

分子标记技术在蕨类植物遗传多样性研究中的应用

周媛^{1,2}, 高磊^{1,2}, 汪志伟^{1,2}, 王艇^{1,2*}

(1. 中国科学院武汉植物园, 武汉 430074; 2. 中国科学院水生植物与流域生态重点实验室, 武汉 430074)

摘要: 简要介绍了蕨类植物的生态类型和生殖方式;回顾了近年来分子标记技术在蕨类植物遗传多样性研究中的应用,主要包括种间亲缘关系和分类学的研究、遗传变异和遗传结构的研究,以及系统发育地理学方面的研究。最后,对蕨类植物遗传多样性研究中存在的一些问题进行了讨论和展望。

关键词: 分子标记; 蕨类植物; 遗传多样性

中图分类号: Q347

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2009)06-0667-07

Application of Molecular Marker Techniques in Genetic Diversity of Pteridophytes

ZHOU Yuan^{1,2}, GAO Lei^{1,2}, WANG Zhi-Wei^{1,2}, WANG Ting^{1,2*}

(1. Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430070; 2. Key Laboratory of Aquatic Botany and Watershed Ecology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China)

Abstract: Pteridophytes are the second-largest group of vascular plants, and understanding its genetic diversity could provide scientific basis for both conservation and utilization. In this paper, we briefly introduced the reproductive mode of pteridophytes and summarized the application of molecular methods in the researches of genetic diversity emphatically. It included three aspects: species relative and classification, genetic diversity and genetic structure, and molecular phylogeography. Finally, The problems in the current researches were discussed and nearfuture perspectives on the subject were put forward.

Key words: Molecular marker; Pteridophytes; Genetic diversity

蕨类植物又称羊齿植物(Pteridophyte),是维管植物的第二大类群^[1,2]。蕨类植物除具有一定的经济价值和观赏价值外,其悠久的演化历史对于探讨植物界的系统演化和蕨类植物区系的发生等方面具有重要的科学价值^[3]。然而,在这些形形色色的蕨类植物中,有些种类数量极少、分布范围狭窄,有的甚至在原产地已濒临灭绝。目前,被列入《国家重点保护野生植物名录(第1批)》的蕨类植物就有14科、18属,约39种。导致这些蕨类植物数量和分布范围急剧减少的原因,一方面是由于这些类群自身不能很好地适应现代气候条件和环境,比如:孢子寿命短、受精及萌发条件苛刻等^[4];更重要的原因则是由于人类对野生观赏、药用蕨类资源掠夺式的利用以及对其生境的严重破坏。

遗传多样性是生物多样性的的重要组成部分,也是生物多样性的基础和核心^[5]。加强蕨类植物遗传多样性的研究,特别是针对那些珍稀濒危类群的

研究,对于保护生物多样性和保证蕨类植物野生资源的可持续利用具有十分重要的意义^[6,7]。随着分子生物学技术的飞速发展,以及生态学、统计学、种群遗传学理论和方法的逐渐完善,有关蕨类植物遗传多样性的研究也随之得以不断深入。本文就蕨类植物的类型和特点,以及近年来运用分子标记技术在蕨类植物遗传多样性研究中取得的成果做如下综述。

1 蕨类植物的生态类型和生殖方式

蕨类植物大多为陆生、石生或附生,少数为水生或沼生。它们对环境的适应能力较强,有的种类可以忍受酷热、干旱或严寒等恶劣环境,一到雨季或气候适宜时,又可生气盎然地恢复生长^[8]。依据孢子形态的不同,蕨类植物又可分为同型孢子(homosporous)蕨类和异型孢子(heterosporous)蕨类。绝大多数蕨类植物产生同型孢子,少数产生异型

收稿日期:2009-02-20,修回日期:2009-03-25。

基金项目:湖北省自然科学基金青年杰出人才项目(0631061H01);中国科学院“百人计划”资助项目(0729281F02)。

作者简介:周媛(1980-),女,硕士,助理研究员,从事植物种群遗传学研究工作。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail:tingwang@wbcas.cn)。

孢子,如卷柏类、水韭类和一些水生真蕨类等^[1]。

与种子植物相比,蕨类植物的生殖方式较为特殊。每株蕨类植物的孢子叶上都可以产生数量繁多且体积微小的孢子,借由风力进行传播,在遇到适合的生境后,即萌发成与孢子体迥然不同的配子体,开始进行有性繁殖。具同型孢子的蕨类,其受精方式可能有以下三种:完全自体受精(intragametophytic selfing),即由同一配子体的精子和卵子自体受精形成基因型完全纯合的孢子体;自体受精(intergametophytic selfing),即由同一孢子体上不同孢子形成的配子体之间的受精作用而形成孢子体;异体受精(intergametophytic crossing),即由不同孢子体的孢子形成的配子体之间的受精作用形成孢子体^[9,10]。此外,除进行正常的孢子生殖外,某些蕨类植物还可利用自身的营养繁殖体,如:根状茎、叶顶端的珠芽、芽胞等进行无性繁殖^[8]。

