江苏铁角蕨的系统位置和多倍体起源

常艳芬^{1,4},李 捷^{1*},陆树刚², Harald Schneider³

 (1中国科学院西双版纳热带植物园 植物系统发育与保护生物学实验室,云南 昆明 650223;2 云南大学 生态学与地植物学研究所,云南 昆明 650091;3 Botany Department, Natural History Museum, London, SW7 5BD, UK;4 中国科学院大学,北京 100049)

摘要:运用分子系统发育分析的方法研究了江苏铁角蕨(Asplenium kiangsuense)的系统位置及其与庐山铁 角蕨(A.gulingense)的关系,并探讨了该类群可能的多倍体起源方式。结果显示:江苏铁角蕨与庐山铁 角蕨可能为同源四倍体,是组成倒挂铁角蕨复合体(A.normale complex)的成员之一;二者在形态特征与 基因序列方面均表现一致,接受英文版中国植物志的处理,即把庐山铁角蕨处理为江苏铁角蕨的异名。 关键词:江苏铁角蕨;庐山铁角蕨;核基因 pgiC;叶绿体基因;系统位置;多倍体起源 中图分类号:Q 949 文献标识码:A 文章编号: 2095-0845(2014)01-007-06

Systematic Position and Polyploid Origin of the Fern Asplenium kiangsuense (Aspleniaceae)

CHANG Yan-Fen^{1,4}, LI Jie^{1*}, LU Shu-Gang², SCHNEIDER Harald³

 (1 Laboratory of Plant Phylogenetics and Conservation, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China; 2 Institute of Ecology and Geobotany, Yunnan University, Kunming 650091, China;
3 Botany Department, Natural History Museum, London, SW7 5BD, UK; 4 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Asplenium gulingense was reduced to a synonym of A. kiangsuense in the English version of Flora of China. However, the status of both entities has not been investigated rigorously. Phylogenetic analysis of plastid and nuclear sequence data and inference of ploidy level were used to investigate the relationships between these taxa and their putative polyploid origin. Both A. kiangsuense and A. gulingense were considered to be likely autotetraploid members of the A. normale complex and because of their morphological and phylogenetic similarities, we accept that A. gulingense should be treated as a synonym of A. kiangsuense in the English version of Flora of China. **Key words**: Asplenium kiangsuense; Asplenium gulingense; Chloroplast DNA; pgiC; Systematic position; Polyploid origin

多倍化 (polyploid) 的物种在维管植物中十 分丰富 (Beck 等, 2010), 而蕨类植物的多倍体 比例在植物界是最高的 (Van den Heede 等, 2003), 其中铁角蕨科 (Aspleniaceae) 的铁角蕨 属 Asplenium 就是一个典型的例子。据统计, 铁 角蕨属植物 700 多个物种中就有超过 70%的物 种是多倍体种 (Wang, 1988; Wang 等, 2003)。 多倍体常常与杂交相伴随,二者的作用常导致 形成具有复杂的网状进化(reticulate evolution) 关系的复合体类群(species complex)(Grant, 1981;洪德元,1990)。由于多倍化是不可逆的, 因此,多倍体复合体类群的研究对于分析进化、 系统发育和植物地理问题具有特别重要的价值 (Soltis 等, 2010)。

 ^{*} 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: jieli@ xtbg.ac.cn;
收稿日期: 2013-01-31, 2013-03-28 接受发表
作者简介:常艳芬(1980-)女,博士,主要从事植物分类与植物系统发育研究。E-mail: cyf@ xtbg.org.cn

