

线蕨属(水龙骨科)的系统发育研究: 来自叶绿体*rbcL*和 *rps4-trnS*序列的证据

¹董晓东 ¹陆树刚 ²李春香*

¹(云南大学生态学与地植物学研究所 昆明 650091)

²(中国科学院南京地质古生物研究所现代古生物学和地层学国家重点实验室 南京 210008)

Molecular phylogeny of *Colysis* (Polypodiaceae) based on chloroplast *rbcL* and *rps4-trnS* sequences

¹Xiao-Dong DONG ¹Shu-Gang LU ²Chun-Xiang LI*

¹(Institute of Ecology and Geobotany, Yunnan University, Kunming 650091, China)

²(State Key Laboratory of Palaeobiology and Stratigraphy of Nanjing Institute of Geology and Palaeontology,
Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Abstract *Colysis* (Polypodiaceae) is a genus with approximately 30 species found in Asia, Africa, Australia (restricted to Queensland), and New Guinea, including ca. 15 species in China. The systematic position and taxonomic circumscription of *Colysis* has remained unresolved since its establishment in 1849. In this work we retrieved the chloroplast DNA sequences *rbcL* and *rps4-trnS* for *Colysis* and its closely related taxa. Two data sets—the *rbcL* gene and *rps4-trnS* region (including both the *rps4* gene and the *rps4-trnS* intergenic spacer) were analyzed separately and together to assess phylogenetic relationships using maximum parsimony (MP) and Bayesian inference (BI). Both separate and combined data sets yielded largely congruent results and revealed that *Colysis* formed a well-supported monophyletic group with *Leptochilus* Kaulf. (here designated as the C-L Clade). Two *Leptochilus* species fell into different subclades of the C-L clade. *Phymatosorus* Pic. Serm. formed a distinct lineage in the current analysis. The genus *Microsorium* Link, as traditionally defined, was polyphyletic; while *M. linguiforme*, *M. varians*, and *M. pustulatum* clustered with Malaysian *Lecanopteris*, other microsoriums were isolated in different clades. Our phylogenetic analysis suggests that *Leptochilus* and *Colysis* may better be treated as one genus.

Key words *Colysis*, *rbcL*, *rps4-trnS*, phylogeny, Polypodiaceae.

摘要 线蕨属*Colysis*植物主要分布于亚洲热带和亚热带地区,少数种类分布至非洲、澳大利亚(昆士兰)及新几内亚地区。自1849年成立以来,线蕨属的分类范畴和系统位置一直有待确定。本文利用叶绿体基因组的*rbcL*、*rps4*基因和*rps4-trnS*基因间隔区序列,运用最大简约法和贝叶斯方法分析了线蕨属及其近缘类群的系统演化关系。研究结果显示:(1)线蕨属和薄唇蕨属*Leptochilus*(含似薄唇蕨属*Paraleptochilus*)组成一个支持率很高的单系分支(C-L Clade),但是薄唇蕨属的成员位于线蕨属的不同支系内,支持线蕨属和薄唇蕨属合并为一个属;(2)瘤蕨属*Phymatosorus*单独形成一个单系分支;(3)星蕨属*Microsorium*是一个多系类群,除*Microsorium linguiforme*、*M. varians*和*M. pustulatum*与马来群岛的*Lecanopteris*聚在一起外,其他的星蕨属成员均位于不同的支系上。本文的系统发育分析结果为线蕨属和薄唇蕨属的分类处理提供了分子系统学的证据。

关键词 线蕨属; *rbcL*; *rps4-trnS*; 系统发育; 水龙骨科

线蕨属*Colysis* C. Presl植物隶属于水龙骨科 Polypodiaceae, 主要分布于亚洲热带和亚热带地区,少数种类分布至非洲、澳大利亚(昆士兰)及太平洋岛屿。关于线蕨属的分类范畴,不同的分类学家之间存在较大争议。吴兆洪和秦仁昌(1991)认为全世

界约有线蕨属植物30种,其中中国约产20种;石雷和张宪春(1999)通过对中国及邻近地区的线蕨属植物进行分类修订后认为,该属植物全世界有12种,中国有9种1杂种。自1849年成立以来(Presl, 1849),线蕨属的系统位置和近缘类群尚没有得到确定。在秦仁昌(1978)分类系统中,线蕨属与星蕨属*Microsorium* Link、薄唇蕨属*Leptochilus* Kaulf.、似薄唇蕨属*Paraleptochilus* Copel.和树舌蕨属*Dendroglossa*

2007-08-27 收稿, 2008-01-11 收修改稿。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: cxli@nigpas.ac.cn)。

Presl同属于水龙骨科中的星蕨亚科Microsorioideae, 而吴兆洪和秦仁昌(1991)将线蕨属与修蕨属*Selliguea* Bory同置于水龙骨科线蕨亚科Selliguioideae。在《中国植物志》中, 线蕨属与星蕨属和薄唇蕨属(似薄唇蕨属被并入薄唇蕨属)均被置于水龙骨科中的星蕨亚科(林尤兴, 2000)。目前多数学者认为线蕨属与星蕨属、薄唇蕨属和似薄唇蕨属具有较近的亲缘关系, 但是这些类群之间的界限尚不能确定(Copeland, 1947; Hettterscheid & Hennipman, 1984; Kramer & Green, 1990; Tryon & Lugardon, 1991; Nootboom, 1997; Schneider et al., 2004)。在形态特征上, 线蕨属以其孢子囊群线形并与主脉斜交的特征区别于水龙骨科中的其他植物, 但是具有孢子囊群线形, 与主脉斜交这一特征的属尚有修蕨属。线蕨属植物根状茎上的鳞片为褐色透明的薄鳞片, 叶片质地为草质或纸质, 而修蕨属植物根状茎上的鳞片为红棕色不透明的厚鳞片, 叶片质地为革质。线蕨属的上述形态特征在水龙骨科中比较稳定且独特, 一直被作为分类的主要依据, 但能否反映其系统演化关系, 还需要进一步的研究。

