

中国特有蕨属扇蕨属 (水龙骨科) 的系统学研究

杜新宇^{1,2}, 成 晓^{1*}

(1 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204; 2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 扇蕨属 (*Neocheiropteris*) 为中国蕨类植物 4 个特有属之一。自 Christ 建属以来, 不同的分类学者对本属的范畴以及系统位置一直存有争议。本研究对扇蕨属和盾蕨属进行了形态解剖观察, 并对扇蕨属及其近缘类群共 14 个种的 4 个叶绿体 DNA 片段: *rbcL*、*rpS4* & *rpS4-trnS* IGS、*trnL* intron & *trnL-trnF* IGS 以及 *atpB* & *atpB-rbcL* IGS 进行测序, 应用最大简约法 (Maximum-parsimony)、最大似然法 (Maximum-likelihood) 和贝叶斯推断 (Bayesian inference) 对序列进行联合矩阵分析, 并构建系统树。该研究从形态学和分子系统学方面都提出了支持扇蕨属和盾蕨属分立的证据。形态学研究显示扇蕨属和盾蕨属叶片分裂方式、叶被和侧脉特征迥异, 支持扇蕨属和盾蕨属的分立; 但两属根状茎鳞片的共同特征则反映了两属间的紧密联系。分子系统学研究表明扇蕨属与毛鳞蕨属和鳞果星蕨属构成姐妹群, 其集合与盾蕨属构成姐妹群。综合形态学和分子系统学的证据, 对扇蕨属的系统位置以及范畴进行了深入探讨, 扇蕨属包括扇蕨和三出扇蕨, 结合形态学和分子系统学证据对三出扇蕨的系统位置进行了初步探讨。

关键词: 扇蕨属; 系统学; 形态解剖; 叶绿体 DNA 序列

中图分类号: Q 949.36

文献标识码: A

文章编号: 2095-0845(2011)03-261-08

Phylogeny of the Chinese Endemic Fern Genus
Neocheiropteris (Polypodiaceae)DU Xin-Yu^{1,2}, CHENG Xiao^{1*}

(1 Botanical Garden, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Science, Kunming 650204, China;

2 Graduate University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China)

Abstract: *Neocheiropteris* is one of the four Chinese endemic fern genera. The taxonomic circumscription and systematic position of *Neocheiropteris* have always been argued among taxonomists since its establishment by Christ in 1905. The anatomical examination of *Neocheiropteris* and *Neolepisorus* is performed, and four chloroplast DNA markers: *rbcL*, *rpS4* & *rpS4-trnS* IGS, *trnL* intron & *trnL-trnF* IGS and *atpB* & *atpB-rbcL* IGS for *Neocheiropteris* and its closely related taxa, totally 14 taxa are sequenced. Phylogenetic trees are constructed with the Maximum-parsimony, Maximum-likelihood and Bayesian inference method based on coded dataset/non-coded dataset/combined dataset. The division of *Neocheiropteris* and *Neolepisorus* is supported by both anatomical and molecular phylogeny evidence. Anatomical research provides support for the division of the two genera by their totally different characters of the division back and vein of frond, and for the close connection of the two genera by their common characters of rhizome scale. Molecular phylogeny research shows that: *Neocheiropteris* is sister to a clade that includes *Tricholepidium* and *Lepidomicrosorium*, and *Neolepisorus* is sister to the combination of above-mentioned three genera. The taxonomic circumscription and systematic position of *Neocheiropteris* are investigated by integrating anatomical characters and molecular phylogenetic results, only *Neocheiropteris palmatopedata* and *N. triglossa* should be treated as members of *Neo-*

* 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: xcheng@mail.kib.ac.cn

收稿日期: 2010-10-27, 2011-02-28 接受发表

作者简介: 杜新宇 (1986-) 男, 在读硕士研究生, 主要从事蕨类植物系统发育和居群遗传多样性研究。

cheiropteris. The systematic position of *N. triglossa* is investigated based on molecular together with anatomical evidence for the first time.

Key words: *Neocheiropteris*; Phylogeny; Anatomy; Chloroplast DNA sequences

扇蕨属 (*Neocheiropteris* Christ) 隶属于水龙骨科瓦韦亚科 (*Polypodiaceae* Subfam. *Lepisorioideae* Ching), 为中国蕨类植物 4 个特有属之一, 仅分布于我国云南、四川和贵州三省。目前本属中得到广泛承认的种只有扇蕨 (*Neocheiropteris palmatopedata* (Bak.) Christ) 和三出扇蕨 (*Neocheiropteris triglossa* (Bak.) Ching), 这两个种最初都由 Henry Augustine 于 1898 年在云南弥勒采得, 随后都被 Baker 置于 *Polypodium* L.。Christ (1905) 根据扇蕨独特的鸟足状扇形深裂叶片建立了一个新属——*Neocheiropteris* Christ (广义盾蕨属), 模式种即为扇蕨。Christ 认为本属介于 *Dipteris* Reinw. 和 *Pleopeltis* Humb. & Bonpl. ex Willd. 之间, 与两者的主要区别在于其叶片分裂方式为独特的鸟足状分裂 (peculiarly pedatifid frond) 或 Brower 所描述的向下螺旋系统 (katadromic helicoids system) (Ching, 1933)。由于孢子囊群具有隔丝, 秦仁昌将扇蕨属归入瓦韦亚科。

