

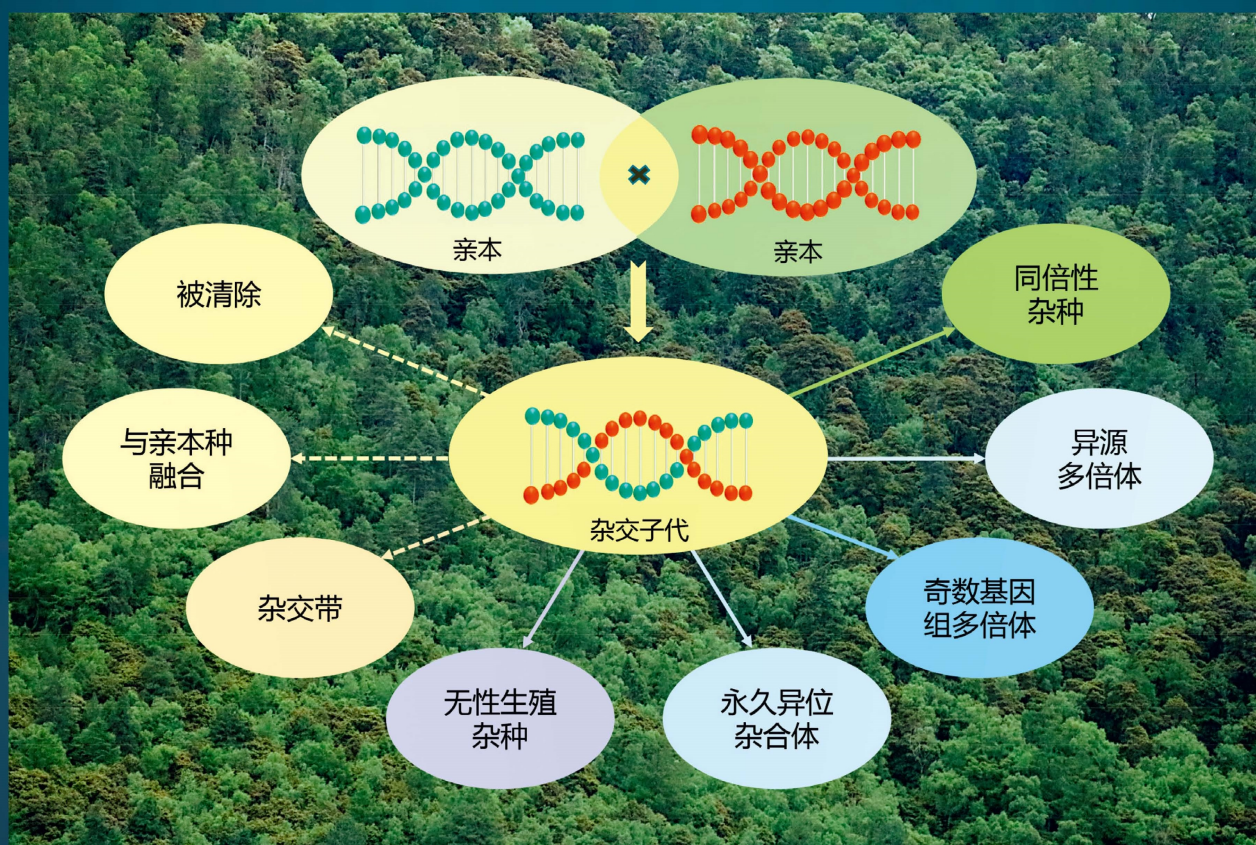
# BIODIVERSITY SCIENCE

# 生物多样性

第25卷 第6期  
2017年6月

Vol.25 No.6  
June 2017

## 自然杂交和生物多样性专辑



主 办

中国科学院生物多样性委员会  
中国植物学会  
中国科学院植物研究所  
中国科学院动物研究所  
中国科学院微生物研究所

Biodiversity Committee, CAS  
Botanical Society of China  
Institute of Botany, CAS  
Institute of Zoology, CAS  
Institute of Microbiology, CAS

<http://www.biodiversity-science.net>

# 生物多样性

## SHENGWU DUOYANGXING

第25卷 第6期 2017年6月

### 目次

#### 编者按

561 自然杂交: 生物多样性的梦魇还是盛宴?

严岳鸿 康 明 马永鹏 周仁超

#### 综述

565 自然杂交与物种形成

王玉国

577 结合系统发育与群体遗传学分析检验杂交是否存在的技术策略

毛建丰 马永鹏 周仁超

600 表观遗传变异在植物杂交与多倍化过程中的作用

李霖锋 刘 宝

#### 研究报告

608 同域分布共享传粉者的鼠尾草属植物的生殖隔离

魏宇昆 黄艳波 李桂彬

615 牛耳朵和马坝报春苣苔同域种群授粉后的生殖隔离

张小龙 杨丽华 康 明

621 铁角蕨科的多倍化与物种多样性形成  
常艳芬

627 结合分子手段和形态分析验证大白杜鹃与马缨杜鹃的自然杂交

郑硕理 田晓玲 黄承玲 王灵军 冯 元  
张敬丽

638 野牡丹属两个海南特有种与同属广布种自然杂交的分子证据

周秋杰 蔡亚城 黄伟伦 吴 伟 代色平  
王 峰 周仁超

647 偏花报春和海仙报春3个同域居群的不对称杂交

谢艳萍 赵建立 朱兴福 李 莉 李庆军

654 中国秋海棠属植物的自然杂交发生及其特点  
田代科 李 春 肖 艳 付乃峰 童 毅  
吴瑞娟

675 基于系统基因组学分析揭示早期陆生植物的复杂网状进化关系

舒江平 刘 莉 沈 慧 戴锡玲 王全喜  
严岳鸿

#### 保护论坛

683 自然杂交与生物多样性保护  
商 辉 严岳鸿

**封面:** 杂交是一种普遍存在的自然现象, 在生物进化(演化)过程中起着重要作用。通过遗传交换过程, 杂交可以在不同分化类群间交换遗传变异、产生新的遗传重组, 甚至通过形成异源多倍体或者同倍性杂交种导致新物种的形成。研究杂交存在的模式、产物及进化意义有助于理解杂交对于生物多样性产生和维持的影响。本期出版的自然杂交与生物多样性专辑为基因组时代研究杂交的进化生物学意义提供了新的见解。(封面设计者: 聂帅、巴伟和毛建丰)

# BIODIVERSITY SCIENCE

Vol. 25 No. 6 June 2017

## CONTENTS

### Editorial

- 561 **Natural hybridization: a nightmare or a delight to biodiversity?**  
Yuehong Yan, Ming Kang, Yongpeng Ma and Renchao Zhou

### Reviews

- 565 **Natural hybridization and speciation**  
Yuguo Wang
- 577 **Approaches used to detect and test hybridization: combining phylogenetic and population genetic analyses**  
Jian-Feng Mao, Yongpeng Ma and Renchao Zhou
- 600 **The roles of epigenetic variation in plant hybridization and polyploidization**  
Linfeng Li and Bao Liu

### Original Papers

- 608 **Reproductive isolation in sympatric *Salvia* species sharing a sole pollinator**  
Yukun Wei, Yanbo Huang and Guibin Li
- 615 **Post-pollination reproductive isolation of sympatric populations of *Primulina eburnea* and *P. mabaensis* (Gesneriaceae)**  
Xiaolong Zhang, Lihua Yang and Ming Kang
- 621 **Polyploidy and the formation of species diversity in Aspleniaceae**  
Yanfen Chang

- 627 **Molecular and morphological evidence for natural hybridization between *Rhododendron decorum* and *R. delavayi* (Ericaceae)**

Shuoli Zheng, Xiaoling Tian, Chengling Huang, Lingjun Wang, Yuan Feng and Jingli Zhang

- 638 **Molecular evidence for natural hybridization between two *Melastoma* species endemic to Hainan and their widespread congeners**

Qiujiu Zhou, Yacheng Cai, Wei Lun Ng, Wei Wu, Seping Dai, Feng Wang and Renchao Zhou

- 647 **Asymmetric hybridization of *Primula secundiflora* and *P. poissonii* in three sympatric populations**

Yanping Xie, Jianli Zhao, Xingfu Zhu, Li Li and Qingjun Li

- 654 **Occurrence and characteristics of natural hybridization in *Begonia* in China**

Daike Tian, Chun Li, Yan Xiao, Naifeng Fu, Yi Tong and Ruijuan Wu

- 675 **The complex reticulate evolutionary relationships of early terrestrial plants as revealed by phylogenomics analysis**

Jiangping Shu, Li Liu, Hui Shen, Xiling Dai, Quanxi Wang and Yuehong Yan

### Forum

- 683 **Natural hybridization and biodiversity conservation**  
Hui Shang and Yuehong Yan

---

**Cover Illustration:** Hybridization is a prevalent phenomenon in nature, which plays an important role in evolution. It can transfer adaptive genetic variation between divergent lineages and generate new genetic recombination, through genetic exchange, or even generate new hybrid species either through allopolyploid or homoploid hybrid speciation. Studying the evolutionary outcomes of hybridization will aid understanding of the impact of hybridization on generating and maintaining of biological diversity. The articles in this special issue on Natural Hybridization and Biodiversity provide new insights in the genomic era into the important evolutionary consequences of hybridization. (Designed by Shuai Nie, Wei Ba and Jianfeng Mao)

•编者按•

# 自然杂交：生物多样性的梦魇还是盛宴？

严岳鸿<sup>1\*</sup> 康 明<sup>2</sup> 马永鹏<sup>3</sup> 周仁超<sup>4</sup>

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 (中国科学院华南植物园, 中国科学院植物资源保护与可持续利用重点实验室, 广州 510650)

3 (中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650201)

4 (中山大学生命科学学院, 广州 510275)

## Natural hybridization: a nightmare or a delight to biodiversity?

Yuehong Yan<sup>1\*</sup>, Ming Kang<sup>2</sup>, Yongpeng Ma<sup>3</sup>, Renchao Zhou<sup>4</sup>

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

2 Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650

3 Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201

4 School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275

2016年, 中国科学院昆明动物研究所的研究人员发现, 北宋皇帝宋徽宗赵佶的御题画《芙蓉锦鸡图》中的锦鸡是一个杂交个体, 这是距今约 900 年前鸟类杂交的最早记录。考虑到红腹锦鸡(*Chrysolophus pictus*)和白腹锦鸡(*C. amherstiae*)在野外和圈养下都有杂交记录, 研究人员推测画家画的这只锦鸡可能有两种来源, 一种是已经圈养的红腹锦鸡和白腹锦鸡杂交产生的后代; 一种是野外自然杂交个体(Peng et al, 2016)。杂交锦鸡兼具两个亲本的优良性状, 从庶民百姓到皇帝贵胄自然都是喜爱的; 但是, 对科学家来说这个异类的出现可能是一个不小的困惑。

对传统分类学家来说, 兼具父母双方性状特征的自然杂交种(hybrids, hybrid species)的出现会模糊自然物种之间的界限; 对系统生物学家来说, 完美的生命之树会因为杂交而成为杂乱无章的生命之网; 而对保护生物学家来说, 自然杂交种介导的渐渗或回交会侵蚀物种的纯粹性。

自然杂交是指在自然条件下具有显著不同可遗传性状的两个物种甚至是生态适应上悬殊很大的两个居群间个体的成功交配(洪德元, 1990; Arnold, 1992)。通常大部分杂交后代因为不育而被淘汰, 但因无融合生殖的发生和异源多倍体的形成,

自然杂交种在自然界普遍存在(Arnold, 1992, 1997)。由于植物中广泛存在的无融合生殖现象, 三倍体或多倍体的自然杂交种往往可以通过无融合生殖等机制繁衍后代, 这对植物的物种形成具有重要意义(洪德元, 1990)。此外, 同倍体杂交物种形成的例子也越来越多(Feliner et al, 2017)。2016 年 11 月, *Science* 发表综述“Shaking up the Tree of Life”, 详述了由于自然杂交和基因渐渗引起的网状进化对传统的生命之树理论提出了挑战(Pennisi, 2016)。

虽然中国人在 900 年前的画作中就记录了物种之间的杂交现象, 但是中国动、植物志中记载的自然杂交种并不多。在动物中, 昆虫的自然杂交极为普遍, 但中国的昆虫学家目前多关注新物种的发现和发表, 还未对自然杂交物种予以足够的关注, 因此本专辑也没有征集到动物学领域的研究工作, 成为这个专辑的遗憾。在植物中, 《中国植物志》完成后, 留给现世一个长长的植物物种清单。然而, 对这个国家植物志物种数世界之清单, 中外植物学家仍有大量的疑虑, 特别是大量似是而非的物种, 我们不清楚这里包含多少自然杂交种。2016 年 11 月 11 日, 在中国科学院生物多样性委员会的组织下, 召开了“中国首届自然杂交与生物多样性研讨会”并组织了 this 专辑。希望本专辑的出版能吸

\* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: yhyang@sibs.ac.cn



引更多研究人员去触及中国生物多样性中的秘境——自然杂交。

对自然杂交后代的命运已有很多讨论,虽然现实中大部分杂交后代为自然界所淘汰,但是杂交仍然是物种形成机制中不可忽视的因素。本专辑中,王玉国(2017)简述了自然杂交与物种形成的研究历史和基因组时代杂交与物种形成研究的新进展;毛建丰等(2017)则以高通量测序技术为核心,结合表型、群体遗传学和系统发育等多种分析手段,联系实际案例,系统介绍了如何检验自然杂交的存在;然而,自然杂交的发生不仅可以造成遗传上的差异,也会造成表观遗传上的变化,李霖锋和刘宝(2017)介绍了表观遗传——主要是指独立于遗传变异之外的一种可以影响生物发育的遗传信息或无法用 DNA 序列变异解释但却有基因功能变异的染色体修饰——在植物杂交与多倍化过程中所起到的作用,并基于在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)和芸薹属物种(*Brassica* spp.)中已有的实例,探讨了表观遗传变异与表型革新的相关性。希望读者能从这 3 篇综述中全面了解自然杂交的研究历史、方法和前沿。

生殖隔离是保持物种独立性的基础,而自然杂交则会打破这道屏障而模糊物种的边界。魏宇昆等(2017)研究了浙江天目山同域分布的舌瓣鼠尾草(*Salvia liguliloba*)和南丹参(*S. bowleyana*)强烈的传粉前隔离机制和微弱的传粉后隔离机制,致使在亲缘关系较近且需借助共同传粉者完成异交的两种鼠尾草,以花部传粉结构的显著差异形成强烈的机械隔离,从而避免了同域分布、花期重叠的物种间的花粉干扰和自然杂交,维持了物种种群遗传结构的稳定性。张小龙等(2017)研究了苦苣苔科牛耳朵(*Primulina eburnea*)和马坝报春苣苔(*P. mabaensis*)两个物种不同的生殖隔离机制,结果显示当两个物种传粉前后隔离机制未彻底发育时,物种间的自然杂交将会发生,自然杂交后代的个体将会出现。两个精巧的案例研究显示了有花植物的生殖隔离在自然杂交物种形成中的重要意义,生动地说明了生殖隔离是保持物种独立性和促进物种多样性的基础。然而,对大部分蕨类植物来说,孢子同型的共同特征意味着蕨类植物相对微弱的生殖隔离机制和自然杂交在蕨类植物中的普遍发生。常艳芬(2017)通过对铁角蕨科植物染色体数据的分析,探讨了蕨

类植物中普遍发生的多倍化现象和网状进化机制。

检测自然杂交种的存在、揭示自然杂交发生的过程和规律是当前中国生物多样性研究中最为基础和艰难的工作,多学科的证据链的结合方能全面了解自然杂交种出现的前世今生。郑硕理等(2017)和周秋杰等(2017)分别基于核 DNA 序列、叶绿体 DNA 序列和形态特征数据的整合分析,通过强有力的证据揭示了中国杜鹃花属(*Rhododendron*)和野牡丹属(*Melastoma*)新发现的自然杂交现象。谢艳萍等(2017)则通过叶绿体 DNA 和核 DNA 序列分析,以及人工授粉实验,首次揭示了偏花报春(*Primula secundiflora*)和海仙报春(*P. poissonii*)在 3 个同域居群中出现的不对称杂交机制;而田代科等(2017)则从自然地理分布、形态学特征、分子生物学检测和杂交试验等多个方面,系统总结了我国秋海棠属(*Begonia*)的自然杂交发生及其特点。

自然杂交在植物界的普遍发生预示着网状进化的可能性,因此传统的理想中的生命之树则可能演变成复杂的生命进化网络。舒江平等(2017)通过对福建观音座莲(*Angiopteris fokiensis*)转录组序列的测序,比较了莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)、小立碗藓(*Physcomitrella patens*)、江南卷柏(*Selaginella moellendorffii*)和欧洲云杉(*Picea abies*)等植物的全基因组序列,利用系统基因组学的方法重构了陆生植物的系统发育进化关系。结果发现,不同的分析策略将得到不同的系统发育拓扑结构:基于 1,668 个直系同源基因的单独分析得到 15 种不同的拓扑结构;而系统发育网络分析结果显示,藻类、苔藓、石松类、种子植物和蕨类植物等 5 个类群间在进化的早期可能存在非常复杂的网状进化关系。

2007 年 *Nature* 文章估计,全世界至少已有 10% 的动物和 25% 的植物经历了自然杂交起源(Mallet, 2007)。近年来,不仅有大量新的自然杂交种被发现,而且还有越来越多的人熟悉的物种被证实为自然杂交起源,从而使物种之间的演化关系不再是过去描述的简单的二歧分支线性关系,而是形成复杂的网络。虽然这些复杂的网状进化关系可能是物种演化的真实表现,并且对研究物种形成和演化具有重要价值,却给分类学带来了越来越多的困扰,逐渐成为分类学家的噩梦(Dejaco et al, 2016)。不仅如此,广泛的杂交后代与亲本回交导致的基因渐渗,



图 1 红腹锦鸡(左中, 中央)、白腹锦鸡(左下, 中下)的成年雌雄个体, 以及红外相机在野外记录到的野生杂交个体(上图, 成年雄性, 四川鞍子河保护区)。红腹锦鸡和白腹锦鸡在我国西南邛崃山等地分布区重叠, 存在天然杂交现象, 杂交个体兼具双方亲本的形态特征, 在 900 多年前北宋徽宗赵佶传世名画《芙蓉锦鸡图》(右下)中即被描绘。(供图: 李晟/北京大学、保护国际基金会、鞍子河保护区、IBE)

Fig. 1 Golden pheasant (*Chrysolophus pictus*, middle left and central), lady Amherst's pheasant (*C. amherstiae*, lower left and lower middle) and a male hybrid individual (upper) which is recently captured by camera-trap in Anzihe Nature Reserve, Sichuan Province, representing chimeric morphological characteristics from both parental species. Such hybrid pheasant has been described in an ancient painting (lower right) by Emperor Huizong dated back to the 12th century in China. (animal picture credit: Sheng Li / Peking University, Conservation International, Anzihe Nature Reserve, IBE)

可能会给祖先物种或亲本的生存造成威胁(周秋杰等, 2017)。因此, 对自然杂交物种或杂交后代是否需要保护成为近年来国际上争议的热点问题。商辉和严岳鸿(2017)从遗传多样性、物种多样性和生态系统多样性等三个方面论述了自然杂交种在进化和生态过程中的重要作用, 并结合近年来自然杂交的研究和保护案例, 提出自然杂交种的保护策略和建议。

《芙蓉锦鸡图》中的杂交锦鸡不仅仅生活在皇帝的御画中, 同样也生活在今天的自然界, 北京大学的李晟在野外用红外相机也捕捉到了野生杂交个体(图 1)。虽然是个异类, 但却是自然界的奇迹。同样的, 它需要一个合法的名称而不仅仅被称为杂交种, 它需要找到父母而不是仅仅游离于家族之外, 它需要人类的保护和关爱而不仅仅是被当作异类

甚至被清除。希望读者通过阅读本期专辑能从自然杂交的角度对生物多样性有一个新的认识。

致谢: 北京大学李晟博士、保护国际基金会、鞍子河保护区、IBE等提供了本文插图中的图片, 李晟博士为本文的插图进行了描述, 在此一并致谢。

## 参考文献

- Arnold ML (1992) Natural hybridization as an evolutionary process. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37, 237–261.
- Arnold ML (1997) *Natural Hybridization and Evolution*. Oxford University Press, Oxford.
- Chang YF (2017) Polyploidy and the formation of species diversity in Aspleniaceae. *Biodiversity Science*, 25, 621–626. (in Chinese with English abstract) [常艳芬 (2017) 铁角蕨科的多倍化与物种多样性形成. *生物多样性*, 25, 621–626.]

- Dejaco T, Gassner M, Arthofer W, SchlickSteiner BC, Steiner FM (2016) Taxonomist's nightmare ... evolutionist's delight: an integrative approach resolves species limits in jumping bristletails despite widespread hybridization and parthenogenesis. *Systematic Biology*, 65, 947–974.
- Feliner GN, Álvarez I, Fuertes-Aguilar J, Heuertz M, Marques I, Moharrek F, Piñeiro R, Riina R, Rosselló JA, Soltis PS, Villa-Machío I (2017) Is homoploid hybrid speciation that rare? *Heredity*, 118, 513–516.
- Hong DY (1990) Plant Cytotaxonomy, pp. 159–160. Science Press, Beijing. (in Chinese) [洪德元 (1990) 植物细胞分类学, 159–160页. 科学出版社, 北京.]
- Li LF, Liu B (2017) The roles of epigenetic variation in plant hybridization and polyploidization. *Biodiversity Science*, 25, 600–607. (in Chinese with English abstract) [李霖峰, 刘宝 (2017) 表观遗传变异在植物杂交与多倍化过程中的作用. 生物多样性, 25, 600–607.]
- Mallet J (2007) Hybrid speciation. *Nature*, 466, 279–283.
- Mao J-F, Ma YP, Zhou RC (2017) Approaches used to detect and test hybridization: combining phylogenetic and population genetic analyses. *Biodiversity Science*, 25, 577–599. (in Chinese with English abstract) [毛建丰, 马永鹏, 周仁超 (2017) 结合系统发育与群体遗传学分析检验杂交是否存在的技术策略. 生物多样性, 25, 577–599.]
- Peng MS, Wu F, Murphy RW, Yang XJ, Zhang YP (2016) An ancient record of an avian hybrid and the potential uses of art in ecology and conservation. *Ibis*, 158, 444–445.
- Pennisi E (2016) Shaking up the Tree of Life. *Science*, 54, 817–821.
- Shang H, Yan YH (2017) Natural hybridization and biodiversity conservation. *Biodiversity Science*, 25, 683–688. (in Chinese with English abstract) [商辉, 严岳鸿 (2017) 自然杂交与生物多样性保护. 生物多样性, 25, 683–688.]
- Shu JP, Liu L, Shen H, Dai XL, Wang QX, Yan YH (2017) The complex reticulate evolutionary relationships of early terrestrial plants as revealed by phylogenomics analysis. *Biodiversity Science*, 25, 675–682. (in Chinese with English abstract) [舒江平, 刘莉, 沈慧, 戴锡玲, 王全喜, 严岳鸿 (2017) 基于系统基因组学分析揭示早期陆生植物的复杂网状进化关系. 生物多样性, 25, 675–682.]
- Tian DK, Li C, Xiao Y, Fu NF, Tong Y, Wu RJ (2017) Occurrence and characteristics of natural hybridization in *Begonia* in China. *Biodiversity Science*, 25, 654–674. (in Chinese with English abstract) [田代科, 李春, 肖艳, 付乃峰, 童毅, 吴瑞娟 (2017) 中国秋海棠属植物的自然杂交发生及其特点. 生物多样性, 25, 654–674.]
- Wang YG (2017) Natural hybridization and speciation. *Biodiversity Science*, 25, 565–576. (in Chinese with English abstract) [王玉国 (2017) 自然杂交与物种形成. 生物多样性, 25, 565–576.]
- Wei YK, Huang YB, Li GB (2017) Reproductive isolation in sympatric *Salvia* species sharing a sole pollinator. *Biodiversity Science*, 25, 608–614. (in Chinese with English abstract) [魏宇昆, 黄艳波, 李桂彬 (2017) 同域分布共享传粉者的鼠尾草属植物的生殖隔离. 生物多样性, 25, 608–614.]
- Xie YP, Zhao JL, Zhu XF, Li L, Li QJ (2017) Asymmetric hybridization of *Primula secundiflora* and *P. poissonii* in three sympatric populations. *Biodiversity Science*, 25, 647–653. (in Chinese with English abstract) [谢艳萍, 赵建立, 朱兴福, 李莉, 李庆军 (2017) 偏花报春和海仙报春3个同域居群的不对称杂交. 生物多样性, 25, 647–653.]
- Zhang XL, Yang LH, Kang M (2017) Post-pollination reproductive isolation of sympatric populations of *Primulina eburnea* and *P. mabaensis* (Gesneriaceae). *Biodiversity Science*, 25, 615–620. (in Chinese with English abstract) [张小龙, 杨丽华, 康明 (2017) 牛耳朵和马坝报春苣苔同域居群授粉后的生殖隔离. 生物多样性, 25, 615–620.]
- Zheng SL, Tian XL, Huang CL, Wang LJ, Feng Y, Zhang JL (2017) Molecular and morphological evidence for natural hybridization between *Rhododendron decorum* and *R. delavayi* (Ericaceae). *Biodiversity Science*, 25, 627–637. (in Chinese with English abstract) [郑硕理, 田晓玲, 黄承玲, 王灵军, 冯元, 张敬丽 (2017) 结合分子手段和形态分析验证大白杜鹃与马缨杜鹃的自然杂交. 生物多样性, 25, 627–637.]
- Zhou QJ, Cai YC, Ng WL, Wu W, Dai SP, Wang F, Zhou RC (2017) Molecular evidence for natural hybridization between two *Melastoma* species endemic to Hainan and their widespread congeners. *Biodiversity Science*, 25, 638–646. (in Chinese with English abstract) [周秋杰, 蔡亚城, 黄伟伦, 吴伟, 代色平, 王峰, 周仁超 (2017) 野牡丹属两个海南特有种与同属广布种自然杂交的分子证据. 生物多样性, 25, 638–646.]

(责任编辑: 周玉荣)

•综述•

# 自然杂交与物种形成

王玉国<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup> (生物多样性与生态工程教育部重点实验室, 复旦大学生物多样性科学研究所, 上海 200438)<sup>2</sup> (复旦大学生命科学学院生态与进化生物学系, 上海 200438)

**摘要:** 在生物进化过程中, 自然杂交对物种形成有着重要的影响。多倍化和同倍体杂交物种形成是通过杂交产生新种的两种主要方式。普遍的观点认为多倍化是植物物种形成的主要动力, 而越来越多染色体倍性相同物种之间杂交现象的发现, 说明同倍体杂交也是物种形成的重要方式。目前按严格标准确定的同倍体物种形成案例相对较少, 还亟需对更多不同类型的种间杂交带进行形态与分子等多方面证据的调研, 并通过模型预测与实测数据分析, 来探讨杂交物种形成初期乃至整个过程的遗传基础; 更多杂交物种形成的新模式材料, 有待于通过分化谱系的历史基因流重建进行鉴定, 用于进一步阐释自然选择对于生殖隔离形成的影响、物种形成过程中的生态适应变化和多样性遗传创新的产生规律。本文简要综述了自然杂交的研究历史, 阐述其相关概念、研究方法和基因组时代杂交与物种形成研究的最近进展, 并针对拟解决的关键问题提出相应的分析见解, 以期后续研究和涉及杂交的物种多样性保护提供借鉴。

**关键词:** 自然杂交; 物种形成; 多倍化; 同倍体杂交; 渐渗杂交

## Natural hybridization and speciation

Yuguo Wang<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup> Ministry of Education Key Laboratory for Biodiversity Science and Ecological Engineering; Institute of Biodiversity Science, Fudan University, Shanghai 200438<sup>2</sup> Department of Ecology and Evolutionary Biology, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438

**Abstract:** Natural hybridization plays a pivotal role in the formation of new species during the evolution of organisms. There are two principal types of hybrid speciation: polyploidization and homoploid hybrid speciation. The former has been regarded as an important force driving plant speciation, whereas the latter has proved to be a main mode of speciation based on an increasing number of cases, which have reported successful crosses between the species at the same ploidy level. However, only a few cases of homoploid hybrid speciation have been documented when strict criteria are applied. Therefore, molecular evidence involving more genomic loci and morphological investigations from different kinds of hybrid zones, as well as assessments of existing speciation models and new computer stimulations, are required for further understanding the genetic basis of the initial and entire process of speciation. Through the historical reconstruction of gene flow between diverging lineages, additional organismal models for hybrid speciation need to be developed to reveal the effects of natural selection on the formation of reproductive isolation, and to discern the ecologically adaptive changes and the formation rules of novel diversity in the process of hybrid speciation. Here I briefly review the history of studies examining natural hybridization and speciation to introduce concept changes, research methods, and the latest advances of natural hybridization and speciation, to identify the unsolved core and basic scientific questions and to provide feasible suggestions for future studies and the protection of biodiversity involved in natural hybridization.

**Key words:** natural hybridization; speciation; polyploidization; homoploid hybrid speciation; introgressive hybridization



自然杂交(natural hybridization)是在自然条件下,来自基于某一个或多个可遗传的性状可以明显区分的两个或多个不同群体的个体之间的成功杂交(Arnold, 1997)。在生物长期进化的过程中,自然杂交与物种形成(speciation)存在着重要的关联。由于自然杂交的客观存在,杂交后代与亲本之间的系统发育关系从本质上就构成了与“二叉分歧”结构不同的网状形式,这种进化就是网状进化(reticulate evolution)。因此而导致产生新物种的方式就是杂交物种形成(hybrid speciation)。

对于杂交与物种形成关系的认识,在动植物的研究中存在明显不同的见解。植物类群中自然杂交的大量出现,表明新的杂交种和新的适应型对进化产生了显著影响。然而,在动物方面的自然杂交研究却是普遍支持另一个截然不同的观点:由于种间杂交几乎不产生或很少产生可育的后代,是不适应的,因而被看作是一个导致生殖隔离形成的过程。自然杂交究竟是一个潜在的创造过程(Lotsy, 1916; Anderson & Stebbins, 1954; Lewontin & Birch, 1966; Arnold, 1992),有助于物种分化(Rieseberg & Wendel, 1993; Arnold, 1997),还是进化过程中的“噪音(noise)”或“盲端(dead end)”(Wagner, 1970; Mayr, 1992; Schemske, 2000),曾存在广泛的争议。随着基因组时代的到来,很多未决的问题获得了突破,更多的研究已从关注自然杂交的鉴定,聚焦到杂交物种形成的过程和相关的机制上来。

## 1 种间杂交的方式与物种形成

自然杂交的遗传本质是分化谱系间遗传物质的交流,在后代中发生重组、变异以及频率的变化并导致性状改变,是基因组进化和物种形成的主要动力之一。虽然在动植物中均有案例显示种间杂交后代可能在适合度(fitness)上相比亲本处于劣势,后代育性低或不育,因而会被淘汰,但也有大量研究表明,可存活的种间杂交后代能够综合亲本的适应性或创造出新的适应性,丰富基因库、拓宽生境,进而促进基因组进化和新种形成。

根据遗传物质交流时是否发生染色体数加倍以及与亲本之间是否产生生殖隔离,可将种间杂交划分为3种主要进化方式:多倍化(polyplodization)、同倍体杂交物种形成(homoploid hybrid speciation)和渐渗杂交(introgressive hybridization)。

### 1.1 多倍化

多倍化是被普遍认可的植物最主要的物种形成方式(Abbott, 2003)。来自不同物种的配对染色体在减数分裂时通常无法正常分离,导致杂交后代不育。但在多倍体中,通过染色体加倍,每个染色体对在减数分裂时包含来自一个物种的两个染色体,正常的分离就可以得到保证,从而达到后代杂交可育。由于杂交后代和亲本的染色体数目不匹配,从而使其与亲本之间产生生殖隔离。因此,可以相对容易被确定是新的物种。在一些植物中,异源多倍化(allopolyploidization)甚至被公认为能“瞬间”生成新种,例如,四倍体邱园报春(*Primula kewensis*)是由两个二倍体物种轮叶报春(*P. verticillata*)和多花报春(*P. floribunda*)杂交而来(Ramsey & Schemske, 2002)。

### 1.2 同倍体杂交物种形成

染色体倍性相同的物种之间也可以通过杂交产生新的物种。这种方式通常表现为二倍体物种之间杂交后形成新种,如向日葵属(*Helianthus*)、芍药属(*Paeonia*)等类群中都有这类种间杂交。这些倍性与亲本相同的杂交后代可以通过基因重组产生与双亲不同的遗传组合,因此也称同倍体重组(homoploid recombination)。其他倍性相同物种之间(如四倍体与四倍体、六倍体与六倍体)的杂交也属于这个范畴(Ferguson & Sang, 2001)。确定同倍体种间杂交后代与亲本之间是否存在生殖隔离,是判断新种形成的关键和难点,往往需要对两个亲本种相互接触的地带——杂交带(hybrid zone, 或译作杂交区、杂交地带)群体开展大量的形态和分子遗传学研究。来自不同亲本的基因型通过杂交会在此区域形成遗传上由一个亲本向另一个亲本过渡的渐变群(cline)。在杂交背景上,两个亲本类型形成了斑块化分布的镶嵌式结构。杂交带宽度从几十米到几百公里不等,其形状差异取决于杂交个体的存活比率高。对杂交带精确定义的理解,不同研究者的侧重有所不同:有的强调该区域杂交个体适合度的增加;有的则强调杂交后代是亲本之间二次接触的结果,尽管杂交后代和亲本基因流可能依然存在,但两者能够通过表型差异和特定遗传位点来进行区分。

### 1.3 渐渗杂交

杂交后代可与两个亲本物种或其中之一反复回交,结果会导致从一个种到另一个种跨越生殖障

碍的基因转移, 这种自然杂交方式即渐渗杂交 (Anderson & Hubricht, 1938; Anderson, 1949)。在自然条件下, 动植物发生渐渗杂交的例子不胜枚举。典型的如狼[野狼(wolf, *Canis lupus*)和灰狼(coyote, *C. latrans*)]、鲤科骨尾鱼属(*Gila*)等动物; 鸢尾属(*Iris*)、刺柏属(*Juniperus*)、松属(*Pinus*)和禾本科一些属等植物。如果杂交后代超过 $F_1$ 代、并且存在杂交个体之间的交配以及与亲本的回交, 这样的群体就是杂交群(hybrid swarm)。这个概念很容易与杂交带的渐变群混淆。杂交群高度可变, 由介于两个亲本类型之间的遗传和表型特征存在差异的一系列个体组成, 因此杂交群使得亲本类群之间的界限变得模糊。例如, 目前野生稻(*Oryza rufipogon*)的生境比较适合栽培稻(*O. sativa*)的生长, 如果没有有效的隔离, 野生稻很可能就会变成被栽培稻基因普遍渐渗的类型。当杂交个体存在变异、与亲本类型一样有活力, 并且与亲本之间的回交不存在障碍, 杂交群就发生了。但如果杂交类型很少变异, 或者杂交群个体不与亲本类型回交就能维持, 杂交群则不能发生。渐渗杂交一般不能产生新的物种, 但如果这些可育的种间杂交不再与亲本群体发生回交或占据了新生境, 就可能形成新的杂交种(Abbot, 2003)。

## 2 自然杂交的频率

总的来说, 在动物中发生种间自然杂交事件的频率非常低, 而在植物中则相对普遍(通常分别用rare和widespread来形容, Arnold, 1997)。尽管如此, 植物种间杂交的整体发生频率并不高, 仅在某些特定的分类群尤其是近缘分类群之间有很高的杂交频率, 显示出明显的偏好, 比如: 松科、桦木科、柳叶菜科、蔷薇科、杨柳科等类群中杂交事件发生频繁, 但在唇形科和豆科中却很少发生。对不同区系的维管植物统计发现: 每一个区系中种间杂交在科、属的水平出现频率都是不均等的(Ellstrand et al, 1996)。此外, 多年生植物发生杂交的频率往往高于一年生植物(Stace, 1975)。但也有学者估计平均有10%的植物和25%的动物至少和另一个物种发生过杂交(Mallet, 2005), 在快速辐射进化类群的近缘物种间更容易发生杂交。自然杂交事件在不同分类群中不均等地出现, 一方面反映了生物体自身的差异(如交配系统的差异), 另一方面与其时空分布有着

密切关系, 如同域分布类群与异域分布类群在自然杂交方面就可能面临不同的机遇。

Vriesendorp和Bakker (2005)统计了已发表文献中涉及被子植物不同种间杂交方式的进化案例, 发现多倍化现象比同倍体重组更为普遍。Kim和Lockhart (2006)则认为同倍体杂交物种的形成不应被看作是罕见的现象, 由于同倍体重组不像多倍化现象容易鉴定, 很可能被严重低估, 因为很难将它和一般的杂交与渐渗杂交相区分。

一些研究表明, 大多数被子植物起源于祖先的杂交(Clausen et al, 1945; Stebbins, 1947; Soltis & Soltis, 1993)。但也有研究推测只有大约2–4%的被子植物和7%的蕨类植物为多倍体杂交起源(Otto & Whitton, 2000), 细胞学、化石和基因组的证据支持绝大多数被子植物和蕨类为古多倍体(paleopolyploidy), 存在祖先类群的基因组加倍(Grant, 1981; Masterson, 1994; Cui et al, 2006)。Wood等(2009)通过对细胞学资料和物种间系统发育关系的联合分析, 确定约有15%的被子植物和31%的蕨类植物的物种形成事件中经历了染色体倍性增加, 但加倍后并没有必然导致相关谱系分化速率的加快。

## 3 鉴定自然杂交的通用方法

### 3.1 方法概述

早期对杂交的鉴定主要依据形态特征, 杂交指数常被用于区分双亲间的中间类型并推断个体是否来自杂交。但形态特征的可塑性常使子代和双亲混淆。由于形态标记的可靠性较低, 没有一致的标准, 甚至不同的研究者都可能获得截然不同的判定结果, 因此仅依靠形态标记来鉴定杂交很容易导致错误的判断。细胞学标记曾作为杂交的重要判断标准, 同倍体杂交物种形成和多倍化的确定都依靠染色体数目的准确鉴定, 但实际操作时必须明确染色体的倍性和亲本范围, 因而也存在很大的局限性。

分子标记在自然杂交的鉴定与分析中曾发挥重要的作用。它包括可遗传并可检测的特异性蛋白质标记和核酸标记。蛋白质标记方法(如同工酶和等位酶等)因精确度明显不足, 逐渐被后来发展的DNA标记取代。常用的DNA标记主要有限制性长度片段多态性(restriction fragment length polymorphisms, RFLP)、随机扩增多态性DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)、扩增片段长度多态性

(amplified fragment length polymorphisms, AFLP)、简单重复序列(simple sequence repeats, SSR或称微卫星)等,其中RFLP、SSR为共显性标记,能鉴定种间杂交及亲本,应用最为广泛。这些分子标记是针对整个基因组的扩增,检测效率高、信息量大,但所获得的信息由扩增片段的有无决定,受实验条件影响较大,鉴定结果不如基因序列准确。

基因序列的系统发育分析,是研究自然杂交尤其是种间杂交最为常用的方法,也是鉴别手段的首选(Arnold, 1997)。鉴定种间杂交时,首先要选择适于属内种间甚至是更低分类群的基因,并确保其对近缘类群有足够的分辨率。植物基因组包括核基因组、叶绿体基因组和线粒体基因组,绝大多数动物无叶绿体基因组。了解不同基因组的特点以及属内种间甚至群体间研究的基因或DNA片段,将有助于合理而有效地应用它们去获得系统发育信息,判断自然杂交。

叶绿体基因组和线粒体基因组通常为单亲遗传,绝大多数为母性遗传,因此常被用来判断杂交种的母本。植物叶绿体基因组中编码基因中的*matK*基因、非编码序列(内含子或间隔区)中的*trnL-F*、*rpl16*、*trnT-L*、*trnG-S*、*trnC-D*、*rps16*等都曾被广泛用于不同属内种间的物种鉴定,适于种间杂交和亲本的判定,而线粒体基因仅有*nad1*和*nad4*等少数有稳定变异的长内含子基因片段被应用于植物种间杂交的进化分析(Chat et al, 2004)。目前大量植物叶绿体基因组已经被报道,富含信息位点的长基因片段筛选及相关引物设计比较容易;而线粒体基因组重排事件频繁,很多类群还缺乏相关数据。相比较而言,动物的线粒体基因组排列相对稳定,常用于属内种间系统发育的基因有细胞色素氧化酶I(cytochrome c oxidase subunit I, COI)、细胞色素B(cytochrome b subunit, cytB)、16S rDNA等基因。由于动物线粒体基因组相对较小,也适合用完整线粒体组来确定争议物种的界限问题,如虎鲸的分类(Morin et al, 2010)。

核基因组为双亲遗传,常被用来判断双亲的大致范围,可避免仅凭单亲遗传推断而产生的不正确分支关系解释。虽然核基因组包含的基因的数量和变异相当大,但以往用于植物属内种间杂交的核基因序列最多的却是核糖体DNA(nrDNA) ITS。它由介于18S rRNA、5.8S、26S rRNA之间的两段序列

(ITS1和ITS2)组成。其突出的优点包括:结构功能十分保守,但又具有一定的变异;在细胞中含量大,容易获得。虽然ITS在基因组中存在大量拷贝,但在多数植物中为一致性进化(concerted evolution, Elder & Turner, 1995),多数情况下可以看作是单拷贝基因,因而成为进行属内种间系统发育研究和自然杂交判断的理想片段,得到广泛应用。由于种间杂交后代特别是F<sub>1</sub>代会包含来自双亲物种的序列,而大部分核基因中同时存在直系同源和旁系同源拷贝,因此使用核基因进行杂交起源判断时必须进行分析和鉴别。除核糖体DNA以外,一些含有长内含子的单或低拷贝核基因有足够的信息位点,已被陆续应用于物种间的系统发育研究,这些基因的克隆测序可以帮助判断自然杂交、多倍化及检验相关的物种形成假说。目前已成功应用的基因包括*Adh*(编码乙醇脱氢酶, Sang et al, 1997; Ferguson & Sang, 2001)、*RPB2*(编码RNA聚合酶II的第二大亚基)、*PgiC*(编码磷酸葡萄糖异构酶,一种糖分解酶)、*PhyC*(光敏色素基因家族的一个成员,编码感光蛋白)(Russell et al, 2010)、*PI*(调控花器官发生的B类基因, Lee et al, 2002)、*LEAFY*(调控花分生组织和花期等功能, Kim et al, 2008)、*GBSSI*(编码小粒结合淀粉合成酶, Smedmark et al, 2003)等。目前大量的转录组或基因组序列的测定,使得从大量功能基因中筛选出适于属内种间系统发育研究的单拷贝核基因(single copy nuclear gene, SCNG)更为便利,特别是那些含有长内含子的单拷贝核基因最为适合自然杂交的判定和物种形成假说的验证。

利用不同类型基因的系统发育不一致(phylogenetic incongruence)来判断种间杂交,是应用比较普遍的方法,如Chat等(2004)基于叶绿体基因序列和线粒体分型对猕猴桃属(*Actinidia*)网状进化的研究。在植物自然杂交与进化的研究中,基于ITS和特定叶绿体基因的系统发育不一致来判断种间杂交事件的发生是最为常用的方法,研究者往往依据叶绿体基因母性遗传特点来判定杂交种的母本。需要注意的是,除了种间杂交,基因水平转移(horizontal gene transfer)、基因复制后的拷贝丢失(hidden paralogs)及不完全谱系分选(incomplete lineage sorting)等过程均可能导致系统树的冲突(Wendel & Doyle, 1998),在判断种间杂交与物种形成时应加以区分。

### 3.2 典型案例

基于上述通用方法, 从无脊椎动物到脊椎动物, 有大量的渐渗杂交案例被报道(Arnold, 1997)。在果蝇、*Heliconius*属蝴蝶中还有同倍体杂交物种形成被证实(Schwarz et al, 2005; Mavárez et al, 2006; Melo et al, 2009; Salazar et al, 2010)。

与动物网状进化以渐渗杂交为主不同, 植物自然杂交的方式更为多样化, 比较有代表性的案例很多, 如棉属(*Gossypium*) AD基因组的异源多倍化起源(Wendel et al, 1995)、向日葵属的同倍体古杂交(Rieseberg et al, 1990; Rieseberg 1991)、芍药属的复杂网状进化(Sang et al, 1995)、鸢尾属的渐渗杂交(Arnold et al, 1990a, b, 1991; Arnold, 1993)、具有细胞质DNA单亲互补遗传模式(Mogensen, 1996)的松科植物的自然杂交(Isoda et al, 2000; Wang et al, 2001)等。此外, 还有基于单拷贝或低拷贝核基因探讨异源多倍体物种网状进化重建的研究, 已用于十字花科独行菜属(*Lepidium*)、蔷薇科Geinae类植物、蓼科春蓼属(*Persicaria*)、兰科多穗兰属(*Polystachya*)等多个类群。这种重建方法不仅可以借助基因拷贝数与植物倍性相关性来探讨杂交起源, 区分同源和异源多倍体, 还可以推导重要鉴别性状(如花部结构简化)的进化历史(Lee et al, 2002; Smedmark et al, 2003; Kim et al, 2008; Russell et al, 2010)。

## 4 基因组时代新的技术在自然杂交与物种形成研究上的应用

随着新一代基因组测序方法的不断发展, 越来越多的新技术被引入到自然杂交与物种形成的研究中, 包括: (1)限制性位点关联DNA测序(restriction-site associated DNA sequencing, 简称RADseq), 作为一种通用的简化基因组测序(reduced-representation sequencing)方法, 它已逐渐取代原来的AFLP、RFLP、SSR等以条带分析的分子标记, 在不同动植物类群杂交与物种形成的研究中获得应用, 例如, 蝴蝶的种间杂交和适应性分化(Gompert et al, 2012; Nadeau et al, 2013)、丽鱼的杂交物种形成与快速辐射(Keller et al, 2013; Martin et al, 2015)、蛙类的渐渗杂交(Streicher et al, 2014)、蚊子性染色体倒位与生殖隔离(O'Loughlin et al, 2014)等; 再如捕蝇草属(*Ficoidula*, Rheindt et al, 2014)、马先蒿属(*Pedicularis*, Eaton & Ree, 2013)、杨属(*Populus*, Stölting

et al, 2013)、向日葵属(Andrew et al, 2013; Andrew & Rieseberg, 2013)等植物类群的种间渐渗杂交研究; (2)单核苷酸多态性微阵列(SNP array)技术, 成功用于在家鼠(*Mus musculus domesticus*)与近缘类群杂交带、杨属植物种间杂交带的分析中(Wang et al, 2011; Janoušek et al, 2012, 2015; Geraldès et al, 2014; Liu et al, 2015); (3)外显子组测序(exome sequencing), Good等(2015)用该方法在两种花栗鼠(chipmunk)中探讨了生殖隔离与种间杂交的关系; (4)转录组测序(transcriptome sequencing), 该方法已在很多类群中得到应用, 如家鼠与近缘类群(Phifer-Rixey et al, 2014)、欧洲野兔2个亚种(*Oryctolagus cuniculus algirus*和*O. c. cuniculus*, Carneiro et al, 2014)、向日葵属不同物种(Renaut et al, 2013; Barb et al, 2014)等; (5)测序基因分型(genotype by sequencing)技术, 在侏儒鸟(manakins)和剑尾鱼(swordtail fish)的案例中, 采用该方法分别揭示了受选择驱动和遗传不亲和导致的种间杂交与亲本种生殖隔离(Parchman et al, 2013; Schumer et al, 2014a); (6)全基因组测序(whole-genome sequencing), 这种研究最为详尽的方法目前已成功应用于蝴蝶(*Heliconius* Genome Consortium, 2012; Martin et al, 2013)、果蝇(Garrigan et al, 2012; Lohse et al, 2015)、马(Jónsson et al, 2014)、蚊子(Fontaine et al, 2015)、捕蝇草属(Ellegren et al, 2012; Nadachowska-Brzyska et al, 2013; Burri et al, 2015)等动植物类群杂交与物种形成研究的各个方面, 以及尼安德特人、丹尼索瓦人与现代人之间的基因渗入和遗传重组研究(Green et al, 2010; Sankararaman et al, 2012, 2014; Wall et al, 2013; Lohse & Frantz, 2014; Prüfer et al, 2014)。纵观以往的研究方法, 其实不外乎两类: 基于序列分析的系统发育方法, 基于杂交群或杂交带渐变群等位基因频率变化的群体遗传学方法。

除此之外, 建模分析在杂交物种形成特别是同倍体物种形成的研究中也得到了发展。早期模型多属于“适应性基因重组模型”, 主要针对特定杂种基因型发生正选择或者自交的情况进行的模拟(McCarthy et al, 1995)。例如, 来自向日葵自然杂交的建模分析显示, 种间杂交中的新基因组合(如倒位)在经历正选择或自交频率高时就会被固定下来。这一模型的后续版本整合了种间杂交和亲本的生态分化, 揭示出如果杂交后代比亲本有更高的适合



度, 杂交物种形成就会频繁出现(Buerkle et al, 2000; Duenez-Guzman et al, 2009)。由于杂交通常会产生新的性状, 但很难评价这些性状在生态上或进化上就一定比亲本有更好的适合度, 因此, 最近有研究者针对上述情况, 提出另一类模型——“遗传不亲和模型”, 它并不需要考虑是否自交或者是否杂种相对亲本有适合度优势。计算机模拟结果揭示种间杂交可以通过对与亲本不亲和的位点进行选择来实现生殖隔离(Schumer et al, 2015)。值得注意的是, 研究者强调这一模型与以前的模型并不排斥, 但还需要更多实测案例(如Hermansen et al, 2014)来验证两者是否兼容。近期在非洲丽鱼中证实古杂交可以促进快速物种辐射(Meier et al, 2017), 从实测的分析结果推测, 物种形成所需代数相较以往模型所推导的会更少, 因此, 有必要在同一类种间杂交中同时检验这两类不同模型, 并结合实测数据进行分析验证。

## 5 生殖隔离与杂交种的判断标准

种间杂交并不一定产生杂交种(hybrid species); 但杂交种必然经历了杂交过程。需要强调的是, 在很多情况下鉴定种间杂交容易, 但要确定已经形成杂交种——达到物种形成的程度比较困难。这不仅仅是因为后者确实对于生物的进化有着特殊的意义, 还因为物种形成本身需要有严格的限定。Schumer等(2014b)提出了证明自然杂交导致了物种形成应该满足3个条件: (1)发生了种间杂交; (2)种间杂交与亲本之间存在生殖隔离; (3)种间杂交导致了这种生殖隔离。就这些条件而言, 异源多倍化现象相比同倍体杂交物种形成更容易得到证明。在动植物自然杂交的案例中大多只证明了(1)或(2)。按Schumer等(2014b)的分析, 同时满足上述3个严格的标准能够被证实的同倍体杂交物种形成案例只有向日葵属植物和*Heliconius*属蝴蝶的4个杂交种。

向日葵属的*Helianthus anomalus*、*H. deserticola*和*H. paradoxus*, 是由向日葵(*H. annuus*)和伞花葵(*H. petiolaris*)为亲本的古杂交种。这些杂交种分别占据沙丘、沙漠和富含盐分的沼泽等环境, 而两个广布的亲本种则很少出现在上述极端环境。Rieseberg等(2003)采用RAPD、AFLP、SSR等分子标记, 通过数量性状位点(quantitative trait locus, QTL)的方法, 对古杂交种和人工杂交种的表现型和基因型

进行比较分析, 研究发现多数古杂交种性状差异能够在新合成的人工杂交种中找到, 且易于受到选择; 人工杂交种的极端表现型所需的亲本染色体片段组合同样也可以在古杂交种中出现。这项研究清晰地说明杂交有助于向日葵属植物的生态分化。

蝴蝶*Heliconius heurippa*的物种形成是动物中得到很好证明的同倍体杂交起源案例(Mavárez et al, 2006; Melo et al, 2009; Salazar et al, 2010)。该物种被认为来源于*H. melpomene*和*H. cydno*的杂交, 杂交种与亲本在双翅花纹式样上存在显著差异。与花纹式样相关的基因组区域证实了杂交的发生。通过两个亲本之间的人工杂交所获得的后代, 表现出与*H. heurippa*相同的性状。试验观察显示, 尽管杂交种*H. heurippa*与亲本之间也存在微弱的基因流, 但它们的后代倾向于与有同类花纹式样的个体交配, 从而减少了与亲本之间的基因流。研究证实杂交后的强化作用(reinforcement)促进了杂交种与亲本的生殖隔离。

Feliner等(2017)认同对同倍体杂交物种形成应采取严格的生殖隔离检验, 但提出不应过多关注生殖隔离本身, 还应多聚焦是否通过杂交产生丰富的遗传创新、占据不同生境。这是因为大多数物种形成过程中并不是完全生殖隔离的(Lowry & Gould, 2016), 所以证明直接来自杂交而产生的生殖隔离是不必要的。鉴于对同倍体杂交物种形成过程理解的差异, 目前亟需对不同物种各种类型的杂交带群体开展广泛而深入的来自形态、分子等多学科证据的调查。不同类型的杂交带群体, 包括以回交为显著特征的杂交群, 它们都是连接杂交与物种形成的重要中间环节, 保留着进化过程中重要的过渡类型, 是探讨杂交物种形成机制材料体系不可或缺的组成部分。正是上述原因, 那些存在大量种间杂交、曾经困扰分类学家的类群, 反过来对进化生物学家而言, 很可能正是探寻物种形成机制与规律难得的机遇(Dejaco et al, 2016)。

## 6 自然杂交的进化后果和生态影响

许多物种之间由于生境差异、空间隔离等合子前隔离机制, 阻碍了彼此的杂交。即便可以实现种间杂交, 往往 $F_1$ 代不育或育性极低, 或面临亲本的回交产生不育后代等合子后隔离, 无法独立成为新种。但这种情况并不是绝对的, 如果 $F_1$ 代能实现单

亲繁殖(无性繁殖或自交)、改变生殖策略(如提前或延迟开花、吸引不同的传粉者)、占据不同的生境(生态隔离)或者随着扩散而造成地理隔离,就可以避免与亲本交配,摆脱“少数类型不利”,最终形成新种。大量研究表明,种间杂交可以提供适应进化的新材料,以适应快速改变的环境(Arnold, 1997; Rieseberg & Carney, 1998)。多倍化对于促进植物物种形成的作用已经不言而喻,而同倍体杂交在动植物的进化上的作用,也越来越被认可(Mallet, 2007)。向日葵属和*Heliconius*属蝴蝶的物种形成研究为这一观点提供了强有力的支持。这些案例不仅从形态和分子的方法证明了杂交种与亲本的关系,观测到它们之间生殖隔离程度,而且还通过不同的方法证明杂交导致了这种隔离的重要作用。从目前的研究看,并不是涉及到同倍体杂交的物种都具备检验是否符合Schumer等(2014b)严格生殖隔离标准的条件,但这应该是自然杂交与物种形成研究的重要方向。已有的研究调查表明,很多物种都确定为同倍体杂交起源,而且这种物种形成的比率很可能被低估(Kim & Lockhart, 2006)。例如,通常认为大部分动物新种的产生都是从现有物种中分化而来的。Schwarz等(2005)的研究则显示从亚洲引种到北美的金银花上寄生的果蝇,来自于本土两种果蝇杂交,由于宿主的改变促成了种间杂交后代与亲本种之间的生殖隔离,导致新的同倍体杂交种产生。尽管只发现一种通过自然杂交形成的新果蝇物种,但鉴于自然界中有着丰富多样的寄生动物,通过杂交产生新物种的方式在这类动物中很可能普遍存在。

杂交不仅仅有重要的适应性进化意义,如促进物种形成,也可能带来严重的生态学问题。禾本科多年生米草属(*Spartina*)植物,因杂交而导致的生态入侵就是典型的案例。在近一个多世纪的时间里,该属植物经长距离的人为引种,使其分布区超出其原产地范围,已经造成多次杂交事件的发生,导致了生态和进化上的后果,包括生物入侵、渐渗杂交或物种形成(Baumel et al, 2002)。这个惊人的例子显示:原来分布于北美东海岸的互花米草(*Spartina alterniflora*)被引种到欧洲和北美西海岸,并与当地的土著种发生了杂交。在英国南安普敦的互花米草,与海岸米草(*S. maritima*)发生杂交,形成不育的*S. × townsendii*,而在法国,同样的亲本种杂交则形成*S. × neyrautii*,它与*S. × townsendii*表现出相似的特性

和多倍体水平(Baumel et al, 2003)。*S. × townsendii*经过染色体加倍形成了一个新的可育的、有发达根系的异源多倍体物种——大米草(*S. anglica*)。由于它能够拦截大量潮汐沉积物,因此世界上一些国家和地区如北欧、澳大利亚、新西兰和中国都曾有目的地引种了大米草。但是,这个异源多倍体能够快速入侵并扩散到周围的盐沼和河口地区,对海岸带生境构成潜在威胁。

非本地种入侵成功,杂交是极为重要的遗传和进化因素之一。杂交促进生物入侵假说(Hybridization-Invasion hypothesis, Stebbins, 1985; Abbott, 1992),得到很多案例的支持(Ellstrand & Schierenbeck, 2000; Schierenbeck & Ellstrand, 2009; Hovick & Whitney, 2014)。计算机模拟揭示即便杂交不能增强其在本地的适应能力,也能促进物种入侵(Mesgaran et al, 2016)。近缘类群的渐渗杂交使得濒危物种的保护面临现实的挑战,如何定义杂交带来的风险并确定相应的保护策略,正受到越来越多的关注和重视(Jackiw et al, 2015; Bohling, 2016)。

## 7 研究展望

自然杂交与物种形成的研究经历了形态、分子标记、基因测序等常规方法鉴定,检验相关假说,到组学大数据的比较分析与证明,新一代测序数据为我们提供了杂交、多倍化与物种形成之间关系新的见解。诸如:在许多已经测序的物种中发现不同程度的全基因组复制(whole genome duplication, WGD)现象,说明物种进化历史上的古多倍化的存在(Jiao et al, 2011)。对六倍体(面包)小麦与近缘二倍体的基因组测序和全基因组尺度的基因树分析揭示了该作物驯化的历史上发生过多杂交物种形成(同倍体重组和多倍化)事件(Marcussen et al, 2014);对不同达尔文雀物种的基因组测序分析揭示种间基因流贯穿整个适应辐射过程,这一经典的进化过程也有自然杂交的参与(Lamichhaney et al, 2015);存在频繁渐渗杂交的不同种乌鸦之间,通过保持局部基因组的特异性来维持不同物种表型的差异性,在基因组水平揭示渐渗杂交与物种形态的分化的内在联系(Poelstra et al, 2014);疟原蚊渐渗杂交的历史可以通过系统发育基因组学的方法重建(Fontaine et al, 2015)。

这些研究提示我们关注不同类型的自然杂交

方式与物种形成的进化关联,思考未来相关研究应注意的问题,诸如:在基因组时代研究自然杂交,如何对表型性状进行合理应用?既然杂交和多倍化是物种形成的重要方式,为什么在一个属内很少能鉴定到大量种间杂交?杂交种的标准应如何界定更为合理?全基因组复制事件究竟和物种形成(或分化)有何关系?在分类学实践中,该如何给予种间杂交一个合理的定位?在什么情况下,我们应该对种间杂交予以优先保护?

随着研究的不断深入,关于杂交与物种形成的概念和核心问题还会被重新讨论,特别是生殖隔离对于杂交的重要性、自然选择对于生殖隔离的影响、如何定义杂交种等问题都将继续成为关注的焦点。Payseur和Rieseberg (2016)曾提示在通过多学科证据分析来阐释物种形成的一般规律时,应充分认识杂交的特殊性与复杂性,以及仅仅依靠基因组数据作为“灵丹妙药(panacea)”来化解杂交物种形成难题的局限性。今后,我们开展自然杂交和物种形成研究时,应特别关注以下几个方面:(1)合适的研究体系构建,获得研究突破的往往是有很好背景的材料,长期研究积累了丰富的实践经验和先进的方法设计理念,清楚研究对象长期未解决的科学问题及其在进化生物学上的普遍意义;(2)同倍体杂交物种形成的群体遗传调查,按极为严格的标准(Schumer et al, 2014b)的物种形成证明还有待深入,需要全面开展亲本鉴定、后代基因型分析、生殖隔离程度甚至超亲分离的重组类型分析,特别是比较处于物种形成初期和不同代种间杂交的基因组与表型变化(Nolte & Tautz, 2010),通过对分化谱系之间基因流的历史重建,分析自然选择对生殖隔离形成的影响、物种形成过程中的生态适应变化和多样性遗传创新的产生规律,进而揭示杂交物种形成过程关键环节的生物学基础;(3)中间过渡进化类型的保护,尽管是否保护种间杂交存在争议,但更多的情况是,由于自然发生的杂交频率较低,以及生境的人为剧烈扰动,很多中间过渡类型无法再次从野外获得,如果能以合适的方式保存这些难得的资源(不包括恶性入侵的类型),将有助于对物种形成的不同时期和整个过程的理解;(4)来自多学科研究成果的综合,自然杂交与物种形成的研究涉及到形态、遗传、生态、发育等不同过程的复杂变化,关系到物种分化、生殖隔离与适应不同生境等等,需探讨微观与

宏观的进化因果关系,因此亟需采用各学科的最新方法,开展自然杂交与物种形成的综合研究。

## 参考文献

- Abbott RJ (1992) Plant invasions, interspecific hybridization and the evolution of new plant taxa. *Trends in Ecology and Evolution*, 7, 401–405.
- Abbott RJ (2003) Sex, sunflowers, and speciation. *Science*, 301, 1189–1190.
- Anderson E (1949) *Introgressive Hybridization*. John Wiley & sons, New York.
- Anderson E, Hubricht L (1938) Hybridization in *Tradescantia*. III. The evidence for introgressive hybridization. *American Journal of Botany*, 25, 396–402.
- Anderson E, Stebbins GL Jr (1954) Hybridization as an evolutionary stimulus. *Evolution*, 8, 378–388.
- Andrew RL, Rieseberg LH (2013) Divergence is focused on few genomic regions early in speciation: incipient speciation of sunflower ecotypes. *Evolution*, 67, 2468–2482.
- Andrew RL, Kane NC, Baute GJ, Grassa CJ, Rieseberg LH (2013) Recent nonhybrid origin of sunflower ecotypes in a novel habitat. *Molecular Ecology*, 22, 799–813.
- Arnold ML (1992) Natural hybridization as an evolutionary process. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 85, 1893–1896.
- Arnold ML (1993) *Iris nelsonii*: origin and genetic composition of a homoploid hybrid species. *American Journal of Botany*, 80, 577–583.
- Arnold ML (1997) *Natural Hybridization and Evolution*. Oxford University Press, Oxford.
- Arnold ML, Bennett BD, Zimmer EA (1990a) Natural hybridization between *Iris fulva* and *I. hexagona*: patterns of ribosomal DNA variation. *Evolution*, 44, 1512–1521.
- Arnold ML, Hamrick JL, Bennett BD (1990b) Allozyme variation in Louisiana irises: a test for introgression and hybrid speciation. *Heredity*, 65, 297–306.
- Arnold ML, Buckner CM, Robinson JJ (1991) Pollen mediated introgression and hybrid speciation in Louisiana irises. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 188, 1398–1402.
- Barb JG, Bowers JE, Renaut S, Rey JI, Knapp SJ, Rieseberg LH, Burke JM (2014) Chromosomal evolution and patterns of introgression in *Helianthus*. *Genetics*, 197, 969–979.
- Baumel A, Ainouche ML, Bayer RJ, Misset MT (2002) Molecular phylogeny of hybridizing species from genus *Spartina* Schreb. (Poaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 22, 303–314.
- Baumel A, Ainouche ML, Misset MT, Gourret JP, Bayer RJ (2003) Genetic evidence for hybridization between the native *Spartina maritima* and the introduced *Spartina alterniflora* (Poaceae) in South-West France: *Spartina* × *neyrautii* re-examined. *Plant Systematics and Evolution*, 237, 87–97.

- Bohling JH (2016) Strategies to address the conservation threats posed by hybridization and genetic introgression. *Biological Conservation*, 203, 321–327.
- Buerkle CA, Morris RJ, Asmussen MA, Rieseberg LH (2000) The likelihood of homoploid hybrid speciation. *Heredity*, 84, 441–451.
- Burri R, Nater A, Kawakami T, Mugal CF, Olason PI, Smeds L, Suh A, Dutoit L, Bureš S, Garamszegi LZ, Hogner S, Moreno J, Qvarnström A, Ružić M, Sæther SA, Sætre GP, Török J, Ellegren H (2015) Linked selection and recombination rate variation drive the evolution of the genomic landscape of differentiation across the speciation continuum of *Ficedula* flycatchers. *Genome Research*, 25, 1656–1665.
- Carneiro M, Albert FW, Afonso S, Pereira RJ, Burbano H, Campos R, Melo-Ferreira J, Blanco-Aguilar JA, Villafuerte R, Nachman MW, Good JM, Ferrand N (2014) The genomic architecture of population divergence between subspecies of the European rabbit. *PLoS Genetics*, 10, e1003519.
- Chat J, Jauregui B, Petit RJ, Nadot S (2004) Reticulate evolution in kiwifruit (*Actinidia*, Actinidiaceae) identified by comparing their maternal and paternal phylogenies. *American Journal of Botany*, 91, 736–747.
- Clausen J, Keck DD, Hiesey WM (1945) Experimental studies on the nature of species. II. Plant evolution through amphiploidy and autopolyploidy, with examples from the Madiinae. Carnegie Institution of Washington Publication, 564, 1–163.
- Cui L, Wall PK, Leebens-Mack JH, Lindsay BG, Soltis DE, Doyle JJ, Soltis PS, Carlson JE, Arumuganathan K, Barakat A, Albert VA, Ma H, dePamphilis CW (2006) Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. *Genome Research*, 16, 738–749.
- Dejaco T, Gassner M, Arthofer W, Schlick-Steiner BC, Steiner FM (2016) Taxonomist's nightmare ... evolutionist's delight: an integrative approach resolves species limits in jumping Bristletails despite widespread hybridization and parthenogenesis. *Systematic Biology*, 65, 947–974.
- Duenez-Guzman EA, Mavarez J, Vose MD, Gavrilets S (2009) Case studies and mathematical models of ecological speciation. 4. Hybrid speciation in butterflies in a jungle. *Evolution*, 63, 2611–2626.
- Eaton DAR, Ree RH (2013) Inferring phylogeny and introgression using RADseq data: an example from flowering plants (*Pedicularis*: Orobanchaceae). *Systematic Biology*, 62, 689–706.
- Elder JR, Turner BJ (1995) Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *Quarterly Review of Biology*, 70, 297–319.
- Ellegren H, Smeds L, Burri R, Olason PI, Backström N, Kawakami T, Künstner A, Mäkinen H, Nadachowska-Brzyska K, Qvarnström A, Uebbing S, Wolf JB (2012) The genomic landscape of species divergence in *Ficedula* flycatchers. *Nature*, 491, 756–760.
- Ellstrand NC, Whitkus R, Rieseberg LH (1996) Distribution of spontaneous plant hybrid. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 93, 5090–5093.
- Ellstrand NC, Schierenbeck KA (2000) Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plant? *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 97, 7043–7050.
- Feliner GN, Álvarez I, Fuertes-Aguilar J, Heuertz M, Marques I, Moharrek F, Piñeiro R, Riina R, Rosselló JA, Soltis PS, Villa-Machio I (2017) Is homoploid hybrid speciation that rare? An empiricist's view. *Heredity*, 118, 513–516.
- Ferguson D, Sang T (2001) Speciation through homoploid hybridization between allotetraploids in peonies (*Paeonia*). *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 98, 3915–3919.
- Fontaine MC, Pease JB, Steele A, Waterhouse RM, Neafsey DE, Sharakhov IV, Jiang X, Hall AB, Catteruccia F, Kakani E, Mitchell SN, Wu YC, Smith HA, Love RR, Lawniczak MK, Slotman MA, Emrich SJ, Hahn MW, Besansky NJ (2015) Extensive introgression in a malaria vector species complex revealed by phylogenomics. *Science*, 347, 1258524.
- Garrigan D, Kingan SB, Geneva AJ, Andolfatto P, Clark AG, Thornton KR, Presgraves DC (2012) Genome sequencing reveals complex speciation in the *Drosophila simulans* clade. *Genome Research*, 22, 1499–1511.
- Geraldes A, Farzaneh N, Grassa CJ, McKown AD, Guy RD, Mansfield SD, Douglas CJ, Cronk QC (2014) Landscape genomics of *Populus trichocarpa*: the role of hybridization, limited gene flow, and natural selection in shaping patterns of population structure. *Evolution*, 68, 3260–3280.
- Gompert Z, Lucas LK, Nice CC, Fordyce JA, Forister ML, Buerkle CA (2012) Genomic regions with a history of divergent selection affect fitness of hybrids between two butterfly species. *Evolution*, 66, 2167–2181.
- Good JM, Vanderpool D, Keeble S, Bi K (2015) Negligible nuclear introgression despite complete mitochondrial capture between two species of chipmunks. *Evolution*, 69, 1961–1972.
- Grant V (1981) *Plant Speciation*. Columbia University Press, New York.
- Green RE, Krause J, Briggs AW, Maricic T, Stenzel U, Kircher M, Patterson N, Li H, Zhai W, Fritz MH, Hansen NF, Durand EY, Malaspina AS, Jensen JD, Marques-Bonet T, Alkan C, Prüfer K, Meyer M, Burbano HA, Good JM, Schultz R, Aximu-Petri A, Butthof A, Höber B, Höffner B, Siegemund M, Weihmann A, Nusbaum C, Lander ES, Russ C, Novod N, Affourtit J, Egholm M, Verna C, Rudan P, Brajkovic D, Kucan Z, Gusic I, Doronichev VB, Golovanova LV, Lalueza-Fox C, de la Rasilla M, Fortea J, Rosas A, Schmitz RW, Johnson PL, Eichler EE, Falush D, Birney E, Mullikin JC, Slatkin M, Nielsen R, Kelso J, Lachmann M, Reich D, Pääbo S (2010) A draft sequence of the Neandertal genome. *Science*, 328, 710–722.



- Heliconius* Genome Consortium (2012) Butterfly genome reveals promiscuous exchange of mimicry adaptations among species. *Nature*, 487, 94–98.
- Hermansen JS, Haas F, Trier CN, Bailey RI, Nederbragt AJ, Marzal A, Sætre GP (2014) Hybrid speciation through sorting of parental incompatibilities in Italian sparrows. *Molecular Ecology*, 23, 5831–5842.
- Hovick SM, Whitney KD (2014) Hybridisation is associated with increased fecundity and size in invasive taxa: meta-analytic support for the hybridisation-invasion hypothesis. *Ecology Letters*, 17, 1464–1477.
- Isoda K, Shirasi S, Watanabe S, Kitamura K (2000) Molecular evidence of natural hybridization between *Abies veitchii* and *A. homolepis* (Pinaceae) revealed by chloroplast, mitochondrial and nuclear DNA markers. *Molecular Ecology*, 9, 1965–1974.
- Jackiw RN, Mandil G, Hager HA (2015) A framework to guide the conservation of species hybrids based on ethical and ecological considerations. *Conservation Biology*, 29, 1040–1051.
- Janoušek V, Wang L, Luzynski K, Dufková P, Vyskočilová MM, Nachman MW, Munclinger P, Macholán M, Piálek J, Tucker PK (2012) Genome-wide architecture of reproductive isolation in a naturally occurring hybrid zone between *Mus musculus musculus* and *M. m. domesticus*. *Molecular Ecology*, 21, 3032–3047.
- Janoušek V, Munclinger P, Wang L, Teeter KC, Tucker PK (2015) Functional organization of the genome may shape the species boundary in the house mouse. *Molecular Biology and Evolution*, 32, 1208–1220.
- Jiao Y, Wickett NJ, Ayyampalayam S, Chanderbali AS, Landherr L, Ralph PE, Tomsho LP, Hu Y, Liang H, Soltis PS, Soltis DE, Clifton SW, Schlarbaum SE, Schuster SC, Ma H, Leebens-Mack J, dePamphilis CW (2011) Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. *Nature*, 473, 97–100.
- Jónsson H, Schubert M, Seguin-Orlando A, Ginolhac A, Petersen L, Fumagalli M, Albrechtsen A, Petersen B, Korneliusen TS, Vilstrup JT, Lear T, Myka JL, Lundquist J, Miller DC, Alfarhan AH, Alquraishi SA, Al-Rasheid KA, Stagegaard J, Strauss G, Bertelsen MF, Sicheritz-Ponten T, Antczak DF, Bailey E, Nielsen R, Willerslev E, Orlando L (2014) Speciation with gene flow in equids despite extensive chromosomal plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 111, 18655–18660.
- Keller I, Wagner CE, Greuter L, Mwaiko S, Selz OM, Sivasundar A, Wittwer S, Seehausen O (2013) Population genomic signatures of divergent adaptation, gene flow and hybrid speciation in the rapid radiation of Lake Victoria cichlid fishes. *Molecular Ecology*, 22, 2848–2863.
- Kim MB, Lockhart PJ (2006) Reconstructing reticulate evolutionary histories of plants. *Trends in Plant Science*, 11, 398–404.
- Kim ST, Sultan SE, Donoghue MJ (2008) Allopolyploid speciation in *Persicaria* (Polygonaceae): insights from a low-copy nuclear region. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 105, 12370–12375.
- Lamichhaney S, Berglund J, Almén MS, Maqbool K, Grabherr M, Martinez-Barrio A, Promerová M, Rubin CJ, Wang C, Zamani N, Grant BR, Grant PR, Webster MT, Andersson L (2015) Evolution of Darwin's finches and their beaks revealed by genome sequencing. *Nature*, 518, 371–375.
- Lee JF, Mummenhoff K, Bowman JL (2002) Allopolyploidization and evolution of species with reduced floral structures in *Lepidium* L. (Brassicaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 99, 16835–16840.
- Lewontin RC, Birch LC (1966) Hybridization as a source of variation for adaptation to new environments. *Evolution*, 20, 315–336.
- Liu KJ, Steinberg E, Yozzo A, Song Y, Kohn MH, Nakhleh L (2015) Interspecific introgressive origin of genomic diversity in the house mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 112, 196–201.
- Lohse K, Clarke M, Ritchie MG, Etges WJ (2015) Genome-wide tests for introgression between cactophilic *Drosophila* implicate a role of inversions during speciation. *Evolution*, 69, 1178–1190.
- Lohse K, Frantz LA (2014) Neandertal admixture in Eurasia confirmed by maximum-likelihood analysis of three genomes. *Genetics*, 196, 1241–1251.
- Lotsy JP (1916) *Evolution by Means of Hybridization*. Martinus Nijhoff, The Hague.
- Lowry DB, Gould BA (2016) Speciation continuum. In: *Encyclopedia of Evolutionary Biology* (ed. Kliman R), pp. 159–165. Academic Press, Oxford, UK.
- Mallet J (2005) Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution*, 20, 229–237.
- Mallet J (2007) Hybrid speciation. *Nature*, 446, 279–283.
- Marcussen T, Sandve SR, Heier L, Spannagl M, Pfeifer M, International Wheat Genome Sequencing Consortium, Jakobsen KS, Wulff BB, Steuernagel B, Mayer KF, Olsen OA (2014) Ancient hybridizations among the ancestral genomes of bread wheat. *Science*, 345, 1250092.
- Martin SH, Dasmahapatra KK, Nadeau NJ, Salazar C, Walters JR, Simpson F, Blaxter M, Manica A, Mallet J, Jiggins CD (2013) Genome-wide evidence for speciation with gene flow in *Heliconius* butterflies. *Genome Research*, 23, 1817–1828.
- Martin CH, Cutler JS, Friel JP, Denning Touokong C, Coop G, Wainwright PC (2015) Complex histories of repeated gene flow in Cameroon crater lake cichlids cast doubt on one of the clearest examples of sympatric speciation. *Evolution*, 69, 1406–1422.
- Masterson J (1994) Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science*, 264, 421–424.
- Mavárez J, Salazar CA, Bermingham E, Salcedo C, Jiggins CD, Linares M (2006) Speciation by hybridization in *Heliconius*

- butterflies. *Nature*, 441, 868–871.
- Mayr E (1992) A local flora and the biological species concept. *American Journal of Botany*, 79, 222–238.
- McCarthy EM, Asmussen MA, Anderson WW (1995) A theoretical assessment of recombinational speciation. *Heredity*, 74, 502–509.
- Meier JI, Marques DA, Mwaiko S, Wagner CE, Excoffier L, Seehausen O (2017) Ancient hybridization fuels rapid cichlid fish adaptive radiations. *Nature Communications*, 8, 14363.
- Melo MC, Salazar C, Jiggins CD, Linares M (2009) Assortative mating preferences among hybrids offers a route to hybrid speciation. *Evolution*, 63, 1660–1665.
- Mesgaran MB, Lewis MA, Ades PK, Donohue K, Ohadi S, Li C, Cousseins RD (2016) Hybridization can facilitate species invasions, even without enhancing local adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 113, 10210–10214.
- Mogensen HL (1996) The hows and whys of cytoplasmic inheritance. *American Journal of Botany*, 83, 383–404.
- Morin PA, Archer FI, Foote AD, Vilstrup J, Allen EE, Wade P, Durban J, Parsons K, Pitman R, Li L, Bouffard P, Abel Nielsen SC, Rasmussen M, Willerslev E, Gilbert MT, Harkins T (2010) Complete mitochondrial genome phylogeographic analysis of killer whales (*Orcinus orca*) indicates multiple species. *Genome Research*, 20, 908–916.
- Nadachowska-Brzyska K, Burri R, Olason PI, Kawakami T, Smeds L, Ellegren H (2013) Demographic divergence history of pied flycatcher and collared flycatcher inferred from whole-genome re-sequencing data. *PLoS Genetics*, 9, e1003942.
- Nadeau NJ, Martin SH, Kozak KM, Salazar C, Dasmahapatra KK, Davey JW, Baxter SW, Blaxter ML, Mallet J, Jiggins CD (2013) Genome-wide patterns of divergence and gene flow across a butterfly radiation. *Molecular Ecology*, 22, 814–826.
- Nolte AW, Tautz D (2010) Understanding the onset of hybrid speciation. *Trends in Genetics*, 26, 54–58.
- O'Loughlin SM, Magesa S, Mbogo C, Mosha F, Midega J, Lomas S, Burt A (2014) Genomic analyses of three malaria vectors reveals extensive shared polymorphism but contrasting population histories. *Molecular Biology and Evolution*, 31, 889–902.
- Otto SP, Whitton J (2000) Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genomics*, 34, 401–437.
- Parchman TL, Gompert Z, Braun MJ, Brumfield RT, McDonald DB, Uy JA, Zhang G, Jarvis ED, Schlinger BA, Buerkle CA (2013) The genomic consequences of adaptive divergence and reproductive isolation between species of manakins. *Molecular Ecology*, 22, 3304–3317.
- Payseur BA, Rieseberg LH (2016) A genomic perspective on hybridization and speciation. *Molecular Ecology*, 25, 2337–2360.
- Phifer-Rixey M, Bomhoff M, Nachman MW (2014) Genome-wide patterns of differentiation among house mouse subspecies. *Genetics*, 198, 283–297.
- Poelstra JW, Vijay N, Bossu CM, Lantz H, Ryll B, Müller I, Baglione V, Unneberg P, Wikelski M, Grabherr MG, Wolf JBW (2014) The genomic landscape underlying phenotypic integrity in the face of gene flow in crows. *Science*, 344, 1410–1414.
- Prüfer K, Racimo F, Patterson N, Jay F, Sankararaman S, Sawyer S, Heinze A, Renaud G, Sudmant PH, de Filippo C, Li H, Mallick S, Dannemann M, Fu Q, Kircher M, Kuhlwilm M, Lachmann M, Meyer M, Ongyerth M, Siebauer M, Theunert C, Tandon A, Moorjani P, Pickrell J, Mullikin JC, Vohr SH, Green RE, Hellmann I, Johnson PL, Blanche H, Cann H, Kitzman JO, Shendure J, Eichler EE, Lein ES, Bakken TE, Golovanova LV, Doronichev VB, Shunkov MV, Derevianko AP, Viola B, Slatkin M, Reich D, Kelso J, Pääbo S (2014) The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai Mountains. *Nature*, 505, 43–49.
- Ramsey J, Schemske DW (2002) Neopolyploidy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33, 589–639.
- Renaut S, Grassa CJ, Yeaman S, Moyers BT, Lai Z, Kane NC, Bowers JE, Burke JM, Rieseberg LH (2013) Genomic islands of divergence are not affected by geography of speciation in sunflowers. *Nature Communications*, 4, 1827.
- Rheindt FE, Fujita MK, Wilton PR, Edwards SV (2014) Introgression and phenotypic assimilation in *Zimmerius* flycatchers (Tyrannidae): population genetic and phylogenetic inferences from genome-wide SNPs. *Systematic Biology*, 63, 134–152.
- Rieseberg LH (1991) Homoploid reticulate evolution in *Helianthus* (Asteraceae): evidence from ribosomal genes. *American Journal of Botany*, 78, 1218–1237.
- Rieseberg LH, Carney SE (1998) Tansley review No. 102: Plant hybridization. *New Phytologist*, 140, 599–624.
- Rieseberg LH, Carter R, Zona S (1990) Molecular tests of the hypothesized hybrid origin of two diploid *Helianthus* species (Asteraceae). *Evolution*, 44, 1498–1511.
- Rieseberg LH, Raymond O, Rosenthal DM, Lai Z, Livingstone K, Nakazato T, Durphy JL, Schwarzbach AE, Donovan LA, Lexer C (2003) Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. *Science*, 301, 1211–1216.
- Rieseberg LH, Wendel JF (1993) Introgression and its consequences in plants. In: *Hybrid Zones and the Evolutionary Process* (ed. Harrison RG), pp. 70–109. Oxford University Press, Oxford.
- Russell A, Samuel R, Klejna V, Barfuss MH, Rupp B, Chase MW (2010) Reticulate evolution in diploid and tetraploid species of *Polystachya* (Orchidaceae) as shown by plastid DNA sequences and low-copy nuclear genes. *Annals of Botany*, 106, 37–56.
- Salazar C, Baxter SW, Pardo-Diaz C, Wu G, Surridge A,

- Linares M, Bermingham E, Jiggins CD (2010) Genetic evidence for hybrid trait speciation in *Heliconius* butterflies. *PLoS Genetics*, 6, 1–12.
- Sang T, Crawford DJ, Stuessy TF (1995) Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: implications from biogeography and concerted evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 92, 6813–6817.
- Sang T, Donoghue MJ, Zhang D (1997) Evolution of alcohol dehydrogenase genes in peonies (*Paeonia*): phylogenetic relationships of putative nonhybrid species. *Molecular Biology and Evolution*, 14, 994–1007.
- Sankararaman S, Patterson N, Li H, Pääbo S, Reich D (2012) The date of interbreeding between Neandertals and modern humans. *PLoS Genetics*, 8, e1002947.
- Sankararaman S, Mallick S, Dannemann M, Prüfer K, Kelso J, Pääbo S, Patterson N, Reich D (2014) The genomic landscape of Neanderthal ancestry in present-day humans. *Nature*, 507, 354–357.
- Schemske DW (2000) Understanding the origin of species. *Evolution*, 54, 1069–1073.
- Schierenbeck KA, Ellstrand NC (2009) Hybridization and the evolution of invasiveness in plants and other organisms. *Biological Invasions*, 11, 1093–1105.
- Schumer M, Cui R, Powell DL, Dresner R, Rosenthal GG, Andolfatto P (2014a) High-resolution mapping reveals hundreds of genetic incompatibilities in hybridizing fish species. *eLife*, 3, e02535.
- Schumer M, Cui R, Rosenthal GG, Andolfatto P (2015) Reproductive isolation of hybrid populations driven by genetic incompatibilities. *PLoS Genetics*, 11, e1005041.
- Schumer M, Rosenthal GG, Andolfatto P (2014b) How common is homoploid hybrid speciation? *Evolution*, 68, 1553–1560.
- Schwarz D, Matta BM, Shakir-Botteri NL, McPherson BA (2005) Host shifts to an invasive plant triggers rapid animal hybrid speciation. *Nature*, 436, 546–549.
- Smedmark JE, Eriksson T, Evans RC, Campbell CS (2003) Ancient allopolyploid speciation in Geinae (Rosaceae): evidence from nuclear granule-bound starch synthase (GBSSI) gene sequences. *Systematic Biology*, 52, 374–385.
- Soltis DE, Soltis PS (1993) Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 12, 243–273.
- Stace CA (1975) Introductory. In: *Hybridization and Flora of the British Isles* (ed. Stace CA), pp. 1–90. Academic Press, London.
- Stebbins GL Jr (1947) Types of polyploids: their classification and significance. *Advances in Genetics*, 1, 403–429.
- Stebbins GL Jr (1985) Polyploidy, hybridization, and the invasion of new habitats. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 72, 824–832.
- Stölting KN, Nipper R, Lindtke D, Caseys C, Waeber S, Castiglione S, Lexer C (2013) Genomic scan for single nucleotide polymorphisms reveals patterns of divergence and gene flow between ecologically divergent species. *Molecular Ecology*, 22, 842–855.
- Streicher JW, Devitt TJ, Goldberg CS, Malone JH, Blackmon H, Fujita MK (2014) Diversification and asymmetrical gene flow across time and space: lineage sorting and hybridization in polytypic barking frogs. *Molecular Ecology*, 23, 3273–3291.
- Vriesendorp B, Bakker FT (2005) Reconstructing patterns of reticulate evolution in angiosperms: what can we do? *Taxon*, 54, 593–604.
- Wagner WH Jr (1970) Biosystematics and evolutionary noise. *Taxon*, 19, 146–151.
- Wall JD, Yang MA, Jay F, Kim SK, Durand EY, Stevison LS, Gignoux C, Woerner A, Hammer MF, Slatkin M (2013) Higher levels of Neanderthal ancestry in East Asians than in Europeans. *Genetics*, 194, 199–209.
- Wang L, Luzynski K, Pool JE, Janoušek V, Dufková P, Vyskočilová MM, Teeter KC, Nachman MW, Munclinger P, Macholán M, Piálek J, Tucker PK (2011) Measures of linkage disequilibrium among neighbouring SNPs indicate asymmetries across the house mouse hybrid zone. *Molecular Ecology*, 20, 2985–3000.
- Wang XR, Szmidt AE, Savolainen O (2001) Genetic composition and diploid hybrid speciation of a high mountain pine, *Pinus densata*, native to the Tibetan Plateau. *Genetics*, 159, 337–346.
- Wendel JF, Doyle JJ (1998) Phylogenetic incongruence: window into genome history and molecular evolution. In: *Molecular Systematics of Plants. II. DNA Sequencing* (eds Soltis DE, Soltis PS, Doyle JJ), pp. 265–296. Kluwer Academic Publishers, Boston/Dordrecht/London.
- Wendel JF, Schnabel A, Seelanan T (1995) An unusual ribosomal DNA sequence from *Gossypium gossypioides* reveals ancient, cryptic, intergenomic introgression. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 4, 298–313.
- Wood TE, Takebayashi N, Barker MS, Mayrose I, Greenspoon PB, Rieseberg LH (2009) The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 106, 13875–13879.

