



基于 ITS 和 *trnL-F* 以及 *rps4* 基因片段的 粗疣藓属分类学地位研究

李晓芹¹, 马 婧¹, 李 敏², 王幼芳^{1*}

(1 华东师范大学 生命科学学院, 上海 200241; 2 河北师范大学 生命科学学院, 石家庄 050024)

摘 要: 选择粗疣藓属及相关属样本作为内群, 油藓属样本作为外群, 选取核基因 ITS 片段以及叶绿体基因 *trnL-F* 和 *rps4* 片段进行 PCR 扩增、测序, 运用贝叶斯推论(BI)、最大似然法(ML)和最大简约法(MP)构建分子系统发育树, 以明确粗疣藓属的分类学地位。结果表明: (1) 用于分子系统分析的基因序列共有 1 744 个位点, 其中 747 个位点属于核基因片段, 997 个位点属于叶绿体基因片段。 (2) 3 种系统发育树拓扑结构基本一致, 都显示粗疣藓属与毛锦藓科成员聚成一支, 支持粗疣藓属应隶属于毛锦藓科的观点。 (3) 小粗疣藓和粗疣藓的种间界限模糊。 (4) 小鼠尾藓属的 3 个种与棉藓属成员聚成一支, 支持将其归入棉藓科的观点。

关键词: 粗疣藓属; 鳞藓科; 毛锦藓科; 分子系统学

中图分类号: Q789

文献标志码: A

Taxonomic Status of *Fauriella* Besch. Inferred from ITS, *trnL-F* and *rps4* Gene Regions

LI Xiaoqin¹, MA Jing¹, LI Min², WANG Youfang^{1*}

(1 School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200241, China; 2 College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050024, China)

Abstract: To clarify the obscured taxonomic status of *Fauriella* Besch., we carried out phylogenetic analyses inferred from cp *trnL-F*, *rps4* and nr ITS, with increased samples of *Fauriella* and related genera, and *Hookeria* Sm. selected as outgroup. The phylogenetic trees were conducted by Bayesian analyses, ML analyses, and MP analyses. The results were as follows: (1) The final alignment used for phylogenetic analyses contained 1 744 positions, including 747 nuclear region positions and 997 plastid positions; (2) There was no significant topological conflict among the consensus trees, which showed that *Fauriella* clustered with the members of Pylaisiadelphaceae and indicated that *Fauriella* should be put into Pylaisiadelphaceae; (3) The relationship between *Fauriella tenerrima* Broth. and *Fauriella tenuis* (Mitt.) Cardot is obscured; (4) 3 species of *Myurella* Bruch & Schimp. are clustered with the members of *Plagiothecium* Bruch & Schimp., which is congruent with the point that *Myurella* should be transferred to Plagiotheciaceae.

Key words: *Fauriella*; Theliaceae; Pylaisiadelphaceae; molecular phylogeny

粗疣藓属 (*Fauriella* Besch.) 建立于 1893 年^[1], 主要分布于亚洲的温带、亚热带以及热带的高山地区^[1-8]。该属的主要识别特征为: (1) 鳞毛披针形, 较

收稿日期: 2013-10-14; 修改稿收到日期: 2013-11-16

基金项目: 国家自然科学基金(31270255)

作者简介: 李晓芹(1989—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事藓类植物分子系统学研究。E-mail: lxq0504@126.com

* 通信作者: 王幼芳, 教授, 博士生导师, 主要从事苔藓植物分类学研究。E-mail: yfwang@bio.ecnu.edu.cn

稀少;(2)叶卵形,内凹,角区不下延;(3)叶先端细胞和叶缘细胞无疣外,其余叶细胞均具单个粗疣;(4)孢蒴倾立,环带多分化^[6-8]。粗疣藓属在东亚分布有 3 种,分别为大粗疣藓(*F. robustiuscula* Broth.)、小粗疣藓(*F. tenerrima* Broth.)和粗疣藓[*F. tenuis* (Mitt.) Cardot]^[6-9]。其中,大粗疣藓以其较为粗大的植物体、叶具长渐尖、中部细胞线形明显区别于另外 2 种;而小粗疣藓和粗疣藓植物体细小,叶中部细胞短菱形,两者的差别仅在于小粗疣藓叶疏生、鳞毛状、急尖,而粗疣藓的叶紧密覆瓦状着生、渐尖^[6-9]。