2 分子标记技术在蕨类植物遗传多样性研究中的应用

近年来,随着分子生物学理论和技术的日新月异,利用分子标记技术进行蕨类植物遗传多样性方面的研究也越来越广泛和深入。这些标记技术主要包括限制性片段长度多态性标记技术(RFLP)、随机扩增多态性标记技术(RAPD)、扩增片段长度多态性标记技术(AFLP)、简单重复序列标记技术(SSR)、简单重复序列间区标记技术(ISSR)和 DNA 测序技术等。分子标记技术相对于其它水平的标记技术而言,具有用材少、变异丰富、分辨率高等特点^[11],为解释和揭示蕨类植物的起源和进化、系统发育关系、遗传变异、分化及其影响因子等现象和规律提供了有效而可靠的手段。其应用主要体现在以下几个方面。

2.1 种间亲缘关系和分类学的研究

传统种间亲缘关系的鉴定和划分主要依赖于宏观方面形态学上的证据,不能准确地进行种属划分。特别是存在许多不同变异类型的情况下,仅根据其外在性状的不同更是难以确定各分类群的进化地位^[12]。而在分子水平上,利用特定 DNA 序列的差异以及分子标记技术可以为蕨类植物种间亲缘关系的研究提供最为直接和可靠的证据^[13]。近几年,越来越多的叶绿体 DNA(cpDNA)序列,最常用的如 *atpB*、*rbcL*、*rps4* 基因以及 *trnL-trnF*、*rps4-trnS* 等基因间区序列已被用于探讨多孔蕨属(*Danaea*)^[14]、铁角蕨属(*Asplenium*)^[15]、舌叶蕨属(*Elaphoglossum*)^[16]、

鳞毛蕨属(*Dryopteris*)^[17]、贯众属(*Cyrtomium*)^[18],以及中国观音座莲属(*Angiopteris*)与原始观音座莲属(*Archangiopteris*)^[19]等蕨类植物的亲缘关系。这些研究均表明,上述基因及其基因间区序列的联合分析可以为相关类群提供准确的系统演化信息。

针对某一特定的系统学问题选择相应合适的分子片段可以说是分子系统学研究中最基础、最关键的一步^[20]。在叶绿体基因组内,一般情况下非编码区序列(包括内含子、基因间区)因其功能上的限制较少,比编码区表现出更快的进化速率^[21],故多用于较低分类阶元的研究,但非编码区不同部分序列的变异速率也会有所差异。为了验证这些序列在蕨类植物分子系统学研究中的价值,Small 等根据 18 对曾在种子植物研究中使用过的 cpDNA 非编码区序列设计引物,选取代表不同蕨类植物类群的 30 个种进行了 PCR 扩增。结果显示,其中大部分序列均能在蕨类植物中得到较好的扩增^[21]。这项研究成果为蕨类植物低分类阶元的系统发育研究提供了更多、更好的选择。

2.2 种群遗传多样性和遗传结构的研究

遗传变异是生物体内遗传物质发生变化而造成的一种可以遗传给后代的变异,正是这种变异导致生物在不同水平上体现出遗传多样性^[5,22]。而群体的遗传结构就是遗传变异在时间和空间上的分布式样,是探讨植物的适应性、物种形成过程和式样及其进化机制的基础^[23,24]。DNA 分子标记技术的应用,使得辨别植物种群精细的变异水平和空间结构成为可能,有助于我们清楚地了解种群间的关系和种群动态,从而为稀有和濒危的物种制定科学合理的保护措施^[24,25]。

2.2.1 种群遗传变异水平的探讨

种子植物遗传变异的研究表明,稀有种或特有种以及分布范围狭窄的植物物种与广布种相比,一般具有较低的遗传多样性水平^[26],但在某些珍稀濒危的蕨类物种中,如合囊蕨科植物 *Angiopteris chauliodonta* Copel^[27]、水蕨(*Ceratopteris thalictroides*)^[28]、桫欏(*Alsophila spinulosa*)^[29,30]、黑桫欏(*Alsophila podophylla*)^[31]、荷叶铁线蕨(*Adiantum reniforme* var. *sinense*)^[32]、水韭属(*Isoetes*)^[33-38]等植物,都检测到了较高的遗传变异水平。其中,分布于我国的水韭属蕨类植物是一个研究较为全面的例子。

