

珍稀植物海南草海桐基于 ITS 序列 分析的系统位置研究^{*}

粟米¹, 何思宁¹, 李炜曦², 王舒², 谈凤笑², 黄椰林¹

(1. 中山大学生命科学学院//广东省植物资源重点实验室, 广东 广州 510275;

2. 华南农业大学资源环境学院, 广东 广州 510642)

摘要: 通过测定来自国内5个分布地点的海南草海桐 *Scaevola hainanensis* Hance 群体核糖体基因间隔区序列 (nuclear ribosomal internal transcribed spacer region, ITS), 一方面评估海南草海桐的遗传多样性大小, 另一方面, 结合 GenBank 中已有的草海桐属物种 ITS 序列来共同进行分子系统发育分析, 旨在确定海南草海桐在草海桐属中的系统位置。研究结果表明海南草海桐遗传多样性水平极低, 作为一种珍稀植物在分子水平上同样面临灭绝的风险。而分子聚类结果发现海南草海桐位于 *Scaevola* 组里的北半球谱系, 并与夏威夷本地物种的亲缘关系最近, 两地草海桐属物种之间可能存在祖先—后代 (progenitor-derivative) 的扩散模式。研究结果同时否定了 *Scaevola* 组的单系性以及海南草海桐由同域广布种草海桐演化而来的假说。

关键词: 海南草海桐 *Scaevola hainanensis* Hance; ITS; 系统发育分析

中图分类号: Q949.783 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2016) 01-0016-08

Systematic position of a rare plant species *Scaevola hainanensis* based on ITS sequence analysis

SU Mi¹, HE Sining¹, LI Weixi², WANG Su², TAN Fengxiao², HUANG Yelin¹

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Plant Resources, School of Life Sciences,

Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Genetic diversity of *Scaevola hainanensis* Hance is estimated based on the sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer region (ITS) from five populations distributed in China. Further, phylogenetic analysis of the *S. hainanensis* is performed based on combined ITS sequences data with other species of *Scaevola* and outgroups available from GenBank. The results shows that the genetic diversity of *S. hainanensis* is very low, implying that it is at risk of extinction at the genetic level as a rare plant. In the phylogenetic tree, *S. hainanensis* is located in the Northern Hemisphere lineage and closest to the clade consisting of local species in Hawaii with high support value, which imply the progenitor-derivative dispersal pattern of *Scaevola* species between Asia and Hawaii. The results did not support the monophyly of *S. sect Scaevola* and the hypothesis that *S. hainanensis* is derived from a widespread and sympatric species *S. taccada* is rejected based on the present result.

Key words: *Scaevola hainanensis* Hance; ITS; phylogenetic analysis

* 收稿日期: 2015-03-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (41276107, 31200466, J1310025)

作者简介: 粟米 (1994 年生), 女; 研究方向: 生态与进化基因组; 通讯作者: 黄椰林; E-mail: lsshyl@mail.sysu.edu.cn

海南草海桐 *Scaevola hainanensis* Hance，又名小草海桐，属于草海桐科 Goodeniaceae 草海桐属 *Scaevola*。该属全世界大约 130 个种，该属的起源以及现存物种都集中在澳大利亚。分布在澳大利亚以外的大约有 40 个种，其中草海桐 *S. taccada* 和非洲草海桐 *S. plumieri* 均为热带广布种，其余物种大多零散分布在热带海岛地区^[1]，仅海南草海桐是唯一的一种澳大利亚以外沿大陆沿岸狭域分布的物种，分布于中国南部沿海地区以及越南与中国相邻的北部湾地区^[1]，生于海边盐田或与红树林同生，该地区同域分布的同属植物只有草海桐^[2]。从海南草海桐的分类学研究历史来看，海南草海桐学名的命名者 Hance 于 1878 年命此学名，也就是以采集地海南岛来命名种小名，但命名当时，以及往后的一段时日，包括命名者在内的分类学者都不大确定其是否可放在草海桐这一属^[3]。1915 年日本植物学家早田文藏解剖来自台湾的海南草海桐标本的花朵之后，强烈主张其属于草海桐属无误^[3]，但随后的几十年里，对该种的研究限于停顿，直到 Carolin^[4]于 1990 年在研究草海桐属的系统分类时，在没有见到该种标本的情况下，按前人的描述将海南草海桐归到了 *Scaevola* 组，但他承认其植株形态和果实等特点并不完全与 *Scaevola* 组的特点相符合；2003 年 Howarth 等^[1]利用 ITS 分子数据对草海桐属的系统分类进行了研究，尤其是对分布在澳大利亚以外的所有该属物种的演化进行了深入探讨，这也是唯一的关于草海桐属分子系统学的报道，但唯独就缺少海南草海桐的样品和数据。作为只限于在中国南部和越南沿岸分布的一种本地草海桐属植物，海南草海桐是否是由本地区与之同域分布，但同时又是泛热带广布的唯一一种草海桐属植物——草海桐演化而来？该问题是 Howarth 在他们研究中所提出的但尚未有数据验证的一个假说^[1]；此外，由于近年来海岸生态系统的破坏，目前海南草海桐的分布范围不断缩减，种群数量极其稀少，以前有

