用核 DNA 和叶绿体 DNA 序列鉴别铁线蕨属 *Adiantum* L. (凤尾蕨科) 新的隐性杂交种

王莹^{①②*}, 商辉^{①*}, 顾钰峰^{①②}, 韦宏金^①, 赵国华^{①③}, 戴锡玲^②, 严岳鸿^{①†}

① 上海辰山植物园, 中国科学院上海辰山植物科学研究中心, 上海 201602;

② 上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234;

③ 哈尔滨师范大学黑龙江省普通高等学校植物生物学重点实验室, 哈尔滨 150025

* 同等贡献

† 联系人, E-mail: yhyan@sibs.ac.cn

2014-11-17 收稿, 2014-12-24 接受, 2015-02-11 网络版发表

中国科学院战略生物资源科技支撑体系运行专项(CZBZX-1)和上海市绿化与市容管理局科技攻关项目(F112422)资助

摘要 物种自然杂交现象在自然界中普遍存在, 并被认为是适宜条件下可以多地独立发生. 2013年, 在云南元江采集的7种铁线蕨属植物中, 其中一种在形态上疑似台湾产梅山铁线蕨, 而该种被认为是以假鞭叶铁线蕨为母本、半月形铁线蕨为父本的自然杂交物种. 形态学比较显示, 该存疑种与铁线蕨属其他种类均有明显差别, 用单拷贝核DNA序列CRY2 exon 3和叶绿体DNA序列 $rbcL$, $atpB$, $atpA$, $trnL-F$, $rps4-trnS$ 对云南元江产梅山铁线蕨存疑种进行研究, 结果显示云南元江产梅山铁线蕨存疑种为以苍山铁线蕨为母本和以孟连铁线蕨为父本的自然杂交种, 由于形态上与台湾产梅山铁线蕨相似、父母本亲缘关系上与梅山铁线蕨的双亲近缘, 因而可称为梅山铁线蕨的隐性杂交种. 据此认为, 中国可能存在大量的自然杂交种尚未发现, 并可以通过核DNA序列和叶绿体DNA序列进行准确鉴定; 同时, 诸如铁线蕨属这样的蕨类植物, 由于存在无性繁殖习性, 可以弥补有性生殖隔离带来的适合度降低的缺陷, 增加杂交种在自然界中的存活机会, 是蕨类植物中自然杂交种普遍存在的重要原因.

关键词

蕨类植物
铁线蕨
核 DNA 序列
叶绿体 DNA 序列
自然杂交
适合度
隐性种

自然杂交是指在自然条件下具有显著不同可遗传性状的2个居群的个体之间的成功交配^[1]. 自然杂交在进化生物学研究具有重要意义, 特别是在分类与系统生物学、生殖隔离与物种形成机制及其基本的进化过程的研究方面尤为重要^[2]. 一般认为, 只要有嫌疑亲本共同存在的分布区, 自然杂交就具有异地独立发生的可能. 因此异域杂交物种形成被认为是自然界广泛存在的现象, 如粤紫萁(*Osmunda mildei*)被认为是华南紫萁(*O. vachellii*)和紫萁(*O. japonica*)的杂交物种^[3,4], 后代不育, 但在中国的香港^[5]、广东^[6]、湖南^[7]、江西^[8]等多地独立发生; 中日双盖蕨(*Diplazium*

kidoi)^[9,10]原产日本, 是薄叶双盖蕨(*D. pinfaense*)和耳羽短肠蕨(*D. wichurae*)的杂交后代, 同样在中国华中地区也有发现^[11]. 但这些异地发生的杂交事件往往仅依靠形态上的相似性, 并未进行进一步的细胞学或分子生物学的检测.

2013年, 我们在云南元江哀牢山发现了一个由铁线蕨属鞭叶系(*Adiantum* L. Ser. *Caudata*)物种混生的自然群落, 包括半月形铁线蕨(*Adiantum philippense*)、假鞭叶铁线蕨(*A. malesianum*)、鞭叶铁线蕨(*A. caudatum*)、苍山铁线蕨(*A. sinicum*)、普通铁线蕨(*A. edgeworthii*)、孟连铁线蕨(*A. menglianense*)

引用格式: 王莹, 商辉, 顾钰峰, 等. 用核 DNA 和叶绿体 DNA 序列鉴别铁线蕨属 *Adiantum* L. (凤尾蕨科) 新的隐性杂交种. 科学通报, 2015, 60: 922–932
Wang Y, Shang H, Gu Y F, et al. A new cryptic hybrid species of *Adiantum* L. (Pteridaceae) identified by nuclear and chloroplast DNA sequences (in Chinese). Chin Sci Bull, 2015, 60: 922–932, doi: 10.1360/N972014-00891

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/N972014-00891>

以及形似梅山铁线蕨(*A. meishanianum*)的个体(*Adiantum* sp. Yan12410 & Yan12413, 以下称云南元江产“梅山铁线蕨”), 并在中国科学院的官方网站报道(http://www.cas.cn/ky/kyjz/201306/t20130628_3888661.shtml). 梅山铁线蕨原产台湾高雄梅山口, 被认为是以假鞭叶铁线蕨为母本以半月形铁线蕨为父本的杂交物种^[12]. 通过对比发现, 云南元江产的“梅山铁线蕨”与台湾产的梅山铁线蕨在形态上仍然有些细微的差别(表1). 王凡红等人^[13]通过叶绿体*rbcL*基因序列对云南勐腊产“梅山铁线蕨”进行分析, 表明具与台湾产梅山铁线蕨*rbcL*基因序列完全一致, 可能是梅山铁线蕨的异域杂交起源.