水韭属植物是异孢型多年生拟蕨类植物,为水韭科中唯一幸存的孑遗属^[39]。分布于中国的水韭属植物目前认为有 5 种,即云贵水韭(*I. yunguiensis*)、

高寒水韭(*I. hypsophila*)、台湾水韭(*I. taiwanensis*)、中华水韭(*I. sinensis*)^[40]和东方水韭(*I. orientalis*)^[41]。由于人类活动对水生生境的干扰,水韭属植物在我国的分布范围和种群数量急剧减少,濒临灭绝,现已被国家列为一级重点保护野生植物。为了有效保护这一蕨类物种,进行种群遗传多样性的研究是十分必要的。目前,学者们已采用 RAPD^[33,36,37]、AFLP^[34]、ISSR^[35,38]等方法分别对分布于我国大陆地区的4种水韭属植物进行了遗传多样性分析。研究发现,除东方水韭^[38]外,其它3种水韭属植物在物种水平上都具有相对较高的遗传多样性水平,但就种群水平来说,高寒水韭、中华水韭和东方水韭种群内部的多态位点比率却非常低^[33-35,37,38]。现将这几项研究所得到的统计结果列于表1。

水韭属植物在物种水平上具有较高遗传变异水平的原因,Kang等认为可能与中华水韭为异源多倍体起源有关,因为四倍体较二倍体物种而言可以容纳和累积更多的变异^[34]。可能是高寒水韭和云贵水韭这两个物种生境的破坏发生在近期,还没有使其种群发生遗传漂变和近交等遗传学效应,因而其遗传多样性还没有大幅度地丧失^[35-37]。

2.2.2 种群遗传结构与保护策略的制定

在对物种实施保护计划过程中,就地保护地点的选择和迁地保护的策略都需要遗传学资料作为基础^[24]。保护濒危蕨类植物的多样性,就是要维持种群最大的遗传多样性和遗传上的整体性,就是要采取措施保护地方性适应的种群。

假芒萁属的 *Sticherus flabellatus* 常作为一种切叶植物供应澳大利亚园艺市场。由于园艺市场的大量需求及自身孢子萌发困难等因素,使其成为受保护的蕨类之一。Keiper 和 McConchie 采用 AFLP 标记对8个分布于悉尼的种群进行了遗传结构的研究。结果表明,大部分遗传变异存在于群体间。聚类分析显示,8个种群分为两个大的分支,所采集的

样本按种群各自聚在一起,这进一步说明种群间存在较大的分化。根据该物种种群遗传结构的特点,建议在其分布地对尽可能多的群体进行就地保护^[42]。

对 Pitcairn 岛上极濒危蕨类植物 *Angiopteris chauliodonta* 的研究又是另一个例子。生态调查发现,由于森林砍伐、外来种对其栖息地的入侵,以及自身繁殖力低下等因素的影响,岛上仅存有该物种的6个种群共774个个体。Kingston等采用 RAPD 标记对这6个种群进行了遗传结构的分析。研究显示,57.1%遗传变异存在于群体内部,其中3个种群的遗传变异水平相对高于其它种群。为了有效地保护这一濒危物种,作者建议在可以覆盖这3个高遗传多样性种群的区域内建立保护区,进行就地保护,并对年幼个体数量较多的种群进行迁地保护,同时,为了尽可能避免近交衰退的现象,还应从其它遗传多样性较高的群体中引入新的个体与之混合栽植,以提高整体的遗传多样性水平^[27]。

2.2.3 繁育系统的分析

繁育系统(breeding system)指的是控制种群内自体受精或异体受精相对频率的各种生理形态机制^[43],是影响种群遗传结构最关键的生物学因素之一^[5,26]。

在以往的研究中,人们根据蕨类植物生殖方式的特点,认为在其种群内部自交应该更容易发生,有的甚至认为在完全自体受精的情况下,蕨类极有可能经由一个独立的孢子产生一个基因型完全一致的群体^[15,43]。例如:英国及爱尔兰北部边缘零散分布的铁线蕨(*Adiantum capillus-veneris*)具有十分独特的遗传结构。Pryor等采用 SSR 标记对该地区52个种群进行了遗传多样性的研究,发现在17个多样本的群体中,有13个没有发现任何 SSR 谱带的差异,仅在3个群体检测到了杂合子的存在。换句话说,该地区几乎所有的变异都分布于种群之间,该物种

表1 3种分子标记检测水韭属植物种群遗传多样性所得到的统计结果

Table 1 Summary statistics revealed by three genetic markers to detect population genetic diversity of species in *Isoetes*