江苏铁角蕨 (A. kiangsuense Ching & Y.X. Jin) 作为新种最初发表于江苏植物志(江苏植 物研究所, 1977)。中国植物志 (吴兆洪, 1999) 没有收录江苏铁角蕨,而是收录了形态特征与江 苏铁角蕨比较相似的庐山铁角蕨 (A. gulingense Ching & S.H. Wu),据中国植物志的记录,庐山 铁角蕨只分布于江西和湖南。英文版的中国植物 志 (Lin 和 Viane, 2012) 则把庐山铁角蕨处理为 江苏铁角蕨的异名,而且认为江苏铁角蕨与倒挂 铁角蕨(A. normale D. Don)之间的关系复杂, 所以它的分布范围可能更为广泛。倒挂铁角蕨分 布于东非,马达加斯加,印度,东亚至东南亚热 带,东部延伸到太平洋岛屿的夏威夷,北部到中 国中部及日本 (吴兆洪, 1999), 目前认为该物 种是组成黑茎铁角蕨类群 (Black stemmed spleenworts)的一个复杂的复合体种 (Schneider 等, 2004, 2005; Chang 等, 2013), 但该复合体 种的组成成员及其分类还有待研究。目前认为倒 挂铁角蕨复合体种可能包括被处理为种或亚种的 倒挂铁角蕨 A. normale (=A. normale var. normale), A. boreale (Ohwi ex Sa. Kurata) Nakaike (= A. normale var. boreale Ohwi ex Sa. Kurata) 和 A. shimurae (H.Ito) Nakaike (=A. normale var. shimurae H.Ito) (Kurata, 1963; Ito, 1972; Nakaike, 1992; Iwatsuki, 1995), 以及产于日本的 A. oligophlebium Baker (Matsumoto, 1975; Matsumoto 等, 2003) 和产于 中国中部的江苏铁角蕨和庐山铁角蕨 (吴兆洪, 1999: Lin 和 Viane, 2012)。所以, 阐明江苏铁 角蕨和庐山铁角蕨的种间关系及其系统位置有助 于对倒挂铁角蕨复合体的进一步研究。

本研究对 4 个叶绿体 DNA 片段(tmL-tmF, tmG-tmR, rps4-tmS、rbcL)和一个单拷贝核基 因 pgiC 片段进行研究,并综合使用流式细胞分 析的方法推测分类群的细胞倍性,来共同分析江 苏铁角蕨的系统位置及其与庐山铁角蕨和其他倒 挂铁角蕨复合体类群组成成员间的关系,并探讨 该类群可能的多倍体起源方式。

1 材料和方法

1.1 样品采集

江苏铁角蕨和庐山铁角蕨分别采自江苏宜兴和江西 庐山。用于本研究的相关类群的实验材料信息见表 1, 凭证标本保存于中国科学院西双版纳热带植物园标本馆(HITBC)。

1.2 流式细胞分析

使用 Accuri C6 流式细胞仪 (Accuri Cytometers, Inc., Ann Arbor, MI, USA) 对江苏铁角蕨、庐山铁角蕨和二 倍体的 A. oligophlebium 的基因组含量进行测量。使用大 豆 Glycine max (L.) Merr.(1.13 pg/C) 作为内参照,取 实验样品植物的健康幼叶约 1 cm²,洗净并去除所有孢 子囊后置于培养皿中,加入 0.5 mL 核分离缓冲液,用锋 利的刀片将叶片充分切碎,再用 30 目网孔 (Partec, Muenster, Nordrhein-Westfalen, Germany) 的尼龙网过滤, 过滤液里加入用核分离缓冲液制备的 100 μ L 荧光染料碘 化丙啶 (propidium iodide, PI) 于 4 ℃冰箱放置 30 min, 再用 Accuri C6 流式细胞仪检测核 DNA 的 C 值 (Dolezel 等, 2007)。每次分析均使用内参照,每个样品重复 5 次 分析取平均值。

1.3 分子系统发育分析

材料野外采集后用硅胶迅速干燥,采用 3 X CTAB (Doyle 和 Doyle, 1987)法提取总 DNA。用 4 对引物 (表 2)对叶绿体基因的 4 个区段 trnL-trnF、rps4-trnS、 rbcL 和 trnG-trnR 进行扩增,扩增反应体积为 20 μL,扩 增程序为: 94 ℃预变性 5 min, 95 ℃ 1 min 变性,40~60 ℃ 引物退火 1 min,循环反应 35 个重复后 72 ℃延伸 8 min。 扩增产物直接送到测序公司测序。用于核基因 pgiC 的 PCR 扩增反应与扩增叶绿体基因片段的相同,引物见表 2。核基因 pgiC 扩增后选择最优一份 PCR 产物进行克 隆,每个个体选取 5~10 份阳性克隆进行测序。