Ching (1933) 认为, 水龙骨科的单叶类群由于叶片形状尤其是裂片数极易受环境影响, 变异幅度大, 因而不能将叶形作为划分属的主要依据, 单叶种 (comparatively simple-leaved species) 和深裂叶种 (more divided-leaved species) 之间具有非常紧密的亲缘关系。基于此观点, Ching (1933) 将三出扇蕨, 宽带蕨 (*Platygyria waltonii* (Ching) Ching & S. K. Wu), 剑叶盾蕨 (*Neolepisorus ensatus* (Thunb.) Ching), 中华盾蕨 (*N. sinensis* Ching), 盾蕨 (*N. ovatus* (Bedd.) Ching) 及其两个变型三角叶盾蕨 (*N. ovatus* f. *deltoideus* (Bak.) Ching) 和蟹爪盾蕨 (*N. ovatus* f. *doryopteris* (Christ) Ching) 都归入了 *Neocheiropteris* (广义盾蕨属)。这样就极大地扩展了广义盾蕨属的范围。

随后, Ching (1940) 又将 *Neocheiropteris* Christ (广义盾蕨属) 划分为两个属: *Neocheiropteris* Christ (扇蕨属) 和 *Neolepisorus* Ching (盾蕨属或狭义盾蕨属), 前者仅包括扇蕨和三出扇蕨。

但是这种处理在国际上并未得到广泛认同, 许多国外学者至今仍沿用 Ching (1933) 的 *Neocheiropteris* (广义盾蕨属) 的概念, 并将其它一些近缘种也归入本属。例如, Tagawa (1952) 把毛鳞蕨 (*Tricholepidium normale* (D. Don) Ching) 和鳞果星蕨 (*Lepidomicrosorium buergerianum* (Miq.) Ching & Shing) 归入本属; Bosman (1991) 将表面星蕨 (*Microsorium superficiale* (Blume) Ching) 和显脉星蕨 (*M. zippellii* (Blume) Ching) 置于本属。在中国植物志 (林尤兴等, 2000) 中, 宽带蕨也被列入扇蕨属下, 处理为戟形扇蕨 (*Neocheiropteris waltonii* Ching)。这种对 *Neocheiropteris* (扇蕨属或广义盾蕨属) 的概念性分歧无疑在国际交流中造成很大的混乱。

目前, DNA 测序以及分子标记等分子生物学技术在蕨类植物系统学研究中被广泛应用 (Hasebe 等, 1995; Schneider 等, 2004; Korall 等, 2006; Schuettpelz 和 Pryer, 2007)。目前在蕨类分子系统学研究中应用的基因片段主要来自叶绿体基因组 (刘红梅等, 2009)。近年来, 基于叶绿体 DNA 片段的分子系统学研究为水龙骨科单叶类群的系统学研究提供了很多新的证据, 主要有 Kreier 等 (2008) 基于 *rbcL*、*rpS4* & *rpS4-trnS* IGS (以下简称为 *rpS4*)、*trnL-trnF* IGS 三个叶绿体 DNA 片段对星蕨类的系统学研究, Wang 等 (2010a) 基于 *rbcL*、*rpS4*、*trnL* intron & *trnL-trnF* IGS (以下简称为 *trnL-F*) 以及 *atpB* & *atpB-rbcL* IGS (以下简称为 *atpB-rbcL*) 4 个叶绿体 DNA 片段对瓦韦属 (*Lepisorus* (J. Sm.) Ching) 的系统学研究, 以及 Wang 等 (2010b) 基于 *rbcL*、*rpS4*、*trnL-F* 以及 *atpB-rbcL* 4 个叶绿体 DNA 片段对瓦韦族 (Tribe *Lepisorioideae*) 的系统学研究。研究的结果表明: 瓦韦类作为一个单系类群位于复系的星蕨类中, 所有瓦韦类形成支持率很高的一支, *Lepisorus longifolia* (Blume) Holtt. 与所有其它瓦韦类构成姐妹群, 其余的瓦韦类形成两个主要支系。一支包括瓦韦属以及位于其分支内部的丝带蕨属 (*Drymotaenium* Maki-

no)、尖嘴蕨属 (*Belvisia* Mirb.) 和宽带蕨属 (*Platygyria* Ching & S. K. Wu); 另一支包含伏石蕨属 (*Lemmaphyllum* Presl)、骨牌蕨属 (*Lepidogrammitis* Ching)、毛鳞蕨属 (*Tricholepidium* Ching)、鳞果星蕨属 (*Lepidomicrosorium* Ching & K. H. Shing)、扇蕨属、盾蕨属以及星蕨属 (*Microsorium* Link) 的几个种,但是在伏石蕨属等这一支内部,随着取样范围、选用 DNA 片段、以及建树方法的不同,所得各类群之间的系统发育关系常会互相冲突,且主要分支支持率较低。

