

根据 cpDNA *trnL-F* 非编码区序列变异分析黑桫欏 海南和广东种群的遗传结构与系统地理

苏应娟, 王 艇, 郑 博, 江 宇, 欧阳蒲月, 陈国培, 王伯荪

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘要:以黑桫欏分布在海南和广东 9 个种群为材料, 通过 PCR 产物直接测序和克隆后再测序的方法测定了叶绿体 DNA (cpDNA) *trnL-F* 非编码区序列。序列长度介于 1017bp 至 1021bp; 碱基组成 A+T 含量较高, 百分比值为 60.43%~62.26%。根据序列的核苷酸变异共鉴定出 15 个单倍型。黑桫欏具高水平单倍型多样性 ($h=0.880$) 和较高水平核苷酸多样性 ($D_{ij}=0.00342$), 其悠长的进化历史可能增加了遗传变异在谱系内的积累。单倍型最小生成网图和邻接树、种群间分化度 ($F_{ST}=0.12645$) 和基因流 ($Nm=3.49$)、AMOVA 分析 (地区间遗传变异占 11.91%, $p>0.05$) 以及 DNA 歧义度结果一致显示, 黑桫欏分布在海南和广东的种群彼此间不存在遗传分化。黑桫欏单倍型的系统发育地理式样具“星状”特征, 提示种群在历史上曾经发生过扩张, 扩张后的种群还未能获得足够时间去建立更加复杂的结构。

关键词:黑桫欏; cpDNA *trnL-F* 非编码区; 单倍型; 遗传结构; 地理分化

Genetic structure and phylogeography of populations of *Alsophila podophylla* in Hainan and Guangdong, southern China, based on cpDNA *trnL-F* noncoding sequences

SU Ying-Juan, WANG Ting, ZHENG Bo, JIANG Yu, OUYANG Pu-Yue, CHEN Guo-Pei, WANG Bo-Sun (School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(5): 914~919.

Abstract: *Alsophila podophylla* Hook is a large perennial herbaceous fern species belonging to family Cyatheaceae in taxonomy. In this research, population genetic structure and phylogeographical pattern of the species were inferred from variations of chloroplast DNA (cpDNA) *trnL-F* noncoding sequences. 9 natural populations were sampled, locating at Jian Feng Ling (HNJFL), Wu Zhi Shan (HNWZS), and Diao Luo Shan (HNDLS) in Hainan Province, as well as Gui Keng (ZQDHG), Ji Feng Lin (ZQDHJ), Da Chong (FKHDC), Du Tian (FKHDT), Xue Si Shang You (FKHXU), and Xue Si Xia You (FKHDX) in Guangdong Province of southern China. cpDNA *trnL-F* noncoding regions were determined by cycle sequencing or sequencing cloned PCR products. Sequence length varied from 1017 bp to 1021bp. Base composition was with high A+T content of 60.43%~62.26%. 15 haplotypes were identified based on nucleotide variation. Relatively high level of haplotype diversity ($h=0.880$) and nucleotide diversity ($D_{ij}=0.00342$) were detected in *A. podophylla*. This is probably associated with its long evolutionary history which allowed the accumulation of genetic variation within lineages. Minimum spanning network constructed from *trnL-F* haplotypes showed that haplotypes identified in Hainan populations rapidly coalesced to those in Guangdong populations with short branch length of one or two mutations. In neighbor-joining tree, haplotypes of Hainan and Guangdong populations were exhibited as highly mixed branches, neither forming as a monophyletic group. Gene genealogies of *trnL-F* haplotypes suggested a close genetic relationship between populations of *A. podophylla* distributed in

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170101);国家自然科学基金重点资助项目(39830310);广东省自然科学基金资助项目(011125)

收稿日期:2003-09-08; **修订日期:**2003-12-28

作者简介:苏应娟, (1965~), 女, 湖北人, 博士, 副教授, 主要从事植物生态学研究。E-mail: ls97@zsu.edu.cn

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 30170101); Key project supported by National Natural Science Foundation of China (No. 39830310); Natural Science Foundation of Guangdong Province, China (No. 011125)

Received date: 2003-09-08; **Accepted date:** 2003-12-28

Biography: SU Ying-Juan, Ph. D., Associate professor, mainly engaged in plant ecology. E-mail: ls97@zsu.edu.cn

Hainan and Guangdong. Investigations of population differentiation ($F_{ST} = 0.12645$), gene flow ($Nm = 3.49$), AMOVA (11.91% genetic variation was partitioned among regions, $p > 0.05$), and DNA divergence also demonstrated that no genetic differentiation occurred between populations of Hainan and Guangdong. A "star like" pattern of phylogeography of haplotypes was uncovered in *A. podophylla*, which meant an outcome of population expansion during its evolutionary history, and since then there will have been insufficient time to form a more complicated population structure.