海南草海桐记录分布的区域如今大多数难以寻找踪迹。依据世界自然保育联盟（IUCN）的保育等级分类标准该种已被台湾列为珍稀濒危种（Critically Endangered，CR）^[5]，在大陆也被列为珍稀易危植物（Vulnerable species，VU）^[6]。针对以上问题，本研究将测定来自国内 5 个分布地点的海南草海桐的群体 ITS 序列，一方面评估该物种在物种水平和群体水平上的遗传多样性，另一方面，结合 GenBank 中已有的且唯一可获得的草海桐属各物种 ITS 序列来共同进行分子系统发育分析，旨在确定海南草海桐在草海桐属中的系统位置。

1 材料和方法

1.1 实验材料

从国内南部沿海地区（包括广东、广西、台湾、和海南）采集了 5 个海南草海桐的群体，共 50 个个体（表 1）。同时在广东和台湾各采集草海桐个体 6 个，采样时用 GPS 定位仪记录经纬度，严格按照群体采样原则，个体间距离不小于 5 m，叶片置于密封的硅胶袋中干燥保存，凭证标本存放于中山大学生物适应性进化研究室。

1.2 方法

1.2.1 植物总 DNA 提取 采用改进的 CTAB 法^[7]用紫外分光光度法测定其核酸含量以及吸光比值。用琼脂糖电泳检测其含量。

1.2.2 ITS 序列的扩增及测序 本研究所用 ITS 引物（ITS4，ITSLeu）同 Howarth（2003）（上海生工合成）^[1]。反应体系为 30 μL，包括 DNA 20 ~ 40 ng，引物 0.15 μmol/L，MgCl₂ 1.5 mol/L，dNTP 0.1 mmol/L，*Taq* DNA 聚合酶 1.5 U。扩增程序为：94 ℃，4 min → 94 ℃，45 s → 60 ℃，50 s → 72 ℃，80 s → 32 个循环 → 72 ℃，6 min。PCR 产物进行电泳检测后，送华大基因公司进行双向测序。

表 1 实验材料采集信息

Table 1 Collection information for experimental materials in this study

物种	采样地点	纬度	经度	采样个体数	采样时间
海南草海桐	广东高桥	21°36'N	109°48'E	10	2012 - 11 - 27
	台湾台南	23°05'N	120°06'E	13	2012 - 12 - 10
	海南东寨港	19°55'N	110°35'E	12	2012 - 11 - 06
	海南儋州	19°30'N	109°30'E	10	2013 - 5 - 23
	广西防城港	21°31'N	108°20'E	5	2014 - 8 - 20
草海桐	广东徐闻	20°15'N	109°57'E	6	2013 - 7 - 17
	台湾台东	22°24'N	120°49'E	6	2014 - 1 - 15

1.2.3 数据分析 首先采用 Clustal - X 软件^[8]和 POPGENE^[9]对所测得的海南草海桐和草海桐群体 ITS 序列进行对位排列和多样性检测,在获得相应的单倍型信息后,用 Clustal X 软件将本研究所测序列与 GenBank 已有的 66 个草海桐属及其相关物种的 ITS 序列（见表 2）共 69 个序列进行共同排序,再用 PAUP 4.0 b10 软件^[10]进行最大简约分析,外类群选取参照 Howarth^[11]研究中的设置,简

约法构树中空位（gap）处理作缺失（missing）状态。最大简约树（Maximum parsimony: MP）采用 Heuristic 法寻找。用 bootstrap 值检验简约树中各分支的置信度,自展数据集为 1 000 次。此外,该数据集也采用贝叶斯法推断法（Bayesian inference: BI）进行构树,采用 MrBayes3.1.1 软件^[11],用 MODELTEST 3.7^[12]选择最适模型。模型选择的标准基于贝叶斯信息准则（Bayes information criterion , BIC）^[13]。