综上所述,前人基于形态学证据对 *Neocheiropteris* 的范围界定存在概念性分歧,虽然很多分子系统学研究都涉及扇蕨,部分研究也支持扇蕨属和盾蕨属的分立,但是这些研究对扇蕨属及其近缘类群的取样不足,且所得系统树多有冲突,无法清晰地反映 *Neocheiropteris* 的范围以及与其近缘类群的亲缘关系,所以有必要对这些问题进行更深入的研究。本研究希望通过更具针对性的类群取样,对选取类群进行形态解剖观察,并以 4 个叶绿体 DNA 片段: *rbcL*、*rpS4*、*trnL-F* 和 *atpB-rbcL*, 进行分子系统发育树的构建。综合形态学和分子系统学证据探究扇蕨属和盾蕨属是否应该分立,如果两属可以分立,则进一步确定扇蕨属的系统位置及其成员范畴。

1 材料与方法

1.1 形态解剖实验

类群选择及实验材料的获得: 扇蕨取自昆明植物园引种栽培的植株,三出扇蕨取自云南大学标本馆蕨类植物标本室 (PYU) 保存的标本,剑叶盾蕨和盾蕨等盾蕨属的种及其变型取自昆明植物所标本馆 (KUN) 的标本。对实验材料进行形态学观察,并对扇蕨、三出扇蕨和盾蕨的根状茎鳞片进行解剖镜和光学显微镜观察照相。

1.2 分子系统学类群取样

类群取样依据前人 (林尤兴等, 2000; Kreier 等, 2008; Wang, 2010a, b) 对水龙骨科尤其是瓦韦亚科的系统学研究,并且参考 *Neocheiropteris* (广义盾蕨属) 的概念。拟选取瓦韦亚科的扇蕨属、盾蕨属、瓦韦属、毛鳞蕨属、鳞果星蕨属和伏石蕨属 6 属共 11 种,以及星蕨亚科 (Subfam. *Microsorioideae* Nayar) 与扇蕨属亲缘关系紧密的表面星蕨和显脉星蕨 2 种作为内类群; 选取星蕨亚科的矩圆线蕨 (*Colysis henryi* (Bak.) Ching)、似薄唇

蕨 (*Leptochilus decurrens* Blume) 和隐子蕨亚科 (Subfam. *Crypsinoideae* Nayar) 的光亮瘤蕨 (*Phymatosorus cuspidatus* (D. Don) Pic. Serm.) 3 个种作为外类群。实验材料除三出扇蕨取自云南大学标本馆标本外,其余全部为硅胶快速干燥的新鲜叶片,凭证标本保存于中科院昆明植物所标本馆 (KUN), 详细信息见表 1。

1.3 DNA 提取, PCR 扩增以及测序

基因组 DNA 提取采用改良的 CTAB 法 (Doyle 和 Doyle, 1987)。PCR 扩增所用引物: *rbcL* 片段为 esR-BCL1F 和 esRBCL1361R (Schuettpeitz 和 Pryer, 2007); *rpS4* 片段为 RPS5F (Nadot 等, 1995) 和 *trnSR* (Smith 和 Cranfill, 2002); *trnL-F* 片段为 *fern1-F* (Trewick 等, 2002) 和 F-R (Tarberlet 等, 1991); *atpB-rbcL* 片段为 *rbcL49R* (Wolf, 1997) 和 *atpB609R* (Pryer 等, 2004)。扩增引物同时作为测序引物。

扩增反应在 BIO-RAD iCycler Thermal Cycler PCR 仪上进行。反应体积为 50 μ L, 反应体系成分为: 1 $\times$ buffer, 1.5 mmol $\cdot$ L⁻¹ MgCl₂, 0.2 mmol $\cdot$ L⁻¹ dNTPs, 0.4 μ mol $\cdot$ L⁻¹ 引物, 1.5 U *Taq* DNA 聚合酶, PCR 扩增均采用热启动法。*rbcL* 片段扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 45s, 57.5 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 36 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。*rpS4* 片段扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 45s, 54 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 36 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。*atpB-rbcL* 片段扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 45s, 56.5 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 36 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。*trnL-F* 片段扩增采用降落 PCR (touch down PCR), 扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30s, 65 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环, 每个循环降低 0.5 $^{\circ}$ C; 95 $^{\circ}$ C 30s, 50 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 20 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测合格后用于测序。测序反应在 ABI-PRISM3730 自动测序仪上完成, 以扩增引物作为测序引物进行双向测序。序列编辑和拼接采用 Lasergene v1.7 软件包中的 Seqman (DNASTAR Inc., Madison, Wisconsin, USA) 软件完成。本研究中新测的 DNA 序列已上传至 GenBank, 序列号见表 1。

1.4 系统发育分析

应用 Clustal X (Thompson 等, 1997) 对 4 个 DNA 片段的序列集进行序列比对, 并进一步进行手工调整。调整好的 DNA 序列矩阵进行 4 个片段 (*rbcL*、*rpS4*、*trnL-F* 和 *atpB-rbcL*) 的单独分析, 并将其整合为编码区 (*rbcL+rpS4+atpB*) 和非编码区 (*rpS4-trnS* IGS+*trnL-F+atpB-rbcL* IGS) 两个独立序列矩阵以及 4 个 DNA 片段的联合序列矩阵, 分别进行系统发育树的构建。

应用 PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002) 进行最大简约性分析 (Maximum parsimony MP) 和最大似然性分析 (Maximum likelihood ML), 应用 MrBayes ver. 3.1.2