叶绿体基因片段测序所得 DNA 序列使用 Clustal X 软 件进行序列比对,之后通过手工调整完成校对。克隆产 物的测序结果得到后,对每个个体的所有 pgiC 序列进行 多序列比对的对位排列 (Alignment), 去除相同及嵌套基 因的序列后剩余的序列单独形成一个可以分析的序列矩 阵,用 PAUP4.0 的最大简约法 (Swofford, 2002) 对其进 行系统发育分析,从得到的系统树选取不同的基因型, 手工修正其中由于 PCR 扩增过程中产生错误阅读造成的 可疑位点,获得最终的一致序列用于系统发育树的构建。 系统发育分析用 PAUP4.0 的最大简约法, PhyML 3.0 (Guindon 等, 2010) 的最大似然法和 MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck 和 Ronquist, 2001) 的贝叶斯分析来来进行。 简约性 (Parsimony) 分析采用如下分析完成,即树二组 重新连接 TBR、启发式搜索 (Heuristic search)、多重性 选择 MµLPARS、ACCTRAN 优化和 100 次随机附加的重 复,用自展法 (Bootstrap Analysis) 检验系统树,自展数 为1000次重复。最大似然法分析使用 PhyML 3.0 的默认 值进行。贝叶斯分析的最佳模型使用 jModelTest (Posada, 2008)的AIC (Akaike, 1974)标准算法获得。

表1 用于研究的样品采集和序列信息

Table 1 Information of locality and sequences used in the present study

| 物种名称 Species | 采集地点 Locality | 叶绿体基因序列号 Genbank accessions: trnL-trnF/rps4-trnS/trnG-trnR/rbcL | 核基因 pgiC 序列号 Genbank number for pgiC |
|-----------------------|-----------------------------|--|---|
| 江苏铁角蕨 A. kiangsuensel | 江苏宜兴 Yixing, Jiangsu | JQ724200/JQ724284/JQ724241/JX152735 | |
| 江苏铁角蕨 A. kiangsuense2 | 江苏宜兴 Yixing, Jiangsu | | JX237487/JX237488 |
| 庐山铁角蕨 A. gulingense1 | 江西庐山 Lushan, Jiangxi | JQ724224/JQ724309/JQ724266/JX152738 | JX237473/JX237474 |
| 庐山铁角蕨 A. gulingense2 | 江西庐山 Lushan, Jiangxi | | |
| A. oligophlebium1 | 日本 Japan | JQ724225/JQ724310/JQ724267/JX152751 | JX237475 |
| A. oligophlebium2 | 日本 Japan | | |
| 倒挂铁角蕨 A. normale1 | 福建武夷山 Wuyishan, Fujian | JQ724210/JQ724294/JQ724251/- | JX237521 |
| 倒挂铁角蕨 A. normale2 | 浙江雁荡山 Yandangshan, Zhejiang | JQ724214/JQ724298/JQ724255/JX152749 | JX237511/JX237512 |
| A. shimurae1 | 云南贡山 Gongshan,Yunnan | JQ724191/JQ724275/JQ724233/JX152741 | JX237507/JX237508 |
| A. shimurae2 | 云南昭通 Zhaotong, Yunnan | JQ724192/JQ724276/JQ724234/- | JX237528/JX237529 |
| A. boreale1 | 广东鼎湖山 Dinghushan, Guangdong | JQ724209/JQ724293/JQ724250/- | JX237501/JX237502 |
| A. boreale2 | 浙江杭州 Hangzhou, Zhejiang | JQ724213/JQ724297/JQ724254/JX152739 | JX237477/JX237478 |