Key words: *Alsophila podophylla*; cpDNA *trnL-F* noncoding sequence; haplotype; genetic structure; geographical differentiation

文章编号:1000-0933(2004)05-0914-06 中图分类号:Q234,Q941,Q948 文献标识码:A

黑桫欏(*Alsophila podophylla* Hook.)属桫欏科(Cyatheaceae)桫欏属(*Alsophila*)黑桫欏亚属(Subgenus *Gymnosphaera*)^[1],为多年生大型草本地生蕨类植物。桫欏类植物在中生代中期曾广泛分布,极为繁盛。随后由于地质变迁和气候变化,特别是第四纪冰川的作用,不少种类绝灭;残存种的分布区也急剧收缩,仅在热带和亚热带山林中的适宜生境内得以保留^[2-3]。现存的黑桫欏一般生长在海拔 350~700m 的密林下,常见于林缘草地、林内阴湿地以及溪谷旁湿地。在我国的贵州、云南、广西、海南、广东、福建和台湾均有分布^[1-4],是研究蕨类植物种群结构和系统地理的重要材料。

对种子植物的研究发现,决定种群遗传结构的因素包括繁育系统、基因流、选择压力、突变、遗传漂变、种内系统发育、进化过程、生活史及生境特征^[5]。然而,由于对蕨类植物种群的遗传变异和地理分化研究还相对很少,上述因素在蕨类植物的种群遗传结构形成过程中是否也起决定作用,迄今仍不确定。近年来,基因谱系(gene genealogy)和接合理论(coalescence theory)为在分子水平上探讨种群的遗传变异和分化开辟出新的途径^[6]。两者的联合运用可以揭示种群形成、分布及扩张等方面的诸多信息^[7]。现在叶绿体 DNA(cpDNA)非编码区核苷酸序列变异已被经常用于分析植物的种群遗传变异和系统地理学问题^[8-9]。其单亲遗传和进化上近中性、速率快的特征非常适合于重建植物种内系统地理格局^[10]。另外,技术上选择 DNA 测序的方法还可以避免在利用限制片段长度多态性(RFLP)和基于 PCR 的指纹图谱法时经常遇到的长度同塑性(length homoplasy)问题,从而提高估算种群遗传结构和基因流的分辨率^[11]。

本研究以黑桫欏分布在海南和广东的 9 个种群为材料,通过分析 cpDNA *trnL-F* 非编码区序列数据,初步研究了这些种群的遗传结构和系统地理,目的是:(1)检测种群遗传多样性及其分配状况;(2)分析位于海南和广东的种群在地区间水平上是否存在地理分化;(3)探讨和黑桫欏种群遗传结构形成有关的因素。

1 材料和方法

1.1 植物材料

样本分别采自广东封开黑石顶大冲(FKHDC)、独田(FKHDT)、学思上游(FKH XU)和学思下游(FKH XD),肇庆鼎湖山鬼坑(ZQDHG)和季风林(ZQDHJ)以及海南尖峰岭(HNJFL)、五指山(HNWZS)和吊罗山(HNDLS)(表 1)。黑石顶大冲、独田、学思上游和学思下游种群生长于河边、山谷;鼎湖山鬼坑和季风林种群生长于鼎湖山树木园;尖峰岭种群生长于海拔 850m 山林中溪边;五指山种群生长于海拔 800~850m 山林中的沟谷或溪边;吊罗山种群生长于海拔 600~700m 山林中的瀑布边。样本数总计 99 株。随机选取样本时,样本间距离至少保持 5m。采集的叶片材料立即用硅胶干燥或贮藏在冰壶中,运至实验室后-20℃保存。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取与 PCR 扩增反应 采用改进的十六烷基三甲基溴化胺(CTAB)法^[12]。测定紫外光吸收以确定 DNA 浓度和纯度,琼脂糖凝胶电泳检查 DNA 完整性。每 100μl PCR 反应体积中包括:50 mmol/L KCl; 10 mmol/L Tris-HCl; 1.5 mmol/L MgCl₂; 0.1% Triton X-100; dNTP 各 200 μmol/L; 模板用量为 50ng; 2.0 单位 *Taq* DNA 聚合酶;引物各 40 pmol。扩增 cpDNA *trnL-F* 非编码区引物采用 Taberlet 等的设计^[13],引物 1: 5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3',引物 2: 5'-CGAAATCG GTAGACGCTAC G-3'。引物由上海博亚生物技术有限公司合成。PCR 反应程序为:94℃ 预变性 3min;94℃ 45s, 55℃ 60s, 72℃ 90s, 30 个循环;末次循环 72℃ 延伸 7min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测分子量。

1.2.2 PCR 扩增产物直接测序 取 PCR 产物 5μl 测序,测序引物与 PCR 反应引物相同。

1.2.3 低熔点琼脂糖回收 PCR 产物与克隆测序 1.0% 琼脂糖凝胶 1×TAE 电泳 2h(电压为 5V/cm),切下目的片段,用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收 PCR 产物。回收所得 PCR 产物采用 pMD18-T Vector 试剂盒连接,转化导入由大肠杆菌 DH-5α 所制的感受态细胞中,采用蓝白斑筛选法获得克隆。使用 PCR 法确认 T 载体中插入片段的大小,鉴定阳性克隆。用阳性克隆提取质粒做模板,应用 pMD18-T Vector 两端通用引物 M13F 和 M13R 在 ABI377 自动测序仪上测序。

