

螳状独缩虫种内分子系统地理学的研究*

缪 炜^{①②} 余育和^② 沈韫芬^{②**} 张锡元^③

(①中国科学院东湖湖泊生态系统试验站 武汉 430072; ②中国科学院水生生物研究所 武汉 430072;

③武汉大学生命科学院 武汉 430072)

摘要 以 18S-ITS1 为分子标记, 对我国 8 省、市、自治区的 19 个螳状独缩虫种群的研究表明: 在 34, 46, 241, 305 和 322 等 5 个位点上碱基的变化情况将它们沿珠江和长江分水岭分为南北两大种群. 进一步分析得出这种地理分布格局的形成可能是以下两个因素共同作用的结果: 第四纪时伴随青藏高原的隆起珠江和长江分水岭的形成导致了螳状独缩虫的隔离分化; 两地气候条件的差异对螳状独缩虫传播方式产生了重要影响.

关键词 螳状独缩虫 系统地理学 18S-ITS1 序列 种群 隔离分化 扩散 第四纪

系统地理学是生物地理学的一个分支, 是研究物种及物种内不同种群形成现有分布格局的历史原因和演化过程的一门学科. 分子系统地理学研究的核心是遗传谱系空间分布的历史特征^[1], 通过种群遗传结构的分析来探讨种内系统地理格局的形成机制、系统发育关系以及现有分布特征, 并结合种群的地理分布状况来发现和验证与其相关的地质事件, 追溯和揭示种群的进化历程^[2,3]. 该学科已成为近 10 年来国际上十分活跃的研究领域^[4~6]. 然而, 这些工作主要集中在对高等动植物系统地理格局的分析上^[7~10], 有关单细胞真核生物(原生动物)的报道很少, 即便有, 研究对象也是寄生的种类^[11,12], 而且缺乏系统性. 关于自由生活的原生动物生物地理学的研究只见于中国科学院青藏高原综合科学考察队对西藏高原原生动物的地理分布和生态特点的研究^[13]. 然而, 原生动物由于其起源早、分布广等特点, 其系统地理格局往往与高等动物的有所不同, 从中可能发现更多的生物进化与地质事件、气候变化间的关系, 为研究低等动物是否存在地理区系以及区系分区等问题提供线索.

我国是惟一跨越六大动物地理区(古北界、新北界、旧热带界、东洋界、新热带界和澳洲界)中两个主要地区(古北界与东洋界)的国家, 加之地处欧亚大陆东南端, 地球地质历史上的一些重大事件(如印度板块与欧亚板块的碰撞、青藏高原的隆起等)都与我国有直接关系, 使得我国成为研究世界动物区系演化与生物地理学的关键地区之一. 众多学者的研究均表明青藏高原抬升导致的环境变迁对青藏高原脊椎动物的现有地理分布格局及东亚鱼类的起源和分化产生了深远影响^[14~18].

对现代陆栖脊椎动物和昆虫地理分布的研究说明我国大陆动物区系的南北差异正好对应东洋界与古北界, 两大界在我国的分野沿喜马拉雅山脉至秦岭一线. 然而, 在我国动物地理学研究中同样存在对原生动物等低等动物相关工作的忽视, 其中的原因除了长期以来认为大多

2002-08-06 收稿, 2002-12-02 收修稿稿

* 中国科学院知识创新工程项目(批准号: KSCX 2-2-06)和东湖湖泊生态系统试验站开放基金(批准号: 200104)资助项目

** 联系人, E-mail: Shen@public.wh.hb.cn

数原生动物可以以孢囊形式通过空气传播形成了全球性分布而认为其不存在地理差异外,还由于原生动物个体小,寻找不同种群间形态结构的差异相对比较困难.随着分子生物学技术的渗透,出现的交叉学科——分子系统地理学正是从生物大分子中获取信息,从分子水平上探讨种内的系统地理格局的形成机制.我们以在缘毛类纤毛虫分子系统发育学研究中原位方法的建立^[19]和对分子标记的比较认识为基础^[20],选择缘毛类纤毛虫中常见的、世界性分布的螳状独缩虫(*Carchesium polypinum*)为材料,以 18S-ITS1 序列为分子标记,联系相关的地质事件,对我国 8 省市自治区的 19 个螳状独缩虫种群的地理分布格局的形成与演化进行了初步分析.