鳞藓科包含 3 个属,即鳞藓属(*Thelia* Sull.)、小鼠尾藓属(*Myurella* Bruch & Schimp.)和粗疣藓属^[6-10]。目前,小鼠尾藓属已被证实为棉藓科(Plagiotheciaceae)成员之一^[11-12]。而有关粗疣藓属分类学地位的研究仅基于形态学^[13-14],在对整个藓类植物的分子系统学研究^[15]中稍有涉及,但观点不同,例如,Goffinet 等^[13]依据粗疣藓属和羽藓科(Thuidiaceae)植物的叶细胞都具疣的形态特征,将粗疣藓属移入羽藓科中;根据粗疣藓属植物叶卵圆形、长锐尖,叶细胞具疣,以及孢蒴倾立、长圆柱形的形态特征与异枝藓科(Heterocladiaceae)植物相似,Frey^[14]将粗疣藓属归入异枝藓科中。以上观点都是基于形态学研究结果。Cox 等^[15]对藓类植物属的分子系统学研究中涉及到一份粗疣藓样本,该份样本与毛锦藓科(Pylaisiadelphaceae)成员聚成一支,虽然支持率不高,但也显示出粗疣藓属和毛锦藓科亲缘关系较近。Cox 等^[15]虽运用到了分子系统学方法,但研究重点不是粗疣藓属,并且只选用了 1 份该属样本。

综上所述,粗疣藓属分类地位存在争议。除各地区植物志对粗疣藓属的记载外,基于多份样本的形态学与分子系统学相结合的有关该属的系统研究尚未开展。本文通过增加采样点和样本量,运用经典分类学和分子系统学相结合的方法,进一步深入探讨粗疣藓属的分类学地位,以期对粗疣藓属及其相关类群的分类学研究提供新的资料和佐证。

1 材料和方法

1.1 实验材料

选取与粗疣藓属相关的 6 科、9 属、15 种共 21 份样本(表 1),其中内群 5 科 8 属 14 种 20 份样本,油藓属(*Hookeria* Sm.)的油藓[*Hookeria lucens* (Hedw.) Sm]^[16]作为外群。内群中粗疣藓属样本

的鉴定主要依据各物种相关文献中形态特征的描述^[2,4,6-9,17]。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取及 PCR 扩增 本研究采用改良 Lysis 法提取基因组 DNA^[18],PCR 扩增和测序所用的引物一致(表 2)。3 条基因片段的扩增程序相同,即 95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s,50 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 90 s,35 个循环;72 °C 终延伸 5 min;最后 4 °C 恒温。扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳上检测,纯化及测序由杰李公司完成(中国,上海)。

1.2.2 数据分析 本研究运用贝叶斯推论(BI)、最大似然法(ML)和最大简约法(MP)3 种系统树构建方法进行分子系统学分析。相关数据分析过程、BI 和 MP 系统树的构建方法等参照 Li 等^[24]。有关 ML 分析,首先利用 Jmodeltest 2.1.1 软件^[25-26]选择最优的 DNA 核苷酸替代模型及相关参数,再采用 PhyML-aBayes 软件^[27],执行 100 次自举重复,构建 ML 系统发育树。每次分析中分别重建每个基因片段的系统树,在树形没有显著冲突的前提下再进行多基因片段合并数据集的系统分析。最后,采用 Treegraph2 软件^[28]整合从每种分析方法中得到的一致树及各分支的支持率。