1.3 数据分析

测定的 *trnL-F* 非编码区单倍型序列 Genbank 登录号为 AY303515-AY303538。序列比对使用 Clustal X 软件^[14]完成。应用 BioEdit 软件^[15]统计序列长度变异和序列的核苷酸组成。运用 DnaSP 软件^[16]计算单倍型多样性 (h) 与核苷酸多样性 (D_{ij})。Minspnet 软件^[17]求算最小生成网图 (Minimum Spanning Network)。使用 PHYLIP 软件包^[18]计算单倍型间的 Kimura 双参数遗传距离, 并进行邻接法 (Neighbor-joining Method) 分析。通过 Bootstrap 法检验重建分支的可信度。对中国桫欏科植物的分子系统发育研究表明毛轴桫欏 (*Cyathea pseudogigantea*), 篦齿桫欏 (*Cyathea pectinata*), 大桫欏 (*Cyathea gigantea*) 和狭羽桫欏 (*Cyathea tinganensis*) 组成的分支与黑桫欏互为姊妹群^[19], 为此进行最小生成网图和邻接法分析时选取它们作为外类群。种群内和种群间的基因流用每代雌性个体迁移数 (Nm) 估计, 该值可由公式 $F_{ST} = 1/(1+2Nm)$ 求出, 其中 N 是雌性有效种群大小, m 是雌性迁移率^[20]。选用 Arlequin 软件^[21]进行分子方差分析 (AMOVA), 计算种群内、种群间及不同地区间种群的变异方差分布。

2 实验结果

2.1 单倍型多样性与核苷酸多样性

本研究运用对 PCR 产物直接测序和克隆后再测序的方法测定了黑桫欏 cpDNA *trnL-F* 非编码区序列。由测得序列共鉴定出 15 个 cpDNA 单倍型 (haplotype)。除封开黑石顶学思下游种群的 FKHXD05 外, 序列长度均为 1017bp。发生在位点 483、650-654 的插入和位点 823-824 的缺失导致 FKHXD05 的序列长度加长至 1021bp。A+T 含量较高, 其百分比介于 60.43%~62.26% 之间, 许多非编码区序列都具此性质。

黑桫欏 cpDNA *trnL-F* 非编码区序列的单倍型多样性 (h) 与核苷酸多样性 (D_{ij}) 见表 1。黑桫欏具高水平单倍型多样性 ($h=0.880$)。除黑石顶独田和海南吊罗山种群具同源组成外, 各种群的单倍型多样性也较高 (h 值介于 0.556~0.818)。桫欏整个种还具有较高水平的核苷酸多样性 ($D_{ij}=0.00342$)。除黑石顶独田和海南吊罗山种群外, 各种群的 D_{ij} 取值介于 0.00164 至 0.00438, 其中封开黑石顶大冲 (FKHDC) 种群的核苷酸多样性最低, 封开黑石顶学思下游 (FKHXD) 种群核苷酸多样性最高。地区水平上, 海南的单倍型多样性与核苷酸多样性 ($h=0.752$, $D_{ij}=0.00274$) 均小于广东的对应值 ($h=0.805$, $D_{ij}=0.00346$)。

2.2 叶绿体 DNA 单倍型的系统发育

本文应用最小生成网图法对叶绿体座位进行分析后重建出黑桫欏的系统发育式样, 图 1 是基于 *trnL-F* 非编码区单倍型间的碱基突变得出的最小生成网图。单倍型的系统发育呈现“星状”式样, FKHDC07、HNWZS06 及 HNJFL01 (=HNWZS01) 仅以 1 个突变, FKHDC02、FKHXU08、FKHXU03、HNJFL02 (=HNDLS07=HNWZS02)、ZQDHJ01、ZQDHJ05 及 ZQDHG04 仅以 2 个突变, ZQDHG05 以 3 个突变, ZQDHG03 以 7 个突变与处于中心位置的 ZQDHJ04 (=ZQDHG09=FKHDT08=FKHXU10=FKHXD18=ZQDHJ06=ZQDHG01) 相连接。FKHXD05 同 ZQDHJ04 的关系相对疏远, 以 16 个突变与之相连接。在以上过程中, 黑桫欏海南种群的单倍型只以 1 或 2 个突变的枝长同广东种群单倍型很快接合; 种群在两地区间未显示地理分化。

邻接法分析发现, 所有黑桫欏单倍型序列组成一单系群, 其中 FKHXD05 首先同其余的单倍型分歧 (图 2)。没有一个来自同一种群的全部单倍型能组成单系群; 对应于不同地点的分支混合分布, 表明其间存在明显基因流。