表 2 扩增叶绿体基因和核基 DNA 片断的引物

Table 2 Primers used to amplify four regions of the chloroplast genome and nuclear pgiC

| 引物 Primer | 正向引物 Forward primer (5'-3') | 反向引物 Reverse primer (3'-5') | 来源 Source |
|-----------|--|--------------------------------------|--|
| trnL-trnF | GGCAGCCCCCARATTCAGGRAACC | ATTTGAACTGGTGACACGAG | Taberlet <i>et al.</i> , 1991; Trewick <i>et al.</i> , 2002 |
| rps4-trnS | ATGTC [AC] CGTTA [CT] CGAGG [AG] CCTCGT | TACCGAGGGTTCGAATC | Schneider et al., 2005 |
| trnG-trnR | GCGGGTATAGTTTAGTGGTAA | CTATCCATTAGACGATGGACG | Grusz et al., 2009 |
| rbcL | CTTCACAAGCAGCAGCTAGTTCAG GACT CC | ATGTCACCACAAACA (G/A) AGACTAAA GC | Schneider <i>et al.</i> , 2005; Ebihara, Nitta & Ito, 2010 |
| pgiC | TGGGTCTTTTGAGTGTTTGG | CATTGCTTTCCATACTA | James et al., 2008 |

对叶绿体基因片段 trnL-trnF、rps4-trnS、trnG-trnR 和 rbcL 的序列数矩阵进行联合分析,外类群的选取根据 Schneider 等(2005)对倒挂铁角蕨的姐妹类群 Diellia 属 的研究结果选取代表铁角蕨属黑茎铁角蕨分支的另外几 个类群,包括: A. monanthes 复合体 (A. formosum, A. monanthes, A. resiliens),铁角蕨 A. trichomanes 复合体 (A. trichomanes subsp. inexpectans, A. trichomanes 复合体 (A. trichomanes subsp. inexpectans, A. trichomanes subsp. quadrivalens, A. trichomanes subsp. trichomanes),欧亚铁 角蕨 A. viride 以及 A. ×lauii。用于分析核基因 pgiC 片段的 外类群选取与倒挂铁角蕨亲缘关系密切并已有序列提交 GenBank 的欧亚铁角蕨 (James 等, 2008)。

2 研究结果

2.1 流式细胞分析

流式细胞分析的结果(图1)显示:江苏铁 角蕨的C值为18.28 pg/2C,庐山铁角蕨的C值为 18.25 pg/2C,日本产的二倍体 A. oligophlebium C 值为9.04 pg/2C。与 A. oligophlebium 相比,江苏 铁角蕨和庐山铁角蕨的细胞倍性可能为四倍体。

2.2 叶绿体基因序列构建的进化树结果分析

四条叶绿体 DNA 片段(tmL-tmF、tmG-tmR、 rps4-tmS 以及 rbcL)的整合序列长度共4155 bp, 总计有 238 个变异位点,其中 162 个变异位点为 信息位点。然而江苏铁角蕨和庐山铁角蕨的叶绿 体 DNA 片段序列仅有 5 个变异位点的差异,这 一结果显示了二者在遗传上不存在种间差异,应 该为同一个物种。

对整合的 4 条叶绿体 DNA 片段的序列数据 矩阵使用 PAUP4.0 的最大简约分析, PhyML 3.0 的最大似然分析和 MrBayes3.1.2 的贝叶斯分析 得到的系统发育树的拓扑结构是一致的,得到支 持率较好的 5 个分支(图 2),并与外类群聚成 姐妹类群。五个分支中的 4 个分支分别包含了倒 挂铁角蕨, A. shimurae、A. boreale 和日本的 A. oligophlebium 几个类群, 而江苏铁角蕨和庐山铁角 蕨聚在了同一个进化支中。这一结果支持倒挂铁 角蕨复合体是一个独立的由几个物种组成的复合 体种。

2.3 核基因 pgiC 序列构建的进化树结构分析

测序得到的核基因 *pgi*C 的序列长度为 645~737 bp,在 263 和 564 bp 处分别有一个 23 bp 和 92 bp 的长片段插入,总计有 93 个变异位点,其



图 1 流式细胞分析日本产的 A. oligophlebium、江苏铁角蕨与 庐山铁角蕨的荧光信号图谱比较,箭头表示为内参照 *Glycine max*, count 为细胞核数目



中有 55 个变异位点为信息位点。最大简约性、 最大似然和贝叶斯分析得到拓扑结构一致的系统 发育树,显示几个支持率较好的分支(图 3), 其中倒挂铁角蕨、A. boreale 和 A. shimurae 的不同 拷贝同时聚在相同的分支中,显示这 3 个种间存 在杂交和基因重组。江苏铁角蕨和庐山铁角蕨均 具有两个不同的拷贝,相似的两个拷贝分别聚在 了同一个分支中,结果显示这一类群与其他的基 因组不存在杂交重组。