由于具有母系遗传背景的叶绿体DNA序列不能反映父本的来源, 所以必须利用核DNA序列的遗传信息对杂交物种进行准确的鉴定^[14,15]. 核DNA序列具有双亲遗传的特性, 但是由于多倍化等原因, 很少在蕨类植物中被应用, 因此以前的研究多是基于等位酶技术^[16,17]. 随着测序技术的兴起和发展, 部分低拷贝核基因序列被筛选出来, 并已经被用于蕨类植物的系统学研究和杂种鉴定^[18]. 对于处于过渡形态的个体, 如果是杂交造成的, 那么应该可以通过直接测序的办法在这些个体中发现来自双亲的等位基因^[19,20]. 我们采用细胞核遗传的隐花色素基因2(*Cryptochrome gene 2*, *CRY2*)第3外显子^[18], 测序后检测峰图上的点突变杂合位点的叠加峰, 再通过分子克隆的办法, 找出来源不同的单倍型, 由此推断杂交种的亲本^[21,22].

在叶绿体DNA序列的研究中, *rbcL*, *atpB*, *atpA*为

基因编码区, 演化速率较慢, 在解决种间亲缘关系时效果较差^[23,24], 因此我们增加了演化速率较快的非编码DNA序列, 即*trnL-F*, *rps4-trnS*基因间隔区序列^[25].

绝大多数植物中, 叶绿体DNA序列通过雌配子以母系遗传的方式传递, 比较杂交个体及其可能亲本的叶绿体DNA序列可以揭示其母本起源^[26,27]; 然而核DNA序列是双亲遗传^[28], 比较核DNA序列组成, 能够找出其双亲起源^[15]. 本研究尝试用核DNA序列和叶绿体DNA序列共同去鉴别这些铁线蕨属植物及其亲缘关系, 其主要目的在于探讨: (1) 铁线蕨属的自然杂交种是否存在异地独立起源事件? (2) 铁线蕨属自然杂交后代与亲本之间的关系如何?

1 材料和方法

(i) 实验材料. 供试材料及其采集地、凭证标本、叶绿体DNA序列GenBank登录号见表2, 从GenBank中下载的参比材料信息见表3, 核DNA序列GenBank登录号见表4, 凭证标本存放于上海辰山植物园标本馆(CSH).

(ii) 序列扩增. 实验样品经乙醇消毒和蒸馏水洗净后, 硅胶干燥, 每一个样本取20 mg研磨成细粉, 用新型植物基因组DNA提取试剂盒(天根公司), 按说明书操作提取总DNA.

核DNA序列引物参照Rothfels等人^[18]的设计, 扩增和测序引物相同. 扩增反应在Eppendorf梯度PCR扩增仪上进行. 本实验所采用的20 μL PCR反应体系如下: 2×*Taq* PCR MasterMix 10 μL (天根公司), 各引

表1 一些铁线蕨属实验材料形态特征比较

Table 1 Morphological characters comparison among some *Adiantum* experimental materials

物种	叶片	羽片	基部羽片	囊群盖	叶轴 近轴面	叶轴 远轴面	叶片 近轴面	叶片 远轴面
苍山铁线蕨 <i>A. sinicum</i>	披针形, 长12~25 cm, 宽1.8~2.4 cm	15~25对, 长1~1.4 cm, 宽4~9 mm, 仅浅裂	团扇形, 无柄	上缘平直	密毛	密毛	密毛	密毛
<i>Adiantum</i> sp.	披针形, 长15~35 cm, 宽2.5~3 cm	15~25对, 长1.2~3 cm, 宽1~1.8 cm, 浅裂, 少半裂	团扇形, 柄长约2 mm	上缘平直	疏毛	无毛	无毛	无毛
孟连铁线蕨 <i>A. menglianense</i>	披针形, 长10~20 cm, 宽4~8 cm	7~10对, 长1.5~3.5 cm, 宽1~2 cm, 浅裂或半裂	半月形, 柄长约1~2.5 cm	上缘平直 或微凹	无毛	无毛	无毛	无毛
半月形铁线蕨 <i>A. philippense</i>	披针形, 长12~25 cm, 宽3~7.8 cm	7~10对, 长2~4 cm, 宽1~2.5 cm, 全缘或浅裂	半月形, 柄长约1.5 cm	上缘平直 或微凹	无毛	无毛	无毛	无毛
梅山铁线蕨 <i>A. meishanianum</i>	线状披针形, 长10~36 cm, 宽3~6 cm	10~20对, 长1.5~3 cm, 宽1~2 cm, 半裂	半月形, 柄长约2~3mm	上缘凹陷	疏毛	无毛	无毛	无毛
假鞭叶铁线蕨 <i>A. malesianum</i>	线状披针形, 长10~40 cm, 宽2.5~3 cm	20~35对, 长1~2 cm, 宽6~10 mm, 半裂或深裂	近团扇形, 柄长约1.5 mm	上缘平直	密毛	密毛	密毛	密毛