表 2 本研究所用序列的物种样品信息及 GenBank 号（* 代表自测序列）

Table 2 The information of species used in this study and their GenBank accession numbers for ITS sequences					
物种	采样地点	GenBank 号	物种	采样地点	GenBank 号
<i>Scaevola wrightii</i>	也门	AY102787	<i>Scaevola lanceolata</i>	澳大利亚	AY102757
<i>Scaevola virgata</i>	澳大利亚	AY102786	<i>Scaevola kilaueae</i>	夏威夷	AY102756
<i>Scaevola tomentosa</i>	澳大利亚	AY102785	<i>Scaevola humifusa</i>	澳大利亚	AY102755
<i>Scaevola thesioides</i>	澳大利亚	AY102784	<i>Scaevola hookeri</i>	澳大利亚	AY102754
<i>Scaevola tahitensis</i>	南太平洋	AY102783	<i>Scaevola hobdyi</i>	夏威夷	AY102753
<i>Scaevola taccada</i> 3	夏威夷	AY102780	<i>Scaevola gracilis</i>	汤加	AY102752
<i>Scaevola taccada</i> 4	马克萨斯群岛	AY102779	<i>Scaevola globosa</i>	澳大利亚	AY102751
<i>Scaevola subcapitata</i>	南太平洋	AY102778	<i>Scaevola glabra</i> 1	夏威夷	AY102750
<i>Scaevola spinescens</i>	澳大利亚	AY102777	<i>Scaevola glabra</i> 2	夏威夷	AY102749
<i>Scaevola socotraensis</i>	古巴	AY102776	<i>Scaevola glabra</i> 3	夏威夷	AY102748
<i>Scaevola repens</i>	澳大利亚	AY102775	<i>Scaevola gaudichaudii</i>	夏威夷	AY102747
<i>Scaevola ramosissima</i>	澳大利亚	AY102774	<i>Scaevola gaudichaudiana</i>	夏威夷	AY102746
<i>Scaevola procera</i>	夏威夷	AY102773	<i>Scaevola floribunda</i>	南太平洋	AY102745
<i>Scaevola porocarya</i>	澳大利亚	AY102772	<i>Scaevola enantophylla</i> 1	澳大利亚	AY102744
<i>Scaevola plumieri</i> 1	南美洲	AY102771	<i>Scaevola enantophylla</i> 2	澳大利亚	AY102743
<i>Scaevola plumieri</i> 2	南美洲	AY102770	<i>Scaevola depauperata</i>	澳大利亚	AY102742
<i>Scaevola plumieri</i> 3	非洲	AY102769	<i>Scaevola cylindrica</i>	新喀里多尼亚	AY102741
<i>Scaevola phlebopetala</i>	澳大利亚	AY102768	<i>Scaevola crassifolia</i>	澳大利亚	AY102740
<i>Scaevola parvibarbata</i>	澳大利亚	AY102767	<i>Scaevola coriacea</i>	夏威夷	AY102739
<i>Scaevola ovalifolia</i>	澳大利亚	AY102766	<i>Scaevola collaris</i>	澳大利亚	AY102738
<i>Scaevola oppositifolia</i> 1	新几内亚	AY102765	<i>Scaevola coccinea</i>	新喀里多尼亚	AY102737
<i>Scaevola oppositifolia</i> 2	新几内亚	AY102764	<i>Scaevola chanii</i>	婆罗洲	AY102736
<i>Scaevola nubigena</i>	南太平洋	AY102763	<i>Scaevola chamissoniana</i>	夏威夷	AY102735
<i>Scaevola nitida</i>	澳大利亚	AY102762	<i>Scaevola calendulacea</i>	澳大利亚	AY102734
<i>Scaevola montana</i>	新喀里多尼亚	AY102761	<i>Scaevola beckii</i>	新喀里多尼亚	AY102733
<i>Scaevola mollis</i>	夏威夷	AY102760	<i>Scaevola balansae</i>	新喀里多尼亚	AY102732
<i>Scaevola microphylla</i>	澳大利亚	AY102759	<i>Scaevola angulata</i>	澳大利亚	AY102731
<i>Scaevola micrantha</i>	婆罗洲	AY102758	<i>Scaevola anchusifolia</i>	澳大利亚	AY102730
<i>Scaevola albida</i>	澳大利亚	AY102729	<i>Goodenia scapigera</i>	澳大利亚	AY102793
<i>Scaevola aemula</i>	澳大利亚	AY102728	<i>Goodenia glabra</i>	澳大利亚	AY102792
<i>Verreauxia reinwardtii</i>	澳大利亚	AY102795	<i>Goodenia decurrens</i>	澳大利亚	AY102791
<i>Velleia spathulata</i>	澳大利亚	AY102794	<i>Goodenia cirrifica</i>	澳大利亚	AY102790
* <i>Scaevola hainanensis</i>	中国 （台湾/海南/广东/广西）	* KM921769	<i>Diaspasis filifolia</i>	澳大利亚	AY102788
* <i>Scaevola taccada</i> 1	中国（广东徐闻）	* KP877531	<i>Goodenia scapigera</i>	澳大利亚	AY102793
* <i>Scaevola taccada</i> 2	中国 （台湾台东/广东徐闻）	* KP877532	<i>Goodenia bellidifolia</i>	澳大利亚	AY102789

所有的贝叶斯分析均以随机树作为起始树，4 条链（3 条热链 1 条冷链）同时运行 5×10^6 代，每 1 000 代对系统树抽样一次，其它参数的先验值设定为默认值。为了进一步获得分辨率更高的系统树，排除差异较大的序列的分析干扰，我们在前面大数据集构树结果的基础上选取部分序列（共 27 个序列）构成小数据集，并采用同样的两种分析方法进行构树，后者将 *Scaevola taccada* 和 *S. repens* 作为外类群。