1 材料与方法

1.1 螳状独缩虫的鉴定、采集、分离和 DNA 的提取

19 个螳状独缩虫种群的采集时间和地点列于表 1,分离方法参见文献[19].对于每个种群,至少收集 100 个个体,用灭菌双蒸水洗几遍后置于裂解液(100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris pH 7.8, 10 mmol/L EDTA, 0.2% SDS, 0.2 mg/mL proteinase K)中, 55℃下温育 12 ~ 20 h 后待提 DNA, 或于 4℃下冻存.

表 1 19 个螳状独缩虫种群的采集时间和地点以及其 ITS1 序列的长度和 GC 含量

<i>C. polypinum</i> 种群	ITS1 序列长度/bp	采集地	采集时间
SHZ	148	新疆, 石河子市巴音沟	2001.8
BJ	148	北京, 北京大学未名湖	2001.10
XA1	148	陕西, 西安市兴庆宫公园东湖样点 1	2002.1
XA2	148	陕西, 西安市兴庆宫公园东湖样点 2	2002.1
DF1	148	河南, 登封市少林寺少溪河	2002.1
DF2	148	河南, 登封市嵩阳书院池塘	2002.1
HY1	148	湖北, 武汉市汉阳月湖采样点 1	2001.3
HY2	148	湖北, 武汉市汉阳月湖采样点 2	2002.1
HKo	148	湖北, 武汉市汉口中山公园池塘	2000.12
WCh1	147	湖北, 武汉市武昌东湖采样点 1	2000.3
WCh2	148	湖北, 武汉市武昌东湖采样点 2	2001.2
WCh3	148	湖北, 武汉市武昌东湖采样点 3	2001.2
WCh4	148	湖北, 武汉市武昌东湖采样点 4	2002.2
WCh5	148	湖北, 武汉市武昌东湖采样点 5	2002.1
XT1	148	湖南, 湘潭市菊花湖采样点 1	2002.1
XT2	148	湖南, 湘潭市菊花湖采样点 2	2002.1
KM	147	云南, 昆明市盘龙江	2001.11
GZh1	147	广东, 广州市中山大学池塘	2001.11
GZh2	147	广东, 广州市华南理工大学东湖	2001.11

样品经裂解后,用酚/氯仿(Phenol/Chloroform)法抽提大核 DNA. DNA 溶于灭菌双蒸水中, 4℃保存备用.

1.2 18S-ITS1-5.8S 序列的扩增和测序

PCR 扩增所用引物为: 正向引物: 5'-GTTCCCCTTGAACGAGGAATT C-3'; 反向引物: 5'-CGCATTTTCGCTGCGTTCTTC-3'^[11], 它们分别对应于 18S rDNA 的 5'端和 5.8S rDNA 的 3'保守序列. PCR 反应体积为 25 μL, 反应条件为 94℃, 1 min, 50℃, 0.5 min, 72℃, 1.5 min, 共 35 个循环. 反应前 94℃预变性 10 min, 反应后 72℃延伸 10 min. PCR 产物用 Glassmilk(Biostar)纯化

回收, 连接到 T-Vector(Promega)上, 再转化到 Ecol.Top10F¹ 中, 用于测序. 测序在自动测序仪 (Applied Biosystems 377 Stretch)上完成.

1.3 18S-ITS1-5.8S 序列分析和排序

所有 18S-ITS1 序列用软件 DNAtools1.05^[1]进行序列统计分析和排序, 并进行人工调整. 用于构建系统树的其他纤毛虫序列都引自 GenBank, *Stentor polymorphus* 登录序列号为 AF429901^[21], *Tetrahymena shanghaiensis* 为 AF429898^[21], *Tetrahymena thermophila* II 为 AF429899^[21], *Tetrahymena thermophila* VII 为 AF429900^[21].

1.4 系统发育关系分析

应用 PHYLIP^[22]和 PUZZLE^[23]软件构建了蛭状独缩虫种群的邻接(neighbor-joining, NJ)树和最大似然(maximum likelihood, ML)树. 在构树过程中, 核苷酸位点被认为是具有 4 种状态的无序位点, 排序中的裂缝(gap)作为缺失处理. 我们选作外类群的 *S. polymorphus* 属纤毛门(Ciliophora)、旋毛纲(Spirotrichea)、异毛目(Hetereotrichida), 由组蛋白(H4)和 SS rRNA 分子系统发育研究结果显示异毛目处在纤毛门系统树的基部, 较缘毛类所在的寡膜纲原始^[24,25]. Johnson^[26]对天蓝喇叭虫(*Stentor coeruleus*)和四膜虫、草履虫等纤毛虫的 LSrRNA 系统发育关系进行的研究表明, 喇叭虫处在比四膜虫和草履虫等寡膜纲纤毛虫更原始的地位, 据此构建相应的系统发育树.