2 结果与分析

2.1 序列分析

在所得到的 57 条序列中,其中 23 条序列为本研究新增,其余从 GenBank 下载得到。删除各序列两端不完整区段后,本研究用于分子系统分析的序列共有 1 744 个位点,其中 747 个位点属于核基因片段,997 个位点属于叶绿体基因片段(表 3)。用于合并数据集 ML 分析的最优模型为 TVM+ γ 。

2.2 系统发育分析

BI 分析(抛弃最初 250 棵树,总结自 14 366 个样本, $-\ln L = 5\,596.98$)、ML 分析(由 100 棵树整合得出)和 MP 分析(最简约树的数目为 1,树长 = 697, $CI = 0.845$, $RI = 0.876$)获得的系统树树形基本一致,无冲突节点。因此,本研究选取贝叶斯分析的 50% 多数一致树作为骨架,并将 BI 后验概率(PP)、ML(MLBS)及 MP(MPBS)分析得到的支持率分别标注在各分支上(图 1)。

图 1 表明,粗疣藓属的小粗疣藓和粗疣藓聚成单系类群(1PP;98MLBS;100MPBS),并与毛锦藓科的弯叶毛锦藓[*Pylaisiadelpha tenuirostris* (Bruch & Schimp. ex Sull.) W. R. Buck]、纤枝同

表 1 本实验所用分子样本信息及 GenBank 收录号

Table 1 Voucher information and GenBank accession numbers for taxa sequenced

种名 Species	GenBank 收录号 Genbank accession number			标本信息 Voucher of specimen
	ITS	<i>trnL</i> -F	<i>rps4</i>	
小粗疣藓 <i>Fauriella tenerrima</i> Broth.	KF751623	KF772184	KF772176	中国浙江,汪岱华 70 Zhejiang,China,Daihua Wang70 (HSNU)
小粗疣藓 <i>F. tenerrima</i> Broth.	KF751624	KF772185	KF772177	中国浙江,汪岱华 112 Zhejiang,China,Daihua Wang112 (HSNU)
小粗疣藓 <i>F. tenerrima</i> Broth.	KF751625	KF772186	KF772178	中国浙江,汪岱华 664 Zhejiang,China,Daihua Wang664 (HSNU)
小粗疣藓 <i>F. tenerrima</i> Broth.	KF751622	KF772183	KF772175	中国贵州,F08117 Guizhou,China, s. n. F08117 (GACP)
粗疣藓 <i>Fauriella tenuis</i> (Mitt.) Cardot	KF751626	KF772187	KF772179	日本,左勤 009 Japan,Qin Zuo009 (HSNU)
粗疣藓 <i>F. tenuis</i> (Mitt.) Cardot	KF751627	KF772188	KF772180	中国广西,左勤 442 Guangxi,China,Qin Zuo442 (HSNU)
粗疣藓 <i>F. tenuis</i> (Mitt.) Cardot	—	KF772190	KF772182	中国广西,左勤 1734 Guangxi,China,Qin Zuo1734 (HSNU)
粗疣藓 <i>F. tenuis</i> (Mitt.) Cardot	KF751628	KF772189	KF772181	中国福建,吴文英 141 Fujian,China,Wenying Wu 141 (HSNU)
异枝藓 <i>Heterocladium procurrens</i> (Mitt.) A. Jaeger	FM16118	AY683587	—	ITS-s. n. (H;H3212289); <i>trnL</i> -F-vitt 35998 (MO)
油藓 <i>Hookeria lucens</i> (Hedw.) Sm.	HM751394	—	AY908233	He S. & Song J. S. 00237 (MO)
纤枝同叶藓 <i>Isopterygium minutirameum</i> (Müll. Hal.) A. Jaeger	—	AF469819	JQ965254	Streimann s. n. (S;B53498)
柔叶同叶藓 <i>Isopterygium tenerum</i> (Sw.) Mitt.	HE660021	AF161130	AF143037	ITS-Merrill 13306 (BONN); <i>trnL</i> -F & <i>rps4</i> -Buck 33462 (NY)
小鼠尾藓 <i>Myurella julacea</i> (Schwägr.) Schimp.	JQ795972	AF472460	AF469821	Schofield 108655 (MO)
刺叶小鼠尾藓 <i>Myurella sibirica</i> (Müll. Hal.) Reimers	JQ795973	JX188016	JQ965251	Schofield & Belland 97712 (UBC)
细枝小鼠尾藓 <i>Myurella tenerrima</i> (Brid.) Lindb.	JQ795974	AF472461	AF469822	Schofield 97975 (DUKE)
扁平棉藓 <i>Plagiothecium neckeroideum</i> Schimp.	JQ795981	AF472469	AF469830	Tan s. n. (S;B53502)
垂蒴棉藓 <i>Plagiothecium nemorale</i> (Mitt.) A. Jaeger	JQ795980	AF472470	AF469831	Hedenäs s. n. (S;B42785)
毛尖棉藓 <i>Plagiothecium piliferum</i> (Sw.) Schimp.	JQ795984	AF472471	AF469832	Schofield 109202 (DUKE)
弯叶毛锦藓 <i>Pylaisiadelphatenuirostris</i> (Sull.) Buck	—	AF161146	AF143053	Buck 32500 (NY)
<i>Thelia lescurii</i> Sull.	—	AF161117	AF143024	—
细枝羽藓 <i>Thuidium delicatulum</i> (Hedw.) Schimp.	AF176278	AF161132	AF143039	Buck 32594 (NY)