近年来的分子系统学研究已经为解决蕨类植物许多类群的系统演化关系提供了很好的证据, 尤其是Schneider等(2004)利用叶绿体*rbcL*、*rps4*基因和*rps4-trnS*基因间隔区对水龙骨科和禾叶蕨科Grammitidaceae进行的分子系统学研究, 为我们探讨线蕨属的系统演化关系提供了基础, 但是他们的研究仅选取了褐叶线蕨*Colysis wrightii* (Hook.) Ching一个代表种(被Schneider等归入薄唇蕨属), 对其近缘类群(如星蕨属)的分析也侧重于东南亚及太平洋岛屿的种类, 涉及我国的种类很少。为了探讨线蕨属及其近缘类群的系统演化关系, 我们根据《中国植物志》星蕨亚科的范畴(包括线蕨属、星蕨属和薄唇蕨属; 林尤兴, 2000), 同时参照Schneider等(2004)建立的系统发育树(包括瘤蕨属*Phymatosorus* Pic. Serm., 但是被Schneider等归并到星蕨属), 对线蕨属及其近缘类群叶绿体基因组的*rbcL*基因和*rps4-trnS*区(包括*rps4*基因和*rps4-trnS*基因间隔区)进行了基因测序和系统发育分析。希望通过分子系统学研究, 能够澄清线蕨属及其近缘类群的系统演化关系, 并为进一步的分类处理提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验材料为新鲜叶片, 采集后迅速在硅胶中干燥, 回到实验室进行DNA提取及序列分析。凭证标本保存在实验室和云南大学标本馆(其中心叶薄唇蕨*Leptochilus cantoniensis* (Baker) Ching保存在中国科学院华南植物研究所标本馆)。鉴于本文的实验材料所涉及名称多存在混乱现象, 部分名称与《中国植物志》中记载的名称尚不统一, 特作如下对照(见表1), 样品产地等信息详见表2。

1.2 总DNA提取

总DNA提取采用改良的CTAB方法(Doyle & Doyle, 1987; 施苏华等, 1996)。

1.3 序列测定

1.3.1 引物设计 根据Schneider等(2004)的研究, 我们选取叶绿体基因组的*rbcL*基因和*rps4-trnS*片段(包括*rps4*基因和*rps4-trnS*基因间隔区)。扩增*rbcL*基因所用引物根据Little和Barrington (2003)设计, 略作修改, 具体序列同Li等(2004)。*rps4-trnS*基因间隔区的引物序列参照Hennequin等(2003)设计, 并略作修改, 分别为*rps5*: 5'-ATGTCCCGTTATCGA-GGACC-3'; *trnS*: 5'-TACCGAGGGTTCGAA TC-3'。

1.3.2 PCR扩增 扩增反应在Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600上进行。反应体积为50 μ L, 其成分为: 2 μ L DNA模板(约2 ng, 由Gel Doc图像分析仪测得), 2.5 mmol/L $MgCl_2$, 0.2 mmol/L dNTPs, 1 \times buffer, 0.25 μ mol/L引物, 0.8 U *Taq* DNA聚合酶, 1 μ g/ μ L BSA, 5% DMSO。扩增*rbcL*基因的程序为: 94 $^{\circ}C$, 2 min, 预变性。循环以下程序: 94 $^{\circ}C$, 0.5 min; 42 $^{\circ}C$, 1 min; 72 $^{\circ}C$, 1.5 min; 40次重复, 72 $^{\circ}C$ 延伸7 min。扩增*rps4+rps4-trnS*片段的程序为: 94 $^{\circ}C$, 2 min, 预变性。循环以下程序: 94 $^{\circ}C$, 0.5 min; 56 $^{\circ}C$, 1 min; 72 $^{\circ}C$, 1 min; 40次重复, 72 $^{\circ}C$ 延伸7 min。扩增产物经0.8%–1.2%琼脂糖电泳后用Gel Doc图像分析仪进行观察。

1.3.3 序列测定 序列测定在ABI 377 DNA自动测序仪(Applied Biosystems, USA)上完成, 从3'→5'和5'→3'进行测序。序列数据已输入美国生物信息中心(NCBI)的基因库中(GenBank), 基因序列号见表2。