(责任编辑: 葛学军 责任编辑: 闫文杰)

•综述•

# 结合系统发育与群体遗传学分析 检验杂交是否存在的技术策略

毛建丰<sup>1\*</sup> 马永鹏<sup>2</sup> 周仁超<sup>3</sup>

1 (北京林业大学生物科学与技术学院林木育种国家工程实验室和林木花卉育种教育部重点实验室, 北京 100083)

2 (中国科学院昆明植物研究所东亚植物多样性与生物地理学重点实验室, 昆明 650201)

3 (中山大学生命科学学院, 广州 510275)

**摘要:** 杂交通常指不同类群间(种间或种内)经有性途径的遗传交流。越来越多的研究表明, 作为一种遗传交换过程, 杂交是生物多样性形成、维持和丧失的重要机制, 它广泛参与了动物、植物、微生物等的类群分化。然而, 我们对杂交过程中遗传交换的普遍性、存在模式、产生机制的认识还非常有限。当前, 高通量测序技术的飞速发展和基因组学研究技术的普遍应用, 为深入评价遗传交换的普遍性和进化意义提供了前所未有的契机。如何选用恰当的研究技术与策略检验潜在的杂交并评价它的特征, 成为大家普遍面临的问题。本文试图综合来自系统发育和群体遗传等相互关联学科中不同的技术策略, 以当前流行的高通量测序技术为核心, 结合表型和细胞遗传学等多种数据获取和分析手段, 概括不同分析策略的特点, 联系必要的实例研究, 为生物多样性与进化领域的学者提供检测遗传交换的参考。

**关键词:** 遗传交换; 基因流; 生物多样性; 系统发育; 群体遗传

## Approaches used to detect and test hybridization: combining phylogenetic and population genetic analyses

Jian-Feng Mao<sup>1\*</sup>, Yongpeng Ma<sup>2</sup>, Renchao Zhou<sup>3</sup>

1 National Engineering Laboratory for Tree Breeding, Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants of Ministry of Education, College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083

2 Key Laboratory for Plant Diversity and Biogeography of East Asia, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201

3 School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275

**Abstract:** Hybridization among diverging (interspecific or intraspecific) groups involves gene flow and genetic recombination. Increasingly, studies have shown that hybridization, a process of genetic exchanges, occurs widely in the divergence and unity of animals, plants, and microorganisms, and acts as an important mechanism for the formation and maintenance of biological diversity. The rapid development of high-throughput sequencing technology and the widespread application of genome-level techniques provides an unprecedented opportunity for us to further evaluate the universality and evolutionary significance of hybridization. However, selecting appropriate research techniques and strategies to detect the potential hybridization and evaluate its characteristics becomes a common question. In this review, we attempt to synthesize methods from phylogenetics and population genetics of the genomic era to provide biodiversity and evolutionary researchers a practical reference for testing hybridization.

**Key words:** genetic exchange; gene flow; biodiversity; phylogenetics; population genetics



杂交(hybridization)通常指真核生物不同类群间(种间或种内)经有性途径的遗传交换(genetic exchange)。杂交使不同亲本的遗传物质共存于杂交子代,而杂交子代减数分裂过程中的同源染色体遗传交换实现了遗传物质在不同类群间的交换和重新组合。除了有性过程的杂交,重组(recombination)经常被用来描述原核生物中不经有性过程实现的遗传物质重新组合。这种重组大量存在于病毒中。水平基因转移(lateral/horizontal gene transfer)指那些不同于杂交和重组中实现的基因由亲代垂直传递给子代的遗传交换过程。此外,基因交流(gene flow)、渐渗(introgression)、伴随基因流的分化(divergence/isolation with gene flow/migration)和网状进化(reticulate evolution)等概念也常被用于概括不同时空、进化过程或系统发育特征的遗传交换。这些概念的形成、应用范围和侧重有差异,但本质上都是遗传交换(Arnold, 2016)。不同于生命之树(tree of life)理论,生命之网(web of life)理论认为生物的演化过程是一个由遗传交换构成的网状模式,它在更普遍的意义上概括了遗传交换对生物多样性产生和维持的重要作用(Arnold, 2016; Mallet et al, 2016)。本文在认同不同遗传交换过程在进化生物学共性意义的基础上,将技术策略综述的视角限定在对杂交(或者说狭义的杂交)的检测上,以此避免大而不全带来的误导。

越来越多的证据表明,杂交普遍存在于生物类群分化和维持中,具有重要的进化生物学意义。在农林业上,杂交是一种重要的育种手段。通过人工杂交,可以快速获得杂种优势、实现有益变异在不同育种材料间的重新组合,甚至产生全新的表型。在自然类群中,杂交也有类似的作用:可以带来新的遗传变异,且速度比突变要快得多(Anderson & Hubricht, 1938; Martinsen et al, 2001)。因此,杂交增加了选择中性位点的等位基因数量;引入具有选择优势的等位基因,增加获得这些变异的类群的适合度,促成快速的适应性转变(Choler et al, 2004; Martin et al, 2006; Castric et al, 2008; Kim et al, 2008)。

杂交对遗传多样性分布格局、类群分化、物种形成也有重要影响。首先,杂交可以直接导致基因流从一个类群流入另一个类群;它可能致使一个类群替代另一个类群,或新生的杂种类群替代亲本类

群,造成等位基因或者类群的灭亡(Ellstrand & Elam, 1993);也可导致分化类群的融合(Grant & Grant, 2014)。其次,杂交还可导致新物种的形成,杂交和后续的多倍化过程构成的异源多倍化是一种快速的物种形成途径,特别是在植物中(Hegarty & Hiscock, 2008; Soltis & Soltis, 2009)。不经由多倍化的同倍性杂交物种形成(homoploid hybrid speciation)也可以发生,在此物种形成模式中,杂种谱系通常和亲本类群在生态或者地域上彼此分隔开来(Gross & Rieseberg, 2005; Abbott et al, 2010)。杂交对物种形成的另一个作用是,它通过传递有利于适应性分化的等位基因,进而强化种间隔离的形成,并促进物种形成(Abbott et al, 2013)。

生物类群中杂交的普遍存在获得了越来越多的认可。然而,相对于复杂的生物多样性,清晰描述的杂交事件仍显得非常少。实际上,作为一个重要的进化过程和生物多样性维持机制,杂交受到的关注还远远不够。据估算,有25%的高等植物物种(Mallet, 2005)和10%的动物物种(Schwenk et al, 2008)间存在着种间杂交;此外,在真菌(Nelson, 1963; Depotter et al, 2016)、细菌(Duncan et al, 1989; Cohan & Kane, 2001; Cohan, 2002; Earl et al, 2008)、病毒(Worobey & Holmes, 1999; Bujarski, 2013; Lefeuvre & Moriones, 2015; Pérez-Losada et al, 2015; Su et al, 2016)的基因组进化中,杂交普遍存在。以植物为例, *Flora of China* 共记载我国3万余种植物(Wu et al, 2014),按25%计算,我们推测其中9,000种植物间存在杂交。同时,日益加剧的全球气候变化和人类活动将对生物多样性的分布特征产生显著影响,进而改变种间关系,导致原已形成的种间生殖隔离改变或降低,进一步增加杂交的机会(Stenz et al, 2015; Novikova et al, 2016; Vallejo-Marin & Hiscock, 2016)。相较于上面的估算,得到确认的植物杂交案例非常稀少,我们认为可能不足1%。因此,要全面澄清杂交产生的机制、杂交对多样性形成和维持的影响及其进化生物学意义还为时尚早。目前已经开展或正在进行的工作所覆盖的杂交事件,估计不超过总量的1%。检测杂交及评估其发生的范围和机制,将成为未来生物多样性监测、管理和保护中不可缺少的组成部分。在后志书时代的今天,检测杂交等遗传交换事件的存在,进而揭示它对生物多样性形成和维持的重要价值,

是我们面临的重要挑战。

当前,高通量测序和基因组技术的飞速发展提供了快捷、简便、廉价、高覆盖度的分子标记,为在更大尺度上鉴定杂交,甚至澄清杂交产生的机制和基因组效应提供了前所未有的契机。传统上,杂交的检出往往借助表型特征(包括形态、生理、次生代谢物等)变异模式、细胞遗传学手段、系统发育分析、群体遗传分析等手段。常规的分析手段中,表型分析未针对遗传物质本身的特征进行评估,所以只能用于杂交的初步认定而不能作为确认的工具;细胞遗传学分析受材料限制较大,对实验技术要求高,应用范围并不广。利用分子标记技术的分析中,基于多位点的系统发育分析和群体遗传分析在基因组时代有了全新的发展,系统发育基因组学和群体基因组学逐步替代了原有的基于少数位点的分析,得到了越来越广的应用,它们将是我们检测和评估杂交的重要手段。本文针对如何检测杂交的存在这一普遍面临的问题,综述了已经出现的、来自于不同研究领域的分析技术和策略,在此基础上,我们把重点放在了结合基因组学方法的技术策略上。旨在为动物、植物、微生物等各个不同类群生物多样性相关领域的研究人员提供参考,提高研究者对杂交在生物进化中意义的认识,提高有关研究中识别遗传重组的能力,为更深入地认识生物多样性的形成和维持机制,建立高效的生物多样性监测、保护和管理策略奠定方法学基础。

## 1 表型变异模式可以给出杂交存在的依据

在分子标记技术出现前,对杂交的描述大都依赖表型分析。表型指个体在包括形态、行为、物候、生殖、生理、生活史、次生代谢等各方面的表现。 $F_1$ 代杂种往往体现出两个亲本都不具备的杂种优势;不论低世代还是高世代杂种,除了受到亲本遗传物质比例的影响之外,它们往往在一些性状上表现出居中的表型,同时都普遍在个别性状上体现出超亲分离(transgressive segregation)。在调查的171个研究实例中,155个(91%)有超亲分离存在;在分析的1,229个性状中,有44%显示了超亲分离,其中58%的植物性状和35%的动物性状显示了超亲分离(Rieseberg et al, 1999)。杂种显示超亲分离与杂交本身有直接关系(Rieseberg et al, 2003)。

大量的调查分析表明,和生殖隔离密切相关的

性状更多地表现出超亲分离,比如植物的环境适应性和开花物候性状、动物的生活史和行为性状(Rieseberg et al, 1999)。总之,杂种和亲本种间在表型的变异模式上有联系,但这种联系还没有确定的模式可依。由此可见,表型在揭示杂交是否存在或者确定亲本来源上有很多限制,它无法提供确切的依据。但表型指标甚至仅仅是形态指标往往也能提供非常有价值的信息,比如将它们与基因组水平的标记结合起来可以为物种的界定提供重要信息(Pyron et al, 2016)。笔者亲历了一个体现形态数据重要性的实例。在几十年前对松属(*Pinus*)的修订中,我国的分类学家就依据形态特征猜测高山松(*Pinus densata*)要么来自云南松(*P. yunnanensis*)和油松(*P. tabulaeformis*)的杂交,要么作为祖先种分化为另外两种松树(吴中伦, 1956)。之后,研究人员开展了形态、生殖、物候、解剖、幼苗萌发、人工杂交、多重分子标记的群体遗传等多方面的研究,已有的证据支持了前一个推测(Wang XR et al, 1990, 2001; Wang & Szmidt, 1994; Song et al, 2002, 2003; Ma et al, 2006; Mao et al, 2009; Wang BS et al, 2011; Gao et al, 2012; 张立沙等, 2012; 梁冬等, 2013; Xing et al, 2014; Zhao et al, 2014)。

目前,随着计算技术的蓬勃发展,用于分析表型数据的统计方法已经非常成熟。描述统计(descriptive statistics)可以针对单一变量或多个变量。单一变量的描述统计中,比较不同类群在特定性状上的平均值、中位数、变异幅度、方差、标准差等,是统计分析的基本步骤;多变量描述统计中,可以考察不同类群在多个变量上的变异模式(作散点图)或者考察性状间的相关性在不同类群上的差异(性状间的相关模式受样本遗传背景的影响,遗传背景不同,性状间相关模式也会改变)。多重比较、回归分析、方差分析的目的都在于对类群间在单一或者多个性状上的差异显著性进行检验,澄清它们的大小关系和相似程度。聚类分析和主成分分析则更侧重类群在多性状变异上的变异模式,在这两类分析中也可以引入分化显著性的检验,并且可以通过做图直观地观察类群间的相似模式和类群内的变异。比如通过对杜鹃花属(*Rhododendron*)内马缨杜鹃(*R. delavayi*)、露珠杜鹃(*R. irroratum*)两个种及其杂交后代大样本的形态测量(物种个体内部和不同个体的形态性状重复)和严格的统计分析(包括形态性状的

outlier检验与去除,多因素分析和杂交指数的计算)发现:不论亲本种还是杂交后代都可以准确鉴定;同时发现中国植物志书对亲本种很多叶、花的特征描述实际上无法区分亲本,因为这些特征的种内变异幅度已经远远超过种间变异;更有意思的是研究发现对区分马缨杜鹃和露珠杜鹃贡献最大的特征是柱头直径和面积(Marczewski et al, 2016),原因可能是柱头面积对于传粉者具有重要的选择作用。这一发现对于接下来研究这两个亲本种间的生殖隔离及其遗传基础有重要启示。

在表型数据的统计分析中,统计作图必不可少,应用恰当的统计作图能直观反映类群内和类群间的变异模式。我们熟知的有:体现单一变量数据分布的频率图、概率密度图、箱图,体现双变量的二维散点图,三变量的立体散点图(虽不受统计学家的推崇,但仍有广泛应用)等。此外,聚类分析的聚类图(可以是树状或网状)、主成分分析图、biplot(一种与主成分分析密切相关的作图方法)也是很有价值的统计作图技术,值得参考。Adams (1982)对如何利用多元统计技术分析表型数据进而检验杂交进行了较为系统全面的综述,可作为参考。

## 2 细胞遗传学水平的分析

核型分析和染色体减数分裂行为的观察,配合染色体荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)技术,也可为检测杂种或者多倍体提供重要线索。利用这些技术揭示出的染色体数目、染色体构象、同源染色体配对和分离行为、减数分裂异常现象的频率等,可以用于判断是否为异源多倍体、是否是杂种以及杂种的育性等。但由于取材和技术操作的限制,现在这方面的应用在逐步减少。国内的一个研究实例是红花油茶(*Camellia reticulata*):它同时含有二倍体( $2n = 2x = 30$ )、四倍体( $2n = 4x = 60$ )和六倍体( $2n = 6x = 90$ ) 3种类型,通过FISH技术对不同倍性的红花油茶及近缘种的分析,确定了异源四倍体的红花油茶是二倍体的红花油茶与二倍体的西南红山茶(*C. pitardii*)杂交形成;而异源六倍体的红花油茶是异源四倍体的红花油茶和二倍体的怒江山茶(*C. saluenensis*)杂交形成(Liu & Gu, 2011)。染色体荧光原位杂交技术在植物和进化研究中的应用可参考Chester等(2010)的综述。

## 3 系统发育与群体遗传学分析

与表型分析和细胞遗传学的间接分析不同,在系统发育和群体遗传学研究中,借助恰当的分子标记技术和分析策略可对杂交的存在做直接检验,并有可能澄清杂交发生的历史、存在的模式、物种形成及多样性维持的机制等。当前,DNA测序技术飞速发展,测序速度、数据通量、测序文库构建的灵活性、测序片段长度均有大幅提高,同时测序成本、建库操作复杂性等在迅速降低。各种动植物、微生物基因组从头测序或是群体水平重测序技术应用越来越广泛。这些都为系统发育重建和在谱系地理学及群体遗传学水平检测杂交的存在做了极好的铺垫,极大地拓展了我们认识杂交的能力。无论研究的目标物种是否有参考基因组,都不需要太大投入(目前几百元人民币)就可以拿到一个包含上万甚至更多单碱基突变(single nucleotide polymorphism, SNP)位点的DNA数据样本。传统的分子标记正在被各种基因组水平的测序策略所取代。这里,我们首先对现在流行的几个基于新一代测序技术(next generation sequencing, NGS)的分子标记技术原理和应用进行简要的综述。同时,对重要的数据分析技术和策略进行总结,指出它们的原理和适用特点。再次,分别从系统发育和群体遗传两个不同领域对杂交检验的分析方法进行综述。目的在于将各类理论和技术的特点呈现出来,为同行提供选择的依据。在分子标记方面,我们列出了部分重要的技术;在数据分析方面,除了本文提供的相关信息,最近Payseur和Rieseberg (2016)针对检测各不同类群中杂交的存在和澄清杂交模式的问题列举了多种分析策略和大量最新的应用实例,可供参考。

### 3.1 基因组时代的分子标记技术

#### 3.1.1 PCR扩增产物测序

该技术也被称为扩增子测序(amplicon sequencing),是直接将PCR扩增得到的产物用NGS技术测序。它是Sanger测序的延续,但其通量高,可以同时多个位点、多个样本进行测序。在测序模板的准备中,可以对每个样本都单独进行多个PCR扩增,得到每个样本多个不同特异位点的PCR产物,然后把产物混合进行测序(即平行扩增测序, parallel tagged sequencing) (Meyer et al, 2008);还可以利用多PCR引物同时扩增目标基因组的多个特定位点,

然后进行样本混合测序(即混合扩增测序, multiplex PCR method) (Mamanova et al, 2010)。在测序文库构建中, 可以对单一样本添加标签序列, 从而在样本混合测序后加以区分, 获得单一样本的序列。当然, 也可以不区分样本进行混池测序。平行扩增测序过程中, 对大量样本众多位点进行单独的PCR扩增是很费时的; 而混合扩增测序时, 虽然可以在单一PCR中对多个特异位点进行扩增, 但往往不同位点扩增效率不一致, 这又会带来新的问题。针对这个

问题, 发展了微液滴PCR (microdroplet PCR), 它可以实现在极小液滴中独立开展数量庞大的PCR反应 (Livak, 2003; Sims et al, 2009)。这些依赖PCR扩增的技术的一个突出优势是它们对待测的模板DNA要求比较低, 这也是PCR的一个重要特点。当样品量奇缺、DNA质量不高时, 这个技术的优势就凸显出来 (Shen et al, 2013)。对DNA已有所降解的标本进行测序时, 这个策略是个不错的选择。该分子标记技术的特征参见图1。

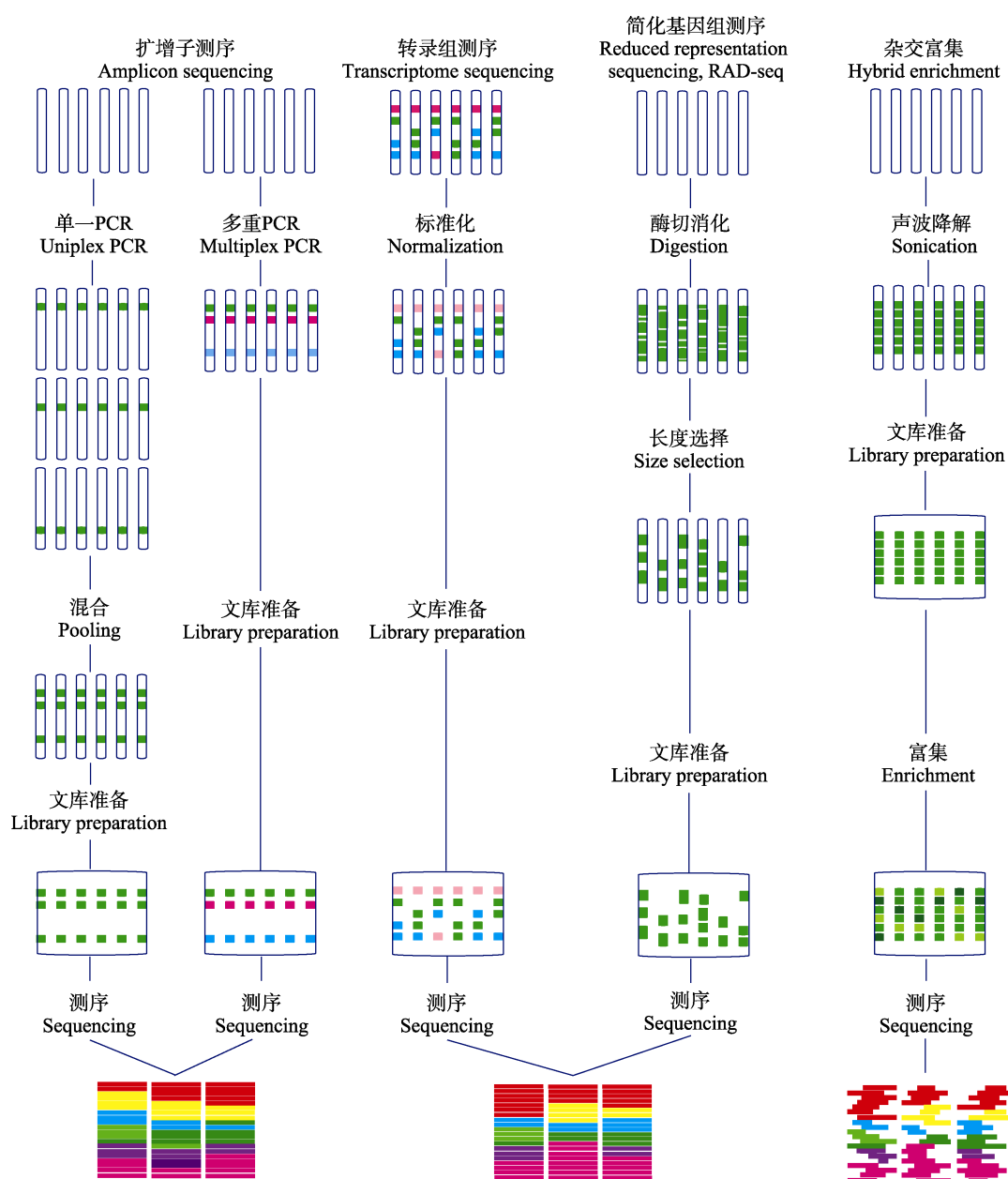


图1 基因组时代的分子标记技术(改编自Lemmon & Lemmon, 2013)。图中简要列出了各测序技术的特点、操作流程和数据特征。  
Fig. 1 Molecular genotyping technologies in the genomic era (adapted from Lemmon & Lemmon, 2013). The figure lists the features, operating procedures and data processing of each sequencing technique.

同时,对只关注少量位点但包含多个个体的项目,扩增子测序有很大的吸引力(Griffin et al, 2011)。在检测杂交存在方面,一个典型应用实例是鲨鱼的研究。研究人员通过扩增子测序建立的分子标记技术,检测到帝氏真鲨(*Carcharchinus tilstoni*)和黑边鳍真鲨(*C. limbatus*)间的杂交(Morgan et al, 2012)。目前,这项技术策略还被用于获取来自全线粒体基因组(Chan et al, 2010; Morin et al, 2010; Gunnarsdóttir et al, 2011)、全叶绿体基因组(Parks, 2009)、宏基因组(metagenomics)遗传变异的研究中。

### 3.1.2 基于限制性酶切的简化基因组测序技术

这类技术都包含一个重要步骤,即对目标样本基因组进行限制性内切酶酶切,有些还包含对酶切产物片段大小的筛选(Baird et al, 2008; van Tassell et al, 2008; Kim et al, 2016)。酶切过程中,可用单一的内切酶,也可用两个内切酶的组合(Peterson et al, 2012);酶切的特征可能是甲基化敏感的、甲基化不敏感的或IIB型限制性核酸内切酶(Wang et al, 2012)。酶的组合和酶切片筛选给了这类技术极大的灵活性,加上样本标签后可以实现各种组合的混样测序,这类技术的潜力巨大。基于类似的简化原理,已有大量特定技术衍生出来(如reduced-representation library sequencing (RRL), restriction-site-associated DNA sequencing (RAD), genotyping by sequencing (GBS)),有不少综述性论文对它们进行了详细介绍(Davey et al, 2011; Andrews et al, 2016)。该分子标记技术的特征参见图1。

但这类技术存在一些问题。第一,人工筛选片段长度时,由于人为操作误差可能造成个别样本上直系同源位点缺失值增多。尽管现在有了自动切胶仪器(比如PippinPrep™),但售价相对较高(近两万美元)。第二,无效等位基因的存在,是由于限制性酶切位点的突变造成酶切片丢失所致。错误地识别无效等位基因会影响对直系同源基因的评估,进而导致系统发育分析的误差。第三,这类基于限制性酶切的技术可能无法用于包含分化时间较长类群的系统发育分析,因为酶切位点位置的变异会造成同源序列的减少。最后,由于受测序技术的限制,这类技术得到的位点多为200–300 bp长的序列,这样短的片段往往无法提供足够的信息用来构建位点特异的基因树。不过,基于Illumina的双末端测序已经可以把单一位点序列长度增加到500 bp以上

(Etter et al, 2011)。

### 3.1.3 目标富集测序

目标富集测序(targeted enrichment sequencing)也称为序列捕获测序(sequence capture),是通过高通量办法对基因组中特定序列进行富集,进而进行高通量测序的一类技术(Mamanova et al, 2010)。在目标富集测序中,先将基因组DNA打碎,然后通过固相(Albert et al, 2007; Hodges et al, 2007)或液相(Gnirke et al, 2009; Maricic et al, 2010)的DNA探针杂交,将非目的片段洗脱,捕获目的序列,再进行样本混合建库和高通量测序。与基于限制性酶切的简化策略相比,这个技术是有目的地对基因组中特定序列进行筛选、富集、测序。与PCR扩增产物测序相比,目标富集测序的富集是通过探针杂交实现的,它的捕获通量可以更高。这个技术需要提前知道要富集的序列信息(可以是基因组、转录组或其他来源的序列),以此设计捕获探针,实现捕获。在捕获过程中,用于区分样本的标签可以在捕获前加入,也可在捕获后加入(Kenny, 2011)。由于捕获试剂往往较为昂贵,捕获前加样本标签更为节省。该分子标记技术的特征参见图1。

尽管目标富集测序技术相对成熟,但目前的应用较多地针对人类疾病研究,在系统发育分析中的应用仍在发展。探针开发是一个重要环节,从转录组或基因组开发探针的工具和流程已有不少报道(Mayer et al, 2016; Pavy et al, 2016; Schmickl et al, 2016)。超保守序列(ultraconserved elements)也是开发捕获探针的重要来源,目前哺乳动物(Bejerano et al, 2004; Reneker et al, 2012)、鸟类(Mccormack & Al, 2011)、两栖爬行类(Crawford et al, 2012)、昆虫(Branstetter et al, 2017)、高等植物(Freeling et al, 2009; Reneker et al, 2012)上的超保守序列已有报道。该技术还有一个特点,就是通过对长目标序列多个不同区域设计探针,可以实现对整条序列的捕获测序。这突破了目前流行的新一代测序的读长较短的限制。但这对数据分析也造成了问题,因为目前流行的系统发育分析软件对大量长片段进行分析时计算速度往往很慢,比如BEST (Edwards et al, 2007)和\*BEST (Heled & Drummond, 2010)。

### 3.1.4 转录组测序

转录组测序(transcriptome sequencing)或者RNA测序(RNA sequencing)是针对基因组中的表达

序列进行测序,本质上也是一种简化基因组测序技术(Marioni et al, 2008; Morin et al, 2008; Wang et al, 2009)。尽管这项技术通常被用于适应性进化和生态基因组学研究,但已有的研究实例表明,该技术获得的转录组序列可以用于重建系统发育和检测杂交的存在(Nabholz et al, 2011; Pease et al, 2016)。此外,该技术对发掘单碱基突变、进行群体遗传研究也很有吸引力,因为它不仅可实现对复杂基因组的简化,而且提供了来自直接与功能相关转录序列的信息。从转录组组装序列中寻找直系同源基因的计算工具已有报道,HaMStR (Ebersberger et al, 2009)是比较不错的一个。该分子标记技术的特征参见图1。

转录组测序的一大特点就是它可以直接地获得大量来自外显子区和附近非转录区(untranslated region, UTR)的序列,这些信息适合各种具有不同分化程度的类群。目前,公开或半公开的转录组序列数据已大量积累,植物方面如1,000种植物转录组测序项目(1KP Project, <http://www.onekp.com/>)、北京林业大学和上海生物信息技术研究中心的植物转录组数据库(<http://lifecenter.sgst.cn/plantransdb/index.do/>)、药用植物转录组测序项目(Medicinal Plant Transcriptome Project, <http://www.uic.edu/pharmacy/MedPITranscriptome/>); 昆虫方面有1KITE项目(1KITE Project, <http://1kite.org/>); 真核微生物方面有海洋真核微生物转录组测序项目(Marine Microbial Eukaryote Transcriptome Project, <http://www.marinemicroeukaryotes.org/>)。基于转录组测序的系统发育研究也在不断积累,比如节肢动物、陆生植物类群。植物方面的突出实例来自复旦大学,研究人员利用转录组测序技术或以其为辅解析了被子植物大类群(Zeng et al, 2014)、十字花科(Huang et al, 2015)、蔷薇科(Xiang et al, 2017)的系统发育,但未见对种间杂交是否存在进行探讨。

转录组测序的限制也很明显(Ozsolak, 2011)。首先,由于样本测序针对RNA开展,而高质量的RNA需要从新鲜组织得到,所以该技术受限于材料,特别是对于那些材料难以获得的类群;其次,由于基因表达有组织特异性并受到环境因素的影响,需要尽量保证用于测序的RNA来自相同培养条件下不同样本相同发育时期的相同组织,这样才能最大限度地保证得到的相似序列更多地来自直系同源谱

系;第三,不同基因表达量差异也很大,如果想得到低表达基因则需要较高的测序深度;最后,可变剪接的存在会给转录组组装及后续数据分析带来挑战(Martin & Wang, 2011; Godden et al, 2012)。

### 3.1.5 全基因组测序

这个技术的实现是显而易见的。对于已有参考基因组、基因组大小合适的类群,全基因组测序(更多的是基因组重测序, genome resequencing)应用已经很常见了,尤其是对近缘种间或种内群体分化的研究中,其优势更加明显。人类的1,000 Genomes计划(<http://www.internationalgenome.org/>)(The Genomes Project Consortium et al, 2010)和植物中拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的1,001 Genomes计划(<http://1001genomes.org/>) (Weigel & Mott, 2009)都为我们作了很好的示范。值得一提的是,基因组水平的证据表明种间遗传交换参与了人(Patterson et al, 2012; Hellenthal et al, 2014; Lazaridis et al, 2014; Sankararaman et al, 2014; Ackermann et al, 2016)和拟南芥(Stenz et al, 2015; Novikova et al, 2016)的起源和分化。

与其他几项技术相比,该技术对测序量的要求相对较高,但建库的成本相对较低。随着测序成本的降低,该技术的应用会更为普遍。如果测序深度足够大,该技术可以得到序列变化的详细信息,如除了碱基替换,插入、缺失、重组、易位、倒位、基因重复、基因组重复、基因组共线性等都可获得。实际上,除了碱基替换,其他信息还无法用基于溯祖模型(coalescent-based)的策略进行分析,在已有的系统发育及群体遗传分析中,这些信息也往往被忽略。这方面的理论和分析技术的开发应该是未来发展的方向。

### 3.1.6 数据处理流程

相对传统技术来说,这些分子标记技术的优势十分明显,尽管数据处理中的某些具体环节还在发展,但成熟的技术流程和相应的软件并不难获得。测序仪输出的原始数据转换、短读(short read)长数据质控、短读长数据的比对、转录组或基因组的组装、单碱基突变或单倍型获取、各步骤质量评估和数据筛选等重要环节的分析对一般的系统发育和群体遗传学的研究团队并不难实现,有大量的高质量技术指南可以参考(DePristo et al, 2011; Nielsen et al, 2011)。对某一种特定分子标记技术的分析策略



也有不少参考, 比如RAD测序方面(Hapke & Thiele, 2016; Kim et al, 2016; McKinney et al, 2016; Shafer et al, 2016; Torkamaneh et al, 2016, 2017)。

### 3.1.7 数据质量控制和筛选

基因组技术带来了海量数据, 同时也伴随着一些问题。有专家认为, 随着谱系基因组学的数据量增大, 潜在的误差来源也会增加(Philippe et al, 2005)。误差来源主要有两个: 随机误差(stochastic error)和系统误差(systematic error) (Swofford et al, 1996)。随机误差是由数据信息量不足造成的, 应该会随着数据量的增加而降低; 系统误差主要来自于模型的选配, 会随着数据量的增加而增大(Philippe et al, 2005; Kumar, 2012)。如果没能很好地控制系统误差, 我们可能得到看似支持率很好但错误的系统发育重建(O'Neill et al, 2013)。当仅利用一个基因位点构建基因树时, 增加序列长度可以降低随机误差; 但如果没有考虑增加序列长度带来的位点内重组的风险, 那么会相应地增加系统误差。当试图把不同位点合并成一个位点进而构建基因树时, 同样的问题也会发生。

为了降低系统误差, 需要注意以下几个要点。

(1)要注意质量控制和筛选。新一代测序数据分析涉及多个步骤, 每一步骤的质量控制都很重要(Rusk, 2009)。(2)要注意直系同源基因的选取。大多数系统发育和谱系地理研究的分析是针对直系同源基因的。在Sanger测序时代, 人们投入了大量精力开发单拷贝基因位点, 以此避免旁系基因的掺入带来的系统误差。但实际上, 即便是使用单拷贝基因, 风险仍然存在。大量的全基因组分析表明, 基因的丢失和重复是普遍存在的现象(Dehal & Boore, 2005)。这类现象的存在会给直系同源基因的识别带来极大的困难。应对这个困难的办法有几个。比如, 有人通过比较来自大量位点的基因树(Rasmussen & Kellis, 2012; Boussau et al, 2013), 进而评判直系同源关系; 也有人通过严格的序列相似性检验(例如用reciprocal BLAST评判)构建直系同源数据集; 还有人借助基因组的共线性分析(Zheng et al, 2005)。相比之下, 最后一种可能最为可靠。(3)利用等位基因序列(单倍型序列, allele)信息而不是位点的一致性序列进行系统发育分析。基于溯祖模型的分析往往假定分析针对的是基因的拷贝(单倍型)。但现实中, 我们往往选用的是多个单倍型的一致性序列

(consensus sequence), 以此代表某个位点。尽管目前还没看到模拟分析评估用一致性序列的风险, 但这样做明显与模型假设不符, 可能会带来潜在系统误差。选用单倍型序列数据至少会使对群体大小的估算更准确。在Sanger时代要得到单倍型数据不太容易, 但新一代测序技术中完全可以将单倍型重建出来(Bauer, 2011; Menelaou, 2013)。(4)提高比对(alignment)的准确性来降低系统误差(Felsenstein, 2004; Susko et al, 2005)。频繁出现的插入/缺失以及高的碱基替换率会直接影响比对的准确性(Gatesy et al, 1993), 从而导致错配和系统误差(Misof & Misof, 2009)。借助蛋白质序列比对及去除高风险区域能在一定程度上保证数据的质量。(5)选用恰当的位点。一般需要数千个位点才可以将分化历史较短的谱系重建出来(Liu et al, 2010); 而对于分化历史较长的系统发育事件可能不需要这么多。群体大小、物种分化时间、位点的特性是帮助我们确定位点数量的重要因素(Leaché & Rannala, 2010; Liu & Yu, 2011; Morrison, 2011)。新一代测序可以获得海量数据, 依据研究目的对位点进行筛选是必要的(Townsend, 2007)。

实际上, 我们可能也无法恰当地处理所有数据。对于旨在检验杂交是否存在的研究来说, 数据的筛选会面临一系列问题。群体遗传学就是研究等位基因数量(allele dosage)的问题, 不同等位基因可能来自不同亲本, 数据筛选可能造成等位基因的丢失, 进而丢失重要杂交信号。当然, 对于系统发育研究而言, 类似的问题同样存在。数据的有效利用非常重要, 对含有“杂交”的样本进行数据获取时面临一定的风险, 需要引起大家的注意。

### 3.1.8 模型的选取

恰当的数据分析模型的选择是重中之重, 一直被认为是准确重建系统发育的核心(Felsenstein, 1978)。有两个显而易见的模型选取问题需要注意。首先, 要确认序列进化模型的选择是否恰当(Lemmon & Moriarty, 2004; Sullivan & Joyce, 2005)。这方面, 混合模型(mixture models) (Pagel & Meade, 2004)、数据分区(data partitioning) (Yang, 1996)和针对大数据的最优分区策略(optimal partitioning strategies) (Lanfear et al, 2012)等技术可以给我们很多帮助。其次, 要注意是否恰当地对重组(比杂交内涵更广, 但实质类似)进行了处理。重组会导致基因树间

的不一致(Rannala & Yang, 2008)。把来自分散在基因组不同区域的不同位点的序列(比如来自RAD测序的序列)进行合并, 再作系统进化分析, 这样的做法有很大风险, 它会带来错误的系统发育信息(Degnan & Rosenberg, 2006; Edwards et al, 2007; Kubatko & Degnan, 2007; Leaché & Rannala, 2010)。来自转录组测序的数据, 即便是同一个基因中, 不同外显子间的重组也不容忽视。实际上, 本文的目的在于检测重组的存在, 不论它是在系统发育尺度上还是群体水平上。我们推荐使用可以同时检验杂交和不完全谱系筛选的算法来重建系统发育。

模型初选后, 应该用恰当的检验来评判选定模型的可靠性。这方面有一系列的工具可以利用, 比如位点内或位点间重组(Mcguire et al, 1997; Kosakovsky et al, 2006; Martin et al, 2015)、各种选择(Delpont et al, 2010)、杂交(Yu et al, 2011)、时序性进化速率差异(heterotachy) (Pagel & Meade, 2008)和模型总体上的配合性(Albert & Schluter, 2005; Abby et al, 2012; Ackermann et al, 2016)等。如果初选模型不适合, 那么应该及时调整选用更恰当的模型。如果位点间基因树冲突, 那么可考虑选用应对杂交或者不完全谱系分离的模型, 而不是仍然将序列合并使用, 或者把不相配合的部分数据删除。当然还是要删除那些体现强烈选择印记的、变异饱和的(saturated) (Castresana, 2000; Rodríguezzepeleta et al, 2007; Gnrirke et al, 2009)和包含有缺失值(missing)或有缺失变异(deletion)的位点(Lemmon et al, 2009)。

### 3.2 系统发育分析策略

不论是二倍体还是多倍体杂种, 其基因组中不同位点的基因可能来自于不同亲本种, 它们反映着不同的进化历程, 这正是利用系统发育分析检测杂交的依据(Yu et al, 2011)。系统发育分析中早就开始评估“网状进化”的存在(Sneath, 1975)。水平基因转移、杂交、重组、不完全谱系分选(incomplete lineage sorting)及基因重复和丢失(gene duplication and loss)都会让我们看到基因树间拓扑结构的不一致性(phylogenetic incongruence), 这种不一致性不能被表示成二歧分枝的树, 而更像一个网状结构。我们用网状进化来描述这个现象。在排除其他机制存在的情况下, 基因树间的不一致性往往正是我们用来检测杂交事件存在的系统发育方法。但不能说系统发育的不一致性一定意味着杂交, 它只是意味着杂

交可能存在。清晰地排除不完全谱系分选和基因重复丢失带来的影响是检测杂交的必需步骤。尽管这样在方法上并不限于系统发育网络(phylogenetic network), 比如可以通过评判不同DNA片段建树后的不同树型(拓扑结构)的比例, 以及不同树型对应的片段在基因组的分布来区分杂交和不完全谱系分选。但相比之下, 系统发育网络同时考虑基因组水平大量位点信息, 有对杂交和不完全谱系分选同时和综合检测的潜力, 所以本文的重点放在了系统发育网络上。较为全面的系统发育分析流程见图2。

对比单一位点构建系统发育树, 进而检测网状进化的存在, 是一种初步评估遗传交换存在的方式, 这里不多论述。多物种溯祖(multispecies coalescent)是通过多位点信息构建物种树的策略(Degnan & Rosenberg, 2009; Edwards, 2016), 最大似然(maximum-likelihood) (Kubatko et al, 2009; Wu, 2012)和贝叶斯(Bayesian)算法(Liu, 2008; Heled & Drummond, 2010)都被成功地应用于这种技术, 对这个领域计算技术的发展也有系统的综述文章发表(Nakhleh, 2013)。然而, 一个重要问题是这个领域大多数已有模型都只把不完全谱系分选作为导致系统发育不一致性的唯一原因。事实上, 如果杂交等遗传交换参与到了类群分化中, 这种技术不但无法检测到遗传交换的存在, 甚至可能会给出相当不可靠的结果, 比如奇怪的枝长、特别的群体大小等。

系统发育网络允许节点(node, 实际上是系统进化中的祖先种)间的网状连接, 它可以替代二歧分枝的系统发育树, 从而体现杂交或其他网状进化的存在, 也是呈现杂交存在的重要方式。目前, 系统发育网络分为直接的(implicit network)和间接的(explicit network)两大类(Solis-Lemus & Ane, 2016)。直接网络简单地将基因树间的不一致性呈现在网络上(Than et al, 2008; Huson & Scornavacca, 2011; Grunewald et al, 2013), 它们往往运算速度快。但这种网络中的内部节点并不对应祖先类群, 导致很难对它们进行深入解读。与直接网络相对应, 间接网络中可呈现网状进化并且内部节点与祖先类群相对应, 对于系统发育分析来说, 它们的价值更大。组合法(combinatorial method)和基于模型法(model-based method)是两类推算间接网络的策略。组合法往往无法把不完全谱系分选与杂交区分开, 也没有



Fig. 2 The brief work-flow of phylogenetic strategy used to test hybridization (adapted from Lemmon & Lemmon, 2013). The work-flow contains multiple steps including data processing, data quality evaluation, data screening, orthologous gene identification, sequence analysis, selection of base substitution model, phylogenetic tree and phylogenetic network reconstruction. We sort out the hierarchy of recommended, suboptimal or requires validation and not recommended, in consideration of the degree of operation, the reliability of the data, whether can distinguish hybridization, incomplete lineage sorting and other factors. And we list the available softwares for each step.

考虑基因不同进化历程(比如基因的重复和丢失)带来的误差(Gambette et al, 2012)。但这类方法的运算速度相对较快。基于模型的方法在利用多位点数据构建系统发育网络时同时考虑了杂交和不完全谱系分选(Strimmer & Moulton, 2000; Meng & Kubatko, 2009; Yu et al, 2012), 相比于组合法更为准确。这类基于模型的系统发育网络方法也被称为多物种网络溯祖(multispecies network coalescent, MSNC) (Yu et al, 2012, 2013, 2014)。PhyloNet (<http://bioinfo.cs.rice.edu/phylonet/>)是这类方法的一个重要软件工具, 它利用最大似然算法, 基于一系列基因位点信息估算系统发育网络(Yu et al, 2014)。PhyloNet可成功地应对由于不完全谱系分选造成的位点间的不一致性, 并且通过校验过程控制网络的复杂性。但它的计算量很大, 对超过10个分类群或4次潜在杂交事件的分析工作就不适用了。针对这种计算上的挑战, SNaQ (species networks applying quartets)算法通过计算假似然性(pseudolikelihood)极大提高了计算效能, 可以应用于有数十分类单位、数千位点的项目, 并且可以估算出大量的潜在杂交事件, 同时应对不完全谱系分选的存在(Solis-Lemus & Ane, 2016)。该方法对应的软件包叫做PhyloNetworks (<https://github.com/crsl4/PhyloNetworks.jl/>)。感兴趣的读者可以在网上找到非常完整的教程(<http://crsl4.github.io/PhyloNetworks.jl/latest/>)。事实上, PhyloNet的作者也通过计算假似然性提高了原有的计算效能(Yu & Nakhleh, 2015)。

不同于上面的系统发育网络技术, 如果研究体系中只包含2个二倍体类群和它们1次杂交事件产生的1个异源四倍体类群, 并且异源四倍体中2个二倍体基因组间没有重组, 那么Allopolyploids软件中的算法可以用来在排除不完全谱系分选的情况下估算这种杂交成种的历史(<https://sites.google.com/site/touchingthedata/software/allopolyploids/>)(Jones et al, 2013)。

### 3.3 群体遗传学分析策略

群体遗传学手段是用来探讨近缘种间或种内类群间分化、检测杂交的存在、澄清杂交特征的重要手段。实际上, 群体遗传学手段实现的第一步是从认识群体结构开始的, 有了群体结构的划分, 才有后面检测杂交存在、澄清杂交模式的可能。相应

群体遗传分析流程的概括见图3。

#### 3.3.1 主成分分析

主成分分析(principal component analysis, PCA)是一类经典的多元统计技术, 很早就开始被应用在遗传数据分析中(Menozzi et al, 1978)。主成分分析可以将样本间的关系呈现在主成分形成的二维或三维空间上, 但它不能提供杂交存在与否的检验(Patterson et al, 2012), 介于类群间的样本不一定就来自于类群间的杂交(Yang et al, 2012)。因此, EIGENSTRAT等软件基于PCA来估算杂交(Price et al, 2006)可能会得出错误的结果。除了EIGENSTRAT, adegenet也是一个主成分分析的工具(Jombart, 2008)。

#### 3.3.2 聚类方法

这里提到的聚类方法(clustering methods)是指按等位基因频率分布模式, 将个体的来源归入相应祖先群体(ancestral populations)中。简单地说, 聚类的基本过程是: 先假定有 $K$ 个可能存在的祖先群体; 然后依据个体基因型计算它们被判别为各群体的概率; 在计算时, 假定各位点群体上的频率分布服从哈代-温伯格平衡(Hardy-Weinberg equilibrium)。利用structure (Pritchard et al, 2000; Falush et al, 2003)和admixture (Alexander et al, 2009)等基于模型的聚类方法对每一个参试个体估算其来自于 $K$ 个祖先群体中某个特定群体的遗传比例。祖先群体的数量 $K$ 是个先验值, 可以依据一些已知的研究背景确定, 也可以通过最小 $K$ 值的策略估算出来。旨在揭示杂交的群体遗传研究中, 此类聚类方法的应用非常普遍。InStruct是structure软件的拓展, 它没有哈代-温伯格平衡的前提假设, 可以同时群体结构和近交率进行估算(Gao et al, 2007), 这对近交或自交比较频繁的植物研究有利用价值。类似的聚类运算的软件还有不少, 例如FRAPPE (Tang et al, 2007)、sNMF (Frichot et al, 2014)、Geneland (Guillot et al, 2004, 2005)等。它们在操作上类似, 运算速度相差不少, 有些可以考虑样本群体间的环境或地理信息。这类聚类方法可以应用于基因型数据、二倍化的单倍型数据(pseudo-homozygous genotype)或者基因型的似然值数据(genotype likelihood)。ANGSD软件包中的NGSAdmix软件(Skotte et al, 2013)可以基于基因组水平基因型的似然值数据而不是基因型数据做聚类分析。

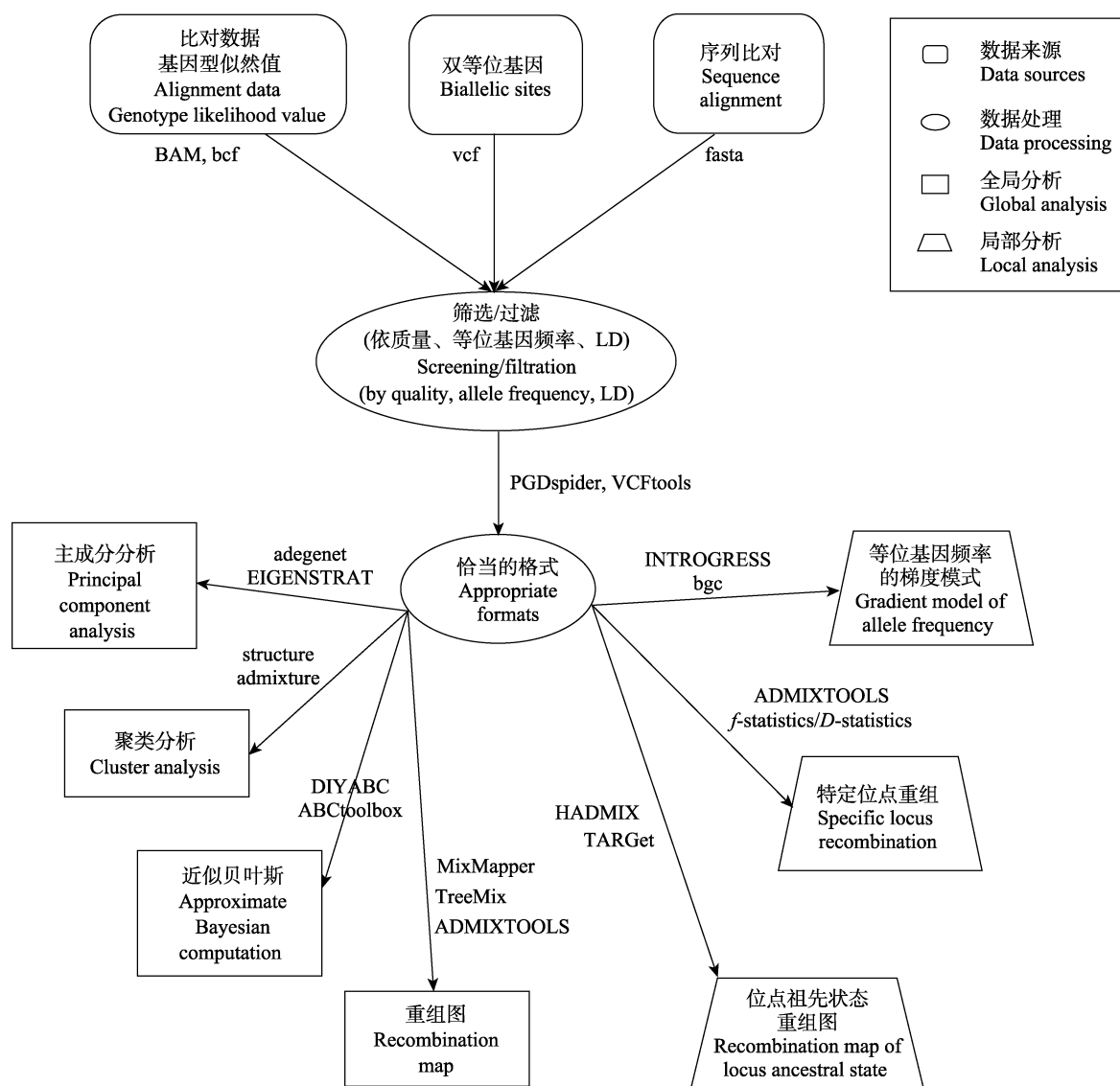


图3 检验杂交群体遗传分析的基本流程。图中给出了利用当前流行的群体基因组学技术,通过数据收集、数据处理和分析等环节,对杂交的存在和模式进行全局和局部检验的基本流程,并列举出了数据格式类型和部分可利用的软件。  
Fig. 3 The current population genomic work-flow used to test hybridization. The basic process of global and local testing for the existence and mode of hybridization through data collection, data processing and analysis are presented. The data format and some of the available softwares are listed.

这类聚类方法只是假定祖先群体的个数,没有对各种可能的群体模型进行评估,因此当存在复杂的杂交重组历史时,可能会给出错误的结果(Patterson et al, 2012)。此外,这里全局性的祖先重建方法也会受到抽样的影响,比如当某些遗传分化类群没有被抽样,或不同类群间抽样不均衡,都会影响对祖先群体遗传组分(ancestry components)的估算(Mcvean, 2009)。

### 3.3.3 等位基因频率的梯度变化模式

等位基因频率在连续分布的地理群体上的梯

度变异模式很早就被用来识别杂交带和判断杂交带的存在形式(Barton, 1983; Szymura & Barton, 1986),它也被用于寻找适应性变异和生殖隔离的遗传基础(Gompert & Buerkle, 2009, 2011; Fitzpatrick, 2013)。INTROGRESS (Gompert & Buerkle, 2010)、bgc (Gompert & Buerkle, 2012)和Hlest (Fitzpatrick, 2013)等软件可以实现这类计算。但这类检测方法来源于早期的杂交带研究,它们多关注分化程度不大的类群或群体间的杂交,对更为古老的杂交事件,它们可能无法识别。

### 3.3.4 几种统计参数和检验

上面提到的主成分分析、聚类分析(比如基于structure和admixture的分析)可以用来澄清群体遗传结构,并对杂交的存在提供全局性的线索(那些看似杂交的迹象可能由杂交以外的其他因素导致),但它们都没有提供杂交是否存在的检验。比如,与距离关联的分化(isolation by distance)可以产生在PCA上的梯度变异。基于structure和admixture的结果也很难做出对群体历史的推算,因为它们没有对特定的群体历史模型进行检验,而是简单地假定抽样群体都是从某特定群体快速辐射分化而来。Patterson等(2012)综合已有工作(Reich et al, 2009; Green et al, 2010; Durand et al, 2011; Moorjani et al, 2011),归纳出了几个针对群体间杂交历史的检验和相应的参数,并提供了实现有关计算的软件包(ADMIXTOOLS)。这些参数和检验包括1个三群体检验( $f_3$ -statistic, the three-population test)和2个四群体检验( $D$ -statistics或者ABBA-BABA test, 以及 $f_4$ -statistics或 $F_4$ -ratio)。这里的 $f_3$ -statistic和 $f_4$ -statistics也被统称为 $F$ -statistics。

三群体检验基于对群体间等位基因频率关联性进行评估,可以对群体间即便是非常近期发生的杂交事件给出清晰的验证。研究人员成功地利用 $f_3$ -statistic估算出尼安德特人(*Homo neanderthalensis*)贡献了非洲现代人群1.5–2.1%的遗传变异(Prufer et al, 2014)。通过选用外类群, $f_3$ -statistic也被用来揭示多个不同类群群体的多重起源历史(Haak et al, 2015; Haber et al, 2016; Mörseburg et al, 2016)。

$F_4$ -ratio检验可以用来推断杂交造成的遗传重组的比例,即使在不知道祖先群体的情况下,也可以依据对系统发育关系的假定进行推断。四群体检验不但可以对杂交是否存在给出证据,还可以提供基因流的方向。这些四群体检验也同样被广泛用于检测现代人类基因组中的古人类成分和相关的历史过程(Green et al, 2010; Fu et al, 2014, 2016; Prufer et al, 2014; Meyer et al, 2016)。最近对非洲丽鱼的研究将该方法进一步拓展为五群体检验,或称为 $f_5$ -statistic (Meier et al, 2017), 该研究表明古老的杂交事件带来遗传变异,成为后期适应性分化和物种形成的重要推动力。

与 $f_3$ -statistic和 $f_4$ -statistics不同,  $D$ -statistics不需要对群体进行细致的取样以得到等位基因频率的

准确信息,它可以应用于一个类群只有一条序列的情况。对这些参数和检验的详细描述请参考Patterson等(2012)的文章。

### 3.3.5 重组图

重组图(admixture graph)是一个允许类群间基因交流的系统发育树的拓展。基于上面提到的 $F$ -statistics就可以构建这样的图,目前有几种工具可以利用。MixMapper (Lipson et al, 2014)是一个半自动的工具。它首先基于由一对明显没有杂交的群体间等位基因频率( $F_2$ )求算的遗传聚类生成邻接树(neighbor-joining tree),然后在允许基因流的情况下把剩下的群体添加到图上来(Lipson et al, 2013, 2014)。TreeMix (Pickrell & Pritchard, 2012)实现了与MixMapper在理论上类似的算法。在假定重组或者基因流个数的情况下,它可以全自动地计算出重组图。不同的重组次数的假定会对结果带来极大影响,选取时需谨慎。上面提到的ADMIXTOOLS软件(Patterson et al, 2012)中也提供了类似的工具。但这里的重组图工具更加稳健,因为它提供了假设中的重组模式是否和数据相符的检验。重组图的手段已经在人类遗传领域广泛应用,曾被用来揭示北美原著民的遗传组成和来源(Raghavan et al, 2014b)、丹尼索瓦人(Denisovans)对现代人群的遗传贡献(Meyer et al, 2012)、新世界寒带地区的人类定居历史(Raghavan et al, 2014a)。

### 3.3.6 位点的祖先状态

与杂交关联的是不同特征的基因组间的重组,这种重组会带来一个嵌合的基因组,在嵌合的基因组上不同的区域体现着不同的进化历程。识别这些位点不但对澄清种间或群体间的基因交流有意义(Green et al, 2010; Reich et al, 2010; Prufer et al, 2014),同时也可以提供重组模式和适应性分化的信息(Kim & Rothschild, 2014)。这些位点的识别对于揭示生殖隔离的遗传基础和找寻物种形成基因(speciation genes)有重要意义(Wu & Ting, 2004; Nosil & Schluter, 2011; Burri et al, 2015),同时对建立针对濒危物种的保护策略有应用价值(der Sarkissian et al, 2015)。基于基因组水平的滑动窗(sliding window)分析可以追溯不同染色体区段的祖先状态,上面提到过的 $D$ -statistics就是一个很好的工具(Kronforst et al, 2013; Smith & Kronforst, 2013)。

已经有一些估算位点祖先状态的计算工具,



Padhukasahasram (2014)就进行了较为详尽的综述。一般来说, 这些计算工具需要借助隐马尔科夫模型(hidden Markov models, HMMs)来确定不同亲本来源的基因组区段的界限。HAPMIX软件可以利用未定相(unphased)的基因型数据确定杂种个体特定位点的祖先来源(Price et al, 2009)。CRFs应用一个广义隐马尔科夫模型(generalized hidden Markov model), 借助训练集数据实现了对祖先来源的估算(Sankararaman et al, 2012)。实现这类分析的软件还包括: SABER (Tang et al, 2006)、HAPA (Sundquist et al, 2008)、LAMP (Sankararaman et al, 2008)、LAMP-LD/LAMP-HAP (Baran et al, 2012)、WINPOP (Pasaniuc et al, 2009)、SupportMix (Omberg et al, 2012)、ASPCA (Moreno-Estrada et al, 2013)、ALLOY (Rodriguez et al, 2013)、RFMix (Maples et al, 2013)、Lanc-CSV (Brown & Pasaniuc, 2014)和EILA (Yang et al, 2013)。EILA没有对输入数据位点间连锁平衡的前提假设, 且比LAMP和HAPMIX更准确, 运行速度也不慢。Lanc-CSV实现了经典算法, 但对超大样本数据有速度上的优势。

在位点水平祖先状态和重组历史的估算上, 祖先重组图(ancestral recombination graph, ARG)也是一个重要策略。祖先重组图试图将所有样本的所有位点经历的溯祖过程(coalescence)和重组历史(recombination events)呈现出来, 是详细解析杂交历史的重要工具(Siepel, 2009)。这类方法在计算上的挑战不小, 目前仅有少量工具可用, 比如ARGWeaver (Rasmussen et al, 2014)、Beagle (Song & Hein, 2005)和TARGet (Cámara et al, 2016)。TARGet是一个最新也是唯一声称可以分析数百基因组特定位点数据的工具。

### 3.3.7 ABC算法

基于最大似然算法的策略往往很复杂, 需要大量的计算。近似贝叶斯算法(approximate Bayesian computation, ABC)不需要计算似然值, 它提供了一个检验各种复杂进化过程是否存在的平台(Beaumont, 2010)。近似贝叶斯计算中, 首先对待检测过程依据一定的期望建立多重模拟, 然后将真实数据和模拟产生的数据进行比较, 再通过选取那些与真实数据最类似的模型来实现对待检验假设的推断。近似贝叶斯计算需要完成数据模拟、统计计算、模型比较等步骤, 目前有多种针对性的工具可以利用,

可参考一些重要综述文章(Csilléry et al, 2010; Sunnåker et al, 2013; Lintusaari et al, 2016)。DIYABC (Cornuet et al, 2014)、ABCtoolbox (Wegmann et al, 2010)和abc (Csilléry et al, 2011)等是通常用来实现ABC计算的平台。利用基因组水平未定向数据和ABC算法揭示杂交事件存在的一个研究实例来自针对胡蜂(*Biorhiza pallida*)的工作(Robinson et al, 2014)。

## 4 总结

作为重要的进化过程, 杂交对于生物多样性产生和维持的意义受到越来越多的关注。针对如何检测杂交存在这个问题, 本文对来自多个学科的理论和技术发展作了综述, 以基因组时代的基因型获取和数据分析技术为重点, 归纳了各新兴技术的特点, 作了多方面的比较, 在一些重要应用领域提出了可能存在的问题和解决对策。虽然本文所综述的检测杂交是否存在的研究方法多来自研究较为透彻的高等动植物类群, 但鉴于这些方法的通用性, 亦可拓展到其他生物类群。

**致谢:** 感谢专辑组织者、两位审稿人和编委的建设性意见, “生物进化与系统学论坛” QQ群和2016年在中国科学院上海辰山植物科学研究中心举办的“自然杂交与生物多样性研讨会”给了作者很多重要的启发, 在此一并表示感谢。

## 参考文献

- Abbott R, Albach D, Ansell S, Arntzen JW, Baird SJE, Bierne N, Boughman J, Brelsford A, Buerkle CA, Buggs R, Butlin RK, Dieckmann U, Eroukhanoff F, Grill A, Cahan SH, Hermansen JS, Hewitt G, Hudson AG, Jiggins C, Jones J, Keller B, Marczewski T, Mallet J, Martinez-Rodriguez P, Möst M, Mullen S, Nichols R, Nolte AW, Parisod C, Pfennig K, Rice AM, Ritchie MG, Seifert B, Smadja CM, Stelkens R, Szymura JM, Väinölä R, Wolf JBW, Zinner D (2013) Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, 26, 229–246.
- Abby SS, Tannier E, Gouy M, Daubin V (2012) Lateral gene transfer as a support for the tree of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 109, 4962–4967.
- Ackermann RR, Mackay A, Arnold ML (2016) The hybrid origin of “Modern” humans. *Evolutionary Biology*, 43, 1–11.
- Adams RP (1982) A comparison of multivariate methods for

- the detection of hybridization. *Taxon*, 31, 646–661.
- Albert AYG, Schluter D (2005) Selection and the origin of species. *Current Biology*, 15, 283–288.
- Albert TJ, Molla MN, Muzny DM, Nazareth L, Wheeler D, Song X, Richmond TA, Middle CM, Rodesch MJ, Packard CJ (2007) Direct selection of human genomic loci by microarray hybridization. *Nature Methods*, 4, 903–905.
- Alexander DH, Novembre J, Lange K (2009) Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Research*, 19, 1655–1664.
- Anderson E, Hubricht L (1938) Hybridization in *Tradescantia*. III. The evidence for introgressive hybridization. *American Journal of Botany*, 25, 396–402.
- Andrews KR, Good JM, Miller MR, Luikart G, Hohenlohe PA (2016) Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics*, 17, 81–92.
- Arnold ML (2016) *Divergence with Genetic Exchange*. Oxford University Press, Oxford.
- Baird NA, Etter PD, Atwood TS, Currey MC, Shiver AL, Lewis ZA, Selker EU, Cresko WA, Johnson EA (2008) Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS ONE*, 3, e3376.
- Baran Y, Pasaniuc B, Sankararaman S, Torgerson DG, Gignoux C, Eng C, Rodriguezcintron W, Chapela R, Ford JG, Avila PC (2012) Fast and accurate inference of local ancestry in Latino populations. *Bioinformatics*, 28, 1359–1367.
- Barton NH (1983) Multilocus clines. *Evolution*, 37, 454–471.
- Bauer DC (2011) Variant calling comparison CASAVA1.8 and GATK. *Nature Precedings*, doi: 10.1038/npre.2011.6107.1/.
- Beaumont MA (2010) Approximate Bayesian computation in evolution and ecology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 41, 379–406.
- Bejerano G, Pheasant M, Makunin I, Stephen S, Kent WJ, Mattick JS, Haussler D (2004) Ultraconserved elements in the human genome. *Science*, 304, 1321–1325.
- Boussau B, Szöllösi GJ, Duret L, Gouy M, Tannier E, Daubin V (2013) Genome-scale coestimation of species and gene trees. *Genome Research*, 23, 323–330.
- Branstetter MG, Longino JT, Ward PS, Faircloth BC (2017) Enriching the ant tree of life: enhanced UCE bait set for genome-scale phylogenetics of ants and other *Hymenoptera*. *Methods in Ecology and Evolution*, 8, 768–776.
- Brown R, Pasaniuc B (2014) Enhanced methods for local ancestry assignment in sequenced admixed individuals. *PLoS Computational Biology*, 10, e1003555.
- Bujarski J (2013) Genetic recombination in plant-infecting messenger-sense RNA viruses: overview and research perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 4, doi: 10.3389/fpls.2013.00068.
- Burri R, Nater A, Kawakami T, Mugal CF, Olason PI, Smeds L, Suh A, Dutoit L, Bureš S, Garamszegi LZ (2015) Linked selection and recombination rate variation drive the evolution of the genomic landscape of differentiation across the speciation continuum of *Ficedula flycatchers*. *Genome Research*, 25, 1656–1665.
- Cámara PG, Levine AJ, Rabadán R (2016) Inference of ancestral recombination graphs through topological data analysis. *PLoS Computational Biology*, 12, e1005071.
- Castresana J (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 17, 540–552.
- Castric V, Bechsgaard J, Schierup MH, Vekemans X (2008) Repeated adaptive introgression at a gene under multiallelic balancing selection. *PLoS Genetics*, 4, e1000168.
- Chan YC, Roos C, Inouemurayama M, Inoue E, Shih CC, Pei JC, Vigilant L (2010) Mitochondrial genome sequences effectively reveal the phylogeny of *Hylobates* gibbons. *PLoS ONE*, 5, e14419.
- Chester M, Leitch AR, Soltis PS, Soltis DE (2010) Review of the application of modern cytogenetic methods (FISH/GISH) to the study of reticulation (polyploidy/hybridisation). *Genes*, 1, 166–192.
- Choler P, Erschbamer B, Tribsch A, Gielly L, Taberlet P (2004) Genetic introgression as a potential to widen a species' niche: insights from alpine *Carex curvula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 101, 171–176.
- Cohan FM (2002) Sexual isolation and speciation in bacteria. *Genetica*, 116, 359–370.
- Cohan FM, Kane M (2001) Bacterial species and speciation. *Systematic Biology*, 50, 513–524.
- Cornuet JM, Pudlo P, Veyssier J, Dehnegarcia A, Gautier M, Leblois R, Marin JM, Estoup A (2014) DIYABC v2.0: a software to make approximate Bayesian computation inferences about population history using single nucleotide polymorphism, DNA sequence and microsatellite data. *Bioinformatics*, 30, 1187.
- Crawford NG, Faircloth BC, McCormack JE, Brumfield RT, Winker K, Glenn TC (2012) More than 1000 ultraconserved elements provide evidence that turtles are the sister group of archosaurs. *Biology Letters*, 8, 783–786.
- Csilléry K, Blum MGB, Gaggiotti OE, François O (2010) Approximate Bayesian computation (ABC) in practice. *Trends in Ecology and Evolution*, 25, 410–418.
- Csilléry K, François O, Blum MGB (2011) abc: an R package for approximate Bayesian computation (ABC). *Methods in Ecology and Evolution*, 3, 475–479.
- Davey JW, Hohenlohe PA, Etter PD, Boone JQ, Catchen JM, Blaxter ML (2011) Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics*, 12, 499–510.
- Degnan JH, Rosenberg NA (2006) Discordance of species trees with their most likely gene trees. *PLoS Genetics*, 2, e68.
- Degnan JH, Rosenberg NA (2009) Gene tree discordance, phylogenetic and the multispecies coalescent. *Trends in*

- Ecology and Evolution, 24, 332–340.
- Dehal P, Boore JL (2005) Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. *PLoS Biology*, 3, e314.
- Delport W, Poon AFY, Frost SDW, Pond SLK (2010) DamaMonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinformatics*, 26, 2455–2457.
- Depotter JR, Seidl MF, Wood TA, Thomma BP (2016) Interspecific hybridization impacts host range and pathogenicity of filamentous microbes. *Current Opinion in Microbiology*, 32, 7–13.
- DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, Philippakis AA, del Angel G, Rivas MA, Hanna M, McKenna A, Fennell TJ, Kernysky AM, Sivachenko AY, Cibulskis K, Gabriel SB, Altshuler D, Daly M (2011) A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nature Genetics*, 43, 491–498.
- der Sarkissian C, Ermini L, Schubert M, Yang MA, Librado P, Fumagalli M, Jónsson H, Bargal GK, Albrechtsen A, Vieira FG (2015) Evolutionary genomics and conservation of the endangered Przewalski's horse. *Current Biology*, 25, 2577–2583.
- Duncan KE, Istock CA, Graham JB, Ferguson N (1989) Genetic exchange between *Bacillus subtilis* and *Bacilluslicheniformis*: variable hybrid stability and the nature of bacterial species. *Evolution*, 43, 1585–1609.
- Durand EY, Patterson N, Reich D, Slatkin M (2011) Testing for ancient admixture between closely related populations. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2239–2252.
- Earl AM, Losick R, Kolter R (2008) Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*, 16, 269–275.
- Ebersberger I, Strauss S, von Haeseler A (2009) HaMStR: profile hidden Markov model based search for orthologs in ESTs. *BMC Evolutionary Biology*, 9, doi:10.1186/1471-2148-9-157.
- Edwards S (2016) Species trees. In: *Encyclopedia of Evolutionary Biology* (ed. Kliman R), pp. 236–244. Academic Press, Oxford.
- Edwards SV, Liu L, Pearl DK (2007) High-resolution species trees without concatenation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 104, 5936–5941.
- Ellstrand NC, Elam D (1993) Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 24, 217–242.
- Etter PD, Preston JL, Bassham S, Cresko WA, Johnson EA (2011) Local *de novo* assembly of RAD paired-end contigs using short sequencing reads. *PLoS ONE*, 6, e18561.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164, 1567–1587.
- Felsenstein J (1978) Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Systematic Zoology*, 27, 401–410.
- Felsenstein J (2004) *Inferring Phylogenies*. Sinauer Associates, Sunderland.
- Fitzpatrick BM (2013) Alternative forms for genomic clines. *Ecology and Evolution*, 3, 1951–1966.
- Freeling M, Subramaniam S, Yano M, Tuberosa R (2009) Conserved noncoding sequences (CNSs) in higher plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 126–132.
- Frichot E, Mathieu F, Trouillon T, Bouchard G, Francois O (2014) Fast and efficient estimation of individual ancestry coefficients. *Genetics*, 196, 973–983.
- Fu QM, Li H, Moorjani P, Jay F, Slepchenko SM, Bondarev AA, Johnson PLF, Petri AA, Prüfer K, Filippa CD (2014) The genome sequence of a 45,000-year-old modern human from western Siberia. *Nature*, 514, 445–449.
- Fu QM, Posth C, Hajdinjak M, Petr M, Mallick S, Fernandes D, Furtwängler A, Haak W, Meyer M, Mittnik A (2016) The genetic history of Ice Age Europe. *Nature*, 534, 200–205.
- Gambette P, Berry V, Paul C (2012) Quartets and unrooted phylogenetic networks. *Journal of Bioinformatics & Computational Biology*, 10, 1250004–1250023.
- Gao H, Williamson S, Bustamante CD (2007) A Markov chain Monte Carlo approach for joint inference of population structure and inbreeding rates from multilocus genotype data. *Genetics*, 176, 1635–1651.
- Gao J, Wang B, Mao JF, Ingvarsson P, Zeng QY, Wang XR (2012) Demography and speciation history of the homoploid hybrid pine *Pinus densata* on the Tibetan Plateau. *Molecular Ecology*, 21, 4811–4827.
- Gnirke A, Melnikov A, Maguire J, Rogov P, Leproust EM, Brockman W, Fennell T, Giannoukos G, Fisher S, Russ C (2009) Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing. *Nature Biotechnology*, 27, 182–189.
- Godden G, Jordon-Thaden I, Chamala S, Crowl AA, García N, Germain-Aubrey C, Heaney JM, Latvis M, Qi XS, Gitzen-danner MA (2012) Making next-generation sequencing work for you: approaches and practical considerations for marker development and phylogenetics. *Plant Ecology & Diversity*, 5, 427–450.
- Gompert Z, Buerkle CA (2012) bgc: software for Bayesian estimation of genomic clines. *Molecular Ecology Resources*, 12, 1168–1176.
- Gompert Z, Buerkle CA (2009) A powerful regression-based method for admixture mapping of isolation across the genome of hybrids. *Molecular Ecology*, 18, 1207–1224.
- Gompert Z, Buerkle CA (2010) INTROGRESS: a software package for mapping components of isolation in hybrids. *Molecular Ecology Resources*, 10, 378–384.
- Gompert Z, Buerkle CA (2011) Bayesian estimation of genomic clines. *Molecular Ecology*, 20, 2111–2127.
- Grant PR, Grant BR (2014) Evolutionary biology: speciation undone. *Nature*, 507, 178–179.