(Ronquist 和 Huelsenbeck, 2003) 进行贝叶斯推断分析 (Bayesian inference BI)。在进行 ML 和 BI 分析之前, 先用 Modeltest 3.7 (Posada 和 Crandall, 1998) 对序列矩阵进行模型选择, 在 Akaike Information Criterion (AIC) 标准下获得最适核苷酸替代模型分别为 GTR+I、GTR+I 和 TVM+G, 以及相关参数估值。MP 分析参数设置为: 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, MUL-PARES 和 ACCTRAN 优化, 所有碱基位点不进行加权处理, 空位 (Gap) 作为缺失 (Missing) 处理。采用自展分析 (Bootstrap analysis), 1000 次抽样, 根据抽样自展

值评估系统树各分支的自展支持率 (Bootstrap value BS)。ML 分析的参数设置为: 根据 Modeltest 3.7 的模型选择结果进行相关参数的设置, 其它选项按照软件默认设置。1000 次自展重复 (Bootstrap replicates), 计算自展支持率。BI 分析的参数设置为: 采用 MCMCMC (Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo) 算法, 根据 Modeltest 3.7 的模型选择结果进行相关参数的设置。以随机树为起始树, 运行 2000000 代, 每 100 代取样 1 次, 开始的 10000 个样本作为老化样本 (Burn-in samples) 舍弃, 以剩余样本构建一致树并计算各分支的后验概率 (Posterior probability value, PP)。

表 1 样品名称、凭证标本、采集地及 GenBank 序列号

Table 1 Taxa, vouchers, collecting localities, and GenBank accession numbers for sequences included in the phylogenetic analyses

分类群 Taxon	凭证标本或来源 Vouchers or source	采集地 Locality	GenBank 序列号 Accession No.			
			<i>rbcL</i>	<i>rpS4</i>	<i>trnL-F</i>	<i>atpB-rbcL</i>
<i>Neocheiropteris palmatop-edata</i> (Bak.) Christ	X. Y. Du 0961	云南澄江 Chengjiang, Yunnan, China	HQ597009	GQ256396#	HQ597018	HQ597023
<i>Neocheiropteris triglossa</i> (Bak.) Ching	W. M. Zhu 57112	云南禄丰 Lufeng, Yunnan, China	HQ597010	\	HQ597019	HQ597024
<i>Microsorium zippelii</i> (Blume) Ching	X. Y. Du 1001	昆明植物园 Kunming Botanical Garden, Yunnan, China (Cult.)	AB232411#	DQ642203#	HQ597017	\
<i>Neolepisorus ovatus</i> (Bedd.) Ching	X. Y. Du 0936	云南永仁 Yongren, Yunnan, China	HQ597011	EU483023#	HQ597020	HQ597028
<i>Phymatosorus cuspidatus</i> (D. Don) Pic. Serm.	X. Y. Du 1002	昆明植物园 Kunming Botanical Garden, Yunnan, China (Cult.)	AF470335#	HQ597015	HQ597021	HQ597026
<i>Leptochilus decurrens</i> Blume	X. Y. Du 1003	昆明植物园 Kunming Botanical Garden, Yunnan, China (Cult.)	AY096203#	AY096228#	HQ597016	HQ597027
<i>Tricholepidium normale</i> (D. Don) Ching	X. Y. Du 1004	昆明植物园 Kunming Botanical Garden, Yunnan, China (Cult.)	HQ597012	HQ597013	HQ597022	HQ597025
<i>Lepidomicrosorium buergerianum</i> (Miq.) C&S	X. Y. Du 1005	昆明植物园 Kunming Botanical Garden, Yunnan, China (Cult.)	GQ256315#	HQ597014	GQ256242#	GQ256156#
<i>Neolepisorus ensatus</i> (Thunb.) Ching	L. Wang et al. (2010a)		GQ256319#	GQ256397#	GQ256247#	GQ256161#
<i>Lepidomicrosorium subhemionitideum</i> (H. Christ) P. S. Wang	L. Wang et al. (2010a)		GU126693#	GU126712#	GU126723#	GU126701#
<i>Lepisorus macrosphaerus</i> (Bak.) Ching	L. Wang et al. (2010a)		GQ256280#	GQ256354#	GQ256203#	GQ256116#
<i>Lepisorus bicolor</i> Ching	L. Wang et al. (2010b)		GQ256261#	GQ256334#	GQ256179#	GQ256092#
<i>Microsorium superficiale</i> (Blume) Ching	L. Wang et al. (2010a)		EU482971#	GU126719#	GU126730#	GU126708#
<i>Colysis henryi</i> (Bak.) Ching	L. Wang et al. (2010a)		GQ256254#	GQ256326#	GU126732#	GU126709#