(1) 邻接法: Neighbor-joining (NJ)树用 PHYLIP 软件构建. 先用 SEQBOOT 生成 100 个 bootstrap 样本, 再以 DNAdist 生成遗传距离矩阵, 最后用 NEIGHBOR 构建 100 棵距离树, 然后用 CONSENSE 将它们合并为一棵. 用 TreeView^[27]读取系统发育树文件.

(2) 最大似然法: 最大似然树的构建根据的是获得观测数据最大概率的树, 它可以通过全局重建得到最可能发生的一致树. 利用 PUZZLE4.0.2 软件的 HKY 进化模型^[28]构建最大似然树.

2 结果

2.1 序列差异

蛭状独缩虫 19 个种群的 18S-ITS1-5.8S 序列长度为 382 或 383 bp, 包括 214 bp 的 18S 序列, 147 或 148 bp 的 ITS1 序列和 21 bp 的 5.8S 序列. 除武昌东湖外, 对于同一地区, 不同样点的蛭状独缩虫种群间的 18S-ITS1-5.8S 序列完全一致, 如广州、登封的种群采自不同水体, 西安、湘潭、汉阳的种群采自同一水体不同的地点, 序列都一样. 序列比较显示出 9 个变异位点(占总长 2.35%), 包括 1 个 gap 和 8 个多态位点. 根据 19 个种群在这些位点上的碱基情况可以把它分成 8 个不同的子群(S1, S2, N1, N2, N3, N4, N5, N6). 进一步分析发现, 在 34, 46, 241, 305 和 322 等 5 个位点上碱基的变化情况将它们分为两个大的种群: 以 S1 为代表的南方种群和以 N1 为代表的北方种群. 这 5 个位点在两大种群间的变异除了 322 位点上 1 个 gap 和 305 位点 1 个 C-T 的转换外, 均为 A-T 的颠换, 而且有 2 个颠换(34 和 46 位点)发生在 18S 区. 北方种群中, 惟一个 18S 区的变异位点发生于 N6 和其他子群间在 67 位点上的 A-G 转换, 其余 4 个变异位点均是发生在 ITS1 区的多态位点, 除了 N2 和其他类型间在 273 位点上的一个 A-T 颠换外, 其余均为转换; 南方种群中, S1 和 S2 在 18S 区的 34 位点上有一个 A-T 颠换(表 2).

1) Rasmussen S W. DNAtools, a software package for sequence analysis. The carlsberg Laboratory, Copenhagen, 2001, <http://www.dnatools.dk>

表 2 根据长为 383 bp 的 18S-ITS1-5.8S 序列中 9 个变异位点划分的子群^{a)}

子群	种 群	核酸位点								
		18S			ITS1					
		34	46	67	230	241	273	305	322	339
S1	WCh1, GZh1, GZh2	A	T	A	A	A	A	C	—	T
S2	KM	T							—	
N1	BJ, DF1, DF2, HY1, HY2, HKo, WCh4, WCh5	T	A			T		T	T	
N2	XA1, XA2	T	A			T	T	T	T	
N3	XT1, XT2	T	A			T		T	T	C
N4	WCh2	T	A		G	T		T	T	
N5	WCh3	T	A			T			T	
N6	SHZ	T	A	G		T		T	T	

a) 核酸位点是与 GenBank 中 Wch1 的 18S-ITS1-5.8S 序列对应的, 子群 S1 的序列与之完全一致, 在表中列出了子群 S1 序列中的全部 9 个变异位点, 其他子群的序列只列出与 S1 不同的位点

2.2 蟪状独缩虫的种内系统发育关系

邻接法(图 1)和最大似然法(图 2)给出了 19 个蟪状独缩虫种群相似的系统发育关系: Wch1, Gzh1, Gzh2 和 KM 组成了南方枝, BJ, DF1, DF2, HY1, HY2, HK0, Wch5, XA1, XA2, XT1, XT2,