植物名称 Species name	群体数 No. of population	样本数 Sample size	多态位点百分率(物种水平) Percentage of polymorphic loci (Species level)	多态位点百分率(种群水平) Percentage of polymorphic loci (Population level)	标记种类 Marker type	文献 Literature
中华水韭 <i>Isoetes sinensis</i>	4	48	58.06%	0.81% ~ 12.90%	RAPD	陈进明等(2004) ^[33]
中华水韭 <i>I. sinensis</i>	7	106	61.6%	25.2% ~ 53.8%	AFLP	Kang et al. (2005) ^[34]
中华水韭 <i>I. sinensis</i>	2	46	51.02%	9.18% ~ 23.47%	ISSR	陈进明等(2006) ^[38]
高寒水韭 <i>I. hypsophila</i>	6	56	82%	8% ~ 35%	ISSR	Chen et al. (2005) ^[37]
高寒水韭 <i>I. hypsophila</i>	6	56	50%	7.69% ~ 25.96%	RAPD	Chen et al. (2005) ^[37]
云贵水韭 <i>I. yunguiensis</i>	1	46	62.1%	62.1%	RAPD	陈进明等(2005) ^[36]
东方水韭 <i>I. orientalis</i>	2	26	9.18%	7.14% ~ 8.16%	ISSR	陈进明等(2006) ^[38]

的繁育方式以自交为主^[10]。而某些蕨类物种具有有性繁殖和无性繁殖相结合的繁育方式,如:生长在美国俄勒岗州的阴地蕨属植物 *Botrychium pumicola* 除了可以进行孢子生殖外,还可利用其地下器官上着生的芽胞(gemmae)进行无性繁殖。为了验证芽胞所起的作用, Camacho 和 Liston 利用 ISSR 标记对当地的 3 个群体进行了研究,结果表明其群体内部存在较大的遗传变异,通过检测变异在采样个体中的空间分布情况,得出该种群内部的繁育方式仍以有性繁殖为主,芽胞繁殖只是在群体的某个阶段发生的稀有事件的结论^[44]。

随着蕨类植物遗传学资料的不断累积,我们认为蕨类群体中绝对异交和绝对自交的类群极少,大多数物种都是以自交为主或以异交为主或二者兼而有之。但蕨类植物生殖方式的多样化必然导致其繁育系统较种子植物更为复杂,进而对种群遗传结构的影响也不尽一致。

2.3 系统发育地理学的研究

系统发育地理学(Phylogeography),最初由 Avise 等提出^[45],是研究物种及物种内不同种群形成现有分布格局的历史原因和演化过程的一门学科^[46]。cpDNA 是迄今研究最多的一类基因组,具有基因组较小、几乎不发生重组、单亲遗传等特点,更易于追溯经过长期历史变迁的物种起源和迁移^[47],十分适合于植物系统发育地理学的研究^[25]。

蕨类植物具有悠久的进化历史,尤其具有孑遗性质的蕨类植物更是探讨植物系统发育地理学问题不可多得的“活化石”。但目前,蕨类植物系统发育地理学的研究还相当滞后。国外方面只涉及到了铁角蕨属的两种植物:*Asplenium ceterach*^[48]和 *Asplenium hookerianum*^[49];国内方面只有对桫欏属植物桫欏(*Alsophila spinulosa*)^[29,30]和黑桫欏(*Alsophila podophylla*)^[31]的报道。

桫欏是著名的孑遗植物,由于第四纪冰川的作用,分布范围急剧收缩^[4],仅在热带和亚热带山林中的适宜生境内得以保留^[50]。Su 等分别利用 cpDNA 的 *atpB-rbcL* 和 *trnL-trnF* 非编码区序列进行了桫欏海南、广东和广西种群的系统地理学研究。经检测发现,桫欏具有较高水平的单倍型多样性和核苷酸多样性,且大部分变异存在于地区之间;种群已发生地理分化,分别形成海南、广东-广西两大群体。作者由此推断近交以及海南和广东、广西之间因被琼州海峡阻隔而无法进行基因交流可能是导致该物种构成两大群体的原因。另外,该物种单倍型

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,但扩张后还未能获得足够时间去建立更加复杂的结构所致^[29,30]。此外,在对黑桫欏种群的研究中也发现了相似的情况^[31]。这些成果为更全面地研究桫欏属植物种群的遗传变异状况和动态,阐明种内水平上对谱系地理分布形成起决定作用的进化遗传过程奠定了基础。

3 讨论与展望

3.1 加强其它分子生物学技术在蕨类植物中的应用

除了本文所提及的分子标记技术外,还有一些新型的分子生物学技术,如:EST-SSR、基因组原位杂交、基因芯片等,在很多有重要经济价值的植物和模式植物中得到了广泛的应用,显示出巨大的潜力,也为将来用于蕨类植物遗传学的研究奠定了基础。