“\” 未获得数据 “#” 从 GenBank 下载的序列。

“\” Data not available for this taxon “#” Sequences downloaded from GenBank

2 结果

扇蕨的叶片发育过程如图 1 所示, 三出扇蕨叶片为三出状深裂; 盾蕨属植物多为单叶, 一些变型如三角叶盾蕨、蟹爪盾蕨、畸裂盾蕨 (*Neolepisorus ovatus* f. *monstrosus* Ching et Shing) 以及撕裂盾蕨 (*N. truncates* f. *laciatus* Ching et Shing) 等的叶片呈一回至多回羽状畸裂。扇蕨和三出扇蕨叶片背覆疏鳞, 裂片侧脉不显; 而盾蕨属成员则通常叶背光滑, 侧脉突出。通过对扇蕨、三出扇蕨和盾蕨根状茎鳞片的解剖镜和光学显微镜观察, 发现 3 个种的根状茎鳞片的网眼结构、颜色和边缘特征相同, 且都在鳞片着生部位的背面环生细长的单细胞

胞柔毛, 图 2 显示扇蕨的根状茎鳞片形态。

本研究中测得扇蕨属及其近缘类群 8 个种 4 个叶绿体 DNA 片段: *rbcL*、*rpS4*、*trnL-F* 和 *atpB-rbcL* 的部分序列, 三出扇蕨的 *rpS4* 片段和显脉星蕨的 *atpB-rbcL* 片段未能在实验中获得。将自己测得的 DNA 序列和从 Genbank 下载的 DNA 序列进行处理和比对, 整合出编码区、非编码区和联合序列 3 个 DNA 序列矩阵。统计数据显示 (表 2): 联合序列总排列长度为 4 346 bp, 总的变异位点数目为 649 (14.9%), 其中简约性信息位点数目为 368 (8.4%), 提供了比较充足的变异信息。

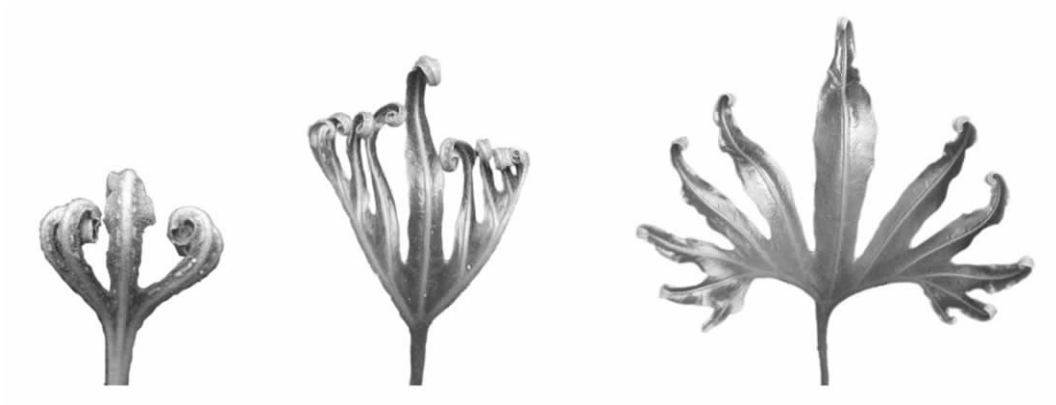


图 1 扇蕨叶片发育过程

Fig. 1 Development process of the fronds of *Neocheiropteris palmatopedata*

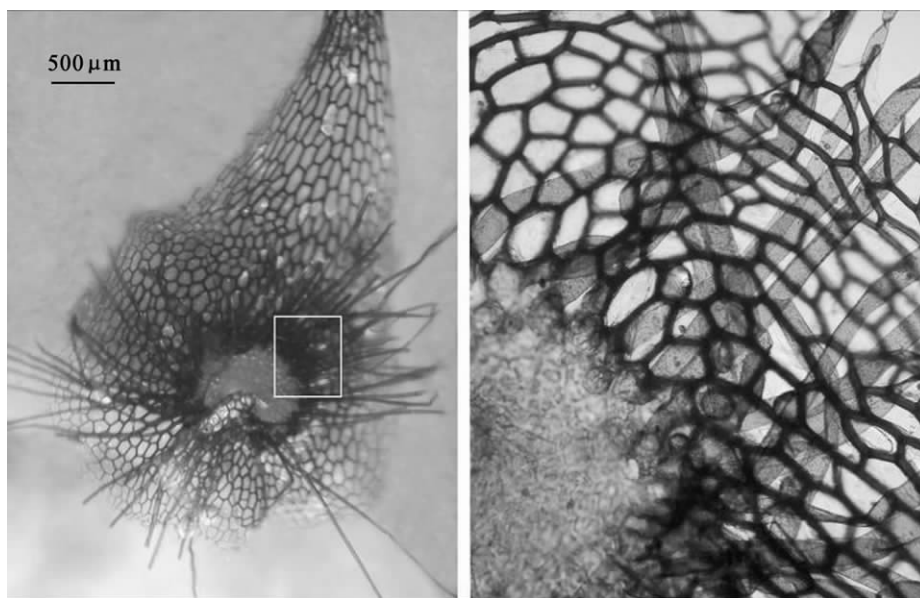


图 2 扇蕨根状茎鳞片: 鳞片着生部位的背面环生细长的单细胞柔毛

Fig. 2 Rhizome scale of *Neocheiropteris palmatopedata*: long unicellular hairs circling the back of the occurrence part of the scale