- Green RE, Krause J, Briggs AW, Maricic T, Stenzel U, Kircher M, Patterson N, Li H, Zhai W, Fritz MH (2010) A draft sequence of the Neandertal genome. *Science*, 328, 710–722.
- Griffin PC, Robin C, Hoffmann AA (2011) A next-generation sequencing method for overcoming the multiple gene copy problem in polyploid phylogenetics, applied to *Poa* grasses. *BMC Biology*, 9, 1–18.
- Gross BL, Rieseberg LH (2005) The ecological genetics of homoploid hybrid speciation. *Journal of Heredity*, 96, 241–252.
- Grunewald S, Spillner A, Bastkowski S, Bogershausen A (2013) SuperQ: computing supernetworks from quartets. *Computational Biology & Bioinformatics IEEE/ACM Transactions*, 10, 151–160.
- Guillot G, Mortier F, Estoup A (2004) Geneland: a program for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes*, 5, 712–715.
- Guillot G, Estoup A, Mortier F, Cosson JF (2005) A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics*, 170, 1261–1280.
- Gunnarsdóttir ED, Li M, Bauchet M, Finstermeier K, Stoneking M (2011) High-throughput sequencing of complete human mtDNA genomes from the Philippines. *Genome Research*, 21, 1–11.
- Haak W, Lazaridis I, Patterson N, Rohland N, Mallick S, Llamas B, Brandt G, Nordenfelt S, Harney E, Stewardson K, Fu QM, Mittnik A, Banffy E, Economou C, Francken M, Friederich S, Pena RG, Hallgren F, Khartanovich V, Khokhlov A, Kunst M, Kuznetsov P, Meller H, Mochalov O, Moiseyev V, Nicklisch N, Pichler SL, Risch R, Rojo GMA, Roth C, Szecsenyi-Nagy A, Wahl J, Meyer M, Krause J, Brown D, Anthony D, Cooper A, Alt KW, Reich D (2015) Massive migration from the steppe was a source for Indo-European languages in Europe. *Nature*, 522, 207–211.
- Haber M, Mezzavilla M, Xue YL, Comas D, Gasparini P, Zalloua P, Tyler-Smith C (2016) Genetic evidence for an origin of the Armenians from Bronze Age mixing of multiple populations. *European Journal of Human Genetics*, 24, 931–936.
- Hapke A, Thiele D (2016) GIBPSs: a toolkit for fast and accurate analyses of genotyping-by-sequencing data without a reference genome. *Molecular Ecology Resources*, 16, 979–990.
- Hegarty MJ, Hiscock SJ (2008) Genomic clues to the evolutionary success of polyploid plants. *Current Biology*, 18, R435–R444.
- Heled J, Drummond AJ (2010) Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Molecular Biology and Evolution*, 27, 570–580.
- Hellenthal G, Busby GBJ, Band G, Wilson JF, Capelli C, Falush D, Myers S (2014) A genetic atlas of human admixture history. *Science*, 343, 747–751.
- Hodges E, Xuan Z, Balija V, Kramer M, Molla MN, Smith SW, Middle CM, Rodesch MJ, Albert TJ, Hannon GJ (2007) Genome-wide *in situ* exon capture for selective resequencing. *Nature Genetics*, 39, 1522–1527.
- Huang CH, Sun RR, Hu Y, Zeng LP, Zhang N, Cai LM, Zhang Q, Koch MA, Ihsan AS, Edger PP (2015) Resolution of Brassicaceae phylogeny using nuclear genes uncovers nested radiations and supports convergent morphological evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 33, 394–412.
- Huson DH, Scornavacca C (2011) A survey of combinatorial methods for phylogenetic networks. *Genome Biology and Evolution*, 3, 23–35.
- Jombart T (2008) adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24, 1403–1405.
- Jones G, Sagitov S, Oxelman B (2013) Statistical inference of allopolyploid species networks in the presence of incomplete lineage sorting. *Systematic Biology*, 62, 467–478.
- Kenny EM (2011) Multiplex target enrichment using DNA indexing for ultra-high throughput SNP Detection. *DNA Research*, 18, 31–38.
- Kim C, Guo H, Kong WQ, Chandnani R, Shuang LS, Paterson AH (2016) Application of genotyping by sequencing technology to a variety of crop breeding programs. *Plant Science*, 242, 14–22.
- Kim ES, Rothschild MF (2014) Genomic adaptation of admixed dairy cattle in East Africa. *Frontiers in Genetics*, 5, doi: 10.3389/fgene.2014.00443.
- Kim M, Cui ML, Cubas P, Gillies A, Lee K, Chapman MA, Abbott RJ, Coen E (2008) Regulatory genes control a key morphological and ecological trait transferred between species. *Science*, 322, 1116–1119.
- Kosakovsky PSL, Posada D, Gravenor MB, Woelk CH, Frost SDW (2006) GARD: a genetic algorithm for recombination detection. *Bioinformatics*, 22, 3096–3098.
- Kronforst MR, Hansen MEB, Crawford NG, Gallant JR, Zhang W, Kulathinal RJ, Kapan DD, Mullen SP (2013) Hybridization reveals the evolving genomic architecture of speciation. *Cell Reports*, 5, 666–677.
- Kubatko LS, Carstens BC, Knowles LL (2009) STEM: species tree estimation using maximum likelihood for gene trees under coalescence. *Bioinformatics*, 25, 971–973.
- Kubatko LS, Degnan JH (2007) Inconsistency of phylogenetic estimates from concatenated data under coalescence. *Systematic Biology*, 56, 17–24.
- Kumar S (2012) Statistics and truth in phylogenomics. *Molecular Biology and Evolution*, 29, 457–472.
- Lanfear R, Calcott B, Ho SY, Guindon S (2012) Partitionfinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 29, 1695–1701.
- Lazaridis I, Patterson N, Mittnik A, Renaud G, Mallick S, Kirchanow K, Sudmant PH, Schraiber JG, Castellano S, Lipson M, Berger B, Economou C, Bollongino R, Fu QM, Bos KI, Nordenfelt S, Li H, de Filippo C, Prufer K, Sawyer S, Posth C, Haak W, Hallgren F, Fornander E, Rohland N, Delsate D,

- Francken M, Guinet JM, Wahl J, Ayodo G, Babiker HA, Bailliet G, Balanovska E, Balanovsky O, Barrantes R, Bedoya G, Ben-Ami H, Bene J, Berrada F, Bravi CM, Brisighelli F, Busby GBJ, Cali F, Churnosov M, Cole DEC, Corach D, Damba L, van Driem G, Dryomov S, Dugoujon JM, Fedorova SA, Gallego RI, Gubina M, Hammer M, Henn BM, Hervig T, Hodoglul U, Jha AR, Karachanak-Yankova S, Khusainova R, Khusnutdinova E, Kittles R, Kivisild T, Klitz W, Kucinskas V, Kushniarevich A, Laredj L, Litvinov S, Loukidis T, Mahley RW, Melegh B, Metspalu E, Molina J, Mountain J, Nakkalajarvi K, Nesheva D, Nyambo T, Osipova L, Parik J, Platonov F, Posukh O, Romano V, Rothhammer F, Rudan I, Ruizbakiev R, Sahakyan H, Sajantila A, Salas A, Starikovskaya EB, Tarekn A, Toncheva D, Turdikulova S, Uktveryte I, Utevska O, Vasquez R, Villena M, Voevoda M, Winkler CA, Yepiskoposyan L, Zalloua P, Zemunik T, Cooper A, Capelli C, Thomas MG, Ruiz-Linares A, Tishkoff SA, Singh L, Thangaraj K, Vilems R, Comas D, Sukernik R, Metspalu M, Meyer M, Eichler EE, Burger J, Slatkin M, Paabo S, Kelso J, Reich D, Krause J (2014) Ancient human genomes suggest three ancestral populations for present-day Europeans. *Nature*, 513, 409–413.
- Leaché AD, Rannala B (2010) The accuracy of species tree estimation under simulation: a comparison of methods. *Systematic Biology*, 60, 126–137.
- Lefevre P, Moriones E (2015) Recombination as a motor of host switches and virus emergence: geminiviruses as case studies. *Current Opinion in Virology*, 10, 14–19.
- Lemmon AR, Brown JM, Stanger-Hall K, Lemmon EM (2009) The effect of ambiguous data on phylogenetic estimates obtained by maximum likelihood and Bayesian inference. *Systematic Biology*, 58, 130–145.
- Lemmon AR, Moriarty EC (2004) The importance of proper model assumption in Bayesian phylogenetics. *Systematic Biology*, 53, 265–277.
- Lemmon EM, Lemmon AR (2013) High-throughput genomic data in systematics and phylogenetics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 44, 99–121.
- Liang D, Mao JF, Zhao W, Zhou XQ, Yuan HW, Wang LM, Xing FQ, Wang XR, Li Y (2013) Seedling performance of *Pinus densata* and its parental population in the habitat of *P. tabulaformis*. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 37, 150–163. (in Chinese with English abstract) [梁冬, 毛建丰, 赵伟, 周先清, 袁虎威, 王黎明, 邢芳倩, 王晓茹, 李悦 (2013) 高山松及其亲本种群在油松生境下的苗期性状. *植物生态学报*, 37, 150–163.]
- Lintusaari J, Gutmann MU, Dutta R, Kaski S, Corander J (2016) Fundamentals and recent developments in approximate Bayesian computation. *Systematic Biology*, 66, 66–82.
- Lipson M, Loh PR, Levin A, Reich D, Patterson N, Berger B (2013) Efficient moment-based inference of admixture parameters and sources of gene flow. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 1788–1802.
- Lipson M, Loh PR, Patterson N, Moorjani P, Ko YC, Stoneking M, Berger B, Reich D (2014) Reconstructing Austronesian population history in Island Southeast Asia. *Nature Communications*, 5, doi: 10.1038/ncomms5689.
- Liu L (2008) BEST: Bayesian estimation of species trees under the coalescent model. *Bioinformatics*, 24, 2542–2543.
- Liu LQ, Gu ZJ (2011) Genomic *in situ* hybridization identifies genome donors of *Camellia reticulata* (Theaceae). *Plant Science*, 180, 554–559.
- Liu L, Yu LL (2011) Estimating species trees from unrooted gene trees. *Systematic Biology*, 60, 661–667.
- Liu L, Yu LL, Edwards SV (2010) A maximum pseudo-likelihood approach for estimating species trees under the coalescent model. *BMC Evolutionary Biology*, 10, doi: 10.1186/1471-2148-10-302.
- Livak KJ (2003) SNP genotyping by the 5'-nuclease reaction. *Methods in Molecular Biology*, 212, 129–147.
- Mörseburg A, Pagani L, Ricaut FX, Yngvadottir B, Harney E, Castillo C, Hoogervorst T, Antao T, Kusuma P, Brucato N (2016) Multi-layered population structure in Island Southeast Asians. *European Journal of Human Genetics*, 24, 1605–1611.
- Ma XF, Szmidt AE, Wang XR (2006) Genetic structure and evolutionary history of a diploid hybrid pine *Pinus densata* inferred from the nucleotide variation at seven gene loci. *Molecular Biology and Evolution*, 23, 807–816.
- Mallet J (2005) Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution*, 20, 229–237.
- Mallet J, Besansky N, Hahn MW (2016) How reticulated are species? *BioEssays*, 38, 140–149.
- Mamanova L, Coffey AJ, Scott CE, Kozarewa I, Turner EH, Kumar A, Howard E, Shendure J, Turner DJ (2010) Target-enrichment strategies for next-generation sequencing. *Nature Methods*, 7, 111–118.
- Mao JF, Li Y, Wang XR (2009) Empirical assessment of the reproductive fitness components of the hybrid pine *Pinus densata* on the Tibetan Plateau. *Evolutionary Ecology*, 23, 447–462.
- Maples BK, Gravel S, Kenny EE, Bustamante CD (2013) RFMix: a discriminative modeling approach for rapid and robust local-ancestry inference. *American Journal of Human Genetics*, 93, 278–288.
- Marczewski T, Ma YP, Zhang XM, Sun WB, Marczewski AJ (2016) Why is population information crucial for taxonomy? A case study involving a hybrid swarm and related varieties. *AoB Plants*, 8, doi:10.1093/aobpla/plw070.
- Maricic T, Whitten M, Pääbo S (2010) Multiplexed DNA sequence capture of mitochondrial genomes using PCR products. *PLoS ONE*, 5, e14004.
- Marioni JC, Mason CE, Mane SM, Stephens M, Gilad Y (2008) RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Re-*

- search, 18, 1509–1517.
- Martin DP, Murrell B, Golden M, Khoosal A, Muhire B (2015) RDP4: detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Chemical Research in Toxicology*, 1, doi: 10.1093/ve/vev003.
- Martin JA, Wang Z (2011) Next-generation transcriptome assembly. *Nature Reviews Genetics*, 12, 671–682.
- Martin NH, Bouck AC, Arnold ML (2006) Detecting adaptive trait introgression between *Iris fulva* and *I. brevicaulis* in highly selective field conditions. *Genetics*, 172, 2481–2489.
- Martinsen GD, Whitham TG, Turek RJ, Keim P (2001) Hybrid populations selectively filter gene introgression between species. *Evolution*, 55, 1325–1335.
- Mayer C, Sann M, Donath A, Meixner M, Podsiadlowski L, Peters RS, Petersen M, Meusemann K, Liere K, Wägele JW, Misof B, Bleidorn C, Ohl M, Niehuis O (2016) BaitFisher: a software package for multispecies target DNA enrichment probe design. *Molecular Biology and Evolution*, 33, 1875–1886.
- Mccormack JE, Al E (2011) Next-generation sequencing reveals phylogeographic structure and a species tree for recent bird divergences. *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 62, 397–406.
- Mcguire G, Wright F, Prentice MJ (1997) A graphical method for detecting recombination in phylogenetic data sets. *Molecular Biology and Evolution*, 14, 1125–1131.
- McKinney GJ, Waples RK, Seeb LW, Seeb JE (2016) Paralogs are revealed by proportion of heterozygotes and deviations in read ratios in genotyping-by-sequencing data from natural populations. *Molecular Ecology Resources*, 17, 656–669.
- Mcvean G (2009) A genealogical interpretation of principal components analysis. *PLoS Genetics*, 5, e1000686.
- Meier JJ, Marques DA, Mwaiko S, Wagner CE, Excoffier L, Seehausen O (2017) Ancient hybridization fuels rapid cichlid fish adaptive radiations. *Nature Communications*, 8, doi: 10.1038/ncomms14363.
- Menelaou A (2013) Genotype calling and phasing using next-generation sequencing reads and a haplotype scaffold. *Bioinformatics*, 29, 84–91.
- Meng C, Kubatko LS (2009) Detecting hybrid speciation in the presence of incomplete lineage sorting using gene tree incongruence: a model. *Theoretical Population Biology*, 75, 35–45.
- Menozi P, Piazza A, Cavallisforza L (1978) Synthetic maps of human gene frequencies in Europeans. *Science*, 201, 786–792.
- Meyer M, Kircher M, Gansauge MT, Li H, Racimo F, Mallick S, Schraiber JG, Jay F, Prüfer K, de Filippo C (2012) A high-coverage genome sequence from an archaic *Denisovan* individual. *Science*, 338, 222–226.
- Meyer M, Arsuaga JL, Filippo CD, Nagel S, Aximupetri A, Nickel B, Martínez I, Gracia A, Castro JMBD, Carbonell E (2016) Nuclear DNA sequences from the Middle Pleistocene Sima de los Huesos hominins. *Nature*, 531, 504–507.
- Meyer M, Stenzel U, Hofreiter M (2008) Parallel tagged sequencing on the 454 platform. *Nature Protocol*, 3, 267–278.
- Misof B, Misof K (2009) A Monte Carlo approach successfully identifies randomness in multiple sequence alignments: a more objective means of data exclusion. *Systematic Biology*, 58, 21–34.
- Moorjani P, Patterson N, Hirschhorn JN, Keinan A, Hao L, Atzmon G, Burns E, Ostrer H, Price AL, Reich D (2011) The history of African gene flow into southern Europeans, Levantines, and Jews. *PLoS Genetics*, 7, e1001373.
- Moreno-Estrada A, Gravel S, Zakharia F, Mccauley JL, Byrnes JK, Gignoux CR, Ortiz-Tello PA, Martínez RJ, Hedges DJ, Morris RW (2013) Reconstructing the population genetic history of the Caribbean. *PLoS Genetics*, 9, 569–573.
- Morgan JAT, Harry AV, Welch DJ, Street R, White J, Geraghty PT, Macbeth WG, Tobin A, Simpfendorfer CA, Ovenden JR (2012) Detection of interspecies hybridisation in Chondrichthyes: hybrids and hybrid offspring between Australian (*Carcharhinus tilstoni*) and common (*C. limbatus*) blacktip shark found in an Australian fishery. *Conservation Genetics*, 13, 455–463.
- Morin PA, Archer FI, Foote AD, Vilstrup J, Allen EE, Wade P, Durban J, Parsons K, Pitman R, Li L (2010) Complete mitochondrial genome phylogeographic analysis of killer whales (*Orcinus orca*) indicates multiple species. *Genome Research*, 20, 908–916.
- Morrison DA (2011) Estimating species trees: practical and theoretical aspects. *Systematic Biology*, 60, 562–564.
- Nabholz B, Künstner A, Wang R, Jarvis ED, Ellegren H (2011) Dynamic evolution of base composition: causes and consequences in avian phylogenomics. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2197.
- Nakhleh L (2013) Computational approaches to species phylogeny inference and gene tree reconciliation. *Trends in Ecology and Evolution*, 28, 719–728.
- Nelson RR (1963) Interspecific hybridization in the fungi. *Annual Reviews in Microbiology*, 17, 31–48.
- Nielsen R, Paul JS, Albrechtsen A, Song YS (2011) Genotype and SNP calling from next-generation sequencing data. *Nature Reviews Genetics*, 12, 443–451.
- Nosil P, Schluter D (2011) The genes underlying the process of speciation. *Trends in Ecology and Evolution*, 26, 160–167.
- Novikova PY, Hohmann N, Nizhynska V, Tsuchimatsu T, Ali J, Muir G, Guggisberg A, Paape T, Schmid K, Fedorenko OM, Holm S, Sall T, Schlotterer C, Marhold K, Widmer A, Sese J, Shimizu KK, Weigel D, Kramer U, Koch MA, Nordborg M (2016) Sequencing of the genus *Arabidopsis* identifies a complex history of nonbifurcating speciation and abundant trans-specific polymorphism. *Nature Genetics*, 48, 1077–1082.
- Omberg L, Salit J, Hackett N, Fuller J, Matthew R, Chouchane L, Rodriguez-Flores JL, Bustamante C, Crystal RG, Mezey



- JG (2012) Inferring genome-wide patterns of admixture in Qataris using fifty-five ancestral populations. *BMC Genetics*, 13, 49–59.
- O'Neill EM, Schwartz R, Bullock CT, Williams JS, Shaffer HB, Aguilar-Miguel X, Parra-Olea G, Weisrock DW (2013) Parallel tagged amplicon sequencing reveals major lineages and phylogenetic structure in the North American tiger salamander (*Ambystoma tigrinum*) species complex. *Molecular Ecology*, 22, 111–129.
- Ozsolak F (2011) RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nature Reviews Genetics*, 12, 87–98.
- Padhukasahasram B (2014) Inferring ancestry from population genomic data and its applications. *Frontiers in Genetics*, 5, doi: 10.3389/fgene.2014.00204.
- Pagel M, Meade A (2004) A phylogenetic mixture model for detecting pattern-heterogeneity in gene sequence or character-state data. *Systematic Biology*, 53, 571–581.
- Pagel M, Meade A (2008) Modelling heterotachy in phylogenetic inference by reversible-jump Markov chain Monte Carlo. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 363, 3955–3964.
- Parks M (2009) Increasing phylogenetic resolution at low taxonomic levels using massively parallel sequencing of chloroplast genomes. *BMC Biology*, 7, doi: 10.1186/1741-7007-7-84.
- Pasaniuc B, Sankararaman S, Kimmel G, Halperin E (2009) Inference of locus-specific ancestry in closely related populations. *Bioinformatics*, 25, 213–221.
- Patterson N, Moorjani P, Luo YT, Mallick S, Rohland N, Zhan YP, Genschoreck T, Webster T, Reich D (2012) Ancient admixture in human history. *Genetics*, 192, 1065–1093.
- Pavy N, Gagnon F, Deschênes A, Boyle B, Beaulieu J, Bousquet J (2016) Development of highly reliable in silico SNP resource and genotyping assay from exome capture and sequencing: an example from black spruce (*Picea mariana*). *Molecular Ecology Resources*, 16, 588–598.
- Payseur BA, Rieseberg LH (2016) A genomic perspective on hybridization and speciation. *Molecular Ecology*, 25, 2337–2360.
- Pease JB, Haak DC, Hahn MW, Moyle LC (2016) Phylogenomics reveals three sources of adaptive variation during a rapid radiation. *PLoS Biology*, 14, e1002379.
- Peterson BK, Weber JN, Kay EH, Fisher HS, Hoekstra HE (2012) Double digest RADseq: an inexpensive method for *de novo* SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLoS ONE*, 7, e37135.
- Pérez-Losada M, Arenas M, Galán JC, Palero F, González-Candelas F (2015) Recombination in viruses: mechanisms, methods of study, and evolutionary consequences. *Infection, Genetics and Evolution*, 30, 296–307.
- Philippe H, Delsuc F, Brinkmann H, Lartillot N (2005) Phylogenomics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 36, 541–562.
- Pickrell JK, Pritchard JK (2012) Inference of population splits and mixtures from genome-wide allele frequency data. *PLoS Genetics*, 8, e1002967.
- Price AL, Patterson NJ, Plenge RM, Weinblatt ME, Shadick NA, Reich D (2006) Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nature Genetics*, 38, 904–909.
- Price AL, Tandon A, Patterson N, Barnes KC, Rafaels N, Ruczinski I, Beaty TH, Mathias R, Reich D, Myers S (2009) Sensitive detection of chromosomal segments of distinct ancestry in admixed populations. *PLoS Genetics*, 5, e1000519.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945–959.
- Prüfer K, Racimo F, Patterson N, Jay F, Sankararaman S, Sawyer S, Heinze A, Renaud G, Sudmant PH, de Filippo C, Li H, Mallick S, Dannemann M, Fu QM, Kircher M, Kuhlwilm M, Lachmann M, Meyer M, Ongyerth M, Siebauer M, Theunert C, Tandon A, Moorjani P, Pickrell J, Mullikin JC, Vohr Samuel H, Green RE, Hellmann I, Johnson PLF, Blanche H, Cann H, Kitzman JO, Shendure J, Eichler EE, Lein ES, Bakken TE, Golovanova LV, Doronichev VB, Shunkov MV, Derevianko AP, Viola B, Slatkin M, Reich D, Kelso J, Paabo S (2014) The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai Mountains. *Nature*, 505, 43–49.
- Pyron RA, Hsieh FW, Lemmon AR, Lemmon EM, Hendry CR (2016) Integrating phylogenomic and morphological data to assess candidate species-delimitation models in brown and red-bellied snakes (*Storeria*). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 177, 937–949.
- Raghavan M, DeGiorgio M, Albrechtsen A, Moltke I, Skoglund P, Korneliussen TS, Gronnow B, Appelt M, Gullov HC, Friesen TM, Fitzhugh W, Malmstrom H, Rasmussen S, Olsen J, Melchior L, Fuller BT, Fahrni SM, Stafford TJ, Grimes V, Renouf MA, Cybulski J, Lynnerup N, Lahr MM, Britton K, Knecht R, Arneborg J, Metspalu M, Cornejo OE, Malaspinas AS, Wang Y, Rasmussen M, Raghavan V, Hansen TV, Khushnutdinova E, Pierre T, Dneprovsky K, Andreassen C, Lange H, Hayes MG, Coltrain J, Spitsyn VA, Gotharstrom A, Orlando L, Kivisild T, Villems R, Crawford MH, Nielsen FC, Dissing J, Heinemeier J, Meldgaard M, Bustamante C, O'Rourke DH, Jakobsson M, Gilbert MT, Nielsen R, Willerslev E (2014a) The genetic prehistory of the new world Arctic. *Science*, 345, doi: 10.1126/science.1255832.
- Raghavan M, Skoglund P, Graf KE, Metspalu M, Albrechtsen A, Moltke I, Rasmussen S, Stafford TW Jr, Orlando L, Metspalu E (2014) Upper Palaeolithic Siberian genome reveals dual ancestry of native Americans. *Nature*, 505, 87–91.
- Rannala B, Yang Z (2008) Phylogenetic inference using whole genomes. *Annual Review of Genomics & Human Genetics*,

- 9, 217–231.
- Rasmussen MD, Hubisz MJ, Gronau I, Siepel A (2014) Genome-wide inference of ancestral recombination graphs. *PLoS Genetics*, 10, e1004342.
- Rasmussen MD, Kellis M (2012) Unified modeling of gene duplication, loss, and coalescence using a locus tree. *Genome Research*, 22, 755–765.
- Reich D, Thangaraj K, Patterson N, Price AL, Singh L (2009) Reconstructing Indian population history. *Nature*, 461, 489–494.
- Reich D, Green RE, Kircher M, Krause J, Patterson N, Durand EY, Viola B, Briggs AW, Stenzel U, Johnson PLF (2010) Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia. *Nature*, 468, 1053–1060.
- Reneker J, Lyons E, Conant GC, Pires JC, Freeling M, Shyu CR, Korkin D (2012) Long identical multispecies elements in plant and animal genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 109, 1183–1191.
- Rieseberg LH, Archer MA, Wayne RK (1999) Transgressive segregation, adaptation and speciation. *Heredity*, 83, 363–372.
- Rieseberg LH, Widmer A, Arntz AM, Burke B (2003) The genetic architecture necessary for transgressive segregation is common in both natural and domesticated populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, 358, 1141–1147.
- Robinson JD, Bunnefeld L, Hearn J, Stone GN, Hickerson MJ (2014) ABC inference of multi-population divergence with admixture from unphased population genomic data. *Molecular Ecology*, 23, 4458–4471.
- Rodríguezpeleta N, Brinkmann H, Roure B, Lartillot N, Lang BF, Philippe H (2007) Detecting and overcoming systematic errors in genome-scale phylogenies. *Systematic Biology*, 56, 389–399.
- Rodriguez JM, Bercovici S, Elmore M, Batzoglou S (2013) Ancestry inference in complex admixtures via variable-length Markov chain linkage models. *Journal of Computational Biology*, 20, 199–211.
- Rusk N (2009) Focus on next-generation sequencing data analysis. *Nature Methods*, 6, doi: 10.1038/nmeth.f.271.
- Sankararaman S, Patterson N, Li H, Pääbo S, Reich D (2012) The date of interbreeding between Neandertals and modern humans. *PLoS Genetics*, 8, e1002947.
- Sankararaman S, Mallick S, Dannemann M, Prüfer K, Kelso J, Paabo S, Patterson N, Reich D (2014) The genomic landscape of Neanderthal ancestry in present-day humans. *Nature*, 507, 354–357.
- Sankararaman S, Sridhar S, Kimmel G, Halperin E (2008) Estimating local ancestry in admixed populations. *American Journal of Human Genetics*, 82, 290–303.
- Schmickl R, Liston A, Zeisek V, Oberlander K, Weitemier K, Straub SCK, Cronn RC, Dreyer LL, Suda J (2016) Phylogenetic marker development for target enrichment from transcriptome and genome skim data: the pipeline and its application in southern African *Oxalis* (Oxalidaceae). *Molecular Ecology Resources*, 16, 1124–1135.
- Schwenk K, Brede N, Streit B (2008) Introduction: extent, processes and evolutionary impact of interspecific hybridization in animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363, 2805–2811.
- Shafer ABA, Peart CR, Tusso S, Maayan I, Brelsford A, Wheat CW, Wolf JBW (2016) Bioinformatic processing of RAD-seq data dramatically impacts downstream population genetic inference. *Methods in Ecology and Evolution*, doi: 10.1111/2041-210X.12700.
- Shen XX, Liang D, Feng YJ, Chen MY, Zhang P (2013) A versatile and highly efficient toolkit including 102 nuclear markers for vertebrate phylogenomics, tested by resolving the higher level relationships of the caudata. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2235–2248.
- Siepel A (2009) Phylogenomics of primates and their ancestral populations. *Genome Research*, 19, 1929–1941.
- Sims GE, Jun SR, Wu GA, Kim SH (2009) Alignment-free genome comparison with feature frequency profiles (FFP) and optimal resolutions. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 106, 2677–2682.
- Skotte L, Korneliussen TS, Albrechtsen A (2013) Estimating individual admixture proportions from next generation sequencing data. *Genetics*, 195, 693–702.
- Smith J, Kronforst MR (2013) Do *Heliconius* butterfly species exchange mimicry alleles? *Biology Letters*, 9, 20130503.
- Sneath PHA (1975) Cladistic representation of reticulate evolution. *Systemic Zoology*, 24, 360–368.
- Solis-Lemus C, Ane C (2016) Inferring phylogenetic networks with maximum pseudolikelihood under incomplete lineage sorting. *PLoS Genetics*, 12, e1005896.
- Soltis PS, Soltis DE (2009) The role of hybridization in plant speciation. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 561–588.
- Song BH, Wang XQ, Wang XR, Ding KY, Hong DY (2003) Cytoplasmic composition in *Pinus densata* and population establishment of the diploid hybrid pine. *Molecular Ecology*, 12, 2995–3001.
- Song BH, Wang XQ, Wang XR, Sun LJ, Hong DY, Peng PH (2002) Maternal lineages of *Pinus densata*, a diploid, hybrid. *Molecular Ecology*, 11, 1057–1063.
- Song YS, Hein J (2005) Constructing minimal ancestral recombination graphs. *Journal of Computational Biology*, 12, 147–169.
- Stenz NWM, Larget B, Baum DA, Ané C (2015) Exploring tree-like and non-tree-like patterns using genome sequences: an example using the inbreeding plant species *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Systematic Biology*, 64, 809–823.
- Strimmer K, Moulton V (2000) Likelihood analysis of phylogenetic networks using directed graphical models. *Molecular Biology and Evolution*, 17, 875–881.
- Su S, Wong G, Shi WF, Liu J, Lai ACK, Zhou JY, Liu WJ, Bi YH, Gao GF (2016) Epidemiology, genetic recombination,

- and pathogenesis of coronaviruses. *Trends in Microbiology*, 24, 490–502.
- Sullivan J, Joyce P (2005) Model selection in phylogenetics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 36, 445–466.
- Sundquist A, Fratkin E, Do CB, Batzoglou S (2008) Effect of genetic divergence in identifying ancestral origin using HAPAA. *Genome Research*, 18, 676–682.
- Sunnåker M, Busetto AG, Numminen E, Corander J, Foll M, Dessimoz C (2013) Approximate Bayesian computation. *PLoS Computational Biology*, 9, e1002803.
- Susko E, Spencer M, Roger AJ (2005) Biases in phylogenetic estimation can be caused by random sequence segments. *Journal of Molecular Evolution*, 61, 351–359.
- Swofford DL, Olsen GJ, Waddell PJ, Hillis DM (1996) Phylogenetic inference. In: *Molecular Systematics* (eds Hillis DM, Moritz D, Mable BK), pp. 407–514. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Szymura JM, Barton NH (1986) Genetic analysis of a hybrid zone between the fire-bellied toads, *Bombina bombina* and *B. variegata*, near Cracow in southern Poland. *Evolution*, 40, 1141–1159.
- Tang H, Choudhry S, Mei R, Morgan M, Rodriguez-Cintron W, Burchard EG, Risch NJ (2007) Recent genetic selection in the ancestral admixture of Puerto Ricans. *American Journal of Human Genetics*, 81, 626–633.
- Tang H, Coram M, Wang P, Zhu X, Risch N (2006) Reconstructing genetic ancestry blocks in admixed individuals. *American Journal of Human Genetics*, 79, 1–12.
- Than C, Ruths D, Nakhleh L (2008) PhyloNet: a software package for analyzing and reconstructing reticulate evolutionary relationships. *BMC Bioinformatics*, 9, doi: 10.1186/1471-2105-9-322.
- The Genomes Project Consortium, Altshuler DL, Durbin RM, Abecasis GR, Bentley DR, Chakravarti A, Clark AG, Collins FS, de La Vega FM (2010) A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*, 467, 1061–1073.
- Torkamaneh D, Laroche J, Bastien M, Abed A, Belzile F (2017) Fast-GBS: a new pipeline for the efficient and highly accurate calling of SNPs from genotyping-by-sequencing data. *BMC Bioinformatics*, 18, doi: 10.1186/s12859-016-1431-9.
- Torkamaneh D, Laroche J, Belzile F (2016) Genome-wide SNP calling from genotyping by sequencing (GBS) data: a comparison of seven pipelines and two sequencing technologies. *PLoS ONE*, 11, e0161333.
- Townsend JP (2007) Profiling phylogenetic informativeness. *Systematic Biology*, 56, 222–231.
- Vallejo-Marin M, Hiscock SJ (2016) Hybridization and hybrid speciation under global change. *New Phytologist*, 211, 1170–1187.
- van Tassell CP, Smith TP, Matukumalli LK, Taylor JF, Schnabel RD, Lawley CT, Haudenschild CD, Moore SS, Warren WC, Sonstegard TS (2008) SNP discovery and allele frequency estimation by deep sequencing of reduced representation libraries. *Nature Methods*, 5, 247–252.
- Wang BS, Mao JF, Gao J, Zhao W, Wang XR (2011) Colonization of the Tibetan Plateau by the homoploid hybrid pine *Pinus densata*. *Molecular Ecology*, 20, 3796–3811.
- Wang S, Meyer E, McKay JK, Matz MV (2012) 2b-RAD: a simple and flexible method for genome-wide genotyping. *Nature Methods*, 9, 808–810.
- Wang XR, Szmidi AE (1994) Hybridization and chloroplast DNA variation in a *Pinus* species complex from Asia. *Evolution*, 48, 1020–1031.
- Wang XR, Szmidi AE, Savolainen O (2001) Genetic composition and diploid hybrid speciation of a high mountain pine, *Pinus densata*, native to the Tibetan Plateau. *Genetics*, 159, 337–346.
- Wang XR, Szmidi AE, Lewandowski A, Wang ZR (1990) Evolutionary analysis of *Pinus densata* Masters, a putative tertiary hybrid 1, allozyme variation. *Theoretical and Applied Genetics*, 80, 635–640.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10, 57–63.
- Wegmann D, Leuenberger C, Neuenschwander S, Excoffier L (2010) ABCtoolbox: a versatile toolkit for approximate Bayesian computations. *BMC Bioinformatics*, 11, doi:10.1186/1471-2105-11-116.
- Weigel D, Mott R (2009) The 1001 Genomes Project for *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biology*, 10, 107.
- Worobey M, Holmes EC (1999) Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *Journal of General Virology*, 80, 2535–2543.
- Wu CL (1956) The taxonomic revision and phytogeographical study of Chinese pines. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 5, 131–163. (in Chinese with English abstract) [吴中伦 (1956) 中国松属的分类与分布. *植物分类学报*, 5, 131–163.]
- Wu CI, Ting CT (2004) Genes and speciation. *Nature Reviews Genetics*, 5, 114–122.
- Wu Y (2012) Coalescent-based species tree inference from gene tree topologies under incomplete lineage sorting by maximum likelihood. *Evolution*, 66, 763–775.
- Wu ZY, Raven PH, Hong DY (2014) *Flora of China*, Vols. 1–25. Science Press, Beijing & Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.
- Xiang YZ, Huang CH, Hu Y, Wen J, Li SS, Yi TS, Chen HY, Xiang J, Ma H (2017) Well-resolved rosaceae nuclear phylogeny facilitates geological time and genome duplication analyses and ancestral fruit character reconstruction. *Molecular Biology and Evolution*, 34, 262–281.
- Xing FQ, Mao JF, Meng JX, Dai JF, Zhao W, Liu H, Xing Z, Zhang H, Wang XR, Li Y (2014) Needle morphological evidence of the homoploid hybrid origin of *Pinus densata*

- based on analysis of artificial hybrids and the putative parents, *Pinus tabulaeformis* and *Pinus yunnanensis*. *Ecology & Evolution*, 4, 1890–1902.
- Yang JJ, Li J, Buu A, Williams LK (2013) Efficient inference of local ancestry. *Bioinformatics*, 29, 2750–2756.
- Yang WY, Novembre J, Eskin E, Halperin E (2012) A model-based approach for analysis of spatial structure in genetic data. *Nature Genetics*, 44, 725–731.
- Yang ZH (1996) Maximum-likelihood models for combined analyses of multiple sequence data. *Journal of Molecular Evolution*, 42, 587–596.
- Yu Y, Degnan JH, Nakhleh L (2012) The probability of a gene tree topology within a phylogenetic network with applications to hybridization detection. *PLoS Genetics*, 8, e1002660.
- Yu Y, Dong J, Liu KJ, Nakhleh L (2014) Maximum likelihood inference of reticulate evolutionary histories. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 111, 16448–16453.
- Yu Y, Ristic N, Nakhleh L (2013) Fast algorithms and heuristics for phylogenomics under ILS and hybridization. *BMC Bioinformatics*, 14, 1–10.
- Yu Y, Than C, Degnan JH, Nakhleh L (2011) Coalescent histories on phylogenetic networks and detection of hybridization despite incomplete lineage sorting. *Systematic Biology*, 60, 138–149.
- Yu Y, Nakhleh L (2015) A maximum pseudo-likelihood approach for phylogenetic networks. *BMC Genomics*, 16, 1–10.
- Zhang LS, Dai JF, Gao Q, Liu H, Zhang H, Zhao W, Mao JF, Li Y (2012) Seedling adaptation of hybrid pine *Pinus densata* and its parental species in the high elevation habitat. *Journal of Beijing Forestry University*, 34(5), 15–24. (in Chinese with English abstract) [张立沙, 代剑峰, 高琼, 刘灏, 张华, 赵伟, 毛建丰, 李悦 (2012) 高山松与亲本种多种群在高海拔生境下的苗期适应性研究. *北京林业大学学报*, 34(5), 15–24.]
- Zeng LP, Zhang Q, Sun RR, Kong HZ, Zhang N, Ma H (2014) Resolution of deep angiosperm phylogeny using conserved nuclear genes and estimates of early divergence times. *Nature Communications*, 5, doi: 10.1038/ncomms5956.
- Zhao W, Meng JX, Wang BS, Zhang LS, Xu YL, Zeng QY, Li Y, Mao JF, Wang XR (2014) Weak crossability barrier but strong juvenile selection supports ecological speciation of the hybrid pine *Pinus densata* on the Tibetan Plateau. *Evolution*, 68, 3120–3133.
- Zheng XH, Lu F, Wang ZY, Zhong F, Hoover J, Mural R (2005) Using shared genomic synteny and shared protein functions to enhance the identification of orthologous gene pairs. *Bioinformatics*, 21, 703–710.

(责任编辑: 卢宝荣 责任编辑: 黄祥忠)

•综述•

# 表观遗传变异在植物杂交与多倍化过程中的作用

李霖锋<sup>1,2\*</sup> 刘 宝<sup>2</sup><sup>1</sup> (中山大学生命科学院, 广州 510275)<sup>2</sup> (东北师范大学分子表观遗传学教育部重点实验室, 长春 130024)

**摘要:** 杂交(hybridization)与多倍化(polyploidization)普遍存在于现存植物类群中, 并对物种形成(speciation)与多样化(diversification)起到了重要作用。在以往的研究中, 已有众多的学者分别从生态学、生理学与遗传学等角度对植物杂交与多倍化进行了广泛的探讨。本综述侧重于从进化生物学的角度探讨表观遗传变异在植物杂交与多倍化过程中所起到的作用, 并基于在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)和芸薹属物种(*Brassica* spp.)中已有的实例探讨表观遗传变异与表型革新(phenotypic novelty)的相关性。通过对已有研究的总结与展望, 我们建议将进化表观遗传学研究扩展到自然群体和多个近缘物种间比较的水平, 并同时需要改进从全基因组水平鉴定关键表观遗传变异的检测方法。

**关键词:** 表观遗传学; 表型革新; 多倍化; 物种形成; 杂交

## The roles of epigenetic variation in plant hybridization and polyploidization

Linfeng Li<sup>1,2\*</sup>, Bao Liu<sup>2</sup><sup>1</sup> College of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275<sup>2</sup> Key Laboratory of Molecular Epigenetics of the Ministry of Education (MOE), Northeast Normal University, Changchun 130024

**Abstract:** Hybridization and polyploidization are common phenomena in plants and play important roles in speciation and diversification of extant species. Previous studies using ecological, physiological and molecular investigations have provided a framework for understanding the underlying mechanisms of plant hybridization and polyploidization. In this review, we examine the roles of epigenetic variation in species evolution from an evolutionary perspective. We summarize recent advances in *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* and species of *Brassica* to elucidate the correlations between phenotypic novelty and epigenetic variation. Based on currently available observations, we propose that future studies should emphasize the roles of epigenetic variation at both the natural population and species levels, and that statistical methods need to be improved to identify causative epigenetic variations at the genome-wide level.

**Key words:** epigenetics; hybridization; phenotypic novelty; polyploidization; speciation

杂交(hybridization)是指具有一定遗传差异的群体或物种之间进行基因组融合的现象, 而多倍化(polyploidization)则主要是指基因组在原有的基础上进行染色体加倍的过程(Barton & Hewitt, 1985; Otto, 2007)。因此, 杂交与多倍化也可以解释为来源不同的基因组融合到同一个细胞内并进行染色体加倍的过程。据统计分析显示, 在现存的植物类群中有超过25%的物种是通过杂交与多倍化形成, 因

此同质杂交物种形成(homoploid hybrid speciation)与多倍化物种形成(polyploid speciation)是较为常见的物种形成方式(Mallet, 2007; Rieseberg & Willis, 2007; Soltis & Soltis, 2009; Abbott et al, 2013)。以小麦-山羊草复合体(*Aegilops-Triticum* complex)为例, 在已鉴定的31个物种中有18个是异源多倍体, 即在物种形成的过程中经历了杂交与多倍化事件(Zohary & Feldman, 1962; Gill & Friebe, 2002)。此外,

收稿日期: 2017-02-01; 接受日期: 2017-04-12

基金项目: 国家自然科学基金(31670382)

\* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: lilinfeng05@163.com

现存的5个祖先D基因组谱系(ancestral D genome lineage)的二倍体物种(*Ae. tauschii*, *Ae. searsii*, *Ae. bicornis*, *Ae. sharonensis*和*Ae. longissima*)也是A基因组谱系和B基因组谱系在5.5百万年前通过同倍体杂交物种形成(homoploid hybridization speciation)产生的(Marcussen et al, 2014; Li et al, 2015a, b)。

由上可知, 杂交与多倍化普遍发生于植物类群中, 并对物种的形成与多样化起到了重要的促进作用。在宏观水平, 由于细胞融合与染色体加倍可以在较短时间内促使大量新表型的产生, 因此高倍性的物种往往比其低倍性的亲本具有更强的适应能力(Doyle et al, 2008; Soltis & Soltis, 2009; Parisod et al, 2010; Soltis et al, 2010; Chao et al, 2013; Selmecki et al, 2015)。例如, Ramsey (2011)通过比对不同倍性的欧蓍草(*Achillea borealis*)对生境的适应能力, 发现六倍体欧蓍草对环境的适应性比四倍体强, 而且超过70%的适应性优势(fitness advantage)是在多倍化过程中即时产生。在分子水平, 近年来的研究进一步证实在杂交与多倍化过程中的基因组震荡(genomic shock)会诱导产生一系列的遗传与表观遗传变异, 如染色体重组(chromosomal rearrangement)、基因丢失(gene loss)、胞嘧啶甲基化(cytosine methylation)、组蛋白乙酰化(histone acetylation)和基因表达(gene expression)的改变(Doyle et al, 2008; Soltis & Soltis, 2009; Wendel et al, 2016)。这些被诱导产生的遗传与表观遗传变异可以直接或间接地促进表型的革新(phenotypic novelty), 以提高多倍体物种适应不同环境的能力(Ni et al, 2009; Soltis & Soltis, 2009; Song & Chen, 2015)。在本文中, 我们主要侧重于从进化生物学的角度探讨表观遗传变异在植物杂交与多倍化过程中的作用。

## 1 表观遗传学的概念

表观遗传学(Epigenetics)的概念最初是由Conrad H. Waddington于1942年提出的, 该单词的词根来源于希腊文“epigenesis”(Waddington, 1942)。亚里士多德最初使用epigenesis来描述生物体的发育过程, 即从未分化的胚胎经历持续不断地发育而最终分化形成各种类型的细胞与组织(Jablonka & Lamb, 2002; Holliday, 2006)。Waddington在此基础上将“epigenetics”定义为“各基因之间以及与其产物之间的相互作用共同促进表型的产生”(the causal

interactions between genes and their products which bring the phenotype into being) (Jablonka & Lamb, 2002)。换言之, 表观遗传变异主要是指独立于遗传变异(genetic variation)之外的一种可以影响生物发育的遗传信息。到了20世纪90年代, 随着对表观遗传机制的进一步了解, “the causal interactions”也随之改变为可以导致基因表达变化的“染色体修饰”(chromosomal modifications)。表观遗传学的定义也相应地修改为“无法用DNA序列变异解释, 但是可以通过有丝分裂和/或无丝分裂遗传的基因功能变异”(mitotically and/or meiotically heritable changes in gene functions that can not be explained by changes in DNA sequence) (Riggs & Porter, 1996)。到目前为止, 表观遗传变异主要包括核仁显性(nucleolar dominance)、组蛋白修饰(histone modification)、DNA甲基化(DNA methylation)、小分子RNA, 以及调控元件的顺式(cis)和反式(trans)作用等(Soltis & Soltis, 2009; Ge et al, 2013; Felsenfeld, 2014)。

## 2 表观遗传变异的进化观念

虽然表观遗传变异可以在生物体发育的过程中产生并能遗传给后代, 但其产生与消亡往往会受到外界作用力的影响, 从而出现类似于“用进废退”(use and disuse)的遗传现象, 这也使得表观遗传学研究对近达尔文主义(neo-Darwinian)产生了较大的冲击。根据近达尔文主义理论, 所有存在于群体中不同个体间的表型差异都是以小的连续的遗传变异为基础。基于此假设, 现代遗传学中的各个基本理论才得以形成与发展(Weiss, 2004)。但在实际情况中, 自然群体中往往存在大量相同的表型却无法用同一种遗传突变来解释, 例如糖尿病等人类的一些常见疾病(Goldstein, 2009; Feinberg & Irizarry, 2010)。因此有学者用基于“获得性遗传(inheritance of acquired traits)”理论的拉马克主义(Lamarckism)来解释表观遗传变异的进化机制(Jablonka & Lamb, 2002)。

从进化生物学的角度探讨表观遗传变异是属于拉马克式遗传还是近达尔文式遗传, 需要从以下3个方面进行阐述:

(1)表观遗传变异是否对物种的表型产生影响, 并可以稳定地遗传给后代。在植物类群中最经典的例子来自于柳穿鱼(*Linaria vulgaris*), 由于



*Linaria-like-CYCLOIDEA* (*Lcyc*)基因甲基化水平的改变导致了其花的形态从两侧对称转变成辐射对称,而这种甲基化水平的改变可以稳定地遗传给后代并最终导致了传粉者的改变(Cubas et al, 1999)。到目前为止,表观遗传变异对物种表型的可塑性及其遗传的稳定性已经被广泛地证实(Rakyan & Beck, 2006; Richards, 2006; Jablonka & Raz, 2009)。

(2)表观遗传变异产生的驱动力和维持机制。众所周知,拉马克主义认为物种进化的驱动力是“用进废退”,即某个性状的使用程度决定其进化速度,比如长颈鹿脖子长度的进化。相对而言,近达尔文主义则认为自然选择是物种进化的驱动力,突变只是随机产生的。以DNA甲基化为例,虽然部分位点的甲基化水平可能受到环境等外界因素的影响,但是全基因组水平的甲基化有其固定的维持机制。例如植物中的CG甲基化主要是由MET1维持,而CHG甲基化的维持则主要依靠CMT3。这种甲基化维持机制类似于遗传变异信息可以通过中心法则从父代传递于子代,因此表观遗传变异信息也是通过自身固有的机制进行维持与世代传递,只是表观遗传变异产生的速率要比遗传变异快。换言之,表观遗传变异是根据其自身的机制产生与维持,并同时受到外界因素的选择作用,而并非完全符合拉马克式遗传。

(3)表观遗传变异是否能影响物种水平或更高分类单元的表型发育,从而产生类似于遗传变异的Evo-Devo现象。Zemach等(2010)通过对17种真核动植物的全基因组甲基化进行分析发现,基因区(genic region)的甲基化在动植物之间非常保守,同时甲基化对限制转座子的活性也起到了关键作用。该研究间接地说明表观遗传变异在物种水平或者更高分类单元的进化过程中起到了一定作用,但具体的Evo-Devo实例还需要在将来的研究中进一步验证。

综上所述,表观遗传变异作为相对独立于中心法则之外的遗传体系,不仅可以直接影响单个生物个体的表型,也可以对物种表型的进化起到一定的作用。类似于朊病毒(prion virus)通过蛋白质直接传递遗传信息的分子机制,表观遗传变异也是对生物信息遗传中心法则的进一步补充。

### 3 表观遗传变异在杂交与多倍化过程中的作用

杂交与多倍化在一定程度上促进了现存植物

类群的基因组进化与物种多样化,而表观遗传变异作为最主要的遗传信息之一也在此过程中起到了一定的作用。本综述主要侧重于总结以往研究中对拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和水稻(*Oryza sativa*)等模式植物的研究成果,根据已有的实例从全基因组水平探讨表观遗传变异在植物杂交与多倍化过程中的作用。

#### 3.1 拟南芥

拟南芥属(*Arabidopsis*)是植物学研究的模式属(Bomblies & Madlung, 2014)。该属在进化的过程中经历了多次全基因组古多倍化(ancient whole genome duplication),并随后伴随着多次独立的物种间杂交与近期多倍化(recent whole genome duplication)事件。这些特征使得该属成为了研究杂交与多倍化过程中表观遗传变异产生与维持机制的理想材料(Bomblies & Madlung, 2014; del Pozo & Ramirez-Parra, 2015)。

为了探讨表观遗传变异的产生及其维持机制,Schmitz等(2011)和Becker等(2011)两个实验室各自从甲基化组(methylome)的角度对拟南芥DNA甲基化的产生与遗传机制进行了探讨。他们通过分析亲本与繁殖30代后的子代之间的甲基化变异发现,如同DNA序列中碱基突变所产生的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)一样,DNA甲基化在传代的过程中也会产生单甲基化多态性(single methylation polymorphism, SMP),并且在不同的子代个体间还会存在甲基化分化区域(differentially methylated region, DMR)。其中的一些SMP与DMR不仅能够稳定遗传,而且还能影响基因的表达以及植株体的形态。这些研究结果说明表观遗传变异在植物表型的产生与维持的过程中起到了一定作用。

在探讨表观遗传变异在植物杂交过程中的作用的研究中,最经典的例子来自于拟南芥的2个生态型C24和Ler之间所产生的杂交体系。例如,Groszmann等(2011)通过表型统计发现这2个生态型的杂交后代的生物量(biomass)比其亲本增加了250%。这2个拟南芥生态型之间的基因组序列比较接近,但在表观遗传变异水平存在一定的差别,这表明表观遗传变异可能是导致杂交后代表型变异的主要机制之一(Schneeberger et al, 2011)。该假设在随后的研究中被证实,即杂交后代中的表观遗传

变异主要产生在那些亲本之间存在差异的基因组区段, 其中CG甲基化比亲本有所增加, 而CHG甲基化却相对降低(Greaves et al, 2012)。在进一步的对比分析中发现, 导致杂交后代中甲基化水平改变的主要机制是反式染色体甲基化(trans chromosomal methylation)和反式染色体去甲基化(trans chromosomal demethylation) (Greaves et al, 2012), 这两种机制的共同作用使得杂交后代的其中一个亲本的拷贝的甲基化水平改变以接近另外一个亲本甲基化的水平。

此外, 基因区甲基化水平的改变和siRNA表达水平的变化存在相关性(Greaves et al, 2012; Shen et al, 2012)。与此类似, Lauss等(2016)将拟南芥Col-0野生型与其*ddm1-2*突变体进行了杂交, 并从全基因组的水平分析DNA甲基化对杂种优势形成的影响。通过分析叶片面积、植株高度和开花时间等多个表型性状与DNA甲基化差异区段(differentially methylated regions, DMRs)的相关性发现, 这些DMRs中有49个基因与开花时间、叶片面积和植株高度等表型性状相关。相对于DNA甲基化而言, 组蛋白修饰(histone modification)在拟南芥杂交后代中相对稳定一些(Moghaddam et al, 2011)。例如, 虽然生态型Col-0, C24和Cvi之间的杂交后代的H3K27me3的变异程度要比H2K4me2相对明显, 但它们在全基因组水平的染色质修饰(chromatin modifications)方面并未产生明显改变(Moghaddam et al, 2011)。这些研究结果显示, 表观遗传变异可以在杂交过程中产生, 并对杂交后代的表型变异起到一定的作用。

在拟南芥属的物种多倍化研究中, 对异源四倍体*A. suecica*和*A. kamchatica*的研究较为广泛。其中, *A. suecica*是通过二倍体物种*A. thaliana*和*A. arenosa*之间的异源四倍化形成, 而*A. kamchatica*则是通过二倍体物种*A. lyrata* ssp. *lyrata*和*A. halleri* ssp. *gemmifera*之间的异源四倍化形成(Bombliès & Madlung, 2014)。以异源四倍体*A. suecica*为例, 其对环境的适应性比二倍体亲本更强(Solhaug et al, 2016)。例如, 在弱光条件下四倍体物种*A. suecica*每单位叶绿素所固定的CO<sub>2</sub>的量比其二倍体亲本明显要高。Ni等(2009)通过研究发现四倍体产生这种优势的可能原因是其昼夜节律钟(circadian clock)相关基因的表观遗传修饰发生了改变。此外, 在杂交与多倍化的过程中所诱导产生的非加性表达变异

(nonadditive expression changes)也可能对四倍体表型革新起到一定的作用(Wang et al, 2006; Ng et al, 2012)。在该研究的基础上, Shi等(2015)将*A. thaliana*和*A. arenosa*进行异源四倍化获得了人工合成四倍体, 并通过分析基因表达与DNA甲基化和组蛋白修饰的相关性发现基因的拷贝数对其表达量存在较大影响。例如, 剂量补偿依赖型基因(dosage-dependent genes)一般都富集在细胞循环、光合作用和代谢等与植株的生长和发育相关的途径中, 而非剂量补偿依赖型基因(dosage-independent genes)则主要富集于生物胁迫和非生物胁迫等途径。为了验证基因组倍性增加对表型革新的影响, Matsushita等(2012)将二倍体*A. thaliana*与四倍体*A. suecica*进行了杂交与多倍化获得了异源六倍体。他们通过对从F<sub>1</sub>至F<sub>7</sub>杂交后代进行分析发现, 这些异源六倍体的表型分化比较快, 且其表型革新和细胞型变异(cytotypic variation)存在相关性, 但其潜在的遗传与表观遗传变异机制还有待进一步研究。

### 3.2 水稻

栽培水稻是单子叶植物的模式物种, 而其所在的稻属(*Oryza*)也是杂交与多倍化研究的模式属(Ge et al, 1999; Ammiraju et al, 2006)。栽培水稻包括*O. sativa* ssp. *japonica*和*O. sativa* ssp. *indica*两个亚种。由于这两个亚种之间可以杂交产生可育后代而成为杂交与多倍化研究的模式系统。He等(2010)通过对这两个亚种及其杂交后代进行转录组、甲基化组和小分子RNA分析发现, 杂交后代中两个亲本等位基因的表达量及其表观遗传修饰水平与其在亲本中的基因表达量和表观修饰成正相关。与此类似, Chodavarapu等(2012)也对这两个栽培水稻亚种及其杂交后代进行了甲基化组、转录组与小分子RNA分析。他们的研究发现这两个栽培水稻亚种间平均每253 bp存在一个SNP差异, 并且这些差异SNP基本都遗传给了杂交后代。相对而言, 两个亚种之间平均每15个胞嘧啶就有一个差异甲基化变异(differentially methylated variation)位点, 其中部分差异甲基化位点成簇地分布于两个亲本及其杂交后代的染色体上; 同时这些区段中的siRNA的数量也在两个亲本之间存在明显差异。这些研究结果说明两个栽培水稻亚种可以将遗传与表观遗传变异信息传递给杂交后代, 并最终导致其产生表型改变。

在水稻多倍体的研究中, Xu等(2014)将栽培水

稻两个亚种进行杂交与染色体加倍后获得了二倍体杂交后代及其异源四倍体。通过对比分析二倍体杂交后代、异源四倍体与其亲本之间的基因表达模式发现,亲本之间差异表达基因(differentially expressed gene)的数量在二倍体杂交后代中相对减少,但这些基因的表达模式在经历基因组加倍后变得更加复杂。这些结果说明杂交与多倍化可以改变亲本间同源基因的表达模式,并且杂交与多倍化的作用机制存在一定的差异,但其潜在的表观遗传机制还有待进一步研究。此外,Zhang等(2015)对栽培稻 *O. sativa* ssp. *indica* 进行同源四倍化,然后对二倍体亲本 *indica* 及其人工合成同源四倍体进行独立自交繁殖48代。通过对比分析二倍体与四倍体的转录组、甲基化组和siRNA发现,四倍体的转座子甲基化水平变异较大。例如,Class II DNA转座子的甲基化以CHH和CHG为主,而其甲基化水平和24-nt siRNA丰富度存在相关性,并可以抑制其附近基因的表达。

### 3.3 其他多倍体物种

除了拟南芥和水稻外,杂交与多倍化对植物表观遗传修饰的影响也在其他重要经济作物中被证实。以芸薹(*Brassica* spp.)为例,3个二倍体物种 *B. rapa* (AA)、*B. nigra* (BB)和 *B. oleracea* (CC)之间两两杂交与多倍化产生了3个四倍体物种 *B. juncea* (AABB)、*B. napus* (AACC)和 *B. carinata* (BBCC) (Nagaharu, 1935)。通过对比这些多倍体物种与其二倍体亲本之间的基因表达与表观遗传修饰差异发现,同源基因和小分子RNA的表达差异,以及DNA甲基化和组蛋白修饰等变异在多倍化初期就产生了,并可能对多倍体的杂种优势(heterosis)等重要性状的形成起到了重要作用(Xu et al, 2009; Ghani et al, 2014; Ran et al, 2016)。综上所述,通过对拟南芥、水稻和芸薹等物种的杂交与多倍化的研究发现,在基因组融合与加倍的过程中有大量的表观遗传变异被诱导产生,而其中部分的变异对表型的革新起到了重要作用。

## 4 研究展望

近年来随着表观遗传学研究的不断深入,表观遗传变异在植物杂交与多倍化过程中的作用也已经从多个角度得到了证实。但目前这些研究主要都集中在模式物种中,且部分结论是基于人工合成的

杂交与多倍体体系,表观遗传变异在自然条件下的杂交与多倍化过程中的作用还有待验证。鉴于这些原因,建议在将来的研究中从以下3个方面进行进一步探讨:

(1)群体(population)是物种进化的最基本单位,因此需要将研究对象从实验室的模式体系延伸到自然环境下的群体中。虽然已有的研究证实了表观遗传变异可以稳定地遗传给后代并导致表型革新的出现,但各表观遗传等位基因(epigenetic allele)在同一个自然群体内的频率分布模式(frequency distribution pattern)及其与群体适应生境的相关性还有待进一步探讨。例如,部分研究对拉关木(*Laguncularia racemosa*)和岳桦(*Betula ermanii*)的自然群体进行了探索性的分析,这些研究发现表观遗传变异与自然群体对不同生境的适应存在相关性(Lira-Medeiros et al, 2010; Wu et al, 2013)。因此在将来的研究中可以对自然杂交与多倍化类群进行类似的群体水平的分析,以探讨在基因组融合与染色体加倍的过程中所诱导产生的表观遗传变异对群体适应性表型的贡献。

(2)基于遗传变异的Evo-Devo从进化的角度解释了物种表型的形成与进化的分子机理,从而为进一步从宏观的水平理解物种的进化提供了证据。因此探讨表观遗传变异在杂交与多倍化过程中的作用时,也需要适当地将研究的对象延伸到物种之间的比较。例如,Paun等(2010)对3个异源四倍体兰花(*Dactylorhiza majalis* s. str, *D. traunsteineri* s.l.和 *D. ebudensis*)进行分析发现,基因组加倍过程中所产生的表观遗传变异对每个物种适应不同生境起到了重要作用。此外,我们通过对多倍体小麦基因表达的研究也发现,相对于其二倍体亲本而言,人工合成四倍体与自然四倍体的表型与基因表达模式都发生了改变,这为进一步从表观遗传学角度探讨其形成机理提供了理想的材料(Wang et al, 2016; Zhang et al, 2016)。

(3)从全基因组水平鉴定关键表观遗传变异的统计方法还有待改善。以DNA甲基化为例,每个位点的甲基化水平往往都是“数量性状”(quantitative character),而目前主要的鉴定方法是统计不同样本间的DMRs,暂时还没有其他能够将表型变异与表观遗传变异相关联的统计方法。相对而言,在鉴定遗传变异与表型相关性的研究中使用全基因

组关联分析(genome-wide association study)和数量性状基因座(quantitative trait loci)等。因此在将来鉴定表型相关的表观遗传变异的研究中也有待对统计方法进行改进。

总而言之,随着高通量测序等分子技术的快速发展,表观遗传学的研究或许将为我们理解物种的形成与进化开启另一扇窗户。

**致谢:** 感谢中国科学院华南植物园康明研究员在本文撰写过程中提出的宝贵建议。

## 参考文献

- Abbott R, Albach D, Ansell S, Arntzen J, Baird S, Bierne N, Boughman J, Brelsford A, Buerkle C, Buggs R (2013) Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, 26, 229–246.
- Ammiraju JS, Luo M, Goicoechea JL, Wang W, Kudrna D, Mueller C, Talag J, Kim H, Sisneros NB, Blackmon B (2006) The *Oryza* bacterial artificial chromosome library resource: construction and analysis of 12 deep-coverage large-insert BAC libraries that represent the 10 genome types of the genus *Oryza*. *Genome Research*, 16, 140–147.
- Barton NH, Hewitt GM (1985) Analysis of hybrid zones. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 58, 113–148.
- Becker C, Hagmann J, Müller J, Koenig D, Stegle O, Borgwardt K, Weigel D (2011) Spontaneous epigenetic variation in the *Arabidopsis thaliana* methylome. *Nature*, 480, 245–249.
- Bombliès K, Madlung A (2014) Polyploidy in the *Arabidopsis* genus. *Chromosome Research*, 22, 117–134.
- Chao DY, Dilkes B, Luo H, Douglas A, Yakubova E, Lahner B, Salt DE (2013) Polyploids exhibit higher potassium uptake and salinity tolerance in *Arabidopsis*. *Science*, 341, 658–659.
- Chodavarapu RK, Feng S, Ding B, Simon SA, Lopez D, Jia Y, Wang GL, Meyers BC, Jacobsen SE, Pellegrini M (2012) Transcriptome and methylome interactions in rice hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 109, 12040–12045.
- Cubas P, Vincent C, Coen E (1999) An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. *Nature*, 401, 157–161.
- del Pozo JC, Ramirez-Parra E (2015) Whole genome duplications in plants: an overview from *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 66, 6991–7003.
- Doyle JJ, Flagel LE, Paterson AH, Rapp RA, Soltis DE, Soltis PS, Wendel JF (2008) Evolutionary genetics of genome merger and doubling in plants. *Annual Review of Genetics*, 42, 443–461.
- Feinberg AP, Irizarry RA (2010) Stochastic epigenetic variation as a driving force of development, evolutionary adaptation, and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 107, 1757–1764.
- Felsenfeld G (2014) A brief history of epigenetics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6, a018200.
- Ge S, Sang T, Lu BR, Hong DY (1999) Phylogeny of rice genomes with emphasis on origins of allotetraploid species. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 96, 14400–14405.
- Ge XH, Ding L, Li ZY (2013) Nucleolar dominance and different genome behaviors in hybrids and allopolyploids. *Plant Cell Reports*, 32, 1661–1673.
- Ghani MA, Li J, Rao L, Raza MA, Cao L, Yu N, Zou X, Chen L (2014) The role of small RNAs in wide hybridisation and allopolyploidisation between *Brassica rapa* and *Brassica nigra*. *BMC Plant Biology*, 14, 272.
- Gill BS, Friebe B (2002) Cytogenetics, phylogeny and evolution of cultivated wheats. In: *FAO Plant Production and Protection Series No. 30: Bread Wheat: Improvement and Production* (eds Curtis BC, Rajaram S, Macpherson HG), pp. 71–88. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Goldstein DB (2009) Common genetic variation and human traits. *New England Journal of Medicine*, 360, 1696.
- Greaves IK, Groszmann M, Ying H, Taylor JM, Peacock WJ, Dennis ES (2012) Trans chromosomal methylation in *Arabidopsis* hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 109, 3570–3575.
- Groszmann M, Greaves IK, Albertyn ZI, Scofield GN, Peacock WJ, Dennis ES (2011) Changes in 24-nt siRNA levels in *Arabidopsis* hybrids suggest an epigenetic contribution to hybrid vigor. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 108, 2617–2622.
- He G, Zhu X, Elling AA, Chen L, Wang X, Guo L, Liang M, He H, Zhang H, Chen F (2010) Global epigenetic and transcriptional trends among two rice subspecies and their reciprocal hybrids. *The Plant Cell*, 22, 17–33.
- Holliday R (2006) Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics*, 1, 76–80.
- Jablonka E, Lamb MJ (2002) The changing concept of epigenetics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 981, 82–96.
- Jablonka E, Raz G (2009) Transgenerational epigenetic inheritance: prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution. *The Quarterly Review of Biology*, 84, 131–176.
- Lauss K, Wardenaar R, van Hulten MH, Guryev V, Keurentjes JJ, Stam M, Johannes F (2016) Epigenetic divergence is sufficient to trigger heterosis in *Arabidopsis thaliana*. *bioRxiv*. doi: <http://doi.org/10.1101/059980>.
- Li LF, Liu B, Olsen KM, Wendel JF (2015a) Multiple rounds of ancient and recent hybridizations have occurred within the *Aegilops-Triticum* complex. *New Phytologist*, 208,

- 11–12.
- Li LF, Liu B, Olsen KM, Wendel JF (2015b) A re-evaluation of the homoploid hybrid origin of *Aegilops tauschii*, the donor of the wheat D-subgenome. *New Phytologist*, 208, 4–8.
- Lira-Medeiros CF, Parisod C, Fernandes RA, Mata CS, Cardoso MA, Ferreira PCG (2010) Epigenetic variation in mangrove plants occurring in contrasting natural environment. *PLoS ONE*, 5, e10326.
- Mallet J (2007) Hybrid speciation. *Nature*, 446, 279–283.
- Marcussen T, Sandve SR, Heier L, Spannagl M, Pfeifer M, Jakobsen KS, Wulff BB, Steuernagel B, Mayer KF, Olsen OA (2014) Ancient hybridizations among the ancestral genomes of bread wheat. *Science*, 345, 1250092.
- Matsushita SC, Tyagi AP, Thornton GM, Pires JC, Madlung A (2012) Allopolyploidization lays the foundation for evolution of distinct populations: evidence from analysis of synthetic *Arabidopsis* allohexaploids. *Genetics*, 191, 535–547.
- Moghaddam AMB, Roudier F, Seifert M, Bérard C, Magniette MLM, Ashtiyani RK, Houben A, Colot V, Mette MF (2011) Additive inheritance of histone modifications in *Arabidopsis thaliana* intra-specific hybrids. *The Plant Journal*, 67, 691–700.
- Nagaharu U (1935) Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *The Journal of Japanese Botany* 7, 389–452.
- Ng DW, Zhang C, Miller M, Shen Z, Briggs S, Chen Z (2012) Proteomic divergence in *Arabidopsis* autopolyploids and allopolyploids and their progenitors. *Heredity*, 108, 419–430.
- Ni Z, Kim ED, Ha M, Lackey E, Liu J, Zhang Y, Sun Q, Chen ZJ (2009) Altered circadian rhythms regulate growth vigour in hybrids and allopolyploids. *Nature*, 457, 327–331.
- Otto SP (2007) The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell*, 131, 452–462.
- Parisod C, Holderegger R, Brochmann C (2010) Evolutionary consequences of autopolyploidy. *New Phytologist*, 186, 5–17.
- Paun O, Bateman RM, Fay MF, Hedrén M, Civeyrel L, Chase MW (2010) Stable epigenetic effects impact adaptation in allopolyploid orchids (Dactylorhiza: Orchidaceae). *Molecular Biology and Evolution*, 27, 2465–2473.
- Rakyan VK, Beck S (2006) Epigenetic variation and inheritance in mammals. *Current Opinion in Genetics & Development*, 16, 573–577.
- Ramsey J (2011) Polyploidy and ecological adaptation in wild yarrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 108, 7096–7101.
- Ran LP, Fang TT, Hao R, Jiang JJ, Fang YJ, Wang YP (2016) Analysis of cytosine methylation in early generations of re-synthesized *Brassica napus*. *Journal of Integrative Agriculture*, 15, 1228–1238.
- Richards EJ (2006) Inherited epigenetic variation—revisiting soft inheritance. *Nature Reviews Genetics*, 7, 395–401.
- Rieseberg LH, Willis JH (2007) Plant speciation. *Science*, 317, 910–914.
- Riggs AD, Porter TN (1996) Overview of epigenetic mechanisms. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*, 32, 29–45.
- Schmitz RJ, Schultz MD, Lewsey MG, O'Malley RC, Urlich MA, Libiger O, Schork NJ, Ecker JR (2011) Transgenerational epigenetic instability is a source of novel methylation variants. *Science*, 334, 369–373.
- Schneeberger K, Ossowski S, Ott F, Klein JD, Wang X, Lanz C, Smith LM, Cao J, Fitz J, Warthmann N (2011) Reference-guided assembly of four diverse *Arabidopsis thaliana* genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 108, 10249–10254.
- Selmecki AM, Maruvka YE, Richmond PA, Guillet M, Shores N, Sorenson AL, De S, Kishony R, Michor F, Dowell R (2015) Polyploidy can drive rapid adaptation in yeast. *Nature*, 519, 349–352.
- Shen H, He H, Li J, Chen W, Wang X, Guo L, Peng Z, He G, Zhong S, Qi Y (2012) Genome-wide analysis of DNA methylation and gene expression changes in two *Arabidopsis* ecotypes and their reciprocal hybrids. *The Plant Cell*, 24, 875–892.
- Shi X, Zhang C, Ko DK, Chen ZJ (2015) Genome-wide dosage-dependent and -independent regulation contributes to gene expression and evolutionary novelty in plant polyploids. *Molecular Biology and Evolution*, 32, 2351–2366.
- Solhaug EM, Ihinger J, Jost M, Gamboa V, Marchant B, Bradford D, Doerge RW, Tyagi A, Replogle A, Madlung A (2016) Environmental regulation of heterosis in the allopolyploid *Arabidopsis suecica*. *Plant Physiology*, 170, 2251–2263.
- Soltis DE, Buggs RJ, Doyle JJ, Soltis PS (2010) What we still don't know about polyploidy. *Taxon*, 59, 1387–1403.
- Soltis PS, Soltis DE (2009) The role of hybridization in plant speciation. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 561–588.
- Song Q, Chen ZJ (2015) Epigenetic and developmental regulation in plant polyploids. *Current Opinion in Plant Biology*, 24, 101–109.
- Waddington CH (1942) Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature*, 150, 563–565.
- Wang J, Tian L, Lee HS, Wei NE, Jiang H, Watson B, Madlung A, Osborn TC, Doerge R, Comai L (2006) Genomewide nonadditive gene regulation in *Arabidopsis* allotetraploids. *Genetics*, 172, 507–517.
- Wang X, Zhang H, Li Y, Zhang Z, Li L, Liu B (2016) Transcriptome asymmetry in synthetic and natural allotetraploid wheats, revealed by RNA-sequencing. *New Phytologist*, 209, 1264–1277.
- Weiss KM (2004) The smallest grain in the balance. *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews*, 13, 122–126.
- Wendel JF, Jackson SA, Meyers BC, Wing RA (2016) Evolution of plant genome architecture. *Genome Biology*, 17, 1.
- Wu W, Yi MR, Wang X, Ma L, Jiang L, Li X, Xiao H, Sun M, Li L, Liu B (2013) Genetic and epigenetic differentiation

- between natural *Betula ermanii* (Betulaceae) populations inhabiting contrasting habitats. *Tree Genetics & Genomes*, 9, 1321–1328.
- Xu C, Bai Y, Lin X, Zhao N, Hu L, Gong Z, Wendel JF, Liu B (2014) Genome-wide disruption of gene expression in allopolyploids but not hybrids of rice subspecies. *Molecular Biology and Evolution*, 31, 1066–1076.
- Xu Y, Zhong L, Wu X, Fang X, Wang J (2009) Rapid alterations of gene expression and cytosine methylation in newly synthesized *Brassica napus* allopolyploids. *Planta*, 229, 471–483.
- Zemach A, McDaniel IE, Silva P, Zilberman D (2010) Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science*, 328, 916–919.
- Zhang HK, Gou XW, Zhang A, Wang XT, Zhao N, Dong YZ, Li LF, Liu B (2016) Transcriptome shock invokes disruption of parental expression-conserved genes in tetraploid wheat. *Scientific Reports*, 6, 26363.
- Zhang J, Liu Y, Xia EH, Yao QY, Liu XD, Gao LZ (2015) Autotetraploid rice methylome analysis reveals methylation variation of transposable elements and their effects on gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 112, E7022–E7029.
- Zohary D, Feldman M (1962) Hybridization between amphidiploids and the evolution of polyploids in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group. *Evolution*, 16, 44–61.

(责任编辑: 郭亚龙 责任编辑: 时意专)

•研究报告•

# 同域分布共享传粉者的鼠尾草属植物的生殖隔离

魏宇昆\* 黄艳波 李桂彬

(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)

**摘要:** 生殖隔离是生物多样性产生的重要原因之一, 不同物种间的生殖隔离形成阶段、方式和强度不完全相同。为了揭示生殖隔离在鼠尾草属(*Salvia*)物种多样性产生和维持过程中的作用和特点, 本文研究了浙江天目山同域分布的舌瓣鼠尾草(*S. liguliloba*)和南丹参(*S. bowleyana*)的开花、传粉和生殖隔离, 利用人工授粉和杂交实验检测它们的种间遗传相容程度。结果表明, 在花的形态结构、花及花序的生长、着生方式与数量特征上, 2种鼠尾草属植物均差异显著( $P < 0.05$ )。2种鼠尾草属植物共享同一种有效传粉昆虫——三条熊蜂(*Bombus trifasciatus*), 但通过访花行为的显著差异和明显不同的花粉落置部位, 有效避免了异源花粉干扰。人工杂交授粉的结果表明2个物种间遗传相容性较高, 互为亲本的杂交结实率分别达到 $77.8 \pm 10.7\%$ 和 $78.7 \pm 11.2\%$ 。我们的研究表明, 同域分布、花期重叠且共享唯一传粉者的2种鼠尾草属植物, 以花部的传粉结构和传粉部位的差异, 产生了较高度度的传粉前生殖隔离, 避免了物种间的异源花粉干扰和自然杂交, 保障各自较高的繁殖成效, 以维持自然种群的多样性和遗传结构的稳定。

**关键词:** 机械隔离; 遗传相容性; 物种多样性; 自然杂交; 三条熊蜂

## Reproductive isolation in sympatric *Salvia* species sharing a sole pollinator

Yukun Wei\*, Yanbo Huang, Guibin Li

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

**Abstract:** Reproductive isolation (RI) is one of the key factors for speciation and diversity maintenance, however, there are differences in formation stage, means, and strength of RI for different species. To assess the effects and the significance of reproductive isolation in *Salvia* species, we compared flowering, pollination, and reproduction characteristics of *Salvia liguliloba* and *S. bowleyana*, which grow sympatrically and have overlapping flowering periods in the Tianmu Mountain, Zhejiang. Furthermore, artificial hybridization between the two species were conducted to estimate and understand their genetic compatibility and reproductive isolation. Results indicated that the two *Salvia* species considerably differed in their flower morphological structures, inflorescence organization, and the number of flowers produced per inflorescence. *Bombus trifasciatus* is the sole pollinator for these two species during the overlapping flowering period. However, different visitation behavior and floral structure ( $P < 0.05$ ) leads to obviously different pollination patterns between the two species. Pollen is deposited on distinctly separate areas of the pollinator's body in a manner precluding contact with any heterospecific *Salvia* stigmata. Under natural condition, the two species are equally successful in reproduction (natural seed set  $> 87\%$ ). Artificial pollination and hybridization experiments between these two species showed that they have a higher genetic compatibility. The cross seed sets are  $77.8 \pm 10.7\%$  and  $78.7 \pm 11.2\%$  when the two species are reciprocally cross parents. Our research suggests that for the two *Salvia* species lacking genetic incompatibility systems and relying on pollinators for outcrossing, there are differences in floral structures and pollen placement sites. The mechanical isolation (a form of pre-pollination RI) prevents heterospecific pollen interference and natural hybridization of the two

收稿日期: 2017-05-27; 接受日期: 2017-06-21

基金项目: 上海市绿化和市容管理局资助项目(G162408, G172410)

\* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: ykwei@sibs.ac.cn



different species that grow sympatrically and have overlapping flowering periods, and also maintains species diversity and the constancy of species heredity.

**Key words:** mechanical isolation; genetic compatibility; species diversity; natural hybridization; *Bombus trifasciatus*

生殖隔离是物种形成和多样性产生的重要机制(Widmer et al, 2009; Baack et al, 2015), 也是避免物种自然杂交不利因素的重要途径。根据植物繁殖过程中隔离机制产生的阶段, 可将生殖隔离分为传粉前(pre-pollination)和传粉后(post-pollination)。传粉前隔离主要包括物种间的生态位分化(如地理隔离)、表型隔离(如物候花期不同、花传粉结构的差异等)和传粉者特化(物种间花粉干扰减少); 传粉后隔离包括不同来源花粉与柱头的竞争、杂交不亲和、杂交种子产量、活力以及 $F_1$ 代幼苗适应能力降低等(Melo et al, 2014; Baack et al, 2015; Ma et al, 2016a)。不同物种的生殖隔离机制有所不同。对于同域分布物种而言, 花结构表型相似的物种对传粉者的竞争在被子植物花结构多样性分化中具有重要作用(Kipling & Warren, 2013)。

鼠尾草属(*Salvia*)的物种丰富度很高, 分布较为广泛(魏宇昆等, 2015)。前期的研究表明鼠尾草属植物存在普遍的同域物种分布现象, 这可能与其花部结构和繁育系统的多样性密切相关(黄艳波等, 2014, 2015), 但是对鼠尾草属植物传粉和生殖隔离的研究有限。同域分布的多个鼠尾草属物种生殖隔离主要通过生态位分化、物候差异和传粉者特化等几种方式, 物种间的遗传不相容性非常低(Claßen-Bockhoff et al, 2004), 这说明传粉后隔离的程度很弱, 物种多样性的维持可能更多地取决于花的表型变化与传粉者, 以及不同类型的传粉前隔离等综合的生殖隔离机制。然而, 目前我们对鼠尾草属植物的传粉前隔离现象仍然了解不多, 对其隔离机制以及传粉者与植物的相互关系、生殖隔离对鼠尾草属物种多样性的维持作用认识不够。另一方面, 鼠尾草属植物普遍的同域物种分布现象(Claßen-Bockhoff et al, 2004)很可能会导致较高的自然杂交概率(Epling, 1947; Meyn & Emboden, 1987), 种间杂交和生殖隔离如何维持动态平衡以保持物种多样性的稳定, 它们与物种形成和演化关系等问题的阐明, 都需要对物种繁育系统和传粉生态学的深入了解和认识(Claßen-Bockhoff et al, 2003)。基于此, 本研

究以同域分布的2种鼠尾草属植物舌瓣鼠尾草(*Salvia liguliloba*)和南丹参(*S. bowleyana*)为研究对象, 研究比较2种植物的开花、传粉特征和繁殖; 通过人工杂交实验了解2个物种的遗传相容程度和杂交结实率, 以期能够认识2个物种的生殖隔离方式和强度, 为阐明鼠尾草属的物种多样性形成和维持机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 样地选择和研究对象

样地位于浙江省天目山国家级自然保护区内(30°23'29.60" N, 119°29'01.77" E, 海拔677 m), 气候类型属北亚热带季风性气候, 植物区系的温带、亚热带东亚区系成分特征显著(杨逢春, 1992)。选择舌瓣鼠尾草和南丹参的天然混生群落为研究样地。将分布在样地内的植株移植到相邻的2个样方中, 组成个体数量相等的2个居群(各50株), 以利于在相同的条件下观察记录传粉昆虫的传粉行为和访花特征。研究的舌瓣鼠尾草为1–2年生草本植物, 天目山–黄山区系特有物种, 株高30–70 cm, 植株单一或偶有分枝, 以基生叶为主, 2–4对茎生叶; 南丹参为多年生草本植物, 广布于长江以南地区, 株高50–70 cm, 秋冬季以基生叶为主, 花果期主要为茎生叶, 分枝较多。2种植物在保护区内较多见, 常于林下、路边等生境形成优势种群; 物候特征基本相同, 花期为5月中旬至6月中旬, 果期从5月下旬开始, 6月初陆续进入成熟期。

### 1.2 花部结构测量统计

植物的花结构形态、组成和开花方式对传粉者行为有显著的影响, 因此我们对2种鼠尾草的花部结构形态、组成和开花方式做了测量和统计。随机选取样方内6个不同植株上完全开放的12朵小花, 用电子游标卡尺对各花部结构性状如花冠长、花冠宽、花冠高、冠筒长、冠口高、冠筒口高、冠筒口宽、花丝长、药隔长、雌蕊长等10个指标进行测量, 具体方法参考黄艳波等(2015)。鼠尾草属的花序由2个聚伞花序为基本单位, 组成2至多花的轮伞花序,

再由多个轮伞花序组成顶生假总状花序,或组成2个以上分枝的顶生假圆锥花序。属内不同鼠尾草的花序多样性表现在组成聚伞花序基本单位的小花数量、轮伞花序数和花序总数等。我们对2种鼠尾草花器官的不同生长方式、数量和开花特征进行统计,包括单株花序总数、单花序侧生分枝数、单一分枝的轮伞花序数、轮伞花序小花总数、轮伞花序同时开放小花数、单株总花数和单株总开花数。

### 1.3 传粉和杂交实验

利用SONY数码摄录机(HDR-CX510E)记录样方内2种鼠尾草属植物单株的昆虫访花情况。在天气晴好的情况下,从8:00–18:00进行不间断录像,记录访花昆虫和访花时间,鉴定昆虫的种类,统计昆虫的数量和访花次数,重复录制3天。统计分析有效传粉昆虫对2种植物的访花相对频次(relative frequency,  $F$ )、单花访花时间、活跃度(activity rate,  $AR$ )和访花频率。活跃度以单只昆虫每分钟的访问花朵数量表示,代表了此种昆虫对某一种植物花的偏好程度和传粉潜力;访花频率用指数 $I_{VR} = F \times AR$ 表示,表示单株植物的昆虫访花频率,该指数同时考虑了昆虫的活跃度及其访花相对频次(黄艳波等, 2015)。

本研究对2种鼠尾草分别进行异交、自交和种间杂交的人工授粉实验,对比分析3种处理下的植株结实率,了解2个物种的繁育系统,验证生殖隔

离的方式和程度。对舌瓣鼠尾草和南丹参各15株分别进行异株异花授粉和同株异花授粉实验,杂交实验以舌瓣鼠尾草和南丹参交互作为父本和母本进行人工授粉,2种杂交组合各重复5株。作为父本的鼠尾草取花药刚开裂时的具较高活力的花粉,母本的材料作去雄处理,待雌蕊成熟后进行人工授粉,对于选取进行授粉实验的花序,在开花前至结实的过程中作套袋处理,避免传粉昆虫干扰。结实率计算待果实完全成熟后进行,根据整株植物的总花朵数和小坚果总数计算结实率,方法如下:结实率(%) = 小坚果总数/总胚珠数  $\times 100$ 。最后采用SPSS 21和Excel 2016对各组数据进行统计学和差异显著性分析。

## 2 结果

### 2.1 花部结构和开花特征

对花部结构的测量结果表明,2种鼠尾草形态特征差异显著(图1)。舌瓣鼠尾草花冠颜色由白色过渡至浅粉色,药隔上臂较其他部分的颜色更深;而南丹参花冠整体浅黄色具紫色斑点,其下唇和雄蕊下臂顶端为显著的紫红色。舌瓣鼠尾草整体形态呈细长筒形,花冠水平直伸,冠口部略大,高与宽近乎相等,浅黄色花药紧贴上层;而南丹参冠筒细窄至冠口显著开张,其整体形态呈镰刀状,花冠高远大于宽,花药完全内藏于两侧紧密折合的上唇之内。从花形态结构测定指标可以看出,2种鼠尾草除

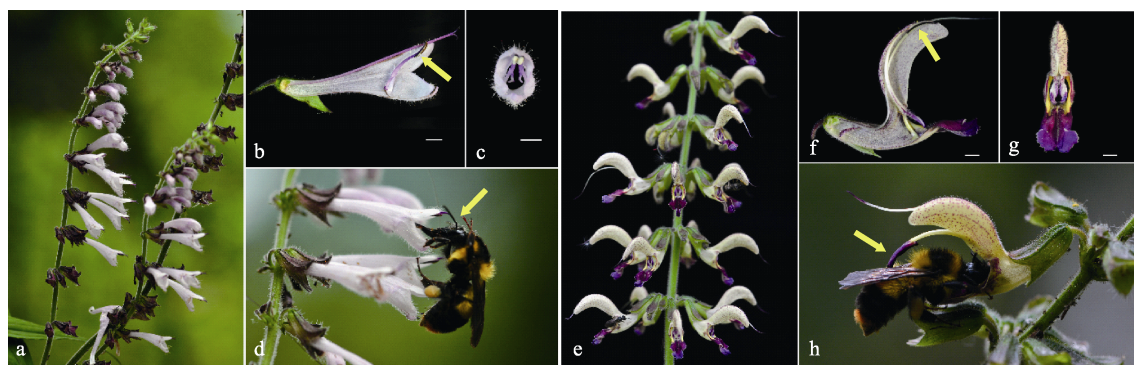


图1 舌瓣鼠尾草和南丹参的花序、花结构及昆虫传粉特征(图中标尺均为2 mm)。(a)舌瓣鼠尾草花序;(b)舌瓣鼠尾草花冠纵切(箭头所示为雄蕊花药);(c)舌瓣鼠尾草花正面观;(d)三条熊蜂访问舌瓣鼠尾草及其传粉过程(箭头所示为传粉部位);(e)南丹参花序;(f)南丹参花冠纵切(箭头所示为雄蕊花药);(g)南丹参花正面观;(h)三条熊蜂访问南丹参及其传粉过程(箭头所示为传粉部位)。

Fig. 1 Comparison of inflorescences, flower structures, and insect pollinations of *Salvia liguliloba* and *S. bowleyana* (Bar = 2 mm). (a) Inflorescences of *S. liguliloba*; (b) Flower lateral dissection of *S. liguliloba* (the arrow indicates anther); (c) A front view of *S. liguliloba* flower; (d) *Bombus trifasciatus* is visiting flowers and pollinating *S. liguliloba* (the arrow indicates pollen placement sites on bumblebee); (e) Inflorescences of *S. bowleyana*; (f) Flower lateral dissection of *S. bowleyana* (the arrow indicates anther); (g) A front view of *S. bowleyana* flower; (h) *Bombus trifasciatus* is visiting flowers and pollinating *S. bowleyana* (the arrow indicates pollen placement sites on bumblebee).

