

基于 *rps4-trnS* 区序列的证据分析傅氏凤尾蕨和狭眼凤尾蕨的关系

徐道兰 姜楠 曹建国 王全喜 戴锡玲*

(上海师范大学生命与环境科学学院,上海 200234)

摘要 对傅氏凤尾蕨(*Pteris fauriei*)和狭眼凤尾蕨(*Pteris biaurita*)的叶绿体 *rps4-trnS* 区序列进行 PCR 扩增和序列分析,再结合 NCBI 基因数据库中已发表的凤尾蕨科及其邻近类群的 *rps4-trnS* 区序列构建系统发育树来分析两者的亲缘关系。结果显示,傅氏凤尾蕨和狭眼凤尾蕨的 *rps4-trnS* 区序列未表现出明显差异。结合两者孢子体和配子体形态发育特征以及 *rps4-trnS* 区序列的证据,认为傅氏凤尾蕨和狭眼凤尾蕨为同种或为变种关系。

关键词 傅氏凤尾蕨 狭眼凤尾蕨 凤尾蕨科 *rps4-trnS* 区序列

中图分类号:Q949.1 文献标志码:A doi:10.7525/j.issn.1673-5102.2014.04.002

Relationship Between *Pteris fauriei* and *Pteris biaurita* Based on *rps4-trnS* Region Sequences Analysis

XU Dao-Lan JIANG Nan CAO Jian-Guo WANG Quan-Xi DAI Xi-Ling*

(College of Life and Environmental Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234)

Abstract This paper mainly discussed the phylogenetic relationship between *Pteris fauriei* and *Pteris biaurita* based on the combined *rps4-trnS* region sequences of Pteridaceae and the allied groups that have been published in GenBank. The result showed that: no significant difference between chloroplast *rps4-trnS* region sequences of *P. fauriei* and *P. biaurita* was detected. Therefore, *P. fauriei* and *P. biaurita* are most probably conspecific or variant relations based on our phylogenetic analysis combining the evidences of morphological characteristics of their sporophytes and gametophytes.

Key words *Pteris fauriei* *Pteris biaurita* Pteridaceae *rps4-trnS* region sequence

凤尾蕨科(Pteridaceae)分布于潮湿的热带或干旱地区,占据陆生、岩生、附生和泽生等多种生态位^[1],全世界现有 50 多属 1 000 余种,约占薄囊蕨类的 10%^[2]。凤尾蕨科在蕨类植物中属于一个大科,秦仁昌根据形态学将凤尾蕨科植物分为凤尾蕨属(*Pteris*)和栗蕨属(*Histiopteris*)两个属,其中凤尾蕨属又分为三个组:凤尾蕨组(Sect. *Pteris*)、篦形凤尾蕨组(Sect. *Quadriauricula*)和网眼凤尾蕨组(Sect. *Campteria*)^[3]。而现今基于分子证据,Smith 等提出了新的蕨类植物分类系统,并得到高度认同,在此系统中 Smith 等将凤尾蕨科分为珠蕨亚科(Cryptogrammoideae)、水蕨亚科(Ceratopteridoideae)、凤尾蕨亚科(Pteridoideae)、碎米蕨亚科

(Cheilanthesoideae)和书带蕨亚科(Vittarioideae)5 个亚科,共 22 个属。

凤尾蕨科物种之多,物种间的系统发育关系也较为复杂,如同为凤尾蕨属的傅氏凤尾蕨(*Pteris fauriei* Hieron.)和狭眼凤尾蕨(*Pteris biaurita* L.)的关系就是一个典型范例。1978 年,秦仁昌根据羽轴两侧有无狭长的与羽轴平行的网眼,将傅氏凤尾蕨和狭眼凤尾蕨定为两个种,其中傅氏凤尾蕨归于篦形凤尾蕨组,而狭眼凤尾蕨归于网眼凤尾蕨组。但除了网眼有无的区别,傅氏凤尾蕨和狭眼凤尾蕨在孢子体形态上极为相似^[3],孢子形态^[4]和配子体发育特征^[5-6]也无明显区别。

利用形态学性状进行分类在很多时候缺乏遗

基金项目:上海师范大学生命与环境科学学院(SK201231)