注:加粗序列为本实验新增序列,其余从 GenBank 下载获得。
Note:The sequences in bold were newly generated in this study,the remains were downloaded from GenBank.

表 2 PCR 扩增和测序引物信息
Table 2 Primers for PCR amplification
and sequencing reactions

基因片段 Region	引物 Primer	引物序列 Sequence of primer(5'-3')
核基因 Nuclear gene	ITS	B18SF ^[19] GGTGAAGTTTTCGGATCGCG
		B5.8SR ^[19] TCGGTTCTTCATCGTTGC
		B5.8SF ^[19] GACTCTCAGCAACGGATA
		B26SR ^[19] AGATTTTCAAGCTGGGCT
叶绿体基因 Chloroplast gene	<i>trnL</i> -F	trnC ^[20] CGAAATCGGTAGACGCTACG
		trnF ^[20] ATTTGAACGTGGTGACACGAG
	<i>rps4</i>	rps5 ^[21] ATGTCCCGTTATCGAGGACCT
		trnas ^[22-23] TACCGAGGGTTCGAATC

叶藓 [*Isopterygium minutirameum* (Müll. Hal.) A. Jaeger]和柔叶同叶藓 [*I. tenerum* (Sw.) Mitt.] 以较高的支持率聚成一支 (1PP; 84MLBS; 93MPBS);但与异枝藓科的异枝藓 [*Heterocladium*

表 3 各序列长度、简约位点 (p. i. 位点) 和
贝叶斯分析中各序列的最佳替代模型

Table 3 The Bayesian analyses of sequence length (length),
parsimony-informative sites (p. i. sites) and optimal
substitution models (Model for Bayes)

基因片段 Region	长度 Length/bp	简约信息位点 p. i. site	贝叶斯最佳替代模型 Model for Bayes
ITS	0~674	124	HKY+I
<i>rps4</i>	0~620	45	GTR+G
<i>trnL</i> -F	320~372	34	HKY+G

procurrens (Mitt.) A. Jaeger]、鳞藓科的 *Thelia lescurii* Sull.、羽藓科的细枝羽藓 [*Thuidium delicatulum* (Hedw.) Schimp.]以及棉藓科成员距离较远。