表1 舌瓣鼠尾草与南丹参的花部结构比较(平均值 ± 标准差)  
Table 1 Comparison of flower structures between *Salvia liguliloba* and *S. bowleyana* (mean ± SD)

	花冠长 Corolla length	花冠宽 Corolla width	花冠高 Corolla height	冠筒长 Tube length	冠口高 Entrance height	冠筒口高 Tube entra- nce height	冠筒口宽 Tube entra- nce width	花丝长 Filament length	药隔长 Connective length	雌蕊长 Pistil length
舌瓣鼠尾草 <i>S. liguliloba</i>	23.7 ± 0.74 <sup>a</sup>	5.31 ± 0.34 <sup>a</sup>	7.30 ± 0.67 <sup>b</sup>	19.5 ± 0.8 <sup>a</sup>	4.87 ± 0.61 <sup>b</sup>	4.87 ± 0.61 <sup>a</sup>	4.41 ± 0.52 <sup>a</sup>	2.39 ± 0.14 <sup>b</sup>	5.19 ± 0.33 <sup>b</sup>	23.7 ± 0.43 <sup>b</sup>
南丹参 <i>S. bowleyana</i>	22.8 ± 1.10 <sup>b</sup>	4.47 ± 0.26 <sup>b</sup>	16.6 ± 0.94 <sup>a</sup>	12.4 ± 0.76 <sup>b</sup>	11.2 ± 0.80 <sup>a</sup>	4.47 ± 0.28 <sup>a</sup>	3.21 ± 0.23 <sup>b</sup>	4.30 ± 0.26 <sup>a</sup>	14.3 ± 0.68 <sup>a</sup>	26.1 ± 1.85 <sup>a</sup>
<i>P</i>	0.0407	0.000	0.000	0.000	0.000	0.0585	0.000	0.000	0.000	0.0011

统计分析使用 $t$ -检验, 同一列不同字母代表差异显著( $P < 0.05$ )。The different letters for the same column indicate significant difference at the level of  $P < 0.05$  by  $t$ -test.

表2 舌瓣鼠尾草和南丹参花及花序数量特征(平均值 ± 标准差)  
Table 2 Comparisons of flowering and inflorescence between *Salvia liguliloba* and *S. bowleyana* (mean ± SD)

	单株花序总数 No. of infloresce- nce in individual plant	假圆锥花序 分枝数 No. of branch in a false panicle	假总状花序的 轮伞花序数 No. of verticillaster in a false raceme	轮伞花序小 花总数 No. of flower in a verticillaster	轮伞花序同时 开放小花数 No. of flowering in a verticillaster	单株总花数 Total no. of flower in individual plant	单株总开花数 Total no. of flowering in individual plant
舌瓣鼠尾草 <i>S. liguliloba</i>	2.0±2.1 <sup>a</sup> (n = 35)	2.0±1.9 <sup>b</sup> (n = 39)	9.3±2.4 <sup>a</sup> (n = 83)	5.6±1.1 <sup>b</sup> (n = 93)	1.4±1.7 <sup>b</sup> (n = 234)	262±299 <sup>b</sup> (n = 26)	21±30 <sup>a</sup> (n = 36)
南丹参 <i>S. bowleyana</i>	2.2±0.45 <sup>a</sup> (n = 5)	5.8±3.0 <sup>a</sup> (n = 11)	9.5±1.9 <sup>a</sup> (n = 40)	9.8±1.9 <sup>a</sup> (n = 160)	1.8±1.0 <sup>a</sup> (n = 160)	891±472 <sup>a</sup> (n = 5)	48±56 <sup>a</sup> (n = 16)
<i>P</i>	0.681	0.0020	0.7166	0.000	0.0053	0.0005	0.089

统计分析使用 $t$ -检验, 同一列不同字母代表差异显著( $P < 0.05$ )。Different letters for the same column indicate significant difference at the level of  $P < 0.05$  by  $t$ -test.

了冠筒口高外, 其他各项指标均差异显著( $P < 0.05$ ) (表1), 舌瓣鼠尾草的花冠长、花冠宽、冠筒长、冠筒口宽显著大于南丹参, 而南丹参的花冠高、冠口高、花丝长、药隔长和雌蕊长则显著大于舌瓣鼠尾草, 其中两者的药隔长度差异极显著( $P < 0.01$ )。

本研究的2种鼠尾草在花部着生和排列方式, 以及单株的花朵和开花数量上都有所不同(表2)。统计结果表明, 南丹参的假圆锥花序分枝数、轮伞花序小花总数、轮伞花序同时开放小花数和单株总花数均明显多于舌瓣鼠尾草( $P < 0.05$ )。而单株花序总数和假总状花序的轮伞花序数2种植物并没有显著差异, 尽管南丹参的单株总开花数要多于舌瓣鼠尾草, 但两者差异并不显著。总体而言在单株水平上, 南丹参的花器官组成较舌瓣鼠尾草更复杂, 花朵数量更多, 可能会影响传粉昆虫对2种植物的传粉行为。

2.2 2种鼠尾草的传粉机制比较

植物的传粉机制与其花形态结构和传粉者的行为密切相关。我们的观察结果表明, 样地中的舌瓣鼠尾草与南丹参共享一种有效传粉昆虫即三条熊蜂(*Bombus trifasciatus*)来完成各自的授粉。从传粉过程来看, 南丹参为经典的背部杠杆传粉机制,

传粉昆虫三条熊蜂落至花冠下唇后进入冠筒吸食花蜜, 在此过程中推动雄蕊药隔下臂向内运动的同时, 药隔上臂的花药向下运动, 雄蕊花丝与药隔连接部分具有一个可往复运动的“轴”, 该结构使得传粉昆虫进出冠筒时, 药隔能够稳定、准确地将花药的花粉涂抹于三条熊蜂的背部, 当昆虫退出花冠后雄蕊又能恢复到最初的位置。南丹参精确传粉的关键在于其结构特化的雄蕊和与其相适应的花冠形态, 如显著伸长的雄蕊上臂, 可运动的“轴”以及两侧折合呈镰刀状的上唇, 保证了传粉时雄蕊以杠杆方式运动, 非传粉时上唇对花药的保护; 2个雄蕊药隔下臂的退化花药联合形成的衍生组织和较窄的花冠口宽度, 使得传粉昆虫进入冠筒时必须推动下臂才能够获取花蜜, 保证了传粉的专一性和稳定性。

舌瓣鼠尾草则采用了完全不同的传粉模式, 表现在传粉昆虫进入花部的方式和传粉部位与南丹参完全不同, 而这些均缘于舌瓣鼠尾草特有的雄蕊结构和相应的花冠形态。舌瓣鼠尾草花部整体较小, 上下唇均较短且无明显区别, 相应的雄蕊花丝和药隔也明显比南丹参短。三条熊蜂取食花蜜时无法落

表3 三条熊蜂对2种鼠尾草的访花行为比较(平均值 ± 标准差)  
Table 3 Comparisons of flower visiting behavior of *Bombus trifasciatus* between *Salvia liguliloba* and *S. bowleyana* (mean ± SD)

	相对频次 Relative frequency	单花访问时间 Visit time per flower (s)	活跃度 Activity rate	访花频率 Visitation rate
舌瓣鼠尾草 <i>S. liguliloba</i>	0.14 ± 0.017 <sup>b</sup> (n = 3)	2.01 ± 0.85 <sup>a</sup> (n = 30)	9.71 ± 3.15 <sup>b</sup> (n = 7)	1.36 ± 0.17 <sup>b</sup> (n = 3)
南丹参 <i>S. bowleyana</i>	0.86 ± 0.017 <sup>a</sup> (n = 3)	1.80 ± 0.63 <sup>a</sup> (n = 30)	16.2 ± 3.4 <sup>a</sup> (n = 52)	13.9 ± 0.28 <sup>a</sup> (n = 3)
<i>P</i>	0.000	0.2758	0.000	0.000

统计分析使用*t*-检验, 同一列不同字母代表差异显著( $P < 0.05$ )。The different letters for the same column indicate significant difference at the level of  $P < 0.05$  by *t*-test.

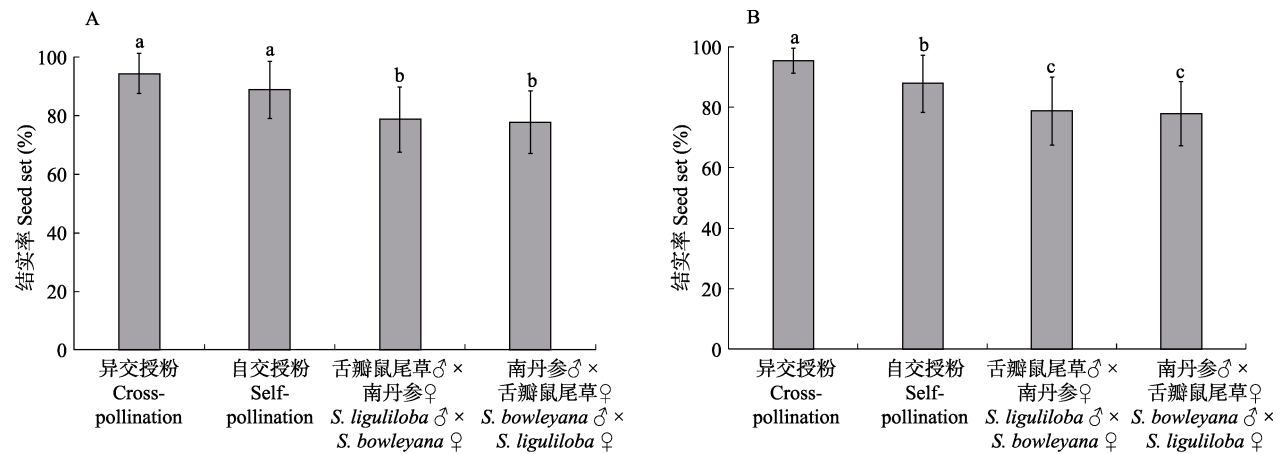


图2 2种鼠尾草的种内异交、自交和种间杂交结实率比较(平均值 ± 标准差)。(A)舌瓣鼠尾草异交、自交以及与南丹参杂交的结实率多重比较结果;(B)南丹参异交、自交以及与舌瓣鼠尾草杂交的结实率多重比较结果。统计分析采用*t*-检验, 不同字母代表差异显著( $P < 0.05$ )。

Fig. 2 Comparisons of cross-pollination, self-pollination, and hybridization of *Salvia liguliloba* and *S. bowleyana*. (A) and (B) show *S. liguliloba* and *S. bowleyana*, respectively. Different letters indicate significant difference at the level of  $P < 0.05$  by *t*-test.

至花冠下唇而是直接接近冠筒, 额部抵住花冠上唇吸食花蜜, 此时位于上唇内侧的雄蕊花药接触熊蜂的额部, 当其离开时即带走花粉。在整个传粉过程中, 雄蕊的位置没有发生改变, 花丝和药隔连接部位没有类似南丹参的可保证雄蕊运动的“轴”结构。舌瓣鼠尾草通过较小的冠口、较长的花冠筒和紧贴上唇的雄蕊花药, 同样保证了三条熊蜂传粉过程的专一、稳定、精确和有效。

访花行为的研究结果表明, 三条熊蜂对南丹参的访花相对频次( $P < 0.001$ )、活跃度( $P < 0.001$ )和访花频率( $P < 0.001$ )均显著高于舌瓣鼠尾草(表3), 传粉昆虫对舌瓣鼠尾草的单花访问时间稍长于南丹参, 但差异不显著( $P = 0.2758$ )。结果表明, 在单株水平上, 三条熊蜂对南丹参的访花频率更高。

2.3 繁育系统和种间杂交

从舌瓣鼠尾草和南丹参各自异交和自交授粉实验可以看出, 2种植物的结实率都很高, 但它们的异交和自交结实率之间的差异有所不同(图2)。舌瓣

鼠尾草异交和自交的结实率没有显著差异( $P = 0.0996$ ), 异交结实率( $94.4 \pm 6.8\%$ )略高于自交结实率( $88.9 \pm 9.7\%$ ); 南丹参的异交结实率( $95.3 \pm 4.1\%$ )也同样高于自交( $87.8 \pm 9.5\%$ ), 但两者具有显著性差异( $P < 0.05$ )。2个物种间的交互杂交结果表明, 舌瓣鼠尾草和南丹参互为父母本的杂交结实率分别为  $78.7 \pm 11.2\%$  和  $77.8 \pm 10.7\%$ , 种间的遗传相容性很高。但不论舌瓣鼠尾草还是南丹参, 其异交和自交的结实率均显著高于种间的杂交结实率( $P < 0.05$ )。

3 讨论

在天目山同域分布的舌瓣鼠尾草和南丹参具有共同的传粉昆虫, 在自然生境中, 2种鼠尾草之间形成了较完备的生殖隔离, 同时与传粉者均具有专一性的花粉传递、分发和授粉机制, 表现出对传粉者资源的充分利用。鼠尾草属具有高度适应传粉昆虫的花形态结构, 物种共生进化程度较高, 突出表现在花粉输出的稳定性、精确性和有效性, 同时与

传粉者形成专一程度和忠实性较高的共存关系(黄艳波等, 2014)。传粉者特化能够促进生殖隔离和物种多样性的产生(Baack et al, 2015)。本文和以往的研究均表明, 以适应传粉者的植物花部结构特化进而引发的物种多样性分化, 可能是鼠尾草属植物多样性形成的关键因素(Claßen-Bockhoff et al, 2004; Wester & Claßen-Bockhoff, 2007)。2种鼠尾草尽管具有相似的花形态, 但基于雄蕊结构的细微差别, 各自独特的传粉结构, 通过各异的传粉方式, 都能够稳定、精确而有效的传递花粉, 同时利用同一传粉者不同传粉部位的有效机械隔离, 避免发生种间自然杂交的可能, 从而形成了一种较完备的传粉前生殖隔离机制, 以维持同域分布物种的遗传稳定性和物种多样性。

从2种鼠尾草的单花结构、花序组成和开花方式的显著差异中我们可以看出, 它们对同一传粉者三条雄蜂的吸引方式、相互作用(传粉机制)和传粉特征均有所不同。南丹参具备的淡黄色花冠、紫红色的下唇和雄蕊下臂可能具有比舌瓣鼠尾草更强的吸引传粉昆虫的能力, 反映在传粉者对南丹参的访花频次显著高于舌瓣鼠尾草, 可能暗示三条熊蜂对南丹参的黄色或较深的紫红色具有偏好。尽管南丹参的昆虫访花频次、访花相对频率明显较舌瓣鼠尾草更高( $P < 0.05$ ), 但两者自然条件下的结实率相当(南丹参:  $87.8 \pm 11.8\%$ ; 舌瓣鼠尾草:  $87.2 \pm 7.6\%$ ;  $P = 0.880$ ), 说明舌瓣鼠尾草的昆虫授粉效率更高, 传粉效果更好。由此, 我们推测2种鼠尾草采用了不同的传粉策略, 利用一种传粉者同时达到了较高的繁殖成效。南丹参借助更多的花朵数量、对传粉者更强的吸引力提高三条熊蜂的访花频率, 减少访问时间, 完成异花授粉和较高的雄性适合度; 舌瓣鼠尾草尽管单位时间访花数量较少, 但通过更高效的单花访花过程, 或是更理想的植物与传粉者互作, 达到同样高水平的繁殖成效和雄性适合度。

鼠尾草属与传粉者的高度协同的传粉关系暗示传粉者物种数量不应少于宿主的物种数, 我们的野外调查和以往报道也显示, 一种鼠尾草通常有多种传粉者(或称传粉功能群)完成授粉过程, 2种鼠尾草共用一种传粉者的情况并不常见(Claßen-Bockhoff et al, 2004)。对玉凤花属(*Habenaria*)和凤仙花属(*Impatiens*)同域共存的多物种传粉研究表明, 每个物种既有特定传粉者, 也有相同的传粉者, 在共

享同一传粉者的情况下, 花传粉结构和传粉部位差异综合作用才可能保证物种间的生殖隔离(Pedron et al, 2012; Ruchisansakun et al, 2016)。本文结果显示同域分布的2种鼠尾草对传粉者资源的利用效率很高, 是高度适应环境的结果。尽管通过花粉落置部位的差异, 在共用一种传粉者时能够避免大多数情况的花粉干扰, 但这并非绝对, 小概率的花粉干扰事件可能无法避免(Huang & Shi, 2013)。对于亲缘关系较远的物种而言, 因其遗传不相容或花粉柱头无法识别, 不会影响各自的繁殖成功(Huang et al, 2015), 但对于舌瓣鼠尾草和南丹参2个没有遗传不相容性的物种来说, 如何尽可能降低少量的花粉干扰值得深入研究。

舌瓣鼠尾草和南丹参的花期完全重叠, 在共享同一种传粉昆虫的情况下, 通过机械隔离机制(传粉部位的差异)避免了自然杂交后代的产生, 是一种典型的传粉前隔离机制, 这种方式保证了2种鼠尾草属植物较高的传粉专一性, 也暗示了该类群在植物与传粉昆虫进化的程度较高。传粉者介导的不同传粉模式能够促进花的分化及其引起的生殖隔离, 表明其在植物多样性起源中的重要作用, 但很少有研究能够阐明具有不同传粉模式的多个物种的共存机制(Pauw, 2013)。对于植物生殖隔离的进化而言, 传粉前隔离通常比传粉后隔离更为重要(Ma et al, 2016a,b)。鼠尾草属生殖隔离的产生可能源于该属物种快速形成过程中的物种分化或局地环境适应, 但其起源机制仍不清楚, 这种较完备的传粉前机械隔离是如何产生的? 这需要更广范围的调查取样以及对2种鼠尾草及其近缘物种的系统进化和谱系地理学分析。生殖隔离可能更强烈地依赖于植物的传粉系统而不是植物本身, 换言之, 植物生殖隔离的进化更有可能受到其传粉昆虫的影响和选择(Hopkins, 2013)。但同时我们看到, 2组人工杂交组合尽管有较高的结实率, 但比2个鼠尾草亲本各自的同种异花授粉结实率仍低了10–20% (图2), 说明舌瓣鼠尾草和南丹参之间仍存在较弱的传粉后隔离。

综上所述, 未来对2物种重叠分布区传粉昆虫种类、传粉行为、传粉报酬、物候等传粉前隔离方式和传粉后生殖隔离的花粉竞争能力、杂交种子活力和 $F_1$ 代生存力的比较研究, 将有助于更全面地认识鼠尾草属的生殖隔离模式。



致谢: 感谢中国科学院上海辰山植物科学研究中心严岳鸿研究员对文章撰写提出的中肯建议; 同时感谢两位匿名审稿专家的宝贵意见和耐心细致的修改。

## 参考文献

- Baack E, Melo MC, Rieseberg LH, Ortiz-Barrientos D (2015) The origins of reproductive isolation in plants. *New Phytologist*, 207, 968–984.
- Claßen-Bockhoff R, Speck T, Tweraser E, Wester P, Thimm S, Reith M (2004) The staminal lever mechanism in *Salvia* L. (Lamiaceae): a key innovation for adaptive radiation? *Organisms Diversity & Evolution*, 4, 189–205.
- Claßen-Bockhoff R, Wester P, Tweraser E (2003) The staminal lever mechanism in *Salvia* L. (Lamiaceae): a review. *Plant Biology*, 5, 33–41.
- Epling C (1947) Natural hybridization of *Salvia apiana* and *S. mellifera*. *Evolution*, 1, 69–78.
- Hopkins R (2013) Reinforcement in plants. *New Phytologist*, 197, 1095–1103.
- Huang S, Shi X (2013) Floral isolation in *Pedicularis*: how do congeners with shared pollinators minimize reproductive interference? *New Phytologist*, 199, 858–865.
- Huang YB, Wei YK, Ge BJ, Wang Q (2014) Research progress in pollination biology of genus *Salvia* (Lamiaceae) and their pollination mechanisms in East Asia (China). *Acta Ecologica Sinica*, 34, 2282–2289. (in Chinese with English abstract) [黄艳波, 魏宇昆, 葛斌杰, 王琦 (2014) 鼠尾草属东亚分支的传粉模式. *生态学报*, 34, 2282–2289.]
- Huang YB, Wei YK, Wang Q, Xiao YE, Ye XY (2015) Floral morphology and pollination mechanism of *Salvia liguliloba*, a narrow endemic species with degraded lever-like stamens. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 39, 753–761. (in Chinese with English abstract) [黄艳波, 魏宇昆, 王琦, 肖月娥, 叶喜阳 (2015) 舌瓣鼠尾草退化杠杆雄蕊的相关花部特征及传粉机制. *植物生态学报*, 39, 753–761.]
- Huang Z, Liu H, Huang S (2015) Interspecific pollen transfer between two coflowering species was minimized by bumblebee fidelity and differential pollen placement on the bumblebee body. *Journal of Plant Ecology*, 8, 109–115.
- Kipling R, Warren J (2013) How generalists coexist: the role of floral phenotype and spatial factors in the pollination systems of two *Ranunculus* species. *Journal of Plant Ecology*, 7, 480–489.
- Ma YP, Xie WJ, Sun WB, Marczewski T (2016a) Strong reproductive isolation despite occasional hybridization between a widely distributed and a narrow endemic *Rhododendron* species. *Scientific Reports*, 6, 19146.
- Ma YP, Zhou RC, Milne R (2016b) Pollinator-mediated isolation may be an underestimated factor in promoting homoploid hybrid speciation. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1183.
- Melo MC, Greal A, Brittain B, Walter GM, Ortiz-Barrientos D (2014) Strong extrinsic reproductive isolation between parapatric populations of an Australian groundsel. *New Phytologist*, 203, 323–334.
- Meyn O, Emboden WA (1987) Parameters and consequences of introgression in *Salvia apiana* × *S. mellifera* (Lamiaceae). *Systematic Botany*, 12, 390–399.
- Pauw A (2013) Can pollination niches facilitate plant coexistence? *Trends in Ecology & Evolution*, 28, 30–37.
- Pedron M, Buzatto CR, Singer RB, Batista JAN, Moser A (2012) Pollination biology of four sympatric species of *Habenaria* (Orchidaceae: Orchidinae) from southern Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 170, 141–156.
- Ruchisansakun S, Tangtorwongsakul P, Cozien RJ, Smets EF, Niet TVD (2016) Floral specialization for different pollinators and divergent use of the same pollinator among co-occurring *Impatiens* species (Balsaminaceae) from Southeast Asia. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181, 651–666.
- Wei YK, Wang Q, Huang YB (2015) Species diversity and distribution of *Salvia* (Lamiaceae). *Biodiversity Science*, 23, 3–10. (in Chinese with English abstract) [魏宇昆, 王琦, 黄艳波 (2015) 唇形科鼠尾草属的物种多样性与分布. *生物多样性*, 23, 3–10.]
- Wester P, Claßen-Bockhoff R (2007) Floral diversity and pollen transfer mechanisms in bird-pollinated *Salvia* species. *Annals of Botany*, 100, 401–421.
- Widmer A, Lexer C, Cozzolino S (2009) Evolution of reproductive isolation in plants. *Heredity*, 102, 31–38.
- Yang FC (1992) Comprehensive Investigation Report on Natural Resource of Tianmu Mountain Nature Reserve. Zhejiang Science and Technology Press, Hangzhou. (in Chinese) [杨逢春 (1992) 天目山自然保护区自然资源综合考察报告. 浙江科学技术出版社, 杭州.]

(责任编辑: 严岳鸿 责任编辑: 时意专)

•研究报告•

# 牛耳朵和马坝报春苣苔同域种群授粉后的生殖隔离

张小龙<sup>1</sup> 杨丽华<sup>1,2</sup> 康 明<sup>1\*</sup><sup>1</sup> (中国科学院华南植物园, 中国科学院植物资源保护与可持续利用重点实验室, 广州 510650)<sup>2</sup> (中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:** 生殖隔离是物种形成的关键, 也是物种保持完整性和独立性的基础。报春苣苔属(*Primulina*)是我国苦苣苔科中最大的属, 具有极为丰富的物种多样性。大部分报春苣苔属植物为喀斯特地区特有植物, 近缘种的同域分布也相当普遍。为更好地理解该属植物的物种多样性形成及维持机制, 我们选取了牛耳朵(*P. eburnea*)和马坝报春苣苔(*P. mabaensis*)的同域种群, 分析了授粉后的多种隔离机制强度, 主要包括花粉竞争、坐果率、种子重量、种子萌发率、花粉活力。结果显示, 牛耳朵和马坝报春苣苔的授粉后总隔离强度都较弱(0.09 vs. 0.13), 其中花粉竞争及种子萌发率的隔离强度为负值, 对物种间基因流发生起促进作用; 而坐果率、种子重量以及花粉活力的隔离强度均为正值, 表现为对种间基因流起阻止作用。牛耳朵和马坝报春苣苔较弱的授粉后隔离机制不足以完全阻止物种间杂交、保持物种独立性, 但野外较少存在自然杂交个体暗示着两者可能存在较强的授粉前隔离机制。

**关键词:** 喀斯特植物; 报春苣苔属; 同域种群; 生殖隔离; 杂交; 花粉竞争

## Post-pollination reproductive isolation of sympatric populations of *Primulina eburnea* and *P. mabaensis* (Gesneriaceae)

Xiaolong Zhang<sup>1</sup>, Lihua Yang<sup>1,2</sup>, Ming Kang<sup>1\*</sup><sup>1</sup> Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650<sup>2</sup> University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049

**Abstract:** Reproductive isolation is essential for sympatric populations of closely related species to maintain species integrity and to prevent genetic introgression caused by hybridization. *Primulina* is the largest genus of Gesneriaceae in China, with a high degree of species diversity and endemism. Most species of the genus are karst habitat specialists (i.e. calciphiles), and many closely related species show a sympatric distribution in karst landscapes. To better understand the mechanism of sympatry in *Primulina*, post-pollination reproductive isolation, including pollen competition, fruit set, seed mass, seed germination, and pollen viability, was investigated in two closely related species, *P. eburnea* and *P. mabaensis*. Results indicated that the total post-pollination isolation strength for *P. eburnea* and *P. mabaensis* was 0.09 and 0.13, respectively, which were not strong enough to prevent hybridization completely. The strength of reproductive isolation from pollen competition and seed germination of *P. eburnea* and *P. mabaensis* was negative, suggesting facilitation for gene flow between species; while the strength of the fruit set, seed mass, and pollen viability showed a weak role in preventing interspecies hybridization. However, the two species are able to maintain their integrity well, as rare hybrid individuals are found in nature, suggesting that the existence of pre-pollination isolation mechanisms may play a more important role in maintaining species boundaries in these two species.

**Key words:** karst plant; *Primulina*; sympatric populations; reproductive isolation; hybridization; pollen competition

收稿日期: 2017-02-01; 接受日期: 2017-04-06

基金项目: 国家自然科学基金-广东省联合基金重点项目(U1501211)

\*通讯作者 Author for correspondence. E-mail: mingkang@scib.ac.cn



生殖隔离是物种形成的关键,也是物种保持完整性和独立性的基础(Coyne & Orr, 2004)。根据发生时间段的不同,生殖隔离可划分为合子前隔离及合子后隔离(Kay, 2006),在植物中也可以划分为授粉前隔离和授粉后隔离(Baack et al, 2015)。授粉前隔离包括生态地理隔离、花期隔离、传粉者隔离等;授粉后隔离指发生在花粉落至柱头后的阶段,主要包括花粉竞争、杂交种子形成、杂种不育、杂种衰败等(Baack et al, 2015)。通常会由多种不同的授粉前及授粉后隔离机制共同作用来阻止种群间或物种间的基因流发生。详细评价各种隔离机制的相对作用是理解物种形成及物种边界维持的关键(Martin & Willis, 2007)。当物种间的生殖隔离强度不足以完全阻断基因流的发生时,两个物种就可能发生杂交融合,甚至导致亲本物种的灭绝,尤其是狭域特有种的灭绝风险更高(Rhymer & Simberloff, 1996; Wolf et al, 2001)。

报春苣苔属(*Primulina*)是苦苣苔科的一个大属,有超过150个种,主要分布在我国南部、西南部及越南北部的石灰岩地区(Möller et al, 2016)。该类群绝大多数物种为极其狭域的地方特有种,且有较强的生长基质专性,只存在少数的广布种,如牛耳朵(*P. eburnea*)、蚂蝗七(*P. fimbrisepala*)等。异域物种形成被认为可能是这个类群的主要物种形成机制,如喀斯特地貌导致的地理隔离(Gao et al, 2015)。这些异域分化的物种在发生二次相遇时(如广布种在它的分布区内经常和一些狭域种相遇),需要快速地再次建立较强的生殖隔离才能阻止物种间的杂交融合,保持自身的独立性和完整性。牛耳朵是华南石灰岩地区常见的广布种(Wang et al, 1998),而马坝报春苣苔(*P. mabaensis*)是近年新发表的一个狭域特有种(Chung et al, 2013),目前只有一个分布点。马坝报春苣苔的生长地同时混合生长着牛耳朵,两者花期存在部分重叠,且具有较近的亲缘关系(Kang et al, 2014),但我们的野外观察发现两个物种可以很好地保持各自的独立性和完整性,很少有杂交过渡个体。牛耳朵和马坝报春苣苔是通过哪些隔离机制来维持各自的物种边界?其各种隔离机制的相对作用强度如何?本文详细研究了牛耳朵和马坝报春苣苔的授粉后生殖隔离机制及其相对贡献,研究结果对于理解近缘物种同域分布的维持机制具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究材料

牛耳朵具有一对大而显著的苞片,花较大(长3–4 cm)而艳丽(图1E),花丝在中部膝状弯曲(图1D),花药整个腹面联合(图1D),花期4–5月(Wang et al, 1998)。马坝报春苣苔苞片不显著,花较小(长2.5–3 cm)而白色(图1G),花丝直(图1C),花药分离(图1C),花期4–6月(Chung et al, 2013)。

在马坝人遗址景区内,两个物种混合生长(图1A),并且存在部分花期重叠,但在野外两个物种可以很好地保持自身的完整性,偶尔见到杂交个体(图1B, F)。2012年,我们对此分布点的两个物种每隔1 m进行少量引种,并用12 cm花盆栽植于华南植物园温室内,2013–2014年开花后进行下列生殖隔离检验实验。

### 1.2 研究方法

#### 1.2.1 花粉大小及花柱长度

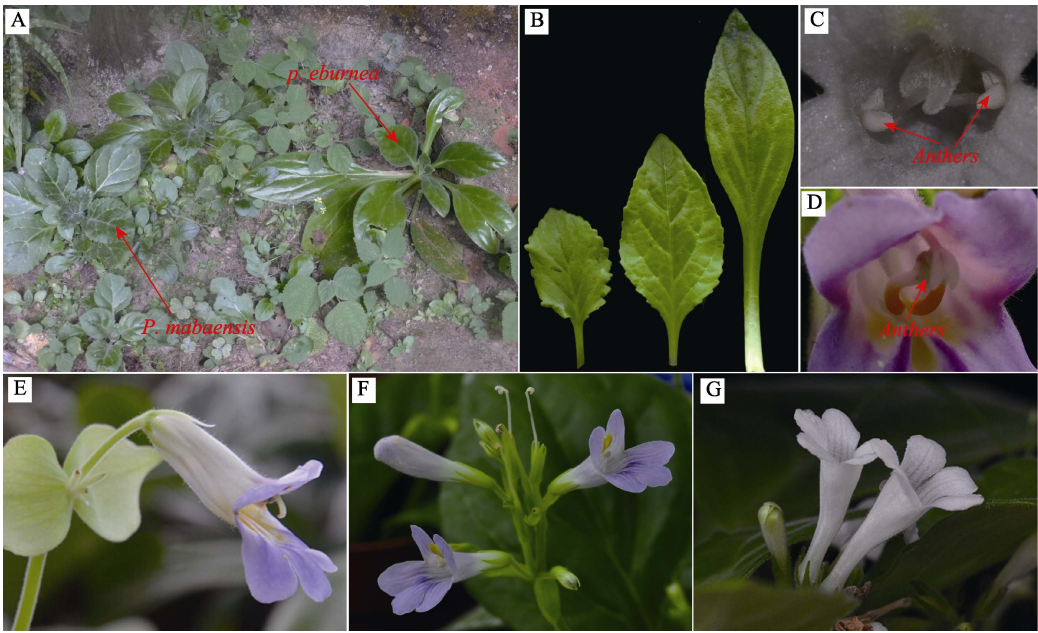
每个物种随机取3株,每株1朵成熟花,将花粉挤出在玻片上混匀,在显微镜下拍照。每个物种选取30粒以上发育正常的花粉粒,用ImageJ软件测量其长、宽、面积。随机选取10朵成熟花朵,用数码相机尺测量两个物种的花柱长度。

#### 1.2.2 花粉管生长

分别对两个物种做以下人工授粉处理(每个处理10朵以上花): (1)种内自交: 开花前套袋,开花后自花授粉,再套袋; (2)种间杂交: 开花前套袋,开花后分别对两个物种进行杂交(牛耳朵♂×马坝报春苣苔♀, 牛耳朵♀×马坝报春苣苔♂),再套袋。授粉2 h后将雌蕊取下立即置于新鲜的卡诺氏固定液(3乙醇:1乙酸)中固定。24 h后,用蒸馏水漂洗3 min,重复2次,用卡尺测量雌蕊长度,再将其浸泡在4 M的氢氧化钠溶液中软化24 h后,用蒸馏水漂洗2次,每次3 min,置于洁净玻片上,滴加2滴0.1%的水溶性苯胺蓝染色液,染色5 min,盖上盖玻片,轻压使柱头压扁平铺。在荧光显微镜DAPI通道410 nm波长紫外光条件下观察花粉管生长状态,并测量花粉管长度。

#### 1.2.3 花粉竞争

开花前套袋并去雄,开花后将两个物种的花粉按1:1等重量混合均匀,再分别授在两个物种的柱头上,套袋至花谢。待果实成熟并风干后,分别将



**图1** 牛耳朵、马坝报春苣苔及其杂交F<sub>1</sub>代植株、花和叶。(A)牛耳朵和马坝报春苣苔野外植株;(B)牛耳朵(右)、杂交F<sub>1</sub>代(中)和马坝报春苣苔(左)的叶;(C)马坝报春苣苔花药;(D)牛耳朵花药;(E)牛耳朵花;(F)杂交F<sub>1</sub>代花;(G)马坝报春苣苔花。  
**Fig. 1** Plant, flower and leaf of *Primulina eburnea*, *P. mabaensis* and their hybrid. (A) Plants of *P. eburnea* and *P. mabaensis* in field; (B) Leaves of *P. eburnea* (right), hybrid (middle) and *P. mabaensis* (left); (C) Flower of *P. mabaensis* showing anthers; (D) Flower of *P. eburnea* showing anthers; (E) Flowers of *P. eburnea*; (F) Flowers of hybrid; (G) Flowers of *P. mabaensis*.

每个果实的种子散播在放置有培养土的培养皿中, 盖上培养皿, 放在25℃的培养箱内, 注意保湿。待长出小苗后随机选取30株, 采用改良的CTAB法分别提取DNA, 再用表1中的3对物种特异性SSR引物进行PCR扩增, 对扩增样品进行毛细管电泳检测扩增片段长度。

先期实验筛选出3对物种特异性SSR标记(引物信息见表1), 即这些标记在亲本上为具有种间多态性的纯合位点(Ai et al, 2015)。因此, 若样本在相应的标记上为杂合状态, 则表明该个体在混合授粉后接受了异源花粉。反之, 则表明该个体在混合授粉后接受了同源花粉。

1.2.4 坐果率及种子重量

花期对两个物种分别进行以下人工授粉处

理: (1)种内自交( $n = 20$ ): 开花前套袋, 开花后自花授粉, 再套袋至花谢; (2)种间杂交( $n = 30$ ): 开花前套袋并去雄, 开花后分别对两个物种进行相互杂交(牛耳朵♂×马坝报春苣苔♀, 牛耳朵♀×马坝报春苣苔♂), 套袋至花谢。果实成熟后分别统计各个处理的坐果率。果实风干后每组随机选取10个发育正常的果实, 用电子天平称量每个果实的种子总重量。

1.2.5 花粉活力

分别随机选取牛耳朵和马坝报春苣苔亲本及上述种间杂交F<sub>1</sub>代3株, 每株取1朵花, 将花粉挤出并在玻片上涂匀, 滴加1滴TTC染色液, 轻轻盖上盖玻片后, 置于铺有潮湿滤纸的培养皿内, 35℃放置30 min以上, 在显微镜下(4×20倍)分别统计视野内淡红色或者红色的花粉占总花粉数的比例, 共统计

**表1 SSR引物信息及扩增长度多态性**  
**Table 1 SSR primer information and amplified fragment length polymorphism**

引物名称 Primer	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer	扩增片段长度多态性 Amplified fragment length polymorphism (bp)	
			牛耳朵 <i>Primulina eburnea</i>	马坝报春苣苔 <i>P. mabaensis</i>
325	AACGGAGAACACCCCATTTA	TCGCCTTATGAAGGTTTGG	249	246
415	AACCCATCGTTTCACTCCAC	CTCGGAATCAACTCCTAGCG	289	299
1143	CGGAGTCAGCTTTGCACATA	CTCTCTCTACACACGAGCG	222	219

10个视野,取平均值即为花粉活力(Dafni, 1992)。

1.2.6 种子萌发率

各取10个上述4种人工授粉处理的发育正常的果实,每个果实取100粒种子散播在放置有培养土的培养皿中,盖上培养皿,放在25℃的培养箱内,注意保湿,60天后统计萌发率。10个果实的平均萌发率代表该组处理的萌发率。

1.2.7 生殖隔离强度的计算

采取Sobel和Chen (2014)提出的计算方法来分析授粉后每个特定时期的生殖隔离强度。隔离机制强度基本算法为:  $RI = 1 - 2 \times [H / (H + C)]$ 。RI为隔离机制的强度, H为异源授粉后代的适合度, C为同源授粉后代的适合度,  $H / (C + H)$ 为基因交流发生的可能性。根据此方法,生殖隔离强度(RI)值在-1.0到1.0之间,如,当1:1混合花粉授粉后,若种子全部为同源花粉所得到,则基因流为0,隔离强度为1;若种子全部为异源花粉所得到,则基因流为1,隔离强度为-1;若两种花粉的授粉能力相同,则基因流为0.5,隔离强度为0。具体每个时期的隔离强度的计算及变量的详细情况如表2。授粉后总的隔离强度为各个特定时期隔离绝对贡献值的总和。

2 结果

2.1 花粉大小及花柱长度

牛耳朵花粉粒长度平均为 $28.14 \pm 0.61 \mu\text{m}$ ,宽度平均为 $14.99 \pm 0.49 \mu\text{m}$ ,面积平均为 $334.02 \pm 12.69 \mu\text{m}^2$ ;马坝报春苣苔花粉粒长度平均为 $32.79 \pm 0.92 \mu\text{m}$ ,宽度平均为 $17.58 \pm 0.72 \mu\text{m}$ ,面积平均为

$461.82 \pm 22.17 \mu\text{m}^2$ 。牛耳朵的花粉粒较马坝报春苣苔花粉粒稍小,其长度、宽度和面积比值分别为1:1.17、1:1.17、1:1.38。牛耳朵花柱长度平均为 $9.87 \pm 0.85 \text{ mm}$ ,马坝报春苣苔花柱长度平均为 $19.52 \pm 1.01 \text{ mm}$ ,二者花柱长度比值为1:1.98。

2.2 花粉管生长

牛耳朵种内自交花粉管长度为 $925.78 \pm 56.17 \mu\text{m}$ ,种间杂交(牛耳朵♀×马坝报春苣苔♂)的花粉管长度为 $722.53 \pm 153.87 \mu\text{m}$ ,种内自交比种间杂交的花粉管长28.13%。马坝报春苣苔种内自交花粉管长度为 $771.66 \pm 338.17 \mu\text{m}$ ,种间杂交(马坝报春苣苔♀×牛耳朵♂)的花粉管长度为 $387.92 \pm 102.38 \mu\text{m}$ ,种内自交比种间杂交的花粉管长128.18%。无论是牛耳朵还是马坝报春苣苔,自交后代的花粉管生长均比杂交后代快。

2.3 花粉竞争

1:1混合花粉授粉后,通过3对SSR标记检测后代花粉来源的结果显示马坝报春苣苔的花粉对牛耳朵进行异源授粉的比率为66.05%;牛耳朵花粉对马坝报春苣苔的异源授粉率为51.29%。异源花粉均表现出一定的优势。

2.4 坐果率

牛耳朵种内自交坐果率为100%,种间杂交(牛耳朵♀×马坝报春苣苔♂)的坐果率为88.56%;马坝报春苣苔种内自交坐果率为87.96%,种间杂交(马坝报春苣苔♀×牛耳朵♂)的坐果率为87.43%。

2.5 种子重量

牛耳朵种内自交每个果实内所有种子的平均

表2 各种生殖隔离机制强度的计算及其变量情况  
Table 2 Equations used to quantify components of reproductive isolation. Details of how the variables were constructed are given in the text.

隔离机制 Isolation barriers	计算方程 Equation for calculating reproductive isolation (RI)
花粉竞争	$1 - 2 \times [\text{异源花粉授粉率} / (\text{异源花粉授粉率} + \text{同源花粉授粉率})]$
Pollen competition	$1 - 2 \times [\text{interspecific pollination ratio} / (\text{interspecific pollination rate} + \text{intraspecific pollination rate})]$
坐果率	$1 - 2 \times [\text{杂交坐果率} / (\text{杂交坐果率} + \text{自交坐果率})]$
Fruit set	$1 - 2 \times [\text{interspecific fruit set} / (\text{interspecific fruit set} + \text{selfing fruit set})]$
种子重量	$1 - 2 \times [\text{杂交种子重量} / (\text{杂交种子重量} + \text{自交种子重量})]$
Seed mass	$1 - 2 \times [\text{interspecific seed mass of per fruit} / (\text{interspecific seed mass of per fruit} + \text{selfing seed mass of per fruit})]$
种子萌发率	$1 - 2 \times [\text{杂交种子萌发率} / (\text{杂交种子萌发率} + \text{自交种子萌发率})]$
Seed germination rate	$1 - 2 \times [\text{interspecific seed germination} / (\text{interspecific seed germination} + \text{selfing seed germination})]$
花粉活力	$1 - 2 \times [\text{杂交F}_1\text{代花粉活力} / (\text{杂交F}_1\text{代花粉活力} + \text{亲本花粉活力})]$
Pollen viability	$1 - 2 \times [\text{interspecific F}_1\text{ pollen viability} / (\text{interspecific F}_1\text{ pollen viability} + \text{parent pollen viability})]$

重量为 $160.41 \pm 90.00$  mg, 种间杂交(牛耳朵♀×马坝报春苣苔♂)每个果实内所有种子的平均重量为 $116.98 \pm 68.72$  mg。马坝报春苣苔种内自交每个果实内所有种子的平均重量为 $29.95 \pm 8.37$  mg, 种间杂交(马坝报春苣苔♀×牛耳朵♂)每个果实内所有种子的平均重量为 $28.90 \pm 8.39$  mg。

2.6 花粉活力

亲本中, 牛耳朵花粉活力为95.58%, 马坝报春苣苔的花粉活力为94.32%。杂交F<sub>1</sub>代的花粉活力显著低于亲本的花粉活力, 牛耳朵♀×马坝报春苣苔♂的F<sub>1</sub>代花粉活力为55.62%, 马坝报春苣苔♀×牛耳朵♂的F<sub>1</sub>代花粉活力为47.18%。杂交后代花粉活力明显低于自交后代花粉活力。

2.7 种子萌发率

牛耳朵种内自交F<sub>1</sub>代萌发率平均为 $57.33 \pm 27.74\%$ , 种间杂交(牛耳朵♀×马坝报春苣苔♂) F<sub>1</sub>代萌发率为 $62.21 \pm 9.52\%$ 。马坝报春苣苔种内自交F<sub>1</sub>代萌发率平均为 $26.14 \pm 22.42\%$ , 种间杂交(马坝报春苣苔♀×牛耳朵♂) F<sub>1</sub>代萌发率为 $39.15 \pm 22.31\%$ 。

2.8 生殖隔离机制强度

花粉竞争和种子萌发率的隔离强度为负值, 表现为对种间杂交起促进作用; 坐果率、种子重量及花粉活力的隔离强度为正值, 表现为阻止种间杂交。其中, 花粉活力的隔离强度最大。各种隔离机制的隔离强度详见表3。整合各个生殖隔离指标, 牛耳朵和马坝报春苣苔的授粉后隔离总强度分别为0.09和0.13。

表3 牛耳朵和马坝报春苣苔授粉后各生殖隔离机制的强度  
Table 3 The strength of post-pollination reproductive isolations between *Primulina eburnea* and *P. mabaensis*.

隔离机制 Isolation barriers	牛耳朵 <i>P. eburnea</i>	马坝报春苣苔 <i>P. mabaensis</i>
花粉竞争 Pollen competition	-0.321	-0.026
坐果率 Fruit set	0.058	0.003
种子重量 Seed mass	0.157	0.019
种子萌发率 Seed germination rate	-0.068	-0.199
花粉活力 Pollen viability	0.264	0.333
授粉后隔离总强度 RI	0.090	0.130

3 讨论

我们的研究揭示了牛耳朵和马坝报春苣苔同域种群授粉后各种隔离机制的强度, 结果表明两者

间的授粉后总生殖隔离强度较弱(分别为0.09和0.13), 不足以完全阻止物种间杂交、保持物种独立性。很早就有研究认识到同种花粉及花粉管比异种花粉及花粉管具有更快萌发及生长的优势(Snow & Spira, 1996), 即花粉竞争, 这种机制可能代表一种有效的生殖隔离机制(Klips, 1999; Husband et al, 2002)。花粉1:1混合授粉产生的种子父本来源显示两者异源授粉率都要稍微高于同源授粉率(异源授粉率: 牛耳朵(66.05%) vs. 马坝报春苣苔(51.29%)), 即花粉竞争表现为对物种间基因流发生起促进作用(花粉竞争隔离强度: 牛耳朵 (-0.321) vs. 马坝报春苣苔(-0.026))。不过, 我们应注意到牛耳朵花粉比马坝报春苣苔花粉略小, 花粉等量混合时, 实际上牛耳朵的花粉数目要比马坝报春苣苔多, 可能会对结果造成一定的偏差。种子萌发率的隔离强度也为负值(牛耳朵(-0.068) vs. 马坝报春苣苔(-0.199)), 表明杂交后代具有竞争优势。坐果率、种子重量以及花粉活力等3个指标的隔离强度均为正值, 体现出对种间基因流的阻止作用, 但这种隔离比较弱, 只有花粉活力的隔离强度稍高, 牛耳朵和马坝报春苣苔分别为0.264和0.333。我们的结果也和日常园艺应用经验相一致, 在日常的园艺杂交中发现报春苣苔属中大多数物种间可以杂交并产生开花的F<sub>1</sub>代(未发表数据)。报春苣苔属全部物种都具有相同的染色体数目(Liu et al, 2012; Kang et al, 2014), 且多数物种可以相互杂交并产生开花的F<sub>1</sub>代, 预示着报春苣苔属中多数物种间授粉后隔离可能普遍较弱。牛耳朵和马坝报春苣苔具有较近的系统发育关系(Kang et al, 2014), 因此两者的遗传分化可能还不足以建立起强烈的授粉后隔离机制(Luo et al, 2015)。牛耳朵和马坝报春苣苔的花期存在部分重叠, 但野外很少有自然杂交个体存在, 表明两者可以较好地保持自身完整性, 由此推测授粉前隔离对阻止牛耳朵和马坝报春苣苔杂交融合可能起到更为重要的作用, 比如, 传粉者隔离(Xu et al, 2011)、传粉精确性隔离(Huang & Shi, 2013)及交配系统隔离(Brys et al, 2014, 2016)等都可能具有较强的作用, 但授粉前的隔离机制需要在以后的研究中进一步证明。

从授粉后隔离强度来看, 马坝人遗址种群中的牛耳朵和马坝报春苣苔发生杂交的可能性较大。自然杂交可以产生新物种(Soltis & Soltis, 2009), 但同时也可能导致亲本物种的灭绝, 尤其是对狭域物种

会产生更高的灭绝风险(Rhymer & Simberloff, 1996; Wolf et al, 2001)。马坝报春苣苔为极其狭域的特有种(目前只有一个分布点),在和牛耳朵发生基因流时,其很可能被遗传同化而导致灭绝,因此在今后的物种保护工作中应给予高度重视。

致谢:感谢两位审稿专家提出的宝贵修改意见。

## 参考文献

- Ai B, Gao Y, Zhong XL, Tao JJ, Kang M, Huang HW (2015) Comparative transcriptome resources of eleven *Primulina* species, a group of 'stone plants' from a biodiversity hot spot. *Molecular Ecology Resources*, 15, 619–632.
- Baack E, Melo MC, Rieseberg LH, Ortiz-Barrientos D (2015) The origins of reproductive isolation in plants. *New Phytologist*, 207, 968–984.
- Brys R, Vanden Broeck A, Mergeay J, Jacquemyn H (2014) The contribution of mating system variation to reproductive isolation in two closely related *Centaurium* species (Gentianaceae) with a generalized flower morphology. *Evolution*, 68, 1281–1293.
- Brys R, Cauwenberghe JV, Jacquemyn H (2016) The importance of autonomous selfing in preventing hybridization in three closely related plant species. *Journal of Ecology*, 104, 601–610.
- Chung KF, Huang HY, Peng JJ, Xu WB (2013) *Primulina maibaensis* (Gesneriaceae), a new species from a limestone cave of northern Guangdong, China. *Phytotaxa*, 92, 40–48.
- Coyne JA, Orr HA (2004) Speciation. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Dafni A (1992) Pollination Biology. Oxford University Press, New York.
- Gao Y, Ai B, Kong HH, Kang M, Huang HW (2015) Geographical pattern of isolation and diversification in karst habitat islands: a case study in the *Primulina eburnea* complex. *Journal of Biogeography*, 42, 2131–2144.
- Huang SQ, Shi XQ (2013) Floral isolation in *Pedicularis*: how do congeners with shared pollinators minimize reproductive interference? *New Phytologist*, 199, 858–865.
- Husband BC, Schemske DW, Burton TL, Goodwillie C (2002) Pollen competition as a unilateral reproductive barrier between sympatric diploid and tetraploid *Chamerion angustifolium*. *Proceedings of the Royal Society B*, 269, 2565–2571.
- Kang M, Tao JJ, Wang J, Ren C, Qi QW, Xiang QY, Huang HW (2014) Adaptive and nonadaptive genome size evolution in karst endemic flora of China. *New Phytologist*, 202, 1371–1381.
- Kay KM (2006) Reproductive isolation between two closely related humming bird pollinated neotropical gingers. *Evolution*, 60, 538–552.
- Klips RA (1999) Pollen competition as a reproductive isolation mechanism between two sympatric *Hibiscus* species (Malvaceae). *American Journal of Botany*, 86, 269–272.
- Liu RR, Pan B, Zhou TJ, Liao JP (2012) Cytological studies on *Primulina* taxa (Gesneriaceae) from limestone karsts in Guangxi Province, China. *Caryologia*, 65, 295–303.
- Luo ZL, Duan TT, Yuan S, Chen S, Bai XF, Zhang DX (2015) Reproductive isolation between sympatric sister species, *Mussaenda kwangtungensis* and *M. pubescens* var. *alba*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 57, 859–870.
- Martin NH, Willis JH (2007) Ecological divergence associated with mating system causes nearly complete reproductive isolation between sympatric *Mimulus* species. *Evolution*, 61, 68–82.
- Möller M, Wei YG, Wen F, Clark JL, Weber A (2016) You win some you lose some: updated generic delineations and classification of Gesneriaceae—implications for the family in China. *Guihaia*, 36, 44–60.
- Rhymer JM, Simberloff D (1996) Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 27, 83–109.
- Snow AA, Spira TP (1996) Pollen-tube competition and male fitness in *Hibiscus moscheutos*. *Evolution*, 50, 1866–1870.
- Sobel JM, Chen GF (2014) Unification of methods for estimating the strength of reproductive isolation. *Evolution*, 68, 1511–1522.
- Soltis PS, Soltis DE (2009) The role of hybridization in plant speciation. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 561–588.
- Wang WT, Pan KY, Li ZY, Weitzman AL, Skog LE (1998) Gesneriaceae. In: *Flora of China* (eds Wu ZY, Raven PH), pp. 244–401. Science Press, Beijing & Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.
- Wolf DE, Takebayashi N, Rieseberg LH (2001) Predicting the risk of extinction through hybridization. *Conservation Biology*, 15, 1039–1053.
- Xu SQ, Schlüter PM, Scopece G, Breikopf H, Gross K, Cozzolino S, Schiestl FP (2011) Floral isolation is the main reproductive barrier among closely related sexually deceptive orchids. *Evolution*, 65, 2606–2620.

(责任编辑: 黄双全 责任编辑: 时意专)

•研究报告•

# 铁角蕨科的多倍化与物种多样性形成

常艳芬\*

(中国科学院西双版纳热带植物园, 云南勐腊 666303)

**摘要:** 铁角蕨科植物约800种, 广布世界各地, 主产热带和亚热带地区。本文统计了铁角蕨科188种植物的细胞学资料, 发现167种植物具有多倍化现象, 占总种数的88.8%, 表明该类群植物中普遍存在多倍化事件。具有多倍化现象的物种中, 90种只有1种细胞型, 占总种数的47.9%; 77种具有种内多倍性, 即种下存在多个细胞型组合, 占总种数的41.0%。多倍体细胞倍性极其丰富, 有三倍体、四倍体、六倍体、八倍体、十倍体、十二倍体以及十六倍体。本文还对铁角蕨科多倍化现象与其物种多样性形成的关系进行了讨论, 同时对铁角蕨科多倍化研究中存在的问题进行了探讨。

**关键词:** 蕨类植物; 多倍化; 物种多样性; 网状进化; 无融合生殖

## Polyploidy and the formation of species diversity in Aspleniaceae

Yanfen Chang\*

Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Mengla, Yunnan 666303

**Abstract:** Ferns are considered to have the highest frequency of polyploidy in plants. Based on the published cytological data of 188 species, we analyzed the relationship between polyploidy and the formation of species diversity in the fern family Aspleniaceae, which comprises approximately 800 species. The results show that polyploids, including triploids, tetraploids, hexaploids, octoploids, decaploids, dodecaploids and hexadecaploids, have been documented in the family. Of the 188 Aspleniaceae species with cytological data, 88.8% exhibit polyploidy, 41.0% show intraspecific polyploidy and 47.9% are the result of polyploid speciation. In addition, the diverse ploidy levels suggest that these species have a complex evolutionary history and their taxonomic problems require further study. The perplexity and future directions of study of Aspleniaceae were also discussed.

**Key words:** Pteridophytes; polyploid; species diversity; reticulation; apomixes

多倍化指产生多倍体的过程, 通常包括同源多倍体和异源多倍体两种类型(Jackson, 1976; Grant, 1981; 洪德元, 1990)。多倍化为植物的物种进化提供了一个快速通道, 是植物最重要的遗传变异之一, 在植物的物种多样性形成中具有重要的意义(Grant, 1981; Rieseberg & Willis, 2007)。植物通过杂交产生的后代由于具有不同的基因组, 其染色体同源性较低, 在减数分裂时不能形成正常的配子体, 往往导致杂交后代不育; 即使后代可育, 也会由于染色体之间的同源性低, 表达的不协调以及核质互作等原因导致杂种衰退。然而, 如果杂交后代发生染色体

加倍, 则其染色体在减数分裂时就可以正常配对, 不仅可以避免杂种衰退, 而且亲本基因在形成合子后, 常常会发生基因重组或重排, 可以丰富物种的基因库并加速基因的突变频率, 使杂种后代形成杂种优势, 具有比亲本更强的适应性。因此, 杂交后的多倍化过程是非常重要的物种形成机制, 是所谓量子物种形成(quantum speciation)、同域物种形成(sympatric speciation)以及生态物种形成(ecological speciation)的重要原因(Rieseberg & Willis, 2007)。

蕨类植物的多倍体比例在植物界是最高的(王任翔等, 2007; Wood et al, 2009)。其中, 铁角蕨科就

收稿日期: 2017-04-13; 接受日期: 2017-06-28

基金项目: 国家自然科学基金(31500171)和生物标本馆经典分类学青年人才项目(ZSBR-008)

\* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: cyf@xtbg.org.cn



因有着丰富的多倍化现象而成为研究蕨类植物物种形成和进化机制的模式类群(Wagner, 1954; Lovis, 1977; Reichstein, 1981; Werth et al, 1985)。该类群物种丰富, 广布世界各地, 主产热带和亚热带地区, 由700余种的铁角蕨属(*Asplenium*)和约30种的膜叶铁角蕨属(*Hymenasplenium*)组成, 共约800种(吴兆洪, 1999; Lin & Viane, 2012; 张宪春, 2012; 张宪春等, 2013)。该类群中多倍体倍性最高达到了16倍, 是蕨类植物细胞倍性水平最高的类群(Braithwaite, 1986)。迄今为止, 我们对多倍化与铁角蕨科中物种多样性形成的关系还知之甚少。

本文介绍了铁角蕨科植物中多倍化的研究现状, 并对该类群植物中多倍化与物种多样性形成的关系进行了探讨, 同时对铁角蕨科植物多倍化研究中存在的问题及未来的研究方向进行了讨论, 旨在进一步推动铁角蕨科植物的物种起源与分化及其演化规律的研究。

## 1 材料与方法

通过收集和整理Tropicos (<http://www.tropicos.org>)数据库中记载的铁角蕨科植物的染色体数目信息, 以及查阅相关的文献及著作(Kato et al, 1992; Cheng & Zhang, 2010; Lin & Viane, 2012; Liu et al, 2012), 得到铁角蕨科植物中已有报道的细胞学数据。为便于分析, 本文将种下分类群的细胞学数据处理到种级分类群的数据。

## 2 结果

### 2.1 铁角蕨科植物的多倍化情况

据整理, 铁角蕨科中共有188种植物有细胞学数据(附录1)。其中167种具有多倍化现象, 占总种数的88.8%; 21种为二倍体种, 占总种数的11.2%。多倍化的倍性多样, 有三倍体、四倍体、六倍体、八倍体、十倍体、十二倍体以及十六倍体。167种具有多倍化的物种中, 90种具单一倍性(种下仅有单一细胞型), 占总种数的47.9%, 其中四倍体种最多, 有67种; 三倍体种有2种; 六倍体种有11种; 八倍体种有9种; 十倍体种有1种。

### 2.2 种内多倍性

铁角蕨科具有多倍化现象的167种中, 77种具有种内多倍性, 即种下存在多个细胞型, 占总种数的41.0%。其中, 具有2种细胞型的有57种, 最普遍

的是二倍体和四倍体的组合, 有33种; 其他具有2种细胞型组合的还有二倍体和三倍体(或八倍体), 三倍体和四倍体(或六倍体), 四倍体和六倍体(或八倍体)以及八倍体和六倍体(或十六倍体)等的组合。具有3种细胞型的有16种, 分别是二倍体、三倍体和四倍体, 二倍体、四倍体和六倍体(或八倍体和十二倍体), 以及四倍体、六倍体(或八倍体和十二倍体)。具有4种细胞型的有4种, 其中, 药蕨(*Asplenium ceterach*)和铁角蕨(*A. trichomanes*)具有二倍体、三倍体、四倍体及六倍体, 倒挂铁角蕨(*A. normale*)中含有二倍体、四倍体、六倍体及八倍体, *A. aethiopicum*中含有四倍体、八倍体、十二倍体及十六倍体。

### 2.3 无融合生殖及非整倍体

铁角蕨科中43种植物有繁殖方式的记录, 其中10种存在无融合生殖, 占比为23.3%, 其余均行有性生殖。然而, 在膜叶铁角蕨属中, 18种植物中就有5种具有无融合生殖方式, 占比高达28%。在这些无融合生殖的类群中, 三倍体是最多的。例如膜叶铁角蕨属中的三倍体均为行无融合生殖的类群, 如齿果膜叶铁角蕨(*Hymenasplenium cheilosorum*)、东亚膜叶铁角蕨(*H. hondoense*)、无配膜叶铁角蕨(*H. apogamum*)和荫湿膜叶铁角蕨(*H. obliquissimum*); 铁角蕨属的*A. curtissii*、*A. dentatum*和*A. monanthes*的三倍体也行无融合生殖。

铁角蕨属中, 大部分物种的染色体基数为  $x = 36$ , 而在*Asplenium centrafricanum*、*A. diplazisorum*、*A. loxoscaphoides*、*A. rutifolium*、*A. sertularioides*、以及*A. theciferum*中的染色体数目均为 $x = 35$ 的整数, 染色体基数为 $x = 36$ 的非整倍体变异。在膜叶铁角蕨属中, 大多数物种的染色体基数为 $x = 39$ , 而在*Hymenasplenium subnormale*中出现了例外, 染色体基数为 $x = 38$ 。

## 3 讨论

### 3.1 铁角蕨科的多倍化与物种多样性形成

多倍化是植物物种多样性形成的一个重要过程(Rieseberg & Willis, 2007)。种子植物中多倍体种的比例是15%, 蕨类植物中多倍体种的比例高达31% (Wood et al, 2009)。而在有细胞学数据记录的188种铁角蕨科植物中, 90种为单一倍性的多倍体种, 占总种数的47.9%。由此可见, 多倍化成种在铁角蕨科植物的物种多样性形成中具有重要作用。



铁角蕨科中大量的多倍体种的形成可能与其地理分布有关。Manton (1959)对蕨类植物多倍体种分布的研究结果显示, 欧洲温带地区的多倍体种的比例均不到50%, 而非洲热带和美洲热带地区分布的多倍体种比例均超过60%。Wood等(2009)对美洲热带地区木本植物多倍体种分布的研究也得到相似的结果。铁角蕨科植物主要分布于热带地区, 该地区生物多样性异常丰富, 物种可能产生更多的变异来提供重组机会, 从而有助于形成更多的物种(Haufler et al, 2000; Haufler, 2002; Hendry, 2009)。另外, 有研究认为, 极端生境条件也是多倍化产生的重要因素(洪德元, 1990)。铁角蕨科植物广泛分布在世界各地, 多为石生或附生, 其普遍的多倍化现象也可能与其特殊生境有关。

### 3.2 铁角蕨科的种内多倍化与物种多样性形成

铁角蕨科中41.0%的物种中存在种内多倍性, 这些物种不是单型种, 而是复杂的复合体种, 种间除了具有不同的细胞倍性, 还常常在形态特征、生境、生殖方式等方面也存在变异。另外, 这些复合体种中的多倍化常常与杂交共同作用, 形成的杂种由于具有两个亲本的基因组, 形态特征常介于两个亲本之间, 形成中间过渡形态, 使种与种之间形成复杂的网状进化关系, 种间界限变得模糊不清。研究这些复合体种的种间关系及物种分类异常困难。目前为止, 只有少量的复合体种得到了比较详细的研究。

例如, 北美分布的Appalachian铁角蕨复合体是铁角蕨科中著名的研究网状进化的例子。该复合体种涉及11个分类群, 由3个二倍体祖先种*A. montanum*、*A. rhizophyllum*和*A. platyneuron*相互杂交, 随后发生多倍化并回交, 最终形成二倍体杂种*A. ebenoides*, 以及异源四倍体种*A. gravesii*、*A. pinatifidum*、*A. ebenoides*、*A. bradleyi*和三倍体种*A. trudellii*、*A. bradleyi*、*A. kentuckiense*。这些类群相互之间又会进行新一轮的杂交, 最后形成错综复杂的网状进化关系(Wagner, 1954; Werth et al, 1985)。铁角蕨复合体(*A. trichomanes* complex)由祖先二倍体的原亚种铁角蕨(*A. t. subsp. trichomanes*)和喜钙亚种(*A. t. subsp. inexpectans*)杂交或自行加倍, 衍生出异源四倍体亚种*A. t. subsp. quadrivalen*、*A. t. subsp. hastatum*, 以及同源四倍体粗轴亚种(*A. t. subsp. pachyrachis*); 这些四倍体种和另一个四倍体

*A. t. subsp. coriaceifolium*进行杂交组合再产生四倍体*A. t. nothosubsp. lovisianum*、*A. t. nothosubsp. moravicum*和*A. t. nothosubsp. staufferi* (Lovis, 1964; Bennert & Fischer, 1993; 侯鑫和王中仁, 2000; Ekrt & Stech, 2008)。目前的分子证据提示东亚分布的三翅铁角蕨(*A. tripteropus*)和产太平洋岛屿的*A. anceps*可能也属于铁角蕨复合体, 但它们与铁角蕨复合体其他类群之间的演化关系还需要进一步的研究(Schneider et al, 2004, 2013)。分布于亚洲的华中铁角蕨复合体(*A. sarelii* complex)由3个基本的二倍体祖先种, 即华中铁角蕨(*A. sarelii*)、细茎铁角蕨(*A. tenuicaule*)和庐山铁角蕨(*A. lushanense*)经过自身染色体加倍, 形成同源四倍体北京铁角蕨(*A. pekinense*)、变异铁角蕨(*A. varians*)和云南铁角蕨(*A. yunnanense*), 这些类群间进一步杂交衍生出新的分类群, 最终使华中铁角蕨复合体的成员达到13个之多(Wang et al, 2003)。

另外, 巢蕨(*Asplenium nidus*)也可能是一个复杂的复合体种, 该复合种内也存在复杂的杂交及多倍化过程, 并存在至少6个隐存种, 因此导致对该类群进行分类学研究异常困难(Yatabe et al, 2001, 2009; Yatabe & Murakami, 2003); 药蕨复合体(*Asplenium ceterach* complex)的多倍体类群*A. aureum*、*A. hybridumhas*、*A. lolegnamense*、*A. punjabense*以及*A. octoploideum*等为异源多倍体, 它们的起源也与网状进化紧密相连(Pinter et al, 2002; van den Heede et al, 2003); 新西兰产澳大利亚铁角蕨类群(Austral group)的8个八倍体类群中至少有7个来源于7个四倍体类群的杂交组合(Shepherd et al, 2008); *A. monanthes* complex复合体和倒挂铁角蕨复合体(*A. normale* complex)中也存在着复杂的网状进化(Dyer et al, 2012; Chang et al, 2013)。这些复合体种的物种分类及网状进化关系还需要进一步研究。

相对于铁角蕨科内广泛存在的多倍化和网状进化事件, 上述研究揭示的可能还只是冰山一角。研究网状进化关系的关键是阐明复合体种内多倍体类群的起源, 然而, 由于选择压力、遗传漂变等因素的影响, 多倍体种与祖先种的性状常常有明显间断, 甚至有的祖先种已灭绝, 导致研究异常困难。由于铁角蕨科中存在大量的杂交和多倍化事件, 因此, 只有阐明了多倍化在铁角蕨科的分布和复杂程度及其对该类群系统演化的影响, 才能阐明其演

化历史,并最终得到一个可以被广泛接受的铁角蕨科系统。

### 3.3 铁角蕨科的非整倍性及无融合生殖与物种多样性形成

染色体的非整倍体变异是植物进化的一个重要过程(Bellefroid et al, 2010)。膜叶铁角蕨属中少数物种的染色体基数为 $x = 38$  (Mitui et al, 1989; Cheng & Murakami, 1998),可能是由染色体基数为 $x = 39$ 的祖先核型演化而来,而铁角蕨属中少数物种的染色体基数为 $x = 35$ ,则可能是由染色体基数为 $x = 36$ 的祖先核型演化而来(Bellefroid et al, 2010),而且非整倍体变异可能在铁角蕨科中发生了多次起源,可能是促进该类群植物物种分化的原因之一(Bellefroid et al, 2010)。

蕨类植物的无融合生殖是指未经受精的配子体直接发育成孢子体(洪德元, 1990; Grusz, 2016)。据统计,蕨类植物中约10%的物种存在无融合生殖,该比例远远高于种子植物的不到1% (van den Heede et al, 2003; Liu et al, 2012)。而铁角蕨科中的无融合生殖类群所占比例更高。因此,无融合生殖方式可能在铁角蕨科植物的进化过程中发挥着巨大的作用。而且,在铁角蕨科无融合生殖的类群中,三倍体行无融合生殖是最多的。所以,有必要对三倍体的物种形成与无融合生殖的关系进行深入的研究。另外,目前对铁角蕨科中一些具有无融合生殖的类群研究发现,大多无融合生殖类群虽然是行无性生殖却具有较高的遗传变异,它们常常与其他无融合生殖类群或有性生殖类群形成复杂的网状进化关系,或形成复杂的复合体种,例如*A. resiliens*、*A. palmeri*、*A. hallbergii*和*A. monanthes* complex (Ebihara et al, 2005; Grusz et al, 2009; Dyer et al, 2012; Hori et al, 2014)。因此,无融合生殖可能与铁角蕨科的物种多样性形成具有密切的关系。

### 3.4 铁角蕨科多倍化研究中存在的问题

#### 3.4.1 研究不够充分

有研究指出,热带地区多样性异常丰富,物种可能产生更多的变异来提供重组机会(Haufler et al, 2000; Haufler, 2002; Hendry, 2009),因此,分布于热带地区的铁角蕨科植物的多倍体数目可能会更多,其多倍化程度可能比我们想象的要复杂得多。然而,目前对铁角蕨科的细胞学和系统学研究大多基于欧洲和北美的类群。因此,要详细了解铁角蕨

科的多倍化情况,还需要进一步扩大对该类群的研究范围。

#### 3.4.2 形态分类和物种鉴定困难

铁角蕨科中丰富的细胞倍性暗示着该类群可能具有复杂的进化历史,复合体种中可能还存在隐存种(Yatabe et al, 2001, 2009; Yatabe & Murakami, 2009; Chang et al, 2013),这些类群的物种分类还需要进一步的澄清。目前对铁角蕨科植物的物种分类研究主要基于形态学。然而,大量的杂交和多倍化事件导致该类群植物形态变异较大,性状重叠,而且形态性状经历了多次起源(Murakami et al, 1999; Schneider et al, 2004; 顾钰峰等, 2014)。只靠形态特征对铁角蕨科进行物种分类研究容易产生分类学上的混乱。因此,除了形态特征外,研究该类群的物种分类还需要综合考虑其他方面的证据,例如分类群的细胞学特征、遗传学特征和地理分布格局等。

#### 3.4.3 网状进化研究困难

多倍化及网状进化在铁角蕨科的进化中起到了至关重要的作用。只有充分了解铁角蕨科中的多倍化事件,并深入研究其物种间的网状进化关系,才能真正认识该类群的物种分类及物种间复杂的演化关系。然而,目前对铁角蕨科系统发育的研究大多基于叶绿体基因组的DNA序列(Schneider et al, 2013)。叶绿体基因组进化速率缓慢,很难用于解决种下水平分类群间的系统发育关系及研究最近发生的进化事件(Sang & Zhong, 2000; Brysting et al, 2007, 2011)。而核基因不仅进化速率快,且网状进化容易在单亲遗传的叶绿体基因片段和双亲遗传的核基因片段上以基因树冲突的形式表现出来(邹新慧和葛颂, 2008)。因此,要正确理解铁角蕨科的多倍化和网状进化,必须引入具有双亲遗传特性的核基因分子序列。近来有研究显示,单(低)拷贝核基因片段在揭示铁角蕨科网状进化事件时起到了关键作用(Dyer et al, 2012; Chang et al, 2013; Schneider et al, 2013),特别是通过多个单(低)拷贝核基因序列的联合使用,可以有效区分直系同源或旁系同源以及杂合态等位基因或祖先多态性等因素的影响,从而在探讨网状进化关系上十分有效(Schneider et al, 2013)。

### 参考文献

Bellefroid E, Rambe K, Leroux O, Viane R (2010) The base

- number of 'loxoscapoid' *Asplenium* species and its implication for cytoevolution in Aspleniaceae. *Annals of Botany*, 106, 157–171.
- Bennett HW, Fischer G (1993) Biosystematics and evolution of the *Asplenium trichomanes* complex. *Webbia*, 48, 743–760.
- Braithwaite AF (1986) The *Asplenium aethiopicum* complex in South Africa. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 93, 343–378.
- Brysting AK, Mathiesen C, Marcussen T (2011) Challenges in polyploid phylogenetic reconstruction: a case story from the arctic-alpine *Cerastium alpinum* complex. *Taxon*, 60, 333–347.
- Brysting AK, Oxelman B, Huber KT, Moulton V, Brochmann C (2007) Untangling complex histories of genome mergings in high polyploids. *Systematic Biology*, 56, 467–476.
- Chang YF, Li J, Lu SG, Schneider H (2013) Species diversity and reticulate evolution in the *Asplenium normale* complex (Aspleniaceae) in China and adjacent areas. *Taxon*, 62, 673–687.
- Cheng X, Murakami N (1998) Cytotaxonomic study of genus *Hymenasplenium* (Aspleniaceae) in Xishuangbanna, southwestern China. *Journal of Plant Research*, 111, 495–500.
- Cheng X, Zhang SZ (2010) Index to chromosome numbers of Chinese Pteridophyta (1969–2009). *Journal of Fairylake Botanic Garden*, 9, 1–58.
- Dyer RJ, Savolainen V, Schneider H (2012) Apomixis and reticulate evolution in the *Asplenium monanthes* fern complex. *Annals of Botany*, 110, 1515–1529.
- Ebihara A, Ishikawa H, Matsumoto S, Lin SU, Iwatsuki K, Takamiya M, Watano Y, Ito M (2005) Nuclear DNA, chloroplast DNA, and ploidy analysis clarified biological complexity of the *Vandenboschia radicans* complex (Hymenophyllaceae) in Japan and adjacent areas. *American Journal of Botany*, 92, 1535–1547.
- Ekrt L, Stech M (2008) A morphometric study and revision of the *Asplenium trichomanes* group in the Czech Republic. *Preslia*, 80, 325–347.
- Grant V (1981) *Plant Speciation*, pp. 273–317. Columbia University Press, New York.
- Grusz AL (2016) A current perspective on apomixis in ferns. *Journal of Systematics and Evolution*, 54, 656–665.
- Grusz AL, Windham MD, Pryer KM (2009) Deciphering the origins of apomictic polyploids in the *Cheilanthes yavapensis* complex (Pteridaceae). *American Journal of Botany*, 96, 1636–1645.
- Gu YF, Wei HJ, Wei R, Dai XL, Yan YH (2014) *Diplazium × kidoi* Sa. Kurata, a newly recorded species of *Diplazium* (Athyriaceae) from China. *Plant Science Journal*, 32, 336–339. (in Chinese with English abstract) [顾钰峰, 韦宏金, 卫然, 戴锡玲, 严岳鸿 (2014) 中国双盖蕨属一新记录种—*Diplazium × kidoi* Sa. Kurata. *植物科学学报*, 32, 336–339.]
- Haufler CH (2002) Homospory 2002: an odyssey of progress in pteridophyte genetics and evolutionary biology. *BioScience*, 52, 1081–1093.
- Haufler CH, Hooper EA, Thierrien JP (2000) Modes and mechanisms of speciation in pteridophytes; implications of contrasting patterns in ferns representing temperate and tropical habitats. *Plant Species Biology*, 15, 223–236.
- Hendry AP (2009) Evolutionary biology: speciation. *Nature*, 458, 162–164.
- Hong DY (1990) *Plant Cytotaxonomy*. Science Press, Beijing. (in Chinese) [洪德元 (1990) 植物细胞分类学. 科学出版社, 北京.]
- Hori K, Tono A, Fujimoto K, Kato J, Ebihara A, Watano Y, Murakami N (2014) Reticulate evolution in the apogamous *Dryopteris varia* complex (Dryopteridaceae, subg. Erythrovariae, sect. Variae) and its related sexual species in Japan. *Journal of Plant Research*, 127, 661–684.
- Hou X, Wang ZR (2000) A subspecific taxonomic study on *Asplenium trichomanes* L. from China. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 38, 242–255. (in Chinese with English abstract) [侯鑫, 王中仁 (2000) 中国铁角蕨的种下分类学研究. *植物分类学报*, 38, 242–255.]
- Jackson RC (1976) Evolution and systematic significance of polyploidy. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 7, 209.
- Kato M, Nakato N, Cheng X, Iwatsuki K (1992) Cytotaxonomic study of ferns of Yunnan, southwestern China. *Journal of Plant Research*, 105, 105–124.
- Lin YX, Viane R (2012) Aspleniaceae. In: *Flora of China* (ed. Editorial Committee of Flora of China). Science Press, Beijing & Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.
- Liu HM, Dyer RJ, Guo ZY, Meng Z, Li JH, Schneider H (2012) The evolutionary dynamics of apomixis in ferns: a case study from polystichoid ferns. *Journal of Botany*, 2012, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/510478>.
- Lovis JD (1964) The taxonomy of *Asplenium trichomanes* in Europe. *British Fern Gazette*, 9, 147–160.
- Lovis JD (1977) Evolutionary patterns and processes in ferns. *Advances in Botanical Research*, 4, 229–415.
- Manton I (1959) Cytological information on the ferns of West Tropical Africa. In: *The Ferns and Fern Allies of West Tropical Africa* (ed. Alston AHG). Grown Agents, London.
- Mitui K, Murakami N, Iwatsuki K (1989) Chromosomes and systematics of *Asplenium* sect. *Hymenasplenium* (Aspleniaceae). *American Journal of Botany*, 76, 1689–1697.
- Murakami N, Nogami S, Watanabe M, Iwatsuki K (1999) Phylogeny of Aspleniaceae inferred from *rbcL* nucleotide sequences. *American Fern Journal*, 89, 232–243.
- Nyhus GC (1987) The subspecies of *Asplenium trichomanes* in Norway. *Blyttia*, 45, 12–24.
- Perrie LR, Brownsey PJ (2005) Insights into the biogeography and polyploid evolution of New Zealand *Asplenium* from chloroplast DNA sequence data. *American Fern Journal*, 95, 1–21.
- Pinter I, Bakker F, Barrett JA, Cox C, Gibby M, Henderson S, Morgan-Richards M, Rumsey F, Russell S, Trewick S, Schneider H, Vogel J (2002) Phylogenetic and biosystematic relationships in four highly disjunct polyploidy complexes in the subgenera *Ceterach* and *Phyllitis* in *Asplenium* (Aspleniaceae). *Organisms, Diversity and Evolution*, 2, 299–

- 311.
- Rasbach H, Rasbach K, Reichstein T, Bennert HW (1990) *Asplenium trichomanes* subsp. *coriaceifolium*, a new subspecies and two new intraspecific hybrids of the *A. trichomanes* complex (Aspleniaceae, Pteridophyta). I. Nomenclature and typification. *Willdenowia*, 19, 471–474.
- Rasbach H, Rasbach K, Reichstein T, Bennert HW (1991) *Asplenium trichomanes* subsp. *coriaceifolium*, a new subspecies and two new intraspecific hybrids of the *A. trichomanes* complex (Aspleniaceae, Pteridophyta). II. Description and illustrations. With an appendix on pairing behaviour of chromosomes in fern hybrids. *Willdenowia*, 21, 239–261.
- Reichstein T (1981) Hybrids in European Aspleniaceae (Pteridophyta). *Botanica Helvetica*, 91, 89–139.
- Rieseberg LH, Willis JH (2007) Plant speciation. *Science*, 317, 910–914.
- Sang T, Zhong Y (2000) Testing hybridization hypotheses based on incongruent gene trees. *Systematic Biology*, 49, 422–434.
- Schneider H, Navarro-gomez A, Russell SJ, Ansell S, Grundmann M, Vogel J (2013) Exploring the utility of three nuclear regions to reconstruct reticulate evolution in the fern genus *Asplenium*. *Journal of Systematics and Evolution*, 51, 142–153.
- Schneider H, Russell SJ, Cox CJ, Bakker F, Henderson S, Rumsey F, Barrett J, Gibby M, Vogel JC (2004) Chloroplast phylogeny of asplenoid ferns based on *rbcL* and *trnL-F* spacer sequences (Polypodiidae, Aspleniaceae) and its implications for biogeography. *Systematic Botany*, 29, 260–274.
- Shepherd LD, Perrie LR, Brownsey PJ (2008) Low copy nuclear DNA sequences reveal a predominance of allopolyploids in a New Zealand *Asplenium* fern complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49, 240–248.
- Tigerschild E (1981) The *Asplenium trichomanes* complex in East Central Sweden. *Nordic Journal of Botany*, 1, 12–16.
- van den Heede CG, Viane R, Chase MW (2003) Phylogenetic analysis of *Asplenium* subgenus *Ceterach* (Pteridophyta: Aspleniaceae) based on plastid and nuclear ribosomal ITS DNA sequences. *American Journal of Botany*, 90, 481–495.
- Vogel JC, Russell SJ, Barrett SA, Gibby M (1996) A noncoding region of chloroplast DNA as a tool to investigate reticulate evolution in European *Asplenium*. In: *Pteridology in Perspective* (eds Camus JM, Johns RJ, Gibby M). Royal Botanic Garden, Kew, Richmond.
- Wagner WH (1954) Reticulate evolution in the Appalachian *Asplenium*. *Evolution*, 8, 103–118.
- Wang RX, Lu SG, Deng XC (2007) Cytotaxonomic studies of the Chinese pteridophytes: a review. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 45, 98–111. (in Chinese with English abstract) [王任翔, 陆树刚, 邓晰朝 (2007) 中国蕨类植物细胞分类学研究概况. *植物分类学报*, 45, 98–111.]
- Wang ZR, Zhang F, Hou X (2003) A biosystematic study on *Asplenium sarelii* complex. *Acta Botanica Sinica*, 45, 1–14.
- Werth CR, Guttman SI, Eshbaugh WH (1985) Recurring origins of allopolyploid species in *Asplenium*. *Science*, 228, 731–733.
- Wood TE, Takebayashi N, Barker MS, Mayrose I, Greenspoon PB, Rieseberg LH (2009) The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 106, 13875–13879.
- Wu ZH (1999) Aspleniaceae. In: *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* (ed. Editorial Committee of Flora Reipublicae Popularis Sinicae, Chinese Academy of Sciences), Tomus, 4(2). Science Press, Beijing. (in Chinese) [吴兆洪 (1999) 铁角蕨科. 见: 中国植物志(中国科学院中国植物志编辑委员会编), 4(2). 科学出版社, 北京.]
- Yatabe Y, Masuyama S, Darnaedi D, Murakami N (2001) Molecular systematics of the *Asplenium nidus* complex from Mt. Halimun National Park, Indonesia: evidence for reproductive isolation among three sympatric *rbcL* sequence types. *American Journal of Botany*, 88, 1517–1522.
- Yatabe Y, Murakami N (2003) Recognition of cryptic species in the *Asplenium nidus* complex using molecular data—a progress report. *Telopea*, 10, 487–496.
- Yatabe Y, Shonohara W, Matsumoto S, Murakami N (2009) Patterns of hybrid formation among cryptic species of bird-nest fern, *Asplenium nidus* complex (Aspleniaceae), in West Malesia. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 160, 42–63.
- Zhang XC (2012) *Lycophytes and Ferns from China*. Peking University Press, Beijing. (in Chinese) [张宪春 (2012) 中国石松类和蕨类植物. 北京大学出版社, 北京.]
- Zhang XC, Wei R, Liu HM, He LJ, Wang L, Zhang G (2013) Phylogeny and classification of the extant lycophytes and ferns from China. *Chinese Bulletin of Botany*, 48, 119–137. (in Chinese with English abstract) [张宪春, 卫然, 刘红梅, 何丽娟, 王丽, 张钢 (2013) 中国现代石松类和蕨类的系统发育与分类系统. *植物学报*, 48, 119–137.]
- Zou XH, Ge S (2008) Conflicting gene trees and phylogenomics. *Journal of Systematics and Evolution*, 46, 795–807. (in Chinese with English abstract) [邹新慧, 葛颂 (2008) 基因树冲突与系统发育基因组学研究. *植物分类学报*, 46, 795–807.]