2 结果与分析

2.1 基于 ITS 序列的海南草海桐群体遗传多样性检测

本研究测定的海南草海桐 5 个种群共 50 个个体的 ITS 序列完全一致，具有唯一的单倍型和基因型，Nei 遗传多样性指数为零，因此提交给 GenBank 唯一的登录号 KM921769。而本研究测定的草海桐 2 个群体共 12 个个体共含有两种单倍型，登录号分别为 KP877531 和 KP877532，对应的基因型共 3 种。其中广东徐闻群体同时存在 2 种单倍型和 3 种基因型，Nei 遗传多样性指数为 0.53。遗传多样性检测结果表明：即使所检测的草海桐群体和个体数均显著少于海南草海桐，从遗传多样性水平上也明显高于海南草海桐。这一检测结果同 Ho 等^[14]针对海南草海桐台湾群体的 ISSR 研究结果一致，同样揭示了海南草海桐无论在群体水平还是在物种水平上的遗传多样性均极低。

2.2 基于大数据集（69 个序列）的 ITS 序列分析结果

69 个草海桐属及其外类群物种序列（加入本研究所获得的海南草海桐和中国分布草海桐的序列在内）的 ITS 全序列排序后的长度为 803 bp，用 PAUP 4.0 b10 进行运算。有 335 个变异位点，243 个为信息位点，分别占 41.7% 和 30.2%。Heuristic 法找到 90 个最简约树，用严格一致性树（strict consensus tree）进行系统分析。树长为 370，一致性指数（CI）和保持指数（RI）分别为 0.629 3 和 0.830 2。MP 树图与使用贝叶斯推断法分析构建的系统树基本一致，但各分支的支持率都较低，因此图 1 未显示 MP 树，只显示了具有较高分辨率的贝叶斯树（BI）。实际上，在分析比较中考虑到各种之间较大的序列差异，采用复杂模型的贝叶斯法更为合理，构树所对应的核苷酸模型按贝叶斯信息准则为 GTR + I + G。从 BI 图中可以得知，4 个草海桐 *S. taccada* 个体序列聚在一起（支持率为

100%），1 和 2 来自中国广东和台湾，3 来自夏威夷，4 来自太平洋中的 Marquesas Islands。同域分布的草海桐和海南草海桐并不构成姐妹群关系，否定了海南草海桐是由该地区另一物种草海桐演化而来的设想。与之相对比的是，海南草海桐在系统树上被归为 Howarth 等建议的北半球谱系（Northern Hemisphere lineage）^[1]，该分支包括非洲草海桐 *S. plumieri*，*S. socotraensis*，*S. wrightii*，*S. nitida* 和分布在夏威夷的 8 个本地种，但支持率只有 0.53，除夏威夷本地物种形成单系类群外，北半球谱系内部各分支间均为平行关系。该分支网结于 Howarth 等所划出的 Subglobulifera 类群（支持率为 0.98），该类群包括了大多数属于 *S. sect. Xerocarpa ser. Globuliferae* 的澳大利亚物种以及来自于婆罗洲的物种。

2.3 基于小数据集（27 个序列）的 ITS 序列分析结果

确定了海南草海桐以高支持率属于 Subglobulifera 类群后，为了进一步确定海南草海桐在 Subglobulifera 类群中的位置，排除大数据集内差异较大物种在系统分析上的干扰，将 Subglobulifera 类群内的所有 25 个物种（包括海南草海桐，见图 1），加上该类群之外的 *S. taccada* 和 *S. repens* 作为外类群，一共 27 个序列重新排序以进行系统发育分析。由于去除了序列差异极大的物种所带来的信号干扰，两种方法都获得了分辨率和支持率得到提高的系统发育树。其中图 2 为采用 bootstrap 法抽样检验所得的一致性 MP 树，图中可以看到海南草海桐与夏威夷的 8 个本地物种构成姐妹群关系，且有较高的自展支持率：70%。使用贝叶斯法构建的 BI 树见图 3，分辨率更高，Howarth 等建议的北半球谱系（已标出）支持率为 67%，在此谱系中，海南草海桐与夏威夷各物种所形成的分枝支持率为 83%。

3 讨 论

海南草海桐是唯一分布在澳大利亚以外沿大陆沿岸狭域分布的草海桐属物种，仅分布于中国南部沿海地区以及越南与中国相邻的北部湾地区，但近几十年种群数量急剧减少，Ho 等^[14]的研究就指出海南草海桐在台湾历来的栖息地，如云林县、嘉义县及澎湖地区均已不见踪迹，如今只在台南将军乡剩最后一个群体，因此在台湾已被列为珍稀濒危种（CR）^[5]。在大陆曾经有海南草海桐记录分布的区域如今大多数也难以寻找踪迹，因此该种也被列

