

后生动物起源时间的分子钟研究^{*}

吴 平 张克云 杨 群
(中国科学院南京地质古生物研究所 南京 210008)

提要 后生动物是起源于“寒武纪大爆发”还是经历了一个相对较长的前寒武时期一直是动物进化史上的不解之谜。综述近年来出现的很多利用分子数据推测后生动物起源时间的分子钟研究, 并就研究中存在的无脊椎动物与脊椎动物之间的进化速率的校正、进化速率恒定基因的判断等问题进行讨论。

关键词 后生动物 起源时间 分子钟

1 关于后生动物各门类的起源时间的争论

后生动物(metazoan)各门类的起源时间问题一直存在争论 (Bell, 1997; Conway Morris, 1997; Conway Morris, 1998)。后生动物究竟是起源于“寒武纪大爆发”(Cambrian explosion), 还是经历了一个相对较长的前寒武时期, 现在尚无明确的答案。痕迹化石(trace fossils)以及叠层石(stromatolite)多样性的下降提示在文德期(Vendian)之前后生动物可能已经出现 (Conway Morris, 1993; Valentine, 1994)。

通常的观点认为第一个体腔动物(coelomates)出现在约 700 Ma (百万年) 前的新元古代的晚期 (late Neoproterozoic), 原口动物(protostomes) 与后口动物(deuterostomes) 的分歧时间发生在约 600 Ma 前; 在后口动物中, 棘皮动物(echinoderms) 和脊索动物(chordates) 的分歧时间发生在文德期 (Ayala *et al.*, 1998) (插图 1a), 但这种观点并未得到化石记录的证实。540 Ma 前的“寒武纪大爆发”发生前的多细胞动物的化石记录极度缺乏, 虽有关于 570 Ma 前的海绵 (Li *et al.*, 1998) 和早期动物胚胎 (Xiao *et al.*, 1998) 的报道, 但是可靠的后生动物化

石证据尚无早于 600 Ma。“寒武纪大爆发”形成了包括脊索动物在内的几乎一切动物门一级谱系分形结构。在许多类群建立不久, 立即开始了相当于亚门或纲一级的次级构型方案多样性的爆发 (Chen and Zhou, 1997)。

但是化石记录的贫乏并不能肯定说文德期没有后生动物, 这种化石的缺少也许只是反映了保存和发现软体化石的困难, 而寒武纪地层中的大量后生动物也许只是保存下来的大型“化石库”而已。在古生物学家们争论不休之际, 分子生物学家开始尝试用 DNA 序列数据和分子钟(molecular clock) 理论来探索这一问题。现代分子生物学的快速发展使得用分子钟理论估算古生物分歧事件的时间成为可能。分子数据具有对化石记录的空缺进行独立检验的潜能, 可以用于推测缺少化石记录的谱系的进化历史。

2 分子钟的早期研究

1962 年, Zuckerkandl 和 Pauling 提出分子钟假说, 认为不同物种间的蛋白质氨基酸序列差异随着分歧时间的加大而增加。现在我们已知道不仅是氨基酸序列, DNA 序列也存在这种规律。