小鼠尾藓属内的小鼠尾藓 [*Myurella julacea*

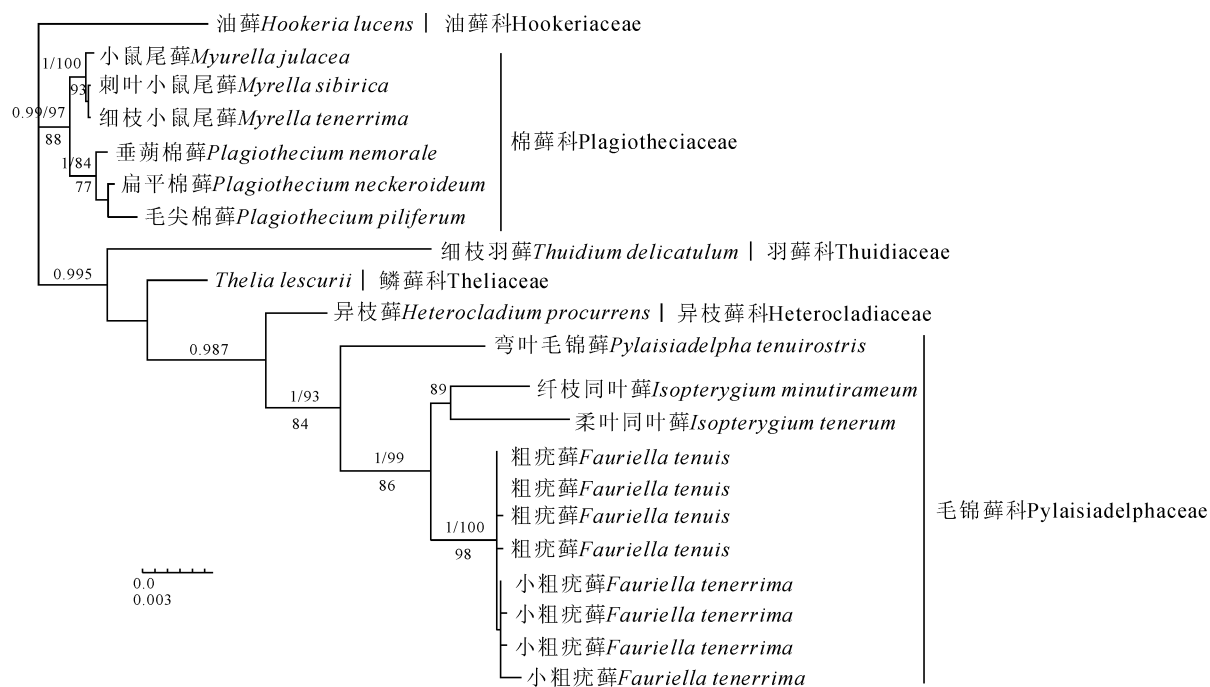


图1 以BI树形为骨架,综合ITS和 $trnL-F$ 以及 $rps4$ 片段所获得的50%多数一致树
贝叶斯先验率(PP)标注于支上左侧(>0.98),最大简约法支持率(MPBS)标注于
支上右侧(>75),最大似然法支持率(MLBS)标注于支下(>75)

Fig. 1 The 50% majority consensus tree from Bayesian analysis of the combined datasets
of ITS, $trnL-F$ and $rps4$ regions

The Bayesian posterior probabilities (left) (>0.98) and MP bootstrap support (right) (>75) are labeled above the branches
and the ML bootstrap support (>75) are labeled below the branches

(Schwägr.) Schimp.]、刺叶小鼠尾蕨 [*Myurella sibirica* (Müll. Hal.) Reimers] 和细枝小鼠尾蕨 [*Myurella tenerrima* (Brid.) Lindb.] 聚成一支 (1PP; 93MLBS; 100MPBS), 并与棉蕨属 (*Plagiothecium* Bruch & Schimp.) 成员互为姐妹群 (0.99 PP; 88MLBS; 97MPBS)。

3 讨论

Bescherelle 等将粗疣蕨属归入鳞蕨科的主要依据是基于其叶细胞具粗疣^[1-9], 而羽蕨科和异枝蕨科的多数物种也具有该形态特征^[13-14]。所以, 粗疣蕨属缺乏独征, 单一依赖某一(些)形态特征进行分类处理, 可能是导致其分类学地位混乱的主要原因之一。