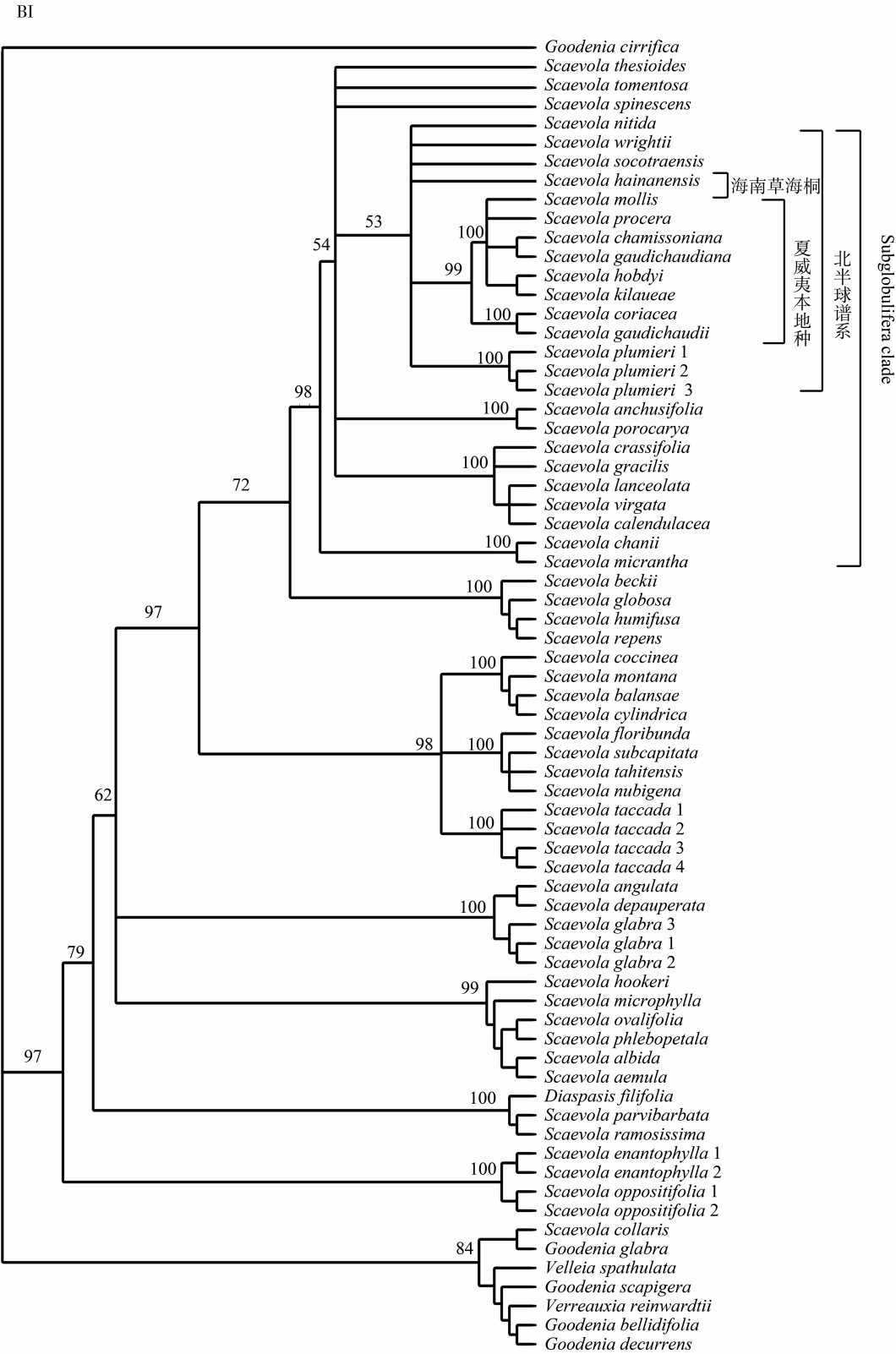


图 1 基于 69 个 ITS 序列（大数据集）所构建的 BI 树图（数字代表后验概率，只显示主要分支），图中部分物种的代表个体多于 1 个，因此在物种名后附加数字以示区分，相对应的物种及其个体具体地理信息见表 1

Fig. 1 The phylogenetic tree resulting from the Bayesian inference (BI) of 69 ITS gene sequences (large dataset). Posterior probability values are given above major branches. The species name with number means more than one individual for this species were used in this study. The information for all taxa was listed in the supplementary Table 1