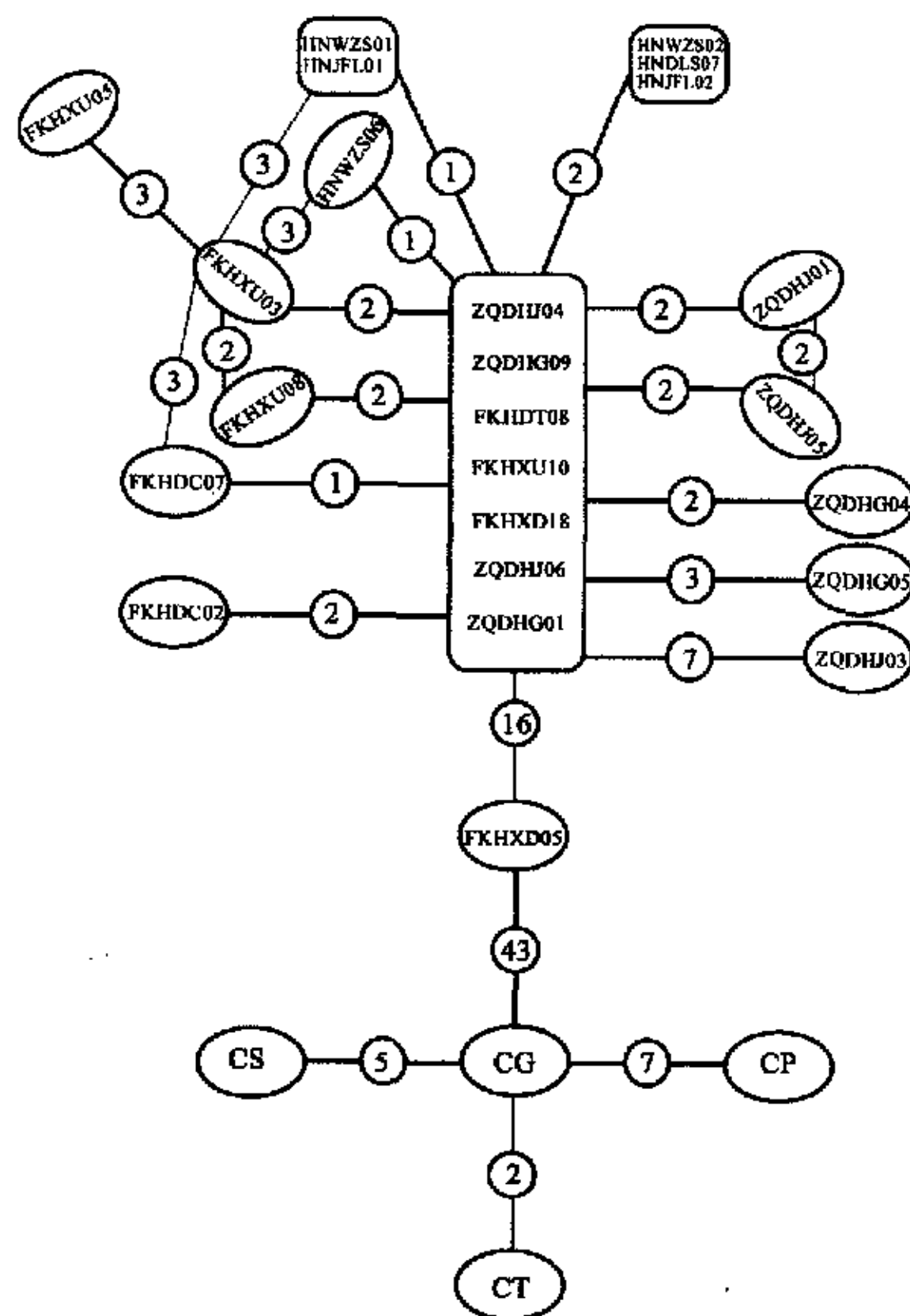


图 1 黑桫欏种群 cpDNA *trnL-F* 非编码区单倍型的最小生成网图
Fig. 1 Minimum spanning network relating haplotypes of cpDNA *trnL-F* noncoding sequences found in populations of *A. podophylla* 毛轴桫欏, 篦齿桫欏, 大桫欏和狭羽桫欏选作根 *Cyathea pseudogigantea* (CS), *Cyathea pectinata* (CP), *Cyathea gigantea* (CG), and *Cyathea tinganensis* (CT) were used to root the tree; 粗线代表单倍型之间的主连接; 细线为其他可能的连接; 线上圆圈内的数字表示单倍型间的突变数 Major links between haplotypes are represented as thick lines; Other possible link is given as thin line; Numbers in circles on links between haplotypes indicate the number of mutational differences between haplotypes

表 1 黑桫欏 cpDNA *trnL-F* 非编码区序列的单倍型多样性(h)和核苷酸多样性(D_{ij})Table 1 Haplotype diversity (h) and nucleotide diversity (D_{ij}) of cpDNA *trnL-F* noncoding sequences of *A. podophylla*