表 2 供试材料信息

Table 2 Samples used in sequence analysis and their information

材料	采集地	标本号	GenBank 登录号				
			<i>rbcL</i>	<i>atpB</i>	<i>atpA</i>	<i>trnL-F</i>	<i>rps4-trnS</i>
<i>A. malesianum</i>	云南元江哀牢山	Yan12404	KP637230	KP637194	KP637179	KP637260	KP637245
<i>A. philippense</i>	云南元江哀牢山	Yan12405	KP637236	KP637200	KP637185	KP637266	KP637251
<i>A. sinicum</i>	云南元江哀牢山	Yan112601	KP637240	KP637204	KP637189	KP637270	KP637255
<i>A. philippense</i>	云南元江哀牢山	Yan12086	KP637235	KP637199	KP637184	KP637265	KP637250
<i>A. sinicum</i>	云南元江哀牢山	Yan12406	KP637237	KP637201	KP637186	KP637267	KP637252
<i>A. sinicum</i>	云南元江哀牢山	Yan12407	KP637238	KP637202	KP637187	KP637268	KP637253
<i>A. caudatum</i>	云南元江哀牢山	Yan12408	KP637228	KP637192	KP637177	KP637258	KP637243
<i>A. menglianense</i>	云南元江哀牢山	Yan12409	KP637233	KP637197	KP637182	KP637263	KP637248
<i>A. sp.</i>	云南元江哀牢山	Yan12410	KP637241	KP637205	KP637190	KP637271	KP637256
<i>A. meishanianum</i>	台湾梅山口	Yan12411	KP637232	KP637196	KP637181	KP637262	KP637247
<i>A. malesianum</i>	云南元江哀牢山	Yan12416	KP637231	KP637195	KP637180	KP637261	KP637246
<i>A. edgeworthii</i>	云南元江哀牢山	Yan12412	KP637229	KP637193	KP637178	KP637259	KP637244
<i>A. sp.</i>	云南元江哀牢山	Yan12413	KP637242	KP637206	KP637191	KP637272	KP637257
<i>A. sinicum</i>	云南元江哀牢山	Yan12414	KP637239	KP637203	KP637188	KP637269	KP637254
<i>A. menglianense</i>	云南元江哀牢山	Yan12415	KP637234	KP637198	KP637183	KP637264	KP637249

表 3 从基因库下载的参比材料信息

Table 3 GenBank accession numbers of downloaded DNA sequences in this study

材料	GenBank 登录号				
	<i>rbcL</i>	<i>atpB</i>	<i>atpA</i>	<i>trnL-F</i>	<i>rps4-trnS</i>
<i>A. caudatum</i> Lu209	JF935296	JF935373	JF937249	JF980641	JF980558
<i>A. chienii</i> Lu568	JF935303	JF935381	JF937256	JF980649	JF980565
<i>A. menglianense</i> Lu114	JF935311	JF935392	JF937266	JF980660	JF980575
<i>A. gravesii</i> Lu129	JF935312	JF935393	JF937267	JF980664	JF980576
<i>A. gravesii</i> Lu451	JF935317	JF935398	JF937272	JF980664	JF980581
<i>A. juxtapositum</i> Lu575	JF935305	JF935383	JF937258	JF980651	JF980567
<i>A. leveillei</i> Lu163	JF935313	JF935394	JF937268	JF980661	JF980577
<i>A. lianxianense</i> Lu441	JF935306	JF935385	JF937259	JF980653	JF980569
<i>A. caudatum</i> Lu050	JF935297	JF935374	JF937250	JF980642	JF980559
<i>A. mariesii</i> Lu120	JF935302	JF935380	JF937255	JF980648	JF980564
<i>A. philippense</i> Wen8257	JF935330	JF935412	JF937285	JF980675	JF980595
<i>A. philippense</i> Wen10206	JF935340	JF935422	JF937295	JF980685	JF980606
<i>A. sinicum</i> Lu269	JF935300	JF935378	JF937253	JF980646	JF980562
<i>A. philippense</i> Zhang009	JF935299	JF935376	JF937252	JF980644	JF980561
<i>A. sp.</i> Wen8295	JF935329	JF935411	JF937284	JF980674	JF980594
<i>A. sp.</i> Wen9616	JF935326	JF935407	JF937280	JF980671	JF980590
<i>A. sp.</i> Wen9648	JF935327	JF935408	JF937281	JF980672	JF980591
<i>A. capillus junonis</i> Lu111	JF935314	JF935395	JF937269	JF980662	JF980578
<i>A. fengianum</i> Lu228 (外类群)	JF935308	JF935388	JF937262	JF980656	JF980571
<i>A. flabellulatum</i> Lu450 (外类群)	JF935295	JF935372	JF937248	JF980640	JF980557

物0.25 μL , 模板DNA 1 μL , 超纯水(ddH₂O)补足至20 μL . *CRY2* exon 3 PCR反应条件: 94℃预变性5 min; 接下来35个循环(94℃变性30 s, 58℃退火30 s, 72℃延伸30 s), 最后72℃终延伸10 min. 核基因目的片段用凝胶回收试剂盒回收, 直接测序分析峰图, 若存在杂合位点, 将序列通过TA克隆, 把它连接到pMD18-T vector (TaKaRa)上, 连接产物转化TOP10大肠杆菌感受态细胞, 在含有Amp, IPTG, X-Gal的LB琼脂平板上筛选白色的阳性菌落. 随机挑选10个菌落, 用M13双向测序引物对菌落进行PCR检测, 鉴定是否克隆成功, 测序进行序列分析. 对照直接测序结果, 对杂合位点位置准确鉴定.