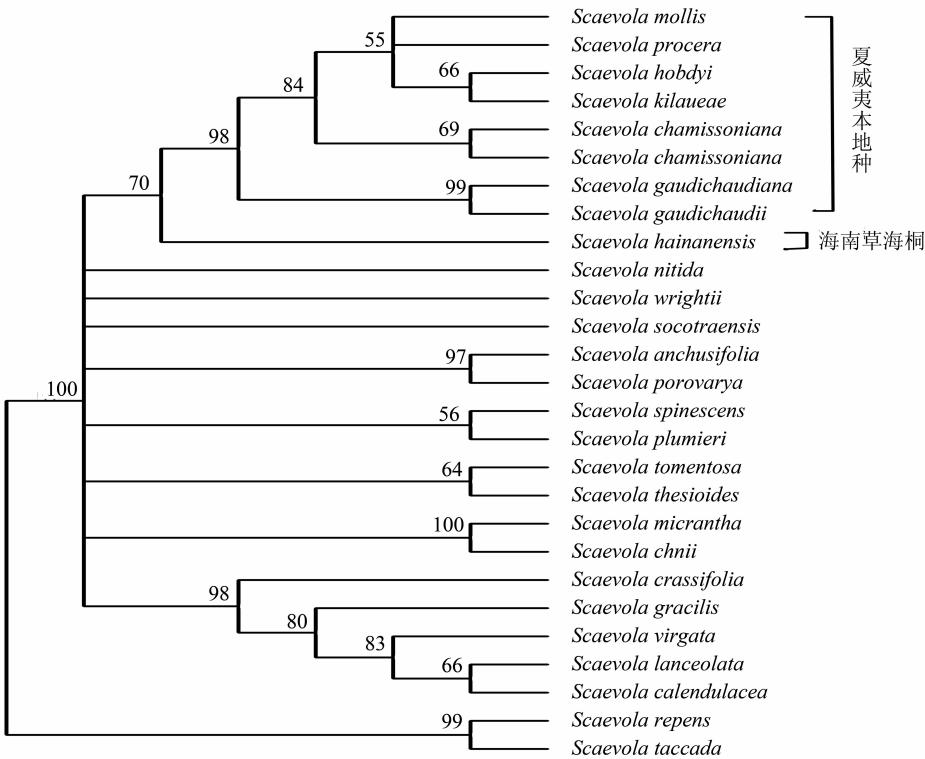


图 2 基于 27 个 ITS 序列（小数据集）所构建的 MP 树（数字代表 bootstrap 自展支持率）
Fig. 2 The phylogenetic tree resulting from the Maximum parsimony (MP) analysis of 27 ITS gene sequences (small dataset). Bootstrap values are given at nodes

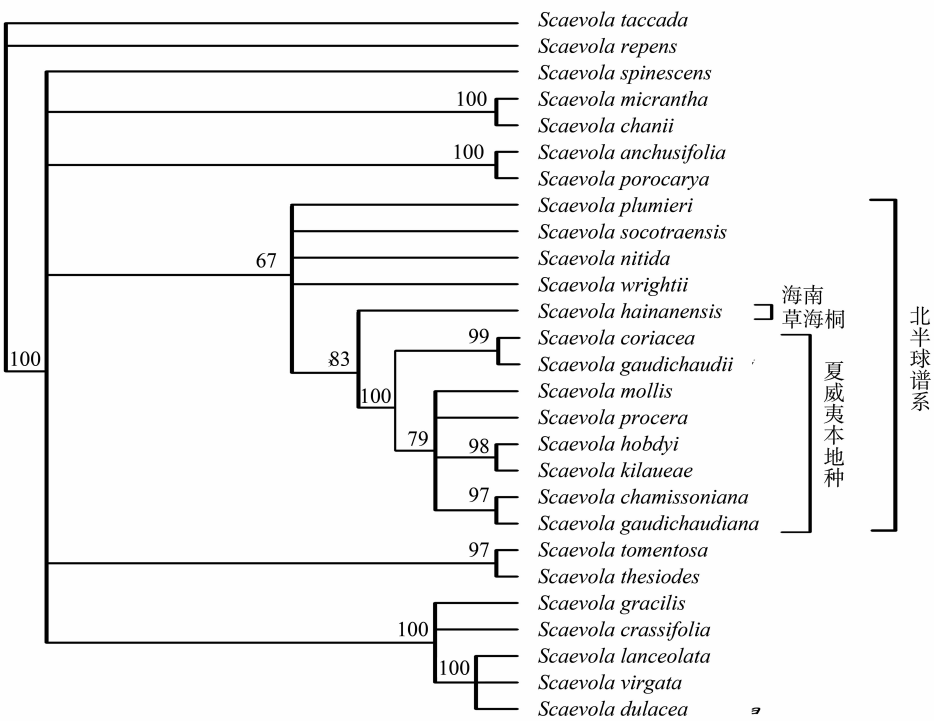


图 3 基于 27 个 ITS 序列（小数据集）所构建的 BI 树（数字代表后验概率）
Fig. 3 The phylogenetic tree resulting from the Bayesian inference (BI) of 27 ITS gene sequences (small dataset). Posterior probability values are given at nodes