表 2 三个 DNA 序列矩阵的统计数据
Table 2 Statistical data of three matrixes of DNA sequences

数据集 Data set	排列长度 Aligned length	简约位点数目 Parsimony-informative sites (%)	变异位点数目 Variable sites (%)	插入/缺失 Indels
编码区 Coding region	2413	120(5. 0)	239(9. 9)	0
非编码区 Noncoding region	1933	248(12. 8)	410(21. 2)	112
联合数据 Combined data	4346	368(8. 4)	649(14. 9)	112

对 3 个整合的 DNA 序列集分别以最大简约性 (MP)、最大似然性 (ML) 以及贝叶斯推断 (BI) 3 种方法进行系统发育分析的结果表明, 3 个序列集采用不同方法构建的系统树都是唯一的, 且所有 9 棵系统树的拓扑结构完全一致, 仅在分支的自展支持率或后验概率上略有差异, 但各分支支持率均较高。联合序列分析的结果显示 (图 3):

1) 瓦韦属 (Clade I) 与所有其余内类群 (Clade II) 构成支持率极高的姐妹群, 其 MP 分析和 ML 分析的自展支持率 (MP-BS/ML-BS) 以及 BI 分析后验概率值 (BI-PP) 分别为: MP-

BS=100, ML-BS=100, BI-PP=1.0。
2) Clade II 由 A、B 和 C 三个分支构成, 分支 A 和分支 B 构成支持率很高的姐妹群 (MP-BS=98, ML-BS=98, BI-PP=1.0); 分支 A、B 再向外与分支 C 构成支持率很高的姐妹群 (MP-BS=99, ML-BS=100, BI-PP=1.0)。
3) 分支 A: 成员比较复杂, 包含 *Tricholepidium normale*、*Lepidomicrosorium buergerianum* 和 *L. subhemionitideum*, *Microsorium superficiale* 也嵌入其中; 分支 B: 仅包含 *Neocheiropteris palmatopodata* 和 *N. triglossa*; 分支 C: 包含 *Neolepisorus ovatus* 和 *N. ensatus*, *Microsorium zippellii* 嵌入其中。

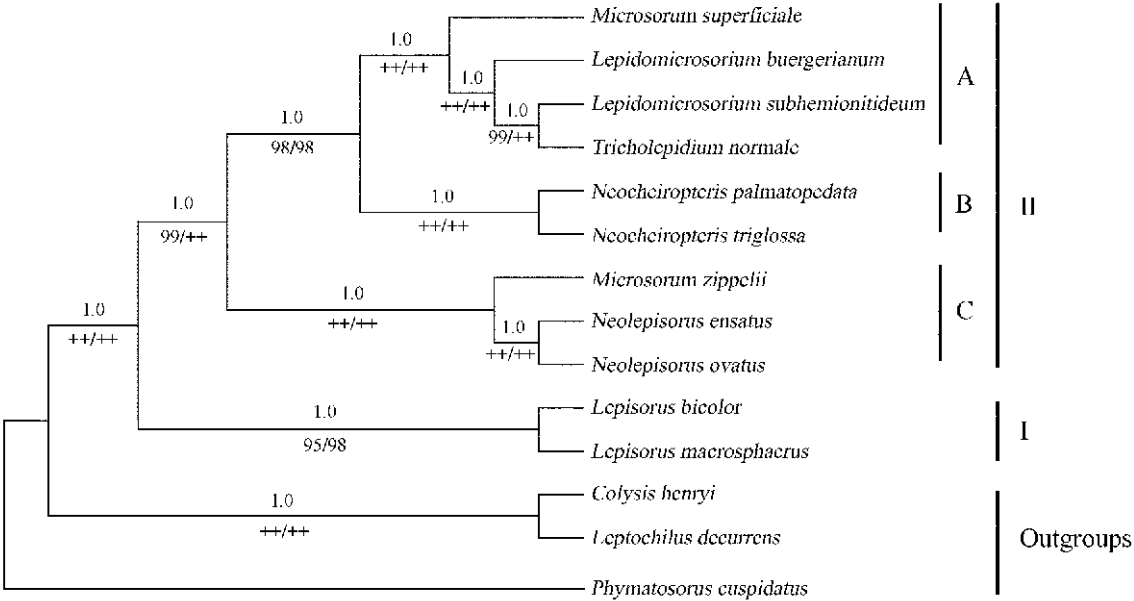


图 3 联合序列分析所得系统树
分支上方所显示数值为 BI 分析后验概率值 (BI-PP), 分支下方所显示数值分别为 MP 分析 (树长=793, CI=0.8222, RI=0.8147, RC=0.6699) 和 ML 分析 (-Ln likelihood=10449.40499) 的自展支持率 (MP-BS/ML-BS), ++ 代表自展支持率为 100%
Fig. 3 Phylogenetic tree resulting from analysis of combined matrix of sequences
Support values are given as posterior probability values of BI analysis (BI-PP) above branches, while bootstrap values (++ corresponds to 100%) of MP analysis (Tree length = 793, CI=0.8222, RI=0.8147, RC=0.6699) and ML analysis (-Ln likelihood=10449.40499) below branches (MP-BS/ML-BS)