叶绿体DNA序列引物设计参照Lu等人^[25]的方法, *atpA*基因扩增引物及测序引物为ESATPF412F和ESTNR46F^[29]. *atpB*扩增及测序引物为ESATB172F和ESATPE45R^[30]. *rbcL*扩增及测序引物均为1F和1379R^[31]. *trnL-F*扩增及测序引物“c”和“f”^[32,33]. *rps4-trnS*扩增及测序引物为“trnS”^[34]和“rps4.5”^[35]. 扩增反应在Eppendorf梯度PCR扩增仪上进行. 反应体系同上. *atpA*和*atpB*的PCR反应条件: 95℃预变性3 min; 接下来35个循环(95℃变性1 min, 50℃退火1 min, 72℃延伸100 s), 最后72℃终延伸10 min. *rbcL*和*trnL-F*的PCR反应条件: 95℃预变性3 min; 接下来35个循环(95℃变性1 min, 51℃退火1 min, 72℃延伸80 s), 最后72℃终延伸10 min. *rps4-trnS* PCR反应条件: 95℃预变性3 min; 接下来35个循环(94℃变性30 s, 58℃退火45 s, 72℃延伸80 s), 最后72℃终延伸10 min.

PCR产物的测序在ABI 3730XL测序仪上完成.

(iii) 序列分析. 核DNA序列分析将直接测序得到的全部序列, 对照测序峰图, 手动筛选杂合位点. 当双向测序都能清晰地在峰图上判断出2个不同的核苷酸峰时, 该位点被认定杂合的点突变位点; 为了准确地判断单倍型的序列构成, 我们对有杂合位点的基因序列进行了分子克隆测序. 使用BioEdit进行序列比对, 剪切编辑序列, 单倍型的命名根据种名的前2个字母(首字母大写), 若不只一个单倍型, 将第二个字母用数字替换以示区别. 使用DnaSP v5^[36]判断单倍型构成, Network 4.6.1.0比较单倍型间的进化关系.

叶绿体DNA序列分析将测序得到的全部序列, 用DNASar 5.0软件中的SeqMan模块进行峰图分析, 手动删除不可信区段, 拼接F和R端, 并手动检验改

错, 得到完整片段. 使用BioEdit^[37]进行序列比对, 剪切编辑序列, 用DnaSP v5^[36]软件统计不同序列间的可变位点、简约信息位点. 以*A. fengianum* Lu228和*A. flabellulatum* Lu450为外类群^[25], 采用最大简约法(maximum parsimony, MP)和贝叶斯法(Bayesian inference, BI)构建分子系统树. 用PAUP4.0b10^[38]软件构建MP树, 空位(gap)处理作缺失(missing)状态, 采用启发式搜索(Heuristic)法寻找最简约树(MP), 并对其进行1000次拟重复抽样的bootstrap分析, 检验各节点的置信度; 用MrBayes v.3.1.2^[39,40]软件构建贝叶斯树, 依据Modeltest3.7^[41,42]中最小AIC值产生的最佳核苷酸替换模型为TIM+I+G, 设置核苷酸替代类型数nst = 6, 位点间速率分布设置为rates = gamma, 以随机树为起始树, 4条马尔可夫链运行100万代, 每100代抽样并保存数据一次, 舍弃老化样本(2500抽样代)后, 根据剩余样本构建合意树.

2 结果与分析

2.1 核DNA序列单倍型分析

实验新测定半月形铁线蕨、鞭叶铁线蕨、苍山铁线蕨、假鞭叶铁线蕨、孟连铁线蕨、普通铁线蕨和云南元江产的“梅山铁线蕨”(Yan12410和Yan12413)植物样本核DNA序列*CRY2* exon 3 GenBank登录号见表4. 测序结果比对剪切后得到的序列长度为446 bp, 此序列长度中半月形铁线蕨、鞭叶铁线蕨、苍山铁线蕨、假鞭叶铁线蕨、孟连铁线蕨和普通铁线蕨, 这6种实验材料, 每一种均有各自的单倍型, 单倍型间的进化关系见图1. 而样本Yan12410和Yan12413, 在峰图上重叠峰(图2)的位置有18处, 包含3个单倍型, 分别来自于孟连铁线蕨和苍山铁线蕨(表4). 核DNA序列单倍型分析结果表明云南元江产“梅山铁线蕨”2个样本是孟连铁线蕨和苍山铁线蕨的杂交.

2.2 叶绿体DNA序列分析

本实验新测定的15个铁线蕨属植物样本5个叶绿体DNA序列(*rbcL*, *atpB*, *atpA*, *trnL-F*, *rps4-trnS*) GenBank登录号见表2. 本研究以*A. fengianum* Lu228, *A. flabellulatum* Lu450为外类群, 联合5个叶绿体DNA序列分别构建了最大简约树和贝叶斯系统发生树. 测序结果比对剪切后得到的序列长度为5132 bp, 其中变异位点884个, 简约信息位点498个. 启发式搜

图1 核基因 *CRY2* texon 3 单倍型间的进化关系. 直线上的数字表示变异步长

Figure 1 Haplotype network of the nuclear gene *CRY2* exon 3. Numbers on line represents the mutational steps.