第一作者简介:徐道兰(1987—),女,硕士研究生,主要从事蕨类植物研究。

* 通信作者 E-mail: dalaixiling2010@shnu.edu.cn

收稿日期:2013-11-23

传基础 , 现代分子系统学可以为研究蕨类植物各类群之间的亲缘关系提供可靠的证据 , 利用特定的 DNA 序列差异以及以 PCR 技术为基础的分子标记 (如 RAPD 和 AFLP 等) 对蕨类植物种间和变种间关系的研究已有报道^[7~9]。近年来 , 越来越多的叶绿体 DNA 序列被证明适合探讨属下等级的亲缘关系 , 如利用叶绿体基因组的 *rbcL* 探讨 *Polystichum*^[10]、*Cyrtomium*^[11] 和 *Elaphoglossum*^[12] 等属的种间演化关系 , *rps4* 基因及邻近的 *rps4-trnS* 基因间隔区片段适合探讨蕨类属下等级的亲缘关系^[13] ; 而 *trnL-trnF* 基因间隔区 (IGS) 是非编码的序列 , 演化速率比较快 , 也已经被用于探讨属间或属下等级的亲缘关系^[14~15]。

本文克隆傅氏凤尾蕨和狭眼凤尾蕨的叶绿体 *rps4-trnS* 区的基因序列 , 利用分子遗传学证据来确定两者的亲缘关系 , 为探讨凤尾蕨科植物的种间关系及其演化提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料

傅氏凤尾蕨和狭眼凤尾蕨供试材料为新鲜叶片 , 详细采集信息见表 1。样品采集后迅速置于硅胶中干燥后保存 , 以备 DNA 提取。其他由基因库中下载以用于本文系统发育分析的相关序列见表 2。

表 1 实验材料及其相关信息
Table 1 Samples used in sequence analysis and their information

物种 Species	采集人 Gatherer	采集地 Locality	凭证标本 Voucher specimen
傅氏凤尾蕨 <i>P. fauriei</i> Hieron.	曹建国 Cao Jianguo	福建建瓯 Jianou , Fujian	0609014(SHNU)
狭眼凤尾蕨 <i>P. biaurita</i> L.	戴锡玲 Dai Xiling	海南尖峰岭 Jianfengling , Hainan	09091(SHNU)

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 的提取

总 DNA 的提取采用改良的 CTAB 方法^[16~17] , 并做了部分修改。

1.2.2 引物的设计

扩增 *rps4-trnS* 区序列所用引物参照 Hennequin 等设计^[7] , 并略作修改 , 具体引物序列为 *rps5* : 5'-ATGTCCCGTTATCGAGGACC-3' ; *trnS* : 5'-TACCGAGGGTTCGAATC-3'^[18]。

1.2.3 PCR 扩增

扩增反应在 Eppendorf AG 22331 Hamburg

PCR 扩增仪上完成。反应体系为 50 μ L , 其成分分别为 37.75 μ L H₂O、5 μ L 1 \times Buffer、4 μ L dNTP、引物各 1、0.25 μ L Ex Taq 聚合酶 (宝生物工程有 限公司) 和 1 μ L DNA 模板。

扩增程序为 : 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min ; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min ; 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s ; 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min ; 35 个循环 ; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

扩增产物先用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测 , 然后用全自动数码凝胶成像系统 Tannon GIS-2010 观察并记录实验结果。

1.2.4 PCR 产物的回收与纯化

PCR 产物的回收采用割胶的方法 , 再用琼脂糖凝胶回收纯化试剂盒 (Takara Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0) 回收并纯化 PCR 产物。

1.2.5 基因序列的测定

将鉴定后纯化好的 PCR 产物直接送华大基因公司测序。

表 2 由基因库中下载用于本文系统发育分析的 DNA 序列
Table 2 GenBank accession numbers of downloaded DNA sequences in this study