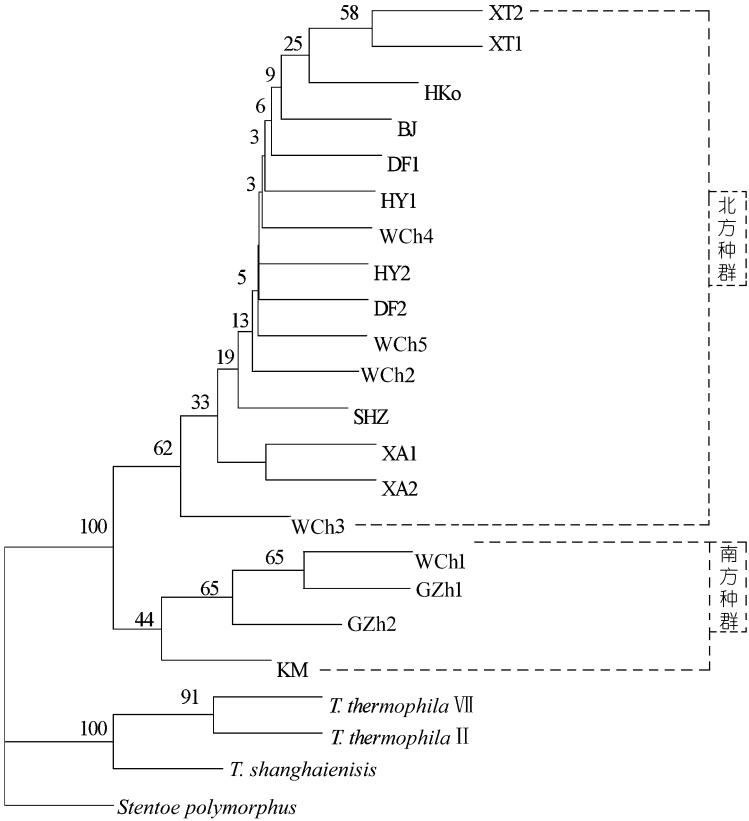


图 1 邻接法构建的 19 个蟪状独缩虫种群的系统发育树

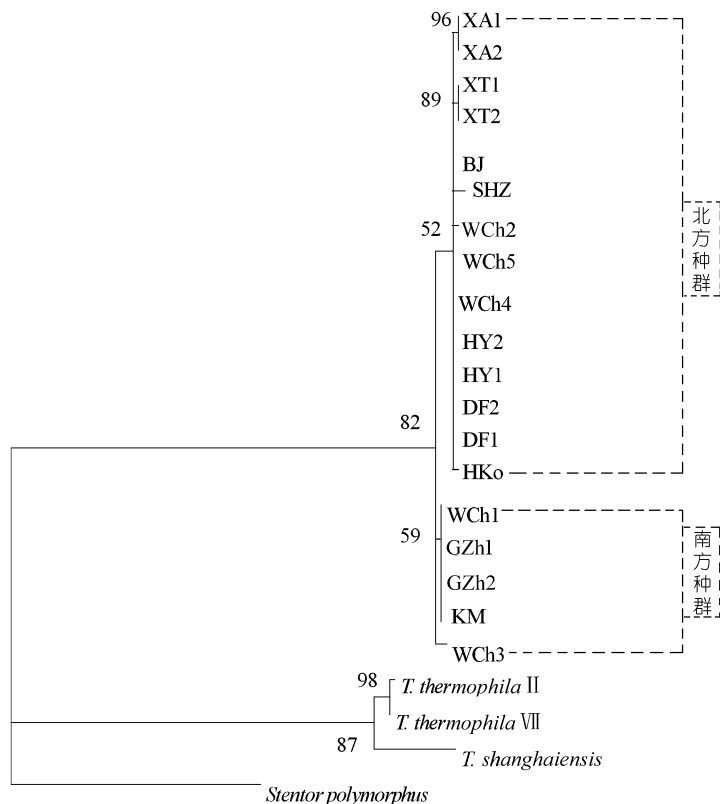


图 2 最大似然法构建的 19 个螳状独缩虫种群的系统发育树

Wch2 和 SH2 组成了北方枝, 且具有较高的支持率(NJ: 100%; ML: 82%). 图 1 和 2 惟一的区别在于 Wch3 的位置: 邻接法中位于北方枝, 最大似然法中则位于南方枝和北方枝之间.

在南、北方枝内部, 由于序列间只发生了 1 个碱基的变异, 从而导致支持率很低. 在最大似然法的北方枝中(图 2), 与代表序列(N1)稍有不同的 XA 和 XT, SHZ 和 Wch2 都独立成枝.