图2 核基因 *CRY2* exon 3 序列在变异位点峰图叠加示意

Figure 2 Overlapping peak of variable site in the nuclear gene *CRY2* exon 3

索(Heuristic search) TBR算法得到严格一致树, 一致性指数(CI = 0.7696)和维持性指数(RI = 0.8695)。

从贝叶斯系统发生树和MP系统发生树(bootstrap 值1000)中可以看出: (1) 采自云南元江哀牢山的孟连铁线蕨(*A. menglianense* Yan12409和*A. menglianense* Yan12415), 和来自广西凌云的*A. menglianense* Lu114^[25]聚为一枝, 为半月形铁线蕨的姐妹群, 支持

王凡红等人^[13]认为孟连铁线蕨为独立于半月形铁线蕨的自然种的研究结果; (2) 来自台湾的样本梅山铁线蕨(*A. meishanianum* Yan12411)和假鞭叶铁线蕨聚在一起, 这一结果和Zhang等人^[12]证实台湾产的梅山铁线蕨的母本是假鞭叶铁线蕨的研究结果相同; (3) 我们在云南元江哀牢山采集到的形似“梅山铁线蕨”的样本Yan12410和Yan12413, 与苍山铁线蕨聚在一枝中, 并与梅山铁线蕨和假鞭叶铁线蕨一枝为姐妹群(图3)。由此推断样本Yan12410和Yan12413, 其母本为苍山铁线蕨, 结合核基因结果进一步推断, 其父本为孟连铁线蕨。

3 讨论

3.1 自然杂交物种中存在隐性杂交问题

随着DNA测序和分析的发展, 原来一些被认为形态相似的物种, 被发现具有完全不同的亲缘关系, 隐性种(cryptic species)的概念也应运而生。隐性种通常被定义为在形态上难以区分的生物物种^[43], 或在形态上很难辨认, 由于生殖隔离代表不同的进化谱系, 并且一直被误解作为一个物种的种类^[44]。在本研究的铁线蕨属的杂交种中, 云南元江产的形似梅山铁线蕨的杂交种与台湾产的梅山铁线蕨杂交种形态学特征相似(表1), 双亲的系统关系近缘(母本分别来自互为姊妹种的苍山铁线蕨和假鞭叶铁线蕨, 父本分别来自互为姊妹种的孟连铁线蕨和半月形铁线蕨), 从而可称为梅山铁线蕨的隐性杂交种。隐性杂交种现象也存在种子植物中, 如半枫荷(*Semiliquidambar cathayensis*)原被认为是金缕梅科的一个单型属, 但分子生物学证据显示, 海南产的半枫荷是广布种枫香(*Liquidambar formosana*)和海南特有种倒卵阿丁枫(*Altingia obovata*)的自然杂交, 而中国大陆地区如广东黑石顶、南岭山区产的半枫荷却是枫香与其他阿丁枫属(*Altingia*)植物之间独立发生的杂交事件^[45]。因此, 在不同产地的看上去形态相似的杂交种, 其双亲可能来自于与双亲近缘的其他物种。这要求我们对杂交种的鉴定中并不能依据简单的形态相似性, 而需要根据形态特征、父母本双亲产地和遗传学特征综合判断。

蕨类植物中隐性杂交现象的发现, 可能意味着中国尚有大量新的自然杂交种有待于进一步发现。目前已知中国产蕨类植物2338种, 但经我们统计可能存在的自然杂交种仅有62种^[46], 其比例远远低于

图3 5个叶绿体序列 *rbcL*, *atpB*, *atpA*, *trnL-F*, *rps4-trnS* 联合构建系统发生树, 横线上面是 MP 自展支持率(只显示 BP ≥ 70%)(bootstrap=1000), 下面是贝叶斯后验概率(只显示 BI ≥ 0.95)

Figure 3 The phylogenetic tree constructed based on five chloroplast markers (*rbcL*, *atpB*, *atpA*, *trnL-F*, *rps4-trnS*). Bootstrap values of 1000 maximum parsimony analysis replicates are shown above branches (BP ≥ 70%), Posterior probability values of Bayesian inference analysis are shown below branches (BI ≥ 0.95)

世界其他研究较为深入的国家或地区,如日本产蕨类植物832种,自然杂交种318种^[47],夏威夷产蕨类植物194种,自然杂交种有37种^[48]。早期的自然杂交种的推定多基于形态学的过渡特征、细胞学特征和等位酶的分析,随着分子生物学的发展,DNA测序技术在自然杂交种的鉴定方面逐渐成为可能。

3.2 核DNA序列在蕨类植物自然杂交种鉴定中的应用

核DNA序列为双亲遗传,因此可以更客观真实地反映物种本来的亲缘关系,利用其序列变异来探讨植物的系统进化优于叶绿体DNA序列,特别是有利于解决网状进化及揭示物种杂交问题。但由于核DNA序列组成结构复杂,且大部分核DNA序列存在基因重复现象而造成了直系同源(orthologous)和旁系同源(paralogous)基因的问题,因此使核DNA序列的应用复杂化^[24]。相对于被子植物来说,蕨类植物高度多倍化,因此适用于被子植物的核DNA序列很少能被蕨类所用。

