the small subunit rRNA gene sequence. *Zool J Linn Soc*, 2010, 158: 231–243
- 45 Song W, Warren A, Hu X. Morphology and morphogenesis of *Pseudoamphisiella lacazei* (Maupas, 1883) Song, 1996 with suggestion of establishment of a new family Pseudoamphisiellidae nov. fam. (Ciliophora, Hypotrichida). *Arch Protistenkd*, 1997, 147: 265–276
- 46 Yi Z, Song W, Stoeck T, et al. Phylogenetic analyses suggest that *Psammomitra* (Ciliophora, Urostylida) should represent an urostylid family, based on small subunit rRNA and alpha-tubulin gene sequence information. *Zool J Linn Soc*, 2009, 157: 227–236
- 47 Eigner P, Foissner W. Divisional morphogenesis in *Amphisiellides illuvialis* n. sp., *Paramphisiella caudata* (Hemberger) and *Hemiamphisiella terricola* Foissner and redefinition of the Amphisiellidae (Ciliophora, Hypotrichida). *J Eukaryot Microbiol*, 1994, 41: 243–261
- 48 Li L, Song W, Al-Rasheid K A S, et al. Redescription of a poorly known marine ciliate, *Leptoamphisiella vermis* Gruber 1888 n. g., n. comb. (Ciliophora, Stichotrichia, Pseudoamphisiellidae) from the Yellow Sea, China. *J Eukaryot Microbiol*, 2007, 54: 527–534
- 49 Shao C, Song W, Li L, et al. Morphological and morphogenetic redescrptions of the stichotrich ciliate *Diaxonella trimarginata* Jankowski, 1979 (Ciliophora, Stichotrichia, Urostylida). *Acta Protozool*, 2007, 46: 25–39
- 50 Shao C, Song W, Yi Z, et al. Morphogenesis of the marine spirotrichous ciliate, *Trachelostyla pediculiformis* (Cohn, 1866) Borrer, 1972 (Ciliophora, Stichotrichia), with consideration of its phylogenetic position. *Eur J Protistol*, 2007, 43: 255–264
- 51 Shen Z, Lin X, Long H, et al. Morphology and SSU rDNA gene sequence of *Pseudoamphisiella quadrinucleata* n. sp. (Ciliophora, Urostylida) from the south China sea. *J Eukaryot Microbiol*, 2008, 55: 510–514