分类群 Taxon	基因库序列号 Genbank accession No.	分类群 Taxon	基因库序列号 Genbank accession No.
<i>Pteridium revolutum</i>	DQ416773	<i>Pellaea andromedifolia</i>	EU831109
<i>Pteridium esculentum</i>	DQ426655	<i>Pellaea rufa</i>	GU935553
<i>Coniogramme wilsonii</i>	KC700232	<i>Pellaea ternifolia</i>	EU831129
<i>Cryptogramma fumariifolia</i>	KC700196	<i>Pellaea falcata</i>	DQ914085
<i>Cryptogramma raddeana</i>	KC700202	<i>Pellaea wrightiana</i>	DQ914108
<i>Cryptogramma brunoniana</i>	KC700200	<i>Pellaea brachyptera</i>	EU831112
<i>Cryptogramma acrostichoides</i>	KC700214	<i>Notholaena candida</i>	DQ914168
<i>Cryptogramma crispa</i>	KC700205	<i>Notholaena californica</i>	DQ914167
<i>Cryptogramma cascadiensis</i>	KC700204	<i>Notholaena affinis</i>	DQ914166
<i>Taeniitis interrupta</i>	AF321700	<i>Doryopteris triphylla</i>	DQ914139
<i>Pteris</i> sp. Wen	JF980608	<i>Doryopteris rediiva</i>	DQ914141
<i>Adiantum pedatum</i>	JN052836	<i>Doryopteris nobilis</i>	DQ914140
<i>Adiantum myriosorum</i>	JN052813	<i>Cheilanthes bergiana</i>	GU935530
<i>Adiantum aleuticum</i>	JN052829	<i>Cheilanthes hirta</i>	GU935531
<i>Paragymnopteris sargentii</i>	DQ914117	<i>Cheilanthes parviloba</i>	DQ914158
<i>Paragymnopteris marantae</i>	DQ914114	<i>Cheilanthes depauperata</i>	GU935532

1.2.6 基因序列的分析

对狭眼凤尾蕨和傅氏凤尾蕨的 *rps4-trnS* 基因序列进行测定 , 并经过序列拼接软件整理 , 结合 NCBI 上传的 *rps4-trnS* 基因序列 (表 2) , 用 ClustalX1.83 软件运算全局联配 (Complete Alignment) 进行多序列的对位排列^[19]。对位排列后用 MAGA5.2 软件进行序列分析和遗传距离计

算^[20],遗传距离采用 Kimura-2 参数遗传距离。最大简约树(Maximum parimony ,MP)用进化分析软件 MEGA5.2 软件包构建 ,系统树分支节点置信度的评价用自展检验(Bootstrap ,BP)表示 ,自展数据集为 1000^[21]。

2 结果

本实验克隆得到傅氏凤尾蕨和狭眼凤尾蕨的 *rps4-trnS* 区序列 ,基因库登录号分别为 KF790631 和 KF790632。

为了探讨傅氏凤尾蕨和狭眼凤尾蕨的亲缘关系 ,将测定得到的 *rps4-trnS* 区序列与已经发表的近缘类群的该序列进行系统发育分析 ,采用最常用的系统发生分析方法——MP 法构建系统发育树(图 1)。

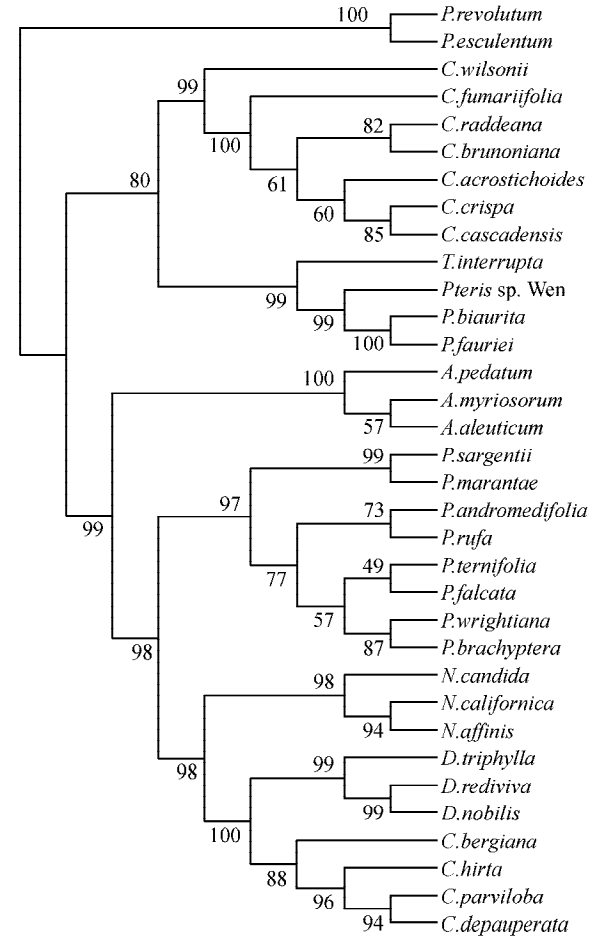


图 1 基于 *rps4-trnS* 基因序列的 MP 树
Fig. 1 MP analysis based on sequences of *rps4-trnS* gene