表1 实验材料的名称及其文献和异名

Table 1 Names and their references and synonyms of samples

物种 Species	文献及异名 Reference and synonym
掌叶线蕨 <i>Colysis digitata</i> (Baker) Ching	Lin Y-X (林尤兴), 2000. 6 (2): 255.
线蕨 <i>Colysis elliptica</i> (Thunb.) Ching	Lin Y-X (林尤兴), 2000. 6 (2): 249.
曲边线蕨 <i>Colysis flexiloba</i> (Christ) Ching	Ching R-C (秦仁昌), 1972. 1: 266. <i>Colysis elliptica</i> (Thunb.) Ching var. <i>flexiloba</i> (D. Don) L. Shi & X. C. Zhang, Lin Y-X (林尤兴). 2000 6 (2): 254.
断线蕨 <i>Colysis hemionitidea</i> (Wall. ex Mett.) C. Presl	Lin Y-X (林尤兴), 2000. 6 (2): 236.
胃叶线蕨 <i>Colysis hemitoma</i> (Hance) Ching	Lin Y-X (林尤兴), 2000. 6 (2): 246.
矩圆线蕨 <i>Colysis henryi</i> (Baker) Ching	Lin Y-X (林尤兴), 2000. 6 (2): 243.
矛叶线蕨 <i>Colysis intermedia</i> Ching & C. H. Wang	Ching R-C (秦仁昌), 1964. 1: 184.
绿叶线蕨 <i>Colysis leveillei</i> (Christ) Ching	Lin Y-X (林尤兴), 2000. 6 (2): 245.
长柄线蕨 <i>Colysis longipes</i> Ching	Ching R-C (秦仁昌), 1964. 1: 186. <i>Colysis elliptica</i> (Thunb.) Ching var. <i>longipes</i> (Ching) L. Shi & X. C. Zhang, Lin Y-X (林尤兴), 2000. 6 (2): 254.
滇线蕨 <i>Colysis pentaphylla</i> (Baker) Ching	Ching R-C (秦仁昌), 1933. 4: 332. Cheng X (成晓) et al., 2005. 21: 398. <i>Colysis elliptica</i> (Thunb.) Ching var. <i>pentaphylla</i> (Baker) L. Shi & X. C. Zhang, Lin Y-X (林尤兴), 2000. 6 (2): 255.
宽叶线蕨 <i>Colysis pothifolia</i> (D. Don) C. Presl	Ching R-C (秦仁昌), 1964. 1: 186. Cheng X (成晓) et al., 2005. 21: 400. <i>Colysis elliptica</i> (Thunb.) Ching var. <i>pothifolia</i> (D. Don) Ching, Lin Y-X (林尤兴), 2000. 6 (2): 252.
三裂线蕨 <i>Colysis triphylla</i> Ching	Ching R-C (秦仁昌), Wang C-H (王铸豪), 1959. 2: 155. Ching R-C (秦仁昌), 1964. 1: 185.
心叶薄唇蕨 <i>Leptochilus cantoniensis</i> (Baker) Ching	Lin Y-X (林尤兴), 2000. 6 (2): 265.
攀援星蕨 <i>Microsorium buergerianum</i> (Miq.) Ching	Ching R-C (秦仁昌), 1972. 1: 261. Cheng X (成晓) et al., 2005. 21: 354. <i>Microsorium brachylepis</i> (Bak.) Nakaike, Wang P-S (王培善), Wang X-Y (王筱英), 2001. 443. <i>Lepidomicrosorium buergerianum</i> (Miq.) Ching & Shing, Lin Y-X (林尤兴), 2000. 6 (2): 113.
羽裂星蕨 <i>Microsorium dilatatum</i> (Wall. ex Bedd.) Sledge	Ching R-C (秦仁昌), 1972. 1: 260. Cheng X (成晓) et al., 2005. 21: 358. <i>Microsorium insigne</i> (Blume) Copel., Lin Y-X (林尤兴), 2000. 6 (2): 229.
江南星蕨 <i>Microsorium fortunei</i> (T. Moore) Ching	Lin Y-X (林尤兴), 2000. 6 (2): 219.
星蕨 <i>Microsorium punctatum</i> (L.) Copel.	Ching R-C (秦仁昌), 1972. 1: 260. <i>Microsorium punctatum</i> (L.) Copel., Lin Y-X (林尤兴), 2000. 6 (2): 226.
似薄唇蕨 <i>Paraleptochilus decurrens</i> (Bl.) Copel.	Cheng X (成晓) et al., 2005. 21: 402. <i>Leptochilus decurrens</i> Blume, Lin Y-X (林尤兴), 2000. 6 (2): 262.
光亮瘤蕨 <i>Phymatosorus cuspidatus</i> (D. Don) Pic. Serm.	Lin Y-X (林尤兴), 2000. 6 (2): 156.
阔鳞瘤蕨 <i>Phymatosorus hainanensis</i> (Noot.) S. G. Lu	Lu SG, 1998. 11: 147-149. Lin Y-X (林尤兴), 2000. 6 (2): 161.

1.4 序列分析

用CLUSTAL X软件(Thompson et al., 1997)进行对位排列。对位排列后的序列, 分别用PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002)中的最大简约法(Maximum Parsimony, MP)和MrBayes v3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003)中的贝叶斯演绎法(Bayesian Inference, BI)构建系统发育树。MP采用启发式搜索(heuristic search), 1000次随机序列加入, TBR (Tree Bisection Reconnection)枝长交换, MULPARES和ACCTRAN优化, 所有核苷酸位点不进行加权处理, 空位(gap)作为缺失(missing)状态分析。采用500次抽样自展(bootstrap)分析评估系统树各分支的支持率。

在用BI构建系统树之前, 先用MrModeltest 2.0 (Nylander, 2004)软件获得最适合本研究序列矩阵的核苷酸替代模型及相关参数, 在AIC (Akaike Information Criterion)标准下, 3个数据集的模型均为GTR+I+G模型。BI采用MCMCMC (Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo)算法, 以随机树为起始树, 运行1000000代, 每100代取样1次, 开始的5000个样本作为老化样本(burn-in samples)舍弃。在进行两个基因的联合分析之前, 采用分划同质性检验(partition homogeneity test)(Farris et al., 1995)评价序列联合分析的可靠性。