Brown 等在 1972 年首次从分子水平研究后生动物的分化时间。通过对细胞色素 C (cytochrome

收稿日期: 1999-11-11

^{*} 国家攀登项目 (95-专-01-4-4) 和国家自然科学基金项目 (No. 94725204) 资助课题。

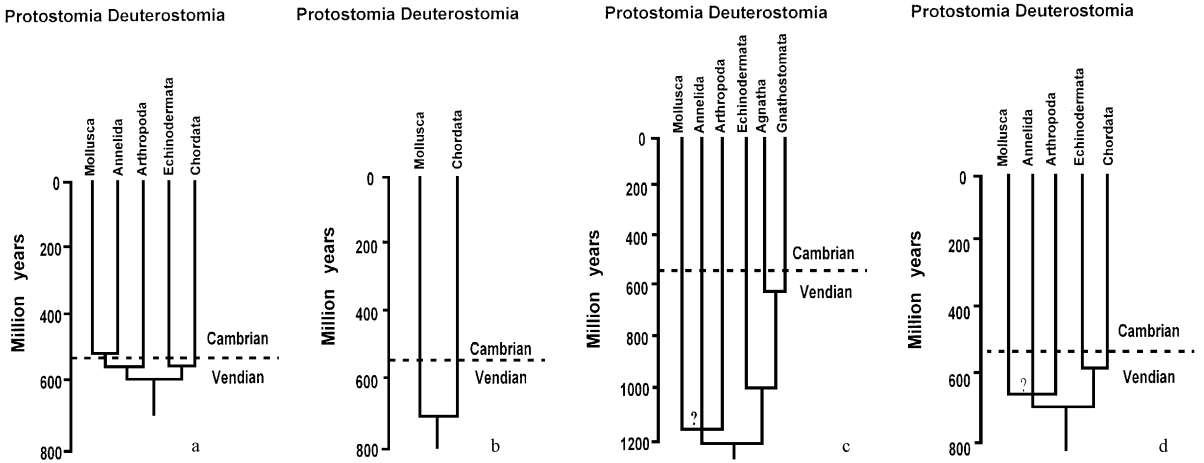


插图 1 传统观念以及用分子钟推测的后生动物的分歧时间

a. 传统观念; b. Brown 等 (1972) 的研究结果; c. Wray 等 (1996) 的研究结果; d. Ayala 等 (1998) 的研究结果。

C) 基因的氨基酸序列的研究, 作者推测软体动物与脊椎动物的分歧时间约为 720 Ma (插图 1b)。这一结果比寒武纪大爆发的观点稍稍早了一点。

Runnegar (1982) 认为 α 和 β 血红蛋白 (haemoglobin) 自从约 450 Ma—500 Ma 前出现后, 以近乎恒定的速率进化。作者假设这个速率在所有的珠蛋白 (globin) 中都是恒定的, 用无脊椎动物和脊椎动物之间的序列差异推断了动物门类之间的初期辐射发生的可能时间至少在 900 Ma—1 000 Ma 以前。这一结果首次从分子水平支持了后生动物在前寒武晚期的软体化石出现前经历了长期分化过程的观点。但是, Erwin (1989) 认为作者的推算时间并不可靠, 存在着方法学上的诸多问题, 因而没有反映出现生动物门类间的辐射进化。

Runnegar (1986) 通过研究珠蛋白、细胞色素 C 和 5 S rRNA 等基因的分子钟, 推测原口动物与后口动物的分歧时间约为 720 Ma。

3 近年来的分子钟研究

随着近年来寒武纪以及前寒武纪化石生物的研究深入, 关于后生动物的起源的分子钟研究也达到了高潮。这些研究多用大量的蛋白质的氨基酸序列或 DNA 序列数据进行分析, 分析的方法也有所改善和突破。

Doolittle 等 (1996) 对脊椎动物的 57 种酶 (enzymes) 的氨基酸序列进行了研究, 根据脊椎动物相对比较完整的化石记录建立分子钟, 并用这个分子钟推测现生的主要生物类群的分歧时间。在这项研

究中, 作者认为原口动物与后口动物的分歧时间为 670 Ma。

Wray 等 (1996) 对后生动物的 18S rRNA、5 个线粒体编码基因以及两个球蛋白基因进行了研究, 7 组独立的 DNA 数据的分析结果均提示无脊椎动物和脊索动物的分歧时间约为 12 亿年, 棘皮动物与脊索动物的分歧时间约为 10 亿年 (插图 1c)。该结果提示在寒武纪以前动物门类经历了长期的进化。但是这项研究结果受到了很多质疑 (Conway Morris, 1997; Nikon *et al.*, 1997; Ayala *et al.*, 1998; Conway Morris, 1998)。Ayala 等 (1998) 根据对 18 个编码基因的分析, 认为原口动物与后口动物的分歧时间约为 670 Ma, 而脊索动物与棘皮动物的分歧时间约为 600 Ma (插图 1d)。在这一研究中, 作者同时对 Wray 等 (1996) 使用的分子数据进行了重新分析, 得到原口动物与后口动物的分歧时间则为 704 Ma。