3.1.1 EST-SSR

基因组来源的 SSR 在物种之间的通用性很差,而作为基因的一部分,EST-SSR 侧翼序列在物种之间高度保守,从一个物种中开发的 EST-SSR 可同时用于其近缘种甚至近缘属物种的研究。EST-SSR 标记也在蕨类植物 *Athyrium distentifolium* 遗传变异的研究中得到了应用^[51]。与基因组 SSR 标记相比,EST-SSR 引物可以扩增得到更加清晰可靠且容易计数的产物,在其近缘种、属的物种中也有较好的通用性,但来源于基因组的 SSR 比来源于 EST 序列的 SSR 标记具有较高的多态性^[52]。对于这一问题,有学者认为可以从筛选 EST、优化 PCR 反应程序等方面进行尝试和探索,以尽可能提高其多态性^[53]。但目前在 GenBank 中可以搜索到的蕨类物种 EST 序列极为有限,仅有 *Anemia phyllitidis*、*Marsilea vestita*、*Athyrium distentifolium* 等少数几种,这也在相当大的程度上限制了 EST 序列在蕨类植物中的应用。

3.1.2 基因组原位杂交

基因组原位杂交(Genomic *in situ* hybridization, GISH)是由染色体原位抑制杂交(Chromosome *in situ* suppression, CISS)衍生而来的一种重要的原位杂交技术,是一个精确、安全的研究工具,在分子细胞遗传学领域发挥着重要作用。

染色体多倍化是植物进化过程中的普遍现象。有报道称,在我国进行过染色体计数的蕨类植物有 395 种,其中 48% 为多倍体^[54]。关于蕨类植物多倍体的起源、进化仍处于一种不明确的状态。GISH 技术作为一种有效手段,可同时鉴定不同倍性蕨类物种的基因组,为准确评价各基因组的亲缘关系,快速

而可靠地研究各基因组的组成、起源与进化提供保证。

3.1.3 基因芯片技术

基因芯片的应用在进化生物学领域有着巨大的潜力^[55,56]。迄今利用芯片技术,已进行了一些近缘物种之间以及物种内不同株系或群体的基因组水平表达差异分析,主要集中在一些模式物种上。此外,基因芯片还可以分析物种间或物种内基因组结构差异,重建系统进化树。比如可以利用芯片进行比较基因组杂交(comparative genomic hybridization, CGH),比较近缘种间或种内的基因组含量^[57,58]。种内和种间的CGH研究发现,许多基因获得和丢失事件可以与基因的功能、表达水平、基因复制时间等关联起来。

显然,要利用基因芯片进行实验,首先要有制备芯片的素材——DNA序列,但是目前可以利用的基因组序列仅限一些模式生物,蕨类植物的序列资源尤其有限。现在正在进行的全基因组测序计划的蕨类植物仅江南卷柏(*Selaginella moellendorffii*)一种,相信随着测序技术的进步和测序成本的降低,将会有越来越多的物种的基因组序列出现;但至少在近期难有很大改观。为此,有研究者提出了不基于特定物种基因组序列的通用芯片(universal microarray)或匿名芯片(anonymous microarray)平台^[59,60],相信在蕨类植物进化遗传学的研究中具有很好的应用前景。

3.2 加强其它分析方法在蕨类植物中的应用

与传统的系统发育重建(phylogeny reconstruction)不同,系统地理学方法常常通过网状支系分析(nested clade analysis)重建基因谱系(gene genealogy)。目前,发展最成熟、应用最广泛的是由Templeton提出并逐步完善的巢式支系法(nested clade analysis,简称NCA法)^[61]。

NCA法主要建立在非重组基因单倍型网的基础之上,利用一定的规则形成阶层网状关系图,将大的关系网进行局部范围的细分,并利用统计学的方法推断支系与支系间、网状支系与支系之间的相互关系,由此推测种群在不同地质年代所经历的进化事件,有机地将种群结构、地理分布与种群历史结合起来,较传统的系统地理学方法更为精确和直接^[61]。目前,这种方法还未在蕨类植物中应用。

3.3 拓展DNA分子标记技术在蕨类植物中应用的范围

在研究的物种方面,还只是相对集中在某些科

属或是某些类型的蕨类物种上,比如,对附生、水生等类型的蕨类植物研究较多,而对陆生的类型研究得较少。因此,研究的范围还需要向更多的科属或类型的蕨类植物中推进。

3.4 加强与其它学科的联系

在DNA水平上分析蕨类植物的遗传多样性,尽管在某些方面有突出的优点,但仍离不开形态学、孢粉学、地理学、古植物学、生态学、细胞学等其它学科的印证,它们之间应当相辅相成,互为补充。只有这样,才能从多层面、多角度对蕨类植物种群的遗传学问题进行更为深入的分析。