3 讨论

本研究最初建树分析时包含伏石蕨属两个种 (伏石蕨 *Lemmaphyllum microphyllum* Presl 和肉质伏石蕨 *L. carnosum* (Wall.) Presl), 但是对 *rbcL*、*rpS4*、*trnL-F* 和 *atpB-rbcL* 这 4 个 DNA 片段的独立序列矩阵, 以及组合成的编码区、非编码区和联合数据矩阵, 共 7 个序列矩阵分别构建 MP、ML 和 BI 树时发现: 与 Kreier 等 (2008) 和 Wang 等 (2010b) 等的结果相似, 伏石蕨属、毛鳞蕨属、鳞果星蕨属、扇蕨属、盾蕨属聚在一大枝, 但是在这一支内部, 随着 DNA 序列矩阵以及建树方法的不同, 所得到的各类群之间的系统发育关系互相冲突, 出现主要分支没有得到支持或支持率很低的情况。形态解剖特征显示伏石蕨属与其它 4 属的亲缘关系稍远, 相当于这 4 属的外类群, 并非本研究的关键类群, 所以尝试将伏石蕨属去掉。去掉伏石蕨属之后, 树形变得非常稳定, 各主要分支也获得很高的支持率 (图 3), 所以在结果分析中去掉了伏石蕨属。

本研究对扇蕨属和盾蕨属的形态解剖观察为两者的关系提供了新的证据。Christ 1905 年建立 *Neocheiropteris* (广义盾蕨属) 主要基于扇蕨叶片独特的鸟足状扇形深裂, 其余广义盾蕨属成员则为单叶或呈各种畸裂。因此, 对 *Neocheiropteris* (扇蕨属或广义盾蕨属) 概念或范围的分歧主要集中在如何评价叶片分裂形态对于划分属的重要性。扇蕨叶片分裂形态虽然非常独特, 但是从图 1 所示的叶片发育过程来看, 扇蕨和三出扇蕨同属三出脉型, 不同之处在于前者在三出深裂的基础上, 两侧裂片又在内侧发生一次分裂; 虽然盾蕨属一些变型如三角叶盾蕨、蟹爪盾蕨、畸裂盾蕨以及撕裂盾蕨等的叶片也呈各种深裂, 但都为一回至多回羽状畸裂, 与扇蕨和三出扇蕨的叶片分裂方式有显著不同。此外, 两属叶被和侧脉特征迥异, 这些形态特征都支持扇蕨属和盾蕨属的分立。另一方面, 根状茎鳞片的共同特征则反映了两属间的紧密联系。本研究首次对扇蕨和三出扇蕨的根状茎鳞片着生部位的背面环生细长的单细胞柔毛这一独特性状进行报道, 这一性状之前只在盾蕨属植物中有类似记载。

系统分析结果显示: 扇蕨属 (分支 B) 与毛鳞蕨属和鳞果星蕨属 (分支 A) 为姐妹群,

其集合 (分支 A+分支 B) 与盾蕨属 (分支 C) 构成姐妹群 (图 3)。所有分析得到一致的拓扑结构和高的支持率也说明了这种系统发育关系的稳定性和可靠性。这一结果支持 Ching (1940) 将 *Neocheiropteris* (广义盾蕨属) 划分为 *Neocheiropteris* (扇蕨属) 和 *Neolepisorus* (盾蕨属) 的处理, 扇蕨属成员仅包括扇蕨和三出扇蕨。显脉星蕨嵌入盾蕨属分支, 部分支持了 Bosman (1991) 将其置入 *Neocheiropteris* (广义盾蕨属) 的观点, 该种更应归于盾蕨属。

三出扇蕨极为罕见, 只在云南弥勒和禄丰有过采集记录, 作者在云南弥勒、禄丰以及滇中其它地区的多次调查中都没有发现三出扇蕨的分布, 怀疑该种在野外已经灭绝。正是由于其罕见性, 前人对该种的研究非常少, 主要是一些形态描述。本研究首次应用叶绿体 DNA 序列结合形态特征对该种的系统地位进行探讨。实验测得三出扇蕨和扇蕨的三个叶绿体 DNA 片段 *rbcL*、*atpB-rbcL* 和 *trnL-F* 完全一致; 该种仅有的两个采集地都在扇蕨的分布范围之内。相对于扇蕨, 该种株型纤弱, 孢子囊群较小, Ching (1933) 将其归入 *Neocheiropteris* (广义盾蕨属) 时也曾指出: 该种除了叶片分裂程度上的微小差异, 基本上符合本属所有重要的形态特征。综合以上证据, 该种是否为扇蕨在某一历史时期的特殊环境下产生的突变种或扇蕨与盾蕨属的杂交种, 由于其自身或环境因素, 未能在自然界生存繁衍而逐渐灭绝, 仍值得深入研究。由于未能在野外采集到该种, 标本馆也仅保存有少量标本, 因而对该种开展进一步研究比较困难。

不同的分类学者对鳞果星蕨属的处理争议很大, 由于本群植物形态多变, 难以鉴别, 有的分类学者主张将本属归并为一个或少数几个种 (石雷和张宪春, 1999; 林尤兴等, 2000)。本研究的系统分系结果显示, 毛鳞蕨位于鳞果星蕨属分支内部, 表面星蕨也位于该分支 (图 3), 说明这一群植物的亲缘关系非常密切。这群植物的共有特征为孢子囊群较小, 散生; 叶片多为披针形, 纸质, 侧脉不显; 具攀援习性。由于本研究取样有限, 鳞果星蕨属和毛鳞蕨属的关系需要进一步的研究来确定。

本研究结合形态学与分子系统学证据对扇蕨

属的系统学问题进行了探讨,从两方面都提出了支持扇蕨属和盾蕨属分立的证据,阐明了扇蕨属的系统位置及其范畴,并首次结合形态和分子证据对三出扇蕨的系统地位进行了探讨。

致谢 云南大学朱维明教授在标本查阅以及实验材料和文献资料的提供上给予的帮助!