由本文研究结果可以看出, 粗疣蕨属以很高的支持率与毛锦蕨科的毛锦蕨属和同叶蕨属成员构成单系类群(图1)。这一结果表明: 相对于鳞蕨科、羽蕨科和异枝蕨科来说, 粗疣蕨属与毛锦蕨科成员的亲缘关系最近, 与 Cox 等^[15]的研究结果一致。

从形态学角度来看, 粗疣蕨属和毛锦蕨科的模式属——毛锦蕨属 (*Pylaisiadelphina* Cardot) 物种都

具植物体不分枝或羽状分枝、叶细胞具疣、叶中部细胞线形至短菱形、叶角区有几个方形细胞等形态特征。因此, 形态学和分子系统学研究结果均支持粗疣蕨属隶属于毛锦蕨科。

在粗疣蕨属分支内, 小粗疣蕨和粗疣蕨构成单系类群, 并获得了非常高的支持率(图1)。由此表明, 小粗疣蕨和粗疣蕨在分子水平上并未出现明显的分化。通过对现有多份粗疣蕨和小粗疣蕨标本的形态学观察, 作者发现这2个种仅在植物体大小、叶排列方式、叶尖和叶细胞形态等方面略有差异。所以, 小粗疣蕨和粗疣蕨的种间界限尚不明确。但由于未见到这2个种的模式标本, 因此, 粗疣蕨和小粗疣蕨两者之间的关系还有待进一步的研究加以确定。

另外, 小鼠尾蕨属的3种与棉蕨属成员以较高的支持率形成单系, 并互为姐妹群。这一结果很好的支持了小鼠尾蕨属是棉蕨科成员的结论^[11-12]。

综上, 分子系统学和形态学的研究结果均表明, 鳞蕨科现仅包含分布于北美洲的鳞蕨属, 亚洲尚无该科植物分布。

参考文献:

- [1] BESCHERELLE É. Musci Yunnanensis[J]. *Annales des Sciences Naturelles; Botanique, sér. 7*, 1893, 17: 1—364.
- [2] BROTHERUS V F. Musci novi sinenses collecti a Dre M. Handel-Mazzetti[J]. *Akademie der Wissenschaften in Wien Sitzungsberichte Mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse Abteilung 1*, 1923, 131: 209—220.
- [3] BROTHERUS V F. Musci novi sinenses collecti a Dre M. Handel-Mazzetti. II[J]. *Akademie der Wissenschaften in Wien Sitzungsberichte Mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse Abteilung 1*, 1924, 133: 559—584.
- [4] BROTHERUS V F. Musci (Laubmoose) 2 Hälfte[M]//ENGLER A, PRANTL K. Die Natürlichen Pflanzenfamilien (2nd edn.). Berlin: Duncker & Humblot, 1925: 1—542.
- [5] CROSBY M R, MAGILL R E, ALLEN B, et al. A Checklist of the Mosses[M]. St. Louis: Missouri Botanical Garden, 1999: 1—306.
- [6] GAO CH, CAO T. Studies on Chinese bryophytes (4), The family Theliaceae (Musci)[J]. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory*, 1992, 71: 367—375.
- [7] GAO CH, FU X. Theliaceae[M]//WU P C, CROSBY M R, HE S. Moss Flora of China (vol. 6). Beijing: Science Press, and New York & St. Louis: Missouri Botanical Garden, 2002: 65—70.
- [8] 吴鹏程. 中国苔藓植物志(第6卷)[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 1—84.
- [9] NOGUCHI A, IWATSUKI Z, YAMAGUCHI T. Illustrated Moss Flora of Japan 4[M]. Nichinan: Hattori Botanical Laboratory, 1991: 1—776.
- [10] FLEISCHER M. Musci Buitenzorg 4[M]. Leiden: Brill, 1923: 1 105—1 486.
- [11] PEDERSEN N, HEDENÄS L. Phylogeny of the Plagiotheciaceae based on molecular and morphological evidence[J]. *The Bryologist*, 2002, 105(3): 310—324.
- [12] HUTTUNEN S, IGNATOV M S, QUANDT D, et al. Phylogenetic position and delimitation of the moss family Plagiotheciaceae in the order Hypnales[J]. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2013, 171(2): 330—353.
- [13] GOFFINET B, BUCK W R, SHAW A J. Morphology, anatomy, and classification of the Bryophyta[M]//GOFFINET B, SHAW A J. Bryophyte Biology (2nd edn.). Cambridge: Cambridge University Press, 2009: 1—117.
- [14] FREY W. Bryophytes and seedless vascular plants 3[M]//FREY W. Syllabus of Plant Families. Adolf Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien (13th edn.). Berlin: Gebr. Borntraeger Verlagsbuchhandlung, 2009: 1—228.
- [15] COX C J, GOFFINET B, WICHETT N J, et al. Moss diversity: A molecular phylogenetic analysis of genera[J]. *Phytotaxa*, 2010, 9: 175—195.
- [16] IGNATOV M S, KUZNETSOVA O I. On the taxonomy of *Myurella-Platydictya* complex (Plagiotheciaceae, Bryophyta)[J]. *Arctoa*, 2011, 20: 239—246.
- [17] MITTEN W. On the species of Musci and Hepaticae recorded from Japan[J]. *Transactions of the Linnean Society of London, Botany*, 1891, 3: 153—206.
- [18] SUN Y, ZHANG W, LI F L, et al. Identification and genetic mapping of four novel genes that regulate leaf development in *Arabidopsis* [J]. *Cell Research*, 2000, 10: 325—335.
- [19] HARTMANN F A, WILSON R, GRADSTEIN S R, et al. Testing hypotheses on species delimitations and disjunctions in the liverwort *Bryopteris* (Jungermanniopsida: Lejeuneaceae)[J]. *International Journal of Plant Sciences*, 2006, 167(6): 1 205—1 214.
- [20] TABERLET P, GIELLY L, PAUTOU G, et al. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA[J]. *Plant Molecular Biology*, 1991, 17(5): 1 105—1 109.
- [21] NADOT S, BAJON R, LEJEUNE B. The chloroplast gene *rps4* as a tool for the study of Poaceae phylogeny[J]. *Plant Systematics and Evolution*, 1994, 191(1-2): 27—38.
- [22] SOUZA-CHIES T T, BITTAR G, NADOT S, et al. Phylogenetic analysis of the Iridaceae with parsimony and distance methods using the plastid gene *rps4*[J]. *Plant Systematics and Evolution*, 1997, 204(1-2): 109—123.
- [23] SHAW A J, COX C J, BOLES S B. Polarity of peatmoss (*Sphagnum*) evolution: who says bryophytes have no roots[J]. *American Journal of Botany*, 2003, 90(12): 1 777—1 787.
- [24] ZUO Q, HIGUCHI M, WANG Y F, et al. The status of *Struckia* Müll. Hal. (Plagiotheciaceae, Bryopsida) inferred from multiple nuclear and chloroplast loci[J]. *Journal of Biology*, 2011, 33(3): 221—227.
- [25] GUINDON S, GASCUEL O. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood[J]. *Systematic Biology*, 2003, 52(5): 696—704.
- [26] DARRIBA D, TABOADA G L, DOALLO R, et al. ModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(8): 772—772.
- [27] ANISIMOVA M, GIL M, DUFAYARD J F, et al. Survey of branch support methods demonstrates accuracy, power, and robustness of fast likelihood-based approximation schemes[J]. *Systematic Biology*, 2011, 60(5): 685—699.
- [28] STÖVER B C, MÜLLER K F. Treegraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analysis[J]. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11: 7—7.