种群 Populations	地理坐标 Geographical coordinate	样本数 Sample size	单倍型多样性 Haplotype diversity(h)	核苷酸多样性 Nucleotide diversity(D_{ij})
黑桫欏 <i>A. podophylla</i>		99	0.880	0.00342±0.00036
广东 Guangdong			0.805	0.00346±0.00050
鼎湖山鬼坑 ZQDHG	112°35'E23°08'N	12	0.682	0.00201±0.00041
鼎湖山季风林 ZQDHJ	112°34'E23°06'N	15	0.771	0.00354±0.00083
黑石顶大冲 FKXDC	111°52'E23°26'N	10	0.556	0.00164±0.00022
黑石顶学思上游 FKHXU	111°53'E23°27'N	12	0.818	0.00201±0.00018
黑石顶学思下游 FKHXD	111°53'E23°25'N	10	0.556	0.00438±0.00059
黑石顶独田 FKHDT	111°52'E23°27'N	8	0.000	0.00000±0.00000
海南 Hainan			0.752	0.00274±0.00014
海南尖峰岭 HNJFL	108°44'E18°23'N	10	0.556	0.00219±0.00029
海南五指山 HNWZS	109°45'E18°53'N	12	0.727	0.00191±0.00018
海南吊罗山 HNDLS	109°53'E18°48'N	10	0.000	0.00000±0.00000

2.3 种群结构和地理分化

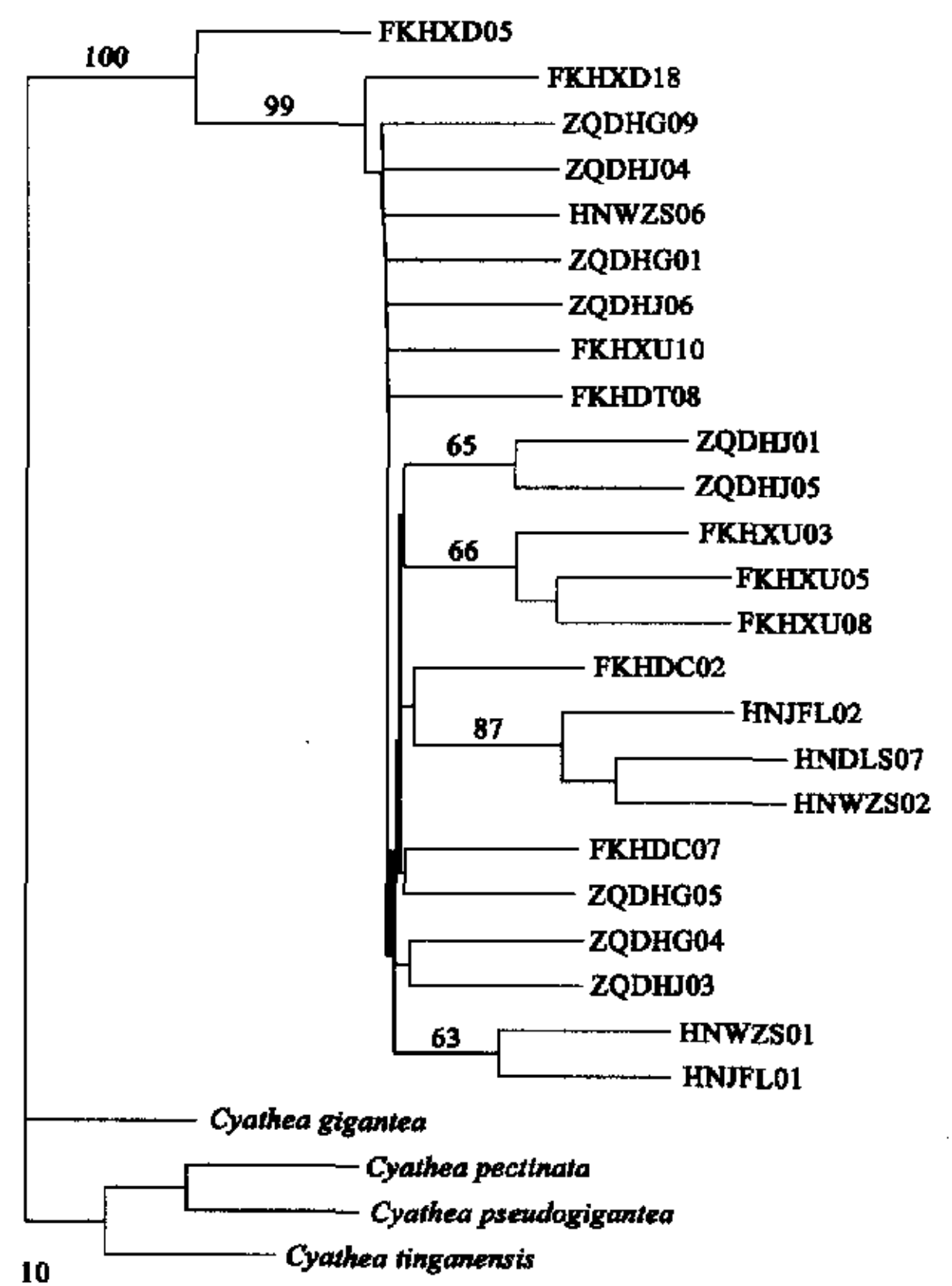
根据黑桫欏 cpDNA *trnL-F* 非编码区序列变异估算出的种群间分化度 F_{ST} (0.12645) 和基因流 Nm (3.49) 表明在海南和广东地区种群不存在分化。地区内水平上,海南种群间的 F_{ST} 为 0.00433~0.55556、 Nm 为 0.33~4.81;广东种群间 F_{ST} 介于 0.18182~0.44444、 Nm 介于 0.50~2.32 (表 2)。基于 *trnL-F* 非编码区序列变异的 AMOVA 分析表明,黑桫欏种群 55.77% 的遗传变异发生在种群内 ($p < 0.001$), 32.33% 的遗传变异发生在地区内种群间 ($p > 0.05$), 而仅有 11.91% 的遗传变异分配在地区间 ($p > 0.05$)。