参考文献:

- [1] 周云龙. 植物生物学[M]. 北京:高等教育出版社,1999: 373 - 391.
- [2] Smith A R. Comparison of fern and flowering plant distribution with some evolutionary interpretations for ferns[J]. *Biotropica*, 1972, 4: 4 - 9.
- [3] 李春香, 陆树刚, 杨群. 蕨类植物起源与系统发生关系研究进展[J]. 植物学通报, 2004, 21(4): 478 - 485.
- [4] Tryon A F, Lugardon B. Spores of the Pteridophyta[M]. Berlin: Springer-Verlag, 1990.
- [5] 葛颂, 洪德元. 遗传多样性及其检测方法[C]. 钱迎倩, 马克平. 生物多样性研究的原理和方法. 北京: 科学出版社, 1994: 123 - 140.
- [6] 李昂, 葛颂. 植物保护遗传学研究进展[J]. 生物多样性, 2002, 10(1): 61 - 71.
- [7] 高焕峰. 中国蕨类植物多样性研究进展[J]. 山地农业生物学报, 2004, 23(5): 431 - 437.
- [8] 绍丽楣. 观赏蕨类的栽培与用途[M]. 北京: 金顿出版社, 1994: 124.
- [9] Banks J A. Gametophyte development in ferns[J]. *Annu Rev Plant Physiol and Plant Mol Biol*, 1999, 50: 163 - 186.
- [10] Pryor K V, Young J E, Rumsey F J. Diversity, genetic structure and evidence of outcrossing in British populations of the rock fern *Adiantum capillus-veneris* using microsatellites[J]. *Mol Ecol*, 2001, 10: 1881 - 1894.
- [11] 周延清. DNA分子标记在植物研究中的应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 2 - 3.
- [12] 许鸿川, 王发明. 遗传多样性分析方法及其在常绿阔叶林优势种研究中的应用[J]. 福建林学院学报, 2006, 26(2): 186 - 192.
- [13] 李春香, 陆树刚, 杨群. 龙骨星蕨与膜叶星蕨的关系: 来自叶绿体 *rbcL*, *rps4* 和 *trnL-trnF*, *rps4-trnS* 序列的证据[J]. 生物多样性, 2005, 13(2): 174 - 179.
- [14] Christenhusz M J M, Tuomisto H, Metzgar J S, Pryor K M. Evolutionary relationships within the Neotropical, eusporangiate fern genus *Danaea* (Marattiaceae)[J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2008, 46: 34 - 48.
- [15] Vogel J C, Rumsey F J, Russell S J, Cox C J, Holmes J S, Bujnoch