3 讨论

由于对最早的真核生物的化石证据至今没有一致的看法, 因此对于单细胞真核生物起源的确切时间尚不能确定. 古生物学家根据目前已有的一些资料推测单细胞真核生物可能起源于距今 10 ~ 20 亿年之间^[29], 鉴于现代真核细胞的直径显著大于原核细胞, 因此测量统计前寒武纪化石的细胞直径, 有可能会找到由原核细胞向真核细胞过渡的时间. Schopf^[30]的研究结果表明, 大约在 14 ~ 15 亿年前化石直径有一明显增大, 这可能反映了单细胞真核生物起源的大体时间. Wright 以 SSrRNA 分子钟推算出纤毛虫的起源可追溯到早元古代, 也在距今 20 亿年左右, 而且推测如今建立的纤毛虫各纲(Spirotrichea, Oligohymenophorea, Nassophorea, Colpodea, Heterotricha, Karyorelictea 和 Litostomatea)大约是在 60 亿年前(与后生动物爆发的寒武纪时间大体相同)开始从位于真核生物进化主干上的纤毛虫祖先演化而来^[31]. 尽管尚不能确定缘毛类纤毛虫螳状独缩虫起源的具体时间, 但相对现生的多细胞生物, 其起源早是可以

肯定的. 加之其既可通过水体传播, 亦可在恶劣环境出现时生成孢囊通过空气传播, 我们可以推测螳状独缩虫很早前便呈现出广泛分布的格局. 从采样时的范围看, 虽未覆盖到全国各省市, 但从北(北京)到南(广州), 从西北(新疆)、西南(昆明)到华中(武汉)地区都有分布, 说明至少在我国螳状独缩虫是广泛分布的. 根据 18S-ITS1 序列分析得出螳状独缩虫在我国存在着南北两个明显的地理种群, 那么这种分布格局是如何产生, 什么时间开始的呢? 参照我国脊椎动物区系的起源与演化的分析方法^[32,33], 联系第四纪时期我国自然地理及气候的变化, 以及螳状独缩虫的传播方式, 对螳状独缩虫现有系统地理格局的形成可作如下分析:

在第三纪时期, 我国西藏与印度次大陆缝合, 欧亚大陆联成整体, 大陆性气候加强, 青藏地区尚趋近夷平状态, 高度仅 1000 m 左右. 因此, 推测广泛分布在我国境内的螳状独缩虫种群间在第三纪时由于近似的自然地理条件和无明显的天然阻碍而时常发生基因交流, 当时并未发生种群间的分化.

至第三世晚期(约 250 万年前), 青藏高原开始强烈抬升, 在第四纪的更新世早、中、晚每个时期均以大约 1000 m 的高度抬升^[34], 至全新世, 我国自然环境产生了明显的区域差异, 这直接导致了动物区系的地区分化.

在整个更新世时期, 气候发生了多次有节奏的波动, 冰川多次扩张和退缩, 气候带也发生过南北的移动. 动物群的演变、分化和迁移在其影响下趋于剧烈, 尤其是在北方. 对于螳状独缩虫来说, 在遭遇恶劣环境不适宜生存的情况下, 它会形成孢囊, 或停留原地等待环境的改善, 或随空气传播, 所以可以推测在更新世期间伴随气候的变化, 螳状独缩虫在我国北方以及北方与南方之间仍存在着广泛的基因交流, 仍无明显种群分化. 在更新世后, 由于北方气候干燥, 螳状独缩虫仍以孢囊作为传播的主要形式, 种群彼此间进行基因交流. 也就是说, 螳状独缩虫北方种群的形成是扩散的结果, 这是由自然地理环境与气候条件所决定的.

在第四纪期间, 南方气候条件与北方剧烈的冰川运动和气候变化相比相对稳定, 螳状独缩虫的迁移主要是通过其赖以生存的水体, 而很少通过形成孢囊来传播, 因此, 对本研究涉及的长江与珠江水系发育的调查成为分析螳状独缩虫种群分化的关键. 任美镔^[35]指出我国西南地区水系的发育受其区域地质历史演变的控制, 与青藏高原抬升密切相关. 最初, 长江上游的金沙江曾与珠江上游相流通^[36], 到第四纪, 由于青藏高原的隆升抬高了云贵高原的台面, 长江和珠江之间的分水岭随之出现, 于是在我国南方长江流域与珠江流域的主要依赖水体迁移的螳状独缩虫种群被隔离开来, 逐渐分化, 从而形成了现在我国螳状独缩虫沿长江与珠江分水岭划分为南北两大种群的地理分布格局. 对高等水生生物的生物地理学的研究就表明长江与珠江分水岭的形成直接导致了华鲮鱼属的隔离分化¹⁾.