表2 所用分类群及其相关信息

Table 2 Taxa used in sequence analysis and their information

物种 ¹⁾ Species ¹⁾	样品来源 Source locality	标本号或参考文献 Voucher or reference	基因库序列号 GenBank Accession No.	
			<i>rbcL</i>	<i>rps4 + rps4-trnS</i>
掌叶线蕨 <i>Colysis digitata</i> (Baker) Ching	海南尖峰岭 Jianfengling, Hainan, China	Lu SG/V99 (PYU)	EU363232	EU363250
线蕨 <i>Colysis elliptica</i> (Thunb.) Ching	昆明金殿公园 Jingdian Park, Kunming, Yunnan, China	Lu SG/B4 (PYU)	EU363233	—
曲边线蕨 <i>Colysis flexiloba</i> (Christ) Ching	四川峨眉山 Mt. Emei, Sichuan, China	LuSG/EM17 (PYU)	EU363234	—
断线蕨 <i>Colysis hemionitidea</i> (Wall. ex Mett.) C. Presl	云南昭通 Zhaotong, Yunnan, China	Lu SG/4B5 (PYU)	EU363235	EU363251
胃叶线蕨 <i>Colysis hemitoma</i> (Hance) Ching	福建南平 Nanping, Fujian, China	Lu SG/S15 (PYU)	EU363236	EU363252
矩圆线蕨 <i>Colysis henryi</i> (Baker) Ching	四川峨眉山 Mt. Emei, Sichuan, China	LuSG/EM1 (PYU)	EU363237	EU363253
矩圆线蕨 <i>Colysis henryi</i> (Baker) Ching	浙江杭州 Hangzhou, Zhejiang, China	Lu SG/Q8 (PYU)	EU363238	—
矛叶线蕨 <i>Colysis intermedia</i> Ching & C. H. Wang	海南五指山 Mt. Wuzhi, Hainan, China	Lu SG/V93 (PYU)	EU363239	—
绿叶线蕨 <i>Colysis leveillei</i> (Christ) Ching	四川峨眉山 Mt. Emei, Sichuan, China	Lu SG/EM26 (PYU)	EU363240	EU363254
长柄线蕨 <i>Colysis longipes</i> Ching	海南五指山 Mt. Wuzhi, Hainan, China	Lu SG/V56 (PYU)	EU363241	—
滇线蕨 <i>Colysis pentaphylla</i> (Baker) Ching	云南瑞丽 Ruili, Yunnan, China	Lu SG/SG9 (PYU)	EU363242	EU363255
宽叶线蕨 <i>Colysis pothifolia</i> (D. Don) C. Presl	海南尖峰岭 Jianfengling, Hainan, China	LuSG/V111 (PYU)	EU363243	EU363256
三裂线蕨 <i>Colysis triphylla</i> Ching	海南五指山 Mt. Wuzhi, Hainan, China	Lu SG/V13 (PYU)	EU363244	EU363257
褐叶线蕨 <i>Colysis wrightii</i> (Hook.) Ching	日本 Japan	Haufler et al., 2003	AF470340 [#]	—
<i>Lecanopteris carnos</i> a (Reinw.) Blume	印度尼西亚 Indonesia	Schneider et al., 2004	AF470322 [#]	AY096227 [#]
<i>Lecanopteris sinuosa</i> (Wall. ex Hook.) Copel.	菲律宾 Philippines	Schneider et al., 2004	AF470321 [#]	AY362634 [#]
心叶薄唇蕨 <i>Leptochilus cantoniensis</i> (Baker) Ching	海南昌江 Changjiang, Hainan, China	Dong/1034 (IBSC)	EU363245	EU363258
攀援星蕨 <i>Microsorium buergerianum</i> (Miq.) Ching	四川青城山 Mt. Qingcheng, Sichuan, China	Lu SG/QC14 (PYU)	EU363247	EU363260
<i>Microsorium commutatum</i> (Baker) Copel.	新几内亚岛 New Guinea	Schneider et al., 2004	AY362571 [#]	AY362644 [#]
羽裂星蕨 <i>Microsorium dilatatum</i> (Wall. ex Bedd.) Sledge	云南大围山 Mt. Dawei, Yunnan, China	Lu SG/I41 (PYU)	EU363248	—
江南星蕨 <i>Microsorium fortunei</i> (T. Moore) Ching	昆明金殿公园 Jingdian Park, Kunming, Yunnan, China	Lu SG/B16 (PYU)	AY725053 [#]	—
<i>Microsorium grossum</i> (Langsd. & Fisch.) Brownlie	新几内亚岛 New Guinea	Schneider et al., 2004	—	AY362695 [#]
<i>Microsorium linguiforme</i> (Mett.) Copel.	新几内亚岛 New Guinea	Schneider et al., 2004	AF470334 [#]	AY362635 [#]
膜叶星蕨 <i>Microsorium membranaceum</i> (D. Don) Ching var. <i>membranaceum</i>	昆明金殿公园 Jingdian Park, Kunming, Yunnan, China	Lu SG/B26 (PYU)	AY725053 [#]	AY725047 [#]
龙骨星蕨 <i>Microsorium membranaceum</i> (D. Don) Ching var. <i>carinatum</i> W. M. Chu & Z. R. He	云南西畴 Xichou, Yunnan, China	Lu SG/J17 (PYU)	AY725054 [#]	AY725046 [#]
<i>Microsorium musifolium</i> (Copel.) Blume	印度尼西亚爪哇 Java, Indonesia	Schneider et al., 2004	AF470333 [#]	AY362636 [#]
星蕨 <i>Microsorium punctatum</i> (L.) Copel.	海南五指山 Mt. Wuzhi, Hainan, China	Lu SG/V11 (PYU)	AF470337 [#]	EU363261

表2 (续) Table 2 (continued)

物种 ¹⁾ Species ¹⁾	样品来源 Source locality	标本号或参考文献 Voucher or reference	基因库序列号 GenBank Accession No.	
			<i>rbcL</i>	<i>rps4 + rps4-trnS</i>
<i>Microsorium pustulatum</i> (G. Forst.) Copel.	新西兰 New Zealand	Schneider et al., 2004	AY362570 [#]	AY362643 [#]
表面星蕨 <i>Microsorium superficiale</i> (Blume) Ching	云南西畴 Xichou, Yunnan, China	Lu SG/J18 (PYU)	AY725055 [#]	AY725048 [#]
<i>Microsorium varians</i> (Mett.) Hennisman & Hett.	新喀里多尼亚 New Caledonia	Schneider et al., 2004	AY362566 [#]	AY362638 [#]
显脉星蕨 <i>Microsorium zippelii</i> (Blume) Ching	印度尼西亚 Indonesia	Tsutsumi & Kato, 2006	AB232411 [#]	—
似薄唇蕨 <i>Paraleptochilus decurrens</i> (Blume) Copel.	云南西畴 Xichou, Yunnan, China	Lu SG/J16 (PYU)	EU363246	EU363259
似薄唇蕨 <i>Paraleptochilus decurrens</i> (Blume) Copel.	爪哇 Java	Schneider et al., 2004	AY096203 [#]	AY096228 [#]
光亮瘤蕨 <i>Phymatosorus cuspidatus</i> (D. Don) Pic. Serm.	云南广南 Guangnan, Yunnan, China	Lu SG/C51 (PYU)	AF470335 [#]	EU363262
阔鳞瘤蕨 <i>Phymatosorus hainanensis</i> (Noot.) S. G. Lu	海南五指山 Mt. Wuzhi, Hainan, China	Lu SG/V73 (PYU)	EU363249	EU363263
台湾水龙骨 <i>Polypodiodes formosana</i> (Baker) Ching	台湾 Taiwan, China	Schneider et al., 2004	AB043100 [#]	AY096224 [#]
日本水龙骨 <i>Polypodiodes niponica</i> (Mett.) Ching	日本 Japan	Schneider et al., 2004	AB043098 [#]	AY362626 [#]