- W, Stark C, Barrett J A, Gibby M. Genetic structure, reproductive biology and ecology in isolated populations of *Asplenium ciskii* (Aspleniaceae, Pteridophyta) [J]. *Heredity*, 1999, 83: 604 – 612.
- [16] Rouhan G, Dubuisson J Y, Rakotondrainibe F, Motley T J, Mickel J T, Labat J N, Moran R C. Molecular phylogeny of the fern genus *Elaphoglossum* (Elaphoglossaceae) based on chloroplast non-coding DNA sequences: contributions of species from the Indian Ocean area [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2004, 33: 745 – 763.
- [17] Geiger J M, Ranker T A. Molecular phylogenetics and historical biogeography of Hawaiian *Dryopteris* (Dryopteridaceae) [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2005, 34: 392 – 407.
- [18] Lu J M, Li D Z, Gao L M, Cheng Xiao, Wu D. Paraphyly of *Cyrtomium* (Dryopteridaceae): evidence from *rbcL* and *trnL-F* sequence data [J]. *J Plant Res*, 2005, 118: 129 – 135.
- [19] 李春香, 陆树刚. 中国观音座莲植物的系统发育和起源时间: 来自叶绿体 *rbcL* 和 *trnL-F* 序列的证据 [J]. 科学通报, 2006, 51 (23): 2761 – 2766.
- [20] 田欣, 李德铎. DNA 序列在植物系统学研究中的应用 [J]. 云南植物研究, 2002, 24 (2): 170 – 184.
- [21] Small R L, Lickey E B, Shaw J, Hauk W B. Amplification of non-coding chloroplast DNA for phylogenetic studies in lycophytes and monilophytes with a comparative example of relative phylogenetic utility from Ophioglossaceae [J]. *Mol. phyl. evol*, 2005, 36: 509 – 522.
- [22] Moritz C, Hillis D M. Molecular Systematics: Context and Controversies [M]//Molecular Systematics. Sunderland, MA: Sinauer, 1990: 1 – 11.
- [23] Brown A H D. Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation [J]. *Theor Appl Genet*, 1978, 52: 145 – 157.
- [24] Falk D A, Holsinger K E. Genetics and Conservation of Rare Plants [M]. New York: Oxford University Press, 1991.
- [25] 邹喻苹, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记 [M]. 科学出版社, 2001: 128.
- [26] Hamrick J L, Godt M J W. Allozyme Diversity in Plant Species [M]//Brown A H D, Clegg M T, Kahler A L, Weir B S, eds. Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources. Sunderland, MA: Sinauer, 1990: 43 – 63.
- [27] Kingston N, Waldren S, Smyth N. Conservation genetics and ecology of *Angiopteris chauiodonta* Copel. (Marattiaceae), a critically endangered fern from Pitcairn Island, South Central Pacific Ocean [J]. *Biol Conserv*, 2004, 117: 309 – 319.
- [28] Dong Y H, Chen J M, Wahitirobert G, Wang Q F. Genetic variation in the endangered aquatic fern *Ceratopteris thalictroides* (Parkeriaceae) in China: implications from RAPD and ISSR data [J]. *Bot J Linn Soc*, 2008, 157: 657 – 671.
- [29] Su Y J, Wang T, Zheng B, Jiang Y, Chen G P, Gu H Y. Population genetic structure and phylogeographical pattern of a relict tree fern, *Alsophila spinulosa* (Cyatheaceae), inferred from cpDNA *atpB* – *rbcL* intergenic spacers [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 109: 1459 – 1467.
- [30] Su Y J, Ting Wang T, Zheng B, et al. Genetic differentiation of relictual populations of *Alsophila spinulosa* in southern China inferred from cpDNA *trnL-F* noncoding sequences [J]. *Mol. Phyl. Evol*, 2005, 34: 323 – 333.
- [31] 苏应娟, 王艇, 郑博, 江宇, 欧阳蒲月, 陈国培, 王伯荪. 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 [J]. 生态学报, 2004, 24 (5): 914 – 919.
- [32] Kang M, Huang H W, Jiang M X, Lowe A J. Understanding population structure and historical demography in a conservation context: population genetics of an endangered fern [J]. *Diversity Distrib*, 2008, 14: 799 – 807.
- [33] 陈进明, 王晶苑, 刘星, 张彦文, 王青锋. 中华水韭遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 生物多样性, 2004, 12 (3): 348 – 353.
- [34] Kang M, Ye Q G, Huang H W. Genetic consequence of restricted habitat and population decline in endangered *Isoetes sinensis* (Isoetaceae) [J]. *Ann Bot*, 2005, 96: 1265 – 1274.
- [35] Chen J M, Liu X, Wang J Y, Robert G W, Wang Q F. Genetic variation within the endangered quillwort *Isoetes hypsophila* (Isoetaceae) in China as evidenced by ISSR analysis [J]. *Aquat Bot*, 2005, 82: 89 – 98.
- [36] 陈进明, 刘星, 王青锋. 中国珍稀濒危特有蕨类植物——云贵水韭的遗传多样性 [J]. 武汉大学学报: 理学版, 2005, 51 (6): 767 – 770.
- [37] Chen J M, Wang J Y, Liu X, Robert G W, Wang Q F. RAPD Analysis for genetic variation within the endangered quillwort *Isoetes hypsophila* (Isoetaceae) [J]. *Wuhan University Journal of Natural Sciences*, 2005, 10: 455 – 459.
- [38] 陈进明, 王青锋. 珍稀濒危蕨类植物东方水韭的遗传多样性 [J]. 武汉植物学研究, 2006, 24 (6): 569 – 573.
- [39] Taylor W C, Hickey R J. Habitat, evolution and speciation in *Isoetes* [J]. *Ann Mo Bot Gard*, 1992, 79: 613 – 621.
- [40] Wang Q F, Liu X, Taylor W C, He Z R. *Isoetes yunguiensis* (Isoetaceae), a new basic diploid quillwort from China [J]. *Novon*, 2002, 12: 587 – 591.
- [41] Liu H, Wang Q F, Taylor W C. *Isoetes orientalis* (Isoetaceae), a new hexaploid quillwort from China. [J]. *Novon*, 2005, 15: 164 – 167.
- [42] Keiper F J, McConchie R. An analysis of genetic variation in natural populations of *Sticherus flabellatus* [R. Br. (St John)] using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers [J]. *Mol Ecol*, 2000, 9: 571 – 581.
- [43] Heywood V H. 植物分类学 [M]. 柯植芬译. 北京: 科学出版社, 1979.
- [44] Camacho F J, Liston A. Population structure and genetic diversity of *Botrychium pumicola* (Ophioglossaceae) based on inter-simple sequence repeats (ISSR) [J]. *Am J Bot*, 2001, 88: 1065 – 1070.
- [45] Avise J C, Arnold J, Ball R M, Bermingham E, Lamb T, Neigel J E, Reeb C A, Saunders N C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics [J]. *Ann Rev Ecol Sys*, 1987, 18: 489 – 522.
- [46] Avise J C, Hamrick J L. Conservation Genetics; Case History from Nature [M]. USA: Chapman and Hall, 1996: 431 – 470.
- [47] Vendramin G G, Anzidei M, Madaghie A, Sperisen C, Bucci G.