但是这种隔离并不是绝对的, 在武昌东湖采集到的 Wch1 就属于南方种群, 而且在 Wch3 的 305 位上具有南方种群特征的胞嘧啶(C), 因此, 我们推测在南北种群间尚未形成生殖隔离时, Wch3 正是两大种群基因交流的产物. 这正是 Wch3 为何在系统发育图中位置略有不同的原因. 对于在武昌东湖何以出现南方种群, 一个原因是随人类活动(如水产养殖中从珠江流域引种入鄂等)迁入, 另外也不排除通过孢囊传播而来, 但处于武昌、广州之间的湘潭并未出现南方种群, 使得这一原因也值得推敲, 尚需通过增加采样点, 尤其是增加珠江流域, 以及珠江

1) 张 鶚. 华鲮属鱼类形态度量学、系统学及生物地理学研究. 博士学位论文. 中国科学院水生生物研究所, 1999

与长江流域间的样点来进一步的分析.

不过在武昌东湖有一值得注意的现象: 在所有采样点, 惟有东湖中相距较近的 2 ~ 5 号站点的螳状独缩虫在头年 10 月底至来年 3 月长达近 6 个月时间中, 在湖岸边的石头、枯枝、甚至废弃的塑料袋等任何可固着的基质上成片生长. 我们可以认为这是东湖螳状独缩虫丰富的遗传多样性导致的种群繁盛的结果, 这一点从采自以上站点的 4 个样品中就有 3 种序列组成 (WCh2, WCh3 和 WCh4) 中得到了很好的反映. 而产生这种多态性的主要原因可能是突变, 因为这些站点所在的东湖水果湖区域是东湖中污染程度最高的水域, 已达超富营养水平^[37], 某些理化因素可能导致了螳状独缩虫 18S-ITS1 序列的变异.

在螳状独缩虫北方种群中, 各种群彼此间在 18S-ITS1 区虽然只存在一个碱基的变异, 但仍体现出与自然地理条件间的关系. 如螳状独缩虫在自然环境相对相似的华北区(北京和河南、陕西)和华中区(湖北、湖南)间的变异较小, 都发生在 ITS1 区, 而它们与在自然条件相差较大的蒙新区(新疆)的螳状独缩虫间的变异较大, 发生在 18S 区.

同样, 在南方种群中, 昆明的螳状独缩虫与广州的螳状独缩虫在 18S 区 34 位上也有 1 个变异. 这是因为青藏高原的隆升抬高了云贵高原台面, 引起珠江上游与珠江中下游地势上的不平衡发展, 形成了我国南部地区第一、三级地势之间的差异. 这种差异导致了两地环境的差异, 也使得两地螳状独缩虫出现差异.

根据上述序列分析与系统地理分析, 我们对我国螳状独缩虫的现有地理分布格局的演化作一总结(图 3): (i) 在第三纪之前, 螳状独缩虫在我国广泛分布; (ii) 在第三纪末和第四纪更新世期间, 伴随青藏高原隆起, 长江与珠江分水岭形成, 导致螳状独缩虫在我国沿该分水岭隔离分化为南北两大种群; (iii) 在此分水岭以北, 由于恶劣环境和气候条件下(无论第四纪冰