1) 物种的名称根据《中国高等植物图鉴》、《中国植物志》、《贵州蕨类植物志》、《云南植物志》和《海南植物志》; #, 从基因库下载的序列。
1) Taxa names follow *Iconographia Cormophytorum Sinicorum, Flora Reipublicae Popularis Sinicae, Pteridophyte Flora of Guizhou, Flora Yunnanica, and Flora of Hainan*; #, sequences from GenBank.

2 结果和分析

2.1 *rbcL*、*rps4+rps4-trnS*序列单独分析的结果

新测定的18种植物的叶绿体*rbcL*基因和14种植物的*rps4+rps4-trnS*序列的GenBank收录号见表2。在对位排列矩阵中(包括从GenBank中下载的相关序列), *rbcL*序列总长度为1367 bp, 无插入或缺失, 其中可变位点222个(占序列总长度的16.24%), 信息位点129个(占序列长度的9.44%)。 *rps4+rps4-trnS*序列长度为1152 bp, 其中可变位点432个(占序列长度的37.5%), 信息位点265个(占序列长度的23%)。

利用MP和BI分析方法分别构建了线蕨属及其近缘类群的*rbcL*基因和*rps4+rps4-trnS*序列的系统发育树, 不同分析方法所获得的系统树在拓扑结构

上基本一致, 但在分支的自展支持率上存在差异。本文分别显示BI方法构建的*rbcL*和*rps4+rps4-trnS*系统树(用MP方法构建的系统树同BI系统树拓扑结构一致, 但是各个分支的自展支持率均较低; BI系统树见图1, MP系统树未在文中显示)。MP方法所获得系统树的树长(tree length)、一致性指数(consistency index, *CI*)、存留指数(retention index, *RI*)及存留一致性指数(retention consistency index, *RCI*)见表3。两种分析方法均显示: 所分析的线蕨属与薄唇蕨属和似薄唇蕨属组成一个支持率很高的单系类群(图1, C-L Clade), *rbcL*和*rps4+rps4-trnS*单独分析的贝叶斯后验概率均为100%; 似薄唇蕨属和薄唇蕨属的种类没有聚在一起, 而是分别落入线蕨属的不同支系内: 心叶薄唇蕨*Leptochilus cantoniensis*与宽叶线蕨*Colysis pothifolia*和长柄线蕨*Colysis longipes*聚在

表3 三个不同序列矩阵最大简约分析的统计参数
Table 3 Characteristics of the sequences and statistics of MP analysis

数据 Data set	序列长度 Length of sequence	最大简约树数目 No. of trees	树长度 Length of trees	一致性系数 <i>CI</i>	保留系数 <i>RI</i>	存留一致性系数 <i>RCI</i>
<i>rps4 + rps4-trnS</i>	1152	6	707	0.7337	0.7854	0.5762
<i>rbcL</i>	1367	20	380	0.6132	0.6957	0.4265
联合数据Combined data	2519	4	1063	0.6704	0.7129	0.4780

CI, Consistency Index; *RCI*, Rescaled Consistency Index; *RI*, Retention Index.