(责任编辑: 严岳鸿 责任编辑: 闫文杰)

## 附录 Supplementary Material

### 附录1 188种铁角蕨科植物的染色体数目、细胞倍性和繁殖方式

Appendix 1 Chromosome number and ploidy levels of the 188 Aspleniaceae species

<http://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2017117-1.pdf>

常艳芬. 铁角蕨科的多倍化与物种多样性形成. 生物多样性, 2017, 25 (6): 621–626.  
http://www.biodiversity-science.net/CN/10.17520/biods.2017117

附录1 188种铁角蕨科植物的染色体数目、细胞倍性和繁殖方式(√表示只有细胞倍性记录, 没有染色体数目计数; S表示有性生殖; A表示无融合生殖)

Appendix 1 Chromosome number and ploidy levels of the 188 Aspleniaceae species. √ Chromosome counts are not available but with ploidy level recorded; S, sexual reproduction; A, apomictic reproduction.

种名 Species	S/A	2X	3X	4X	6X	8X	10X	12X	16X
<i>Asplenium abscissum</i>		72							
黑色铁角蕨 <i>A. adiantum-nigrum</i>				√	√				
合生铁角蕨 <i>A. adnatum</i>				√					
<i>A. adulterinum</i>				144					
<i>A. aethiopicum</i>				144		288		√	√
匙形铁角蕨 <i>A. affine</i>						√			
西部铁角蕨 <i>A. aitchisonii</i>				√	√				
阿尔泰铁角蕨 <i>A. altaicense</i>				√					
<i>A. alternifolium</i>			108	144					
<i>A. anceps</i>	S	72		144					
广布铁角蕨 <i>A. anogrammoides</i>				√					
大鳞巢蕨 <i>A. antiquum</i>				√					
狭翅巢蕨 <i>A. antrophyoides</i>				√					
黑鳞铁角蕨 <i>A. asterolepis</i>				√					
<i>A. aureum</i>	A			144	216	288			
<i>A. auritum</i>	A	72		144					
<i>A. australasicum</i>				144					
华南铁角蕨 <i>A. austrochinense</i>				√		√			
<i>A. azomanes</i>				144					
<i>A. azoricum</i>				144					
<i>A. balearicum</i>		72							
<i>A. belangeri</i>				144					
<i>A. billotii</i>				144					
<i>A. bradleyi</i>				√					
<i>A. bulbiferum</i>				144					
大盖铁角蕨 <i>A. bullatum</i>				√		√			
<i>A. capense</i>		72							
线柄铁角蕨 <i>A. capillipes</i>	S	√		√					
东海铁角蕨 <i>A. castaneoviride</i>				144					
高加索铁角蕨 <i>A. caucasicum</i>	S	72		√					
<i>A. caudatum</i>				144					
<i>A. centrafricanum</i>				140					
药蕨 <i>A. ceterach</i>		√	√	√	√				
<i>A. chathamense</i>				144					
<i>A. chihuahuense</i>					216				
<i>A. cimmeriorum</i>						288			
<i>A. claussenii</i>		72							
<i>A. cordatum</i>		72		144					
线裂铁角蕨 <i>A. coenobiale</i>				√					
壮乡铁角蕨 <i>A. cornutissimum</i>				√					
毛轴铁角蕨 <i>A. crinicaule</i>				√		√		√	
<i>A. cristatum</i>	S	72		144					
乌来铁角蕨 <i>A. cuneatifforme</i>				√					
<i>A. curtissii</i>	A		108						
<i>A. cyprium</i>					216				
苍山蕨 <i>A. dalhousiae</i>	S	√		√					
<i>A. decrescens</i>				144					
水鳖蕨 <i>A. delavayi</i>				√					
<i>A. dentatum</i>	A	72	108						
<i>A. diplazisorum</i>				144					
圆叶铁角蕨 <i>A. dolomiticum</i>	S	72		144					
<i>A. dolosum</i>					216				

种名 Species	S/A	2X	3X	4X	6X	8X	10X	12X	16X
<i>A. ebenoides</i>		72		144					
剑叶铁角蕨 <i>A. ensiforme</i>				√					
<i>A. erectum</i>		72							
云南铁角蕨 <i>A. exiguum</i>				√					
网脉铁角蕨 <i>A. finlaysonianum</i>				√		√			
<i>A. fissum</i>		72							
<i>A. flabellifolium</i>				√	√			√	
<i>A. flaccidum</i>				144					
西藏铁角蕨 <i>A. fontanum</i>	S	√		√					
<i>A. foresiense</i>	S			144					
南海铁角蕨 <i>A. formosae</i>				√					
易变铁角蕨 <i>A. fugax</i>				√					
腺齿铁角蕨 <i>A. glanduliserrulatum</i>				√					
<i>A. goudeyi</i>				√					
<i>A. grevillei</i>		72							
厚叶铁角蕨 <i>A. griffithianum</i>	S	72		144				√	
撕裂铁角蕨 <i>A. gueinzianum</i>				√					
海南铁角蕨 <i>A. hainanense</i>			√	√					
<i>A. haughtonii</i>				√					
<i>A. haussknechtii</i>				144					
<i>A. helii</i>	S	72							
<i>A. hemionitis</i>		72							
<i>A. heterochroum</i>				144	216				
<i>A. hindusthanensis</i>		72							
<i>A. hobdyi</i>				√					
江南铁角蕨 <i>A. holosorum</i>				√	√				
<i>A. hostmannii</i>			108	144					
扁柄巢蕨 <i>A. humbertii</i>					√				
<i>A. hybridum</i>		72							
<i>A. inaequilaterale</i>	S	72		144					
虎尾铁角蕨 <i>A. incisum</i>	S	√		√					
胎生铁角蕨 <i>A. indicum</i>	S	√		√		√			
<i>A. indopakistanicum</i>		72							
贵阳铁角蕨 <i>A. interjectum</i>	S	√		√					
<i>A. juglandifolium</i>				144					
对开蕨 <i>A. komarovii</i>		√		√					
新疆铁角蕨 <i>A. kukkonenii</i>				√					
<i>A. lepidum</i>				144					
<i>A. loxoscaphoides</i>				140					
庐山铁角蕨 <i>A. lushanense</i>	A	√		√					
<i>A. macilentum</i>						288			√
大叶苍山蕨 <i>A. magnificum</i>						√			
<i>A. majoricum</i>				144					
<i>A. marinum</i>		72							
<i>A. milnei</i>				144					
<i>A. monanthes</i>	A		108		216				
<i>A. montanum</i>		72							
<i>A. morganii</i>			108						
<i>A. murbeckii</i>	S			144					
巢蕨 <i>A. nidus</i>				√	√				
倒挂铁角蕨 <i>A. normale</i>	S	√		√	√	√			
黑鳞巢蕨 <i>A. oblanceolatum</i>				√					
<i>A. obovatum</i>	S	72		144					
<i>A. onopteris</i>	S	72		144					
<i>A. pagesii</i>	S				216				
<i>A. paleaceum</i>				144					

种名 Species	S/A	2X	3X	4X	6X	8X	10X	12X	16X
疏脉苍山蕨 <i>A. paucivenosum</i>				√					
北京铁角蕨 <i>A. pekinense</i>				√					
<i>A. petersenii</i>				144					
<i>A. petrarchae</i>	S	72	108	144					
<i>A. phillipsianum</i>		72							
长叶巢蕨 <i>A. phyllitidis</i>				√					
<i>A. pinnatifidum</i>				144					
<i>A. platyneuron</i>		72							
<i>A. plenum</i>				√					
镰叶铁角蕨 <i>A. polyodon</i>					√		√		
长叶铁角蕨 <i>A. prolongatum</i>				√					
<i>A. protomajoricum</i>				144					
假大羽铁角蕨 <i>A. pseudolaserpitiifolium</i>						√			
斜裂铁角蕨 <i>A. pseudopraemorsum</i>				√					
叶基宽铁角蕨 <i>A. pulcherrimum</i>				√					
<i>A. pumilum</i>		72							
<i>A. punjabense</i>					216				
<i>A. radicans</i>		72				288			
<i>A. recoderi</i>			108		216				
<i>A. reichsteinii</i>		72	108						
<i>A. resiliens</i>					216				
<i>A. rhizophyllum</i>		√							
骨碎补铁角蕨 <i>A. ritoense</i>				√					
瑞丽铁角蕨 <i>A. rockii</i>					√				
<i>A. rosselloi</i>		72				288			
<i>A. rouyi</i>				144					
过山蕨 <i>A. ruprechtii</i>	S	√		√					
卵叶铁角蕨 <i>A. ruta-muraria</i>				√					
<i>A. rutifolium</i>				140		280			
<i>A. salicifolium</i>						288			
<i>A. samarkandense</i>				144					
岭南铁角蕨 <i>A. sampsonii</i>							√		
华中铁角蕨 <i>A. sarelii</i>	S	72		144					
<i>A. scolopendrium</i>		√							
狭叶铁角蕨 <i>A. scortechinii</i>				√	√			√	
近变异铁角蕨 <i>A. semivarians</i>	S	√		√					
叉叶铁角蕨 <i>A. septentrionale</i>	S	√		√					
<i>A. serra</i>						288			
<i>A. serratum</i>				144		288			
<i>A. sertularioides</i>				140					
<i>A. simplicifrons</i>				144					
<i>A. sleepiae</i>		72				288			
<i>A. souchei</i>				144		288			
<i>A. subhastatum</i>						288			
<i>A. surrogatum</i>		72							
<i>A. tabulense</i>				√					
膜连铁角蕨 <i>A. tenerum</i>				√					
细茎铁角蕨 <i>A. tenuicaule</i>	S	√		√					
细裂铁角蕨 <i>A. tenuifolium</i>	S	72		144					
<i>A. theciferum</i>				140		280		√	
<i>A. ticinense</i>		72	108						
铁角蕨 <i>A. trichomanes</i>	S	√	√	√	√				
台南铁角蕨 <i>A. trigonopterum</i>						√			
三翅铁角蕨 <i>A. tripteropus</i>	S	√		√					
<i>A. triquetrum</i>				144					
<i>A. troodeum</i>					√				



常艳芬. 铁角蕨科的多倍化与物种多样性形成. 生物多样性, 2017, 25 (6): 621–626.  
<http://www.biodiversity-science.net/CN/10.17520/biods.2017117>

种名 Species	S/A	2X	3X	4X	6X	8X	10X	12X	16X
<i>A. trudellii</i>			108						
<i>A. ulbrichtii</i>				144					
变异铁角蕨 <i>A. varians</i>	S	√		√					
欧亚铁角蕨 <i>A. viride</i>	S	√		√	√				
狭翅铁角蕨 <i>A. wrightii</i>						√	√	√	
<i>A. wudangense</i>				144					
<i>A. × artanense</i>		72		144					
<i>A. × centovallense</i>				144					
<i>A. × diasii</i>					216				
<i>A. × sarniense</i>		72		144	216				
<i>A. × sollerense</i>				144					
<i>A. × tyrrhenicum</i>		72							
棕鳞铁角蕨 <i>A. yoshinagae</i>						√			
无配膜叶铁角蕨 <i>H. apogamum</i>	A/S		117	156					
细辛膜叶铁角蕨 <i>H. cardiophyllum</i>	S	√		√					
齿果膜叶铁角蕨 <i>H. cheilosorum</i>	S	√	√	√					
切边膜叶铁角蕨 <i>H. excisum</i>	S	√		√					
东亚膜叶铁角蕨 <i>H. hondoense</i>	A/S		√	√					
单边膜叶铁角蕨 <i>H. murakami-hatanakae</i>		√							
荫湿膜叶铁角蕨 <i>H. obliquissimum</i>	A/S	√	√	√					
绿杆膜叶铁角蕨 <i>H. obscurum</i>		√		√					
尖峰岭膜叶铁角蕨 <i>H. pseudobscurum</i>		√		√					
小膜叶铁角蕨 <i>H. subnormale</i>		76		152					
<i>H. unilaterale</i>		√	√	√					

•研究报告•

# 结合分子手段和形态分析验证大白杜鹃与马缨杜鹃的自然杂交

郑硕理<sup>1,2</sup> 田晓玲<sup>3</sup> 黄承玲<sup>3</sup> 王灵军<sup>4</sup> 冯元<sup>4</sup> 张敬丽<sup>1\*</sup>

1 (云南农业大学园林园艺学院, 昆明 650201)

2 (湖南省森林植物园, 长沙 410116)

3 (贵州民族大学人文科技学院, 贵阳 550025)

4 (贵州百里杜鹃科研所, 贵州毕节 551518)

**摘要:** 中国西南地区是世界杜鹃属(*Rhododendron*)植物的分布和分化中心, 开展杜鹃属自然杂交研究可为分类修订和新品种选育提供依据。本文以贵州百里杜鹃自然保护区(百里保护区)和云南石宝山分布的大白杜鹃(*Rhododendron decorum*)、马缨杜鹃(*R. delavayi*)及两种间疑似自然杂交后代和人工杂交后代个体为研究材料, 通过形态特征比较、核基因间隔序列ITS以及叶绿体基因片段 $trnL-trnF$ 、 $rbcL$ 和 $trnH-psbA$ 测序特征分析, 发现疑似自然杂交后代与人工杂交后代形态特征介于大白杜鹃与马缨杜鹃之间; 4个DNA片段序列均能区分大白杜鹃和马缨杜鹃, 同一物种的不同居群在叶绿体基因片段 $rbcL$ 、 $trnH-psbA$ 序列存在差异位点; 所有人工杂交后代个体和1个石宝山疑似杂交个体均以大白杜鹃为母本, 所有百里保护区疑似杂交个体和6个石宝山疑似杂交个体以马缨杜鹃为母本。本研究证实了大白杜鹃与马缨杜鹃在百里保护区和云南石宝山存在自然杂交现象, 杂交为双向且自然杂交后代绝大多数以马缨杜鹃为母本。

**关键词:** 杜鹃属; 自然杂交; 形态特征; DNA序列

## Molecular and morphological evidence for natural hybridization between *Rhododendron decorum* and *R. delavayi* (Ericaceae)

Shuoli Zheng<sup>1,2</sup>, Xiaoling Tian<sup>3</sup>, Chengling Huang<sup>3</sup>, Lingjun Wang<sup>4</sup>, Yuan Feng<sup>4</sup>, Jingli Zhang<sup>1\*</sup>

1 College of Landscape and Gardening, Yunnan Agriculture University, Kunming 650201

2 Hunan Forest Botanical Garden, Changsha 410116

3 College of Humanities &amp; Science, Guizhou Minzu University, Guiyang 550025

4 Institute of Guizhou Baili Rhododendron, Bijie, Guizhou 551518

**Abstract:** The southwestern region of China is the center of differentiation for the genus *Rhododendron*. Studies on the natural hybridization of *Rhododendron* provide solutions for taxonomic problems and enhance the ability to breed new cultivars faster. In this paper, we compared the morphological features and sequenced nuclear internal transcribed spacer (ITS) and chloroplast  $trnL-trnF$ ,  $rbcL$ ,  $trnH-psbA$  for *Rhododendron decorum*, *R. delavayi*, and the putative hybrid offspring of these two species. All samples in this study were collected from Baili Rhododendron Nature Reserve in Guizhou Province, the Shibao Mountain of Yunnan Province and Kunming Botanical Garden. Results showed that all putative hybrids (natural and artificial) produced an intermediate morphology. Sequencing results revealed that all artificial hybrids and one collected from the Shibao Mountain inherited cpDNA from *R. decorum*, and all putative hybrids collected from Baili Rhododendron Nature Reserve and six from Shibao Mountain inherited cpDNA from *R. delavayi*. In this study, we have confirmed that natural hybridization between *R. decorum* and *R. delavayi* exists in the Guizhou and Yunnan sites. Hybridization was bilateral, and most of the hybrids were derived from maternal parent *R. delavayi*.

收稿日期: 2017-03-22; 接受日期: 2017-06-28

基金项目: 国家自然科学基金(31260079)和国家科技支撑计划(2015BAD10B00)

\* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: jl200812@yeah.net

**Key words:** *Rhododendron*; natural hybridization; morphological traits; DNA sequences

自然杂交(natural hybridization)在植物进化和物种形成中具有重要作用(Arnold, 1997; Rieseberg, 1997; Barton, 2001; Soltis & Soltis, 2009; Chase et al, 2010)。植物物种间的自然杂交发生频繁,特别是在适应性辐射分化种群中更为频繁(Seehausen, 2004; Grant et al, 2005)。据统计约有25%的物种发生过杂交(Mallet, 2005),在中国西南地区,如松属(*Pinus*) (Mason, 1949; Mao & Wang, 2011)、柳属(*Salix*) (Oberprieler et al, 2013)、橐吾属(*Ligularia*) (Yu et al, 2014)、龙胆属(*Gentiana*) (Li et al, 2008)、报春花属(*Primula*) (Ma et al, 2014)和绿绒蒿属(*Meconopsis*) (Yuan et al, 2007)等类群均存在自然杂交的现象。杜鹃属(*Rhododendron*)常绿杜鹃亚属(subgenus *Hymenanthes*)植物在喜马拉雅地区经历了快速的适应性辐射分化(Milne, 2004),由于种间生殖隔离较弱,种间杂交和基因渐渗容易发生,已有多个自然杂交研究的报道(Zhang et al, 2007; Milne & Abbott, 2008; Ma et al, 2010, 2016; Zha et al, 2008; Yan et al, 2013)。

杜鹃属是杜鹃花科最大的属,也是中国种子植物最大的属。据不完全统计,全世界约有1,025种杜鹃(Chamberlain et al, 1996),亚洲是杜鹃最主要的分布区。这些杜鹃主要集中在中国西南地区(云南、四川、贵州)和毗邻的喜马拉雅地区(不丹、尼泊尔及印度东北部)。中国是世界上杜鹃种类最多的国家,约542种,占世界种类的59%;云南分布最多,约259种,占全国的49%,是杜鹃最主要的分布与分化中心(闵天禄, 1984)。在园艺学领域,已培育出相当多的杜鹃花杂交品种,杜鹃属植物的种间自然杂交被频繁地报道(Kron et al, 1993; Milne et al, 1999, 2003; Milne & Abbott, 2008; Tagane et al, 2008)。开展杜鹃自然杂交研究不仅可为该属物种的形成与分类提供依据,同时也可作为杜鹃新品种培育提供新的思路。

马缨杜鹃(*Rhododendron delavayi*)生长于我国西南地区,为云南省广布种,贵州省西北部也有分布,并且常常与大白杜鹃(*R. decorum*)、露珠杜鹃(*R. irroratum*)和迷人杜鹃(*R. agastum*)同域生长。从分类地位上看,这4种杜鹃同属于常绿杜鹃亚属常绿杜鹃组(section *Ponticum*),其中马缨杜鹃属于树形杜

鹃亚组(subsection *Arborea*),大白杜鹃属于云锦杜鹃亚组(subsection *Fortunea*),迷人杜鹃和露珠杜鹃属于露珠杜鹃亚组(subsection *Irrorata*) (Wu et al, 2005)。Cox (1995)最早在中国西南地区发现类似马缨杜鹃与大白杜鹃的杂交后代,Chamberlain (1982, 2003)推测迷人杜鹃为马缨杜鹃与大白杜鹃的杂交后代。Zhang等(2007)通过DNA序列比较和形态性状分析,证实了迷人杜鹃为马缨杜鹃与大白杜鹃的杂交后代,马缨杜鹃为母本,大白杜鹃为父本。然而,Zha等(2008, 2010)研究表明迷人杜鹃是马缨杜鹃与露珠杜鹃的杂交后代,且主要以F<sub>1</sub>代为主。在贵州百里杜鹃自然保护区(百里保护区)和云南石宝山均发现有形态性状介于大白杜鹃和马缨杜鹃之间的疑似杂交个体,且这些个体同两种杜鹃的人工杂交后代高度相似。为了验证这些疑似杂交个体是否为自然杂交后代,本研究以贵州百里保护区和云南石宝山的马缨杜鹃、大白杜鹃,以及二者疑似自然杂交后代和昆明植物园栽培的人工杂交后代个体为研究材料,通过核基因和叶绿体基因的序列比较分析,研究其自然杂交的真实性及杂交方向,通过形态特征比较,验证人工杂交后代的真实性,为杜鹃花的分类学和新品种选育提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料来源

样品于2013年4月采自百里保护区和云南石宝山。这两个地方是我国西南地区云贵高原杜鹃属植物集中分布区域,分别位于贵州省大方县和黔西县交界处(27°08'–28°20' N, 105°45'–106°04' E)和云南省大理州剑川县境内(26°22' N, 99°50' E)。其中百里保护区共采集28份样品,石宝山17份,5份人工杂交后代样品采自中国科学院昆明植物园(表1)。采集植株健康的幼嫩叶片,用变色硅胶干燥处理后作为提取DNA的材料。

### 1.2 DNA提取、PCR扩增和数据处理

采用改良的CTAB法提取总DNA (Doyle & Doyle, 1987; Kobayashi et al, 1998)。利用ITS、*trnL-trnF*、*trnH-psbA*、*rbcL*序列引物进行扩增(White et al, 1990; Taberlet et al, 1991; Krewss & Erickson,

表1 大白杜鹃、马缨杜鹃及疑似杂交后代的来源和数量  
Table 1 Sources and sample size of *Rhododendron decorum*, *R. delavayi*, and putative hybrids used in this study

编号 Code	种类 Taxon	地点 Site	经纬度 Latitude and longitude	海拔 Altitude (m)	个体数量 Sample size
BLM (1–10)	马缨杜鹃 <i>R. delavayi</i>	贵州百里杜鹃自然保护区 Baili Rhododendron Nature Reserve in Guizhou Province	27°15′ N 105°58′ E	1,700–1,800	10
BLD (1–10)	大白杜鹃 <i>R. decorum</i>	贵州百里杜鹃自然保护区 Baili Rhododendron Nature Reserve in Guizhou Province	27°15′ N 105°58′ E	1,700–1,800	10
BLH (1–8)	疑似杂交后代 Putative hybrids	贵州百里杜鹃自然保护区 Baili Rhododendron Nature Reserve in Guizhou Province	27°15′ N 105°58′ E	1,700–1,800	8
SBSM (1–5)	马缨杜鹃 <i>R. delavayi</i>	云南大理石宝山 Shibao Mountain of Dali, Yunnan	26°22′ N 99°50′ E	2,400–2,600	5
SBSD (1–5)	大白杜鹃 <i>R. decorum</i>	云南大理石宝山 Shibao Mountain of Dali, Yunnan	26°22′ N 99°50′ E	2,400–2,600	5
SBSH (2/3/4/5/7/8/9)	疑似杂交后代 Putative hybrids	云南大理石宝山 Shibao Mountain of Dali, Yunnan	26°22′ N 99°50′ E	2,400–2,600	7
AH (1–5)	人工杂交后代 Artificial hybrids	昆明植物园 Kunming Botanical Garden			5
总计 Total					50

表2 大白杜鹃、马缨杜鹃、人工杂交后代与疑似杂交后代的形态特征对比  
Table 2 Comparison of morphological characters of *Rhododendron decorum*, *R. delavayi*, artificial and putative hybrids

形态特征 Morphological characters	大白杜鹃 <i>R. decorum</i>	疑似自然杂交与人工杂交后代 Putative and artificial hybrids	马缨杜鹃 <i>R. delavayi</i>
花冠颜色 Corolla color	白色 White	粉红 Pink	红色 Red
花冠裂片数 No. of corolla lobes	6–8, 通常7 6–8, usually 7	5–6, 无规律 5–6, irregular	5
叶片形状 Leaf shape	长圆形 Oblong	长圆形至披针形 Oblong to lanceolate	披针形 Lanceolate
叶片毛被 Ventral leaf surface indumentum	无毛 Glabrous	稀疏毛被 Thin indumentum	浓密海绵状毛被 Woolly indumentum
果实表面特征 Fruit surface character	有腺体 Glands	有腺体或毛被或两者均有 Glands or/and indumentum	密被棕红色毛被 Continuous brownish red indumentum
花期 Flowering period	5–6月 May to June	4月中旬–5月中旬 Mid-April to mid-May	3月–5月 March to May

2007), 序列长度及引物详情见附录1。聚合酶链式反应(PCR)在PERKIN ELMER 9600型PCR仪上进行, 各序列PCR反应体系及程序见附录2。PCR扩增产物首先经过1%琼脂糖凝胶电泳检验。成功扩增的产物再使用北京全式金公司PCR产物纯化试剂盒纯化, 纯化后的产物作为测序反应的模板DNA。DNA片段测序在ABI 3730xl自动测序仪上进行。15个疑似杂交后代与5个人工杂交后代ITS序列使用天根公司Lethal. Based Fast Cloning Kit试剂盒进行克隆后再次测序, 获得克隆序列。

利用Dnastar pack软件包中的SeqMan完成DNA序列的编辑和拼接, 各序列边缘根据GenBank近缘种确定, 相同序列经过对比寻找碱基差异。序列拼接后, 导入MEGA软件以Kimura 2-parameter模式重复1,000次获得NJ树(neighbor-joining tree), 所有的序列都提交到GenBank, 并获得登录号(KY81-4953-KY815002; KY853044-KY853193; KY882364-

KY882457)。

1.3 形态特征比较

选择15份大白杜鹃、15份马缨杜鹃、15份疑似自然杂交后代与5份人工杂交后代的标本用于形态特征比较, 包括花冠裂片数、叶片形状、叶片毛被、果实表面特征等(表2)。

用游标卡尺测量花序直径、花冠直径、叶长和叶宽。除花序直径外, 每一份标本其余性状均测量5次, 取平均值。花序直径、花序花朵数、花冠直径、花冠裂片数、叶长/叶宽、雄蕊数通过SPSS进行Duncan单因子方差检测( $P = 0.05$ )。

2 结果

2.1 核基因ITS序列变异

大白杜鹃、马缨杜鹃、疑似杂交后代以及人工杂交后代的ITS序列长度为654 bp, 共计6个变异位点。这6个位点能区分不同物种, 即大白杜鹃为A1

型, 马缨杜鹃为A2型, 疑似杂交后代和人工杂交后代在这6个位点均表现为疑似亲本碱基种类的杂合状态, 为A3型。经过克隆测序, 所有疑似杂交后代和人工杂交后代均获得了A1、A2型ITS序列, 说明它们拥有双亲的基因型(表3)。此外部分克隆测序结果为A4型, 是A1、A2型碱基信号的杂合。

2.2 叶绿体基因序列变异

2.2.1 trnL-trnF序列

马缨杜鹃与大白杜鹃的trnL-trnF序列的929个位点中共有9个变异位点(表4), 全部为碱基替换。大白杜鹃为B1型, 马缨杜鹃为B2型。所有人工杂交个体(5个)同大白杜鹃一致, 即B1型, 百里保护区的疑似杂交后代全部8个个体与马缨杜鹃一致, 为B2型, 石宝山疑似杂交后代中只有1个个体为B1型, 其余6

个个体为B2型。

2.2.2 rbcL序列

马缨杜鹃与大白杜鹃的rbcL序列长度为527 bp, 共有5个变异位点, 贵州百里保护区的大白杜鹃为C1型, 马缨杜鹃为C2型; 大理石宝山大白杜鹃为C3型, 马缨杜鹃为C4型。所有人工杂交个体为C1型, 百里保护区疑似杂交后代为C2型, 1个石宝山疑似杂交后代(SBSH5)为C3型, 其余6个石宝山疑似杂交后代为C4型。贵州百里保护区居群的大白杜鹃与大理石宝山居群的大白杜鹃在第8号位点存在一个C/G碱基替换, 两个居群的马缨杜鹃在相同位点也有C/G碱基替换(表5)。

2.2.3 trnH-psbA序列

在381 bp的trnH-psbA序列中一共存在23个差

表3 大白杜鹃与马缨杜鹃的ITS序列差异位点及疑似杂交后代克隆序列  
Table 3 The location of variable sites based on ITS and clone sequences of *Rhododendron decorum*, *R. delavayi* and putative hybrids

编号 Code	克隆数量 Clone numbers	类型 Type	差异位点 Variable sites (bp)						类型 Type		
			94	101	114	203	494	505	A1	A2	A4
大白杜鹃 <i>R. decorum</i>	0	A1	T	G	G	T	T	C	15	0	0
马缨杜鹃 <i>R. delavayi</i>	0	A2	C	C	T	G	C	T	0	15	0
AH、BLH、SBSH		A3	Y	S	K	K	Y	Y			
克隆测序 Clone sequences											
BLH1	2								1	1	0
BLH2	4								1	2	1
BLH3	3								2	1	0
BLH4	3								2	1	0
BLH5	3								1	1	1
BLH6	5								1	1	3
BLH7	4								2	1	1
BLH8	4								2	1	1
AH1	3								1	2	1
AH2	3								1	2	0
AH3	4								2	2	0
AH4	3								2	1	0
AH5	4								2	2	1
SBSH2	6								4	2	0
SBSH3	8								5	3	0
SBSH4	5								4	1	0
SBSH5	5								4	1	0
SBSH7	7								5	2	0
SBSH8	7								6	1	0
SBSH9	5								3	2	0
克隆数量总计 Total clone numbers									53	31	10

AH、BLH和SBSH含义见表1; K = G + T; S = C + G; Y = C + T。  
The means of AH, BLH, and SBSH see Table 1; K = G + T; S = C + G; Y = C + T.

表4 大白杜鹃、马缨杜鹃及疑似杂交后代的*trnL-trnF*序列差异位点  
Table 4 The location of variable sites based on *trnL-trnF* sequences of *Rhododendron decorum*, *R. delavayi* and putative hybrids

编号 Code	类型 Type	差异位点 Variable sites (bp)								
		147	622	623	624	626	627	629	646	831
大白杜鹃 <i>Rhododendron decorum</i>	B1	G	T	T	T	T	T	T	C	T
马缨杜鹃 <i>R. delavayi</i>	B2	T	A	A	A	A	A	A	A	C
AH、SBSH5	B1	G	T	T	T	T	T	T	C	T
BLH、SHSH2/3/4/7/8/9	B2	T	A	A	A	A	A	A	A	C

AH、BLH和SBSH含义见表1。The means of AH, BLH, and SBSH see Table 1.

表5 大白杜鹃、马缨杜鹃及疑似杂交后代的*rbcL*序列差异位点  
Table 5 The location of variable sites based on *rbcL* sequences of *Rhododendron decorum*, *R. delavayi* and putative hybrids

编号 Code	类型 Type	差异位点 Variable sites (bp)				
		8	30	263	398	407
BLD	C1	C	G	T	C	C
BLM	C2	C	T	A	T	T
SBSD	C3	G	G	T	C	C
SBSM	C4	G	T	A	T	T
AH	C1	C	G	T	C	C
BLH	C2	C	T	A	T	T
SBSH5	C3	G	G	T	C	C
SBSH2/3/4/7/8/9	C4	G	T	A	T	T

AH、BLH、SBSH、BLM、BLD、SBSM和SBSD含义见表1。  
The means of AH, BLH, SBSH, BLM, BLD, SBSM, and SBSH see Table 1.

异位点, 包括4个碱基位点的插入或缺失及19个位点的碱基替换。大理石宝山居群的大白杜鹃D2与百里保护区居群的大白杜鹃D1之间存在9个位点的差异, 即1个碱基插入或缺失, 8个碱基替换; 石宝山马缨杜鹃D4与百里保护区马缨杜鹃D3在第214个

位点存在A/C碱基替换(表6)。疑似杂交后代与人工杂交后代该序列片段结果与*rbcL*序列结果一致。

2.3 分子证据的联合分析

人工杂交后代与疑似杂交后代的ITS序列存在亲本物种碱基的杂合位点, 经过克隆测序获得大白杜鹃和马缨杜鹃的ITS序列, 分子证据支持疑似杂交后代为大白杜鹃与马缨杜鹃的自然杂交后代。3个叶绿体基因序列中, *trnL-trnF*序列仅能区分大白杜鹃与马缨杜鹃, 无法区分同一物种的不同地理居群。*rbcL*和*trnH-psbA*序列在区分不同物种的基础上, 还能区分出贵州居群和云南居群, 且结果一致。即人工杂交后代AH的叶绿体基因序列同百里保护区的大白杜鹃一致, 百里保护区的疑似杂交后代BLH的叶绿体基因序列同该群落内的马缨杜鹃相同, 石宝山疑似杂交后代SBSH5个体的叶绿体基因序列同该群落内的大白杜鹃一致, 其余SBSH个体叶绿体基因序列同该群落内的马缨杜鹃一致, 叶绿体基因序列变异见附录3。联合ITS、*trnL-trnF*、*rbcL*、*trnH-psbA*序列片段分子系统树可将研究材料分为3支(图1),

表 6 大白杜鹃、马缨杜鹃及疑似杂交后代的 *trnH-psbA* 序列差异位点  
Table 6 The location of variable sites based on *trnH-psbA* sequences of *Rhododendron decorum*, *R. delavayi* and putative hybrids

编号 Code	类型 Type	差异位点 Variable sites (bp)																		
		1	2	128	135	211	214	245	254	254	299	313	333	337	340	344	348	351	358	365-369
BLD	D1	G	A	T	C	G	C	G	A	C	A	A	G	T	G	G	T	T	T	AATTC
SBSD	D2	-	G	*	*	*	*	*	*	*	*	*	A	A	A	A	A	G	G	*****
BLM	D3	*	*	A	G	A	C	T	T	T	T	G	*	*	*	*	*	*	*	G-----
SBSM	D4	*	*	A	G	A	A	T	T	T	T	G	*	*	*	*	*	*	*	G-----
AH	D1	G	A	T	C	G	C	G	A	C	A	A	G	T	G	G	T	T	T	AATTC
SBSH5	D2	*	G	*	*	*	*	*	*	*	*	*	A	A	A	A	A	G	G	*****
BLH	D3	*	*	A	G	A	C	T	T	T	T	G	*	*	*	*	*	*	*	G-----
SBSH2/3/4/7/8/9	D4	*	*	A	G	A	A	T	T	T	T	G	*	*	*	*	*	*	.	G-----

\*表示该位置碱基与 D1 类型的碱基一致, “-”表示缺失或插入; AH、BLH、SBSH、BLM、BLD、SBSM 和 SBSH 含义见表 1。  
\* means that this site is identical with D1 type, “-” Absent or insert; The means of AH, BLH, SBSH, BLM, BLD, SBSM, and SBSH see Table 1.

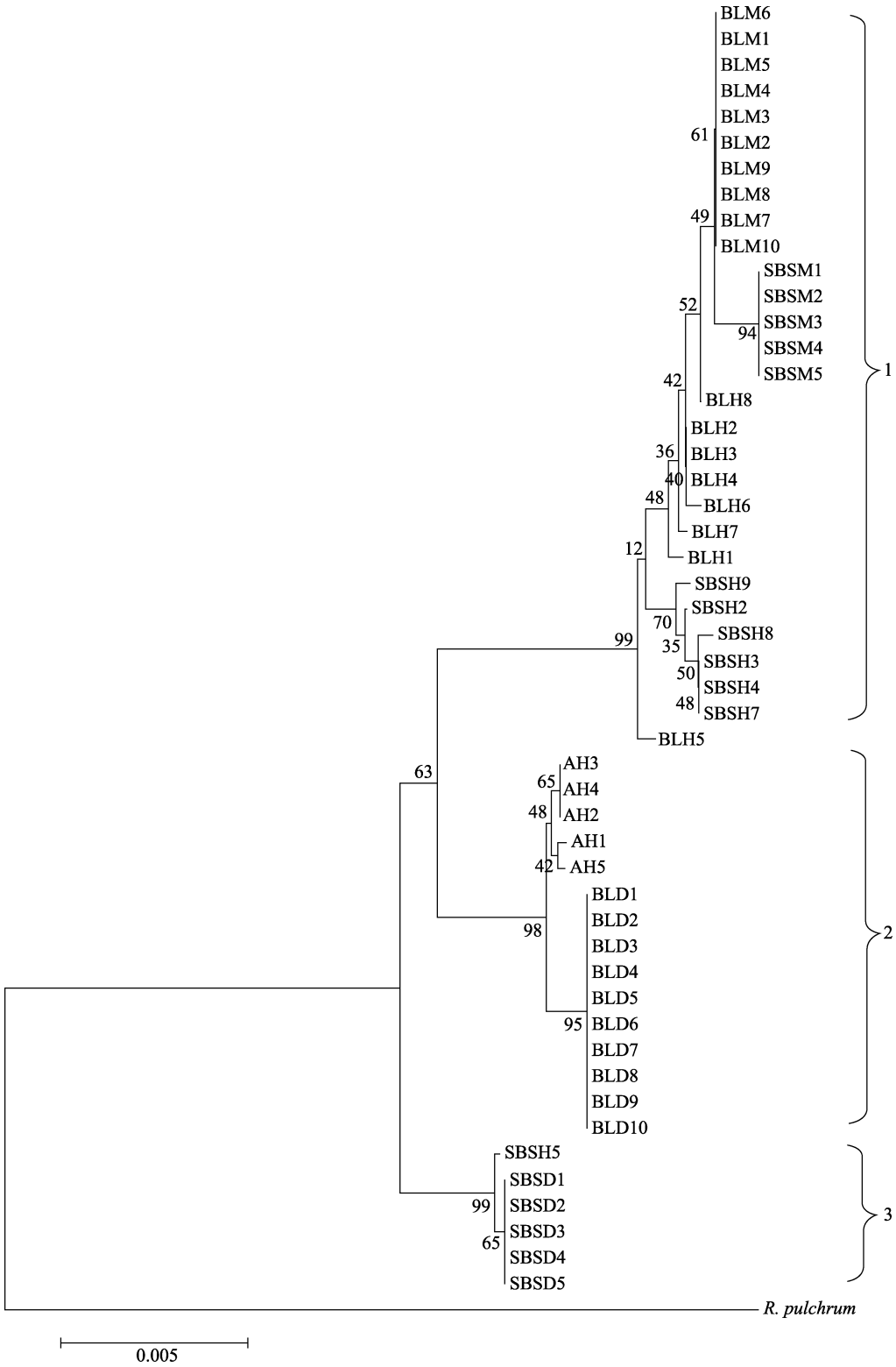


图1 大白杜鹃、马缨杜鹃及疑似杂交后代的联合ITS、*trnL-trnF*、*rbcL*、*psbA-trnH*序列片段的聚类图。AH、BLH、SBSH、BLM、BLD、SBSM和SBSD含义见表1。  
Fig. 1 Clustering chart of combined ITS, *trnL-trnF*, *rbcL*, *psbA-trnH* sequence of *Rhododendron decorum*, *R. delavayi* and putative hybrids. The means of AH, BLH, SBSH, BLM, BLD, SBSM, and SBSD see Table 1.



百里保护区的马缨杜鹃、石宝山的马缨杜鹃与百里保护区的疑似杂交后代和云南石宝山的杂交后代(除SBSH5个体)聚为一支(分支1), 人工杂交后代与百里保护区的大白杜鹃聚为一支(分支2), SBSH5个体与石宝山的大白杜鹃聚为一支(分支3)。

## 2.4 形态学证据

马缨杜鹃与大白杜鹃同为常绿大灌木至小乔木, 在花冠颜色、花冠裂片数、叶片形状、叶片毛被、果实表面特征和花期6个性状上易于区别(图2, 表2)。花序直径和花朵数等性状间差异显著, 花序直径表现为:  $AH > \text{大白杜鹃} = BLH > \text{马缨杜鹃} = SBSH$  ( $F = 2.665, P = 0.05$ ); 花序花朵数表现为:  $AH > \text{马缨杜鹃} > BLH > SBSH > \text{大白杜鹃}$  ( $F = 6.721, P = 0.05$ ); 花冠直径表现为:  $\text{大白杜鹃} = AH > BLH > \text{马缨杜鹃} > SBSH$  ( $F = 41.512, P = 0.05$ ); 花冠裂片数表现为:  $\text{大白杜鹃} > AH > SBSH > \text{马缨杜鹃} = SBSH$  ( $F = 29.473, P = 0.05$ ); 雄蕊数表现为:  $\text{大白杜鹃} > AH > \text{马缨杜鹃} = BLH = SBSH$  ( $F = 36.127, P = 0.05$ ); 叶长/叶宽表现为:  $\text{马缨杜鹃} = BLH > AH = SBSH > \text{大白杜鹃}$  ( $F = 51.929, P = 0.05$ ) (图3)。通过形态学比较, 20个马缨杜鹃和大白杜鹃的疑似杂交个体的形态学特征介于大白杜鹃与马缨杜鹃之间, 个别性状超过或低于这两种杜鹃, 如花序直径、花冠直径。

## 3 讨论

### 3.1 马缨杜鹃与大白杜鹃存在自然杂交

前人关于杜鹃花自然杂交的相关研究(Zhang et al, 2007; Tagane et al, 2008; Ma et al, 2010; Zha et al, 2010; Yan et al, 2013)均基于形态特征的推测。植株形态特征呈现中间性状、不完全的育性以及疑似亲本在地理上的同域分布等现象暗示着可能存在杂交(Gottlieb, 1972)。本研究所选的疑似杂交个体形态特征表现为大白杜鹃与马缨杜鹃的中间性状, 同时, 大白杜鹃与马缨杜鹃花期重叠, 两者有共同的传粉昆虫中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*), 两者双向人工授粉均可育, 杂交后代种子具有很高的活力(张长芹等, 1998; 张敬雨等, 2007)。通过以上证据推测15个野外疑似杂交个体可能为大白杜鹃与马缨杜鹃的自然杂交后代。本研究中, 分子证据证实了基于形态学的推测, 即疑似杂交后代的ITS序列有6个位点均表现为疑似亲本碱基种类的杂合状态,

表明它们拥有父母双方的基因型。杜鹃属植物的叶绿体通常为母系遗传, 本研究中3个叶绿体基因序列分析结果表明, 除了云南石宝山发现的1个杂交个体SBSH5具有大白杜鹃的单倍型外, 其余自然杂交个体均具有马缨杜鹃的单倍型, 而所有人工杂交个体的单倍型与大白杜鹃相同, 即绝大部分的自然杂交个体的母本为马缨杜鹃。这是因为杜鹃属植物为雄蕊先熟, 早开花的柱头更易接受后期开放花朵的花粉(Milne & Abbott, 2008), 而马缨杜鹃花期早于大白杜鹃, 更容易成为母本(Zhang et al, 2007; Ma et al, 2010; Zha et al, 2010)。

### 3.2 杜鹃自然杂交的启示

杂交既能产生杂种优势, 有利于后代群体的壮大(卢宝荣等, 2010); 也能产生劣势, 造成群体衰退或者小居群被大居群同化(王峥峰和彭少麟, 2012)。狭域分布的小居群通常更容易受到环境改变而濒危。然而, 在狭域分布物种蓝果杜鹃(*R. cyanocarpum*)与马缨杜鹃的自然杂交中, 杂交并未加剧蓝果杜鹃的濒危, 并且两者间存在强生殖隔离(Ma et al, 2016), 可见杂交对蓝果杜鹃的保护可能更有利。相反, 日本屋久岛的*R. ericarpum*海边居群被*R. indicum*河岸居群渐渗, 使得屋久岛鲜有基因纯和的*R. ericarpum* (Tagane et al, 2008), 从而不利于*R. ericarpum*的保护。杂交种棱果沙棘(*Hippophae gonocarpa*)不仅未表现出杂交优势, 其适应性未超过亲本, 甚至在一定程度上与亲本竞争光和水分<sup>①</sup>。大白杜鹃与马缨杜鹃均为广布物种, 杂交后代迷人杜鹃在调查范围内与大白杜鹃、马缨杜鹃、露珠杜鹃也存在一定程度的竞争, 可能对亲本的生存产生一定程度的压力。中华猕猴桃(*Actinidia chinensis*)与美味猕猴桃(*A. deliciosa*)在倍性上存在差异, 理论上而言在经历过足够长的分隔后应产生一定的分化, 但恰好同域分布的两者存在不完全的生殖隔离, 从而构成了中华/美味猕猴桃复合体(刘亚令, 2006)。大白杜鹃、马缨杜鹃、露珠杜鹃均为二倍体( $2n = 26$ ) (Zhang et al, 2007), 也存在不完全的生殖隔离。而已经存在的迷人杜鹃回交群体暗示着这一杂交进程可能还会继续发展, 其发展方向、程度以及后果未知, 值得持续关注。

① 唐洁涓 (2009) 棱果沙棘自然杂交带亲本与杂交后代的适应性分析. 硕士学位论文, 西北师范大学, 兰州。



图2 大白杜鹃、马缨杜鹃、疑似杂交后代与人工杂交后代的花序和叶片  
Fig. 2 Flowers and leaves of *Rhododendron decorum*, *R. delavayi*, putative and artificial hybrids

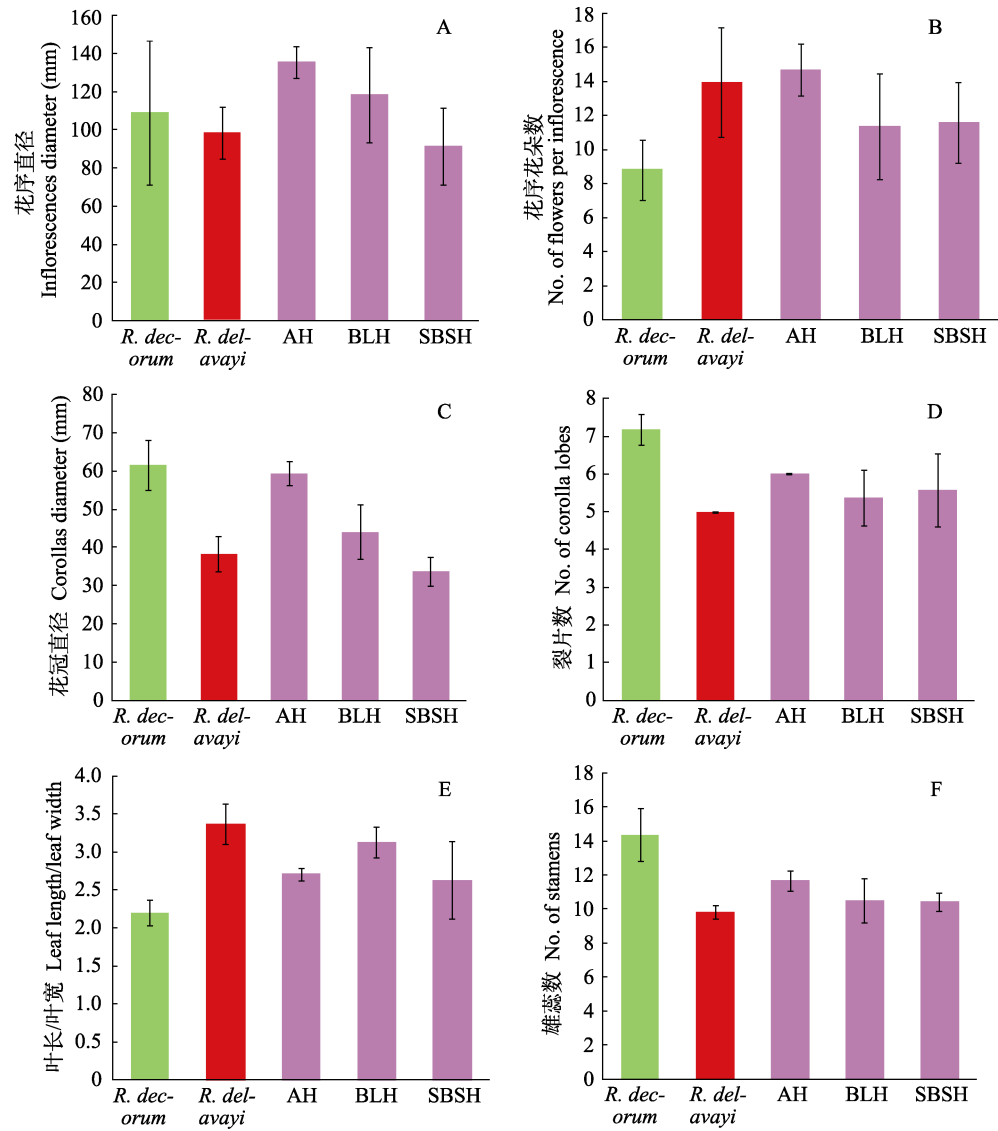


图3 大白杜鹃、马缨杜鹃、疑似杂交后代与人工杂交后代部分数量性状。AH、BLH和SBSH含义见表1。  
Fig. 3 Part of quantitative characters of *Rhododendron decorum*, *R. delavayi*, putative and artificial hybrid. The means of AH, BLH, and SBSH see Table 1.

贵州百里保护区和云南大理石宝山都已经被开发为风景旅游区,对当地的生态环境产生了一定的干扰,尤其是百里保护区,上层林木的砍伐使得大面积的杜鹃花纯林出现,且发生大量不同种杜鹃之间的自然杂交现象。这些群落目前处于生长旺盛期,但也存在着种群结构不稳定,核心种类分布地带人类活动相对频繁的特点,且中间夹杂着被开垦的农田,生境片段化严重,直接威胁到百里保护区作为品种基因库和种质资源库的功能,也将会影响到百里保护区旅游景观的可持续发展(张长芹等, 2015)。在实际生产生活中要注意保护生态环境,避免生态过度干扰而引起物种濒危或产生物种间基因渐渗。

从园艺观赏的角度而言,大白杜鹃与马缨杜鹃的杂交后代花大,花色柔和,观赏价值很高,自然杂交后代通过扩繁就能盆栽观赏、景观绿化,或作为亲本进一步育种,缩短育种年限。此外,百里杜鹃保护区内存在丰富的杜鹃花自然杂交种质资源,为我国杜鹃花培育提供了很好的资源,值得继续深入研究。

**致谢:** 感谢贵州百里杜鹃管委会黄家湧对调查、采样的支持和帮助。感谢编委和三位匿名审稿人在论文评审时的建议和指导。感谢新西兰植物与食品研究院Dr. Huaibi Zhang对英文摘要的修改。感谢邓强提供部分图像资料。

## 参考文献

- Arnold ML (1997) Natural Hybridization and Evolution. Oxford University Press, New York.
- Barton NH (2001) The role of hybridization in evolution. *Molecular Ecology*, 10, 551–568.
- Chamberlain DF (1982) A revision of *Rhododendron*. II. Subgenus *Hyemantes*. Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh, 39, 209–486.
- Chamberlain DF (2003) *Rhododendrons* in the wild: a taxonomist's view. In: *Rhododendrons* in Horticulture and Science (eds Argent G, McFarlane M), pp. 42–52. The Royal Botanic Garden, Edinburgh.
- Chamberlain DF, Hyam R, Argent G, Fairweather G, Walter KS (1996) The Genus *Rhododendron*, Its Classification and Synonymy. Alden Press, Oxford.
- Chase MW, Paun O, Fay MF (2010) Hybridization and speciation in angiosperms: a role for pollinator shifts. *BMC Biology*, 8, doi:10.1186/1741-7007-8-45.
- Cox PA (1995) Note of natural hybrids and intraspecific variation of *Rhododendron* in China. In: Scientific Investigation of the Plant on Cangshan Mountain (eds Duan CZ, Liao SC, Li QL, Li XW). Yunnan Science and Technology Press, Kunming. (in Chinese) [Cox PA (1995) 中国杜鹃属植物的天然杂交及种内变异. 见: 苍山植物科学考察(段诚忠, 廖士长, 李琼兰, 李锡文). 云南科技出版社, 昆明.]
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11–15.
- Gottlieb LD (1972) Leaves of confidence in the analysis of hybridization in plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 59, 435–446.
- Grant PR, Grant BR, Petren K (2005) Hybridization in the recent past. *The American Naturalist*, 166, 56–67.
- Kobayashi N, Horikoshi T, Katsuyama H, Handa T, Takayangi K (1998) A simple and efficient DNA extraction method for plants, especially woody plants. *Plant Tissue Culture & Biotechnology*, 4, 72–80.
- Krewe WJ, Erickson DL (2007) A two-locus global DNA barcode for land plant: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS ONE*, 2, e508.
- Kron KA, Gawn LM, Chase MW (1993) Evidence for introgression in azaleas (*Rhododendron*; Ericaceae): chloroplast DNA and morphological variation in a hybrid swarm on Georgia. *American Journal of Botany*, 80, 1095–1099.
- Li XJ, Wang LY, Yang HL, Liu JQ (2008) Confirmation of natural hybrid between *Gentiana straminea* and *G. siphonantha* (Gentianaceae) based on molecular evidence. *Frontiers of Biology in China*, 3, 470–476.
- Liu YL (2006) The Genetic Structure and Introgression Among Natural Populations of *Actinidia*. PhD dissertation, Central China Agricultural University, Wuhan. (in Chinese with English abstract) [刘亚令 (2006) 猕猴桃属植物自然居群的遗传结构与种间基因渐渗研究. 博士学位论文, 华中农业大学, 武汉.]
- Lu BR, Xia H, Wang W, Yang X (2010) Impact of natural hybridization and introgression on biological in invasion of plant species. *Biodiversity Science*, 18, 577–589. (in Chinese with English abstract) [卢宝荣, 夏辉, 汪魏, 杨箫 (2010) 天然杂交与遗传渐渗对植物入侵性的影响. 生物多样性, 18, 577–589.]
- Ma YP, Zhang CQ, Zhang JL, Yang JB (2010) Natural hybridization between *Rhododendron delavayi* and *R. cyanocarpum* (Ericaceae), from morphological, molecular and reproductive evidence. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52, 844–851.
- Ma YP, Xie WJ, Tian XL, Sun WB, Wu ZK, Milne RI (2014) Unidirectional hybridization and reproductive barriers between two heterostylous primrose species in north-west Yunnan, China. *Annals of Botany*, 113, 763–775.
- Ma YP, Xie WJ, Sun WB, Tobias M (2016) Strong reproduc-

- tive isolation despite occasional hybridization between a widely distributed and a narrow endemic *Rhododendron* species. *Scientific Reports*, 6, 19146.
- Mallet J (2005) Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology & Evolution*, 20, 229–237.
- Mao JF, Wang XR (2011) Distinct niche divergence characterizes the homoploid hybrid speciation of *Pinus densata* on the Tibetan Plateau. *The American Naturalist*, 177, 424–439.
- Mason HL (1949) Evidence for the Genetic Submergence of *Pinus remorata* Genetics, Paleontology and Evolution. Princeton University Press, Princeton.
- Milne RI (2004) Phylogeny and biogeography of *Rhododendron* subsection *Pontica*, a group with a Tertiary relict distribution. *Molecular Phylogenetic & Evolution*, 33, 389–401.
- Milne RI, Abbott RJ (2008) Reproductive isolation among two interfertile *Rhododendron* species: low frequency of post-F<sub>1</sub> hybrid genotypes in alpine hybrid zones. *Molecular Ecology*, 17, 1108–1121.
- Milne RI, Abbott RJ, Wolff K, Chamberlain DF (1999) Hybridization among sympatric species of *Rhododendron* (Ericaceae) in Turkey: morphological and molecular evidence. *American Journal of Botany*, 86, 1776–1785.
- Milne RI, Terzioğlu S, Abbott RJ (2003) A hybrid zone dominated by fertile F<sub>1</sub>s: maintenance of species barriers in *Rhododendron*. *Molecular Ecology*, 12, 2719–2729.
- Min TL (1984) A revision of subgenus *Hymenanthes* (*Rhododendron* L.) in Yunnan-Xizang. *Acta Botanica Yunnanica*, 6, 141–171. (in Chinese with English abstract) [闵天禄 (1984) 滇藏常绿杜鹃亚属的修订. 云南植物研究, 6, 141–171.]
- Oberprieler C, Dietz L, Harlander C, Heilmann J (2013) Molecular and phytochemical evidence for the taxonomic integrity of *Salix alba*, *S. fragilis*, and their hybrid *S. × rubens* (Salicaceae) in mixed stands in SE Germany. *Plant Systematics & Evolution*, 299, 1107–1118.
- Rieseberg LH (1997) Hybrid origins of plant species. *Annual Review of Ecology & Systematics* 28, 259–389.
- Seehausen O (2004) Hybridization and adaptive radiation. *Trends in Ecology & Evolution*, 19, 198–207.
- Soltis PS, Soltis DE (2009) The role of hybridization in plant speciation. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 561–588.
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J (1991) Universal primers for amplification of the three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17, 1105–1109.
- Tagane S, Hiramatsu M, Okubo H (2008) Hybridization and asymmetric introgression between *Rhododendron eriocarpon* and *R. indicum* on Yakushima Island, Southwest Japan. *Journal of Plant Research*, 121, 387–395.
- Wang ZF, Peng SL (2003) Plant hybridization and its harmful genetic consequences. *Biodiversity Science*, 11, 333–339. (in Chinese with English abstract) [王峥嵘, 彭少麟 (2003) 杂交产生的遗传危害——以植物为例. 生物多样性, 11, 333–339.]
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (eds Innis M, Gelfand D, Sninsky J, White T), pp. 315–322. Academic, San Diego.
- Wu ZY, Raven PH, Hong DY (2005) *Flora of China*, Vol. 14. Science Press, Beijing & Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.
- Yan LJ, Gao LM, Li DZ (2013) Molecular evidence for natural hybridization between *Rhododendron spiciferum* and *R. spinuliferum* (Ericaceae). *Journal of Systematics and Evolution*, 51, 426–434.
- Yu JJ, Pan L, Pan YZ, Gong X (2014) Natural hybrid between *Ligularia vellea* and *L. subspicata* (Asteraceae: Senecioneae). *Plant Diversity and Resources*, 36, 219–226.
- Yuan CC, He XB, Yuan QM, Shi SH (2007) Genetic relationship between a natural hybrid *Meconopsis × cookei* (Papaveraceae) and its parents based on cpDNA *trnL-trnF* region sequence. *Acta Botanica Yunnanica*, 29, 103–108.
- Zha HG, Milne RI, Sun H (2008) Morphological and molecular evidence of natural hybridization between two distantly related *Rhododendron* species from the Sino-Himalaya. *Botanical Journal of Linnean Society*, 156, 119–129.
- Zha HG, Milne RI, Sun H (2010) Asymmetric hybridization in *Rhododendron agastum*: a hybrid taxon comprising mainly F<sub>1</sub>s in Yunnan, China. *Annals of Botany*, 105, 89–100.
- Zhang JL, Zhang CQ, Gao LM, Yang JB, Li HT (2007) Natural hybridization origin of *Rhododendron agastum* (Ericaceae) in Yunnan, China: inferred from morphological and molecular evidence. *Journal of Plant Research*, 120, 457–463.
- Zhang JL, Zhang CQ, Wu ZK, Qiao Q (2007) The potential roles of interspecific pollination in natural hybridization of *Rhododendron* species in Yunnan, China. *Biodiversity Science*, 15, 658–665. (in Chinese with English abstract) [张敬丽, 张长芹, 吴之坤, 乔琴 (2007) 探讨种间传粉在杜鹃花属自然杂交物种形成中的作用. 生物多样性, 15, 658–665.]
- Zhang CQ, Feng BJ, Lü YL (1998) Hybridization study of the genus *Rhododendron*. *Acta Botanica Yunnanica*, 20, 94–96. (in Chinese with English abstract) [张长芹, 冯宝均, 吕元林 (1998) 杜鹃花属的杂交育种研究. 云南植物研究, 20, 94–96.]
- Zhang CQ, Huang CL, Huang JY, Wang LJ, Zhang JL, Sun WB, Ma YP (2015) Investigation of germplasm resources of the genus *Rhododendron* in Baili Nature Reserve in Guizhou. *Plants Diversity and Resources*, 37, 357–364. (in Chinese with English abstract) [张长芹, 黄承玲, 黄家勇, 王灵军, 张敬丽, 孙卫邦, 马永鹏 (2015) 贵州百里杜鹃自然保护区杜鹃花属种质资源的调查. 植物分类与资源学报, 37, 357–364.]

(责任编辑: 高连明 责任编辑: 黄祥忠)

## 附录 Supplementary Material

### 附录1 本研究中所用4个序列引物

Appendix 1 Primers of four intergenic spacer used in this study

<http://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2017090-1.pdf>

### 附录2 本研究所用4个序列体系及程序

Appendix 2 The systems and procedures of four intergenic spacer used in this paper

<http://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2017090-2.pdf>

### 附录3 杂交后代叶绿体序列类型详情

Appendix 3 The details of four cpDNA sequences type of hybrid

<http://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2017090-3.pdf>

郑硕理, 田晓玲, 黄承玲, 王灵军, 冯元, 张敬丽. 结合分子手段和形态分析验证大白杜鹃与马缨杜鹃的自然杂交. 生物多样性, 2017, 25 (6): 627–637.  
<http://www.biodiversity-science.net/CN/10.17520/biods.2017090>

2 附录 1 本研究中所用 4 个序列引物

Appendix 1 Primers of four intergenic spacer used in this study

序列名称	引物	引物序列	序列长度
Gene region	Primer	Primer sequence (5'→3')	Sequences length (bp)
ITS	ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	654
	ITS5	CGT AAC AAG GTT TCC GTA GC	
<i>trnL-trnF</i>	<i>trn-c</i>	CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG	929
	<i>trn-f</i>	ATT TGA ACT GGT GAG ACG AG	
<i>trnH-psbA</i>	fwd	CTT ATG CAT CAA CGT AAT GCT C	381
	rev	CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAT CC	
<i>rbcL</i>	<i>rbcLa-F</i>	ATG TCA CCA CAA ACA GAG ACT AAA GC	527
	<i>rbcLa-R</i>	CTA AAA TCA AGT CCA CCR CG	

6

附录 2 本研究所用 4 个序列体系及程序

8 Appendix 2 The systems and procedures of four intergenic spacer used in this paper

名称	PCR 程序	PCR 体系 (25 μL)
Gene region	PCR procedure	PCR system
ITS	94℃, 4 min	dd H <sub>2</sub> O 11 μL; 2 × Mix 12 μL; Primer 1 0.5 μL; Primer 2 0.5 μL; DNA template 1 μL.
	94℃, 1 min	
	52℃, 1 min	
	72℃, 1 min 30 s	
	72℃, 4 min	
35 cycles		
<i>trnL-trnF</i>	94℃, 4 min	dd H <sub>2</sub> O 11 μL; 2 × Mix 12 μL; Primer 1 0.5 μL; Primer 2 0.5 μL; DNA template 1 μL.
	94℃, 1 min	
	56℃, 1 min	
	72℃, 1 min 30 s	
	72℃, 4 min	
35 cycles		
<i>trnH-psbA</i>	95℃, 4 min	dd H <sub>2</sub> O 11 μL; 2 × Mix 12 μL; Primer 1 0.5 μL; Primer 2 0.5 μL; DNA template 1 μL.
	94℃, 1 min	
	52℃, 1 min	
	72℃, 1 min 30 s	
	72℃, 4 min	
35 cycles		
<i>rbcL</i>	94℃, 4 min	dd H <sub>2</sub> O 11 μL; 2 × Mix 12 μL; Primer 1 0.5 μL; Primer 2 0.5 μL; DNA template 1 μL.
	94℃, 1 min	
	55℃, 1 min	
	72℃, 1 min 30 s	
	72℃, 4 min	
35 cycles		

2 × Mix (天根公司): 0.1 U Taq Polymerase/μL, 500 μL dNTP each, 20 mM Tris-HCl (pH 8.3),  
10 100 mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub> 等其他稳定剂和增强剂。  
2 × Mix (TIANGEN BIOTECH CO. LTD.): 0.1 U Taq Polymerase/μL, 500 μL dNTP each, 20  
12 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub> with other stabilizer and reinforcing agent.



郑硕理, 田晓玲, 黄承玲, 王灵军, 冯元, 张敬丽. 结合分子手段和形态分析验证大白杜鹃与马缨杜鹃的自然杂交. 生物多样性, 2017, 25 (6): 627–637.  
<http://www.biodiversity-science.net/CN/10.17520/biods.2017090>

14

附录 3 杂交后代叶绿体序列类型详情

16

Appendix 3 The details of four cpDNA sequences type of hybrid

	<i>trnL-trnF</i> 类型		<i>rbcL</i> 类型				<i>psbA-trnH</i> 序列			
	<i>trnL-trnF</i> Types		<i>rbcL</i> Types				<i>psbA-trnH</i> Types			
	B1	B2	C1	C2	C3	C4	D1	D2	D3	D4
马缨杜鹃 <i>Rhododendron delavayi</i>	15	0	0	10	0	5	0	0	10	5
大白杜鹃 <i>R. decorum</i>	0	15	10	0	5	0	10	5	0	0
BL putative hybrid (BLH1)	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
BL putative hybrid (BLH2)	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
BL putative hybrid (BLH3)	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
BL putative hybrid (BLH4)	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
BL putative hybrid (BLH5)	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
BL putative hybrid (BLH6)	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
BL putative hybrid (BLH7)	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
BL putative hybrid (BLH8)	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
Artificial hybrid (AH1)	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
Artificial hybrid (AH2)	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
Artificial hybrid (AH3)	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
Artificial hybrid (AH4)	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
Artificial hybrid (AH5)	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
SBS putative hybrid (SBSH2)	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
SBS putative hybrid (SBSH3)	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
SBS putative hybrid (SBSH4)	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
SBS putative hybrid (SBSH5)	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
SBS putative hybrid (SBSH7)	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
SBS putative hybrid (SBSH8)	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
SBS putative hybrid (SBSH9)	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1

BL: 贵州百里杜鹃保护区; SBS: 云南大理石宝山。

18

BL: Baili Rhododendron Nature Reserve; SBS: Shibao Mountain of Dali, Yunnan.

20

•研究报告•

# 野牡丹属两个海南特有种与同属广布种 自然杂交的分子证据

周秋杰<sup>1</sup> 蔡亚城<sup>1</sup> 黄伟伦<sup>1</sup> 吴 伟<sup>1</sup> 代色平<sup>2</sup> 王 峰<sup>3</sup> 周仁超<sup>1\*</sup><sup>1</sup> (中山大学生命科学学院, 广州 510275)<sup>2</sup> (广州市林业和园林科学研究院, 广州 510520)<sup>3</sup> (暨南大学药学院, 广州 510632)

**摘要:** 自然杂交既可以在物种形成、遗传交换和适应性进化方面发挥重要作用, 也可以造成稀有种的下降甚至灭绝以及超级入侵种的产生。涉及到稀有种的自然杂交研究可以为稀有种的保护提供重要的信息。紫毛野牡丹(*Melastoma penicillatum*)和枝毛野牡丹(*M. dendrisetosum*)是野牡丹属的两个海南特有种, 其中枝毛野牡丹已处于濒危状态。我们的野外调查和形态观察发现, 海南吊罗山存在紫毛野牡丹和野牡丹(*M. candidum*)以及枝毛野牡丹和毛蕊(*M. sanguineum*)的嫌疑杂种个体。本研究测定并分析了这些嫌疑杂种及其嫌疑亲本的4个核基因和5个叶绿体基因间隔区序列, 发现嫌疑杂种个体在嫌疑亲本物种的固定替换位点上均为嫌疑亲本物种碱基的杂合状态, 单倍型网络分析表明所有嫌疑杂种个体在每个核基因上均具有来自两个嫌疑亲本的等位基因, 证实了紫毛野牡丹和野牡丹, 以及枝毛野牡丹和毛蕊之间确实存在自然杂交。另外, 相对于其他野牡丹属物种, 枝毛野牡丹具有极低的遗传多样性。因为紫毛野牡丹和野牡丹、枝毛野牡丹和毛蕊之间均存在很强的生态隔离, 所以因公路修建而造成的生境干扰可能造成了这两个杂交事件的发生。因此避免生境干扰是保护这两个海南特有种最关键的手段。除此之外, 在实验室条件下进行种子萌发或枝条扦插繁殖, 然后将幼苗种植到合适生境中是扩大种群的另一个可行方法。

**关键词:** 野牡丹属; 自然杂交; 濒危物种; 核基因; 叶绿体基因间隔区; 保护

## Molecular evidence for natural hybridization between two *Melastoma* species endemic to Hainan and their widespread congeners

Qiujie Zhou<sup>1</sup>, Yacheng Cai<sup>1</sup>, Wei Lun Ng<sup>1</sup>, Wei Wu<sup>1</sup>, Seping Dai<sup>2</sup>, Feng Wang<sup>3</sup>, Renchao Zhou<sup>1\*</sup><sup>1</sup> School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275<sup>2</sup> Guangzhou Institute of Forestry and Landscape Architecture, Guangzhou 510520<sup>3</sup> College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632

**Abstract:** Natural hybridization plays an important role in speciation, genetic exchange, and adaptive evolution. However, it can also lead to the extinction of rare species or can generate super invasive species. Studies of natural hybridization involving rare species can therefore provide valuable information for species protection. In *Melastoma*, *M. penicillatum* and *M. dendrisetosum* are endemic to Hainan, China. *M. dendrisetosum* is at the edge of extinction, with a wild population of less than 300 individuals. Based on morphological observations during our field survey, we found that there are putative hybrids formed between the two endemic species and their widespread congeners, i.e. *M. candidum* × *M. penicillatum* and *M. sanguineum* × *M. dendrisetosum*. In this study, we sequenced four low-copy nuclear genes and five chloroplast DNA intergenic spacers of the putative hybrids and their putative parents. We found that these putative hybrids showed chromatogram signal additivity between putative parental species on differentially fixed sites at these nuclear genes. Haplotype networks also showed that at all four nuclear loci analyzed, alleles of the putative hybrids were shared with those of their putative parental species. The results above confirmed that hybridization occurred between *M. candidum* and *M. penicillatum*, and between *M. sanguineum* and *M. dendrisetosum*. Also,

收稿日期: 2017-02-27; 接受日期: 2017-04-12

基金项目: 国家自然科学基金(31670210)、中央高校基本科研业务费(151gjc23)和广东省科技计划项目(2015A030302011)

\* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: zhrench@mail.sysu.edu.cn

we found an extremely low level of genetic diversity in *M. dendrisetosum* relative to the three other species of *Melastoma*. It appears that there are strong ecological isolation between *M. candidum* and *M. penicillatum* as well as between *M. sanguineum* and *M. dendrisetosum*, and habitat disturbance caused by highway construction may have promoted hybridization between these species. Therefore, the key to protecting these two species endemic to Hainan is to reduce habitat disturbance. Artificial propagation of the species is another possible way to expand their population sizes.

**Key words:** *Melastoma*; natural hybridization; endangered species; nuclear genes; chloroplast intergenic spacer; conservation

自然杂交在有花植物中非常常见(Arnold, 1997, 2006; Rieseberg, 1997), 大约有25%的植物物种会与其他物种发生杂交(Mallet, 2005)。杂交在进化上的作用是多样的: 一方面, 杂交可以增加遗传多样性, 产生新的物种, 打破或增强物种间的生殖隔离, 通过渐渗转移适应性性状等(Arnold, 1997; Mallet, 2005; Arnold & Martin, 2009; Abbott et al, 2013); 另一方面, 杂交也可能产生一些负面的结果, 如广布种与稀有种的杂交会通过遗传湮没(genetic swamping)和群体湮没(demographic swamping)造成稀有种的灭绝(Rhymer & Simberloff, 1996; Huxel, 1999; Todesco et al, 2016), 杂交还可以产生超级入侵种(如Moody & Les, 2002)。对于和广布种杂交的稀有种来说, 不管杂种是否可育, 杂交所引起的遗传融合和(或)远交衰退导致其灭绝的可能性都大大增加。根据Wolf等(2001)的模型估计, 频繁的杂交可以在5个甚至更少的世代内导致稀有种或其种群的灭绝。因此, 对于濒危物种来说, 杂交可能是最快起作用的遗传威胁(Wolf et al, 2001)。鉴定杂种并分析杂交发生的程度是评估杂种及其亲本物种进化命运的第一步, 研究杂交也有助于所涉及的濒危物种的保护。

野牡丹属(*Melastoma*)隶属于野牡丹科, 主要分布在亚洲和大洋洲的热带地区。本属经历了快速的适应性辐射, 在过去的一百万年中形成了20多个物种(Meyer, 2001; Renner & Meyer, 2001)。本属物种间的分歧时间相对较短, 一些物种在地理分布、开花时间和传粉昆虫方面存在大量的重叠(Gross, 1993; Luo & Zhang, 2005; Luo et al, 2008, 2009; 路国辉等, 2009), 因此物种间的杂交相对常见(Dai et al, 2012; Liu et al, 2014)。据《中国植物志》记载, 野牡丹属在中国有9个种(陈介, 1984), 但在*Flora of China*中, 部分物种被归并, 只包含了5种(Chen & Renner, 2007)。这两部著作在物种的分类处理上都

存在一些问题, 如《中国植物志》中将细叶野牡丹(*M. intermedium*)和多花野牡丹(*M. affine*)作为独立的物种, 但二者实际上分别是地蕊(*M. dodecandrum*)和野牡丹(*M. candidum*), 毛蕊(*M. sanguineum*)和野牡丹的杂种(Dai et al, 2012; Liu et al, 2014)。*Flora of China*将多花野牡丹、野牡丹和展毛野牡丹(*M. normale*)合并到东南亚广布的印度野牡丹(*M. malabathricum*)中, 但多花野牡丹为1个种间杂种, 展毛野牡丹花期早于另外几个物种, 所以, 将这几个物种合并明显不正确。*Flora of China*将《中国植物志》中记载的分布于海南的2个特有种, 即紫毛野牡丹(*M. penicillatum*)和枝毛野牡丹(*M. dendrisetosum*)并入毛蕊也是不正确的, 这二者在形态、花期与生境上与毛蕊存在很大的差异, 并且我们的分子数据确定了紫毛野牡丹和枝毛野牡丹均为独立的物种(Chao et al, 2014; Huang et al, 未发表数据)。

紫毛野牡丹分布于海南中部高海拔的山区, 常见于海拔800–1,300 m的林下; 枝毛野牡丹分布更为狭窄, 目前仅零星分布于海南陵水吊罗山的一个山谷中, 分布海拔为350–400 m, 种群数量不足300株, 处于濒危的状态(彭东辉等, 2014)。我们在海南吊罗山的野外调查中发现, 与紫毛野牡丹同域分布的同属物种有野牡丹、毛蕊及二者的杂种多花野牡丹, 与枝毛野牡丹同域分布的同属物种只有毛蕊。野牡丹和毛蕊是野牡丹属中的两个常见种, 在华南地区分布范围很广。我们也发现了1株形态上介于紫毛野牡丹和野牡丹, 4株形态上介于枝毛野牡丹和毛蕊之间的嫌疑杂种个体(图1, 2)。如果它们之间确实存在杂交, 那么相对于毛蕊和野牡丹而言, 紫毛野牡丹和枝毛野牡丹种群数量较小, 将有可能因杂交而导致种群数量减少甚至灭绝, 尤其是已经处于濒危状态的枝毛野牡丹。本研究旨在利用多个核基因的序列数据来验证这些形态上的嫌疑杂种是否属实, 并进一步利用叶绿体基因间隔区的序列推

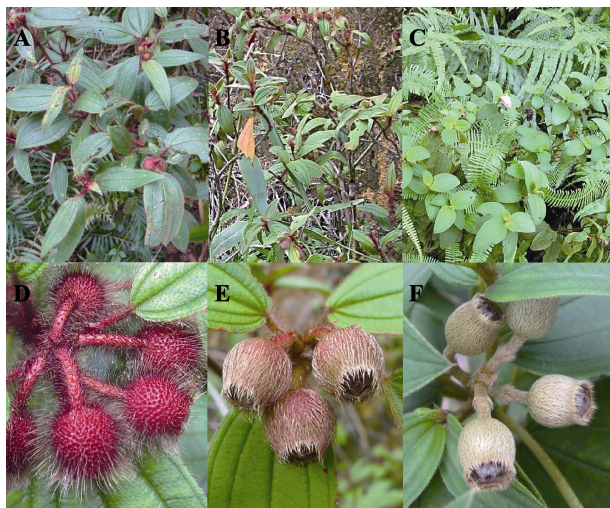


图1 紫毛野牡丹、野牡丹及其嫌疑杂种的部分形态学特征。A: 紫毛野牡丹; B: 紫毛野牡丹和野牡丹的嫌疑杂种; C: 野牡丹; D、E、F分别为紫毛野牡丹、嫌疑杂种和野牡丹的果。Fig. 1 Morphological comparison between *Melastoma penicillatum*, *M. candidum* and their putative hybrid. (A) *M. penicillatum*, (B) putative hybrid, (C) *M. candidum*. Fruits of *M. penicillatum* (D), putative hybrid (E) and *M. candidum* (F).