近年来,部分适用于蕨类植物种间系统进化和杂交种鉴定研究的核DNA序列相继被开发出来。如Kranz和Huss^[49]利用18S rRNA基因序列探讨了蕨类植物的分子进化问题及蕨类植物与种子植物的关系; Sanchez-Baracaldo^[50]利用18S~26S核基因序列的ETS序列结合叶绿体DNA序列对Jamesonia-Eriosorus复合群进行系统发育和谱系地理研究; Kuo等人^[12]利用CRY2第一内含子(CRY2 intron 1)用于对囊蕨属(Li-Yaung Kuo pers. comm.2008)和铁线蕨属的系统进化研究; Schuettpelz等人^[51]应用低拷贝核基因序列gapCp研究了碎米蕨复合群cheilanthoid多倍体的起源; Shepherd等人^[52]用低拷贝的核基因序列Leafy第二内含子(LFY intron 2)研究了异源多倍体铁角蕨复合群; Chang等人^[22]用核基因序列pgiC intron 14-15对台湾产的微弯假复叶耳蕨的遗传异质性和杂交起源的研究;值得指出的是, Rothfels等人^[18]用转录组挖掘了20个用于蕨类植物系统进化研究的单拷贝核基因序列分子标记,对蕨类植物系统进化和杂交种鉴定具有重要的参考意义。随着蕨类植物基因组数据和转录组数据的不断发表,在不久的将来有望有更多的核DNA序列能为蕨类系统学研究所用,从而为

物种的认识提供更有力的证据^[18]。

3.3 自然杂交物种的无性繁殖习性增加杂交后代的适合度

“自然杂交在动植物进化历史中具有多大的贡献”和“自然杂交后代与亲本之间的适合度有什么差别”是自然杂交研究在进化意义中2个最受关注的问题^[2]。虽然自然界的杂交很普遍,但并不是所有的自然杂交都能保留下来,甚至形成新的物种,杂种后代虽然可能具有较强的生活力,但由于生殖隔离的存在造成可育性降低甚至不育,适合度较低,无法顺利繁衍后代,被有些进化学家称为进化的死角或进化上的噪音^[53,54]。一般认为,蕨类植物的杂交后代往往不能产生或产生很少的能育孢子而难于大量繁殖,因此杂交后代植株的数量较少,其分布范围较小,常常仅限于局部生境中^[55]。尽管如此,仍然有众多蕨类植物自然杂交种分布范围较广、野外居群数量较大。如本文所研究的云南产铁线蕨属自然杂交种虽然孢子败育,但铁线蕨属鞭叶系植物具有叶轴顶端延长成鞭状并着地生根的无性繁殖习性,能够通过有效的无性繁殖形成一个较大的无性系居群,以此补偿远缘杂交有性繁殖适合度的下降,所以铁线蕨属鞭叶系自然杂交种在台湾以及云南元江、西双版纳、普洱孟连等多个地方分布^[13]。类似的无性繁殖机制还有网脉实蕨(*Bolbitis* × *laxireticulata*)、南仁实蕨(*Bolbitis* × *nanjenensis*)、云南实蕨(*Bolbitis* × *yunnanensis*)等实蕨属的自然杂交种,其中网脉实蕨是由华南实蕨(*B. subcordata*)和刺蕨(*B. appendiculata*)自然杂交产生的,其采取根状茎横走并且叶片先端常产生芽孢的无性繁殖策略。相反,自然杂交种粤紫萁孢子不育且根状茎直立,每个产地多仅有一株,因为没有有效的无性生殖机制来补偿其有性适合度的下降,以致数量稀少,濒临灭绝。

4 结论

我们在云南元江所采集到的形似梅山铁线蕨的标本是以苍山铁线蕨为母本以孟连铁线蕨为父本的杂交种,应鉴定为*A. sinicum* × *A. menglianense*; 和台湾产梅山铁线蕨是不同的杂交起源,并不是异域杂交起源的关系,二者为隐性杂交种(图4)。