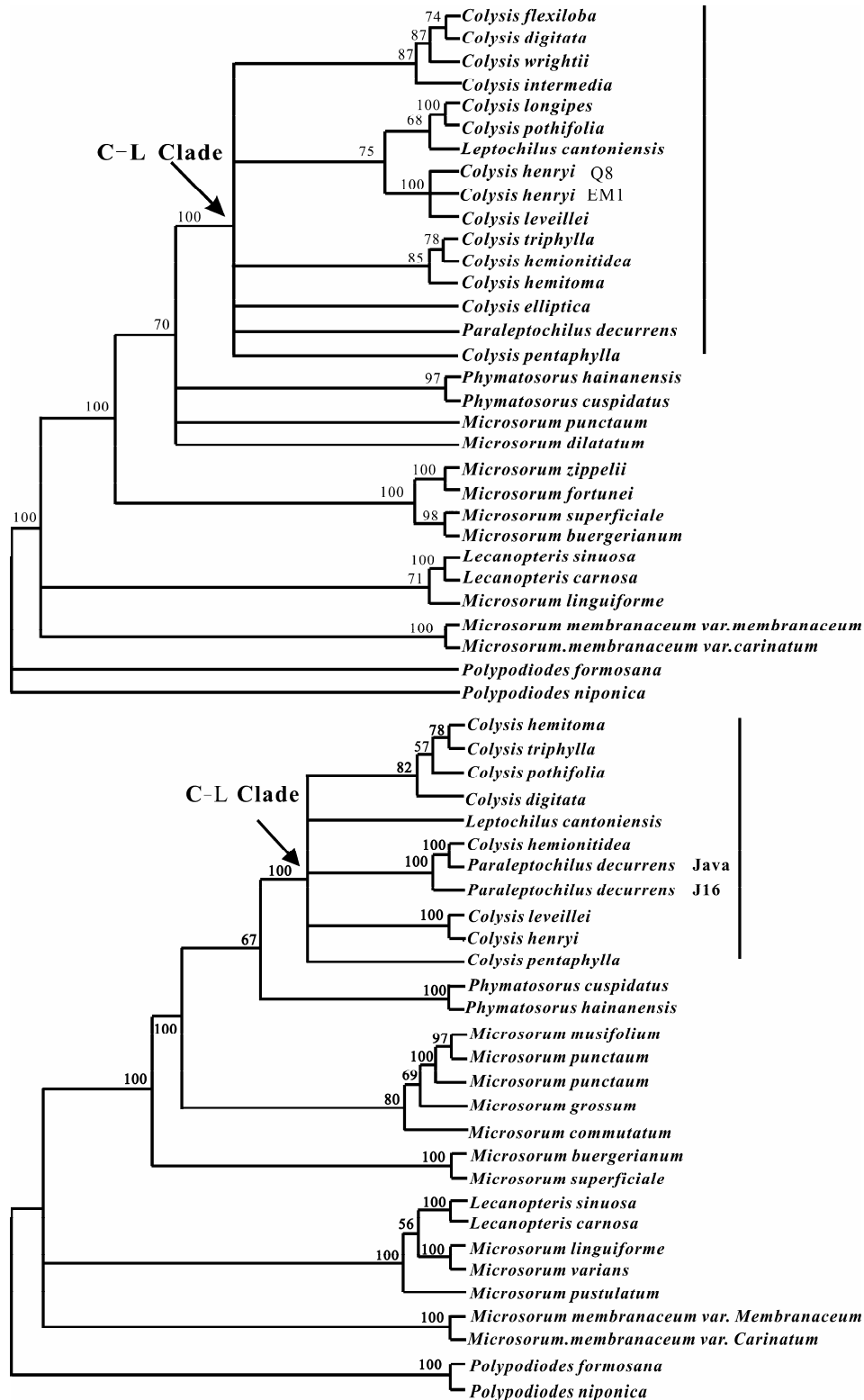


图1 用贝叶斯分析方法构建的线蕨属及其近缘类群的系统发育树 上: *rbcL*系统发育树; 下: *rps4+rps4-trnS*系统发育树; 分支上方为后验概率值($\times 100$)。

Fig. 1. Phylogenetic tree resulting from Bayesian analyses of the single *rbcL* (upper) and *rps4+rps4-trnS* (below) sequences of *Colysis* and its related taxa. The posterior probability values ($\times 100$) are shown above branches.

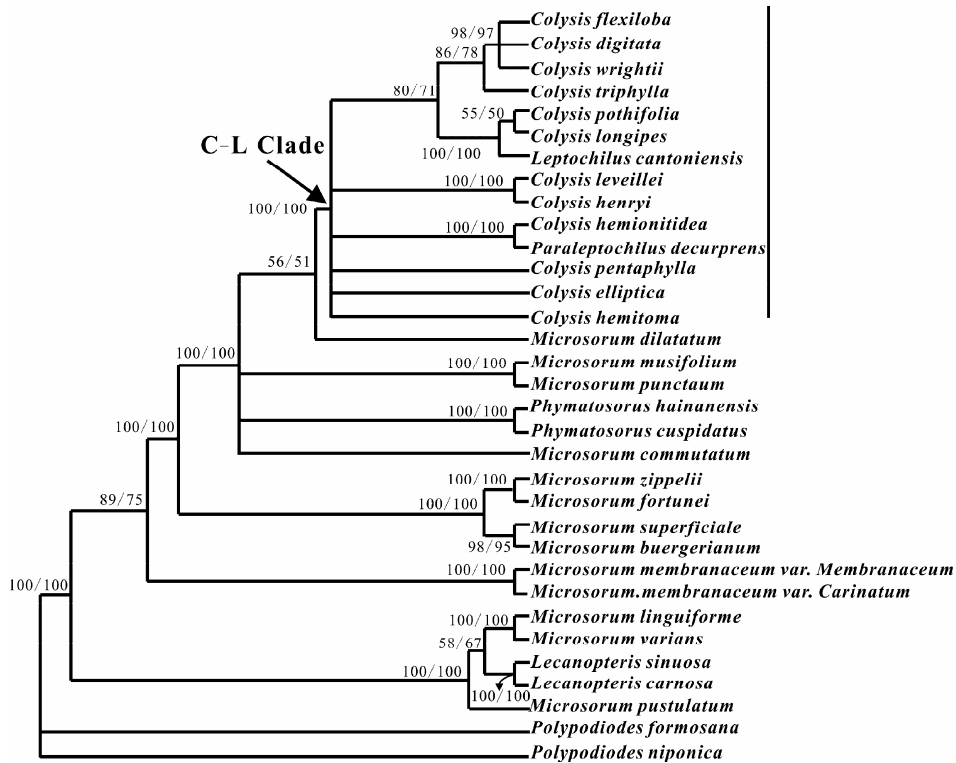


图2 用贝叶斯分析方法构建的线蕨属及其近缘类群的 $rbcL$ 和 $rps4+rps4-trnS$ 联合数据的系统树。节点处分别为贝叶斯分析的后验概率值($\times 100$)和最大简约法分析的抽样自展值。

Fig. 2. Phylogenetic tree resulting from Bayesian analyses for a combined analysis of the $rbcL$ and $rps4+rps4-trnS$ sequences of *Colysis* and its related taxa. The posterior probability values ($\times 100$) and maximum parsimony bootstrap support (BS) values are given at the nodes.