为珍稀易危种 (VU)^[6]。我们在华南沿海的采样过程同样见证了海南草海桐种群的消失。海南草海桐濒危的原因前人推测是由于体型不高, 本身不能被遮光, 生态幅度窄隘, 因而在海岸大规模开发过程中逐渐消失^[3]。本研究通过检测来自国内五个分布地点的海南草海桐的群体 ITS 序列, 揭示了海南草海桐在遗传多样性上同样面临灭绝的风险, 尽管这只是基于一种分子标记——ITS 序列的检测结果, 但 ITS 序列在草海桐属的分子研究中被普遍认为是适合的分子标记^[1]。此外, 在对比研究中, 即使所检测的同域草海桐群体和个体数均显著少于海南草海桐, 但草海桐在 ITS 序列上也显示出更高的遗传多样性水平。该遗传多样性检测结果也与 Ho 等^[14]利用 ISSR 对台湾海南草海桐群体进行研究的结果相一致, 在他们所获得的 233 个条带中, 只发现 6 个多态性条带。海南草海桐遗传多样性极低的检测结果将为制定这一珍稀植物的保育策略提供重要信息。

依据 Carolin^[15]所提出的经典的草海桐属的分类系统, 该属被分成了 3 个组, 分别是 *Scaevola* 组, *Xerocarpa* 组和 *Enantiophyllum* 组。后两组主要由分布在澳大利亚的物种所组成, 包括了 130 个种中的大多数物种 (约 90 种), 形态上主要以干外果皮、蔓生草本和灌木为最重要特征。而分布在澳大利亚以外的物种绝大部分被归为 *Scaevola* 组, 该组的主要特点是果实具肉质外果皮, 植株常为高大的灌木甚至是乔木。Carolin^[4]于 1990 年在研究草海桐属的系统分类中, 在没有见到海南草海桐标本的情况下, 按前人的描述将该种归到了 *Scaevola* 组, 但他承认其植株形态和果实等特点并不完全与 *Scaevola* 组的特点相符合; 实际上按朱芳莹^[16]以及我们的观察, 海南草海桐实为蔓生的小灌木, 肉质核果成熟后变干。但 Howarth^[1]在他们研究中发现 Carolin 所提出的 3 个组除 *Enantiophyllum* 组外都不为单系类群, 因此单凭形态证据就对海南草海桐进行系统位置的确定是不太准确的。本研究基于 ITS 序列所得出的聚类结果发现海南草海桐位于 *Scaevola* 组里的一个分支谱系——北半球谱系 (Northern Hemisphere lineage)。在 Howarth^[1]的研究中该谱系包括 *S. plumieri*, *S. socotraensis*, *S. wrightii*, *S. nitida* 和分布在夏威夷的 8 个本地种, 但他的研究中未包括海南草海桐。本研究的结果支持海南草海桐属于这一谱系, 但该谱系总体的支持率并不高, 在 MP 树上支持率小于 50%, 在 BI 树上支持率为 67%, 在 Howarth 的研究中该谱系支持率同样

较低^[1]。Howarth^[1]认为是由于来自于澳大利亚的物种 *S. nitida* 的数据异常造成的, 因此随后将 *S. nitida* 排除在北半球谱系外。从北半球谱系所包括的几个物种来看, 分布地点分别是也门索科特拉岛 *S. socotraensis*, 古巴 *S. wrightii*, 夏威夷 (标记的 7 个本地种), 中国越南沿岸 (海南草海桐), 相互之间地理距离相隔极远。而该谱系中唯一的广布种 *S. plumieri* 尽管广布在热带美洲和非洲, 但除了古巴外并未与北半球谱系其它物种在分布范围上存在交集, 因此 Howarth^[1]在研究中认为北半球谱系的祖先仍然位于澳大利亚, 而现存的各个狭域物种均来自于鸟类对肉质果实的长距离扩散和随后的本地适应, 而狭域物种之间同样存在与扩散相对应的祖先—后代 (progenitor-derivative) 形成模式, 但广布种的扩散更依赖于洋流。此外, 分子系统发育树显示依据形态特征被归入 *Scaevola* 组里的草海桐, 尽管与海南草海桐同域分布, 却在系统位置上相隔较远, 这一结果否定了 *Scaevola* 组的单系性以及海南草海桐最有可能由草海桐演化而来的假说。这与前人针对夏威夷群岛草海桐属的研究结果相一致。他们的研究证实: 在夏威夷群岛分布的草海桐, 也并未参与演化形成夏威夷的其他本地种^[17]。本研究中, 4 个分布在全球不同地域的草海桐个体形成单系类群, 在分子系统树上获得的极高支持 (100%)。这一结果进一步反映了该广布种并未在分布的不同地点独立演化而表现出遗传上的分化。

本研究基于 ITS 序列所得出的聚类结果还进一步揭示了海南草海桐与夏威夷本地种的紧密关系, 尤其是与 *S. coriacea* 和 *S. gaudichaudii* 这两个本地种在系统树上组成的分支最近^[1]。在形态上海南草海桐与其中 *S. coriacea* 最接近。二者均为匍匐肉质小灌木, 茎均光滑, 叶肉质, 叶基不抱茎, 花单生或呈简单的总状花序; 苞叶与叶大小相近, 小苞片生于花梗顶端, 萼片波状缘, 花冠筒内部有毛, 花柱下部有短毛; 果实光滑无毛^[2]。但相比海南草海桐的腋生花, *S. coriacea* 的花是顶生的; *S. gaudichaudii* 在形态特点上同前两者大多类似, 与 *S. coriacea* 和海南草海桐所不同的只是其花冠筒内部无毛。从生境来看, 海南草海桐生长在较为湿润低海拔的海边湿地, 而 *S. coriacea* 生长在海边较干燥的沙丘, *S. gaudichaudii* 则长在更为干燥和高海拔的山脊和灌木丛林中^[17], 这种从海边到内陆的生境变化反映了新种产生所依赖的生态位的必要性, 而亚洲与夏威夷之间鸟类的迁移和对果实的长距离扩散则从另一个方面解释了两地植物存在祖先