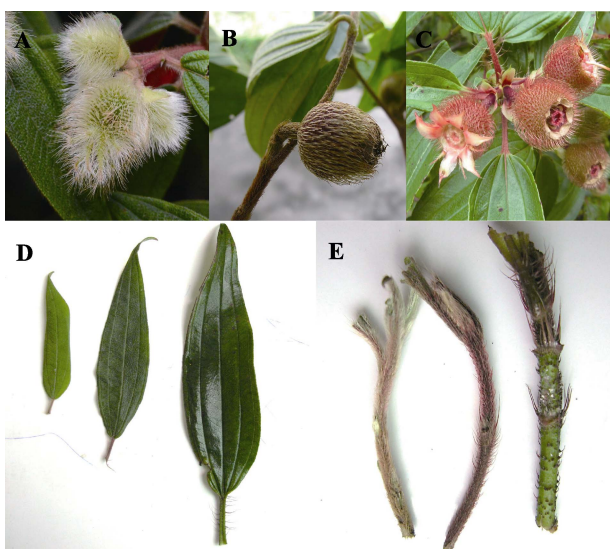


图2 枝毛野牡丹、毛蕊及其嫌疑杂种的部分形态学特征。A、B、C分别为枝毛野牡丹、嫌疑杂种和毛蕊的果。D、E从左到右分别为枝毛野牡丹(左)、嫌疑杂种(中)和毛蕊(右)的叶和幼枝。Fig. 2 Morphological comparison between *Melastoma dendrisetosum*, *M. sanguineum* and their putative hybrid. Fruits of *M. dendrisetosum* (A), putative hybrid (B) and *M. sanguineum* (C). D, Leaves of *M. dendrisetosum* (left), putative hybrid (middle) and *M. sanguineum* (right). E, Young twigs of *M. dendrisetosum* (left), putative hybrid (middle) and *M. sanguineum* (right).

测杂交发生的方向,最后探讨造成杂交的可能原因及如何更好地保护这两个海南特有种。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

取样地点位于海南省陵水县吊罗山国家级自然保护区。对每一个嫌疑的亲本物种,包括枝毛野牡丹、紫毛野牡丹、毛蕊和野牡丹,于2017年1月采用群体采样的方法,每个物种采集约20个个体。因为野牡丹与毛蕊之间存在广泛的杂交与渐渗(Liu et al, 2014),所以我们也对来自福建龙海的异域分布的1个野牡丹群体进行了取样,作为参考。对于嫌疑杂种,所发现的个体非常有限,我们仅发现4个枝毛野牡丹与毛蕊的嫌疑杂种个体,和1个紫毛野牡丹与野牡丹的嫌疑杂种个体。我们对4个物种和2个嫌疑杂种的每个个体采集1片叶片,经硅胶干燥后用于后续的DNA提取。样品的具体信息见表1。

### 1.2 DNA提取、PCR扩增和测序

采用CTAB法(Doyle, 1987)从干燥的叶片样品中提取DNA。本研究测定了4个低拷贝核基因的序列(*tpi*, *gbss*, *chi*和*cam*),这些基因分别编码磷酸丙糖异构酶(TPI)、颗粒结合型淀粉合成酶(GBSS)、苯基丙乙烯酮异构酶(CHI)和钙调素(CAM)。首先利用Strand等(1997)的通用引物序列扩增每个物种2个个体的各个基因并进行测序,然后根据这些序列设计野牡丹属的特异性引物以更高效地进行PCR扩增。因为叶绿体DNA序列在野牡丹属物种中非常保守,我们对每组嫌疑亲本分别扩增了5个叶绿体基因间隔区(*trnL-trnF*, *trnS-trnG*, *atpB-rbcL*, *trnH-psbA*和*psbM-trnD*),最后发现枝毛野牡丹和毛蕊在*trnL-trnF*上有差异,而紫毛野牡丹和野牡丹在这5个叶绿体基因间隔区上均没有差异。因此我们只对枝毛野牡丹和毛蕊及其嫌疑杂种进行了*trnL-trnF*的测序。*trnL-trnF*区域使用通用引物*trnL-c*和*trnF-f*进行扩增(Taberlet et al, 1991)。采用Pearl凝胶纯化试剂盒(Pearl Bio-tech, 广州)对PCR产物进行纯化,然后在ABI 3730测序仪上直接测序(广州擎科生物技术有限公司)。鉴于大多数嫌疑杂种个体和部分嫌疑亲本物种个体的核基因直接测序会产生多个核苷酸位点的碱基叠加现象,同时个体内长度多态性也会导致测序峰图无法识别的情况。我们对这些样品进行克隆测序以拆分单倍型。克隆测序前的连接反应采用pMD18-T & A克隆试剂盒(Takara, 大连)完成,每个样品选择8个单克隆进行测序。所有的序列均提交

表1 4个野牡丹属物种和2个嫌疑杂种的采样信息  
Table 1 Sampling details of four species of *Melastoma* and two putative hybrids used in this study

类群 Taxon	采样地点 Location	个体数量 Sample size
野牡丹 <i>M. candidum</i> (Cf)	福建龙海 Longhai, Fujian	19
野牡丹 <i>M. candidum</i> (Ch)	海南吊罗山 Diaoluoshan, Hainan	20
毛茛 <i>M. sanguineum</i> (S)	海南吊罗山 Diaoluoshan, Hainan	20
紫毛野牡丹 <i>M. penicillatum</i> (P)	海南吊罗山 Diaoluoshan, Hainan	20
枝毛野牡丹 <i>M. dendrisetosum</i> (D)	海南吊罗山 Diaoluoshan, Hainan	20
紫毛野牡丹与野牡丹的嫌疑杂种 Putative hybrid between P and C	海南吊罗山 Diaoluoshan, Hainan	1
枝毛野牡丹与毛茛的嫌疑杂种 Putative hybrid between D and S	海南吊罗山 Diaoluoshan, Hainan	4

到GenBank并已获得接受号(KY912087–KY912157, KY659616–KY659627, KY659637–KY659655, KY-659674–KY659677, KY659690–KY659698, KY65-9705–KY659710, KY659717–KY659718, KY659720, KY659723–KY659728, KY659742–KY659761, KY-798067–KY798069, KY798100)。

1.3 序列分析

利用SeqMan (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA)编辑各个物种及嫌疑杂种的各个基因的序列,并用Clustal X (Thompson et al, 1997)做序列比对。核基因的单倍型拆分采用DnaSP5.0 (Librado & Rozas, 2009) 中的 Phase 完成。使用 Network 4.6 (www.fluxus-engineering.com) 中的 median-joining 方法(Bandelt et al, 1999)来构建各基因的网络图,以反映单倍型之间的关系。

2 结果

2.1 核基因序列分析

2.1.1 *tpi*基因

4个野牡丹属物种及2个嫌疑杂种的*tpi*基因序列比对后长度为708 bp, 包含28个变异位点。其中紫毛野牡丹和野牡丹之间、枝毛野牡丹和毛茛之间分别存在7个和3个固定的碱基替换, 2个嫌疑杂种

在对应的位置上均表现为嫌疑亲本碱基种类的杂合状态(表2, 3)。

*tpi*基因的单倍型分为两大支, 一支由紫毛野牡丹、毛茛和嫌疑杂种单倍型构成, 另一支主要由枝毛野牡丹、野牡丹和嫌疑杂种单倍型构成, 还包含有毛茛的1个单倍型, 该单倍型很可能由野牡丹渐渗而来(图3A)。两个大的分支之间存在7个碱基的差异。枝毛野牡丹和福建龙海的野牡丹在*tpi*基因上没有多态性, 都只有1个单倍型。福建龙海野牡丹的这个单倍型与海南吊罗山野牡丹的最常见单倍型共享。野牡丹和紫毛野牡丹的嫌疑杂种个体的2个单倍型分别与野牡丹最常见单倍型(Ch1, Cf1)和紫毛野牡丹的最常见单倍型(P1)共享。枝毛野牡丹和毛茛的嫌疑杂种的4个个体在该基因上均具有2种单倍型, 其中1个单倍型与枝毛野牡丹的D1单倍型共享, 而4个个体的另外1个单倍型分别与毛茛的4个单倍型(S1, S2, S3和S4)一致。

2.1.2 *gbss*基因

4个野牡丹属物种及2个嫌疑杂种的*gbss*基因序列比对后的长度为612 bp, 共存在29个变异位点。紫毛野牡丹和野牡丹之间在该基因上并未有固定的碱基替代; 枝毛野牡丹和毛茛之间则有2个碱基替代, 并且在这2个位点上其嫌疑杂种个体均表现

表2 紫毛野牡丹和野牡丹在*cam*和*tpi*基因上的固定变异位点及其嫌疑杂种在这些位点上的碱基组成(R = A + G; Y = C + T; W = T + A)  
Table 2 The base composition of the differentially fixed sites at the *cam* and *tpi* genes between *Melastoma penicillatum* and *M. candidum* in their putative hybrid (R = A + G; Y = C + T; W = T + A)

类群 Taxon	<i>cam</i>		<i>tpi</i>						
	292	244	204	225	258	272	315	340	568
野牡丹 <i>Melastoma candidum</i> (C)	A	G	T	T	T	G	A	T	C
紫毛野牡丹 <i>M. penicillatum</i> (P)	G	A	A	C	C	A	G	C	T
紫毛野牡丹和野牡丹的嫌疑杂种 Putative hybrid between P and C	R	R	W	Y	Y	R	R	Y	Y

表3 枝毛野牡丹和毛蕊在4个基因上的固定变异位点及其嫌疑杂种在这些位点上的碱基组成(R = A + G; Y = C + T; W = T + A; M = A + C; S = C + G)

Table 3 The base composition of the differentially fixed sites at the four nuclear genes between *Melastoma dendrisetosum* and *M. sanguineum* in their putative hybrid (R = A + G; Y = C + T; W = T + A; M = A + C; S = C + G)

类群 Taxon	cam			chi		gbss		tpi	
	190	329	661	79	258	315	414	80	240
毛蕊 <i>M. sanguineum</i> (S)	T	C	G	C	A	G	G	G	T
枝毛野牡丹 <i>M. dendrisetosum</i> (D)	C	T	A	T	C	A	C	A	C
枝毛野牡丹和毛蕊的嫌疑杂种 Putative hybrid between D and S	Y	Y	R	Y	M	R	S	R	Y

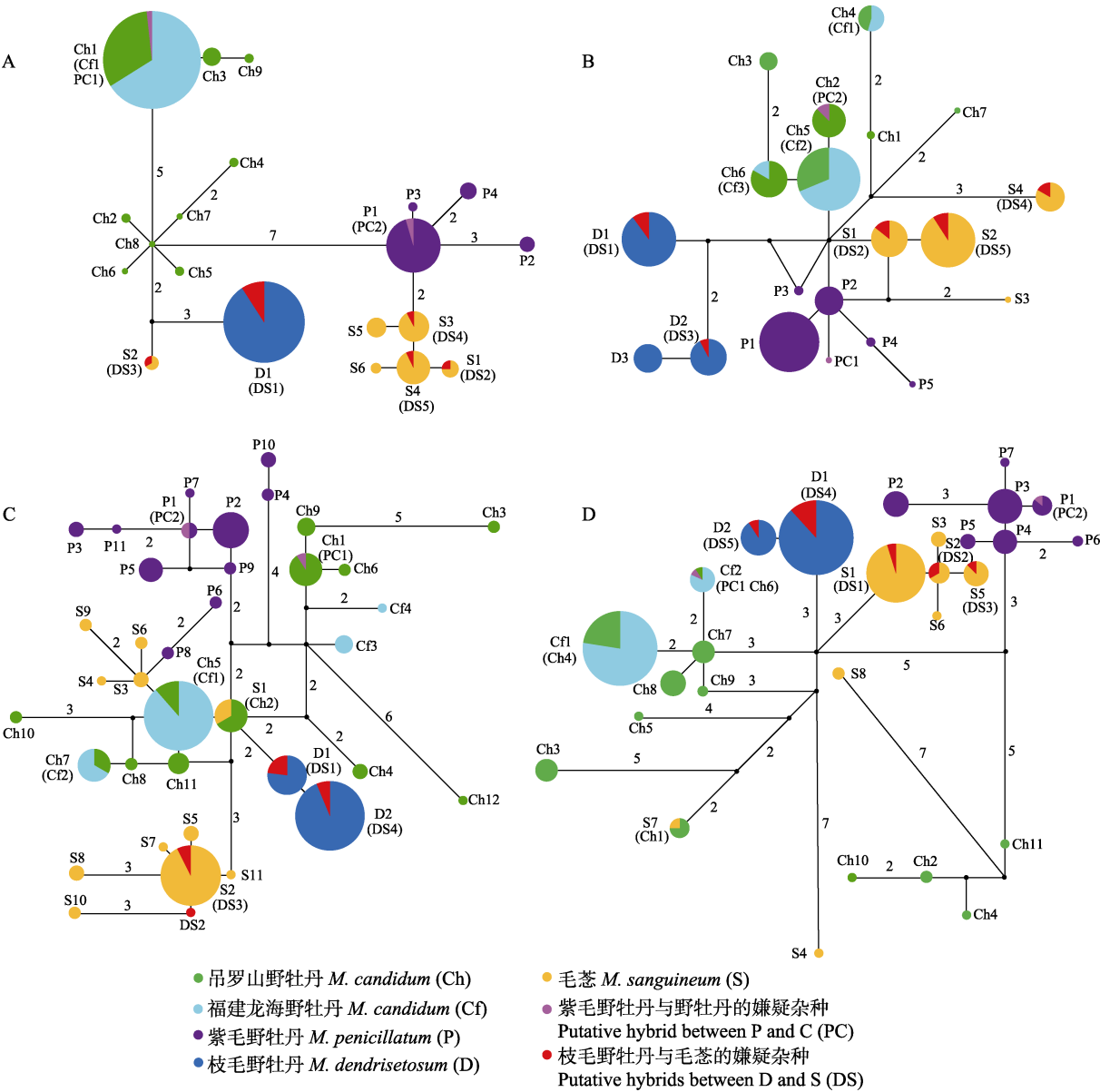


图3 4个野牡丹属物种及2个嫌疑杂种在4个核基因上的单倍型网络图。A、B、C、D分别为tpi、gbss、chi和cam基因的单倍型网络图。两个单倍型之间的连线上的数字代表突变步骤，未标出数字的均表示一个突变步骤。黑色小圆圈代表未取样到的单倍型或假设的单倍型。

Fig. 3 Median-joining networks of tpi (A), gbss (B), chi (C) and cam (D) genes of the four Melastoma species and the two putative hybrids. The numbers around the connecting lines between haplotypes represent the number of mutational steps between them, while those without numbers represent only one mutational step. Small black circles represent hypothetical or unsampled haplotypes.



为二者的碱基种类叠加状态(表3)。

所分析的4个野牡丹属物种在*gbss*基因上多态性均较低(图3B)。福建龙海的野牡丹所有单倍型均与海南吊罗山的野牡丹的单倍型共享, 此外海南吊罗山的野牡丹还拥有4个独特的单倍型。紫毛野牡丹和野牡丹的嫌疑杂种个体的1个单倍型与野牡丹的Ch2单倍型共享, 另1个单倍型为其特有, 但与紫毛野牡丹主要单倍型之间只差1个碱基。枝毛野牡丹和毛蕊的嫌疑杂种的所有个体均有2种单倍型, 分别与枝毛野牡丹(D1, D2)和毛蕊单倍型(S1, S2, S4)共享。

### 2.1.3 *chi*基因

4个野牡丹属物种及2个嫌疑杂种的*chi*基因序列比对后的长度为740 bp, 其中有55个变异位点。在该基因上紫毛野牡丹和野牡丹之间没有固定的碱基替代。枝毛野牡丹和毛蕊之间存在2个固定的碱基替换, 它们的嫌疑杂种在这2个位点上全部表现为两个亲本碱基的叠加状态(表3)。

除了枝毛野牡丹只有2种单倍型外, 其他3个物种在该基因上的单倍型多样性均较高(图3C)。福建龙海的野牡丹的主要单倍型(Cf1和Cf2)均与海南吊罗山的野牡丹的单倍型共享, 但单倍型数目远低于后者。野牡丹、毛蕊和紫毛野牡丹在该基因上均没有表现出同一物种的单倍型之间关系更近的特点。毛蕊还与野牡丹共享1个单倍型(S1和Ch2)。紫毛野牡丹和野牡丹的嫌疑杂种个体的2个单倍型分别与野牡丹的Ch1单倍型和紫毛野牡丹的P1单倍型共享。枝毛野牡丹和毛蕊的嫌疑杂种个体均有2个单倍型, 其中3个个体的2个单倍型分别与枝毛野牡丹(D1, D2)和毛蕊(S2)共享, 另外1个个体的单倍型之一与枝毛野牡丹(D1)共享, 另一个单倍型为该个体特有, 但与毛蕊的主要单倍型(S2)之间只相差1个碱基。

### 2.1.4 *cam*基因

研究所涉及的野牡丹属物种及嫌疑杂种的*cam*基因比对后的序列长度为741 bp, 一共检测到56个变异位点。其中紫毛野牡丹和野牡丹之间、枝毛野牡丹和毛蕊之间分别有2和3个固定的碱基替换, 而两个嫌疑杂种在相应的位置上均表现为嫌疑双亲碱基种类的叠加状态(表2, 3)。

枝毛野牡丹和福建龙海的野牡丹在*cam*基因上表现出较低的单倍型多样性, 都只有2种单倍型(图

3D)。福建龙海野牡丹的2个单倍型均与吊罗山野牡丹共享。紫毛野牡丹和野牡丹的嫌疑杂种个体的2种单倍型分别与紫毛野牡丹的P1单倍型和野牡丹的Ch6 (Cf2)单倍型共享。枝毛野牡丹和毛蕊的嫌疑杂种共有5种单倍型, 3种与毛蕊(S1, S2和S5)共享, 2种与枝毛野牡丹(D1和D2)共享。另外, 我们注意到毛蕊的1个单倍型S7与海南吊罗山野牡丹的Ch1单倍型共享, 很可能由野牡丹渐渗而来。

### 2.2 叶绿体基因间隔区序列分析

在我们分析的5个叶绿体基因间隔区中, 枝毛野牡丹和毛蕊在*trnL-trnF*上具有变异位点, 而紫毛野牡丹和野牡丹在这些基因间隔区均未检测到变异。所分析的野牡丹属物种*trnL-trnF*序列进行比对后的长度为825 bp, 枝毛野牡丹和毛蕊的所有个体中仅检测到1个多态性位点。在该位点上毛蕊均为C, 枝毛野牡丹绝大多数个体(18个)为T, 少数个体(2个)为C。4个嫌疑杂种个体中, 有1个为T, 另外3个为C。

## 3 讨论

### 3.1 野牡丹属2个海南特有种与同属广布种之间自然杂交的分子证据

本研究旨在通过对4个低拷贝核基因的序列分析检验紫毛野牡丹和野牡丹之间、枝毛野牡丹和毛蕊之间是否存在自然杂交。枝毛野牡丹和毛蕊在全部4个核基因上, 紫毛野牡丹和野牡丹在这4个核基因中的2个基因上(*cam*和*tpi*)各有多个固定的碱基差异, 它们的嫌疑杂种个体在这些位点上均表现出双亲碱基种类的叠加状态。另外, 所有嫌疑杂种个体在每个核基因上均有2种单倍型(表4), 其中紫毛野牡丹和野牡丹的嫌疑杂种个体除*gbss*基因外, 2种单倍型均是1个与野牡丹共享, 另1个与紫毛野牡丹共享; 在*gbss*基因上, 它的2个单倍型1个与野牡丹共享, 另1个为其独有的单倍型, 但是仅与紫毛野牡丹的主要单倍型相差1个碱基。枝毛野牡丹和毛蕊的嫌疑杂种个体的2个单倍型1个均与枝毛野牡丹共享, 另1个除*chi*基因外均与毛蕊共享; 在*chi*基因上, 1个嫌疑杂种个体的1个单倍型与枝毛野牡丹共享, 另1个为其独有的单倍型, 但该单倍型与毛蕊主要单倍型之间只相差1个碱基。嫌疑杂种中极少数特有的单倍型很可能来自于未取样到的嫌疑亲本物种的单倍型。因为这些嫌疑杂种个体在所分析



表4 野牡丹属2个嫌疑杂种个体在4个核基因上的基因型。**PC**为紫毛野牡丹和野牡丹的嫌疑杂种个体; **DS\_1–DS\_4**为枝毛野牡丹和毛蕊的4个嫌疑杂种个体。单下划线、双下划线、波浪线和虚线分别代表与野牡丹、紫毛野牡丹、毛蕊和枝毛野牡丹共享该单倍型。单倍型命名同图3。

Table 4 Genotypes of two putative hybrids of *Melastoma* at four nuclear genes (*tpi*, *cam*, *chi* and *gbss*). Haplotypes with single, double, wavy, or dotted underlines have identical sequences with those of *M. candidum*, *M. penicillatum*, *M. sanguineum*, and *M. dendrisetosum*, respectively. Haplotypes without underline are unique to the putative hybrids.

类群 Taxon	个体编号 Sample ID	<i>tpi</i>	<i>cam</i>	<i>chi</i>	<i>gbss</i>
紫毛野牡丹和野牡丹的嫌疑杂种 Putative hybrid (PC)	PC	<u>PC1</u> <u>PC2</u>	<u>PC1</u> <u>PC2</u>	<u>PC1</u> <u>PC2</u>	PC1 PC2
枝毛野牡丹和毛蕊的嫌疑杂种 Putative hybrid (DS)	DS_1	<u>DS1</u> <u>DS2</u>	<u>DS1</u> <u>DS4</u>	<u>DS1</u> <u>DS2</u>	<u>DS1</u> <u>DS2</u>
	DS_2	<u>DS1</u> <u>DS3</u>	<u>DS2</u> <u>DS4</u>	<u>DS1</u> <u>DS3</u>	<u>DS3</u> <u>DS4</u>
	DS_3	<u>DS1</u> <u>DS4</u>	<u>DS3</u> <u>DS5</u>	<u>DS3</u> <u>DS4</u>	<u>DS1</u> <u>DS2</u>
	DS_4	<u>DS1</u> <u>DS5</u>	<u>DS2</u> <u>DS4</u>	<u>DS1</u> <u>DS3</u>	<u>DS1</u> <u>DS5</u>

的各个核基因上均表现为嫌疑亲本物种等位基因的组合, 结合它们生长于嫌疑亲本物种的分布重叠区域且同时具有嫌疑亲本物种的中间形态特征, 因此我们的分子数据支持这2个嫌疑杂种分别为紫毛野牡丹和野牡丹、枝毛野牡丹和毛蕊的自然杂种。叶绿体基因间隔区*trnL-trnF*序列分析表明, 枝毛野牡丹和毛蕊的杂种有2种单倍型, 其中1个个体的单倍型与枝毛野牡丹共享, 应该是以枝毛野牡丹为母本; 另外3个个体的单倍型与毛蕊和少数枝毛野牡丹的单倍型共享, 因此无法判断其母本, 但毛蕊作为母本的可能性较大。

3.2 生境干扰可能造成了野牡丹属2个海南特有种与同属广布种之间的自然杂交

野牡丹属经历了快速的适应性辐射, 在过去一百万年的时间中进化出了20多个物种(Meyer, 2001; Renner & Meyer, 2001)。物种的快速形成往往伴随着祖先多态性的不完全谱系分选, 这一点也可以从本研究的核基因单倍型网络图看出: 除枝毛野牡丹外, 物种内的单倍型之间的关系并不总是更近。也正是由于快速的适应性辐射, 野牡丹属物种间的生殖隔离并不完全, 为杂交提供了机会。然而无论是紫毛野牡丹和野牡丹, 还是枝毛野牡丹和毛蕊都具有很好的生境隔离。紫毛野牡丹通常生长于高海拔的林下, 非常喜阴, 而野牡丹生长于较低海拔的空旷地带, 非常喜阳, 它们很少有机会发生生境的重叠。毛蕊通常生长于林缘, 稍喜阴, 而枝毛野牡丹通常生长于林下, 喜阴, 同样二者很少有机会发生生境的重叠。如果这些物种保持生境的隔离, 发生杂交的机会就很小。然而, 一条穿越吊罗山保护区的公路使这些野牡丹属物种的生境受到了强烈干扰。我们的野外调查发现, 在海拔300–400 m之间的

公路两边, 枝毛野牡丹和毛蕊生长在一起; 在海拔900 m左右公路尽头度假村的位置, 紫毛野牡丹和野牡丹生长在一起。本研究所发现的杂种个体全部位于这条公路两边或公路尽头度假村的开阔地带, 而在没有生境干扰的紫毛野牡丹的林下生境中, 我们并未发现野牡丹和嫌疑杂种个体; 但对于枝毛野牡丹, 因为分布范围非常有限, 我们无法进一步评估。生境干扰是自然杂交发生的一个重要推动力(Arnold, 1997; Grant & Grant, 2014), 它一方面打破了原本存在的物种之间的生态隔离和促进了杂交, 另一方面也为杂种提供了适宜的生境。因此, 生境的干扰可能造成了野牡丹属2个海南特有种与同属广布种之间的杂交。

3.3 野牡丹属两个海南特有种的保护

紫毛野牡丹仅分布于海南中部山区的高海拔地区(Liu et al, 2014), 枝毛野牡丹仅分布于海南吊罗山保护区的一个山谷, 且数量不足300株(彭东辉等, 2014)。相对于我国野牡丹属其他物种如野牡丹、毛蕊、展毛野牡丹和地蕊来说, 这2个海南特有种分布范围非常有限, 种群数目很少, 因此具有较高的保护价值。枝毛野牡丹的模式标本采于海南乐会(今海南琼海)(陈介, 1983), 但如今模式标本的产地已不见有枝毛野牡丹的分布, 显然其种群数量在过去的三十多年中经历了下降。这两个物种都喜林下的生境, 因此对生境的干扰非常敏感。同时生境干扰也造成这两个特有种与同属广布种的杂交, 这样会造成繁殖能量的浪费, 进一步造成这两个特有种个体数量的下降。因此无论从两个物种对生境的敏感性还是从避免杂交的角度来讲, 避免生境干扰都是保护这两个海南特有种的最关键手段。

保护物种最重要的是保护其遗传多样性。从遗

传多样性上看, 枝毛野牡丹具有最低的遗传变异, 在每个核基因上仅有1–3个关系极近的单倍型, 紫毛野牡丹有较多的遗传变异, 这可能与它目前较大的群体规模有关。杂交可以增加物种的遗传多样性, 例如海南吊罗山野牡丹居群的遗传多样性远高于福建龙海的野牡丹居群。野牡丹和毛茛可以发生频繁的杂交与渐渗(Liu et al, 2014), 海南吊罗山野牡丹和毛茛分布上有重叠, 可以杂交而增加遗传多样性, 这一点从部分核基因(*cam*和*chi*)的单倍型网络图也可以看出。需要注意的是, 野牡丹与毛茛的杂种具有很强的生活力和育性, 可以与亲本物种反复回交(Liu et al, 2014), 但本研究中的2个杂种在4个核基因上均为其两个亲本物种的等位基因组合, 很可能是F<sub>1</sub>代杂种。尽管准确地确定杂种的F<sub>1</sub>地位需要更多的核基因位点, 但我们的野外调查没有发现形态上与任何一个亲本接近的可能的回交后代, 这表明F<sub>1</sub>代杂种可能具有很低的育性, 限制了利用杂交增加物种内遗传多样性的潜力。

除此之外, 恢复种群数量也是濒危物种保护的重要内容。紫毛野牡丹和枝毛野牡丹在实验室条件下的种子萌发率都较高, 同时野牡丹属物种扦插繁殖相对容易, 因此可以利用实验室条件对两种野牡丹进行种子繁殖或扦插繁殖, 再将小苗移植到合适的生境来提高种群数量。

## 参考文献

- Abbott R, Albach D, Ansell S, Arntzen JW, Baird SJE, Bierne N, Boughman J, Brelsford A, Buerkle CA, Buggs R, Dieckmann U, Eroukhmanoff F, Grill A, Cahan SH, Hermansen JS, Hewitt G, Hudson AG, Jiggins C, Jones J, Keller B, Marczewski T, Mallet J, Martinez-Rodriguez P, Möst M, Mullen S, Nichols R, Nolte AW, Parisod C, Pfennig K, Rice AM, Ritchie MG, Seifert B, Smadja CM, Stelkens R, Szymura JM, Väinölä R, Wolf JBW, Zinner D, Butlin RK (2013) Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, 26, 229–246.
- Arnold ML (1997) *Natural Hybridization and Evolution*. Oxford University Press, Oxford.
- Arnold ML (2006) *Evolution Through Genetic Exchange*. Oxford University Press, Oxford.
- Arnold ML, Martin NH (2009) Adaptation by introgression. *Journal of Biology*, 8, 82.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 37–48.
- Chao LF, Chen YY, Wang SQ, Liu T, Wu W, Dai SP, Wang F, Fan Q, Shi SH, Zhou RC (2014) One species or two? Multi-locus analysis of nucleotide variation of *Melastoma penicillatum* and *Melastoma sanguineum* (Melastomataceae) in Hainan, China. *Biochemical Systematics and Ecology*, 55, 275–282.
- Chen J, Renner SS (2007) Melastomataceae. In: *Flora of China* (ed. Editorial Committee of Flora of China), Vol. 13, pp. 360–399. Science Press, Beijing and Missouri Botanical Garden, St Louis.
- Chen J (1983) A study of *Melastoma* (Melastomataceae) in China. *Journal of South China Agricultural College*, 4(1), 31–36. (in Chinese) [陈介 (1983) 中国野牡丹科野牡丹属植物的研究. 华南农学院学报, 4(1), 31–36.]
- Chen J (1984) Melastomataceae. In: *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* (ed. Editorial Committee of Flora Reipublicae Popularis Sinicae, Chinese Academy of Sciences), Tomus, 53(1), pp. 152–161. Science Press, Beijing. (in Chinese) [陈介 (1984) 野牡丹科. 见: 中国植物志 (中国科学院中国植物志编辑委员会编), 53(1), 152–161. 科学出版社, 北京.]
- Dai SP, Wu W, Zhang RS, Liu T, Chen YY, Shi SH, Zhou RC (2012) Molecular evidence for hybrid origin of *Melastoma intermedium*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 41, 136–141.
- Doyle JJ (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11–15.
- Grant PR, Grant BR (2014) Speciation undone. *Nature*, 507, 178–179.
- Gross CL (1993) The breeding system and pollinators of *Melastoma affine* (Melastomataceae): a pioneer shrub in tropical Australia. *Biotropica*, 25, 468–474.
- Huxel GR (1999) Rapid displacement of native species by invasive species: effects of hybridization. *Biological Conservation*, 89, 143–152.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451–1452.
- Liu T, Chen YY, Chao LF, Wang SQ, Wu W, Dai SP, Wang F, Fan Q, Zhou RC (2014) Extensive hybridization and introgression between *Melastoma candidum* and *M. sanguineum*. *PLoS ONE*, 9, e96680.
- Lu GH, Wu WH, Wang RZ, Li XL, Wang YQ (2009) Division of labor of heteromorphic stamens in *Melastoma malabathricum*. *Biodiversity Science*, 17, 174–181. (in Chinese with English abstract) [路国辉, 武文华, 王瑞珍, 李新亮, 王英强 (2009) 野牡丹异型雄蕊的功能分化. 生物多样性, 17, 174–181.]
- Luo ZL, Zhang DX (2005) A review of heteranthery in flowering plants. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 13, 536–542.
- Luo ZL, Zhang DX, Renner SS (2008) Why two kinds of stamens in buzz-pollinated flowers? Experimental support for

- Darwin's division-of-labour hypothesis. *Functional Ecology*, 22, 794–800.
- Luo ZL, Gu L, Zhang DX (2009) Intrafloral differentiation of stamens in heterantherous flowers. *Journal of Systematics and Evolution*, 47, 43–56.
- Mallet J (2005) Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology & Evolution*, 20, 229–237.
- Meyer K (2001) Revision of the Southeast Asian genus *Melastoma*. *Blumea*, 46, 351–398.
- Moody ML, Les DH (2002) Evidence of hybridity in invasive watermilfoil (*Myriophyllum*) populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 99, 14867–14871.
- Peng DH, Lan SR, Wu SS (2014) Pollination biology and breeding system of *Melastoma dendrisetosum*. *Forest Research*, 27(1), 11–16. (in Chinese with English abstract) [彭东辉, 兰思仁, 吴沙沙 (2014) 中国特有种枝毛野牡丹传粉生物学及繁育系统研究. *林业科学研究*, 27(1), 11–16.]
- Renner SS, Meyer K (2001) Melastomeae come full circle: biogeographic reconstruction and molecular clock dating. *Evolution*, 55, 1315–1324.
- Rhymer JM, Simberloff D (1996) Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27, 83–109.
- Rieseberg LH (1997) Hybrid origins of plant species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 28, 359–389.
- Strand AE, Leebens-Mack J, Milligan BG (1997) Nuclear DNA-based markers for plant evolutionary biology. *Molecular Ecology*, 6, 113–118.
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17, 1105–1109.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25, 4876–4882.
- Todesco M, Pascual MA, Owens GL, Ostevik KL, Moyers BT, Hübner S, Heredia SM, Hahn MA, Caseys C, Bock DG, Rieseberg LH (2016) Hybridization and extinction. *Evolutionary Applications*, 9, 892–908.
- Wolf DE, Takebayashi N, Rieseberg LH (2001) Predicting the risk of extinction through hybridization. *Conservation Biology*, 15, 1039–1053.

(责任编辑: 葛学军 责任编辑: 闫文杰)

•研究报告•

# 偏花报春和海仙报春3个同域居群的不对称杂交

谢艳萍<sup>1</sup> 赵建立<sup>2</sup> 朱兴福<sup>1</sup> 李 莉<sup>1</sup> 李庆军<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup> (中国科学院西双版纳热带植物园热带森林生态学重点实验室, 云南勐腊 666303)<sup>2</sup> (云南大学生态学与进化生物学实验室, 云南省生物资源保护与利用国家重点实验室, 昆明 650091)

**摘要:** 自然杂交是进化生物学研究中的热点, 而杂交方向则是理解自然杂交和生殖隔离机制的一个关键环节。偏花报春(*Primula secundiflora*)和海仙报春(*P. poissonii*)在横断山区重叠分布且存在自然杂交现象, 研究仅证实了种间杂交的发生, 但对不同地域的这2个物种间的杂交方向并未开展深入研究。本研究选取偏花报春和海仙报春3个同域分布点的居群, 利用双亲遗传的核转录间隔区ITS和母系遗传的叶绿体片段*trnH-psbA*构建系统树, 检测了3个居群中的自然杂交以及杂交方向; 通过人工授粉实验检测种内种间杂交以及不同物种作为母本时对结籽数的影响水平。DNA分子标记结果显示每个居群中的杂交方向都是不对称的, 海仙报春更容易在杂交中作为母本。人工授粉的结果表明种内种间交配以及哪个种作为母本对结籽数有非常显著的影响。海仙报春作为母本时能够显著提高结籽数。这2个物种之间不同的生殖隔离强度可能是造成不对称杂交的原因。3个居群中都是以海仙报春更易作母本, 可能是因为这3个地点的种间生殖隔离具有相似的机制。

**关键词:** 报春花属; 同域分布; 杂交方向; 不对称

## Asymmetric hybridization of *Primula secundiflora* and *P. poissonii* in three sympatric populations

Yanping Xie<sup>1</sup>, Jianli Zhao<sup>2</sup>, Xingfu Zhu<sup>1</sup>, Li Li<sup>1</sup>, Qingjun Li<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup> Key Laboratory of Tropical Forest Ecology, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Mengla, Yunnan 666303<sup>2</sup> Laboratory of Ecology and Evolutionary Biology, State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources in Yunnan, Yunnan University, Kunming 650091

**Abstract:** Natural hybridization is one of the research hotspots in evolutionary biology. The direction of hybridization is a critical aspect to understanding natural hybridization and interspecific reproductive isolation. Although natural hybridization between *Primula secundiflora* and *P. poissonii* has been confirmed in overlapping areas in the Hengduan Mountains, the interspecific hybridization directions among different populations remain unclear. We chose three sympatric populations to test interspecific hybridization directions. Biparentally inherited nuclear internal transcribed spacer (ITS) and maternally inherited chloroplast sequence *trnH-psbA* techniques were used to confirm hybridization and to test directions. Moreover, hand pollination of intraspecific and interspecific populations were performed to detect which factors influence seed numbers and hybridization patterns. Results of DNA marker analysis suggested that the direction of hybridization was asymmetric in each population, and *P. poissonii* was found to be the most maternal parent. Intraspecific crossing produced significantly more seeds than interspecific crossing. *Primula poissonii* produced significantly higher seed numbers when it was treated as the maternal parent. The asymmetric direction may be the result of the asymmetric strength of reproductive barriers between *P. secundiflora* and *P. poissonii*. Similar mechanisms of reproductive isolation may contribute to the asymmetric hybridization among the three sympatric sites.

**Key words:** *Primula*; sympatric distribution; hybridization direction; asymmetric

收稿日期: 2017-01-01; 接受日期: 2017-06-17

基金项目: 国家自然科学基金(31500194)和云南省联合基金(U1202261)

\* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: qingjun.li@ynu.edu.cn

自然杂交是指两个遗传上不同的居群之间的交配繁殖(Barton & Hewitt, 1985), 是动植物中一种常见的现象(Arnold, 1997)。由于揭示自然杂交事件有利于深入理解生殖隔离的机制和进化(Zhou et al, 2008), 近几十年来它吸引了众多学者的目光(Anderson, 1948; Mallet, 2005; van Droogenbroeck et al, 2006; Arnold et al, 2012; Abbott et al, 2013)。自然杂交可能会引起诸多遗传后果, 比如渐渗杂交可能会促进种间基因流并产生新的基因型组合, 从而增加物种的分化和生态适应性(Ellstrand et al, 1999; Jensen et al, 2005; Abbott et al, 2013); 过度的种间杂交则可能导致遗传融合, 降低物种多样性(Levin et al, 1996; Runyeon-Lager & Prentice, 2000)。杂交的方向是杂交中一个非常重要的方面(Zhou et al, 2008), 在杂交过程中, 杂交方向可能是不对称的双向杂交或单向杂交。这种现象在植物中相对比较常见(Zha et al, 2010; Field et al, 2011; Muranishi et al, 2013; Zhang et al, 2016)。而造成这种现象的原因有很多, 比如单向不亲和(unilateral incompatibility)、开花物候、传粉昆虫的选择偏好以及亲本在同域居群中的分布数量(Carney et al, 2000; Zhou et al, 2008; Zha et al, 2010; Muranishi et al, 2013; Zhang et al, 2016)。因此研究杂交发生的方向有利于探寻亲本间生殖隔离样式, 而比较不同地点之间的杂交方向能佐证亲本间更明确的种间关系。

中国西南部横断山区是生物多样性的热点地区(Myers et al, 2000; Mutke & Barthlott, 2005), 保存了约8,000种种子植物(李锡文和李捷, 1993)。近缘物种重叠分布在该地区较为常见, 且这些近缘物种间易发生自然杂交(Du et al, 2012; Yu et al, 2014; Liao et al, 2015), 甚至可通过自然杂交形成新的物种(Wang et al, 2001; Mao & Wang, 2011)。从自然杂交到杂交物种形成很可能是横断山区生物多样性起源的途径之一。对横断山区自然杂交现象的研究可为理解该地区生物多样性的起源提供科学理论依据。

报春花属(*Primula*)以其丰富的物种和异型花柱而闻名, 且超过一半的报春花物种分布在中国西南部(Arnold & Richards, 1998; Richards, 2003; Wu & Zhang, 2010)。自然杂交事件在报春花属的很多分布范围内被广泛记载(Stace, 1975; Richards, 2003; Zhu et al, 2009; Terzioglu et al, 2012; Ma et al,

2014)。但目前在我国西南地区仅报道两例报春花属植物的自然杂交事件(Zhu et al, 2009; Ma et al, 2014), 其中一例是在丽江同域分布形成杂交区的橘红灯台报春(*P. bulleyana*)和霞红灯台报春(*P. beesiana*), 杂交方向为单向, 杂交后代全部都是和橘红灯台报春的回交个体, 且在霞红灯台报春上不产生有活力的杂交种子(Ma et al, 2014)。另一个例子是海仙报春(*P. poissonii*)和偏花报春(*P. secundiflora*)之间的杂交(Zhu et al, 2009), 确认了一个居群中26个中间形态特征的个体是杂交个体, 16个以海仙报春为母本, 其余10个以偏花报春为母本。针对后一例子, 为检测杂交发生的方向在不同的地点是否存在差异, 本研究采集了3个同域分布居群中的海仙报春和偏花报春的杂交个体, 利用双亲遗传的核转录间隔区ITS和母系遗传的叶绿体片段

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集及杂交方向的检测

采集来自香格里拉格咱乡(GZ)、普达措国家公园(PTS)和香格里拉高山植物园(SABG) (图1) 3个居群的海仙报春、偏花报春以及杂交个体共46个个体的新鲜叶片材料。其中海仙报春和偏花报春各7个个体, 杂交个体共32个。用硅胶迅速干燥叶片后带回实验室, 采用改良的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB, cetyltrimethyl ammonium bromide)法提取总DNA (Doyle & Doyle, 1987)。核转录间隔区ITS和叶绿体片段\muL, 包括0.25  $\mu$ L的Taq DNA聚合酶(5 U/ $\mu$ L), 10  $\mu$ L带有Mg<sup>2+</sup>的5  $\times$  Taq缓冲液, 4  $\mu$ L dNTP混合物, 引物各2  $\mu$ L (浓度为20  $\mu$ M), 2  $\mu$ L模板DNA ( $\approx$  60 ng/ $\mu$ L)以及双蒸水29.75  $\mu$ L。反应条件如下: 94 $^{\circ}$ C预变性2 min, 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 50 $^{\circ}$ C退火20 s, 72 $^{\circ}$ C延伸20 s, 共35个循环, 最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。取4–5  $\mu$ L PCR扩增产物作琼脂糖凝胶电泳, 将有清晰目标条带的PCR产物进行测序。测序结果在Sequencher 4.14软件中检查拼接, 在Bioedit软件中用关联的Clustal

X对序列进行自动排列, 之后再进行必要的手工微调(Hall, 1999; Thompson et al, 2002)。

## 1.2 系统发育重建

从NCBI网站下载锡金报春(*P. sikkimensis*)的序列作为建树时的外类群。用软件jModelTest 2.1.6 (Guindon & Gascuel, 2003; Darriba et al, 2012)计算适合ITS和

## 1.3 亲本亲和能力比较及影响结籽数的因素

为了研究亲本产生杂种的能力, 我们于2013年6–7月在其中1个居群进行了一系列人工授粉实验。因为海仙报春和偏花报春都是二型花柱, 因此种间、种内的型间和型内一共产生了16种授粉处理。对于每个处理, 随机选取不少于35朵花, 当它们还是花苞时去雄防止自交, 并进行套袋, 以隔绝花开时昆虫访问及传粉。花开后根据不同的处理授粉并作不同标记以便于采集。2013年9月进行果实采集, 检验种内和种间交配(WBS)、海仙报春和偏花报春作母本(PSM), 以及它们的交互作用(WBS × PSM)是否影响种子产量, 对结籽数进行Tweedie分布的线性模型分析, 统计分析在SPSS 19.0上完成。

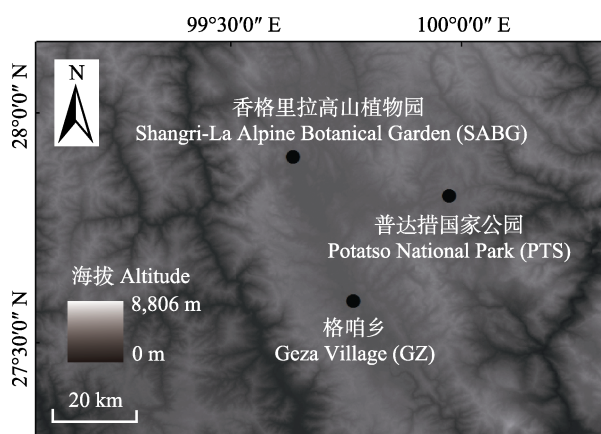


图1 香格里拉格咱乡(GZ)、普达措国家公园(PTS)和香格里拉高山植物园(SABG) 3个海仙报春和偏花报春居群的地理位置

Fig. 1 Locations of the three populations from Geza Village (GZ), Potatso National Park (PTS) and Shangri-La Alpine Botanical Garden (SABG) in Shangri-La

## 2 结果

### 2.1 ITS和trnH-psbA检测杂交方向

在亲本的2个物种中均未发现任何突变或双峰。2个物种之间共有4个核苷酸多态位点, 所有的32个杂交个体在这4个位点都表现为双峰(图2)。克隆后这些ITS序列被清楚地分为2种类型, 一种和偏花报春相同, 另一种和海仙报春相同。比对好的

### 2.2 系统发育重建

比对后的ITS和

### 2.3 影响杂交结籽数的因素

根据Tweedie分布的线性模型分析结果, 种内种间交配对结籽数的影响极显著( $P < 0.01$ ), 种内交配产生的种子数显著高于种间交配。种间杂交时, 对于海仙报春和偏花报春哪个物种作为母本对结籽数的影响极显著( $P < 0.01$ ) (表2)。

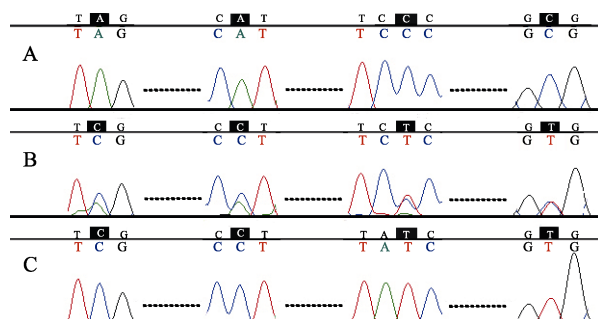


图2 海仙报春(A)、杂交个体(B)和偏花报春(C)核转录间隔区ITS序列中的双峰结构

Fig. 2 Double waves on part of internal transcribed spacer (ITS) sequences in *Primula poissonii* (A), Hybrids (B) and *P. secundiflora* (C)

表1 叶绿体片段 $trnH-psbA$ 中杂交个体和亲本存在变异的位点及位置  
Table 1 Positions at which hybrids and parents differ in the  $trnH-psbA$  sequence

居群 Population	物种 Species	个体数 No. of individuals	$trnH-psbA$ 变异位点及位置 Sequence region and position (bp) of $trnH-psbA$			
			36 bp	63 bp	103 bp	112–386 bp
格咱 Geza Village (GZ)	海仙报春 <i>Primula poissonii</i>	7	G	C	A	1*
	偏花报春 <i>P. secundiflora</i>	7	A	A	T	2*
	杂交个体类型1 Hybrid type-1	6	G	C	A	1*
	杂交个体类型2 Hybrid type-2	4	A	A	T	2*
香格里拉高山植物园 Shangri-La Alpine Botanical Garden (SABG)	杂交个体类型1 Hybrid type-1	2	G	C	A	1*
普达措国家公园 Potatso National Park (PTS)	杂交个体类型1 Hybrid type-1	15	G	C	A	1*
	杂交个体类型2 Hybrid type-2	5	A	A	T	2*

1\*=TCATAAAAAGCTTTCTTCTTACTAATGAAAAAGTATA-----  
2\*=ATTTATTAGTCTTTTATTACATATACTTTTCATTAGTAAGAAGAAAGCTTTTATGAGAAAAAAGAAAAGGGGTCATGAGTTAGTTC  
ATGATTAAAGTACCGTCTTTTCATTTTATTCTGTATTAATTACACTTATATTACTTTGTCTTTTTTGTGTTAATTTTTTTGAATCATTGAAA  
TAAAAAACTTTGACATTTTCTTTCATATTTTATAAAATATGAACATAAATAATGATGACGGGTAAAAATAGACTATTTCTCCTTTTCTAA  
bp代表碱基对, -代表缺失的碱基。bp represents base pairs, - is missing base.

3 讨论

理论上, 因为核基因是双亲遗传, 所以杂交个体应该具有双亲的拷贝(Broyles, 2002; Noyes, 2006; 李小娟等, 2007; Zha et al, 2008)。ITS序列在偏花报春和海仙报春中均无变异, 3个不同居群中的32个杂交个体在4个位点上的套峰均与双亲差异的位点一致。进一步的克隆测序也证实了与偏花报春和海仙报春一致的两种克隆类型(图2)。叶绿体基因被认为是母系遗传, 霞红灯台报春和橘红灯台报春中的 $trnH-psbA$ 就是母系遗传(Ma et al, 2014)。本研究ITS序列的套峰以及系统树的结果证实了种间杂交的发生, 系统树中的平行分支表明它们可能经历了网状进化。多次回交以及居群之间不同步的杂交应该是导致这种结果的原因。虽然杂交现象被证实了, 但本研究中我们仅使用了一个核转录间隔区片段, 可能导致系统关系不够明了, 因此还需要更多的研究来探讨种间自然杂交。

来自3个不同地方的居群中, 其中两个居群的偏花报春和海仙报春都可以作为杂交个体的母本, 而杂交个体倾向于以海仙报春为母本, 另一个居群中的杂交个体母本都来自于海仙报春, 表明存在不对称的双向杂交甚至单向杂交。不对称自然杂交的例子在植物中被广泛记载, 有的高度不对称甚至是单向杂交的(Xiang et al, 2000; Tiffin et al, 2001; van der Velde & Bijlsma, 2004; Zhou et al, 2008; Zha et al,

2010; Ma et al, 2014)。导致不对称杂交的原因有很多。比如不同的花期使得雄性先熟的杜鹃属(*Rhododendron*)中花期较早的马缨杜鹃(*R. delavayi*) 在末花期更容易接受来自露珠杜鹃(*R. irroratum*)的花粉, 因而在杂交中更常作为母本(Zha et al, 2010); 蝇子草属(*Silene*)中的一对可杂交物种, 因为雄性先熟的云南蝇子草(*S. yunnanensis*)具有较晚的盛花期, 加上传粉者的选择偏好, 使得杂交方向在很大程度上是从云南蝇子草到掌脉蝇子草(*S. asclepiadea*) (Zhang et al, 2016); 橐吾属(*Ligularia*)等3个属由于在同域分布时亲本数量的不同而导致不对称甚至单向的杂交, 常见种在杂交时更容易作为母本(Zhou et al, 2008); 而霞红灯台报春和橘红灯台报春的杂交区域中, 可能由于它们的细胞质遗传背景不兼容而使得在霞红灯台报春上不能形成有活力的杂交种子, 从而形成单向的杂交(Ma et al, 2014)。

本研究中不对称的杂交方向可能是由于两个物种不同的亲和能力导致的, 偏花报春的花柱长度长于海仙报春对应花柱类型的花柱长度, 可能使得海仙报春的大部分花粉管不足以进入到偏花报春的子房完成受精。这种情况在种间杂交时很常见, 比如小报春(*P. forbesii*)的花粉管本身长度不够长而不能到达岩生报春(*P. saxatilis*)的子房完成受精, 从而导致了种间杂交的不亲和(唐星林等, 2014)。种间交配时, 海仙报春作母本能够显著提高杂交种子的产量(表2), 这可能是由于海仙报春对异种花粉有



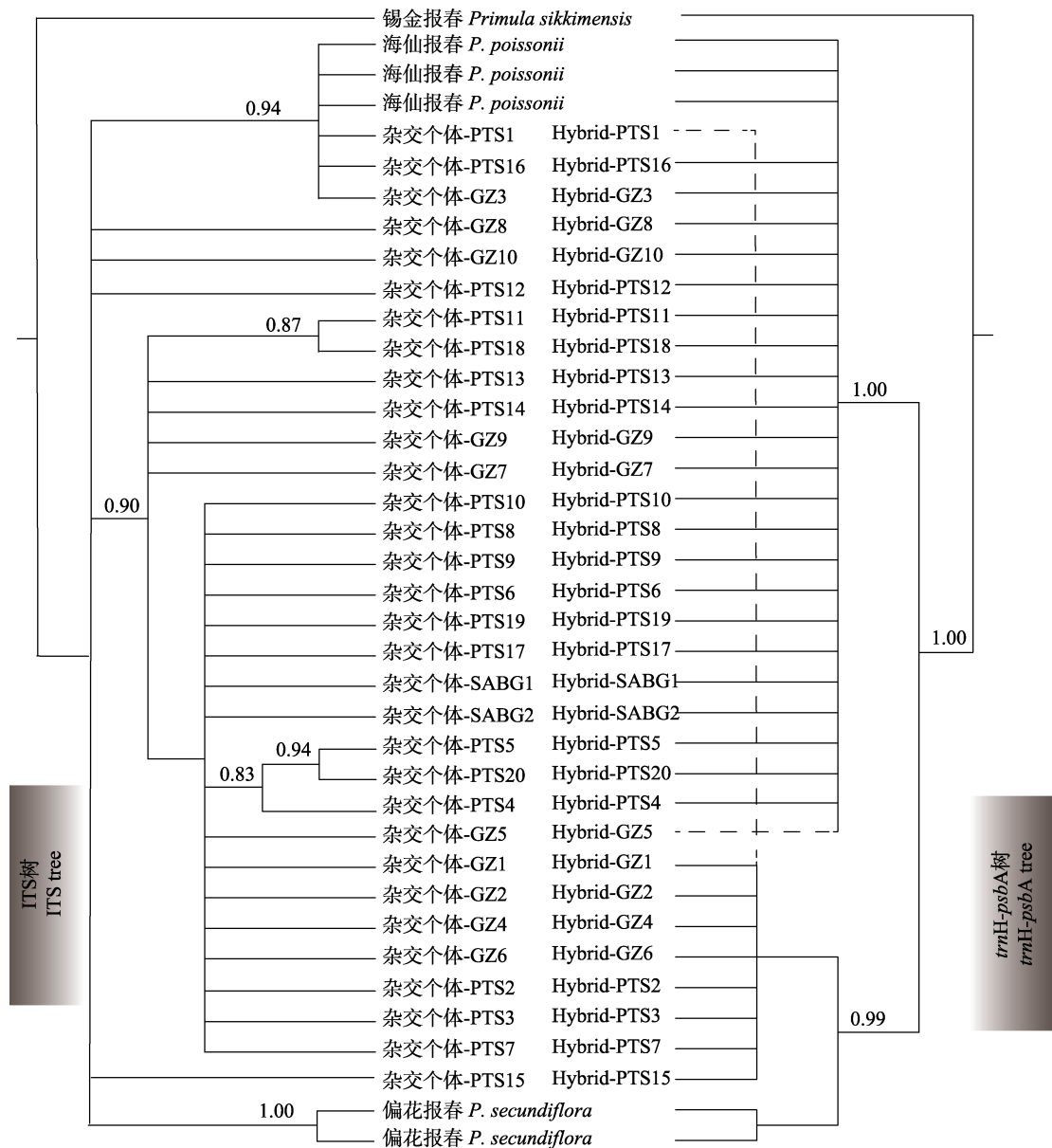


图3 基于Bayes法构建的核转录间隔区ITS和叶绿体基因trnH-psbA系统树。GZ、PTS和SABG分别代表格咱乡、普达措国家公园和香格里拉高山植物园居群。  
Fig. 3 The nuclear ITS and chloroplast trnH-psbA phylogeny tree based on Bayes method. GZ, PTS and SABG are the abbreviations of populations from Geza Village, Potatso National Park and Shangri-La Alpine Botanical Garden.

表2 种内种间交配对结籽数的影响			
Table 2 Effects of cross-pollination treatments (within or between species and mother species) on seed production			
来源 Source	Wald 卡方值	自由度	P值
	Wald Chi-Square	df	P-value
种内 vs. 种间	61.110	1	< 0.001
Within vs. between species (WBS)			
海仙报春 vs. 偏花报春作母本	29.078	1	< 0.001
<i>Primula poissonii</i> vs. <i>P. secundiflora</i> as mother (PSM)			
交互作用	22.074	1	< 0.001
Interaction (WBS × PSM)			

较强的亲和能力, 形成的阻止F<sub>1</sub>代杂交个体产生的生殖隔离弱于偏花报春, 因而在杂交区域出现更多以海仙报春为母本的杂交个体。由于亲本间不同的隔离强度而使得杂交方向不对称的现象在很多类群中都有报道(Arnold, 1997; Tiffin et al, 2001; Field et al, 2011; Natalis & Wesselingh, 2012)。考虑到这3个同域居群都分布在香格里拉, 所以它们可能具有相似的生殖隔离模式, 海仙报春的生殖隔离可能弱于偏花报春, 导致在不同居群中海仙报春更容易作

为母本。

种间杂交产生的种间基因流如果很大的话可能会破坏物种的完整性,而不对称的杂交可能会导致物种的灭绝。广泛分布在伊比利亚半岛东南部的大翅蓟属(*Onopordum*)植物*O. nervosum*与同属稀有植物*O. hinojense*同域分布时,因为存在不对称的杂交方向,可能会使得稀有种*O. hinojense*在4个世代之内灭绝(Balao et al, 2015)。然而海仙报春和偏花报春之间的杂交个体并不是很多,而且种间生殖隔离相对比较完整(未发表数据)。因此这两个物种在有自然杂交存在的前提下,依然能够维持清晰的种间界限,其完整性在短期内应该并不会被破坏,物种也不会濒临灭绝。

报春花属在横断山区广泛分布,且种类繁多,但在这个区域记载的自然杂交事件只有两例,而且都是灯台报春组的成员。研究这些杂交事件形成的原因及结果为理解物种形成过程提供了更多的可能性。我们对偏花报春和海仙报春在3个不同居群中的杂交方向的研究也只是管中窥豹,今后还需要更深入研究关于亲本间生殖隔离的衡量以及杂交对物种的影响,以更好地理解物种形成的过程。

## 参考文献

- Abbott R, Albach D, Ansell S, Arntzen JW, Baird SJE, Bierne N, Boughman J, Brelsford A, Buerkle CA, Buggs R (2013) Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, 26, 229–246.
- Anderson E (1948) Hybridization of the habitat. *Evolution*, 2, 1–9.
- Arnold ES, Richards AJ (1998) On the occurrence of unilateral incompatibility in *Primula* section *Aleuritia* Duby and the origin of *Primula scotica* Hook. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 128, 359–368.
- Arnold ML (1997) *Natural Hybridization and Evolution*. Oxford University Press, New York.
- Arnold ML, Ballerini ES, Brothers AN (2012) Hybrid fitness, adaptation and evolutionary diversification: lessons learned from Louisiana Irises. *Heredity*, 108, 159–166.
- Balao F, Casimiro-Soriguer R, Luis GCJ, Terrab A, Talavera S (2015) Big thistle eats the little thistle: does unidirectional introgressive hybridization endanger the conservation of *Onopordum hinojense*? *New Phytologist*, 206, 448–458.
- Barton NH, Hewitt GM (1985) Analysis of hybrid zones. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16, 113–148.
- Broyles SB (2002) Hybrid bridges to gene flow: a case study in milkweeds (*Asclepias*). *Evolution*, 56, 1943–1953.
- Carney SE, Gardner KA, Rieseberg LH (2000) Evolutionary changes over the fifty-year history of a hybrid population of sunflowers (*Helianthus*). *Evolution*, 54, 462–474.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9, 772.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11–15.
- Du GH, Zhang ZQ, Li QJ (2012) Morphological and molecular evidence for natural hybridization in sympatric population of *Roscoea humeana* and *R. cautleoides* (Zingiberaceae). *Journal of Plant Research*, 125, 595–603.
- Ellstrand NC, Prentice HC, Hancock JF (1999) Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 30, 539–563.
- Field DL, Ayre DJ, Whelan RJ, Young AG (2011) The importance of pre-mating barriers and the local demographic context for contemporary mating patterns in hybrid zones of *Eucalyptus aggregata* and *Eucalyptus rubida*. *Molecular Ecology*, 20, 2367–2379.
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology*, 52, 696–704.
- Hall TA (1999) BioEdit: user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17, 754–755.
- Jensen AB, Palmer KA, Boomsma JJ, Pedersen BV (2005) Varying degrees of *Apis mellifera ligustica* introgression in protected populations of the black honeybee, *Apis mellifera mellifera*, in Northwest Europe. *Molecular Ecology*, 14, 93–106.
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH (2005) Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 102, 8369–8374.
- Levin DA, Francisco-Ortega J, Jansen RK (1996) Hybridization and the extinction of rare plant species. *Conservation Biology*, 10, 10–16.
- Li XJ, Wang LY, Yang HL, Liu JQ (2007) Confirmation of natural hybrids between *Gentiana straminea* and *G. siphonantha* (Gentianaceae) based on molecular evidence. *Acta Botanica Yunnanica*, 29, 91–97. (in Chinese with English abstract) [李小娟, 王留阳, 杨惠玲, 刘建全 (2007) 麻花艽和管花秦艽(龙胆科)之间自然杂交类型的分子验证. *云南植物研究*, 29, 91–97.]
- Li XW, Li J (1993) A preliminary floristic study on the seed plants from the region of Hengduan Mountain. *Acta Botanica Yunnanica*, 15, 217–231. (in Chinese with English abstract) [李锡文, 李捷 (1993) 横断山脉地区种子植物区系的初步研究. *云南植物研究*, 15, 217–231.]
- Liao RL, Ma YP, Gong WC, Chen G, Sun WB, Zhou RC, Marczewski T (2015) Natural hybridization and asymmetric introgression at the distribution margin of two *Buddleja* species with a large overlap. *BMC Plant Biology*, 15, 146.
- Ma YP, Xie WJ, Tian XL, Sun WB, Wu ZK, Milne R (2014)

- Unidirectional hybridization and reproductive barriers between two heterostylous primrose species in north-west Yunnan, China. *Annals of Botany*, 113, 763–775.
- Mallet J (2005) Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology & Evolution*, 20, 229–237.
- Mao JF, Wang XR (2011) Distinct niche divergence characterizes the homoploid hybrid speciation of *Pinus densata* on the Tibetan Plateau. *The American Naturalist*, 177, 424–439.
- Muranishi S, Tamaki I, Setsuko S, Tomaru N (2013) Asymmetric introgression between *Magnolia stellata* and *M. salicifolia* at a site where the two species grow sympatrically. *Tree Genetics & Genomes*, 9, 1005–1015.
- Mutke J, Barthlott W (2005) Patterns of vascular plant diversity at continental to global scales. In: *Plant Diversity and Complexity Patterns, Local, Regional and Global Dimensions* (eds Friis I, Balslev H), pp. 521–537. The Royal Danish Academy of Sciences and Letters, Copenhagen, Biologiske Skrifter.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853–858.
- Natalis LC, Wesselingh RA (2012) Post-pollination barriers and their role in asymmetric hybridization in *Rhinanthus* (Orobanchaceae). *American Journal of Botany*, 99, 1847–1856.
- Noyes RD (2006) Intraspecific nuclear ribosomal DNA divergence and reticulation in sexual diploid *Erigeron strigosus* (Asteraceae). *American Journal of Botany*, 93, 470–479.
- Richards J (2003) *Primula*. Timber Press Inc., Oregon.
- Runyeon-Lager H, Prentice HC (2000) Morphometric variation in a hybrid zone between the weed, *Silene vulgaris*, and the endemic, *Silene uniflora* ssp. *petraea* (Caryophyllaceae), on the Baltic Island of Öland. *Canadian Journal of Botany*, 78, 1384–1397.
- Sang T, Crawford DJ, Stuessy TF (1997) Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany*, 84, 1120–1136.
- Stace CA (1975) *Hybridization and the Flora of the British Isles*. Academic Press, London.
- Tang XL, Liu YM, Pan HT, Ma YL, Li XY, Zhang QX (2014) Intergeneric cross-compatibility between *Primula forbesii* (Section Monocarpicae) and *Primula saxatilis* (Section Cortusoides). *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 34, 270–275. (in Chinese with English abstract) [唐星林, 刘艳梅, 潘会堂, 马玉磊, 李小远, 张启翔 (2014) 小报春与岩生报春种间杂交亲和性研究. *西北植物学报*, 34, 270–275.]
- Terzioğlu S, Coskuncelbi K, Gultepe M (2012) *Primula* × *uzungolensis* (Primulaceae): a new natural hybrid from NE Anatolia. *Turkish Journal of Botany*, 36, 9–19.
- Thompson JD, Gibson T, Higgins DG (2002) Multiple sequence alignment using Clustal W and Clustal X. In: *Current Protocols in Bioinformatics* (ed. Baxevanis AD). John Wiley & Sons, New York.
- Tiffin P, Olson MS, Moyle LC (2001) Asymmetrical crossing barriers in angiosperms. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 268, 861–867.
- van der Velde M, Bijlsma R (2004) Hybridization and asymmetric reproductive isolation between the closely related bryophyte taxa *Polytrichum commune* and *P. uliginosum*. *Molecular Ecology*, 13, 1447–1454.
- van Droogenbroeck B, Kyndt T, Romeijn-Peeters E, van Thuyne W, Goetghebeur P, Romero-Motochi JP, Gheysen G (2006) Evidence of natural hybridization and introgression between *Vasconcellea* species (Caricaceae) from southern Ecuador revealed by chloroplast, mitochondrial and nuclear DNA markers. *Annals of Botany*, 97, 793–805.
- Wang XR, Szmidt AE, Savolainen O (2001) Genetic composition and diploid hybrid speciation of a high mountain pine, *Pinus densata*, native to the Tibetan Plateau. *Genetics*, 159, 337–346.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (eds Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ), pp. 315–322. Academic Press, New York.
- Wu ZK, Zhang CQ (2010) Comparative study of pollination biology of two closely related alpine *Primula* species, namely *Primula beesiana* and *P. bulleyana* (Primulaceae). *Journal of Systematics and Evolution*, 48, 109–117.
- Xiang LL, Werth CR, Emery SN, McCauley DE (2000) Population-specific gender-biased hybridization between *Dryopteris intermedia* and *D. carthusiana*: evidence from chloroplast DNA. *American Journal of Botany*, 87, 1175–1180.
- Yu JJ, Kuroda C, Gong X (2014) Natural hybridization and introgression between *Ligularia cymbulifera* and *L. tongolensis* (Asteraceae, Senecioneae) in four different locations. *PLoS ONE*, 9, e115167.
- Zha HG, Milne RI, Sun H (2008) Morphological and molecular evidence of natural hybridization between two distantly related *Rhododendron* species from the Sino-Himalaya. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 156, 119–129.
- Zha HG, Milne RI, Sun H (2010) Asymmetric hybridization in *Rhododendron agastum*: hybrid taxon comprising mainly F1s in Yunnan, China. *Annals of Botany*, 105, 89–100.
- Zhang JJ, Montgomery BR, Huang SQ (2016) Evidence for asymmetrical hybridization despite pre- and post-pollination reproductive barriers between two *Silene* species. *Aob Plants*, 8, plw032.
- Zhou RC, Gong X, Boufford D, Wu CI, Shi SH (2008) Testing a hypothesis of unidirectional hybridization in plants: observations on *Sonneratia*, *Bruguiera* and *Ligularia*. *BMC Evolutionary Biology*, 8, 149.
- Zhu XF, Li Y, Wu GL, Fang ZD, Li QJ, Liu JQ (2009) Molecular and morphological evidence for natural hybridization between *Primula secundiflora* Franchet and *P. poissonii* Franchet (Primulaceae). *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 51, 29–36.

(责任编辑: 严岳鸿 责任编辑: 黄祥忠)

•研究报告•

# 中国秋海棠属植物的自然杂交发生及其特点

田代科<sup>1,2\*</sup> 李 春<sup>1,3</sup> 肖 艳<sup>1,2</sup> 付乃峰<sup>1,2</sup> 童 毅<sup>1,2</sup> 吴瑞娟<sup>1,2</sup>

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 (上海市资源植物功能基因组学重点实验室, 上海 201602)

3 (四川省芦山县林业局, 四川芦山 625600)

**摘要:** 自然杂交在植物界中十分普遍, 一直是物种形成和进化研究的热点。秋海棠属(*Begonia*)为世界最大植物属之一, 其种类繁多, 但关于自然杂交的相关报道很少。系统调查秋海棠属的自然杂交不仅有利于理解该属植物的多样性, 也是弄清其资源和解决物种分类问题不可缺少的环节。本文通过对国产秋海棠属植物自然杂交现象的系统调查和分析, 发现总计29种(占国产已知200种秋海棠的约15%)参与了杂交, 产生了31个自然“杂种”约50个居群。其中, 掌叶秋海棠(*B. hemsleyana*)和粗喙秋海棠(*B. longifolia*)参与杂交程度最高, 分别与另外的8种和7种秋海棠发生了杂交; 而裂叶秋海棠(*B. palmata*)发生杂交的居群最多, 达16处。自然杂交以云南(尤其是南部)发生频率最高, 一共有20种参与, 产生了31处杂交居群; 台湾和广西次之。杂交多为单向发生, 个体以 $F_1$ 代个体为主, 尚未脱离亲本独立成种。野外传粉生物学初步观察发现: 秋海棠的主要访花昆虫为食蚜蝇类, 其次是蜜蜂科, 但各自传粉特点及效率尚待进一步研究。杂种及疑似亲本的鉴定可通过形态学、分子生物学和人工重复杂交等综合方法实现。杂种的基因组大小(C值)等于或接近两亲本的平均值, 误差通常小于10%, 有助于辅助鉴定杂种及亲本。我们总结后认为杂交发生及杂种形成必须满足5个条件: (1)重叠或邻近分布; (2)花期相遇; (3)有效传粉媒介; (4)杂交亲和; (5)适宜种子萌发幼苗生长的小生境及气候条件。据此, 我们预测了国产秋海棠属未来可能发生的约40个新杂交组合的可能亲本及地点。到目前为止, 尽管所有已知的秋海棠杂种尚未形成真正的新物种, 但是, 为了满足科学研究及实践交流的需要, 建议按照新分类群发表的严格要求, 将“杂种”逐一开展调查研究并整理发表, 并将其作为物种进化过程中的一个特殊分类单元对待。鉴于秋海棠属的杂种个体稀少且并未对亲本构成威胁, 反而在一定程度上增加了类群的多样性, 并为优良观赏品种的直接选育创造了机会, 因此, 国产秋海棠属种类丰富及杂种区应为就地保护的优先考虑范围之一。同时, 鉴于秋海棠属杂交亲和性高, 迁地保护栽培时应增大花期重叠种类的种植间距, 避免发生自然杂交。

**关键词:** 秋海棠属; 自然杂交; 发生频率; 特殊分类单元; 杂交方向; 传粉

## Occurrence and characteristics of natural hybridization in *Begonia* in China

Daïke Tian<sup>1,2\*</sup>, Chun Li<sup>1,3</sup>, Yan Xiao<sup>1,2</sup>, Naifeng Fu<sup>1,2</sup>, Yi Tong<sup>1,2</sup>, Ruijuan Wu<sup>1,2</sup>

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

2 Shanghai Key Laboratory of Plant Functional Genomics and Resources, Shanghai 201602

3 Lushan Bureau of Forestry, Lushan, Sichuan 625600

**Abstract:** Natural hybridization is a very common phenomenon in plants and has continuously been a hot-spot in the scientific research of speciation and evolution. As one of the largest genera in plants, *Begonia* has a large number of species. However, very few cases have been reported on its natural hybrids. A systematic investigation of natural hybridization of *Begonia* can not only improve understanding of plant diversity and germplasm resources of this genus, but also be a step towards solving its taxonomical issues. Through a comprehensive field survey and experimental analysis of natural hybridization in Chinese begonias, we found

收稿日期: 2017-02-20; 接受日期: 2017-06-28

基金项目: 上海市绿化与市容管理局科技公关项目(F122416)和国家自然科学基金(3170199)

\* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: dktian@sibs.ac.cn

nearly 50 populations of 31 natural hybrids occurred among 29 species, accounting for 15% of currently about 200 accepted species. *Begonia hemsleyana* and *B. longifolia* had the highest cross frequency and crossed with 8 and 7 other species, respectively. *B. palmata* contributed to 16 hybrid populations, the largest number in all individual species. The largest number of hybrids (31 hybrid populations from 20 parental species) occurred in Yunnan (mainly in the southern areas), followed by Taiwan and Guangxi. Hybridization between species was unidirectional in most cases, and the majority of hybrids were  $F_1$  individuals, which still rely on parents or hybridization zones and have not been established as a true species. Field observations showed that aphid flies, followed by members of the bee family (Apidae), were the most frequent visitors of begonia flowers, however, further studies are necessary to examine their behavior and the efficiency of pollination. The natural hybrids and their putative parents were identified using integrative methods of morphology, molecular research, and artificial crossing experiments. Genome size (C value) of hybrids was usually equal or close to the average of that of the two parents, with an error less than 10%, which could assist identification of hybrids and parents. In addition, we summarized the five conditions necessary for the occurrence of natural hybridization: overlapping or adjacent distributions, concurrent flowering (at least partially overlapping), efficient pollination media, cross compatibility, and suitable microhabitat and climate conditions for seed germination and seedling growth. Based on these, we also predicted future putative parents of about 40 new natural hybrids and possible hybridization sites. Thus far, although all the known natural begonia hybrids have not established as true species, it may be more appropriate to treat them as a special taxon of speciation and evolution, which should be thoroughly investigated and published referring to protocols for publishing a new taxon in the scientific research. Because the individuals of natural hybrids in *Begonia* are always sparsely distributed in small numbers, and hybrids are not harmful to its parents it increases plant diversity and the chances of obtaining a new ornamental cultivar by natural selection. Therefore, the priority of *in situ* conservation should be given to regions with natural hybrids and species-rich environments. Meanwhile, for the purpose of *ex situ* conservation, requiring sufficient planting distance between species should be considered in those species with overlapping flowering time to avoid possible natural hybridization due to high cross-compatibility, particularly in native begonias.

**Key words:** *Begonia*; natural hybridization; occurrence frequency; special taxon; cross direction; pollination

自然杂交在植物界相当普遍, 约有25%的被子植物在其进化历程中与其近缘种发生了杂交(Mallet, 2007)。杂交的结果可能形成“进化噪音”(evolutionary noise) (Arnold, 1992)、杂种群(hybrid swarm) (Nolte & Tautz, 2010)、杂交带(hybrid zone), 甚至成为一个新物种(Bairdungerer et al, 1998)。自然杂交后代的性状往往介于双亲之间, 或偏向亲本之一, 从而造成形态过渡, 使原有的物种区别界线变得模糊, 给分类鉴别带来困难(Stebbins, 1957); 或因为遗传吸收, 杂交会致使一些稀有居群或物种灭绝(王峥峰和彭少麟, 2003)。杂交也是形成入侵的重要机制之一, 一些杂种比双亲表现出更强的适应性和竞争力, 从而增加了入侵性(Ellstrand & Schierenbeck, 2000; Parepa et al, 2014; Gaskin, 2016), 目前关于这方面的案例报道呈上升趋势(Schierenbeck & Ellstrand, 2009)。更为重要的是, 自然杂交可引起遗传基因重组和新的进化路线重建, 是创造植物多样性的重要力量, 是植物进化最为重要的驱动力,

可以增加遗传多样性, 提高居群的适应性, 加强或打破近缘种间的生殖隔离, 是新种形成的重要途径之一(Arnold, 1997; Rieseberg, 1997; Rieseberg & Carney, 1998; Arnold et al, 2003; Zalapa et al, 2010), 在物种进化中起着重要作用。因此, 研究自然杂交成为近年来植物系统与进化领域的热点(Ellstrand et al, 1996; Rieseberg et al, 2003; Stukenbrock, 2016)。

秋海棠属(*Begonia*)植物为多年生草本, 泛热带分布, 植物种类异常丰富, 为世界第5大维管束植物属(Sands, 2001; Hoover et al, 2004)或植物界第6大属(Frodin, 2004), 目前已知1,800多种(Phutthai & Hughes, 2016), 也是重要的观赏、药用和野生蔬菜植物, 经济价值高。该属植物生境和习性极为特殊, 形态多样、生态脆弱, 在植物多样性及保护、物种演化、系统进化、表观遗传、杂交育种等多方面具有很高的科研价值, 越来越成为全球的热点研究对象和研究植物多样性与进化的模式类群。由于秋海棠属种间具有很高的交配亲和性, 易发生杂交, 因

此,自然状况下也可能容易发生杂交,产生大量杂交个体或居群,并具有通过自然杂交形成新物种的巨大潜力。然而,有关秋海棠属的自然“杂种”(hybrid)全球报道不超过30种,包括中国13种,其中滇桂黔5种:变色秋海棠×掌叶秋海棠(*Begonia versicolor* × *B. hemsleyana*)<sup>①</sup>,酸味秋海棠×香花秋海棠(*B. acetosella* × *B. handelii*)<sup>②</sup>,玉柄秋海棠×掌裂叶秋海棠(*B. rubinea* × *B. pedatifida*) (Li et al, 2005),短萼秋海棠(*B. ×breviscapa*) (Peng et al, 2010)和掌叶秋海棠×大裂秋海棠(*B. macrotoma*) (Li et al, 2015);台湾3种:武威秋海棠(*B. ×buimontana*) (Peng & Chen, 1991),台北秋海棠(*B. ×taipeiensis*) (Peng & Sue, 2000)和钟氏秋海棠(*B. ×chungii*) (Peng & Ku, 2009);藏南地区5种(Morris, 2017): *B. ×chungii* subsp. *mishmiensis*, *B. aborensis* × *B. burkillii*, *B. acetosella* var. *hirtifolia* × *B. silletnesis*, *B. burkillii* × *B. griffithiana*, *B. adscendens* × *B. palmata* (裂叶秋海棠);马来西亚2种: *B. decora* × *B. venusta* (Teo & Kiew, 1999), *B. conipila* × *B. lucychongiana* (Sang et al, 2013);中美洲约9种(Burt-Utley, 1985; Twyford, 2009<sup>③</sup>);南美的玻利维亚4种(Tebbitt, 2013a, b)。而且,这些研究多限于单个“杂种”的偶然发现及后续利用形态学、细胞学等开展的简单鉴定,很少对自然杂交发生特点、杂种群体的成分构成等进行深入探讨,更没有针对本属系统地开展调查。因此,研究存在零散、缺乏全面性、系统性和目的性强等缺点;对秋海棠杂种的形成机理、杂种群体的繁衍能力和动态也没有进行深入的调查和讨论;对杂交群落的维持机制以及杂交群体是否最终能真正演化成新种的趋势也没有展开深入研究分析,无法更好地回答有关秋海棠属自然杂交相关的若干重要科学问题,如自然杂交发生的概率、杂种的分布式样、组成成分及动态、繁衍能力、杂种在秋海棠属植物多样性及其物种演化过程中所扮演的角色等。只有在更大的范围内,如秋海棠属野生种类分布丰富的国家(如巴西、中国)甚至洲(亚洲、非洲、南美洲)对其自然杂交现

象及杂种形成机制开展系统、全面的调查、研究和分析讨论,才能更好地回答上述部分或全部问题,也才能真正解决该属的分类学问题。

本研究以中国秋海棠属为对象,通过野外全面调查、人工杂交试验和形态学、分子生物学方法等分析,试图回答上述一些科学问题,结果将为秋海棠属的分类研究、多样性评价、就地保护和杂交育种等提供有益参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 文献标本调研及野外调查、引种

为了全面了解国产秋海棠野外自然杂交的发生及特点,首先利用馆藏、网络数字化标本查阅、收集、整理国内外主要标本馆的中国秋海棠属标本信息,特别是采集地点、海拔、花期以及采集时间等重要资料。之后对这些信息进行统计分析,根据结果制定野外考察路线。以云南、广西、贵州、广东、海南、四川、台湾等省的秋海棠主要分布区域为重要考察对象,兼顾西藏、福建、江西、湖南等省局部地区,调查地点包括至少有两种秋海棠分布的省市区及具体分布点。重点调查分布区重叠或相近、花期至少部分重叠的秋海棠种类,发现疑似自然杂种后调查其分布格局、群体大小、结构、自我繁衍能力等特征。采集凭证标本,引种栽培疑似杂种及其亲本。

### 1.2 杂种的形态学及分子生物学鉴定

(1)材料。研究材料包括野外采集的秋海棠属自然杂交组合:杂交后代样本28份(表1),杂交后代个体数1–25个不等,其中18组28个杂交居群叶片材料用于分子鉴定。采集杂交后代及亲本的新鲜叶片并用硅胶保存,腊叶标本保存于上海辰山植物园标本馆(CSH)。

(2)形态及分子鉴定。在野外考察及引种栽培过程中对所有疑似杂种及其可能亲本的形态性状进行详细记录和拍照,对部分个体引种栽培,比较相同及差异的形态学特征,找出杂种及其亲本间的生物性状特点和规律,如相似性、中间性、偏亲性等。

DNA提取、扩增和测序:利用天根新型植物基因组DNA提取试剂盒(天根生物,北京)提取基因组DNA。使用被子植物通用ITS引物对ITS区进行扩增。为确定杂交发生的方向,选用Thomas等(2011)设计的引物对叶绿体间隔区*ndhF-rpl32*、*ndhA* intron

① 田代科 (1999) 变色秋海棠的园艺学研究. 硕士学位论文, 中国科学院昆明植物研究所, 昆明.