- Chloroplast microsatellite analysis reveals the presence of population subdivision in Norway spruce (*Picea abies* K.) [J]. *Genome*, 2000, 43: 68 – 78.
- [48] Treweek S A, Morgan-Richards M, Russell S J, Henderson S, Rumsey F J, Pintér I, Barrett J A, Gibby M, Vogel J C. Polyploidy, phylogeography and Pleistocene refugia of the rockfern *Asplenium ceterach*: evidence from chloroplast DNA [J]. *Mol Ecol*, 2002, 11: 2003 – 2012.
- [49] Shepherd L D, Perrie L R, Brownsey P J. Fire and ice: volcanic and glacial impacts on the phylogeography of the New Zealand forest fern *Asplenium hookerianum* [J]. *Mol Ecol*, 2007, 16: 4536 – 4549.
- [50] Willis K J, McEwain J C. The Evolution of Plants [M]. New York: Oxford University Press, 2002.
- [51] Woodhead M, Russell J, Squirrell J, Hollingsworth P M, Cardle L, Ramsay L, Gibby M, Powell W. Development of EST-SSRs from the alpine lady fern, *Athyrium distentifolium* [J]. *Mol Ecol Notes*, 2003, 3: 287 – 290.
- [52] Woodhead M, Russell J, Squirrell J, Hollingsworth P M, Mackenzie K, Gibby M, Powell W. Comparative analysis of population genetic structure in *Athyrium distentifolium* (Pteridophyta) using AFLPs and SSRs from anonymous and transcribed gene regions [J]. *Mol Ecol*, 2005, 14: 1681 – 1695.
- [53] 李永强, 李宏伟, 高丽锋, 何蓓如. 基于表达序列标签的微卫星标记 (EST-SSRs) 研究进展 [J]. 植物遗传资源学报, 2004, 5(1): 91 – 95.
- [54] 王任翔, 陆树刚, 邓晰朝. 中国蕨类植物细胞分类学研究概况 [J]. 植物分类学报, 2007, 45(1): 98 – 111.
- [55] Gibson G. Microarrays in ecology and evolution: a preview [J]. *Mol Ecol*, 2002, 11: 17 – 24.
- [56] Wray G A, Hahn M W, Abouheif E, Balhoff J P, Pizer M, Rockman M V, Romano L A. The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes [J]. *Mol Biol Evol*, 2003, 20: 1377 – 1419.
- [57] Borevitz J O, Liang D, Plouffe D, Chang H S, Zhu T, Weigel D, Berry C C, Winzler E, Chory J. Large-scale identification of single-feature polymorphisms in complex genomes [J]. *Genome Res*, 2003, 13: 513 – 23.
- [58] Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Maner S, Massa H, Walker M, Chi M, Navin N, Lucito R, Healy J, Hicks J, Ye K, Reiner A, Gilliam T C, Trask B, Patterson N, Zetterberg A, Wigler M. Large-scale copy number polymorphism in the human genome [J]. *Science*, 2004, 305: 525 – 528.
- [59] Belosludtsev Y Y, Bowerman D, Weil R, Marthandan N, Balog R, Luebke K, Lawson J, Johnston S A, Lyons C R, O'Brien K, Garner H R, Powdrill T F. Organism identification using a genome sequence-independent universal microarray probe set [J]. *Biotechniques*, 2004, 37: 654 – 658.
- [60] Cannon C H, Kua C S, Lobenhofer E K, Hurban P. Capturing genomic signatures of DNA sequence variation using a standard anonymous microarray platform [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: 121.
- [61] Templeton A R, Routman E, Phillips C A. Separating population structure from population history: A cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the Tiger Salamander, *Ambystoma tigrinum* [J]. *Genetics*, 1995, 140: 767 – 782.