- 后代 (progenitor-derivative) 扩散模式的可能性, 这一推测与 Howarth 对草海桐属北半球谱系其它物种在起源和适应上的讨论高度一致^[1], 这在一定程度上支持了海南草海桐在系统上位于北半球谱系, 并更靠近夏威夷本地物种的结论。针对海南草海桐的系统发育研究, 下一步将尽可能采用多基因数据联合分析法^[18], 尤其是加入叶绿体基因的数据进行研究^[19]。但由于草海桐属物种分布范围极广, 采样受限以及前人所测的基因数据只限于 ITS 序列, 故短期内无法完成 ITS 外的其他基因的分析。今后应进一步加大采集力度, 收集其他基因数据, 以进一步验证海南草海桐的系统位置, 同时也为草海桐属的起源和进化提供重要信息。

参考文献：

[1] HOWARTH D G, GUSTAFSSON M H G, BAUM D A, et al. Phylogenetics of the genus *Scaevola* (Goodeniaceae): Implication for dispersal patterns across the Pacific basin and colonization of the Hawaiian Islands [J]. American Journal of Botany, 2003, 90(6): 915 – 923.

[2] 中国科学院植物志编委. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1983: 179.

[3] 陈玉峰. 台湾生态大变迁之海南草海桐 [J/OL]. 生态台湾电子季刊, 2007(15). [2015 – 02 – 18]. <http://ecology.org.tw/publication/15/issue15-3.htm>.

[4] CAROLIN R C. Nomenclatural notes, new taxa and the systematic arrangement in the genus *Scaevola* (Goodeniaceae) including synonyms [J]. Telopea, 1990, 3: 477 – 516.

[5] 吕勝由, 邱文良. 台湾稀有及濒危植物之分级彩色图鉴(III) [M]. 台北: 行政院农业委员会, 1998: 143.

[6] 邢福武. 中国的珍稀植物 [M]. 长沙: 湖南教育出版社, 2005: 216.

[7] DOYLE J J. DNA protocols for plants—CTAB total DNA isolation [M] // HEWITT G M, JOHNSTON A, et al. Molecular techniques in taxonomy. Berlin: Springer-Verlag, 1991: 283 – 293.

[8] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAC F, et al. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools [J].

Nucleic Acids Research, 1997, 25: 4876 – 4882.

[9] YEH F C, BOYLE T J B. Population genetic analysis of codominant and dominant markers and quantitative traits [J]. Belgian Journal of Botany, 1997, 129: 157.

[10] SWOFFORD D L. PAUP*: Phylogenetic analysis using Parsimony (and other methods) [M]. 4th ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.

[11] RONQUIST F, HUELSENBECK J P. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. Bioinformatics, 2003, 19: 1572 – 1574.

[12] POSADA D, CRANDALL K A. Modeltest: testing the model of DNA substitution [J]. Bioinformatics, 1998, 14: 817 – 818.

[13] POSADA D, BUCKLEY T R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests [J]. Systematic Biology, 2004, 53: 793 – 808.

[14] HO K Y, DENG S L, CHANG Y H, et al. Genetic variation of the endangered *Scaevola hainanensis* (Goodeniaceae) in the Jiangjun stream mouth, Taiwan [J]. Taiwan Journal of Forest Science, 2005, 20(3): 193 – 202.

[15] CAROLIN R C, MORRISON D A, RAJPUT T. Flora of Australia volume 35, Brunoniaceae, Goodeniaceae [M]. Canberra: Australian Government Publishing Service, 1992.

[16] 朱芳莹. 海南草海桐之生殖特性与植群组成 [D]. 台南: 台南大学材料科学系, 2007.

[17] HOWARTH D G, BAUM D A. Genealogical evidence of homoploid hybrid speciation in an adaptive radiation of *Scaevola* (Goodeniaceae) in the Hawaiian Islands [J]. Evolution, 2005, 59(5): 948 – 961.

[18] 陈兴汉, 郭梁, 李明明, 等. 中国南方沿海 13 种石斑鱼类的分子系统进化关系分析 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 2014, 53(4): 123 – 130.

[19] 赖燕玲, 王晓明, 陈国培, 等. 利用 trnL-trnF 探讨文定果属的系统地位及其与若干近缘科属的系统发育关系 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 2012, 51(3): 98 – 107.