图4 本研究中涉及的铁线蕨属物种间亲缘关系图

Figure 4 Relationships among *Adiantum* spp. in this study

参考文献

- 1 Arnold M L. Natural Hybridization and Evolution. Oxford: Oxford University Press Inc, 1997
- 2 Arnold M L. Natural hybridization as an evolutionary process. *Annu Rev Ecol Evol Syst*, 1992, 37: 237–261
- 3 Gou C Y, Zhang S Z, Geng S L. Phylogenetic position and genetic relationship of *Osmunda mildei* (Osmundaceae): Evidence from *rbcL* Gene and *trnL-trnF* region (in Chinese). *Acta Bot Boreali-Occidental Sin*, 2009, 28: 2178–2183 [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. *西北植物学报*, 2009, 28: 2178–2183]
- 4 Tsutsumi C, Hirayama Y, Kato M, et al. Molecular evidence on the origin of *Osmunda mildei* (Osmundaceae). *Am Fern J*, 2012, 102: 55–68
- 5 Lee W, Chau L, Wu S. Flora of Hong Kong-Pteridophyta. Hong Kong: Kadoorie Farm & Botanic Garden, 2003
- 6 Zhang S Z, He Z C, Fan C R, et al. A cytogenetic study of five species in the genus *Osmunda*. *J Syst Evol*, 2008, 46: 490–498
- 7 Zhou X L, Qi X P, Shao W, et al. New records for ferns from Hunan Province, China (in Chinese). *J Plant Resour Environ*, 2013, 22: 117–118 [周喜乐, 齐新萍, 邵文, 等. 湖南省蕨类植物新记录. *植物资源与环境学报*, 2013, 22: 117–118]
- 8 Yan Y H, Yuan H, He Z X, et al. New records of ferns from Jiangxi, China (in Chinese). *Guihaia*, 2011, 31: 5–8 [严岳鸿, 苑虎, 何祖霞, 等. 江西蕨类植物新记录. *广西植物*, 2011, 31: 5–8]
- 9 Mitui K. Chromosomes and speciation in ferns. *Sci Rep Tokyo Kyoiku Daigaku B*, 1968, 13: 185–333
- 10 Mitsuta S. An artificial hybrid between *Diplazium pin-faense* and *D. wichurae* var. *wichurae*. *Acta Phytotax Geobot*, 1982, 33: 275
- 11 Gu Y F, Wei H J, Wei R, et al. *Diplazium* × *kidoi* Sa. Kurata, a newly recorded species of *Diplazium* (Athyraceae) from China (in Chinese). *Plant Sci J*, 2014, 32: 336–339 [顾钰峰, 韦宏金, 卫然, 等. 中国双盖蕨属一新记录种—*Diplazium* × *kidoi* Sa. Kurata. *植物科学学报*, 2014, 32: 336–339]
- 12 Zhang W Y, Kuo L Y, Li F W, et al. The hybrid origin of *Adiantum meishanianum* (Pteridaceae): A rare and endemic species in Taiwan. *Syst Bot*, 2014, 39: 1034–1041
- 13 Wang F H, Lu J M, Li D S. New geographical distribution of three species in *Adiantum* L. (in Chinese). *Acta Bot Boreali-Occidental Sin*, 2014, 34: 1055–1060 [王凡红, 卢金梅, 李德铎. 铁线蕨属3个种的分布新记录. *西北植物学报*, 2014, 34: 1055–1060]
- 14 Xiang L, Werth C R, Emery S N, et al. Population-specific gender-biased hybridization between *Dryopteris intermedia* and *D. carthusiana*: Evidence from chloroplast DNA. *Am J Bot*, 2000, 87: 1175–1180
- 15 Small R L, Cronn R C, Wendel J F. Use of nuclear genes for phylogeny reconstruction in plants. *Aust Syst Bot*, 2004, 17: 145–170
- 16 Masuyama S, Watano Y. Hybrid sterility between two isozymic types of the fern *Ceratopteris thalictroides* in Japan. *J Plant Res*, 1994, 107: 269–274
- 17 Lin S J, Kato M, Iwatsuki K. Electrophoretic variation of the apogamous *Dryopteris varia* group (Dryopteridaceae). *J Plant Res*, 1995, 108: 451–456
- 18 Rothfels C J, Larsson A, Li F W, et al. Transcriptome-mining for single-copy nuclear markers in ferns. *PLoS One*, 2013, 8: e76957

- 19 Koch M A, Dobeš C, Mitchell Olds T. Multiple hybrid formation in natural populations: Concerted evolution of the internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA (ITS) in North American *Arabis divaricarpa* (Brassicaceae). *Mol Biol Evol*, 2003, 20: 338–350
- 20 Wendel J F, Schnabel A, Seelanan T. Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 280–284
- 21 Zhang R, Liu T, Wu W, et al. Molecular evidence for natural hybridization in the mangrove fern genus *Acrostichum*. *BMC Plant Biol*, 2013, 13: 74
- 22 Chang H M, Chiou W L, Wang J C. Molecular evidence for genetic heterogeneity and the hybrid origin of *Acrorumohra subreflexipinna* from Taiwan. *Am Fern J*, 2009, 99: 61–77
- 23 Tian X, Li D Z. Application of DNA sequences in plant phylogenetic study (in Chinese). *Acta Bot Yunnan*, 2002, 24: 170–184 [田欣, 李德铎. DNA序列在植物系统学研究中的应用. 云南植物研究, 2002, 24: 170–184]
- 24 Liu H M, Zhang X C, Zeng H. Application of DNA sequences in pteridophyte phylogenetic study (in Chinese). *Chin Bull Bot*, 2009, 44: 143–158 [刘红梅, 张宪春, 曾辉. DNA序列在蕨类分子系统学研究中的应用. 植物学报, 2009, 44: 143–158]
- 25 Lu J M, Wen J, Lutz S, et al. Phylogenetic relationships of Chinese *Adiantum* based on five plastid markers. *J Plant Res*, 2012, 125: 237–249
- 26 Gastony G J, Yatskievych G. Maternal inheritance of the chloroplast and mitochondrial genomes in cheilanthoid ferns. *Am J Bot*, 1992, 79: 716–722
- 27 Vogel J C, Russell S, Rumsey F, et al. Evidence for maternal transmission of chloroplast DNA in the genus *Asplenium* (Aspleniaceae, Pteridophyta). *Bot Acta*, 1998, 111: 247–249
- 28 Soltis P S, Doyle J J, Soltis D E. Molecular data and polyploid evolution in plants. In: Soltis P S, Soltis D E, Doyle J J, eds. *Molecular Systematics of Plants*. Berlin, Heidelberg: Springer, 1992. 177–201
- 29 Schuettpelz E, Korall P, Pryer K M. Plastid atpA data provide improved support for deep relationships among ferns. *Taxon*, 2006, 55: 897–906
- 30 Schuettpelz E, Pryer K M. Fern phylogeny inferred from 400 leptosporangiate species and three plastid genes. *Taxon*, 2007, 56: 1037
- 31 Little D P, Barrington D S. Major evolutionary events in the origin and diversification of the fern genus *Polystichum* (Dryopteridaceae). *Am J Bot*, 2003, 90: 508–514
- 32 Lu J M, Li D Z, Gao L M, et al. Paraphyly of *Cyrtomium* (Dryopteridaceae): Evidence from *rbcL* and *trnL-F* sequence data. *J Plant Res*, 2005, 118: 129–135
- 33 Taberlet P, Gielly L, Pautou G, et al. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol Biol*, 1991, 17: 1105–1109
- 34 Shaw J, Lickey E B, Beck J T, et al. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *Am J Bot*, 2005, 92: 142–166
- 35 Souza Chies T T, Bittar G, Nadot S, et al. Phylogenetic analysis of Iridaceae with parsimony and distance methods using the plastid gene *rps4*. *Plant Syst Evol*, 1997, 204: 109–123
- 36 Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 2009, 25: 1451–1452
- 37 Hall T A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser*, 1999, 42: 95–98
- 38 Swofford D L. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods). Version 4., 2003
- 39 Huelsenbeck J P, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 2001, 17: 754–755
- 40 Ronquist F, Huelsenbeck J P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 2003, 19: 1572–1574
- 41 Posada D, Buckley T R. Model selection and model averaging in phylogenetics: Advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Syst Biol*, 2004, 53: 793–808
- 42 Posada D, Crandall K A. Modeltest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 1998, 14: 817–818
- 43 Grant V. *Plant Speciation: Maps, Chromosome Numbers*. New York: Columbia University Press, 1981
- 44 Paris C A, Wagner F S, Wagner W H. Cryptic species, species delimitation, and taxonomic practice in the homosporous ferns. *Am Fern J*, 1989, 79: 46–54
- 45 Wu W, Zhou R, Huang Y, et al. Molecular evidence for natural intergeneric hybridization between *Liquidambar* and *Altingia*. *J Plant Res*, 2010, 123: 231–239
- 46 Wu Z Y, Raven P H, Hong D Y. *Flora of China*. Beijing: Science Press; St.Louis: Missouri Botanical Garden Press, 2013, 2–3: 242
- 47 Toshiyuki N. Index to scientific names of Japanese Pteridophytes. *J Nippon Fernist Club*, 2004
- 48 Palmer D D. *Hawaii' Ferns and Fern Allies*. Honolulu: University of Hawaii Press, 2003