从种群间 DNA 歧义度的角度分析,在地区内水平上,海南种群间的核苷酸差异平均数和每位点核苷酸替换平均数分别介于 1.500~2.833 和 0.00147~0.00279;广东种群间的核苷酸差异平均数和每位点核苷酸替换平均数分别介于 1.250~6.200 和 0.00123~0.00611 (表 3)。地区间水平上,海南与广东种群间的核苷酸差异平均数和每位点核苷酸替换平均数分别为 3.600 和 0.00355,并未超出只分布于广东的种群间的歧义度范围。

3 讨论

本研究显示,黑桫欏 *trnL-F* 非编码区序列维持着高水平的单倍型多样性 ($h = 0.880$) 和较高水平的核苷酸多样性 ($D_{ij} = 0.00342$)。造成这种状况的原因一方面可能是因为黑桫欏悠长的进化历史增加了遗传变异在谱系内的积累;另一方面是由于非编码区序列受到的功能限制偏低,进化上趋于中性,使突变在每个谱系内得以保留^[22]。对山毛榉、橡树、榕树、台湾含笑等乔木叶绿体基因组非编码区序列的分析,也都发现它们核苷酸变异的积累同进化历史、功能限制相关^[18, 23, 24]。

根据 cpDNA *trnL-F* 非编码区单倍型重建的最小生成网图和邻接树表明,黑桫欏现存于海南和广东种群之间的遗传关系接近;海南单倍型或广东单倍型各自均不构成单系分支而呈混合分布,并且海南单倍型 (HNWZS01-02、HNJFL01-02 及 HNDLS07) 以 1 或 2 个碱基变异同广东单倍型 (ZQDHJ04) 迅速接合 (图 1, 2)。另外,种群间分化度 ($F_{ST} = 0.12645$) 和基因流 Nm (3.49)、AMOVA 分析 (地区间遗传变异占 11.91%, $p > 0.05$) 以及 DNA 歧义度结果也一致显示,黑桫欏分布在海南和广东的种群彼此间不存在遗传分化。在第三纪末期和第四纪初期由于地壳的升降运动,大陆低地发生海侵,形成了大陆与海南分

图 2 以毛轴桫欏, 篦齿桫欏, 大桫欏和狭羽桫欏为外类群构建的黑桫欏 cpDNA *trnL-F* 非编码区单倍型邻接树Fig. 2 Neighbour-joining tree of haplotypes of cpDNA *trnL-F* noncoding regions of *A. podophylla*, rooted using *Cyathea pseudogigantea*, *Cyathea pectinata*, *Cyathea gigantea*, and *Cyathea tinganensis* as outgroups

分支上为重复 1000 次的 Bootstrap 值 Numbers above branches indicate the bootstrap values of 1000 replicates

开的格局;晚更新世末,海水下降,海南与大陆再度相连,然而随着全新世气候回暖,海水回升,海南与大陆再度分离^[25],从此海南和大陆之间被宽达 20~40km 的琼州海峡阻隔。结果表明,地理隔离并未导致黑桫欏分布在海南和广东的种群发生分化。

表 2 根据 cpDNA *trnL-F* 非编码区序列比较黑桫欏种群间的 Nm (对角线上)和 F_{ST} (对角线下)

Table 2 Pairwise comparisons of Nm (above diagonal) and F_{ST} (below diagonal) between populations of *A. podophylla*, based on cpDNA *trnL-F* noncoding sequences