在用大量的氨基酸或 DNA 数据进行分子钟研究的同时, 很多研究者也在积极寻找进化速率恒定的基因。Iwabe 等 (1995) 以不同哺乳动物目间 (75 Ma)、哺乳动物与鸟类/爬行类 (300 Ma)、四足动物与鱼类 (400 Ma)、有颌类与七鳃鳗 (500 Ma)、脊索动物与节肢动物 (700 Ma) 作为参照分歧点的研究结果认为醛缩酶 C (aldolase C) 等 4 种蛋白质的进化速率恒定。Nikoh 等 (1997) 根据这一结果, 对其中的醛缩酶 C 和丙糖磷酸异构酶 (triose phosphate isomerase) 的氨基酸序列进行了分析, 推测侧生动物 (Parazoa) (即海绵动物) 和真后生动物 (Eumetazoa) 的分歧时间, 即第一个多细胞动物的起源时间约为

940 Ma;而头索动物与脊椎动物在 700 Ma 拥有共同祖先。

还有一种推测分歧时间的方法是用某些脊椎动物类群间的分歧时间作为内校正时间或用较早的分歧时间(如动物与真菌)作为外校正时间,分别用外推和内推的方法得到未知的分歧时间。Gu(1998)对果蝇(*Drosophila*)和脊椎动物的 22 个核基因进行了研究,假定人/鼠和哺乳动物/鸟类的分歧时间分别为 100 Ma 和 310 Ma,动物/真菌的分歧时间为 1100 Ma,不论是外推法还是内推法的结果均显示节肢动物和脊椎动物的分歧时间在约为 800 Ma 以上。

Bromham 等(1998)使用四元法(quartet method)来验证寒武纪大爆发理论。作者对 18S rRNA 和线粒体编码基因两组数据进行了分析,并对各种四元组合进行了相对速率检验,只用通过检验的四元组合进行时间估计。结果表明两组数据得到的棘皮动物与脊椎动物、原口动物与后口动物的分歧时间均超过 680 Ma,但是该研究结果尚不能确定准确的分歧时间。作者认为尽管不能提供后生动物起源的准确估计时间,但是其结果与寒武纪大爆发假说不同。

4 研究中存在的问题

用分子数据对后生动物分歧时间的研究依据分子钟假说。分子钟假说认为基因的进化速率在相关的进化谱系间是相对稳定的。但是我们现在知道基因在不同的时间和不同的进化谱系间的进化速率可能存在明显差异,这种差异会严重影响分歧时间推测结果的准确性。因此,如何校正分子钟以得到恒定的进化速率是研究结论正确与否的关键。

基于一个或少数几个基因的分歧时间估计受到基因进化速率恒定偏离的严重影响。在估计分歧时间时最好不仅使用很多基因而且使用很多物种,这样基因特异效应和谱系特异效应都能够被考虑进去。一般认为可用两个方法解决这个问题。一是使用大量的相互独立的数据提高时间估计的准确性(如:Doolittle *et al.*, 1996; Gu, 1998; Ayala *et al.*, 1998)。另一个是寻找速率恒定的基因用于时间估计(如:Nikoh *et al.*, 1997)。Nikoh 等(1997)在分析中使用的是 Iwabe 等(1995)认为进化速率恒定的 2 个基因。但是,这两种解决方法均存在着一些问题。在第一种方法中,由于缺乏多数早期分歧

