

•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¹ 蔡亚城¹ 黄伟伦¹ 吴 伟¹ 代色平² 王 峰³ 周仁超^{1*}¹ (中山大学生命科学学院, 广州 510275)² (广州市林业和园林科学研究院, 广州 510520)³ (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 Zhou¹, Yacheng Cai¹, Wei Lun Ng¹, Wei Wu¹, Seping Dai², Feng Wang³, Renchao Zhou^{1*}¹ School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275² Guangzhou Institute of Forestry and Landscape Architecture, Guangzhou 510520³ 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

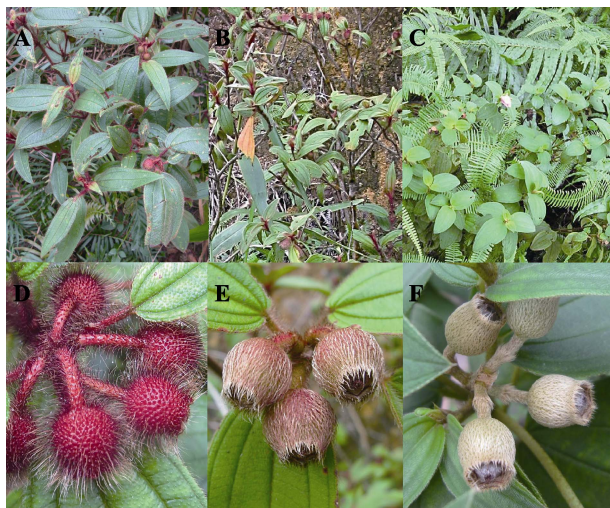


图1 紫毛野牡丹、野牡丹及其嫌疑杂种的部分形态学特征。A: 紫毛野牡丹; B: 紫毛野牡丹和野牡丹的嫌疑杂种; C: 野牡丹; D、E、F分别为紫毛野牡丹、嫌疑杂种和野牡丹的果。Fig. 1 Morphological comparison between *Melastoma penicillatum*, *M. candidum* and their putative hybrid. (A) *M. penicillatum*, (B) putative hybrid, (C) *M. candidum*. Fruits of *M. penicillatum* (D), putative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

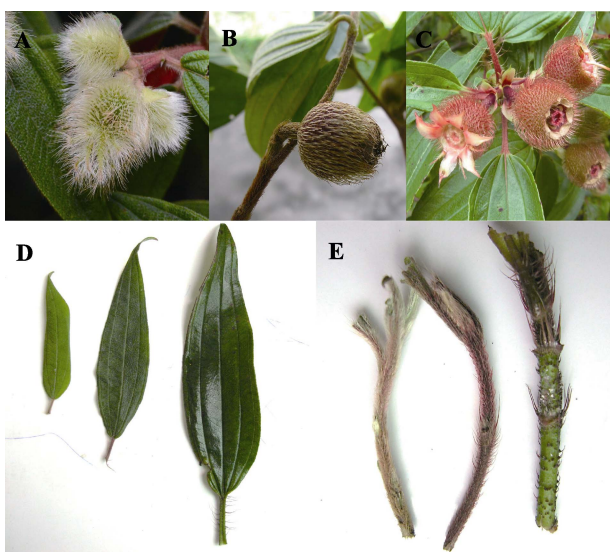


图2 枝毛野牡丹、毛蕊及其嫌疑杂种的部分形态学特征。A、B、C分别为枝毛野牡丹、嫌疑杂种和毛蕊的果。D、E从左到右分别为枝毛野牡丹(左)、嫌疑杂种(中)和毛蕊(右)的叶和幼枝。Fig. 2 Morphological comparison between *Melastoma dendrisetosum*, *M. sanguineum* and their putative hybrid. Fruits of *M. dendrisetosum* (A), putative hybrid (B) and *M. sanguineum* (C). D, Leaves of *M. dendrisetosum*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