傅氏凤尾蕨和狭眼凤尾蕨及其近缘类群间的遗传距离显示 ,傅氏凤尾蕨和狭眼凤尾蕨及其近缘类群间的 *rps4-trnS* 序列间的遗传距离介于 0 ~

0. 283 ,序列图谱显示所测傅氏凤尾蕨和狭眼凤尾蕨的 *rps4-trnS* 基因间隔区序列在长度上仅相差 3 个碱基 ,其余位点则全部相同。

表 3 傅氏凤尾蕨和狭眼凤尾蕨及其近缘类群 *rps4-trnS* 序列间的遗传距离

Table 3 Genetic distances between *rps4-trnS* sequences in *P. fauriei* *P. biaurita* and their close species

分类群 Taxon	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>P. fauriei</i>									
<i>P. biaurita</i>	0.000								
<i>Pteris</i> sp. Wen	0.041	0.046							
<i>T. interrupta</i>	0.141	0.143	0.137						
<i>C. cascadiensis</i>	0.197	0.204	0.190	0.251					
<i>C. crispa</i>	0.195	0.202	0.188	0.249	0.002				
<i>A. aleuticum</i>	0.209	0.216	0.200	0.276	0.207	0.204			
<i>A. pedatum</i>	0.207	0.214	0.205	0.275	0.211	0.209	0.005		
<i>A. myriosorum</i>	0.216	0.223	0.207	0.283	0.214	0.211	0.006	0.008	

3 讨论

根据已有的研究 ,傅氏凤尾蕨和狭眼凤尾蕨在孢子体形态上极为相似 ,如根状茎先端密被鳞片 ,叶簇生 ,二回深羽裂 ,侧生羽片斜展 ,顶生羽片的形状、大小及分裂度与中部的侧生羽片相似 ;羽轴下面隆起 ,禾秆色 ,光滑 ,上面有狭纵沟 ;孢子囊群线性 ,沿裂片边缘延伸 ,仅裂片先端不育 ,囊群盖线性 ,灰棕色 ,膜质 ,全缘 ,宿存等^[3]。二者的孢子均是深褐色 ,三裂缝 ,表面纹饰均为瘤块状纹饰^[4]。二者的孢子萌发为书带蕨型 ,原叶体发育为水蕨型 ,无毛状体产生 ,配子体都能产生精子器 ,但不能产生颈卵器 ,为专性无配子生殖^[5~6]。

本文根据 *rps4-trnS* 区序列系统发育分析的结果显示 ,在所分析的 34 种凤尾蕨科及其邻近类群蕨类植物(按 Smith 系统)中 ,傅氏凤尾蕨和狭眼凤尾蕨在简约树上构成一个自展支持率为 100% 的分支 ,这说明傅氏凤尾蕨和狭眼凤尾蕨的亲缘关系相近。进一步通过 *rps4-trnS* 区序列分析傅氏凤尾蕨、狭眼凤尾蕨及其近缘类群的遗传距离显示 ,本文所选的 9 个物种的遗传距离介于 0 ~ 0. 283 ,其中傅氏凤尾蕨和狭眼凤尾蕨的遗传距离为 0 ,说明二者 *rps4-trnS* 区序列差异极小 ,亲缘关系较其它物种近。结合上面的系统发育分析可以看出 ,*rps4-trnS* 分子序列证据不能将傅氏凤尾蕨和狭眼凤尾蕨这两个物种分开。因此 ,本文结合孢

子体和配子体的形态发育和分子证据认为,傅氏凤尾蕨和狭眼凤尾蕨很可能是同种;或者由于二者的生境不同,傅氏凤尾蕨和狭眼凤尾蕨也可能为变种关系。

本实验中对傅氏凤尾蕨和狭眼凤尾蕨 *rps4-trnS* 区序列的分析清楚显示傅氏凤尾蕨和狭眼凤尾蕨在分子证据上不能被分开,更加有力地支持了它们在形态学方面的相似。但这只是基于一个 DNA 序列资料而提出的建议,因此,傅氏凤尾蕨和狭眼凤尾蕨的分类和演化关系还有待于结合其它分子方面的资料进行深入研究。