(参 考 文 献)

- 林尤兴,张宪春,陆树刚等,2000. 中国植物志(第6卷第2分册) [M]. 北京: 科学出版社
- Bosman MTM, 1991. A monograph of the fern genus *Microsorium* (Polypodiaceae) [J]. *Leiden Botanical Series*, **14**: 1—161
- Ching RC, 1933. The studies of Chinese ferns IX [J]. *Bulletin of the Fan Memorial Institute of Biology*, **4** (3): 103—107
- Ching RC, 1940. The studies of Chinese ferns XXX [J]. *Bulletin of the Fan Memorial Institute of Biology*, **10** (1): 1—22
- Christ H, 1905. Fougères de Mengtze [J]. *Bulletin de l'herbier Boissier*, **62** (1): 21—22
- Doyle JJ, Doyle JL, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochemical Bulletin*, **19**: 11—15
- Hasebe M, Worf PG, Pryer KM *et al.*, 1995. Fern phylogeny based on rbcL nucleotide sequences [J]. *American Fern Journal*, **85** (4): 134—181
- Korall P, Pryer KM, Metzgar JS *et al.*, 2006. Tree ferns: Monophyletic groups and their relationships as revealed by four protein-coding plastid loci [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **39**: 830—845
- Kreier HP, Zhang XC, Muth H *et al.*, 2008. The microsoroid ferns: Inferring the relationships of a highly diverse lineage of Paleotropical epiphytic ferns (Polypodiaceae, Polypodiopsida) [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **48**: 1155—1167
- Liu HM (刘红梅), Zhang XC (张宪春), Zeng H (曾辉), 2009. Application of DNA Sequences in Pteridophyte Phylogenetic Study [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, **44** (2): 143—158
- Nadot S, Bittar G, Carter L *et al.*, 1995. A phylogenetic analysis of monocotyledons based on the chloroplast gene *rps4*, using parsimony and a new numerical phenetics method [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **4**: 257—282
- Posada D, Crandall KA, 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution [J]. *Bioinformatics*, **14** (9): 817—818
- Pryer KM, Schuettpelz E, Wolf PG *et al.*, 2004. Phylogeny and evolution of ferns (monilophytes) with a focus on the early leptosporangiate divergences [J]. *American Journal of Botany*, **91** (10): 1582—1598
- Ronquist F, Huelsenbeck JP, 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. *Bioinformatics*, **19** (12): 1572—1574
- Schneider H, Schuettpelz E, Pryer KM *et al.*, 2004. Ferns diversified in the shadow of angiosperms [J]. *Nature*, **428**: 553—557
- Schuettpelz E, Pryer KM, 2007. Fern phylogeny inferred from 400 leptosporangiate species and three plastid genes [J]. *Taxon*, **56** (4): 1037—1050
- Shi L (石雷), Zhang XC (张宪春), 1999. Taxonomic studies of the fern genus *Lepidomicrosorium* Ching et Shing (Polypodiaceae) from China and neighboring regions [J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica* (植物分类学报), **37** (5): 509—522
- Smith AR, Cranill RB, 2002. Intrafamilial relationships of the Thelypteroid ferns (Thelypteridaceae) [J]. *American Fern Journal*, **92**: 131—149
- Swofford DL, 2002. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods), version 4.0b10 (Alvitec) [CP]. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates
- Tagawa M, 1952. Fern miscellany (6) [J]. *The Journal of Japanese Botany*, **27** (7): 217—218
- Tarberlet P, Gielly L, Pautou G *et al.*, 1991. Universal primers for amplification of the three noncoding regions of chloroplast DNA [J]. *Plant Molecular Biology*, **17**: 1105—1109
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F *et al.*, 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Research*, **25** (24): 4876—4882
- Trewick SA, Morgan-Richards M, Russell SJ *et al.*, 2002. Polyploidy phylogeography and Pleistocene refugia of the rockfern *Asplenium ceterach*: evidence from chloroplast DNA [J]. *Molecular Ecology*, **11**: 2003—2012
- Wang L, Qi XP, Xiang QP *et al.*, 2010b. Phylogeny of the paleotropical fern genus *Lepisorus* (Polypodiaceae, Polypodiopsida) inferred from four chloroplast genome regions [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **54**: 211—225
- Wang L, Wu ZH, Xiang QP *et al.*, 2010a. A molecular phylogeny and a revised classification of tribe Lepisoreae (Polypodiaceae) based on an analysis of four plastid DNA regions [J]. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **162**: 28—38
- Wolf PG, 1997. Evaluation of atpB nucleotide sequences for phylogenetic studies of ferns and other Pteridophytes [J]. *American Journal of Botany*, **84** (10): 1429—1440