一起($rbcL$ 系统树), 而似薄唇蕨 *Paraleptochilus decurrens* 在 $rps4+rps4-trnS$ 系统树上与断线蕨 *Colysis hemionitidea* 聚在一起。 $rbcL$ 和 $rps4-trnS$ 两者的单独分析均显示星蕨属是一个多系发生的类群, 除部分种类(*Microsorium linguiforme*、*M. varians*和 *M. pustulatum*)与马来群岛的 *Lecanopteris* 聚在一起外, 其他类群分别位于不同的支系。瘤蕨属的两个种在系统发育树上单独形成一个分支。

2.2 序列联合分析的结果

对 $rbcL$ 基因和 $rps4+rps4-trnS$ 序列进行分划同质性检验(partition homogeneity test)的结果为 $P=1.00$ 。因此, 本文把 $rbcL$ 同 $rps4+rps4-trnS$ 两个数据进行联合, 分别进行MP和BI分析。

$rbcL$ 同 $rps4+rps4-trnS$ 联合后的序列总长度为 2519 bp, 其中可变位点 634 个(占序列长度的 25.17%), 信息位点 371 个(占序列长度的 14.73%)。用 MP 和 BI 方法构建的系统树在拓扑结构上基本一致,

但在自展支持率上存在差异(图2)。 $rbcL$ 和 $rps4+rps4-trnS$ 序列联合分析的结果同两个矩阵单独分析的结果一致, 即所分析的线蕨属、薄唇蕨属及似薄唇蕨属组成一个支持率很高的单系分支(图2, C-L Clade), 且薄唇蕨属和似薄唇蕨属分别位于线蕨属的不同支系内。星蕨属是一个多系类群, 除部分种类(*Microsorium linguiforme*、*M. varians*和 *M. pustulatum*)与马来群岛的 *Lecanopteris* 聚在一起外, 其他的类群分别位于不同的分支上。瘤蕨属的两个种构成一个独立的分支。在两个基因的联合分析中, 在线蕨属与薄唇蕨属和似薄唇蕨属组成的分支内可以识别出几个稳定的亚分支(贝叶斯后验概率高于95%): 绿叶线蕨 *C. leveillei* 与矩圆线蕨 *C. henryi*; 断线蕨 *C. hemionitidea* 与似薄唇蕨 *Paraleptochilus decurrens*; 长柄线蕨 *C. longipes*、宽叶线蕨 *C. pothifolia* 与心叶薄唇蕨 *Leptochilus cantoniensis*; 曲边线蕨 *C. flexiloba*、掌叶线蕨 *C. digitata* 与褐叶线蕨 *C. wrightii*。

3 讨论

3.1 线蕨属的系统地位

在秦仁昌分类系统(1978)中, 线蕨属与星蕨属、薄唇蕨属、似薄唇蕨属和树舌蕨属同属于水龙骨科中的星蕨亚科; 在《中国植物志》中, 线蕨属与星蕨属和薄唇蕨属(似薄唇蕨属被并入薄唇蕨属)也被置于水龙骨科中的星蕨亚科(林尤兴, 2000); Hettterscheid 和 Hennipman (1984) 和 Nooteboom (1997)认为线蕨属与薄唇蕨属、似薄唇蕨属和树舌蕨属属于同一类植物; 在Kramer和Green (1990)系统中似薄唇蕨属和树舌蕨属均被并入线蕨属。本文的分析结果显示线蕨属与薄唇蕨属、似薄唇蕨属的亲缘关系极为密切, 共同组成一个支持率很高的单系分支, 支持将线蕨属作为独立的分类群, 但其分类范畴应该扩展, 还应该包括秦仁昌(1978)分类系统中的薄唇蕨属和似薄唇蕨属。根据重新定义的概念, 线蕨属的名称和属的分类特征等均需做一系列的修订。关于线蕨属内各个种之间的亲缘关系, 一方面本文的分析不支持现有的分类处理(石雷, 张宪春, 1999; 林尤兴, 2000), 另一方面本文的分析结果亦不能分辨线蕨属内各个种之间的关系, 因此还需要运用更多的分子序列资料以及形态学和解剖学的资料(如叶脉类型、孢子形态及叶形等)进行综合分析。

3.2 线蕨属与薄唇蕨属的系统关系

本文的系统发育分析显示, 线蕨属、薄唇蕨属和似薄唇蕨属组成一个支持率很高的单系分支(图2, C-L Clade), 薄唇蕨属和似薄唇蕨均落入线蕨属内的不同支系。Hettterscheid和Hennipman (1984)和Nooteboom (1997)通过对叶脉类型和孢子囊群特征的观察研究, 均认为线蕨属和薄唇蕨属之间存在着过渡类型, 应作同属对待。Tryon和Lugardon (1991)利用扫描电镜研究了部分线蕨属和薄唇蕨属植物的孢子形态, 认为两属孢子表面均具刺, 支持了两属有亲缘关系的观点。线蕨属植物为同型叶, 孢子囊群线形, 与主脉斜交, 而薄唇蕨属和似薄唇蕨属植物为异型叶, 孢子囊群布满能育叶的下面。传统分类学上采用的叶型及孢子囊群等特征并不能将线蕨属、薄唇蕨属和似薄唇蕨属区别开来, 这些形态特征可能不应该作为分属的关键特征。本文的系统发育结果支持线蕨属与薄唇蕨属及似薄唇蕨属

植物应作同属对待, 这与叶脉类型、孢子形态及叶形等研究的结果相一致(Hettterscheid & Hennipman, 1984; Kramer & Green, 1990; Tryon & Lugardon, 1991; Nooteboom, 1997)。

3.3 线蕨属与星蕨属的系统关系

星蕨类植物的叶脉类型、孢子囊群特征和叶形(Hettterscheid & Hennipman, 1984; Hennipman et al., 1990)以及孢粉学(Tryon & Lugardon, 1991; 石雷, 张宪春, 1999)的研究均证实线蕨属与星蕨属的关系比较密切; Schneider等(2004)将线蕨属和薄唇蕨属或似薄唇蕨属均归并入星蕨属。本文的系统发育分析显示, 部分星蕨属植物为线蕨属和薄唇蕨属(含似薄唇蕨属)支系(C-L Clade)的近缘类群, 但是星蕨属本身是个非常异质的类群, 是多系起源的, 其中部分种类(如江南星蕨 *Microsorium fortunei* 和表面星蕨 *M. superficiale*)与瓦韦属 *Lepisorus* 关系比较密切, 已经被归到瓦韦类(Lepisoroid ferns, Schneider et al., 2004), 而瘤蕨属已经被并到星蕨属(Schneider et al., 2004); 线蕨属、薄唇蕨及拟薄唇蕨这一支系与星蕨属的系统演化关系还需要收集更多的资料(如在亚科水平)进行进一步的分析。