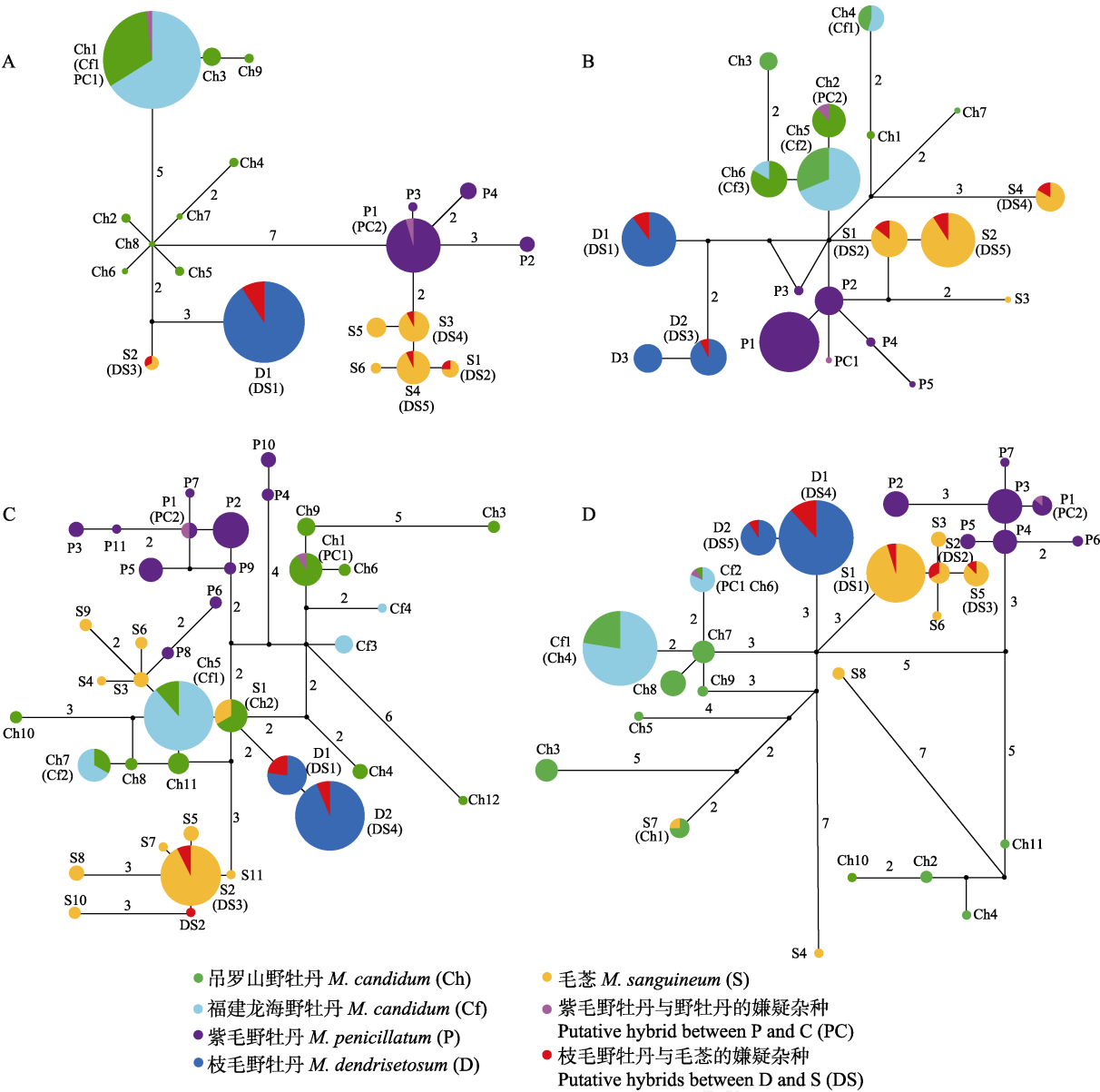


图3 4个野牡丹属物种及2个嫌疑杂种在4个核基因上的单倍型网络图。A、B、C、D分别为tpi、gbss、chi和cam基因的单倍型网络图。两个单倍型之间的连线上的数字代表突变步骤，未标出数字的均表示一个突变步骤。黑色小圆圈代表未取样到的单倍型或假设的单倍型。

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

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F₁代杂种。尽管准确地确定杂种的F₁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F₁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)