- 49 Kranz H D, Huss V A. Molecular evolution of pteridophytes and their relationship to seed plants: evidence from complete 18S rRNA gene sequences. *Plant Syst Evol*, 1996, 202: 1–11
- 50 Sanchez B P. Phylogenetics and biogeography of the neotropical fern genera *Jamesonia* and *Eriosorus* (Pteridaceae). *Am J Bot*, 2004, 91: 274–284
- 51 Schuettelpelz E, Grusz A L, Windham M D, et al. The utility of nuclear gapCp in resolving polyploid fern origins. *Syst Bot*, 2008, 33: 621–629
- 52 Shepherd L D, Perrie L R, Brownsey P J. Low-copy nuclear DNA sequences reveal a predominance of allopolyploids in a New Zealand *Asplenium* fern complex. *Mol Phylogenet Evol*, 2008, 49: 240–248
- 53 Barton N H, Hewitt G. Analysis of hybrid zones. *Annu Rev Ecol Syst*, 1985, 16: 113–148
- 54 Mayr E. Animal species and evolution. Cambridge (Massachusetts): Belknap Press, 1963
- 55 Zhang X C. Hybrids of fern in China (in Chinese). *Bull Biol*, 1993, 3: 4 [张宪春. 我国的蕨类植物杂交种. 生物学通报, 1993, 3: 4]

A new cryptic hybrid species of *Adiantum* L. (Pteridaceae) identified by nuclear and chloroplast DNA sequences

WANG Ying^{1,2}, SHANG Hui¹, GU YuFeng^{1,2}, WEI HongJin¹, ZHAO GuoHua^{1,3}, DAI XiLing² & YAN YueHong¹

¹Chenshan Botanical Garden, Shanghai Chenshan Plant Science Research Center, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201602, China;

²College of Life and Environmental Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China;

³Harbin Normal University, Key Laboratory of Plant Biology, College of Heilongjiang Province, Harbin 150025, China

Natural hybridization has been commonly found in ferns and is generally believed to happen independently at different locations if the range of the parent species overlaps. In 2013, we collected seven species of *Adiantum* from Yuanjiang, Yunnan, China. The identity of one of these collections remained in doubt; the plant is very similar to *A. meishanianum* (*A. malesianum* × *A. philippense*), a natural hybrid from Taiwan, China. Morphological comparison showed that this unidentified collection was different from other related taxa. Sequencing of a single copy of an exon (*CRY2* exon 3) of the nuclear genome suggested this plant contained haplotype sequences of both *A. sinicum* and *A. menglianense*. Therefore, it should be treated as a new hybrid. Phylogenetic analysis based on five chloroplast DNA sequences (*rbcL*, *atpB*, *atpA*, *trnL-F* and *rps4-trnS*) indicated that the plant was clustered in *A. sinicum*, which could be considered to be the female parent of the hybrid. This new hybrid is not only similar to *A. meishanianum* in morphology, but also its parental taxa are in sister groups in the phylogeny. Hence, the new hybrid was considered to be a cryptic hybrid species. Our methods could be extended to identify other potential natural fern hybrids in China. The habit of clonal propagation potentially occurs in nature, so this natural hybrid could easily survive in the field because clonal growth can offset the lack of fitness caused by sexual reproductive isolation, which may be an important reason why so many hybrid ferns exist in nature.

fern, *Adiantum*, nuclear DNA sequence, chloroplast DNA sequence, natural hybrid, fitness, cryptic species

doi: 10.1360/N972014-00891