的动物门类的直源(orthologous)基因序列数据,我们还很难得到可靠的分子钟(Gu, 1998);而在第二种寻找速率恒定基因的方法中,Iwabe 等(1995)得到的进化速率恒定的结果是依据一些脊椎动物之间的分歧时间以及脊索动物与节肢动物(700 Ma)的分歧时间作为参照分歧点。实际上,我们并不知道脊索动物与节肢动物的确切分歧时间,假设脊索动物与节肢动物的分歧时间不是 700 Ma,而是 600 Ma,或 800 Ma,那么这些基因的进化速率就有可能不恒定了,也就是说这些所谓速率恒定的基因只是在脊椎动物之间的进化速率恒定。由此可见,用直接计算进化速率的方法也许根本就找不到在所有后生动物中进化速率恒定的基因。

在后生动物早期分化时间的分子钟研究中,一般用两种方法来推测未知的分歧时间。一是用脊椎动物的分歧时间和遗传距离建立的分子钟来推测未知的分歧时间(如:Bunegar, 1982; Doolittle *et al.*, 1996; Wray *et al.*, 1996; Ayala *et al.*, 1998)(插图 2),其中只有少数研究对脊椎动物和无脊椎动物的进化速率进行了校正(如:Ayala *et al.*, 1998)。事实上,脊椎动物和无脊椎动物的分子进化速率存在着差异,未对两者的进化速率进行校正得到的结果是很难令人信服的。Ayala 等认为 Wray 等研究结果的误差主要来自用脊椎动物的慢进化速率来外推后生动物之间的分歧时间。二是选择某些特殊的参照点来推测未知的分歧时间(如 Gu, 1998),在这种研究中不仅存在速率是否恒定的问题,同时也存在使用参照点本身的时间是否准确的问题。

另外,很多研究使用线粒体基因来推测后生动物的分化时间(Wray *et al.*, 1996; Bromham *et al.*, 1998)。Nikoh(1997)则认为线粒体基因不适合用于深层次进化关系的研究。

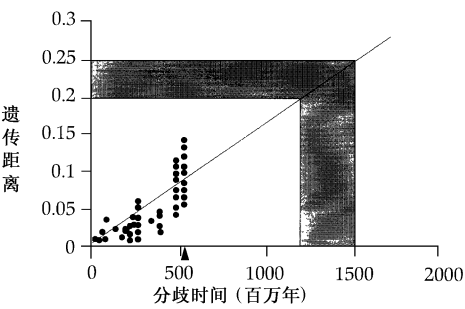


插图 2 Wray 等(1996)用脊椎动物的 18S rRNA 基因的分子钟推测后生动物门类的分歧时间

5 结束语

尽管在长期进化过程中不同的谱系间的进化速率可能并不恒定,由此导致了分子钟研究不够准确,但分子钟在推算缺乏化石记录的物种的分歧时间的研究中仍然是一个有用的工具。各项研究得到的有关后生动物间分歧时间的结果之间有较大的差异,但没有一项研究证实在约 540 Ma 前的寒武纪大爆发发生以前后生动物只经历了数百万年的进化历程。尽管 Doolittle 等(1996)和 Ayala 等(1998)得到的原口动物与后口动物的 670 Ma 分歧时间已经是最接近寒武纪大爆发时间的分子证据,这些结果提示了在寒武纪大爆发前后生动物的进化至少经历了一亿年以上的分化。

由于各项研究结果仍然存在争议,故用分子数据确定动物门类之间的分歧时间尚需进一步研究。假如能够通过大量的研究推测得到早期后口动物和原口动物比较一致的分歧时间,我们就可能知道前寒武纪动物的分歧究竟经过了一个数千万年的爆发式辐射进化还是数亿年的逐渐进化。随着早期分化的动物门类分子数据的逐渐积累以及统计方法的日臻成熟,关于后生动物起源的分子钟研究将逐步深入。