种群 Populations	ZQDHG	ZQDHJ	FKHDC	FKHXU	FKHDX	FKHDT	HNJFL	HNWZS	HNDLS
鼎湖山鬼坑 ZQDHG		1.64	0.81	0.83	0.62	1.87	0.74	1.21	0.22
鼎湖山季风林 ZQDHJ	0.18182		1.07	1.03	0.75	2.32	0.96	1.39	0.42
黑石顶大冲 FKHDC	0.32507	0.28829		0.55	0.50	0.56	0.50	0.70	0.14
黑石顶学思上游 FKHXU	0.31818	0.28539	0.42890		0.51	0.72	1.73	0.73	0.18
黑石顶学思下游 FKHDX	0.38191	0.35125	0.44444	0.43566		0.56	0.50	0.58	0.25
黑石顶独田 FKHDT	0.18182	0.18182	0.44444	0.41558	0.44444		0.56	1.25	0.00
海南尖峰岭 HNJFL	0.34343	0.30688	0.44444	0.14646	0.44444	0.44444		4.81	0.33
海南五指山 HNWZS	0.22874	0.21612	0.36364	0.35381	0.40152	0.27273	0.00433		0.44
海南吊罗山 HNDLS	0.68531	0.57143	0.76190	0.72727	0.62963	1.00000	0.55556	0.51515	

表 3 黑桫欏种群间的核苷酸差异平均数(对角线上)和每位点核苷酸替换平均数(对角线下)

Table 3 Average number of nucleotide differences (above diagonal) and average number of nucleotide substitution per site (below diagonal) between populations of *A. podophylla*

种群 Populations	ZQDHG	ZQDHJ	FKHDC	FKHXU	FKHDX	FKHDT	HNJFL	HNWZS	HNDLS
鼎湖山鬼坑 ZQDHG		3.450	2.750	3.000	5.250	1.250	2.750	2.583	3.250
鼎湖山季风林 ZQDHJ	0.00339		3.700	3.950	6.200	2.200	3.700	3.533	4.200
黑石顶大冲 FKHDC	0.00270	0.00364		3.250	5.500	1.500	3.000	2.833	3.500
黑石顶学思上游 FKHXU	0.00295	0.00388	0.00320		5.750	1.750	3.250	3.083	3.750
黑石顶学思下游 FKHDX	0.00517	0.00611	0.00542	0.00567		4.000	5.500	5.333	6.000
黑石顶独田 FKHDT	0.00123	0.00216	0.00147	0.00172	0.00394		1.500	1.333	2.000
海南尖峰岭 HNJFL	0.00270	0.00364	0.00295	0.00320	0.00542	0.00147		2.833	1.500
海南五指山 HNWZS	0.00254	0.00347	0.00279	0.00303	0.00525	0.00131	0.00279		2.000
海南吊罗山 HNDLS	0.00320	0.00413	0.00344	0.00369	0.00591	0.00197	0.00147	0.00197	

DNA 测序在技术上可以提高分辨种群遗传变异的能力。但是,如果只采用“概要性统计学(summary statistics)”分析方法,例如估算 F_{ST} ,蕴涵在数据中的许多信息就会被忽略,从而无法区分由不同进化过程产生的相似的遗传变异分布格局^[7]。为此,基因谱系和接合理论正在被广泛应用于种群遗传学研究,成为该领域内最重要的进展之一。本研究检测到黑桫欏海南和广东种群间的基因流 Nm 值高达 3.49。考虑到黑桫欏种群现代生境的片段化、桫欏类植物孢子体和配子体的有限迁移能力以及孢子自身生命力的脆弱性^[26],推测此高基因流值并不表示黑桫欏现存种群在地区间可以实现高效基因流,而它更可能反映的是种群历史上的迁移事件。黑桫欏单倍型在海南和广东的系统发育地理式样具“星状”特征,即围绕中心单倍型,其他单倍型大多以较短的枝长发散(图 1)。根据结合理论,这种相对简单的式样表示,种群在遇到适宜的气候环境条件时曾经发生过扩张;扩张后的种群因为还未能获得足够的时间建立更加复杂的结构故而呈现“星状”^[7]。邻接树中,海南单倍型和广东单倍型的接合发生在树的顶端或接近顶端(图 2),也提示海南种群发生于相对较近的时期。地质证据表明,在早更新世,每隔 10 万年出现的冰期后伴随有 2 万 a 温暖期(Milankovitch 循环)^[3, 27]。和许多其他蕨类植物一样^[28],黑桫欏可能通过产生大量的微小、风媒孢子随着气候条件的摆动实现种群周期性扩张。在增加种群取样的基础上,进一步鉴定原始单倍型类型、估算单倍型间的分歧时间将会有助于推定黑桫欏种群在海南和大陆之间的迁移路线。

References:

- [1] Xia Q. The classification of the Chinese Cyatheaceae. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 1989, 27(1): 1~16.
- [2] Lucansky T W. Comparative studies of the nodal and vascular anatomy in the neotropical Cyatheaceae II. Squamate genera. *Amer. J. Bot.*, 1974, 61: 472~480.
- [3] Willis K J and McElwain J C. *The Evolution of Plants*. New York: Oxford University Press, 2002.
- [4] Instituti Botanici Austro-sinensis Academiae Sinicae. *Flora Hainanica* (Tome I). Beijing: Science Press, 1964.
- [5] Loveless M D and Hamrick J L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 1984, 15: 65~95.
- [6] Castelleo J and Templeton A R. Root probability for intraspecific gene trees under neutral coalescent theory. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 1994, 3: 102~113.