致谢 感谢美国University of Vermont的David S. Barrington教授修改英文摘要。本研究由国家自然科学基金项目(40302003, 30770164) 和国家重点基础研究发展计划项目(2003CB415103)资助。

参考文献

- Cheng X (成晓), Wu S-K (武素功), Lu S-G (陆树刚). 2005. Flora Yunnanica (云南植物志). Beijing: Science Press. 21: 275-403.
- Ching R-C (秦仁昌). 1933. Studies in Chinese ferns X. Bulletin of the Fan Memorial Institute of Biology, Botanical Series 4: 293-362.
- Ching R-C (秦仁昌), Wang C-H (王铸豪). 1959. Materials for the pteridophytic flora of Hainan. Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报) 8: 155-156.
- Ching R-C (秦仁昌). 1964. Flora of Hainan (海南植物志). Beijing: Science Press. 1: 1-206.
- Ching R-C (秦仁昌). 1972. Iconographia Cormophytorum Sinicorum (中国高等植物图鉴). Beijing: Science Press. 1: 250-270.
- Ching R-C (秦仁昌). 1978. The Chinese fern families and genera: systematic arrangement and historical origin. Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报) 16 (3): 1-19; 16 (4): 16-37.

- Copeland EB. 1947. Genera Filicum. Waltham: Chronia Botanica, Company.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11–15.
- Farris JS, Källersjö M, Kluge AG, Bult C. 1995. Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10: 315–319.
- Haufler CH, Grammer WA, Hennipman E, Ranker TA, Smith AR, Schneider H. 2003. Systematics of the ant-fern genus *Lecanopteris* (Polypodiaceae): Testing phylogenetic hypotheses with DNA sequences. *Systematic Botany* 28: 217–227.
- Hennipman E, Veldhoen P, Kramer KU. 1990. Polypodiaceae. In: Kramer KU, Green PS eds. The families and genera of vascular plants. Vol. 1. Pteridophytes and gymnosperms. Berlin: Springer-Verlag. 203–230.
- Hennequin S, Ebihara A, Ito M, Iwatsuki K, Dubuisson J-Y. 2003. Molecular systematics of the fern genus *Hymenophyllum* s.l. (Hymenophyllaceae) based on chloroplastic coding and noncoding regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27: 283–301.
- Hettterscheid WLA, Hennipman E. 1984. Venation patterns, characteristics and shape of the fronds of the microsoroid Polypodiaceae. *Botanische Jahrbücher für Systematik*, 105: 11–47.
- Kramer KU, Green PS. 1990. Vol. I. Pteridophytes and gymnosperms. In: Kubitzki K ed. The families and genera of vascular plants. Berlin: Springer-Verlag. 1–277.
- Li C-X, Lu S-G, Yang Q. 2004. Asian origin for *Polystichum* (Dryopteridaceae) based on *rbcL* sequences. *Chinese Science Bulletin* 49: 1146–1150.
- Lin Y-X (林允兴). 2000. Flora Reipublicae Popularis Sinicae (中国植物志). Beijing: Science Press. 6 (2): 7–31.
- Little DP, Barrington DS. 2003. Major evolutionary events in the origin and diversification of the fern genus *Polystichum* (Dryopteridaceae). *American Journal of Botany* 90: 508–514.
- Lu SG. 1998. A new combination of the genus *Phymatosorus* (Polypodiaceae). *Bulletin of National Museum of Natural Science* 11: 147–149.
- Nooteboom HP. 1997. The microsoroid ferns. *Blumea* 42: 261–395.
- Nylander JAA. 2004. MrModeltest 2.0. Program distributed by the author. Sweden: Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Presl CB. 1849. *Epimelieae Botanicae*. Prague.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.
- Schneider H, Smith AR, Cranfill R, Hildebrand TJ, Haufler CH, Ranker TA. 2004. Unraveling the phylogeny of polygrammoid ferns (Polypodiaceae and Grammitidaceae): exploring aspects of the diversification of epiphytic plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 1041–1063.
- Shi L (石雷), Zhang X-C (张宪春). 1999. Taxonomic studies of the genus *Colysis* C. Presl (Polypodiaceae) from China and neighboring regions. *Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报)* 37: 54–80.
- Shi S-H (施苏华), Zhang Q (章群), Chen Y-Q (陈月琴), Tang S-Q (唐绍清), Qu L-H (屈良鹤). 1996. A simple method for isolation of total RNA and DNA from silicagel-dried and fresh leaves of plants. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni (中山大学学报)* 35: 103–105.
- Swofford DL. 2002. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The CLUSTA_X windows interface: flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools. *Nuclear Acids Research* 24: 4876–4882.
- Tryon AF, Lugardon B. 1991. Spores of the Pteridophyta: Surface, wall structure, and diversity based on electron microscope studies. New York: Springer-Verlag.
- Tsutsumi C, Kato M. 2006. Evolution of epiphytes in Davalliaceae and related ferns. *Botanical Journal of the Linnean Society* 151: 495–510.
- Wang P-S (王培善), Wang X-Y (王筱英). 2001. Pteridophyte Flora of Guizhou (贵州蕨类植物志). Guiyang: Guizhou Science & Technology Publishing House. 1–727.
- Wu S-H (吴兆洪), Ching R-C (秦仁昌). 1991. Fern families and genera of China. Beijing: Science Press. 485–540.