参考文献

- Ayala F J, Rzhetsky A, Ayala F J, 1998. Origin of the metazoan phyla: Molecular clocks confirm paleontological estimates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 606—611.
- Bell M A, 1997. Origin of metazoan phyla: Cambrian explosion or proterozoic slow burn? *Trends. Ecol. Evol.*, **12**, 1—2.
- Bromham L, Rambaut A, Forty R, Cooper A, Penny D, 1998. Testing the Cambrian explosion hypothesis by using a molecular dating technique. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 12386—12389.
- Brown R H, Richardson M, Boulter D, Ramshaw J A M, Jefferies R P

- S, 1972. The amino acid sequence of cytochrome c from *Helix aspersa* Muller (Garden Snail). *Biochem. J.*, **128**, 971—974.
- Chen J Y, Zhou G Q, 1997. Biology of the Chengjiang fauna. *Bulletin of National of Natural Museum Science*, **10**, 11—105.
- Conway Morris S, 1993. The fossil record and the early evolution of the Metazoa. *Nature*, **361**, 219—225.
- Conway Morris, S, 1997. Molecular clocks: Defying the Cambrian 'explosion'. *Current Biology*, **7**, 71—74.
- Conway Morris S, 1998. Early metazoan evolution: reconciling paleontology and molecular biology. *Amer. Zool.*, **38**, 867—877.
- Doolittle R F, Feng D-F, Tsang S, Cho G, Little E, 1996. Determining divergence times of the major kingdoms of living organisms with a protein clock. *Science*, **271**, 470—477.
- Erwin D, 1989. Molecular clocks, molecular phylogenies and the origin of phyla. *Lethaia*, **22**, 251—257.
- Gu X, 1998. Early metazoan divergence was about 830 million years ago. *J. Mol. Evol.*, **47**, 369—371.
- Iwabe N, Kuma K, Nikoh N, Miyata T, 1995. Molecular clock for dating of divergence between animal phyla. *Jap. J. Genet.*, **70**, 687—692.
- Li C W, Chen J Y, Hua T E, 1998. Precambrian sponges with cellular structures. *Science*, **279**, 879—882.
- Nikoh N, Iwabe N, Kuma K, Ohno M, Sugiyama T, Watanabe Y, Yasui K, Zhang S C, Hori K, Shimura Y, Miyata T, 1997. An estimate of divergence time of Parazoa and Eumetazoa and that of Cephalochordata and Vertebrata by aldolase and triose phosphate isomerase clocks. *J. Mol. Evol.*, **45**, 97—106.
- Runnegar B, 1982. A molecular-clock date for the origin of the animal phyla. *Lethaia*, **15**, 199—205.
- Runnegar B, 1986. Molecular Palaeontology. *Palaeontology*, **29**, 1—24.
- Valentine J W, 1994. Late Precambrian bilaterians: grades and clades. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 6751—6757.
- Xiao S, Zhang Y, Knoll A H, 1998. Three-dimensional preservation of algae and animal embryos in a Neoproterozoic phosphorite. *Nature*, **391**, 553—558.
- Wray G A, Leighton J S, Shapiro L H, 1996. Molecular evidence for deep Precambrian divergences among metazoan phyla. *Science*, **274**, 568—573.
- Zuckerkandl E, Pauling L, 1962. Molecular disease, evolution and genetic heterogeneity. In: Kasha, M and Pullman, B. (eds): *Horizons in Biochemistry*. New York: Academic Press. 189—225.

MOLECULAR CLOCK STUDIES ON THE DIVERGENCE TIME OF THE EARLY METAZOANS

WU Ping, ZHANG Ke-Yun and YANG Qun

(Nanjing Institute of Geology and Palaeontology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Key words: Metazoa, Cambrian explosion, molecular clock

Abstract

Whether early metazoans originated during the “Cambrian explosion” or lasted a relatively long period before, remains a mystery in the evolutionary history of animal. Studies to estimate the origin time of

the Metazoa using molecular data have been steadily increasing in recent years. In this paper, we summarized these studies and discussed existing problems including the calibration of evolutionary rate between invertebrates and vertebrates and the judgment of constant evolutionary rate genes.