- [7] Pages R D M and Holmes E. *Molecular Evolution, A Phylogenetic Approach*. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1998.
- [8] Lu S Y, Hong K H, Liu S L, *et al.* Genetic variation and population differentiation of *Michelia formosana* (Magnoliaceae) based on cpDNA variation and RAPD fingerprints: relevance to post-Pleistocene recolonization. *J. Plant Res.*, 2002, **115**: 203~216.
- [9] Huang S, Chiang Y C, Schaal B A, *et al.* Organelle DNA phylogeography of *Cycas taitungensis*, a relict species in Taiwan. *Mol. Ecol.*, 2001, **10**: 2669~2681.
- [10] Ferris C, King R A, Vainola R, *et al.* Chloroplast DNA recognizes three refugia sources of European oaks and suggests independent eastern and western immigrations to Finland. *Heredity*, 1998, **80**: 584~593.
- [11] Chiang T Y, Chiang Y C, Chen Y J, *et al.* Phylogeography of *Kandelia candel* in east Asiatic mangroves based on nucleotide variation of chloroplast and mitochondrial DNAs. *Mol. Ecol.*, 2001, **10**: 2697~2710.
- [12] Su Y J, Wang T, Yang W D, *et al.* DNA extraction and RAPD analysis of *Podocarpus*. *Acta. Sci. Natur. Univ. Sunyatseni*, 1998, **37**: 13~18.
- [13] 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.
- [14] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The Clustal X windows interface; flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.*, 1997, **24**: 4876~4882.
- [15] Hall T A. BioEdit; a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.*, 1999, **41**: 95~98.
- [16] Rozas J and Rozas R. DNASP version 3.0; an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution genetic analysis. *Bioinformatics*, 1999, **15**: 174~175.
- [17] Excoffier L and Smouse P E. Using allele frequencies and geographic subdivision to reconstruct gene trees with a species; molecular variance parsimony. *Genetics*, 1994, **136**: 343~359.
- [18] Felsenstein J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.57. Computer program, University of Washington, 1995.
- [19] Wang T, Su Y J, Zheng B, *et al.* Phylogenetic analysis of the chloroplast *trnL* intron and *trnL-trnF* intergenic spacer sequences of the Cyatheaceae plants from China. *J. Trop. Subtrop. Bot.*, 2003, **11**(2): 137~142.
- [20] Slatkin M. Isolation by distance in equilibrium and nonequilibrium populations. *Evolution*, 1993, **47**: 264~279.
- [21] Schneider S, Roessli D, Excoffier L. *Arlequin ver. 2.000; A software for population genetics data analysis*. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland, 2000.
- [22] Chiang T Y and Schaal B A. Phylogeography of ten North American *Hylocomium splendens* based on nrDNA ITS sequences. *Mol. Ecol.*, 1999, **8**: 1037~1042.
- [23] Petit R J, Pineau E, Demesure B, *et al.* Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, **94**: 9996~10001.
- [24] Demesure B, Comps B, Petit R J. Chloroplast DNA phylogeography of the common beech (*Fagus sylvatica* L.) in Europe. *Evolution*, 1996, **50**: 2515~2520.
- [25] Xing F W, Wu T L, Li Z X, *et al.* Endemic plants of Hainan island. *J. Trop. Subtrop. Bot.*, 1995, **3**(1): 1~12.
- [26] Chen Z Y, Tao G D, Xu Z F. A study on the biological characteristics and the endangering factors of *Alsophila spinulosa*. *Acta Botanica Yunnanica*, 1990, **12**(2): 186~190.
- [27] Bennett K D. Milankovitch cycles and their effects on species in ecological and evolutionary time. *Paleobiology*, 1990, **16**: 11~21.
- [28] Van Zanten B O. Experimental studies of trans-oceanic long-range dispersal of moss spores in the Southern Hemisphere. *J. Hatton. Bot. Lab.*, 1978, **44**: 455~482.

参考文献:

- [1] 夏群. 中国桫欏科植物的分类. 植物分类学报, 1989, **27**(1): 1~16.
- [4] 中国科学院华南植物研究所. 海南植物志(第一卷). 北京: 科学出版社, 1964.
- [19] 王艇, 苏应娟, 郑博, 等. 中国桫欏科植物叶绿体 *trnL* 内含子和 *trnL-trnF* 基因间隔区序列的系统发育分析. 热带亚热带植物学报, 2003, **11**(2): 137~142.
- [25] 邢福武, 吴德邻, 李泽贤, 等. 海南岛特有植物的研究. 热带亚热带植物学报, 1995, **3**(1): 1~12.
- [26] 程治英, 陶国达, 许再富. 桫欏濒危原因的探讨. 云南植物研究, 1990, **12**(2): 186~190.