② 向建英 (2001) 秋海棠属无翅组的保护生物学研究. 硕士学位论文, 中国科学院昆明植物研究所, 昆明.

③ Twyford A (2009) The Evolution of *Begonia* Section *Gireoudia* in Central America. Merlin Trust Grant Report, University of Edinburgh & Royal Botanic Gardens Edinburgh, Edinburgh.

表 1 中国秋海棠属的自然杂交后代及亲本鉴定材料(含不同居群)  
Table 1 Natural hybrids of Chinese native begonias and their parents for identification (including different populations)

杂交居群可能亲本组合 Possible parents of natural hybrids	采集地 Location of collection	标本采集号 Voucher no.	分子鉴定 lar identification	Molecu- Genome size
酸味秋海棠×勐养秋海棠 <i>B. acetosella</i> × <i>B. silletensis</i> subsp. <i>mengy- angensis</i>	云南勐腊国家级自然保护区 Mengla National Nature Reserve, Yunnan	TDK354	✓	✓
		TDK358	✓	
	老挝南塔至勐新县公路 Road between Nanta and Mengxin, Laos	TDK747*	✓	✓
歪叶秋海棠×粗喙秋海棠 <i>B. augustinei</i> × <i>B. longifolia</i>	云南勐养国家级自然保护区 Mengyang National Nature Reserve, Yunnan	ZPS001	✓	
周裂秋海棠×裂叶秋海棠 <i>B. circumlobata</i> × <i>B. palmata</i>	广东信宜县大雾山 Dawushan of Xinyi, Guangdong	TDK868	✓	
		TDK870	✓	
		TDK873	✓	
	广东惠州罗浮山 Luofushan of Huizhou, Guangdong	TDK2064	✓	
大围山秋海棠×掌叶秋海棠 <i>B. daweishanensis</i> × <i>B. hemsleyana</i>	云南大围山国家级自然保护区 Daweishan National Nature Reserve, Yunnan	TDK1306	✓	
厚叶秋海棠×酸味秋海棠(粗喙秋海棠) <i>B. dryadis</i> × <i>B. acetosella</i> ( <i>B. longifolia</i> )	云南勐腊县勐远乡 Mengyuan, Mengla, Yunnan	TDK396	✓	
厚叶秋海棠×粗喙秋海棠 <i>B. dryadis</i> × <i>B. longifolia</i>	云南勐腊县望天树景区 Wangtianshu Resort of Mengla, Yunnan	TDK368	✓	✓
全柱秋海棠×大理秋海棠 <i>B. grandis</i> subsp. <i>holostyla</i> × <i>B. taliensis</i>	云南丽江永胜县 Yongsheng, Lijiang, Yunnan	TDK2213	✓	✓
掌叶秋海棠×大裂秋海棠 <i>B. hemsleyana</i> × <i>B. macrotoma</i>	云南绿春县大水沟乡 Dashuigou, Lüchun, Yunnan	TDK264	✓	
掌叶秋海棠×裂叶秋海棠 <i>B. hemsleyana</i> × <i>B. palmata</i>	云南绿春县三勐乡巴东草果场 Badong, Sanmeng, Lüchun, Yunnan	TDK1252	✓	
		TDK1257	✓	
	云南绿春县平河乡 Pinghe, Lüchun, Yunnan	TDK2697		✓
		TDK2697A		✓
掌叶秋海棠×紫叶秋海棠 <i>B. hemsleyana</i> × <i>B. purpureofolia</i>	云南大围山国家级自然保护区 Daweishan National Nature Reserve, Yunnan	TDK1303	✓	
掌叶秋海棠×倒鳞秋海棠 <i>B. hemsleyana</i> × <i>B. reflexisquamosa</i>	云南绿春县三勐乡巴东草果场 Badong, Sanmeng, Lüchun, Yunnan	TDK1251	✓	
掌叶秋海棠×变色秋海棠 <i>B. hemsleyana</i> × <i>B. versicolor</i>	云南麻栗坡县豆豉店 Douchidian, Malipo, Yunnan	TDK1374	✓	
掌叶秋海棠×长纤秋海棠 <i>B. hemsleyana</i> × <i>B. longiciliata</i>	云南绿春县平河乡 Pinghe, Lüchun, Yunnan	TDK2689		✓
戴叶秋海棠×掌裂叶秋海棠 <i>B. limprichtii</i> × <i>B. pedatifida</i>	四川峨眉山 Mount Emei, Sichuan	TDK2984		✓
戴叶秋海棠×秀丽秋海棠 <i>B. limprichtii</i> × <i>B. pulchrifolia</i>	四川峨眉山 Mount Emei, Sichuan	TDK2976		✓
戴叶秋海棠×存疑种 <i>B. limprichtii</i> × <i>Be- gonia</i> sp.	四川峨眉山 Mount Emei, Sichuan	TDK2290	✓	✓
裂叶秋海棠×周裂秋海棠 <i>B. palmata</i> × <i>B. circumlobata</i>	福建尤溪县坂面镇青坑村 Qingkeng, Banmian, Youxi, Fujian	TDK2542		✓
	广东惠州罗浮山 Luofushan of Huizhou, Guangdong	FNF006		✓
裂叶秋海棠×掌叶秋海棠 <i>B. palmata</i> × <i>B. hemsleyana</i>	云南绿春县三勐乡巴东草果场 Badong, Sanmeng, Lüchun, Yunnan	TDK1255	✓	



表 1 (续) Table 1 (continued)

杂交居群可能亲本组合 Possible parents of natural hybrids	采集地 Location of collection	标本采集号 Voucher no.	分子鉴定 Molecular identification	基因组大小 Genome size
掌裂叶秋海棠×截叶秋海棠 <i>B. pedatifida</i> × <i>B. limprichtii</i>	云南屏边县至河口县 Between Pingbian and Hekou, Yunnan	TDK1310	√	
	云南绿春县平河乡 Pinghe, Lüchun, Yunnan	TDK2677		√
	四川峨眉山 Mount Emei, Sichuan	TDK2747		√
勐养秋海棠×粗喙秋海棠 <i>B. silletensis</i> subsp. <i>mengyangensis</i> × <i>B. longifolia</i>	云南勐腊县望天树景区 Wangtianshu Resort of Mengla, Yunnan	TDK362	√	
多变秋海棠×癩叶秋海棠 <i>B. variifolia</i> × <i>B. leprosa</i>	广西东兰县新烟村 Xinyan, Donglan, Guangxi	TDK1428	√	
变色秋海棠×掌叶秋海棠 <i>B. versicolor</i> × <i>B. hemsleyana</i>	云南大围山国家级自然保护区 Daweishan National Nature Reserve, Yunnan	TDK1299	√	
长毛秋海棠×变色秋海棠 <i>B. villifolia</i> × <i>B. versicolor</i>	云南麻栗坡县猛洞乡小坪寨 Xiaopingzhai, Mengdong, Malipo, Yunnan	TDK1348	√	
	云南麻栗坡县豆豉店 Douchidian, Malipo, Yunnan	TDK1378	√	
长毛秋海棠×变色秋海棠(反向杂交) <i>B. villifolia</i> × <i>B. versicolor</i> (or reverse)	云南麻栗坡县猛洞乡小坪寨 Xiaopingzhai, Mengdong, Malipo, Yunnan	TDK1349	√	
文山秋海棠×大围山秋海棠 <i>B. wenshanensis</i> × <i>B. daweishanensis</i>	云南大围山国家级自然保护区 Daweishan National Nature Reserve, Yunnan	TDK1296	√	

亲本材料采集于杂种分布重叠区或邻近地区; \*邻近中国的老挝杂种居群; √表示开展了分子或基因组大小分析。  
The parental plant materials were collected from the overlapped or near distribution of hybrids; \* hybrid population collected from Laos near China; √ indicated conduction of molecular and genome size analysis.

进行扩增。ITS序列的扩增体系为20 μL, 包括: 10 μL MasterMix (康为生物, 北京), 正反向引物(10 μM)各1.0 μL, 2 μL模板DNA (20 ng/μL)。扩增程序: 94℃预变性3 min, 94℃变性45 s, 55℃退火45 s, 72℃延伸45 s, 共35个循环; 72℃延伸5 min。叶绿体序列的扩增体系为20 μL, 包括: 4.0 μL 5 × Fast HiFidelity PCR buffer, 0.4 μL 20 × Fast PCR Enhancer, 正反向引物(10 μM)各1.0 μL, 0.4 μL Fast HiFidelity Polymerase (天根生物)。扩增程序: 94℃预变性2 min, 94℃变性15 s, 60℃退火10 s, 68℃延伸30 s, 共35个循环; 68℃延伸5 min。ITS和*ndhF-rpl32*片段扩增产物直接送上海迈浦生物科技有限公司测序。

使用SeqMan (DNASTar Inc., WI, USA)对核基因ITS和叶绿体基因*ndhF-rpl32*、*ndhA* intron片段分别进行比对, 然后用BioEdit进行人工校正, 使用MEGA分别分析两个片段在疑似杂交后代和亲本之间的序列差异。

1.3 杂种及亲本的基因组大小关系分析

实验选取13个自然杂种组合(表1)和8个人工杂种组合, 分别测定杂种与亲本的C值, 即单倍体基因组中的DNA总含量(bp)。实验流程为: 选取核提

取液→选取内参→制备核提取液→PI染色(Partec公司PI试剂盒, 现配现用)→染色3 h→BD AriaIII流式细胞仪测定荧光强度(电压290 V, 580 nm激发光, 低速上样, 计数细胞达到10,000停止, 每个样品重复3次)→流式分析软件获得数据→根据公式获得秋海棠C值。

流式细胞术测定结果需要避免各种可能导致误差的因素来保证较小的C值,  $C < 3\%$ 表明结果非常可靠,  $3\% < C < 5\%$ 基本可靠, 5%–8%可靠性较低, 当 $C > 8\%$ 后, 结果可靠性就不足, 需要予以舍弃。得出所测样品和标样准确的P1/P2峰值后即可依据Seker等(2003)方法计算出所测样品的2C值(Q, pg):  $Q = R \times (E/S)$ , 其中R为标样的2C值, E为待测样品的P1峰值, S为标样的P2峰值。C值 = 2C值/2。比较亲本和杂种C值的方法为: 将两亲本实际测量所得的C值之和的一半作为杂交后代的理论C值, 实际测量得到的杂交后代C值为测量值, 测量值与理论值的相对误差为: (测量值 – 理论值)/理论值 × 100%。

1.4 人工杂交实验

分别在福建尤溪县坂面镇青坑村湖美溪组的

野生秋海棠自然杂交区、上海辰山植物园和昆明植物园的温室, 对疑似杂种及其亲本开展正交、反交、回交以及杂种自交等, 结合坐果率、种子饱满度及种子萌发率等分析讨论杂交亲和力及杂种的自我繁殖能力, 最终以种子是否能萌发为标准判定杂交是否成功(+/-)。

### 1.5 昆虫传粉生物学实验

2016年9月选取福建尤溪县坂面镇青坑村湖美溪组沿着一条小溪分布的周裂秋海棠(*B. circumlobata*)和裂叶秋海棠及其杂种、上海辰山植物园矿坑花园附近露天栽培的秋海棠(*B. grandis*)为对象, 分别开展传粉生物学试验(9月2–4日, 9月17–21日), 连续多天对秋海棠的访花昆虫种类、访花时间、访花行为和目的等进行观察; 捕捉访花昆虫制成标本并照相后进行鉴定, 确定主要访花昆虫及其传粉特点。

### 1.6 杂交发生条件及动态预测

根据标本采集信息和野外实地考察, 分析总结自然杂交发生和杂种形成的必要条件, 并依据这些条件, 结合种类的实际分布及生境状况推测国产秋海棠未来可能发生新杂交组合的亲本及地点。

## 2 结果

### 2.1 中国秋海棠自然杂交发生频率及特点

通过比较全面的野外调查, 采集了大量标本(1,500余号)和分子材料(4,000多份), 共发现了23个新自然杂交组合(部分活体及生境照片见图1), 连同以前文献报道的8个“杂种”(Peng & Chen, 1991; 田代科, 1999<sup>①</sup>; Peng & Sue, 2000; 向建英, 2001<sup>②</sup>; Li et al, 2005; Peng & Ku, 2009; Peng et al, 2010), 目前国产秋海棠的自然“杂种”达到31个(不含藏南地区, 正反交按同种计), 自然杂交居群约50个(表2, 3), 涉及到5组(section) 29种(表3), 占当前已知种类的15% (按200种计算, 不含种下类群), 比例较高。其中, 杂交主要发生在扁果组(Sect. *Platycentrum*), 涉及到18种, 包括一待发表新种*Begonia* sp. nov.; 其次为东亚秋海棠组(Sect. *Diploclinium*), 有5种参与了杂交; 无翅组(Sect. *Sphenanthera*) 4种; 侧膜组(Sect. *Coelocentrum*)和棒果组(Sect. *Leprosae*)各1种,

分别为多变秋海棠(*B. variifolia*)和癩叶秋海棠(*B. leprosa*)。

物种间自然杂交发生的频率也较高(表4)。同3种及以上其他秋海棠发生自然杂交的有掌叶秋海棠(8种)、粗喙秋海棠(*B. longifolia*) (7种)、裂叶秋海棠(5种)、酸味秋海棠(3种)和长纤秋海棠(*B. longiciliata*) (3种), 其余均仅同1–2种发生杂交(表2, 3)。就发生自然杂交的地点来看, 裂叶秋海棠最多, 发现了16处, 包括台湾6处, 云南屏边1处、绿春2处, 广东信宜2处、惠州1处, 广西上思、防城港和武鸣各1处, 福建尤溪1处; 其次为粗喙秋海棠9处, 酸味秋海棠和掌叶秋海棠各7处, 变色秋海棠5处(表3)。发生自然杂交频率最高的几个种类具有分布广、花期长、花期重叠的同域分布种类多、偏热带分布、植株较高利于传粉等特点(表4)。例如裂叶秋海棠在整个秋海棠属中全球分布范围最广, 其次为粗喙秋海棠, 分布范围广增加了同其他秋海棠伴生、花期相遇从而发生杂交的可能性。在国内, 尽管秋海棠(*B. grandis*)的分布范围最广, 但仅发现其亚种全柱秋海棠(*B. grandis* subsp. *holostyla*)在云南永胜县相近两处同大理秋海棠(*B. taliensis*)发生了杂交(表1, 图1F), 主要原因在于该种同其他种类分布重叠概率少, 而且华中以北地区只有这一种分布。

综合野外考察和文献报道, 目前全国仅发现7个省区(含台湾)存在秋海棠属的自然杂种(表3, 图2), 以云南为最多, 包括20种, 31个居群, 除了丽江一个居群外, 其余全部位于云南南部。变色秋海棠×掌叶秋海棠发生4处, 酸味秋海棠×劬养秋海棠(*B. silletensis* subsp. *mengyangensis*)、酸味秋海棠×香花秋海棠的居群各3处。其中, 西双版纳自治州勐腊县就有10个自然杂交居群, 占云南省秋海棠自然杂交居群总数的近1/3; 屏边大围山国家级自然保护区发现7个杂交居群(表2), 这显然同该地的秋海棠种类丰富和重叠分布率高相关。其次是台湾, 有3个自然杂种, 7个居群(表2, 图2), 已分别作为武威秋海棠(Peng & Chen, 1991)、台北秋海棠(Peng & Sue, 2000)和钟氏秋海棠(Peng & Ku, 2009)发表(表2)。尽管广西的秋海棠种类很多, 仅次于云南, 但至今只发现3个自然杂交居群, 且个体数极少, 分别位于东兰县武篆乡、上思县十万大山和防城港市聪皇沟, 杂种种群数量还不及台湾, 这主要可能是因为广西以喀斯特地貌分布的种类居多, 而该区生境严重碎

① 田代科 (1999) 变色秋海棠的园艺学研究. 硕士学位论文, 中国科学院昆明植物研究所, 昆明.

② 向建英 (2001) 秋海棠属无翅组的保护生物学研究. 硕士学位论文, 中国科学院昆明植物研究所, 昆明.









图 1 中国秋海棠的主要自然杂种及其亲本形态比较

Fig. 1 Morphological characteristics comparison between natural hybrids and their parents in begonias native to China

A: 酸味秋海棠×勐养秋海棠: a. 杂种植株, b. 叶片形态比较(上: 酸味秋海棠; 中: 杂种; 下: 勐养秋海棠); B: 周裂秋海棠(a)×粗喙秋海棠(c)杂种(b); C: 周裂秋海棠×裂叶秋海棠杂种及其亲本叶片形态特征比较(a 正面, b 反面) (左: 周裂秋海棠, 右: 裂叶秋海棠, 下: 杂种); D: 大围山秋海棠×掌叶秋海棠: a. 杂种植株, b. 叶形比较(上: 掌叶秋海棠; 中: 杂种; 下: 大围山秋海棠); E: 厚叶秋海棠×粗喙秋海棠: a. 正交(左箭头所指: 粗喙秋海棠; 中: 杂种; 右: 厚叶秋海棠); b. 反交(上: 粗喙秋海棠; 下: 杂种); F: 全柱秋海棠×大理秋海棠: a. 亲本, b. 杂种, c. 叶片及花特征比较(上: 全柱秋海棠; 中: 杂种; 下: 大理秋海棠); G: 同一地点生长 2 个不同杂种群: a. 粗喙秋海棠(左上)×掌叶秋海棠(右上)杂种(左箭头所指)、掌叶秋海棠×长纤秋海棠杂种(右下), b. 掌叶秋海棠(左)×长纤秋海棠(右)叶片特征比较, 杂种(中)叶背颜色更深; H: 掌叶秋海棠×大裂秋海棠: a. 掌叶秋海棠(下箭头所指)、杂种(上箭头所指), b. 大裂秋海棠; I: 掌叶秋海棠×紫叶秋海棠: a. 杂种, b. 杂种(中)及亲本叶形比较(上: 掌叶秋海棠; 下: 紫叶秋海棠绿叶类型); J: 撕裂秋海棠及其亲本: a. 掌叶秋海棠, b. 撕裂秋海棠, c. 食用秋海棠; K: 掌叶秋海棠×裂叶秋海棠: a. 杂种植株, b. 叶形比较(上: 掌叶秋海棠; 中: 杂种; 下: 裂叶秋海棠); L: 戴叶秋海棠×掌裂叶秋海棠: a. 戴叶秋海棠及杂种(右上及箭头所指), b. 掌裂叶秋海棠(含反向杂交后代); M: 新种(右)×裂叶秋海棠杂种: 仅见 1 株小苗(箭头所指); N: 粗喙秋海棠(a)×裂叶秋海棠(c)杂种(b); O: 麻栗坡秋海棠(中)及其亲本掌叶秋海棠(左)、变色秋海棠(右)叶片形态比较, 正反交后代个体均可见; P: 倒鳞秋海棠×掌叶秋海棠: a. 杂种(上箭头所指)同母本倒鳞秋海棠(下箭头所指), b. 叶形比较(左: 倒鳞秋海棠; 左上: 掌叶秋海棠; 右下: 杂种); cde. 叶柄及茎被毛比较, 杂种 d 介于中间。除 B 中照片由谭运洪提供外, 其余由田代科提供。

A, *B. acetosella* × *B. silletensis* subsp. *mengyangensis*: a. hybrid plant, b. comparison of leaf morphology (top: *B. acetosella*; middle: hybrid; bottom: *B. silletensis* subsp. *mengyangensis*); B, Hybrid (b) of *B. circumlobata* (a) and *B. longifolia* (c); C, Leaf morphological comparison between hybrid (bottom) and its parental species, *B. circumlobata* (left) and *B. palmata* (right) (a. upper surface, b. back); D, *B. daweshanensis* × *B. hemsleyana*: a. hybrid plant, b. comparison of leaf morphology (top: *B. hemsleyana*; middle: hybrid; bottom: *B. daweshanensis*); E, *B. dryadis* × *B. longifolia*: a. *B. longifolia* (left arrow), hybrid (middle arrow), *B. dryadis* (right arrow); b. reversal cross: *B. longifolia* (mother plant, upper) and hybrid (lower); F, *B. grandis* subsp. *holostyla* (a: right) × *B. taliensis* (a: left): b. hybrid; c. leaf and floral morphological comparison (top: *B. grandis* subsp. *holostyla*; middle: hybrid; bottom: *B. taliensis*); G, Two hybrids pooled: a. *B. longifolia* (upper left) × *B. hemsleyana* (upper right), hybrid (arrow), *B. hemsleyana* (upper) × *B. longiciliata* (lower); b. Leaf morphological comparison between hybrid (middle, deeper color in leaf back) and its parents, *B. hemsleyana* (left) × *B. longiciliata* (right); H, Hybrid (a: upper arrow) between *B. hemsleyana* (a: lower arrow) and *B. macrotoma* (b); I, *B. hemsleyana* (b: top) × *B. purpureofolia* (b: bottom): a. hybrid; b. leaf morphological comparison (middle: hybrid); J, *B. lacerata* (b. hybrid origin) and its tentative parents, *B. hemsleyana* (a) and *B. edulis* (c); K, *B. hemsleyana* (b: top) × *B. palmata* (b: bottom): a. hybrid; b. leaf morphological comparison (middle: hybrid); L, Hybrid (arrow) between *B. limprichtii* (a: larger patch) × *B. pedatifida* (b, hybrids also seen from reversal cross); M, Hybrid (arrow) with only one young plant seen between *Begonia* sp. nov. (right) and *B. palmata* nearby; N, Hybrid (b) between *B. longifolia* (a) and *B. palmata* (c); O, *B. malipoensis* (hybrid origin: middle) and its parents, *B. hemsleyana* (left) and *B. versicolor* (right): including two direction cross; P, *B. reflexisquamosa* × *B. hemsleyana*: a. hybrid (upper arrow) nested with its mother plant (*B. reflexisquamosa*: lower arrow); b. leaf morphological comparison (left: *B. reflexisquamosa*; upper left: *B. hemsleyana*; lower right: hybrid); cde. intermediate hair characteristics showing on petiole or stems of hybrid (middle). All the photos were provided by Daiké Tian, except of Fig. 1B by Yunhong Tan.

表 2 已发现的中国秋海棠自然杂交组合(正反交同组)

Table 2 Natural hybrids (crosses) in begonias native to China (the reciprocal crosses considered as same hybrid)

杂种数 Hybrid no.	自然杂种或组合(母本×父本) Natural hybrid (♀×♂)	杂种产地及居群数 Location and number of hybrid populations	发现(发表)时间 Time discovered (published)
1	短萼秋海棠(多变秋海棠×瓣叶秋海棠) <i>B. ×breviscapa</i> ( <i>B. variifolia</i> × <i>B. leprosa</i> )	广西东兰 1 处 Guangxi: Donglan 1	(Peng et al, 2010)
2	武威秋海棠(裂叶秋海棠×台湾秋海棠) <i>B. ×buimontana</i> ( <i>B. palmata</i> × <i>B. taiwaniana</i> )	台湾屏东 2、高雄 1、嘉义 1 Taiwan: Pingdong 2, Gaoxiong 1, Jiayi 1	(Peng & Chen, 1991)
3	钟氏秋海棠(裂叶秋海棠×粗喙秋海棠) <i>B. ×chungii</i> ( <i>B. palmata</i> × <i>B. longifolia</i> )	台湾南投 2 Taiwan: Nantou 2	(Peng & Ku, 2009)
4	台北秋海棠(水鸭脚×粗喙秋海棠) <i>B. ×taipeiensis</i> ( <i>B. formosana</i> × <i>B. longifolia</i> )	台湾台北 2 Taiwan: Taipei 2	(Peng & Sue, 2000)
5	玉柄秋海棠×掌裂叶秋海棠 <i>B. rubinea</i> × <i>B. pedatifida</i>	贵州习水 1 Guizhou: Xishui 1	(Li et al, 2005)
6	酸味秋海棠×勐养秋海棠 <i>B. acetosella</i> × <i>B. silletensis</i> subsp. <i>mengyangensis</i>	云南勐腊 3 Yunnan: Mengla 3	1997, 2012, 2015
7	歪叶秋海棠×粗喙秋海棠 <i>B. augustinei</i> × <i>B. longifolia</i>	云南勐腊 1 Yunnan: Mengla 1	2015
8	周裂秋海棠×粗喙秋海棠 <i>B. circumlobata</i> × <i>B. longifolia</i>	广西那坡 1 Guangxi: Napo 1	2015
9	周裂秋海棠×裂叶秋海棠 <i>B. circumlobata</i> × <i>B. palmata</i>	广东信宜 2、惠州 1; 福建尤溪 1 Guangdong: Xinyi 2, Huizhou 1; Fujian: Youxi 1	2014
10	大围山秋海棠×掌叶秋海棠 <i>B. daweishanensis</i> × <i>B. hemsleyana</i>	云南屏边 1 Yunnan: Pingbian 1	2014
11	厚叶秋海棠×酸味秋海棠 <i>B. dryadis</i> × <i>B. acetosella</i>	云南勐腊 1 Yunnan: Mengla 1	2012
12	厚叶秋海棠×粗喙秋海棠 <i>B. dryadis</i> × <i>B. longifolia</i>	云南勐腊 1 Yunnan: Mengla 1	2012
13	全柱秋海棠×大理秋海棠 <i>B. grandis</i> subsp. <i>holostyla</i> × <i>B. taliensis</i>	云南永胜 2 Yunnan: Yongsheng 2	2014
14	香花秋海棠×酸味秋海棠 <i>B. handelii</i> × <i>B. acetosella</i>	云南勐腊 2、澜沧 1、临沧 1 Yunnan: Mengla 2, Lancang 1, Lincang 1	1997, 2012, 2015
15	掌叶秋海棠×食用秋海棠 <i>B. hemsleyana</i> × <i>B. edulis</i>	云南屏边 1 Yunnan: Pingbian 1	1939*
16	掌叶秋海棠×长纤秋海棠 <i>B. hemsleyana</i> × <i>B. longiciliata</i>	云南绿春 1 Yunnan: Lüchun 1	2015
17	掌叶秋海棠×粗喙秋海棠 <i>B. hemsleyana</i> × <i>B. longifolia</i>	云南绿春 1 Yunnan: Lüchun 1	2015
18	掌叶秋海棠×大裂秋海棠 <i>B. hemsleyana</i> × <i>B. macrotoma</i>	云南绿春 1 Yunnan: Lüchun 1	2012
19	掌叶秋海棠×裂叶秋海棠 <i>B. hemsleyana</i> × <i>B. palmata</i>	云南绿春 2 Yunnan: Lüchun 2	2013, 2015
20	掌叶秋海棠×紫叶秋海棠 <i>B. hemsleyana</i> × <i>B. purpureofolia</i>	云南屏边 1 Yunnan: Pingbian 1	2012
21	掌叶秋海棠×倒鳞秋海棠 <i>B. hemsleyana</i> × <i>B. reflexisquamosa</i>	云南绿春 1 Yunnan: Lüchun 1	2013
22	戴叶秋海棠×掌裂叶秋海棠 <i>B. limprichtii</i> × <i>B. pedatifida</i>	四川峨眉山 2 Sichuan: Mount Emei 2	2014, 2016, 2017
23	戴叶秋海棠×秀丽秋海棠 <i>B. limprichtii</i> × <i>B. pulchrifolia</i>	四川峨眉山 1 Sichuan: Mount Emei 1	2016
24	长纤秋海棠×食用秋海棠 <i>B. longiciliata</i> × <i>B. edulis</i>	云南勐腊西双版纳热带植物园 1 Yunnan: XSBN Tropical Botanical Garden 1	2015
25	长纤秋海棠×厚叶秋海棠 <i>B. longiciliata</i> × <i>B. dryadis</i>	云南勐腊西双版纳热带植物园 1 Yunnan: XSBN Tropical Botanical Garden 1	2015
26	粗喙秋海棠×裂叶秋海棠 <i>B. longifolia</i> × <i>B. palmata</i>	广西上思 1、武鸣 1 Guangxi: Shangsi 1, Wuming 1	2014, 2016
27	粗喙秋海棠×勐养秋海棠 <i>B. longifolia</i> × <i>B. silletensis</i> subsp. <i>mengyangensis</i>	西藏墨脱 1 Tibet: Motuo 1	2012 (存疑 Possible)
28	新种×裂叶秋海棠 <i>Begonia</i> sp. nov. × <i>B. palmata</i>	广西防城港 1 Guangxi: Fangchenggang 1	2013
29	变色秋海棠×掌叶秋海棠 <i>B. versicolor</i> × <i>B. hemsleyana</i>	云南屏边 3、麻栗坡 2 Yunnan: Pingbian 3, Malipo 2	1996
30	变色秋海棠×长毛秋海棠 <i>B. versicolor</i> × <i>B. villifolia</i>	云南麻栗坡 2 Yunnan: Malipo 2	1997
31	文山秋海棠×大围山秋海棠 <i>B. wenshanensis</i> × <i>B. daweishanensis</i>	云南屏边 1 Yunnan: Pingbian 1	2014

\* *Begonia lacerata* 于 1939 年发表, 但是, 基于我们后来的调查判断, 该种极可能为掌叶秋海棠和食用秋海棠的杂种。

*Begonia lacerata* was published in 1939, but it should be a hybrid between *B. hemsleyana* and *B. edulis* based on our later investigation.

表 3 中国秋海棠的自然杂交发生种类及频率  
Table 3 Species and occurrence frequency of natural hybridization in Chinese begonias

编号 No.	种名 Species name	组名 Section	自然杂交发生地点及杂交居群数 Occurrence location and population number
1	酸味秋海棠 <i>B. acetosella</i>	无翅组 Sect. <i>Sphenanthera</i>	云南勐腊 4、澜沧 1、临沧 1、绿春 1 Yunnan: Mengla 4, Lancang 1, Lincang 1, Lüchun 1
2	歪叶秋海棠 <i>B. augustinei</i>	扁果组 Sect. <i>Platycentrum</i>	云南勐海 1 Yunnan: Menghai 1
3	周裂秋海棠 <i>B. circumlobata</i>	扁果组 Sect. <i>Platycentrum</i>	广东信宜 1、惠州 1; 广西那坡 1; 福建尤溪 1 Guangdong: Xinyi 1, Huizhou 1; Guangxi: Napo 1; Fujian: Youxi 1
4	厚叶秋海棠 <i>B. dryadis</i>	扁果组 Sect. <i>Platycentrum</i>	云南勐腊 3 Yunnan: Mengla 3
5	食用秋海棠 <i>B. edulis</i>	扁果组 Sect. <i>Platycentrum</i>	云南勐腊 1、屏边 1 Yunnan: Mengla 1, Pingbian 1
6	水鸭脚 <i>B. formosana</i>	扁果组 Sect. <i>Platycentrum</i>	台湾 1 Taiwan: 1
7	全柱秋海棠 <i>B. grandis</i> subsp. <i>holostyla</i>	东亚秋海棠组 Sect. <i>Diploclinium</i>	云南永胜 1 Yunnan: Yongsheng 1
8	香花秋海棠 <i>B. handelii</i>	无翅组 Sect. <i>Sphenanthera</i>	云南勐腊 2、澜沧 1、临沧 1 Yunnan: Mengla 2, Lancang 1, Lincang 1
9	掌叶秋海棠 <i>B. hemsleyana</i>	扁果组 Sect. <i>Platycentrum</i>	云南屏边 5、绿春 2、麻栗坡 2 Yunnan: Pingbian 5, Lüchun 2, Malipo 2
10	癩叶秋海棠 <i>B. leprosa</i>	棒果组 Sect. <i>Leprosae</i>	广西东兰 1 Guangxi: Donglan 1
11	戴叶秋海棠 <i>B. limprichtii</i>	扁果组 Sect. <i>Platycentrum</i>	四川峨眉山 2 Sichuan: Mount Emei 2
12	长纤秋海棠 <i>B. longiciliata</i>	扁果组 Sect. <i>Platycentrum</i>	云南绿春 1、勐腊 1 Yunnan: Lüchun 1, Mengla 1
13	粗喙秋海棠 <i>B. longifolia</i>	东亚秋海棠组 Sect. <i>Diploclinium</i>	云南勐腊 2、绿春 2; 广西那坡 1、上思 1; 台湾 2; 西藏墨脱 1 Yunnan: Mengla 2, Lüchun 2; Guangxi: Napo 1, Shangsi 1; Taiwan: 2; Tibet: Motuo 1
14	大裂秋海棠 <i>B. macrotoma</i>	扁果组 Sect. <i>Platycentrum</i>	云南绿春 2 Yunnan: Lüchun 2
15	裂叶秋海棠 <i>B. palmata</i>	扁果组 Sect. <i>Platycentrum</i>	台湾 6; 云南绿春 2、屏边 1; 广东信宜 2、惠州 1; 广西上思 1、防城港 1、武鸣 1; 福建尤溪 1 Taiwan: 6; Yunnan: Lüchun 2, Pingbian 1; Guangdong: Xinyi 2, Huizhou 1; Guangxi: Shangsi 1, Fangchenggang 1, Wuming 1; Fujian: Youxi 1
16	掌裂秋海棠 <i>B. pedatifida</i>	扁果组 Sect. <i>Platycentrum</i>	四川峨眉山 2 Sichuan: Mount Emei 2
17	秀丽秋海棠 <i>B. pulchrifolia</i>	扁果组 Sect. <i>Platycentrum</i>	四川峨眉山 1 Sichuan: Mount Emei 1
18	紫叶秋海棠 <i>B. purpureofolia</i>	扁果组 Sect. <i>Platycentrum</i>	云南屏边 1 Yunnan: Pingbian 1
19	倒鳞秋海棠 <i>B. reflexsquamosa</i>	扁果组 Sect. <i>Platycentrum</i>	云南绿春 2 Yunnan: Lüchun 2
20	玉柄秋海棠 <i>B. rubinea</i>	扁果组 Sect. <i>Platycentrum</i>	贵州习水 1 Guizhou: Xishui 1
21	厚壁秋海棠 <i>B. silletensis</i> subsp. <i>silletensis</i>	无翅组 Sect. <i>Sphenanthera</i>	西藏墨脱 1 Tibet: Motuo 1
22	勐养秋海棠 <i>B. silletensis</i> subsp. <i>mengyangensis</i>	无翅组 Sect. <i>Sphenanthera</i>	云南勐腊 4 Yunnan: Mengla 4
23	台湾秋海棠 <i>B. taiwaniana</i>	东亚秋海棠组 Sect. <i>Diploclinium</i>	台湾 1 Taiwan: 1
24	大理秋海棠 <i>B. taliensis</i>	东亚秋海棠组 Sect. <i>Diploclinium</i>	云南永胜 1 Yunnan: Yongsheng 1
25	多变秋海棠 <i>B. variifolia</i>	侧膜组 Sect. <i>Coelocentrum</i>	广西东兰 1 Guangxi: Donglan 1
26	变色秋海棠 <i>B. versicolor</i>	扁果组 Sect. <i>Platycentrum</i>	云南屏边 3、麻栗坡 2 Yunnan: Pingbian 3, Malipo 2
27	长毛秋海棠 <i>B. villifolia</i>	扁果组 Sect. <i>Platycentrum</i>	云南麻栗坡 2 Yunnan: Malipo 2
28	文山秋海棠 <i>B. wenshanensis</i>	东亚秋海棠组 Sect. <i>Diploclinium</i>	云南屏边 2、文山 1 (疑似) Yunnan: Pingbian 2, Wenshan 1 (possible)
29	新种(待发表) <i>Begonia</i> sp. nov.	扁果组 Sect. <i>Platycentrum</i>	广西防城港 1 Guangxi: Fangchenggang 1

片化, 重叠分布情况少, 自然杂交机会较少。贵州仅发现1处。由于对西藏考察不系统, 西藏的杂交居群应该不止1处(Morris, 2017)。海南产秋海棠种类约11种, 调查尚未发现自然杂交, 这可能不仅同该省的种类数量相对较少、分布重叠概率低、居群个体少(如粗喙秋海棠、香花秋海棠、裂叶秋海棠等)有

关, 而且与大量种植橡胶等作物对秋海棠的栖息地造成破坏也有一定关系。从杂交发生的分布范围来看, 裂叶秋海棠参与自然杂交发生的范围最广, 包括云南、广西、广东、福建和台湾均已发现; 其次是粗喙秋海棠, 自然杂交发生省区为云南、广西和台湾(表3, 4)。

表 4 中国秋海棠自然杂交发生频率最高的种类

Table 4 Species with the highest frequency of natural cross in Chinese native begonias

种名 Species name	参与杂交种类及数量 Species involved in natural cross	杂交发生地点 Location of hybridization occurrence	杂交发生频率高的理由 Reasons for high frequency of natural hybridization
掌叶秋海棠 <i>B. hemsleyana</i>	8 食用秋海棠 <i>B. edulis</i> 粗喙秋海棠 <i>B. longifolia</i> 大裂秋海棠 <i>B. macrotoma</i> 裂叶秋海棠 <i>B. palmata</i> 紫叶秋海棠 <i>B. purpureofolia</i> 倒鳞秋海棠 <i>B. reflexiquamosa</i> 长纤秋海棠 <i>B. longiciliata</i> 变色秋海棠 <i>B. versicolor</i>	云南屏边 Pingbian, Yunnan 云南绿春 Lüchun, Yunnan 云南绿春 Lüchun, Yunnan 云南绿春 Lüchun, Yunnan 云南屏边 Pingbian, Yunnan 云南绿春 Lüchun, Yunnan 云南绿春 Lüchun, Yunnan 云南屏边、麻栗坡 Pingbian and Malipo, Yunnan	(1)云南、广西南部局部分布较广的种类, 所在分布区为国产秋海棠分布比较集中的地区, 种类多, 重叠概率大; (2)花期较长 6-11 月; (3)植株较高: 为直立茎类, 利于昆虫传粉。 (1) Widely distributed with higher chance of habitat overlapping in some regions of Yunnan and Guangxi provinces with rich begonia species; (2) Long flowering time from June to November; (3) Relatively taller plants benefiting visiting of pollinators.
粗喙秋海棠 <i>B. longifolia</i>	7 歪叶秋海棠 <i>B. augustinei</i> 周裂秋海棠 <i>B. circumlobata</i> 厚叶秋海棠 <i>B. dryadis</i> 水鸭脚 <i>B. formosana</i> 掌叶秋海棠 <i>B. hemsleyana</i> 裂叶秋海棠 <i>B. palmata</i> 厚壁秋海棠 <i>B. silletensis</i>	云南勐腊 Mengla, Yunnan 广西那坡 Napo, Guangxi 云南勐腊 Mengla, Yunnan 台湾 Taiwan 云南绿春 Lüchun, Yunnan 台湾、云南绿春、广西上思 Taiwan; Lüchun, Yunnan; Shangsi, Guangxi 西藏墨脱 Motuo, Tibet	(1)分布范围广, 为该属跨国分布最广种类之一, 仅次于裂叶秋海棠 <i>B. palmata</i> ; (2)花期长: 5-12 月; (3)植株高: 为直立茎、亚灌木类, 利于昆虫传粉。 (1) The second most widely distributed species only next to <i>B. palmata</i> ; (2) Long flowering time from May to December; (3) Relatively taller subshrub benefiting pollinator visiting.
裂叶秋海棠 <i>B. palmata</i>	5 台湾秋海棠 <i>B. taiwaniana</i> 粗喙秋海棠 <i>B. longifolia</i> 周裂秋海棠 <i>B. circumlobata</i> 掌叶秋海棠 <i>B. hemsleyana</i> 新种 <i>Begonia</i> sp. nov.	台湾 Taiwan 台湾、广西上思 Taiwan; Shangsi, Guangxi 广东信宜、惠州; 福建尤溪 Xinyi, Huizhou and Guangdong; Youxi, Fujian 云南绿春 Lüchun, Yunnan 广西防城港 Fangchenggang, Guangxi	(1)分布范围最广, 为该属在国内和跨国分布最广种类; (2)该种适应性强, 居群多、范围及密度大、个体数多, 因此, 同其他种类重叠分布频率高; (3)花期长: 5-12 月; (4)植株较高: 为直立茎类, 利于昆虫传粉。 (1) The most widely distributed species in <i>Begonia</i> ; (2) High adaptation to environment, populations are large in number and usually in size and high density resulting in high frequency of habitat overlapping with other species; (3) Long flowering time from May to December; (4) Relatively taller plants benefiting pollinator visiting.
酸味秋海棠 <i>B. acetosella</i>	3 厚叶秋海棠 <i>B. dryadis</i> 香花秋海棠 <i>B. handelii</i> 勐养秋海棠 <i>B. silletensis</i> subsp. <i>mengyangensis</i>	云南勐腊 Mengla, Yunnan 云南勐腊、澜沧、临沧 Mengla, Lancang and Lincang, Yunnan 云南勐腊 Mengla, Yunnan	(1)分布范围相对窄, 限于西双版纳州及邻近地区, 但常同本组的香花秋海棠、勐养秋海棠和扁果组的厚叶秋海棠伴生; (2)为直立茎类、植株高, 利于昆虫传粉; (3)同属组花具有香味, 有利于吸引昆虫传粉。 (1) Narrowly distributed but frequently overlapped with habitats of other species ( <i>B. handelii</i> , <i>B. silletensis</i> subsp. <i>mengyangensis</i> ) in the same section and <i>B. dryadis</i> ; (2) Shrub-like plants erect and tall to benefit pollinator visiting; (3) Flowers with strong fragrance to facilitate attracting pollinators.
长纤秋海棠 <i>B. longiciliata</i>	3 掌叶秋海棠 <i>B. hemsleyana</i> 食用秋海棠 <i>B. edulis</i> 厚叶秋海棠 <i>B. dryadis</i>	云南绿春 Lüchun, Yunnan 云南勐腊西双版纳热带植物园 Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Mengla, Yunnan 云南勐腊西双版纳热带植物园 Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Mengla, Yunnan	(1)分布范围相对狭窄, 限于云南绿春、江城等中越边境地区, 但该地区种类相对丰富; (2)西双版纳热带植物园栽培多种于热带雨林, 导致自然杂交。 (1) Narrowly distributed but frequently overlapped with relatively rich species in habitat in the border regions between Lüchun and Jiangcheng of Yunnan, China and Vietnam; (2) Natural cross also occurred in <i>ex situ</i> conservation site under the tropical rain forest of Xishuangbanna Tropical Botanical Garden.





图2 中国秋海棠自然杂交发生频率及分布式样(实心点: 杂交居群)(藏南地区杂种未列入)

Fig. 2 Occurrence and distribution pattern of natural hybridization of begonias in China (solid dots: hybrid populations not including the hybrids in South Tibet)

## 2.2 中国秋海棠自然杂种及亲本的形态鉴定

由于国产秋海棠属的自然杂种个体以 $F_1$ 代多为, 从形态特征上同其亲本容易区分(图1)。杂种的形态特征往往介于亲本之间, 包括植株大小、叶片形态及大小、被毛、花及果实特征等。例如: 变色秋海棠为根茎类、无地上茎、叶片颜色和斑纹变化大、无裂、被毛多, 掌叶秋海棠有明显地上茎、复叶、叶片被毛少, 二者的杂交后代有较短直立茎, 叶片深或浅裂、被毛较多、叶片颜色及斑纹出现较多变化<sup>①</sup>(图1O); 在云南西双版纳自然保护区多处发现酸味秋海棠和勐养秋海棠的杂交个体, 均有明显地上茎, 但较有直立茎的亲本酸味秋海棠要短, 叶片大小居二者之间(图1A), 其余多数特征也介于二亲本之间。秋海棠属自然杂种中也有个别性状相对亲本而言得到强化, 体现出“杂种优势”, 如掌叶秋海棠同长纤秋海棠发生杂交, 后代中一些个体的叶片背面颜色更深(图1G-b)。不同组间杂交, 杂种子房室数、果实及果翅形态也常介于亲本之间, 如厚叶秋海棠(*B. dryadis*)为2室扁果组, 粗喙秋海棠为3室东亚秋海棠组, 其杂交后代子房兼有2室和3室, 果翅很短(图1E, 子房解剖图略)。国产秋海棠自然杂种表现出亲本的中间性状这一特点已在其他学者和我们以前的研究报道中提及(Peng & Chen, 1991; Peng & Sue, 2000; Peng & Ku, 2009; Li et al, 2015)。

① 田代科 (1999) 变色秋海棠的园艺学研究。硕士学位论文, 中国科学院昆明植物研究所, 昆明。

但是个别情况下, 由于双亲自身的某些形态特征差异相对较小或某个性状(如叶形)变异幅度大, 杂种个体的某一个或多个性状同亲本十分接近, 难以区分, 如分别在广东信宜大雾山、惠州罗浮山及福建尤溪坂面镇发现的周裂秋海棠和裂叶秋海棠的杂交后代, 植株及叶片等形态同亲本一些个体很像, 如不通过综合形态仔细辨认, 容易被混淆(图1C)。

## 2.3 中国秋海棠自然杂种及亲本的分子鉴定

使用核基因ITS和叶绿体基因 $ndhF-rpl32$ 、 $ndhA$  intron片段对“疑似自然杂种”进行鉴定。选取18组28份材料进行分析, 共有18份可以通过ITS序列确定其自然杂交后代的身份, 其余10份未能确定(表5)。在确定杂交后代身份的18份材料中, 共有10份可以通过筛选出来的叶绿体基因片段确定杂交后代的父母本, 其余8份材料两亲本的叶绿体基因片段一样, 无法确定父母本。在可以确认父母本身份的10份杂交后代材料中, 除广东惠州罗浮山的杂交后代为双向杂交外, 其余均为单向发生的杂交事件。利用ITS和叶绿体基因 $ndhF-rpl32$ 、 $ndhA$  intron片段均无法确认身份的有7份, 需要后续进一步分析, 也说明该方法通用性还不够。因为除了极个别杂种居群因外形特征同亲本十分接近可能导致错误取材外, 其余疑似杂种完全可以通过综合形态学等特点判定其杂种身份。

## 2.4 杂种及其亲本的基因组大小相关性分析

利用流式细胞仪对13个自然杂种组合和8个人工杂种组合进行基因组大小测定, 测定结果如表6所示。理论上, 杂交后代是父本与母本的杂交产物, 遗传物质应该一半来自父本, 一半来自母本, 所以杂交后代的基因组大小应该为父本与母本基因组大小之和的一半, 但实际情况却往往有所偏差(表6)。我们发现大部分相对误差小于10%, 仅TDK 2984、B9、B11和E8的杂交后代C值的测量值与理论值的相对误差分别为19.45%、10.24%、12.14%和15.03%, 大于10%。杂交后代C值大部分等于或接近双亲之和的一半, 从侧面反映了上述杂交组合的准确性。相对亲本而言, 测量值与理论值相对误差较大的4个杂交组合, 其基因组并没有发生倍性改变, 因此, 不排除因染色体重复、重组或缺失事件导致基因组显著增大或减少。尽管以往没有研究涉及秋海棠杂种同亲本基因组大小的关系, 但在其他植物类群的研究报道中, 自然杂种的基因组大小除了大

表 5 利用核基因 ITS 和叶绿体基因序列鉴别中国秋海棠的杂种及疑似亲本结果  
Table 5 Identification of Chinese native begonia hybrids and their parents by ITS and chloroplast genes

标本采集号 Voucher no.	ITS	叶绿体基因 Chloroplast genes	标本采集号 Voucher no.	ITS	叶绿体基因 Chloroplast genes
TDK244	√	√	TDK1296	×	×
TDK264	√	√	TDK1299	√	√
TDK354	×	×	TDK1303	√	×
TDK358	×	×	TDK1306	√	×
TDK362	√	√	TDK1310	×	√
TDK368	×	×	TDK1348	×	×
TDK396	√	√	TDK1349	×	×
TDK868	√	×	TDK1374	√	√
TDK870	√	×	TDK1378	×	√
TDK873	√	×	TDK1428	×	√
TDK1251	√	√	TDK2064	√	√
TDK1252	√	×	TDK2213	×	√
TDK1255	√	×	TDK2290	×	×
TDK1257	√	×	ZPS001	√	√

标本采集号杂种及其亲本相关信息见表 1。√ 表示成功鉴定, × 表示无法鉴定。  
Detailed information on voucher-number related hybrids and their parents showed in Table 1. √ indicated success of identification, × indicated failure of identification.

体介于两个亲本之间, 也有杂种居群间基因组变化较大的报道, 如向日葵属(*Helianthus*) (Baack et al, 2005)、水仙属(*Narcissus*) (Marques et al, 2012)和水马齿属(*Callitriche*) (Prancl et al, 2014)。因此, 基因组大小虽然能初步判断亲本及杂交后代的关系, 但要准确判断杂种及疑似亲本的身份, 还必须借助形态、分子证据以及人工重复自然杂交试验来验证。

2.5 人工杂交验证自然杂种及疑似亲本

我们自1999年来先后在昆明植物园和上海辰山植物园的栽培大棚或温室内、福建尤溪县坂面镇青坑村的野生秋海棠自然杂交带等地, 对已发现的自然杂种开展了人工重复自然杂交过程试验(表7), 对部分自然杂交后代开展自交、杂种亲本间重复杂交、回交等, 并结合原有报道数据(Peng & Sue, 2000; Peng & Ku, 2009)统计可知: 基于种子是否饱满并萌发判定, 杂种亲本间双向交配杂交绝大多数成功, 仅少数只能单向交配成功(如以粗喙秋海棠为母本、水鸭脚(*B. formosana*)为父本杂交不成功), 而杂种自交、同亲本交配成功率低(表7)。结合形态特征推断, 国产秋海棠的自然杂交后代通常是F<sub>1</sub>代个体, 这在人工杂交试验中得到支持。人工杂交F<sub>1</sub>代植株同野外发现的自然杂交个体在形态上几乎没有区别, 从而可确定杂种及其亲本的身份。国产秋海棠

属植物的杂交高度亲和性得到李景秀等(2013)的研究证实: 通过对109个组合(含部分国外种及品种)开展人工杂交, 发现云南秋海棠属下组内、组间及不同根茎类型种类对有性杂交均无显著差异, 其亲和力强、可育性高, 可在属内广泛进行远缘杂交, 但同国外种或品种的杂交亲和性很低。这充分说明, 只要花期相遇、分布相近, 国产秋海棠属种类间易发生自然杂交。

2.6 中国秋海棠的主要访花昆虫及传粉特点

对上海辰山植物园露天栽培的秋海棠进行传粉观察。在2015年9月底, 昆虫访花高峰为8:00–10:00和12:00–14:00, 6:00之前和18:00之后无昆虫访花(图3)。主要访花昆虫有6种, 按访花频率高低依次为: 黑带食蚜蝇(*Episyrphus balteatus*)、绿条无垫蜂(*Amegilla zonata*)、粗额淡脉隧蜂(*Lasioglossum pallilomum*)、圆斑黄食蚜蝇(*Xanthandrus comtus*)、中华蜜蜂(*Apis cerana*)和淡脉隧蜂属一种(*Lasioglossum* sp.)。其中, 访花频率最高的黑带食蚜蝇平均每天实际观察时段访花近80次; 淡脉隧蜂属的一种访花频率最低, 平均每天仅6次。主要访花昆虫访花频率虽高, 但访问雌花的次数很少, 仅为访问雄花次数的1/5–1/20, 只有淡脉隧蜂属一种访问雌雄花的概率近似相等。9月初福建尤溪坂面镇自然杂交

表 6 中国秋海棠的自然杂种、人工杂交后代与其亲本的 C 值关系  
Table 6 The relationship of C-values between hybrids and their parents in Chinese begonia species

杂种采集号 Collect. no. of hybrid	母本 Mother species		父本 Father species		2C 值 2C value				相对误差 Relative error (%)
	采集号 Collect. no.	物种 Species	采集号 Collect. no.	物种 Species	母本 Mother species	父本 Father species	杂种理论 Theoretical of hybrid	杂种实测 Measured of hybrid	
TDK354	TDK355	酸味秋海棠 <i>B. acetosella</i>	TDK2645	勐养秋海棠 <i>B. silletensis</i> subsp. <i>mengyangensis</i>	1.098	1.116	1.107	1.109	0.22
TDK368	TDK366	厚叶秋海棠 <i>B. dryadis</i>	TDK434	粗喙秋海棠 <i>B. longifolia</i>	1.204	1.122	1.163	1.263	8.59
TDK747	TDK355	酸味秋海棠 <i>B. acetosella</i>	TDK2645	勐养秋海棠 <i>B. silletensis</i> subsp. <i>mengyangensis</i>	1.098	1.116	1.107	1.136	2.66
TDK2213	TDK2212	全柱秋海棠 <i>B. grandis</i> subsp. <i>holostyla</i>	TDK2214	大理秋海棠 <i>B. taliensis</i>	1.077	1.252	1.165	1.206	3.58
TDK2542	TDK2537	裂叶秋海棠 <i>B. palmata</i>	TDK1795	周裂秋海棠 <i>B. circumlobata</i>	0.993	0.999	0.996	1.006	1.08
TDK2677	TDK2669	裂叶秋海棠 <i>B. palmata</i>	TDK2696	掌叶秋海棠 <i>B. hemsleyana</i>	0.926	1.043	0.985	0.901	8.48
TDK2689	TDK2696	掌叶秋海棠 <i>B. hemsleyana</i>	TDK1283	长纤秋海棠 <i>B. longiciliata</i>	1.043	1.053	1.048	1.040	0.75
TDK2697	TDK2696	掌叶秋海棠 <i>B. hemsleyana</i>	TDK2669	裂叶秋海棠 <i>B. palmata</i>	1.043	0.926	0.985	0.891	9.50
TDK2747	TDK1924	掌裂叶秋海棠 <i>B. pedatifida</i>	TDK2250	戴叶秋海棠 <i>B. limprichtii</i>	0.878	0.938	0.908	0.965	6.23
TDK2697A	TDK2696	掌叶秋海棠 <i>B. hemsleyana</i>	TDK2669	裂叶秋海棠 <i>B. palmata</i>	1.043	0.926	0.985	0.940	4.49
TDK2976	TDK2983	戴叶秋海棠 <i>B. limprichtii</i>	TDK2973	秀丽秋海棠 <i>B. pulchrifolia</i>	0.967	0.984	0.976	0.916	6.15
TDK2984	TDK2983	戴叶秋海棠 <i>B. limprichtii</i>	TDK2981	掌裂叶秋海棠 <i>B. pedatifida</i>	0.967	1.285	1.126	1.345	19.45
FNF006	FNF005	裂叶秋海棠 <i>B. palmata</i>	TDK1795	周裂秋海棠 <i>B. circumlobata</i>	0.959	0.999	0.979	0.980	0.14
B7*	B040-A	裂叶秋海棠 <i>B. palmata</i>	177	多毛秋海棠 <i>B. polytricha</i>	0.933	0.836	0.908	0.909	0.11
B9*	B040-A	裂叶秋海棠 <i>B. palmata</i>	180	勐养秋海棠 <i>B. silletensis</i> subsp. <i>mengyangensis</i>	0.933	1.116	0.979	1.079	10.24
B10*	B040-A	裂叶秋海棠 <i>B. palmata</i>	177	多毛秋海棠 <i>B. polytricha</i>	0.933	0.836	0.908	0.932	2.64
B11*	278-C	花叶秋海棠 <i>B. cathayana</i>	180	勐养秋海棠 <i>B. silletensis</i> subsp. <i>mengyangensis</i>	0.970	1.116	1.006	1.128	12.14
C4*	B040-A	裂叶秋海棠 <i>B. palmata</i>	B022	秋海棠新种 <i>Begonia</i> sp. nov.	0.933	0.908	0.926	0.889	4.00
E5*	278-B	花叶秋海棠 <i>B. cathayana</i>	226	粗喙秋海棠 <i>B. longifolia</i>	0.970	1.105	1.003	1.103	9.89
E7*	B040-A	裂叶秋海棠 <i>B. palmata</i>	226	粗喙秋海棠 <i>B. longifolia</i>	0.933	1.105	0.976	1.047	7.36
E8*	B040-A	裂叶秋海棠 <i>B. palmata</i>	227	厚叶秋海棠 <i>B. dryadis</i>	0.933	1.204	1.001	1.151	15.03

\*表示人工杂交获得杂种。 \*indicated artificial hybrids.

表 7 人工杂交实验验证中国秋海棠的自然杂交  
Table 7 Assessment of natural hybridization by artificial crossing in Chinese native begonia species

杂种组合 Hybrid	母本 Mother plant (♀)	父本 Father plant (♂)	是否成功(+/-) Success + /failure -
1	酸味秋海棠 <i>B. acetosella</i>	香花秋海棠 <i>B. handelii</i>	+
	香花秋海棠 <i>B. handelii</i>	酸味秋海棠 <i>B. acetosella</i>	+
2	酸味秋海棠 <i>B. acetosella</i>	勐养秋海棠 <i>B. silletensis</i> subsp. <i>mengyangensis</i>	+
	勐养秋海棠 <i>B. silletensis</i> subsp. <i>mengyangensis</i>	酸味秋海棠 <i>B. acetosella</i>	+
	酸味秋海棠×勐养秋海棠 <i>B. acetosella</i> × <i>B. silletensis</i> subsp. <i>mengyangensis</i>	酸味秋海棠×勐养秋海棠 <i>B. acetosella</i> × <i>B. sil-</i> <i>letensis</i> subsp. <i>mengyangensis</i>	-
	圆果秋海棠(=粗喙秋海棠) <i>B. aptera</i> (= <i>B. longifolia</i> )	水鸭脚 <i>B. formosana</i>	-
3*	水鸭脚 <i>B. formosana</i>	圆果秋海棠 <i>B. aptera</i>	+
	水鸭脚 <i>B. formosana</i>	台北秋海棠 <i>B. ×taipeiensis</i> ( <i>B. formosana</i> × <i>B.</i> <i>aptera</i> )	-
	圆果秋海棠 <i>B. aptera</i>	台北秋海棠 <i>B. ×taipeiensis</i>	-
	台北秋海棠 <i>B. ×taipeiensis</i>	台北秋海棠 <i>B. ×taipeiensis</i>	-
4	周裂秋海棠 <i>B. circumlobata</i>	裂叶秋海棠 <i>B. palmata</i>	+
	裂叶秋海棠 <i>B. palmata</i>	周裂秋海棠 <i>B. circumlobata</i>	+
	周裂秋海棠×裂叶秋海棠 <i>B. circumlobata</i> × <i>B. palmata</i>	周裂秋海棠 <i>B. circumlobata</i>	-
	周裂秋海棠×裂叶秋海棠 <i>B. circumlobata</i> × <i>B. palmata</i>	裂叶秋海棠 <i>B. palmata</i>	-
5	厚叶秋海棠 <i>B. dryadis</i>	粗喙秋海棠 <i>B. longifolia</i>	+
	粗喙秋海棠 <i>B. longifolia</i>	厚叶秋海棠 <i>B. dryadis</i>	+
	厚叶秋海棠×粗喙秋海棠 <i>B. dryadis</i> × <i>B. longifolia</i>	厚叶秋海棠×粗喙秋海棠 <i>B. dryadis</i> × <i>B. longifolia</i>	-
6	掌叶秋海棠 <i>B. hemsleyana</i>	变色秋海棠 <i>B. versicolor</i>	+
	变色秋海棠 <i>B. versicolor</i>	掌叶秋海棠 <i>B. hemsleyana</i>	+
	麻栗坡秋海棠 <i>B. ×malipoensis</i> ( <i>B. hemsleyana</i> × <i>B.</i> <i>versicolor</i> )	麻栗坡秋海棠 <i>B. ×malipoensis</i>	-
7	掌叶秋海棠 <i>B. hemsleyana</i>	大裂秋海棠 <i>B. macrotoma</i>	+
	掌叶秋海棠×大裂秋海棠 <i>B. hemsleyana</i> × <i>B. macro-</i> <i>toma</i>	掌叶秋海棠×大裂秋海棠 <i>B. hemsleyana</i> × <i>B.</i> <i>macrotoma</i>	+
8*	粗喙秋海棠 <i>B. longifolia</i>	裂叶秋海棠 <i>B. palmata</i>	+
	钟氏秋海棠 <i>B. ×chungii</i> ( <i>B. longifolia</i> × <i>B. plamata</i> )	钟氏秋海棠 <i>B. ×chungii</i>	-

杂交是否成功(+/-)以种子是否饱满及萌发判定, \*为已经发表数据。  
Success or failure in artificial cross was based on seeds and germination, \*published data (Peng & Ku, 2009; Peng & Sue, 2000).

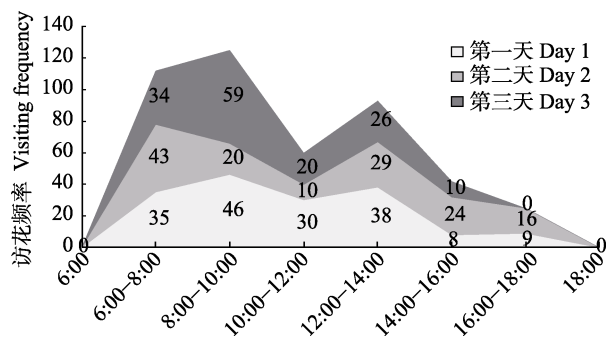


图 3 连续三天不同时间段内上海辰山植物园秋海棠的主要访花昆虫的访花频率(次数)  
Fig. 3 Frequency of major pollinators to visit flowers of *B. grandis* in Shanghai Chenshan Botanical Garden in different periods in 3 days

区的访花昆虫种类和访花行为同上海辰山植物园露天栽培秋海棠的观察结果大体类似, 但因为实际观察时间稍短, 加上部分时间段下雨, 影响了统计数据的质量(数据略)。

蜜蜂通常是很多开花植物的高效传粉者, 但我们发现中华蜜蜂对秋海棠的传粉贡献极低, 因为它们不但访问花次数偏低, 而且通常只访问雄花且停留时间长, 其目的是采集花粉; 相反很少接触雌花, 即使偶尔接触, 时间也极短。这一情况在2014年9月观察四川都江堰风景区蜜蜂访问秋海棠花的情况时得到证实: 蜜蜂访问雌花并非带有目的性, 而极可能是偶尔错把雌花当作雄花的结果, 因为蜜蜂

在即将接触或刚接触雌花柱头后就马上飞离, 显然表明其意识到了自己的误判。因此, 蜜蜂对秋海棠的传粉属于欺骗性传粉。

## 2.7 中国秋海棠的自然杂交发生条件及动态预测

通过对国产秋海棠属自然杂交发生地点进行系统调查, 发现自然杂交后代只出现在亲本的重叠分布区, 与亲本植株紧挨或邻近生长, 相距大多不超过10 m。例如, 云南屏边县大围山国家级自然保护区内3处、麻栗坡县豆豉店2处发现了变色秋海棠和掌叶秋海棠的杂交个体(表3), 而只要有杂交植株的地方, 就可见到其双亲亲本, 且距离很近(0–10 m); 周裂秋海棠和裂叶秋海棠分别在广东信宜大雾山、惠州罗浮山和福建尤溪坂面镇青坑村的小溪沟边发生了自然杂交(表3), 杂交后代同亲本沿着溪沟紧挨生长或距离很近(0–5 m); 秋海棠在我国分布最广泛, 但由于同其他种类重叠分布的情况少, 目前仅在云南丽江永胜县发现同大理秋海棠发生了自然杂交, 且杂种个体仅5株, 杂种同亲本的距离不到1 m。此外, 杂种往往更靠近母本生长, 如云南勐腊县望天树景区发现厚叶秋海棠和粗喙秋海棠发生自然杂交, 作为母本的厚叶秋海棠生长在公路内侧的斜坡上, 其下方见到数株杂种个体, 而父本粗喙秋海棠位于公路外侧、相距不过5 m。已发现的其他杂种和亲本的距离也大体如此, 这一特点有利于杂种及亲本的身份判定。

发生自然杂交的亲本除了分布上重叠或很接近外, 花期多少重叠, 例如掌叶秋海棠、粗喙秋海棠的群体花期长达数月, 从而增加了同其他种类花期相遇的可能性, 因此更易发生杂交; 而厚叶秋海棠除了有明显的主花期, 还常发现少量个体在其他时间段开花, 从而增加了杂交发生的概率。杂交发生后形成杂种需要适宜的环境条件, 即适度荫蔽处、表面湿润的土壤或岩石才能满足种子萌发和幼苗生长的条件, 一些地方尽管发现两个花期相遇的物种重叠分布, 但由于原有生境被破坏, 不利于种子萌发和个体生长发育, 因此很难见到杂交个体。相反, 由于一些露天迁地保护栽培的环境好, 种植距离近, 为自然杂交的发生创造了有利条件, 如中国科学院西双版纳热带植物园热带雨林引种栽培了多种秋海棠, 由于不同种类种植距离近, 生境接近自然、条件优良, 该处发生了两组自然杂交(表2); 四川峨

眉山植物园露天栽培的掌裂叶秋海棠和戴叶秋海棠(*B. limprichtii*)发生了双向杂交(表1, 2; 图1L)。

通过对中国秋海棠物种的分布、生境、开花习性和昆虫传粉观察等综合分析, 总结出杂交发生及杂种形成的5个必需条件: (1)至少2个及以上物种的个体重叠分布或相距足够近; (2)花期至少部分重叠; (3)存在有效传粉媒介; (4)杂交亲和; (5)适宜杂交种子萌发及其个体生长发育的环境条件。这样, 借助昆虫的传粉就可能发生杂交、形成杂种。其中, 亲本距离很近(大体10 m以内)是已知秋海棠杂种发生的显著特点之一。基于野外调查、形态特征和分子分析发现(表5): 国产秋海棠属的绝大部分杂种居群少、个体少(最少仅见1株); 且多数为单向杂交的 $F_1$ 代, 还未离开杂交区脱离亲本形成独立种群; 杂种间自交往往不亲和(Peng & Chen, 1991; Peng & Sue, 2000; Peng & Ku, 2009; Li et al, 2015), 因此, 杂种还不能脱离亲本实现自我繁衍, 其居群稳定或个体数缓慢增长只能依靠亲本不断发生杂交而补充新个体。例如, 自1997年以来, 我们多次对云南屏边县大围山国家级自然保护区、麻栗坡豆豉店的几处变色秋海棠×掌叶秋海棠的自然杂交居群的观察发现, 尽管杂交个体因为观赏价值高而易被研究和爱好者发现、采集, 但个体数总体稳定, 每年都能发现杂种小苗, 这显然是杂交不断发生、杂交种子萌发的结果。当然, 也有自然杂种的生境易受破坏、个体数显著减少甚至消亡的情况, 如位于云南勐腊县望天树景区的厚叶秋海棠×粗喙秋海棠的杂交植株正好生长在公路内侧斜坡, 因受公路养护除草影响, 目前接近绝灭。云南绿春县平河乡的一处杂交带同时包括掌叶秋海棠×长纤秋海棠、掌叶秋海棠×粗喙秋海棠杂种居群, 但由于位于村寨附近的一块菜地旁(图1G), 不断受到人为干扰, 很难保证其持续生存。基于这些特点, 从生物种概念上理解, 目前发现的国产秋海棠杂种尚未成为真正的新物种。

通过系统的野外考察并结合文献、标本信息, 依据秋海棠属自然杂交发生、杂种形成需要满足的5个条件, 我们推测出国产秋海棠属未来可能发生自然杂交的亲本和发生地点(表8)。将来可能产生新的杂交组合(“杂种”)约40个, 发生地点主要在云南; 其次为广西和四川; 西藏、贵州、广东、重庆、福建、湖南等也可能有一到多个杂交组合发生。

表 8 中国秋海棠属植物未来可能发生新的自然杂交及其地点

Table 8 Occurred locations predicated for future potentially natural hybrids in Chinese native begonias

编号 No.	可能亲本 A Possible parent A	可能亲本 B Possible parent B	杂交可能发生地 Possible place of cross occurrence
1	大水沟秋海棠 <i>B. ×dashiugouensis</i>	掌叶秋海棠 <i>B. hemsleyana</i> ; 大裂秋海棠 <i>B. macrotoma</i>	云南绿春 Lüchun, Yunnan
2	酸味秋海棠 <i>B. acetosella</i>	粗喙秋海棠 <i>B. longifolia</i>	云南勐腊 Mengla, Yunnan
3	点叶秋海棠 <i>B. alveolata</i>	裂叶秋海棠 <i>B. palmata</i>	云南马关、麻栗坡 Maguan & Malipo, Yunnan
4	树生秋海棠 <i>B. arborea</i>	倒鳞秋海棠 <i>B. reflexisquamosa</i>	云南绿春 Lüchun, Yunnan
5	糙叶秋海棠 <i>B. asperifolia</i>	刺毛红孩儿 <i>B. difformis</i>	云南贡山; 西藏墨脱 Gongshan, Yunnan; Motuo, Tibet
6	歪叶秋海棠 <i>B. augustinei</i>	裂叶秋海棠 <i>B. palmata</i>	云南勐腊、勐海、澜沧 Mengla, Menghai & Lancang, Yunnan
7	巴马秋海棠 <i>B. bamaensis</i>	食用秋海棠 <i>B. edulis</i>	广西巴马 Bama, Guangxi
8	花叶秋海棠 <i>B. cathayana</i>	掌叶秋海棠 <i>B. hemsleyana</i>	云南屏边; 广西防城港 Pingbian, Yunnan; Fangchenggang, Guangxi
9	昌感秋海棠 <i>B. cavaleriei</i>	罗甸秋海棠 <i>B. porteri</i> ; 卷毛秋海棠 <i>B. cirrosa</i> ; 裂叶秋海棠 <i>B. palmata</i>	广西罗城 Luocheng, Guangxi
10	角果秋海棠 <i>B. ceratocarpa</i>	粗喙秋海棠 <i>B. longifolia</i>	云南马关 Maguan, Yunnan
11	凤山秋海棠 <i>B. chingii</i>	食用秋海棠 <i>B. edulis</i>	广西巴马、德保 Bama & Debao, Guangxi
12	赤水秋海棠 <i>B. chishuiensis</i>	掌裂叶秋海棠 <i>B. pedatifida</i> ; 新种 <i>Begonia</i> sp. nov.	贵州赤水; 重庆江津四面山 Chishui, Guizhou; Simianshan, Jiangjin, Chongqing; 四川纳溪 Naxi, Sichuan
13	周裂秋海棠 <i>B. circumlobata</i>	裂叶秋海棠 <i>B. palmata</i>	贵州榕江 Rongjiang, Guizhou
14	卷毛秋海棠 <i>B. cirrosa</i>	昌感秋海棠 <i>B. cavaleriei</i>	广西那坡 Napo, Guangxi
15	黄连山秋海棠 <i>B. coptidimontana</i>	多毛秋海棠 <i>B. polytricha</i>	云南绿春黄连山 Huanglianshan, Lüchun, Yunnan
16	水晶秋海棠 <i>B. crystallina</i>	光滑秋海棠 <i>B. psyllophilla</i>	云南麻栗坡 Malipo, Yunnan
17	瓜叶秋海棠 <i>B. cucurbitifolia</i>	裂叶秋海棠 <i>B. palmata</i>	云南马关 Maguan, Yunnan
18	大围山秋海棠 <i>B. daweishanensis</i>	掌叶秋海棠 <i>B. hemsleyana</i> ; 裂叶秋海棠 <i>B. palmata</i>	云南屏边 Pingbian, Yunnan
19	德保秋海棠 <i>B. debaoensis</i>	食用秋海棠 <i>B. edulis</i> ; 凤山秋海棠 <i>B. chingii</i>	广西德保 Debao, Guangxi
20	南川秋海棠 <i>B. dielsiana</i>	戴叶秋海棠 <i>B. limprichtii</i>	四川峨眉山 Mount Emei, Sichuan
21	刺毛红孩儿 <i>B. difformis</i>	宿苞秋海棠 <i>B. yuii</i>	云南景东无量山 Wuliangshan, Jingdong, Yunnan
22	槭叶秋海棠 <i>B. digyna</i>	裂叶秋海棠 <i>B. palmata</i>	福建长汀 Changting, Fujian
23	厚叶秋海棠 <i>B. dryadis</i>	小花秋海棠 <i>B. peii</i>	云南勐腊 Mengla, Yunnan
24	食用秋海棠 <i>B. edulis</i>	巴马秋海棠 <i>B. bamaensis</i> ; 裂叶秋海棠 <i>B. palmata</i>	广西巴马 Bama, Guangxi; 广东阳山 Yangshan, Guangdong
25	紫背天葵 <i>B. fimbriatipula</i>	秋海棠 <i>B. grandis</i>	广东仁化; 湖南永兴 Renhua, Guangdong; Yongxing, Hunan
26	金秀秋海棠 <i>B. glechomifolia</i>	裂叶秋海棠 <i>B. palmata</i>	广西金秀 Jinxiu, Guangxi
27	圭山秋海棠 <i>B. guishanensis</i>	独牛 <i>B. henryi</i>	云南石林 Shilin, Yunnan
28	古林箐秋海棠 <i>B. gulinqingensis</i>	裂叶秋海棠 <i>B. palmata</i>	云南马关、古林箐 Gulinqing & Maguan, Yunnan
29	香花秋海棠 <i>B. handelii</i>	长果秋海棠 <i>B. longicarpa</i>	云南河口 Hekou, Yunnan
30	独牛 <i>B. henryi</i>	新种 <i>Begonia</i> sp. nov.; 圭山秋海棠 <i>B. guishanensis</i>	四川天全 Tianquan, Sichuan; 云南石林 Shilin, Yunnan
31	靖西秋海棠 <i>B. jingxiensis</i>	厚叶秋海棠 <i>B. dryadis</i>	广西靖西 Jingxi, Guangxi
32	缙云秋海棠 <i>B. jinyunensis</i>	裂叶秋海棠 <i>B. palmata</i>	贵州榕江 Rongjiang, Guizhou
33	心叶秋海棠 <i>B. labordei</i>	裂叶秋海棠 <i>B. palmata</i> ; 中华秋海棠 <i>B. grandis</i> subsp. <i>sinensis</i>	云南多处; 广西 Multi-places in Yunnan; Guangxi; 云南昆明、楚雄 Kunming & Chuxiong, Yunnan
34	大裂秋海棠 <i>B. macrotoma</i>	裂叶秋海棠 <i>B. palmata</i>	云南澜沧、绿春 Lancang & Lüchun, Yunnan
35	麻栗坡秋海棠 <i>B. malipoensis</i>	变色秋海棠 <i>B. versicolor</i> ; 掌叶秋海棠 <i>B. hemsleyana</i>	云南屏边、麻栗坡 Pingbian & Malipo, Yunnan
36	不显秋海棠 <i>B. obsolescens</i>	裂叶秋海棠 <i>B. palmata</i>	云南马关 Maguan, Yunnan
37	掌裂叶秋海棠 <i>B. pedatifida</i>	赤水秋海棠 <i>B. chishuiensis</i> ; 裂叶秋海棠 <i>B. palmata</i> ; 新种 <i>Begonia</i> sp. nov.	贵州赤水 Chishui, Guizhou; 广西田林 Tianlin, Guangxi; 四川青城山 Qingchengshan, Sichuan
38	秀丽秋海棠 <i>B. pulchrifolia</i>	掌裂叶秋海棠 <i>B. pedatifida</i>	四川峨眉山 Mount Emei, Sichuan
39	长毛秋海棠 <i>B. villifolia</i>	裂叶秋海棠 <i>B. palmata</i>	云南麻栗坡 Malipo, Yunnan
40	一点血 <i>B. wilsonii</i>	新种 <i>Begonia</i> sp. nov.	四川峨眉山、青城山 Mount Emei & Qingchengshan, Sichuan



### 3 讨论

#### 3.1 中国秋海棠的自然杂交发生特点及杂种形成的必需条件

自然杂交在植物界十分普遍, 它同物种的进化密切相关, 也是植物分类不可忽略的一道障碍, 因此, 越来越受到研究者的关注。尽管一些大科(如伞形科、茄科大属(如黄芪属(*Astragalus*)))不易产生杂种(Ellstrand et al, 1996), 但也有若干属的种间杂交发生频繁, 如蕨类植物铁角蕨科铁角蕨属(*Asplenium*) (Lee et al, 2015), 菊科的千里光属(*Senecio*) (Abbott & Lowe, 2004)、婆罗门参属(*Tragopogon*) (Soltis et al, 2004)和向日葵属(*Rieseberg et al, 2003*), 桦木科桦木属(*Betula*) (Wang et al, 2014), 蔷薇科委陵菜属(*Potentilla*) (Léveillé-Bourret et al, 2014), 壳斗科栎属(*Quercus*) (Curtu et al, 2007), 杜鹃花科杜鹃属(*Rhododendron*) (Yan et al, 2013)等。从我们的研究结果看, 秋海棠属的自然杂交发生频率也很高, 涉及种类广泛, 仅在我国就多次出现了1种与其他8种发生杂交的现象, 这表明该属种间甚至组间的交配具有很高的亲和性, 历年来全球利用人工杂交等方法培育出一万多个品种的事实也佐证了这一点(赵斌等, 2017)。20世纪末, 本文第一作者曾在中国科学院昆明植物研究所攻读硕士学位及后续工作期间对国产秋海棠种类开展过120多组人工杂交实验, 成功率极高(数据待发表), 证明了中国秋海棠属组间、种类间极少存在绝对的生殖隔离, 这一结果也被后来的研究证实(李景秀等, 2013)。因此, 国产秋海棠属物种间的清晰界限及独立性主要靠分布或花期不重叠维持, 否则就极有可能发生自然杂交, 产生大量的杂交后代, 进而模糊亲本的形态特征边界, 如在广东信宜大雾山、福建尤溪县坂面镇发现的裂叶秋海棠同周裂秋海棠的杂交后代, 一些个体从叶片形态上很难同裂叶秋海棠区别开。鉴于自然杂交发生、杂种后代形成必须同时满足5个条件, 在自然界发生了杂交但因种子萌发条件不宜、无法形成杂交植株的情况也应不少, 因此, 国产秋海棠的自然杂交实际发生频率远比人们想象和观察到的要高。

#### 3.2 中国秋海棠杂种的形态及分子鉴定

基于野外自然杂交的后代个体往往很少, 一个杂交居群个体多者数十株, 最少时仅发现1株, 加

上其杂交个体的性状总体上均介于亲本之间或略偏向一方, 调查者只要具备比较扎实的形态分类、遗传育种学知识和丰富的实践经验, 从形态上就容易识别出杂种及其疑似亲本。目前仅发现周裂秋海棠×裂叶秋海棠的情况例外, 其杂种后代的叶片形态更似裂叶秋海棠, 除了叶片表面被毛的质感有细微差别外, 部分个体在未开花时同亲本裂叶秋海棠难以分辨, 这种情况只能借助分子生物学的方法进行辅助鉴定。尽管利用核基因ITS和叶绿体基因片段分析杂种成分、疑似亲本及杂交方向快捷方便, 但并非所有的杂种及其亲本的关系都能被检测鉴定。由于ITS属于多拷贝基因, 且具有致同进化现象, 导致少量疑似杂交个体的扩增产物无法直接测序, 因此无法通过ITS片段对其杂交后代的属性进行确认, 需要开发单拷贝核基因对这一部分杂交后代个体进行鉴定。另外, 由于叶绿体基因进化速度慢的原因, 在部分亲本亲缘关系较近的杂交组合中, 无法确定杂交后代的父母本, 同样需要使用更多的叶绿体基因片段进行鉴定。目前还未找到针对所有杂种鉴定的通用性片段。根据国产秋海棠自然杂交发生特点及杂种同亲本形态特征的关系等, 我们推测以前发表的撕裂秋海棠(*B. lacerata*)、澜沧秋海棠(*B. langcangensis*)和麻栗坡秋海棠(*B. malipoensis*) 3种均为杂交起源, 其亲本分别是掌裂秋海棠×食用秋海棠(*B. edulis*)、酸味秋海棠×香花秋海棠、变色秋海棠×掌叶秋海棠, 相关分类地位正在修订中。

利用先进的流式细胞术比较亲本和杂种后代的基因组大小, 可以辅助鉴定杂种及疑似亲本。我们的分析表明: 杂种的基因组大小往往等于亲本的平均值, 偏差多数小于10%, 仅有少数情况出现较大偏差, 导致实际值同理论值差异较大的原因不明, 需要结合染色体学研究才能解决。通过人工杂交重复自然杂交过程是判断杂种及其疑似亲本的可靠办法之一, 但从授粉结实到播种育苗、杂种后代完全表现出性状这一过程费时太长, 且迁地栽培的条件同野外存在差异, 因此, 人工杂交的实验结果不一定能完全真实地反映实际情况, 特别是因授粉时间或方法掌握不好、授粉样本不够等导致杂交失败, 很容易得出错误结论。最可靠的办法是直接野外开展人工重复杂交实验, 获得成熟果实, 播种成苗开花后再分析鉴定, 但这种方法很费人力、时间和经费, 每个案例都用此方法研究鉴定不太现实。因



此, 只有根据实际情况, 综合以上各种方法, 依据不同目的解决实际问题。

尽管通过多年的研究, 我们对国产秋海棠属的自然杂交发生频率、特点及杂种分布状况等有了比较充分的理解, 但鉴于我国秋海棠资源十分丰富, 分布范围很广, 随着今后调查的深入, 一定还会有新的杂交居群不断被发现。针对不同组、不同种间杂种的个体组成、遗传结构和多样性, 传粉机制和杂交后代的环境适应性和性状分化, 能否找到一种普适性方法准确鉴定杂种及其亲本等等诸多问题还不清楚, 均需要将来投入大量的时间和精力开展研究才能逐一解决。

### 3.3 秋海棠属植物的传粉

有关秋海棠属传粉生物学的报道很少, 以往研究表明: 不仅是蜜蜂, 其他昆虫访问秋海棠植物雄花的频率和时间也远远高于雌花, 偶尔访问雌花是由于花部外形的高度相似性使昆虫受到欺骗的结果, 但由于总体访问雌花的频率也足以满足授粉的需求, 所以秋海棠的结实率通常较高(Agren & Schemske, 1991; Schemske et al, 1996; Wyatt & Szirma, 2011), 这一结论在我们的实验观察中也得到证实。但由于调查时间和地点有限, 数据采集不充分和全面, 一些昆虫(特别是体型很小的种类)是否真正起到有效传粉作用还不十分明确, 需要进一步观察其身体是否携带花粉并完成授粉过程来判定。另一方面, 国产秋海棠属种类繁多、分布广、组间甚至种间花期差异大, 因此, 传粉昆虫种类及其传粉特点是否因种类(组)、分布纬度和海拔、生境、开花时间等不同而存在显著差异也有待今后系统地开展研究才能回答。

### 3.4 杂种的概念、分类处理及保护建议

由于对物种的概念和内涵的认识一直存在变化和争议(洪德元, 2016; 刘建全, 2016; 张德兴, 2016), 对杂种也难达成一致理解。我们认为杂种概念应该包括两个范畴: 一是广义的称谓, 即不同水平、不同类群同一杂交组合(通常指单向, 有时包括双向)发生杂交、产生后代个体的集合, 这些个体在形态和遗传关系上最为接近; 二是生物学概念概念的杂种, 即杂交起源相同、形态和遗传关系上最近, 且与亲本独立、能通过有性或无性繁殖实现自我繁衍的一类个体集合。尽管秋海棠属的杂交比较普遍, 但同其他科属植物的情况大体一样, 目前发现的所

有“杂种”, 自交几乎都不亲和, 还不能脱离亲本或杂交带获得独立繁衍的能力, 仅仅是少数杂交个体或多个杂交居群的集合体, 因此称不上真正的生物学种。但是, 杂种不仅是物种分类时必须面对的问题, 也是研究生物多样性及进化、育种等的重要材料, 因此, 为了满足解决相关科学问题及实践交流的需要, 我们建议有必要按照新分类群发表的严格要求, 将“杂种”逐一调查和整理发表, 作为物种进化过程中的一种特殊单元处理和理解。在其他一些植物类群中, 尽管杂交可能会导致亲本遗传同化, 小种群遗传特异性丧失, 优势杂种排挤、淘汰亲本(Rhymer & Simberloff, 1996), 但从我们当前的调查结果看, 国产秋海棠属的自然杂种个体很少, 对亲本的影响十分小, 相反, 杂种的存在增加了本属植物的多样性, 因此, 无论基于科学研究的需要, 还是考虑到从杂种个体中筛选优良观赏品种的可能, 杂交发生区域应该优先保护。鉴于国产秋海棠属种间的杂交亲和性高, 在露天迁地保育栽培时应增加花期可遇种类的种植间距, 防止不必要的基因交流, 实时监控, 准确鉴定杂种并及时去除。

**致谢:** 感谢中国科学院昆明植物研究所李景秀高级工程师, 西双版纳热带植物园谭运洪副研究员, 福建中医药大学杨成梓教授, 云南绿春黄连山国家级自然保护区管理局朱正明高级工程师, 云南省西双版纳国家级自然保护区张沛松工程师, 四川峨眉山植物园李策宏研究员, 北京花木公司董文珂先生等提供部分自然杂交信息或协助野外考察; 感谢中国科学院上海植物生理生态研究所昆虫博物馆吴捷博士帮助鉴定昆虫标本; 感谢审稿专家提出的宝贵建议。

### 参考文献

- Abbott RJ, Lowe AJ (2004) Origins, establishment and evolution of new polyploid species: *Senecio cambrensis* and *S. eboracensis* in the British Isles. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82, 467–474.
- Agren J, Schemske DW (1991) Pollination by deceit in a Neotropical monoecious herb, *Begonia involucre*. *Biotropica*, 23, 235–241.
- Arnold ML (1992) Natural hybridization as an evolutionary process. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 23, 237–261.
- Arnold ML (1997) *Natural Hybridization and Evolution*.