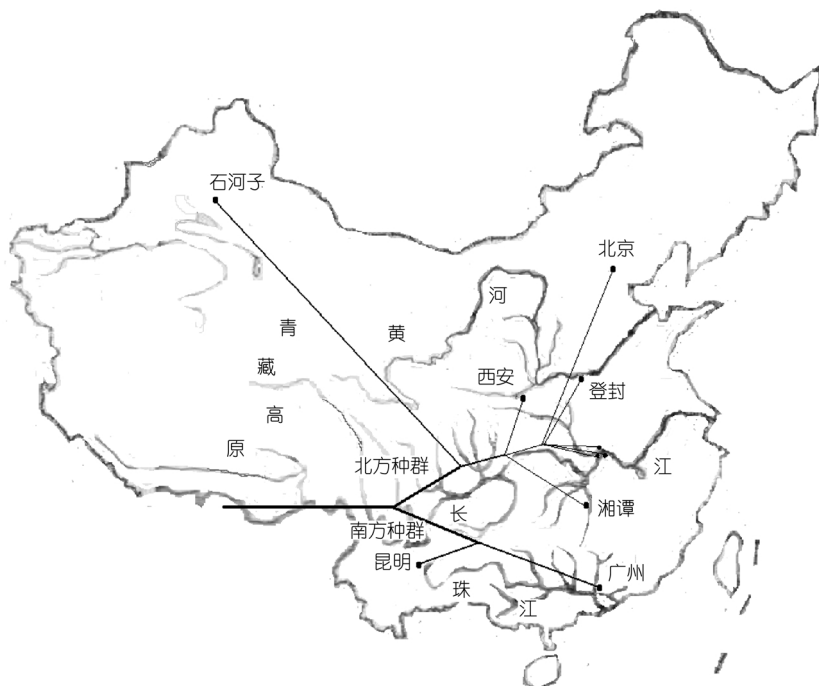


图 3 我国螳状独缩虫 18S-ITS1 系统发育树(图 1 和 2)的地理分布示意图

川运动和气候变化, 还是之后北方的干燥气候) 蟪状独缩虫可能形成孢囊通过空气大范围扩散使得北方种群间基因交流频繁, 未发生显著分化; (iv) 在南、北两大种群内, 各种群由于各自所处环境的差异也发生轻微分化, 且这种分化程度的大小与环境的差异表现出一定相关性。

我们在说明 18S-ITS1 rDNA 序列是研究蟪状独缩虫系统地理学的良好分子标记的同时, 指出蟪状独缩虫存在地域性分布, 而且这种分布格局与第四纪地质事件和气候变化有着密切的关系。在国内外开展了纤毛虫分子系统地理学方面的工作, 以合适的分子标记对起源早、分布广的低等单细胞真核生物现有地理分布格局的演化作了合理分析, 更为重要的是针对蟪状独缩虫与高等动物地理分布的差异(如南北分界线的不同), 将这类低等生物的传播方式受气候变化的影响这一因素, 与隔离分化和扩散理论有机结合起来讨论问题的分析方法, 对低等生物系统地理学的研究具有重要指导意义。

致谢 感谢中山大学的徐润林教授、黄建荣和施海琼, 北京大学的高崇明教授和胡国群, 中国科学院昆明动物研究所的文建凡研究员和董锦华在采样期间提供的帮助。感谢中国科学院昆明动物研究所张亚平研究员为我们的数据分析提供的技术支持; 感谢庞俊锋博士对我们的数值分析和验证中的全力帮助。感谢复旦大学谢毅教授、吴海和郭凌晨提供了 DNA 测序服务。

参 考 文 献

- 1 Avise J C, Hamrick J L. Conservation Genetics: Case Histories from Nature. New York: Chapman & Hall, 1996
- 2 Avise J C, Arnold J, Ball R M. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. Annual Review of Ecology and Systematics, 1987, 18: 489 ~ 522
- 3 Avise J C. The history and preview of phylogeography: a personal reflection. Molecular Ecology, 1998, 7: 371 ~ 379
- 4 Lydeard C, Wooten M C, Meyer A. Molecules, morphology, and area cladograms: A cladistic and biogeographic analysis of *Gambusia* (Teleostei: Poeciliidae). Syst Biol, 1995, 44: 221 ~ 236
- 5 Near T J, Page L M, Mayden R L. Intraspecific phylogeography of *Percina evides* (Percidae: Etheostominae): an additional test of the central highlands pre-Pleistocene vicariance hypothesis. Molecular Ecology, 2001, 10: 2235 ~ 2240
- 6 Kotlík P, Berrebi P. Phylogeography of the barbell (*Barbus barbus*) assessed by mitochondrial DNA variation. Molecular Ecology, 2001, 10: 2177 ~ 2185
- 7 Edwards K J, Gadek P A. Evolution and biogeography of *Alectryon* (Sapindaceae). Mol Phylogenet Evol, 2001, 20: 14 ~ 26
- 8 Fernando P, Pfrender M E, Encalada S E, et al. Mitochondrial DNA variation, phylogeography and population structure of the Asian elephant. Heredity, 2000, 84: 362 ~ 372
- 9 Johnson W E, Slattey J P, Eizirik E, et al. Disparate phylogeographic patterns of molecular genetic variation in four closely related South American small cat species. Molecular Ecology, 1999, 8: S79 ~ 94
- 10 Taberlet P, Bouvet J. Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetics the brown bear (*Ursus arctos*) in Europe. Proc R Soc Lond B, 1994, 255: 195 ~ 200
- 11 Goggin C L. Variation in the two internal transcribed spacers and 5.8S ribosomal DNA from five isolates of the marine parasite *Perkinsus* (Protista, Apicomplexa). Mol Biochem Parasitol, 1994, 65: 179 ~ 182
- 12 Wright A D G. Analysis of intraspecific sequence variation among eight isolates of the rumen symbiont, *Isotricha prostoma* (Ciliophora), from two continents. J Eukaryot Microbiol, 1999, 46: 445 ~ 446
- 13 蒋燮治, 沈韞芬, 龚循矩. 西藏水生无脊椎动物. 北京: 科学出版社, 1983
- 14 斐文中. 中国第四纪哺乳动物群的地理分布. 古脊椎动物学报, 1975, 1: 9 ~ 24
- 15 曹文宣, 陈宜瑜, 武云飞, 等. 裂腹鱼类的起源和演化及其与青藏高原隆起的关系. 见: 青藏高原隆起的时代、幅度和