由基于 *rps4-trnS* 基因序列构建的进化树可知,凤尾蕨属的 *P. fauriei*、*P. biaurita*、*Pteris* sp. Wen 和竹叶蕨属的 *Taenitis interrupta* 自成一支,与珠蕨属(*Cryptogramma*)和凤了蕨属(*Coniogramme*)亲缘关系较近;金毛裸蕨属(*Paragymnopteris*)和旱蕨属(*Pellaea*)又自成一一大支,与隐囊蕨属(*Notholaena*)、黑心蕨属(*Doryopteris*)、碎米蕨属(*Cheilanthes*)和铁线蕨属(*Adiantum*)亲缘关系较近。综上所述,该进化树支持 Smith 分类系统,将凤尾蕨科分为 5 个亚科,其中凤尾蕨属和竹叶蕨属归于凤尾蕨亚科,珠蕨属和凤了蕨属归于珠蕨亚科,碎米蕨属、黑心蕨属、隐囊蕨属、金毛裸蕨属和旱蕨属归于碎米蕨亚科。

参 考 文 献

1. 森林,苏应娟,张冰等. 凤尾蕨科植物 *rbcL* 基因的适应性进化分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2010, 18(1): 1-8.
2. 周媛,王博,高磊等. 凤尾蕨科旱生蕨类 *rbcL* 基因的适应性进化和共进化分析[J]. 植物科学学报, 2011, 29(4): 409-416.
3. 邢公侠. 中国植物志:第3卷第1分册[M]. 北京:科学出版社, 1990.
4. 王全喜,戴锡玲. 中国水龙骨科(真蕨目)植物孢子形态的研究[M]. 北京:科学出版社, 2010.
5. 沈建,李新国,戴锡玲等. 傅氏凤尾蕨配子体发育及其无配子生殖的研究[J]. 植物研究, 2009, 29(4): 385-390.
6. 戴锡玲,王晖,唐晓娟等. 狭眼凤尾蕨配子体发育及其成精子囊素对水蕨配子体发育的影响[J]. 植物研究, 2012, 32(5): 537-543.
7. 李晶,沙伟. 东北地区部分大型蕨类植物遗传多样性的 RAPD 研究[J]. 植物研究, 2008, 28(6): 689-692.
8. Trewick S A, Morgan-Richards M, Russell S J, et al. Polyploidy phylogeography and Pleistocene refugia of the rockfern *Asplenium ceterach*: evidence from chloroplast DNA[J]. Molecular Ecology, 2002, 11: 2003-2012.
9. Wang L, Wu Z H, Xiang Q P, et al. 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, 2010, 162: 28-38.
10. Li C X, Lu S G, Yang Q. Asian origin for *Polystichum* (Dryopteridaceae) based on *rbcL* sequences[J]. Chinese Science Bulletin, 2004, 49: 1146-1150.
11. Lu J M, Li D Z, Gao L M, et al. Paraphyly of *Cyrtomium* (Dryopteridaceae): Evidence from *rbcL* and *trnL-F* sequence data[J]. J Plant Res, 2005, 118: 129-135.
12. Skog J E, Mickel J T, Moran R C, et al. Molecular studies of representative species in the fern genus *Elaphoglossum* (Dryopteridaceae) based on chloroplast DNA sequences *rbcL*, *trnL-F* and *rps4-trnS*[J]. Int J Plant Sci, 2004, 165: 1063-1075.
13. Li C X, Lu S G. Phylogenetics of Chinese *Dryopteris* (Dryopteridaceae) based on the chloroplast *rps4-trnS* sequence data[J]. J Plant Res, 2006, 119: 589-598.
14. 勾彩云,张寿洲,耿世磊. 基于 *rbcL* 和 *trnL-trnF* 序列探讨粤紫萁的系统位置及遗传关系[J]. 西北植物学报, 2008, 28(11): 2178-2183.
15. 王玛丽,陈之端,张宪春,等. 蹄盖蕨科的系统发育:叶绿体 DNA *trnL-F* 区序列证据[J]. 植物分类学报, 2003, 41(5): 416-426.
16. Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochemical Bulletin, 1987, 19: 11-15.
17. Shi S H, Zhang Q, Chen Y Q, et al. A simple method for isolation of total RNA and DNA from silica-gel-dried and fresh leaves of plants[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 1996, 35(2): 103-105.
18. 姜楠. 中国水龙骨科植物的系统演化研究[D]. 上海:上海师范大学, 2011.
19. Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The Clustalx windows interface: flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools[J]. Nuclear Acids Research, 1997, 24: 4876-4882.
20. Kimura M. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences[J]. Journal of Molecular Evolution, 1981, 16: 111.
21. Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, et al. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software[J]. Bioinformatics, 2001, 17: 1244-1245.