- Oxford University Press, New York.
- Arnold ML, Bouck AC, Cornman RS (2003) Verne Grant and Louisiana Irises: is there anything new under the sun? *New Phytologist*, 161, 143–149.
- Baack EJ, Whitney KD, Rieseberg LH (2005) Hybridization and genome size evolution: timing and magnitude of nuclear DNA content increases in *Helianthus* homoploid hybrid species. *New Phytologist*, 167, 623–630.
- Bairdungerer MC, Baird S, Pan J, Rieseberg LH (1998) Rapid hybrid speciation in wild sunflowers. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 95, 11757–11762.
- Burt-Utley K (1985) A revision of Central American species of *Begonia* section *Gireoudia* (Begoniaceae). *Tulane Studies in Zoology and Botany*, 25, 1–131.
- Curtu AL, Gailing O, Finkeldey R (2007) Evidence for hybridization and introgression within a species-rich oak (*Quercus* spp.) community. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 218–232.
- Ellstrand NC, Schierenbeck KA (2000) Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants? *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 97, 7043–7050.
- Ellstrand NC, Whitkus RW, Rieseberg LH (1996) Distribution of spontaneous plant hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 93, 5090–5093.
- Frodin DG (2004) History and concepts of big plant genera. *Taxon*, 53, 753–776.
- Gaskin JF (2016) The role of hybridization in facilitating tree invasion. *AoB Plants*, 9, doi:10.1093/aobpla/plw079.
- Hong DY (2016) Biodiversity pursuits need a scientific and operative species concept. *Biodiversity Science*, 24, 979–999. (in Chinese with English abstract) [洪德元 (2016) 生物多样性事业需要科学、可操作的物种概念. 生物多样性, 24, 979–999.]
- Hoover WS, Karegeannes C, Wiriadinata H, Hunter JM (2004) Notes on the geography of South-east Asian *Begonia* and species diversity in montane forests. *Telopea*, 10, 749–764.
- Lee CS, Lee K, Yeu SH, Chung KS (2015) Two new and one unrecorded natural hybrids between *Asplenium ruprechtii* and related taxa (Aspleniaceae). *Korean Journal of Plant Taxonomy*, 45, 362–368.
- Léveillé-Bourret E, Bailleul S, Cayouette J, Joly S (2014) Testing hybridization hypotheses with morphometry: the case of eastern American arctic species of *Potentilla* sect. *Niveae* (Rosaceae). *Systematic Botany*, 39, 193–204.
- Li C, Tian DK, Li XP, Fu NF (2015) Morphological and molecular identification of natural hybridization between *Begonia hemsleyana* and *B. macrotoma*. *Scientia Horticulturae*, 192, 357–360.
- Li HZ, Ma H, Guan KY, Peng CI (2005) *Begonia rubinea* (sect. *Platycentrum*, Begoniaceae), a new species from Guizhou, China. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 46, 377–383.
- Li JX, Guan KY, Kong FC, Godo TN (2013) Property of sexual hybridization plants of *Begonia* in Yunnan. *Guihaia*, 33, 727–733. (in Chinese with English abstract) [李景秀, 管开云, 孔繁才, 神户敏成 (2013) 云南秋海棠属植物有性杂交特性. 广西植物, 33, 727–733.]
- Liu JQ (2016) “The integrative species concept” and “species on the speciation way”. *Biodiversity Science*, 24, 1004–1008. (in Chinese with English abstract) [刘建全 (2016) “整合物种概念”和“分化路上的物种”. 生物多样性, 24, 1004–1008.]
- Mallet J (2007) Hybrid speciation. *Nature*, 446, 279–283.
- Marques I, Feliner GN, Martins-Loucao MA, Aguilar JF (2012) Genome size and base composition variation in natural and experimental *Narcissus* (Amaryllidaceae) hybrids. *Annals of Botany*, 109, 257–264.
- Morris R (2017) *Species Begonias of the Eastern Himalayas*. KBCC Press, Gaoshu, China.
- Nolte AW, Tautz D (2010) Understanding the onset of hybrid speciation. *Trends in Genetics*, 26, 54–58.
- Parepa M, Fischer M, Krebs C, Bossdorf O (2014) Hybridization increases invasive knotweed success. *Evolutionary Applications*, 7, 413–420.
- Peng CI, Chen YK (1991) Hybridity and parentage of *Begonia buimontana* Yamamoto (Begoniaceae) from Taiwan. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 78, 995–1001.
- Peng CI, Ku SM (2009) *Begonia ×chungii* (Begoniaceae), a new natural hybrid in Taiwan. *Botanical Studies*, 50, 241–250.
- Peng CI, Liu Y, Ku SM, Kono Y, Chung KF (2010) *Begonia ×breviscapa* (Begoniaceae), a new intersectional natural hybrid from Guangxi, China. *Botanical Studies*, 51, 107–117.
- Peng CI, Sue CY (2000) *Begonia ×taipeiensis* (Begoniaceae), a new natural hybrid in Taiwan. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 41, 151–158.
- Phutthai T, Hughes M (2016) A new species and a new record in *Begonia* sect. *Platycentrum* (Begoniaceae) from Thailand. *Gardens' Bulletin Singapore*, 68, 99–107.
- Pranc J, Kaplan ZK, Travnicek P, Jarolimova V (2014) Genome size as a key to evolutionary complex aquatic plants: polyploidy and hybridization in *Callitriche* (Plantaginaceae). *PLoS ONE*, 9, e105997.
- Rhymer JM, Simberloff D (1996) Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27, 83–109.
- Rieseberg LH (1997) Hybrid origins of plant species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 28, 359–389.
- Rieseberg LH, Carney SE (1998) Plant hybridization. *New Phytologist*, 140, 599–624.
- Rieseberg LH, Raymond O, Rosenthal DM, Lai Z, Livingstone K, Nakazato T, Durphy JL, Schwarzbach AE, Donovan LA, Lexer C (2003) Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. *Science*, 301, 1211–1216.
- Sands, MJS (2001) Begoniaceae. In: *The Plants of Mt. Kinabalu*

- (eds, Beaman JJ, Anderson C, Beaman RS), pp. 147–163. Natural History Publications (Borneo), Royal Botanic Gardens: Kew, UK.
- Sang J, Kiew R, Geri C (2013) Revision of *Begonia* (Begoniaceae) from the Melinau Limestone in Gunung Mulu National Park and Gunung Buda National Park, Sarawak, Borneo, including thirteen new species. *Phytotaxa*, 99, 1–34.
- Schemske DW, Agren J, Corff JL (1996) Deceit pollination in the Monoecious, Neotropical Herb *Begonia oaxacana* (Begoniaceae). In: *Floral Biology: Studies on Floral Evolution in Animal-Pollinated Plants* (eds, Lloyd DG, Barrett S), pp. 292–318. Chapman & Hall, New York.
- Schierenbeck KA, Ellstrand NC (2009) Hybridization and the evolution of invasiveness in plants and other organisms. *Biological Invasions*, 11, 1093–1105.
- Seker M, Tuzcu O, Ollitrault P (2003) Comparison of nuclear DNA content of citrus rootstock populations by flow cytometry analysis. *Plant Breeding*, 122, 169–172.
- Soltis DE, Soltis PS, Pires JC, Kovarik A, Tate JA, Mavrodiev E (2004) Recent and recurrent polyploidy in *Tragopogon* (Asteraceae): cytogenetic, genomic and genetic comparisons. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82, 485–501.
- Stebbins GL (1957) The role of hybridization in evolution. *Proceedings of the American Philosophical Society*, 103, 231–251.
- Stukenbrock EH (2016) The role of hybridization in the evolution and emergence of new fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 106, 104–112.
- Tebbitt MC (2013a) Three new natural hybrids of Andean tuberous begonias. *The Begonian*, 80, 29–32.
- Tebbitt MC (2013b) A rare new natural hybrid of Andean tuberous begonia. *The Begonian*, 80, 176–177.
- Teo LL, Kiew R (1999) First record of a natural begonia hybrid in Malaysia. *Gardens' Bulletin of Singapore*, 51, 103–118.
- Thomas D, Hughes M, Phutthai T, Rajbhandary S, Rubite R, Ardi WH, Richardson JE (2011) A non-coding plastid DNA phylogeny of Asian *Begonia* (Begoniaceae): evidence for morphological homoplasy and sectional polyphyly. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 60, 428–444.
- Wang N, Borrell JS, Bodles WJ, Kuttapitiya A, Nichols RA, Buggs RJA (2014) Molecular footprints of the Holocene retreat of dwarf birch in Britain. *Molecular Ecology*, 23, 2771–2782.
- Wang ZF, Peng SL (2003) Plant hybridization and its harmful genetic consequences. *Biodiversity Science*, 11, 333–339. (in Chinese with English abstract) [王峥嵘, 彭少麟 (2003) 杂交产生的遗传危害——以植物为例. *生物多样性*, 11, 333–339.]
- Wyatt GE, Sazima M (2011) Pollination and reproductive biology of thirteen species of *Beogonia* in the Serra Do Mar State Park, São Paulo, Brazil. *Journal of Pollination Ecology*, 6, 95–107.
- Yan LJ, Gao LM, Li DZ (2013) Molecular evidence for natural hybridization between *Rhododendron spiciferum* and *R. spinuliferum* (Ericaceae). *Journal of Systematics and Evolution*, 51, 426–434.
- Zalapa JE, Brunet J, Guries RP (2010) The extent of hybridization and its impact on the genetic diversity and population structure of an invasive tree, *Ulmus pumila* (Ulmaceae). *Evolutionary Applications*, 3, 157–168.
- Zhang DX (2016) Why is it so difficult to reach a consensus in species concept? *Biodiversity Science*, 24, 1009–2013. (in Chinese with English abstract) [张德兴 (2016) 为什么在物种概念上难以达成共识? *生物多样性*, 24, 1009–1013.]
- Zhao B, Fu NF, Xiang YC, Tian DK (2017) Effects of light intensity and planting substrates on the growth of *Begonia ningmingensis* 'Ningming Silver', a new begonia cultivar. *Guihaia*, 37, doi:10.11931/guihaia.gxzw201610033. (in Chinese with English abstract) [赵斌, 付乃峰, 向言词, 田代科 (2017) 光照强度及栽培基质对秋海棠新品种‘宁明银’生长的影响. *广西植物*, 37, doi:10.11931/guihaia.gxzw201610033.]

(责任编辑: 陈又生 责任编辑: 黄祥忠)

•研究报告•

# 基于系统基因组学分析揭示早期 陆生植物的复杂网状进化关系

舒江平<sup>1,2</sup> 刘 莉<sup>1,2</sup> 沈 慧<sup>2</sup> 戴锡玲<sup>1</sup> 王全喜<sup>1,4</sup> 严岳鸿<sup>2,3,4\*</sup>

1 (上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234)

2 (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)

3 (国家林业局华东野生濒危资源植物保育中心, 上海 201602)

4 (上海市资源植物功能基因组学重点实验室, 上海 201602)

**摘要:** 植物由水生走向陆生的进化过程中经历了非常复杂的演化, 期间产生的大量基因的进化路线可能互不相同, 因此仅仅使用系统发育树无法呈现真实的演化关系。系统发育网络图能够清楚地展示包括垂直演化和水平演化在内的复杂网状进化关系。本文选取莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)和4种陆生植物, 利用系统基因组学的方法, 筛选得到1,668个一对一直系同源基因, 重新构建了陆生植物的系统发育网状进化关系。结果发现, 使用不同的分析策略所得到的系统发育树不同; 对1,668个基因单独分析, 发现存在15种不同的拓扑结构; 对5个物种筛选得到的直系同源基因进行系统发育网络分析显示, 在非常稳健的系统发育网络图中, 仅仅5个物种就存在9个不同的分离支, 暗示着非常复杂的网状进化关系; 而且藻类植物与苔藓植物和石松类植物的分离支之间差异很小, 这可能是产生系统发育树冲突的原因之一, 也暗示着早期陆生植物发生了复杂的辐射演化。

**关键词:** 网状进化; 基因树冲突; 系统发育基因组学; 陆生植物演化; 转录组从头测序

## The complex reticulate evolutionary relationships of early terrestrial plants as revealed by phylogenomics analysis

Jiangping Shu<sup>1,2</sup>, Li Liu<sup>1,2</sup>, Hui Shen<sup>2</sup>, Xiling Dai<sup>1</sup>, Quanxi Wang<sup>1,4</sup>, Yuehong Yan<sup>2,3,4\*</sup>

1 College of Life and Environmental Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234

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

3 East China Wild Endangered Resources Plant Conservation Center, State Forestry Administration, Shanghai 201602

4 Shanghai Key Laboratory of Plant Functional Genomics and Resources, Shanghai 201602

**Abstract:** Plants from aquatic to terrestrial ecosystems have undergone a very complex evolution, and their evolutionary pathways of large numbers of genes may be different from one another, so that traditional phylogenetic trees cannot show true evolutionary relationships. The phylogenetic network graph is a good solution to show the complex relationships of reticulate evolution, including vertical evolution and horizontal evolution. In this paper, we selected *Chlamydomonas reinhardtii* and four terrestrial plants, and screened 1,668 one-to-one orthologous genes to reconstruct the phylogenetic relationship of terrestrial plants based on phylogenomics. Results showed that phylogenetic trees were different based on different analysis strategies. The 1,668 genes were analyzed separately and 15 different topologies were found. The phylogenetic network of the orthologous genes obtained from the five species was analyzed, and the results showed that in a very robust phylogenetic network map, only five species have nine different split branches, suggesting a very complex evolutionary relationship network. Furthermore, the difference in split branches between algae and bryophytes or lycopphytes is very small, which may be one of the reasons influencing the phylogenetic tree conflict, and implies that early terrestrial plants underwent a complex radiate evolution.

**Key words:** reticulate evolution; gene tree conflict; phylogenomics; terrestrial plant evolution; *de novo* transcriptome

收稿日期: 2017-02-18; 接受日期: 2017-06-20

基金项目: 上海市绿化和市容局 2015 年科学技术项目(G152420)

\* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: yan.yh@126.com

在距今约4.8亿年前的奥陶纪(Ordovician)时期,藻类植物(绿藻)由水生向陆生发展产生了早期陆地植物。这一重大的进化历史事件(李承森, 1994; Kenrick & Crane, 1997; Wellman et al, 2003; Steemans et al, 2009; Rubinstein et al, 2010; Wickett et al, 2014)引起了包括现存植物和化石植物在形态、生理、生殖和生态等性状上的极大多样化。而重建早期陆生植物的系统演化关系,一直以来都是植物系统发育学研究的基本内容,对于理解植物胚胎、维管组织、种子和花等的发育和演化都至关重要(Wickett et al, 2014)。

虽然现在利用大量的分子数据研究早期陆生植物的演化已得到相对普遍认同的观点,但是石松类植物(lycophytes)和苔藓植物(bryophytes)的关系在早期研究中饱受争议。在志留纪(Silurian)和早泥盆纪(Lower Devonian)时期,出现了大量结构非常简单的石松类植物的祖先——裸蕨类(psilophytes)植物。基于现存形式和化石形式的形态比较研究,得出了两种假设: (1)石松类植物直接起源于藻类植物; (2)石松类植物和苔藓植物的关系更为紧密。

支持第一种假设的研究者认为苔藓植物和石松类植物的相似性是由于平行进化引起的,而不是由于二者之间的系统演化所关联(Scott, 1900; Eames, 1936)。石松类植物可能起源于一群复杂的藻类,这些藻类的生长接近于从海洋转运而来的潮汐的上限,很可能是在潮间带生长旺盛的具有游动生殖细胞的褐藻类(phaerophyta)植物(Church, 1919; Arnold, 2013)。另一种观点认为这些藻类可能是绿藻(chlorophyta)。这些绿藻被认为是一类细丝状的胶毛藻类型(Bohlin, 1901; Fritsch, 1916),但是其祖先绿藻是具有同形生活史的直立薄壁细胞形式,其生活史由两种相似的无性世代交替进行(Fritsch, 1945)。

支持第二种假设的研究者认为石松类植物和苔藓植物之间存在很多相似的特征,暗示二者之间存在某种系统演化关系。一些研究认为石松类植物和苔藓植物是由一种非常原始的陆生颈卵器植物演化而来的两条不同进化路线(Bower, 1935; Zimmermann, 1938); 另一些研究认为石松类植物是由苔藓植物演化而来(Campbell, 1899)。

系统发育学(phylogenetics)试图利用各种性状(包括化石、形态、分子等)重新构建地球上所有生物的演化历史,并以系统发育树的形式呈现。随着

分子数据的增加,特别是基因组时代的来临,各个不同类群的系统发育树得以重建并有非常高的统计学支持(Dunn et al, 2008; Regier et al, 2010; Misof et al, 2014; Wickett et al, 2014)。然而,与此同时,不同基因构建的系统发育树之间各不一致,即基因树冲突(conflicting gene trees)现象也日益突出(邹新慧和葛颂, 2008)。在物种演化历程中,不同基因可能有不同的进化路线,主要分为两种:垂直演化(vertical evolutionary processes)和水平演化(horizontal evolutionary processes)。垂直演化,即遗传信息直接由亲代传递给子代,主要包括核酸替换(DNA substitutions)、插入(insertions)、删除(deletions)和基因复制(genic duplications)、易位(translocations)、倒位(inversions); 水平演化主要包括重组(recombination)、杂交(hybridization)、基因渐渗(introgression)、基因水平转移(horizontal gene transfer)和基因组融合(genome fusion)等。系统发育树只能呈现垂直演化过程,而对于相对复杂的水平演化过程,系统发育树则无法展示。此外,即使是垂直演化,如果存在不完全的谱系分选(incomplete lineage sorting)等进化历史事件,基因演化树和物种演化树可能截然不同。

随着系统发育学研究的深入,系统发育网络(phylogenetic network)可以很好地展现复杂的网状进化(reticulate evolution)关系(Huson & Bryant, 2006; Nakhleh, 2010; Huson & Scornavacca, 2011)。理论上,当进化过程中存在网状进化事件时,有根的系统发育网络可以清楚地呈现物种演化,但是这种系统发育网络分析所涉及的计算很困难,至今仍然没有一种成熟和广泛使用的分析工具(Tofigh et al, 2011)。值得庆幸的是,已经有大量的分析工具用于计算无根的系统发育网络,以此来呈现系统发育分析和谱系地理学研究中的网状进化事件(Bandelt et al, 1999; Clement et al, 2000; Bryant & Moulton, 2004; Huson & Bryant, 2006)。

本文以早期陆生植物演化分析为例,利用系统基因组学和系统发育网络分析早期陆生植物演化过程中可能存在的网状进化关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 转录组测序

转录组测序样品取自上海辰山植物园的蕨类

温室内单个福建观音座莲(*Angiopteris fokiensis*)植株的营养叶, 取样后迅速将样品放到液氮中冷冻。利用TRIzol<sup>®</sup> Reagent试剂(Invitrogen, 上海)提取总RNA, 然后利用Plant RNA Purification Reagent试剂(Invitrogen, 上海)对提取的总RNA进行纯化, 之后用Agilent 2100检测RNA提取质量。利用带有Oligo dT的磁力架(Invitrogen, 上海)与polyA进行A-T碱基配对, 从总RNA中分离出mRNA。利用金属离子将获得的mRNA随机断裂成200 bp左右的小片段。以这些小片段mRNA为模板, 用随机引物合成第一条cDNA链, 然后加入缓冲液、dNTPs、RNase H和DNA polymerase I合成第二条cDNA链。对双链cDNA进行加工修饰, 末端加poly (A)并连接测序接头adaptor, 得到完整的cDNA。利用PCR进行cDNA扩增, 构建测序文库, 用Illumina HiSeq 2500进行测序。

### 1.2 序列组装和ORF预测

利用Illumina双末端测序(paired-end, PE)方法进行高通量测序, 得到的原始图像数据经过Base Calling转化为序列数据, 即原始序列读取片段(raw reads), 以FASTQ格式储存。对原始序列进行质量评估和可信度分析, 并去除制备文库时产生的接头序列、两端低质量序列( $Q < 20$  bp)、含N > 10%的序列以及修剪后长度小于20 bp的序列, 得到有效数据(clean data)。利用Trinity (<http://trinityrnaseq.sourceforge.net/>, 版本号 trinityrnaseq-r2013-02-25) (Grabherr et al, 2011)对所有有效数据进行从头组装。由于Trinity组装结果中含有大量的冗余序列, 利用CD-HIT (Fu et al, 2012)去除重复序列, 得到unigene序列。利用Trinity中的transcoder工具对unigene进行开放阅读框(open reading frame, ORF)预测, 得到序列中最佳的ORF区域, 使用pfam (<http://pfam.xfam.org/>)数据库对预测结果进行校正, 将比对结果保留到pfam数据库的蛋白序列中。

### 1.3 转录组数据完整性评估

使用转录组数据进行系统发育分析, 评估测序组装得到的转录序列是否覆盖所有可能的转录本是非常重要的。这直接关系到系统发育分析中数据的大小和完整性, 从而影响系统发育树的拓扑结构。我们选取由30个植物基因组筛选得到的1,440个普遍存在于植物中的单拷贝直系同源基因组成的数据集, 使用BUSCO v2 (Simão et al, 2015)软件评估福建观音座莲转录组数据的完整性。

### 1.4 直系同源基因筛选

从EnsemblPlants (<http://plants.ensembl.org/index.html>)数据库网站上下载得到莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)、小立碗藓(*Physcomitrella patens*)、江南卷柏(*Selaginella moellendorffii*)的基因组数据, 从congenie (<http://congenie.org/>)网站获得欧洲云杉(*Picea abies*)的基因组数据。对5个物种(莱茵衣藻、小立碗藓、江南卷柏、福建观音座莲和欧洲云杉)基因的蛋白序列使用OrthoMCL (Li et al, 2003)软件筛选同源基因( $E \text{ value} \leq 1e-10$ , inflation = 2.5), 运用Agalma (Dunn et al, 2013)系统发育基因组学分析流程筛选一对一直系同源基因。其大致流程如下: (1)对每个同源基因聚类组中的序列使用MUSCLE (Edgar, 2004)软件对齐; (2)使用GBlocks (Talavera & Castresana, 2007)软件筛选基因序列的保守区域; (3)使用RAxML (Stamatakis, 2014)软件对筛选得到的保守序列构建最大似然树, 自举检验100次; (4)使用DendroPy (Sukumaran & Holder, 2010)软件对单基因树进行修剪, 得到每个类群只保留一条序列的一对一直系同源基因矩阵。

### 1.5 系统发育与网状进化分析

系统发育分析分别使用串联和联合分析。串联矩阵的方法: (1)对每个筛选得到的直系同源基因使用MUSCLE软件比对, 形成序列矩阵; (2)对每个矩阵使用GBlock软件进行序列保守区域的筛选; (3)将筛选之后的保守序列矩阵串联成多基因超级矩阵(supermatrix); (4)使用RAxML软件进行最大似然法分析, 选择执行快速支持度分析并以Prottest 3 (Darriba et al, 2011)软件搜索的PROTCATJTT为最佳模型自举检验1,000次。联合基因树的方法: (1)对每个直系同源基因单独使用RAxML软件进行最大似然法分析, 自举检验100次; (2)将单基因树根据拓扑结构进行分类, 并统计不同拓扑结构的基因数量; (3)使用ASTRAL (Mirarab et al, 2014)软件将多个单基因树整合成超级物种树(supertree)。

对筛选得到的蛋白超级矩阵, 使用SplitsTree4软件(Huson & Bryant, 2006)推测5个类群的系统发育网络关系。

## 2 结果

### 2.1 转录组组装和ORF预测

采用Illumina HiSeq 2500高通量测序平台对福

建观音座莲进行转录组测序, 得到4.5 Gb原始数据 (raw data), 原始数据已上传至NCBI的SRA数据库 (SAMN03575909)。为了保证后续生物信息分析的准确性, 对原始数据进行过滤去杂, 获得了4.4 Gb有效数据(clean data)。对有效数据进行de novo拼接组装, 共得到63,262个转录本。去除冗余序列后得到57,637条单基因簇(unigene), N50为1,629 bp。从unigene中预测得到35,972条ORF, 占总unigene的62.41%。详细结果见附录1。

2.2 转录组数据完整性评估

使用植物直系同源基因数据集对福建观音座莲的转录组数据完整性进行评估, 在由30个植物基因组筛选得到的1,440个植物单拷贝直系同源基因中, 完全匹配到的单拷贝直系同源基因(complete)有956个, 占总BUSCO的66.4%; 部分片段匹配到的单拷贝直系同源基因(fragment)有85个, 占总BUSCO的5.9%; 没有匹配到的植物单拷贝直系同源基因(missing)有399个, 占总BUSCO的27.7% (表1)。

2.3 系统发育分析

我们筛选得到1,668个100%类群覆盖的一对一

单拷贝直系同源基因。首先, 使用串联矩阵的方法, 将每个单基因蛋白序列矩阵串联成多基因超级矩阵, 包含324,365个保守的氨基酸位点; 以莱茵衣藻为外类群, 使用最大似然法重建得到5个类群的系统发育关系为: (莱茵衣藻, (江南卷柏, (小立碗藓, (福建观音座莲, 欧洲云杉)))) (图1)。然后, 使用联合基因树的方法, 以莱茵衣藻为外类群, 使用最大似然法对每个单基因蛋白序列矩阵构建系统发育树, 得到1,668棵单基因树, 包括15种树形(图2)。对所有单基因树联合得到超级物种树为: (莱茵衣藻, (小立碗藓, (江南卷柏, (福建观音座莲, 欧洲云杉)))) (图1)。

2.4 网状进化

不同的基因可能存在不同的演化历史, 我们使用1,668个基因构建5个植物的系统发育网络, 结果发现存在9个分离支(split branch), 除了物种分离支外, 还存在4种网络分离支, 除了最短的分离支(图3箭头标示)支持率仅为21.6%外, 其他支都是100%的支持率(图3)。结果显示, 小立碗藓和莱茵衣藻亲缘关系更近一些, 而江南卷柏更远, 然而这种结果也不太稳定(最短分离支的支持率低, BS = 21.6%)。

表1 转录组和基因组组装完整性评估结果统计  
Table 1 The assessment results of assembly completeness of transcriptome and genome

物种 Species	分类 Classification	BUSCO评估结果 BUSCO results
福建观音座莲 <i>Angiopteris fokiensis</i>	真蕨类植物 Monilophytes	C: 66.4% [S: 43.2%, D: 23.2%], F: 5.9%, M: 27.7%, n: 1440
欧洲云杉 <i>Picea abies</i>	种子植物 Spermatophytes	C: 34.0% [S: 28.9%, D: 5.1%], F: 7.4%, M: 58.6%, n: 1,440
江南卷柏 <i>Selaginella moellendorffii</i>	石松类植物 Lycophytes	C: 63.2% [S: 10.0%, D: 53.2%], F: 4.7%, M: 32.1%, n: 1,440
小立碗藓 <i>Physcomitrella patens</i>	苔藓植物 Bryophytes	C: 70.1% [S: 46.0%, D: 24.1%], F: 2.6%, M: 27.3%, n: 1,440
莱茵衣藻 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	藻类植物 Thallophytes	C: 18.8% [S: 17.9%, D: 0.9%], F: 1.7%, M: 79.5%, n: 1,440

C: 完全匹配的BUSCOs; S: 完全匹配的单拷贝BUSCOs; D: 完全匹配的有副本的BUSCOs; F: BUSCOs部分片段; M: 缺失的BUSCOs; n: 总BUSCOs数目。  
C, Complete BUSCOs; S, Complete and single-copy BUSCOs; D, Complete and duplicated BUSCOs; F, Fragmented BUSCOs; M, Missing BUSCOs; n, Total BUSCO groups searched.

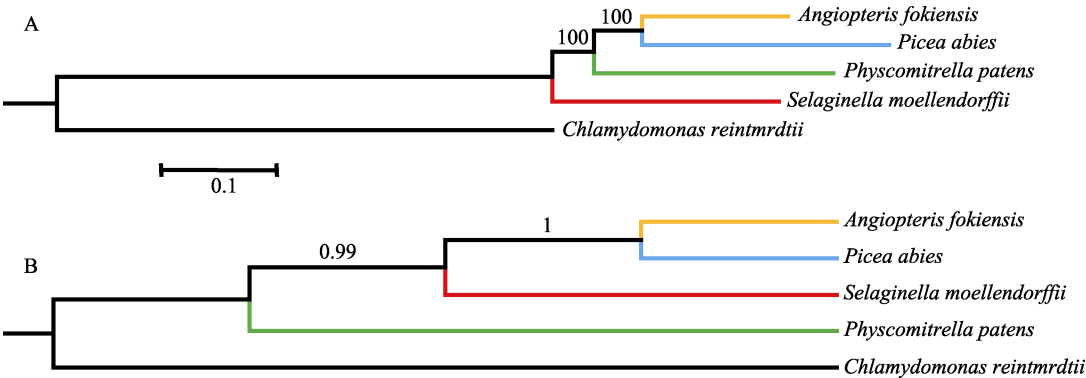


图1 基于串联和联合的方法分析得到的系统发育树。(A)使用串联矩阵构建的最大似然树;(B)使用联合基因树构建的物种树。  
Fig. 1 The phylogenetic trees based on concatenation and coalescence methods. (A) The maximum likelihood tree based on concatenation method; (B) The species tree based on coalescence method.



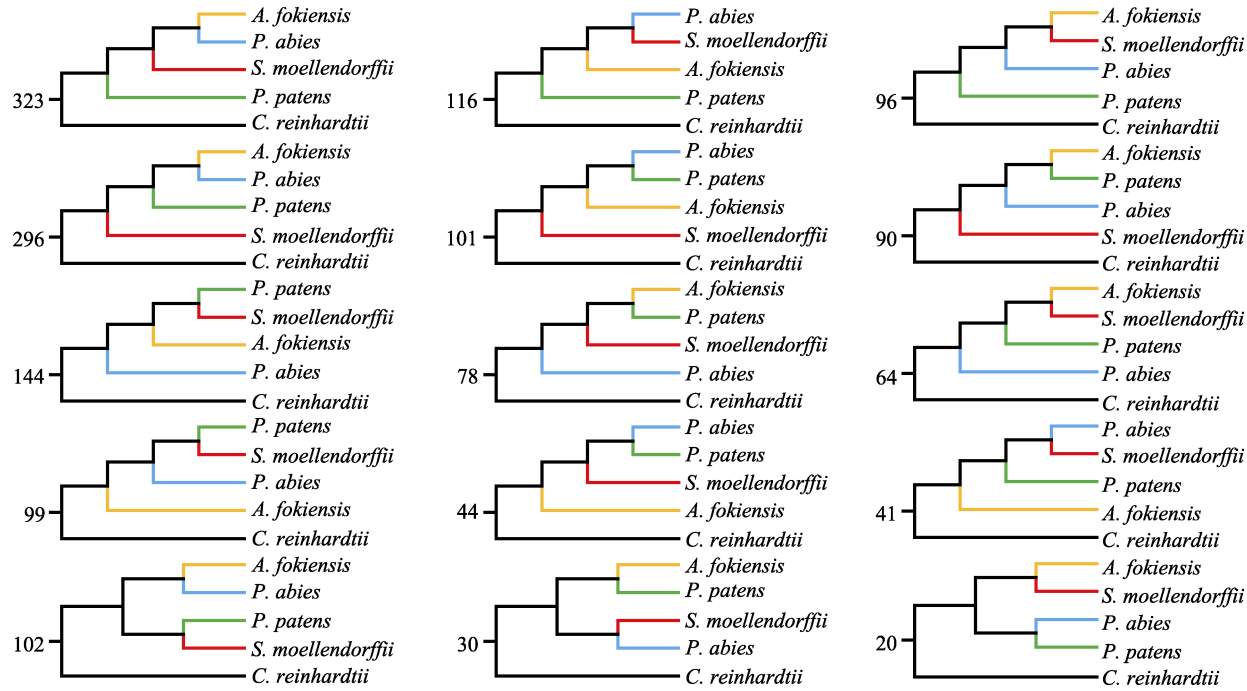


图2 使用最大似然法构建的15种拓扑结构的基因树。数字表示每种拓扑结构的数量。  
Fig. 2 Fifteen topological structure of gene trees based on maximum likelihood method. The numbers mean the amount of the topological structure.

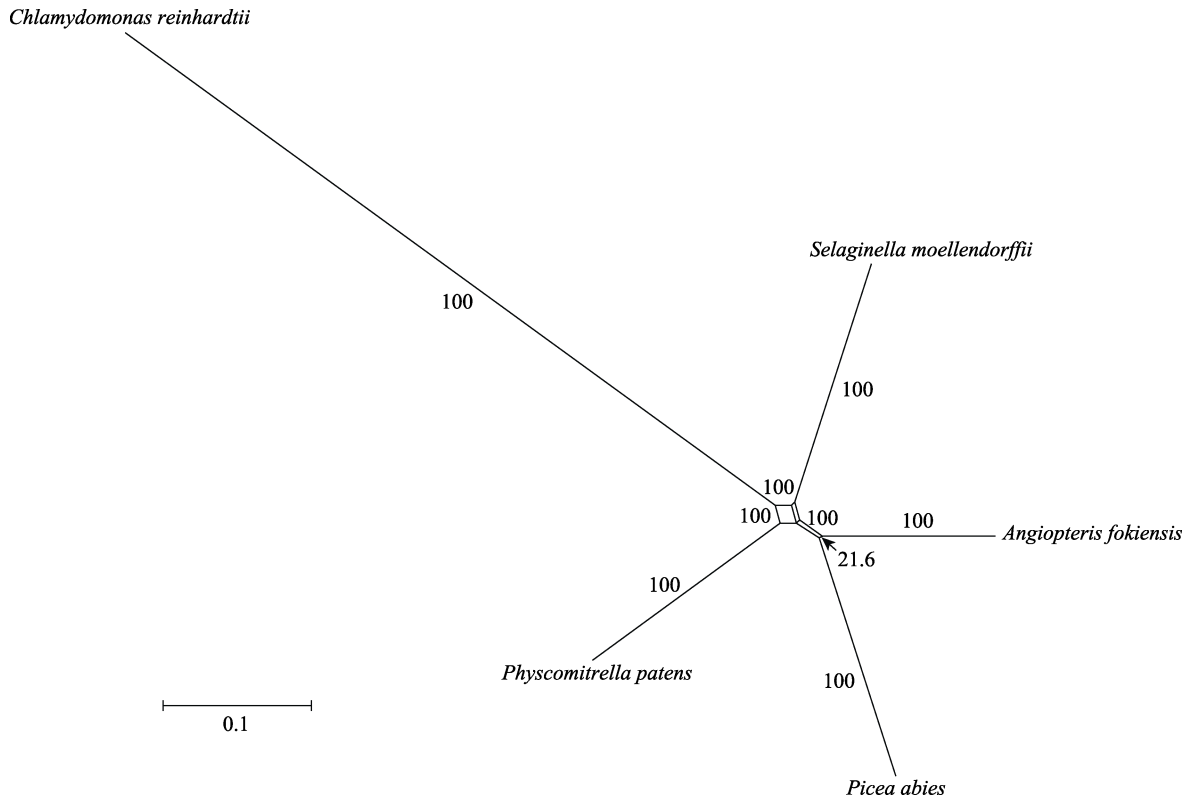


图3 基于1,668个基因构建的早期陆生植物的系统发育网络。数字表示每个分离支的支持率, 除了最短分离支(箭头)之外, 其他分离支的支持率都为100%; 平行的分离支为同一种分离支。  
Fig. 3 The phylogenetic network of early land plants based on 1,668 genes. The numbers mean the bootstrap support of each split branch. In addition to the shortest split branch (arrow), the bootstrap support of other split branches is 100%. The parallel split branches are the same type of split branch.

### 3 讨论

早在1859年达尔文在《物种起源》一书中就提出,地球上所有的生物都起源于一个共同祖先。并且其曾使用简单的系统树来表示地球上物种的演化过程。随着系统发育分析的发展,人们开始使用各种性状来构建地球上不同类群生物的演化历史,试图实现构建整个地球生命之树的伟大理想。随着分子生物学的迅猛发展,越来越多的分子数据得到积累,使得分子数据成为系统发育分析的主要性状。人们开始联合使用多个基因和DNA片段进行系统发育分析,然而随着研究的深入,不同的研究者使用不同的基因序列对同一类群进行系统发育分析所得到的系统演化树却互不相同。Cranston等(2009)在6个水稻物种中筛选得到307个直系同源基因,研究发现这些基因之间存在高度的不一致性,仅有8个基因树与串联分析的物种树一致(Cranston et al, 2009); Salichos和Rokas (2013)从23种酵母基因组中筛选得到1,070个直系同源基因,其中没有一种基因树与串联分析的物种树一致(Salichos & Rokas, 2013)。

本研究中,我们从5个物种的基因组和转录组中筛选得到1,668个一对一直系同源基因,将这些基因串联建成包含324,365个保守氨基酸位点的超级矩阵,运用最大似然法重建了植物的演化关系。结果和以往研究不同的是,石松类植物首先在藻类植物之后演化出来。随后,使用联合基因树的方法,首先用最大似然法构建1,668个单基因树,然后整合成为超级物种树。和串联矩阵的结果不同,苔藓植物首先在藻类植物之后演化出来。由此可见,即使是相同的数据,不同的分析策略所得到的系统发育树也是自相矛盾的。将构建得到的1,668个基因树进行分类,得到15种不同的拓扑结构,即这些基因可能存在15种不同的进化过程。进一步统计发现,支持串联矩阵方法的分析结果的基因有296个,少于支持联合基因树方法的分析结果的基因(323个)。由此可见,这1,668个基因数据本身就存在不确定性,这些经历不同进化过程的基因的信息含量没有明显的差异,这可能也造成了两种分析策略所得到的结果有所不同。

不同的基因分析得到不同的系统树,这种不一致性可能是由于基因进化历史重建过程分析错误

造成,更有可能是由于存在复杂的生物学过程引起(Woodhams et al, 2016)。这些进化事件在生物演化过程中时常发生,特别是杂交物种形成事件, Mallet (2005)估计平均大约25%的植物和10%的动物与另外至少一个物种发生了杂交。随着研究的深入,人们已经开始尝试在不完全谱系分选(Degnan & Rosenberg, 2009; Nakhleh, 2013; Mirarab et al, 2016)、杂交(Nakhleh, 2010; Woodhams et al, 2016)、基因水平转移(Szöllősi et al, 2012)等进化事件存在的情况下重建物种演化关系。更多的研究者认为在存在复杂的网状进化事件时,应该使用系统发育网络来重建物种演化过程中基因网络关系,从而理解基因树冲突的原因和物种演化关系(Sneath, 1975; Syvanen, 1985; Delwiche & Palmer, 1996; Griffiths & Marjoram, 1996; Rieseberg, 1997; Doolittle, 1999; Huson & Bryant, 2006; Huson & Scornavacca, 2011)。本研究中,我们的取样类群相对较少,因此1,668个基因只得到了15种不同的演化路线,这在一定程度上预示着早期陆生植物在进化过程中存在着非常复杂的网状演化关系。随后我们对这1,668个基因进行系统发育网络分析,发现早期陆生植物之间确实存在复杂的网状进化关系。仅仅在5个类群之间就出现9个分离支,除了最短的分离支(图3箭头标示,  $BS = 21.6\%$ )外,其他分离支都得到100%的统计学支持。虽然系统发育网络图中,物种间的分离支差异不大,但总体上仍能看出在藻类植物演化之后苔藓植物先分化出来。

### 参考文献

- Arnold CA (2013) *An Introduction to Paleobotany*. Read Books Ltd., New York.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 37–48.
- Bohlin K (1901) *Utkast till de gröna algernas och arkegoniaternas fylogeni*. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB, Uppsala.
- Bower FO (1935) Primitive land plants. *Science*, 81, 537–539.
- Bryant D, Moulton V (2004) Neighbor-net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Molecular Biology and Evolution*, 21, 255–265.
- Campbell D (1899) *Lectures on the Evolution of Plants*. Kessinger Publishing, London.
- Church AH (1919) *Thalassiphyta and the Subaerial Transmigration*. Oxford University Press, Oxford.

- Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9, 1657–1659.
- Cranston KA, Hurwitz B, Ware D, Stein L, Wing RA (2009) Species trees from highly incongruent gene trees in rice. *Systematic Biology*, 58, 489–500.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2011) ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*, 27, 1164–1165.
- Degnan JH, Rosenberg NA (2009) Gene tree discordance, phylogenetic inference and the multispecies coalescent. *Trends in Ecology & Evolution*, 24, 332–340.
- Delwiche CF, Palmer JD (1996) Rampant horizontal transfer and duplication of Rubisco genes in eubacteria and plastids. *Molecular Biology and Evolution*, 13, 873–882.
- Doolittle WF (1999) Phylogenetic classification and the universal tree. *Science*, 284, 2124–2128.
- Dunn CW, Hejnol A, Matus DQ, Pang K, Browne WE, Smith SA, Seaver E, Rouse GW, Obst M, Edgecombe GD (2008) Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature*, 452, 745–749.
- Dunn CW, Howison M, Zapata F (2013) Agalma: an automated phylogenomics workflow. *BMC Bioinformatics*, 14, 330.
- Eames AJ (1936) *Morphology of Vascular Plants*. McGraw-Hill Book Company, New York.
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32, 1792–1797.
- Fritsch F (1945) Studies in the comparative morphology of the algae. IV. Algae and archegoniate plants. *Annals of Botany*, 9, 1–29.
- Fritsch FE (1916) The algal ancestry of the higher plants. *New Phytologist*, 15, 233–249.
- Fu L, Niu B, Zhu Z, Wu S, Li W (2012) CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*, 28, 3150–3152.
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 29, 644–652.
- Griffiths RC, Marjoram P (1996) Ancestral inference from samples of DNA sequences with recombination. *Journal of Computational Biology*, 3, 479–502.
- Huson DH, Bryant D (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23, 254–267.
- Huson DH, Scornavacca C (2011) A survey of combinatorial methods for phylogenetic networks. *Genome Biology and Evolution*, 3, 23–35.
- Kenrick P, Crane PR (1997) The origin and early evolution of plants on land. *Nature*, 389, 33–39.
- Li CS (1994) Origin of land plants is an important event of life evolution. *Bulletin of National Natural Science Foundation of China*, (4), 8–14. (in Chinese with English abstract) [李承森 (1994) 生物进化的重大事件——陆地植物的起源及其研究的新进展. *中国科学基金*, (4), 8–14.]
- Li L, Stoeckert CJ, Roos DS (2003) OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Research*, 13, 2178–2189.
- Mallet J (2005) Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology & Evolution*, 20, 229–237.
- Mirarab S, Bayzid MS, Warnow T (2016) Evaluating summary methods for multilocus species tree estimation in the presence of incomplete lineage sorting. *Systematic Biology*, 65, 366–380.
- Mirarab S, Reaz R, Bayzid MS, Zimmermann T, Swenson MS, Warnow T (2014) ASTRAL: genome-scale coalescent-based species tree estimation. *Bioinformatics*, 30, 541–548.
- Misof B, Liu S, Meusemann K, Peters RS, Donath A, Mayer C, Frandsen PB, Ware J, Flouri T, Beutel RG (2014) Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science*, 346, 763–767.
- Nakhleh L (2010) Evolutionary phylogenetic networks: models and issues. In: *Problem Solving Handbook in Computational Biology and Bioinformatics* (eds Lenwood SH, Naren R), pp. 125–158. Springer, New York.
- Nakhleh L (2013) Computational approaches to species phylogeny inference and gene tree reconciliation. *Trends in Ecology & Evolution*, 28, 719–728.
- Regier JC, Shultz JW, Zwick A, Hussey A, Ball B, Wetzer R, Martin JW, Cunningham CW (2010) Arthropod relationships revealed by phylogenomic analysis of nuclear protein-coding sequences. *Nature*, 463, 1079–1083.
- Rieseberg LH (1997) Hybrid origins of plant species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 28, 359–389.
- Rubinstein CV, Gerrienne P, de la Puente G, Astini R, Steemans P (2010) Early Middle Ordovician evidence for land plants in Argentina (eastern Gondwana). *New Phytologist*, 188, 365–369.
- Salichos L, Rokas A (2013) Inferring ancient divergences requires genes with strong phylogenetic signals. *Nature*, 497, 327–331.
- Scott DH (1900) *Studies in Fossil Botany*. Adam & Charles Black, London.
- Simão FA, Waterhouse RM, Ioannidis P, Kriventseva EV, Zdobnov EM (2015) BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, 31, 3210–3212.
- Sneath PH (1975) Cladistic representation of reticulate evolution. *Systematic Zoology*, 24, 360–368.
- Stamatakis A (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30, 1312–1313.
- Steenmans P, Le Hérisse A, Melvin J, Miller MA, Paris F, Verniers J, Wellman CH (2009) Origin and radiation of the

- earliest vascular land plants. *Science*, 324, 353.
- Sukumaran J, Holder MT (2010) DendroPy: a Python library for phylogenetic computing. *Bioinformatics*, 26, 1569–1571.
- Syvanen M (1985) Cross-species gene transfer, implications for a new theory of evolution. *Journal of Theoretical Biology*, 112, 333–343.
- Szöllősi GJ, Boussau B, Abby SS, Tannier E, Daubin V (2012) Phylogenetic modeling of lateral gene transfer reconstructs the pattern and relative timing of speciations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 109, 17513–17518.
- Talavera G, Castresana J (2007) Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systematic Biology*, 56, 564–577.
- Tofigh A, Hallett M, Lagergren J (2011) Simultaneous identification of duplications and lateral gene transfers. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics (TCBB)*, 8, 517–535.
- Wellman CH, Osterloff PL, Mohiuddin U (2003) Fragments of the earliest land plants. *Nature*, 425, 282–285.
- Wickett NJ, Mirarab S, Nguyen N, Warnow T, Carpenter E, Matasci N, Ayyampalayam S, Barker MS, Burleigh JG, Gitzendanner MA (2014) Phylotranscriptomic analysis of the origin and early diversification of land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 111, 4859–4868.
- Woodhams MD, Lockhart PJ, Holland BR (2016) Simulating and summarizing sources of gene tree incongruence. *Genome Biology and Evolution*, 8, 1299–1315.
- Zimmermann W (1938) Phylogenie. In: *Manual of Pteridology* (ed. Frans V), pp. 558–618. Springer, New York.
- Zou XH, Ge S (2008) Conflicting gene trees and phylogenomics. *Journal of Systematics and Evolution*, 46, 795–807. (in Chinese with English abstract) [邹新慧, 葛颂 (2008) 基因树冲突与系统发育基因组学研究. *植物分类学报*, 46, 795–807.]
- (责任编辑: 王艇 责任编辑: 时意专)

## 附录 Supplementary Material

### 附录1 福建观音座莲转录组测序和组装结果统计

Appendix 1 The results of transcriptome sequence and assemble of *Angiopteris fokiensis*  
<http://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2017042-1.pdf>

舒江平, 刘莉, 沈慧, 戴锡玲, 王全喜, 严岳鸿. 基于系统基因组学分析揭示早期陆生植物的复杂网状进化关系. 生物多样性, 2017, 25 (6): 675–682.  
<http://www.biodiversity-science.net/CN/10.17520/biods.2017042>

附录1 福建观音座莲转录组测序和组装结果统计  
Appendix 1 The results of transcriptome sequence and assemble of *Angiopteris fokiensis*

原始数据 Rawdata (G)	4.5	Q30 值 Q30 (%)	91.85
有效数据 Cleandata (G)	4.4	单基因簇数量 Number of unigenes	57,637
总碱基含量 Total bases (bp)	3,415,761,579	N50 值 N50 (bp)	1,629
Q20 值 Q20 (%)	96.1	GC 含量 GC content	0.45

•保护论坛•

# 自然杂交与生物多样性保护

商 辉 严岳鸿\*

(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)

**摘要:** 物种之间的杂交事件在自然界中时常发生, 虽然大部分自然杂交会成为进化的盲端而被淘汰, 但仍有一部分自然杂交在物种形成过程中起到很重要的作用。随着对自然杂交认识的深入, 人们对其是否具有保护价值存在着较大的争议。本文从遗传多样性、物种多样性和生态系统多样性三个方面综述了自然杂交在物种进化和生态系统中的作用, 认为并不是所有杂交都存在着物种逆转的危险, 一些杂交事件可以增加生物多样性, 提高物种的环境适应性。同时, 我们结合近年来自然杂交的研究案例, 提出自然杂交的保护原则: 对父母本没有威胁, 同时有助于提高生物多样性和环境适应性的自然杂交应该予以保护。希望该建议为国家制定物种保护法律法规和编制红色名录提供参考。

**关键词:** 自然杂交; 生物多样性; 保护生物学; 红色名录

## Natural hybridization and biodiversity conservation

Hui Shang, Yuehong Yan\*

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

**Abstract:** Hybridization occurs commonly in nature. Due to decreasing fitness, a large number of hybridized offspring might be eliminated in natural conditions, but many hybridization/introgression events can be important drivers of speciation. With advances in modern molecular genotyping methods, the mechanisms of hybridization and their impacts on speciation are becoming better understood. However, for taxa with hybridized origins, the question of whether the germplasm needs to be conserved presents many viewpoints. Here, we comprehensively review the conservation value of hybrids over three aspects (including genetic diversity, species diversity, and ecosystem diversity) to pronounce the significant roles in evolution and ecology. A large number of cases indicate that not all hybridization will lead to genetic assimilation by hybridization swamping. It can also boost genetic diversity and increase fitness and adaptability. Based on recent research on natural hybridization, we propose a principle for conservation of hybridized originated taxa if the existing hybridized taxon does not threaten the parental species, and its unique germplasm can contribute to genetic and adaptive capacity. In such a situation, the conservation of hybridized taxa should be taken into consideration. We hope this proposal could supplement a reference to reinforce conservation policy and species red listing.

**Key words:** natural hybridization; biodiversity; conservation biology; species red list

自然杂交指的是已发生遗传分化的种群之间的交配(Arnold, 1992; Allendorf et al, 2001), 一般更容易发生在亲缘关系较近的类群间。然而, 蕨类植物的一个案例表明, 分化六千万年的物种之间也可以发生杂交(Rothfels et al, 2015)。大部分自然杂交

后代(hybrid)由于生殖隔离造成的不育而被淘汰, 或存在于杂交带中成为亲本间基因流的桥梁; 但仍有一部分杂交后代通过各种机制得以留存而形成自然杂交种(hybrid species), 如同倍杂交后代由于适应新的环境与父母本产生生殖隔离, 或通过异源

收稿日期: 2017-04-16; 接受日期: 2017-06-10

基金项目: 国家自然科学基金(31370234)和上海市绿化和市容管理局科技攻关项目(G152419 和 G162401)

\* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: yan.yh@126.com

染色体加倍的方式直接和父母本产生生殖隔离(生物物种概念)(Mallet, 2007); 而一些奇数倍染色体的杂交后代通过无性繁殖得以延续, 由于其形态的可辨识性, 也可能被命名为杂交种(形态种)。

自然杂交包括杂交过程和杂交产物(未成种的杂交后代和自然杂交种), 它们是否需要保护一直备受争议。传统观点认为杂交会对纯种的父母本造成威胁, 特别是在均质化环境中过度的杂交渐渗会造成两物种融合, 即发生物种逆转(reverse speciation), 从而导致物种多样性的丢失(Seehausen, 2006; Grant & Grant, 2014), 所以主张杂交有害不予保护(Hill, 1993; Vilà et al, 2000), 应采取积极措施防范其威胁(Bohling, 2016), 甚至应通过分子标记准确地鉴别后人为清除(Wyk et al, 2017); 而没有形成自然杂交种的个别杂交后代则迟早被自然所淘汰, 更无须作为保护对象。另外, 一些隐性杂交种往往难以通过形态鉴定, 或者无法确定其起源, 因此容易被忽视(Wang et al, 2015a)。

随着自然杂交研究的增多, 人们越来越认识到物种杂交是自然界的普遍现象, 而且是植物物种形成的主要驱动力。杂交有害的情况更多地发生在同倍体杂交中, 而多倍化杂交物种往往比其亲本更利于生态位建成和适应性增强。由此带来的混合基因库具备更高的遗传多样性和快速适应新环境的潜力, 对生物多样性的保持具有一定的积极作用。所以, 对其保护价值的讨论具有重要意义(Anderson & Stebbins Jr, 1954; Nolte & Tautz, 2010; Pielt et al, 2015; Kasari et al, 2016)。

Jackiw等(2015)对北美的物种保护条例进行了研究, 发现虽然人们已经开始关注到自然杂交的保护, 但是条例中涉及的条款很少, 并且往往语焉不详, 执行情况也不理想。世界自然保护联盟(IUCN)的物种红色名录里, 甚至明确说明要把自然杂交种剔除, 完全忽略其价值(IUCN, 2013, 2014)。为此, Jackiw等(2015)针对北美的情况制定了一个评估杂交是否值得保护的原则框架, 他建议保育工作者在制定法规和具体的保护工作中, 系统地考虑杂交的成因、对父母本的威胁程度, 以及对生态环境的影响等。这些评估原则对中国的保护工作也有很好的借鉴意义。

在中国, 自然杂交的保护问题还没有引起人们的足够关注, 1996年颁布的《野生植物保护条例》

和2016年颁布的《野生动物保护法》都没有明确提及自然杂交种是否需要保护的问题。但在已有的保护名录里实际上已经包括了自然杂交种, 例如《国家重点保护野生植物名录》(1999)中的国家二级保护植物半枫荷(*Semiliquidambar cathayensis*)是杂交起源(吴伟, 2009; Wu et al, 2010)。相信随着保护研究的进展, 类似的例子以及相关的讨论会越来越多, 而这也是保护生物学无法回避的问题。

本文结合近些年有关自然杂交保护生物学的研究进展, 特别是Jackiw等(2015)提出的自然杂交保护的策略框架, 拟探讨: (1)保护自然杂交的意义; (2)结合中国现在的自然杂交保护现状, 我们应该如何保护自然杂交?

## 1 自然杂交的保护价值

人们对自然杂交的顾虑往往在于其可能对父母本以及生态系统产生潜在威胁。但很多情况下, 自然杂交带来的影响并不都是有害的, 需要结合实际情况来进行科学的判断。保护生物学最主要的目的就是保护生物多样性, 而自然杂交是否值得保护也要从多样性的角度去考虑。

### 1.1 遗传多样性

不完全生殖隔离导致的杂交渐渗现象中, 物种间的基因流对物种演化和生态适应起到非常重要的作用。由于父母本双方基因库的混合而产生新的等位基因组合, 杂交带往往比父母本种群具有更高的遗传多样性以及适应性(Yakimowski & Rieseberg, 2014)。当渗透的等位基因受到选择时, 适度的渗透可以使物种快速获得适应性。这种基因交流可以给父母本物种提供一个快速适应新环境、提高适合度的机会。从这个角度来说, 适度的自然杂交显然是有利的。只有当渗透过度时, 才可能造成生殖隔离的突破而造成物种逆转。

另外, 当父母本有一方或双方由于其自身适合度低下而濒临灭绝时, 杂交种可能会因杂种优势具有较高适合度, 成为保存其遗传多样性的有效方式。例如Hori等(2014)利用核基因研究日本的变异鳞毛蕨(*Dryopteris varia*)复合群网状进化时, 发现了一个不属于任何现存物种的单倍型, 推测其来源于一个已灭绝的物种。

### 1.2 物种多样性

自然杂交不仅可以增加遗传多样性和物种的



适应性, 而且可以导致物种的辐射式演化, 促进大量物种在相对较短的时期内形成(Seehausen, 2004)。

首先, 大量现存物种是通过自然杂交起源的, 或者处于自然杂交物种形成的演化途中(Abbott et al, 2013), 网状进化是一种重要的物种演化模式。一方面, 杂交后代可以通过染色体加倍形成异源多倍化物种(Soltis et al, 2014); 另一方面, 由于同倍性的杂交后代与父母本间的生殖隔离不如异倍杂交那样容易产生, 所以同倍性杂交物种比较少见, 但仍然是不可忽视的物种形成方式之一。例如, 生长在粘性土壤中的向日葵(*Helianthus annuus*)和其生长在砂质土壤中的近亲植物草原太阳花(*H. petiolaris*), 产生了3种适应不同环境的自然杂交种(*H. anomalus*、*H. deserticola*和*H. paradoxus*) (Rieseberg, 1991)。

其次, 在同域物种形成的过程中, 当新物种和旧物种的生殖隔离尚未完全建立时, 杂交渗透所形成的物种间基因流可能会导致适应不同生态位的基因被选择作用固定在不同的物种中, 促进物种的分化(Coyne & Orr, 2004; Rolán-Alvarez, 2007)。

总之, 自然杂交是自然物种进化历程中非常重要的组成部分, 其价值理应受到重视。

### 1.3 生态系统多样性

一般认为, 生态系统组成的多样性与稳定性存在某种程度的相关性, 虽然May (1976)从数学上论证了多样性有时会导致稳定性下降的可能性, 但在多数情况下, 通过增加生态系统内的多样性, 可促进系统的稳定性。自然杂交在生态系统中的存在, 则可能通过影响遗传多样性和物种多样性进而影响生态系统的稳定性和可恢复性。

杂交可增加物种对植食作用、病原体和寄生虫压力的抗性(Vilà et al, 2000), 在应对气候剧变、虫害爆发、病原菌等环境压力时, 可能会表现更出色(Fitzpatrick & Shaffer, 2007)。实验表明, 杂交的酵母属(*Saccharomyce*)种群在逆境下表现得比其父母本更加出色, 当环境剧变时, 通过基因交换, 可以使物种快速获得适应新环境的能力而得以存活(Stelkens et al, 2014)。如果自然杂交后代适应了极端环境或新的栖息地, 可能会增加生态系统对环境压力的恢复能力(Gross & Rieseberg, 2005)。此外, 杂交可能改变现有的群落结构, 整合分析表明, 植物杂交带使栖息环境更多样化, 促进了昆虫和真菌,

甚至鸟类的物种多样性(Whitham et al, 1999)。总之, 自然杂交对维持生态系统的稳定性起到很重要的作用。

## 2 自然杂交的保护原则

保护生物学家在自然杂交的保护领域已经开始了理论探讨和实践尝试。除Jackiw等(2015)的工作以外, Richards和Hobbs (2015)针对珊瑚礁群落中的杂交保护问题进行了讨论, 首先综述了珊瑚虫以及岩礁鱼类杂交研究进展, 并据此评估了杂交对珊瑚礁群落多样性的影响。分析结果表明, 杂交可以造成多种进化生物学后果, 既有可能是增加遗传多样性, 产生新的类群, 也有可能造成物种逆转。由于对自然杂交保护立法的忽视, 可能使得有价值的自然杂交没有得到有效的保护而导致其灭绝。针对这种情况, 他们提出, 应逐个案例(case-by-case)评估杂交的原因和后果, 有针对性地决定是保护还是清除杂交。

综合这些意见, 对自然杂交的成因以及后果分别进行科学评估是采取适宜保护措施的前提。由于自然杂交对其父母本物种、物种多样性乃至生态系统具有重要意义, 因此在制定野生动植物保护法律法规以及编写红色名录的时候就要根据具体的情况进行科学的评估。

有鉴于此, 我们参考国际同行的观点, 并考虑到中国自然杂交保护的现状, 提出有关中国自然杂交的保护原则(图1)。首先应对自然杂交保护的对象

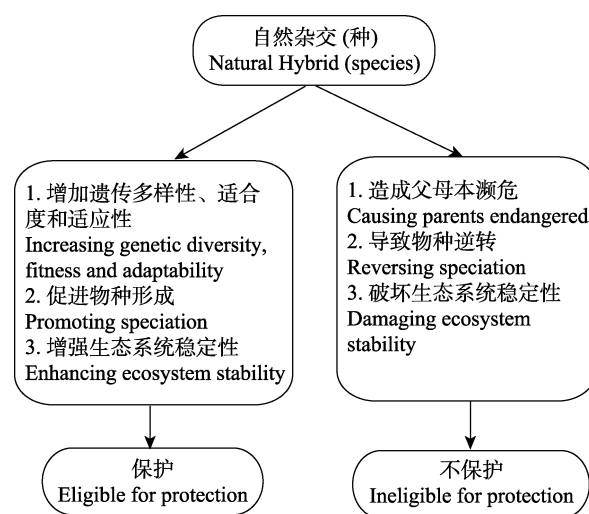


图1 自然杂交种的保护原则

Fig. 1 Principle for the conservation of natural hybridization

进行明确的规定: (1)该自然杂交后代已独立成种并能在自然环境中独立建立自我繁殖体系(具有稳定基因交流的自然杂交带除外); (2)该自然杂交后代或自然杂交种受到了生存威胁或在IUCN等级评估标准中处于受威胁状态, 或者对维持或保存父母本遗传多样性、对群落物种多样性、生态系统稳定性以及对人类社会具有显著的意义。涉及濒危的自然杂交种可以考虑列入物种红色名录; 涉及生态保护价值或社会经济价值、科学研究价值的则列入相应类型的保护名录。据此, 将关于自然杂交的保护策略归纳为以下4个方面:

(1)自然杂交指的是近期或者历史上自然发生的没有受到人为因素干扰的物种杂交事件, 包括自然杂交种、基因渐渗和杂交带等。这里需要指出的是, 用于可操作的自然保护的自然杂交对象一般是指具有相对稳定的遗传特征的杂交事件, 可以是能够自我繁殖的自然杂交种, 如孟连铁线蕨(*Adiantum menglianense*)与假鞭叶铁线蕨(*A. malesianum*)和苍山铁线蕨(*A. sinense*)分别产生的自然杂交后代: 梅山铁线蕨(*A. meishanianum*)和哀牢山铁线蕨(*A. ailaoshanense*), 均可以通过无性繁殖在自然界自我维系自然种群(Wang et al, 2015b; Shang et al, 2016); 也可以是由于杂交渐渗在自然杂交带中产生的杂交群体, 如分布于丽江玉龙雪山的橘红灯台报春(*Primula bulleyana*)和霞红灯台报春(*P. beesiana*)可以在其分布重叠区内高频率发生自然杂交并形成杂交后代。虽然其杂交后代不育, 但杂交后代通过回交可能对亲本的遗传多样性产生重要的影响(Hayashi et al, 2009)。因此可以视其濒危程度及其亲本的生存状况等因素, 酌情考虑保护措施。但是, 对自然界中偶尔产生的一些自然杂交后代, 由于遗传上的不稳定性 and 发生频率的随机性, 一般不需要列入保护对象, 如粤紫萁(*Osmunda mildei*)是华南紫萁(*O. vachellii*)和紫萁(*O. japonica*)的自然杂交后代(Tsutsumi et al, 2012), 其杂交后代不具可育性, 无法在野外独立建立种群, 而是仅在亲本的重叠分布区产生极少量的随机个体, 因此也很难对该自然杂交个体进行有效的保护。

(2)当父母本一方或双方濒危, 但杂交后代或杂交种没有威胁到其父母本时, 自然杂交应该被保护。日本西部特有分布的稀子蕨属植物*Monachosorum arakii*是亚洲大陆分布的稀子蕨(*M. henryi*)

和日本分布的日本稀子蕨(*M. nipponicum*)的自然杂交产物, 该杂交种可以通过无性繁殖芽孢自行在野外建立种群。由于稀子蕨现仅分布于中国大陆以及热带亚洲地区, 在日本已经灭绝, 稀子蕨和日本稀子蕨的杂交可能是过去地质时代的孑遗产物(Ebihara et al, 2016)。在此, 由于杂交没有威胁到父母本的生存, 自然杂交种*Monachosorum arakii*在日本的分布具有重要科学研究价值并可维系已灭绝的亲本遗传信息, 因此该自然杂交种应该受到必要的保护。

(3)当父母本双方都不濒危, 并且杂交后代或杂交种没有威胁到其父母本时, 自然杂交应该被保护。高山松(*Pinus densata*)是油松(*P. tabulaeformis*)和云南松(*P. yunnanensis*)的自然杂交种(Wang et al, 2001), 是乔木物种二倍体自然杂交同倍体成种的范例, 广泛分布于云南、四川、西藏、青海等地, 生长于海拔1,500–4,500 m的地区。但其父母本均不濒危, 且高山松没有威胁到父母本的生存; 由于高山松具有较大的社会经济价值, 因此可以列入林业系统的珍稀林木保护名录; 然而, 由于高山松分布广泛, 其野外种群没有受到明显的威胁, 目前尚不需要将该种列入物种红色名录。

(4)无论父母本双方濒危或不濒危, 当杂交后代威胁到其父母本时, 自然杂交是否被保护就需要视具体情况确定。如果杂交后代或杂交种比其父母本具有更高的适合度、具有更好的环境可塑性、有助于群落结构稳定、增加遗传多样性或促进成种进程(hybrid speciation)而不是导致物种逆转时, 应考虑予以保护。如迷人杜鹃(*Rhododendron agastum*)和露珠杜鹃(*R. irroratum*)均为马缨花(*R. delavayi*)和大白花杜鹃(*R. decorum*)的自然杂交种, 且两个自然杂交种的分布区和马缨花的分布区一样广泛。大白花杜鹃分布在低海拔地区, 马缨花的分布区则高中低海拔均有分布, 而自然杂交种迷人杜鹃和露珠杜鹃分布在高海拔地区, 核基因序列分析显示杂交后代与亲本之间具有广泛的基因交流和回交历史(张敬丽, 2007), 但杂交后代对父母本的生存没有明显的威胁。鉴于全球变化对高山植物的威胁、近年来中国高山生态环境的破坏, 以及该种重要的观赏价值, 该自然杂交种应该得到保护。相反, 在本专辑中另一篇论文(周杰秋等, 2017)中, 枝毛野牡丹(*Melastoma dendrisetosum*)和毛蕊(*M. sanguineum*)

的自然杂交后代同样出现了威胁亲本之一海南特有濒危物种枝毛野牡丹生存的问题, 对这样的自然杂交种则不应该保护。厄瓜多尔的科隆群岛中弗雷里安纳岛上原本分布着大树雀(*Camarhynchus psittacula*)、中树雀(*C. pauper*)和小树雀(*C. parvulus*) 3种树雀。由于种间杂交, 大树雀已经在该岛消失, 剩余2个种也面临着融合的危险(Kleindorfer et al, 2014)。同样的情况已经发生在加拿大温哥华岛恩诺斯湖, 一个三刺鱼复合群(*Gasterosteus aculeatus* complex)的种对原本包含了区别显著的2个物种, 但经过几十年的杂交渗透(1977–2002年), 两个物种迅速混合为一个杂种群(hybrid swarm) (Gow et al, 2006; Taylor et al, 2006)。对这类由于杂交渗透造成的物种逆转的情况, 也不应予以保护。

### 3 结语

评估自然杂交的保护价值需要综合考虑各方面的因素, 不能一概而论。保护生物学的目的并不是保护物种纯正的血统, 而是应该更多地从生物多样性和生物多样化过程的角度去考虑问题并评估保护价值。我们提出的保护策略可以为实际物种保护工作以及相关法律法规的制定提供参考, 而中国现行野生植物保护政策中, 将部分类群如水韭属(*Isoetes*)、桫欏科、红豆杉属(*Taxus*)、兰科等作为一个整体加以保护, 对保护该类群的自然杂交无疑具有积极意义。然而, 目前需要更多的关于自然杂交的科学研究以及更广泛的科普宣传, 使人们进一步了解自然杂交在生物进化历程以及生态系统中的重要作用。

**致谢:** 感谢马永鹏研究员、邓敏研究员、金冬梅博士、刘子玥、刘逸在本文写作过程中给予的帮助和建议; 感谢审稿专家提出的修改意见, 极大地提升了本文的专业性和逻辑的严谨性。

### 参考文献

- Abbott R, Albach D, Ansell S, Arntzen JW, Baird SJ, Bierne N, Boughman J, Brelsford A, Buerkle CA, Buggs R (2013) Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, 26, 229–246.
- Allendorf FW, Leary RF, Spruell P, Wenburg JK (2001) The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology & Evolution*, 16, 613–622.
- Anderson E, Stebbins G Jr (1954) Hybridization as an evolutionary stimulus. *Evolution*, 378–388.
- Arnold ML (1992) Natural hybridization as an evolutionary process. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 23, 237–261.
- Bohling JH (2016) Strategies to address the conservation threats posed by hybridization and genetic introgression. *Biological Conservation*, 203, 321–327.
- Coyne JA, Orr HA (2004) Speciation. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA.
- Ebihara A, Nakato N, Amoroso VB, Hidayat A, Kuo LY (2016) *Monachosorum arakii* Tagawa (Dennstaedtiaceae) is a relict “international” hybrid: a reassessment of the *Monachosorum* species. *Systematic Botany*, 41, 586–595.
- Fitzpatrick BM, Shaffer HB (2007) Hybrid vigor between native and introduced salamanders raises new challenges for conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 104, 15793–15798.
- Gow JL, Peichel CL, Taylor EB (2006) Contrasting hybridization rates between sympatric three-spined sticklebacks highlight the fragility of reproductive barriers between evolutionarily young species. *Molecular Ecology*, 15, 739–752.
- Grant PR, Grant BR (2014) Evolutionary biology: speciation undone. *Nature*, 507, 178–179.
- Gross B, Rieseberg L (2005) The ecological genetics of homoploid hybrid speciation. *Journal of Heredity*, 96, 241–252.
- Hayashi M, Kato J, Ohashi H, Mii M (2009) Unreduced 3x gamete formation of allotriploid hybrid derived from the cross of *Primula denticulata* (4x) × *P. rosea* (2x) as a causal factor for producing pentaploid hybrids in the backcross with pollen of tetraploid *P. denticulata*. *Euphytica*, 169, 123.
- Hill KD (1993) The endangered species act: what do we mean by species. *Boston College Environmental Affairs Law Review*, 20, 239.
- Hori K, Tono A, Fujimoto K, Kato J, Ebihara A, Watano Y, Murakami N (2014) Reticulate evolution in the apogamous *Dryopteris varia* complex (Dryopteridaceae, subg. *Erythrovariae*, sect. *Variae*) and its related sexual species in Japan. *Journal of Plant Research*, 127, 661–684.
- IUCN (2013) The IUCN Red List of Threatened Species. IUCN, Gland, Switzerland.
- IUCN (2014) Guidelines for Using the IUCN Red List Categories and Criteria, Version 11. IUCN, Gland, Switzerland.
- Jackiw RN, Mandil G, Hager HA (2015) A framework to guide the conservation of species hybrids based on ethical and ecological considerations. *Conservation Biology*, 29, 1040–1051.
- Kasari L, Saar L, de Bello F, Takkis K, Helm A (2016) Hybrid ecosystems can contribute to local biodiversity conservation. *Biodiversity and Conservation*, 25, 3023–3041.
- Kleindorfer S, O'Connor JA, Dudaniec RY, Myers SA, Rob-

- ertson J, Sulloway FJ (2014) Species collapse via hybridization in Darwin's tree finches. *The American Naturalist*, 183, 325–341.
- Mallet J (2007) Hybrid speciation. *Nature*, 446, 279.
- May R (1976) *Theoretical Ecology*. Saunders, Philadelphia.
- Nolte AW, Tautz D (2010) Understanding the onset of hybrid speciation. *Trends in Genetics*, 26, 54–58.
- Piatt S, Hager HA, Gerrard C (2015) Characteristics for evaluating the conservation value of species hybrids. *Biodiversity and Conservation*, 24, 1931–1955.
- Richards ZT, Hobbs JPA (2015) Hybridisation on coral reefs and the conservation of evolutionary novelty. *Current Zoology*, 61, 132–145.
- Rieseberg LH (1991) Homoploid reticulate evolution in *Helianthus* (Asteraceae): evidence from ribosomal genes. *American Journal of Botany*, 1218–1237.
- Rolán-Alvarez E (2007) Sympatric speciation as a by-product of ecological adaptation in the Galician *Littorina saxatilis* hybrid zone. *Journal of Molluscan Studies*, 73, 1–10.
- Rothfels CJ, Johnson AK, Hovenkamp PH, Swofford DL, Roskam HC, Fraser-Jenkins CR, Windham MD, Pryer KM (2015) Natural hybridization between genera that diverged from each other approximately 60 million years ago. *The American Naturalist*, 185, 433–442.
- Seehausen O (2004) Hybridization and adaptive radiation. *Trends in Ecology & Evolution*, 19, 198–207.
- Seehausen O (2006) Conservation: losing biodiversity by reverse speciation. *Current Biology*, 16, R334–R337.
- Shang H, Wang Y, Zhu XF, Zhao GH, Wang FH, Lu JM, Yan YH (2016) Likely allopatric origins of *Adiantum* × *meishanianum* (Pteridaceae) through multiple hybridizations. *Journal of Systematics and Evolution*, 54, 528–534.
- Soltis DE, Visger CJ, Soltis PS (2014) The polyploidy revolution then and now: Stebbins revisited. *American Journal of Botany*, 101, 1057–1078.
- Stelkens RB, Brockhurst MA, Hurst GD, Greig D (2014) Hybridization facilitates evolutionary rescue. *Evolutionary Applications*, 7, 1209–1217.
- Taylor E, Boughman J, Groenenboom M, Sniatynski M, Schluter D, Gow J (2006) Speciation in reverse: morphological and genetic evidence of the collapse of a three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) species pair. *Molecular Ecology*, 15, 343–355.
- Tsutsumi C, Hirayama Y, Kato M, Yatabe-Kakugawa Y, Zhang S (2012) Molecular evidence on the origin of *Osmunda* × *mildei* (Osmundaceae). *American Fern Journal*, 102, 55–68.
- Vilà M, Weber E, Antonio CM (2000) Conservation implications of invasion by plant hybridization. *Biological Invasions*, 2, 207–217.
- Wang XR, Szmidt AE, Savolainen O (2001) Genetic composition and diploid hybrid speciation of a high mountain pine, *Pinus densata*, native to the Tibetan Plateau. *Genetics*, 159, 337–346.
- Wang Y, Shang H, Gu YF, Wei HJ, Zhao GH, Dai XL, Yan YH (2015a) A new cryptic hybrid species of *Adiantum* L. (Pteridaceae) identified by nuclear and chloroplast DNA sequences. *Chinese Science Bulletin*, 60, 922–932.
- Wang Y, Shang H, Zhou XL, Zhao GH, Dai XL, Yan YH (2015b) *Adiantum* × *ailaoshanense* (Pteridaceae), a new natural hybrid from Yunnan, China. *Phytotaxa*, 236, 266–272.
- Whitham TG, Martinsen GD, Keim P, Floate KD, Dungey HS, Potts BM (1999) Plant hybrid zones affect biodiversity: tools for a genetic-based understanding of community structure. *Ecology*, 80, 416–428.
- Wu W (2009) Natural Hybridization, Phylogeography and Speciation Patterns of Altingiaceae. PhD dissertation, Sun Yat-sen University, Guangzhou. (in Chinese with English abstract) [吴伟 (2009) 阿丁枫科的自然杂交、亲缘地理学与物种形成模式. 中山大学博士学位论文, 广州.]
- Wu W, Zhou R, Huang Y, Boufford DE, Shi S (2010) Molecular evidence for natural intergeneric hybridization between *Liquidambar* and *Altingia*. *Journal of Plant Research*, 123, 231–239.
- Wyk AM, Dalton DL, Hoban S, Bruford MW, Russo IRM, Birss C, Grobler P, Vuuren BJ, Kotzé A (2017) Quantitative evaluation of hybridization and the impact on biodiversity conservation. *Ecology and Evolution*, 7, 320–330.
- Yakimowski SB, Rieseberg LH (2014) The role of homoploid hybridization in evolution: a century of studies synthesizing genetics and ecology. *American Journal of Botany*, 101, 1247–1258.
- Zhang JL (2007) Natural Hybridization Origin of *Rhododendron agastum* (Ericaceae) in Yunnan, China. PhD dissertation, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming. (in Chinese with English abstract) [张敬丽 (2007) 杜鹃花属迷人杜鹃的自然杂交起源研究. 中国科学院昆明植物研究所博士学位论文, 昆明.]
- Zhou QJ, Cai YC, Ng WL, Wu W, Dai SP, Wang F, Zhou RC (2017) Molecular evidence for natural hybridization between two *Melastoma* species endemic to Hainan and their widespread congeners. *Biodiversity Science*, 25, 638–646. (in Chinese with English abstract) [周秋杰, 蔡亚城, 黄伟伦, 吴伟, 代色平, 王峰, 周仁超 (2017) 野牡丹属两个海南特有种与同属广布种自然杂交的分子证据. 生物多样性, 25, 638–646.]

(责任编辑: 卢宝荣 责任编辑: 时意专)