形式问题. 北京: 科学出版社, 1981. 118 ~ 119

- 16 张荣祖, 郑昌琳. 青藏高原哺乳动物地理分布特征及其区系演化. 地理学报, 1985, 40: 225 ~ 231
- 17 杨大同. 中国横断山生态环境和两栖类物种多样性形成的演化及其横断山抬升的关系研究. 见: 吴征镒, 主编. 云南生物多样性学术讨论会论文集. 昆明: 云南科技出版社, 1993. 17 ~ 32
- 18 刘焕章, 陈宜瑜. 中国淡水鱼类的分布格局与东亚淡水鱼类的起源演化. 动物分类学报, 1998, 23(增刊): 10 ~ 16
- 19 Miao W, Yu Y H, Shen Y H. Phylogenetic relationships of the subclass Peritrichia (Oligohymenophorea, Ciliophora) with emphasis on the genus *Epistylis*, inferred from small subunit rRNA gene sequences. J Eukaryot Microbiol, 2001, 48: 583 ~ 587
- 20 缪 炜, 张锡元, 余育和, 等. 利用三种分子标记研究缘毛类纤毛虫的系统发育学地位. 动物学研究, 2002, 23: 265 ~ 269
- 21 缪 炜, 余育和, 沈韞芬. 上海四膜虫和两株嗜热四膜虫的 rRNA 基因 ITS1 序列及分子系统关系. 动物学研究, 2001, 22: 265 ~ 269
- 22 Felsenstein J. PHYLIP: Phylogenetic inference package, ver.3.5c. Seattle: University of Washington, 1993
- 23 Strimmer K, von Haeseler A. Quartet puzzling: A quartet maximum likelihood method for reconstructing tree topologies. Mol Biol Evol, 1996, 13: 964 ~ 969
- 24 Bernhard D D, Schlegel M I. Evolution of histone H4 and H3 gene in different ciliate lineages. J Mol Evol, 1998, 46: 344 ~ 354
- 25 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
- 26 Johnson A M. Phylogeny and evolution of Protozoa. Zoological Science, 1990, 7 (supplement): 179 ~ 188
- 27 Page R D M. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Comp Appl Biosc, 1996, 12: 357 ~ 358
- 28 Hasegawa M, Kishino H, Yano T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. J Mol Evol, 1985, 22: 160 ~ 174
- 29 张 昀. 前寒武纪生命演化与化石记录. 北京: 北京大学出版社, 1989. 76 ~ 93
- 30 Schopf J W. Biostratigraphic usefulness of stromatolitic Precambrian microbiotas: A preliminary analysis. Precambrian Research, 1977, 5: 143 ~ 173
- 31 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
- 32 张荣祖. 鼠兔亚属(兽纲: 兔形目: 鼠兔科)地理分布. 动物分类学报, 1998, 23(增刊): 67 ~ 73
- 33 张荣祖. 中国动物地理. 北京: 科学出版社, 1999
- 34 李吉均, 文世宣, 张青松, 等. 青藏高原隆起的时代、幅度和形式的探讨. 中国科学, 1979, 6: 608 ~ 616
- 35 任美镔. 云南西北部金沙江河谷地貌与河流袭夺问题. 地理学报, 1959, 25: 135 ~ 155
- 36 任美镔. 中国自然区域及开发整治. 北京: 科学出版社, 1992
- 37 李植生, 梁小民, 陈旭东, 等. 东湖水化学现状. 东湖生态学研究(二). 北京: 科学出版社, 1995. 36 ~ 74