3 讨论

3.1 江苏铁角蕨与庐山铁角蕨的关系

通过仔细对比江苏铁角蕨和庐山铁角蕨的模 式标本(PE:070164; NAS:75014)和原始文献 描述(江苏植物研究所,1977; 吴兆洪,1989), 我们发现这两个种在根状茎鳞片、叶柄、羽片、 叶脉及孢子囊群形态特征上均比较相似。本研究 通过流式细胞分析发现两个种的基因组大小基本 一致,分别为18.25 pg/2C和18.28 pg/2C。对4 个叶绿体 DNA 片段及一个核基因片段的测序表 明江苏铁角蕨和庐山铁角蕨序列信息基本一致。 上述研究结果均支持英文版中国植物志对该类群 的处理,即把庐山铁角蕨处理为江苏铁角蕨的异 名(Lin 和 Viane, 2012)。

3.2 江苏铁角蕨的系统位置

分子系统发育的研究结果显示倒挂铁角蕨、 A. shimurae、A. boreale、日本产的A. oligophlebium、 江苏铁角蕨和庐山铁角蕨聚成了一个独立的分 支。这一结果支持倒挂铁角蕨复合体是由几个物 种组成的复合体种(Schneider 等, 2004, 2005)。 江苏铁角蕨与庐山铁角蕨均聚在了倒挂铁角蕨复 合体的分支中,显示江苏铁角蕨和庐山铁角蕨为 组成倒挂铁角蕨复合体的成员之一。

在形态特征上,江苏铁角蕨和庐山铁角蕨与 A. boreale 比较相似,二者都是组成倒挂铁角蕨复 合体的成员中唯一没有在叶片上生成无性繁殖的 芽孢的两个类群。本文分子系统发育的研究结果 也支持江苏铁角蕨和庐山铁角蕨与 A. boreale 之间 存在杂交现象且关系较近。然而,我们的研究结 果也显示了这一类群与日本产的 A. oligophlebium 之间也存在较近的亲缘关系(图 2),支持 Matsumoto 等(2003)认为 A. boreale 和 A. oligophlebium



图 2 对叶绿体基因片段序列数据进行最大似然法分析得到的系统发育树。系统发育分析的支持率表示顺序为: 最大简约法和最大似然法的靴带支持率(MP/ML)和贝叶斯分析得到的后验率

Fig.2 Maximum Likelihood phylogeny of the chloroplast dataset. Node support is indicated for all three analyses: maximum parsimony/maximum likelihood/Bayesian inference in bootstrap percentage and posterior probabilities, respectively



图 3 对核基因 pgiC 序列进行最大似然法分析得到的系统发育 树。系统发育分析的支持率表示顺序为:最大简约法、最大似 然法的靴带支持率 (MP/ML) 和贝叶斯分析得到的后验率 Fig.3 Maximum Likelihood phylogeny of the nuclear pgiC. Node support is indicated for all three analyses: maximum parsimony/maximum likelihood/Bayesian inference in bootstrap percentage and posterior probabilities, respectively. - supports value under 50%

之间存在杂交现象的观点(Matsumoto, 1975; Matsumoto等, 2003)。

3.3 江苏铁角蕨的多倍体起源

蕨类植物同大多数种子植物一样, 叶绿体基

因的遗传物质是母性遗传 (Gastony 和 Yatskievych, 1992; Vogel 等, 1998), 而核基因揭示的是双亲 遗传物质的来源, 它具有来自不同起源亲本的不 同拷贝,这些拷贝会分布在核基因构建的系统发 育树的不同分支中,形成在系统发育树上重复出 现的分类群名称。所以,通过比较分析两个基因 组即叶绿体基因片段和核基因构建的系统树的拓 扑结构的差异,可以推测其多倍体类群可能的母 本和父本遗传物质的来源。

倒挂铁角蕨四倍体类群的不同拷贝同时和 A. boreale 以及 A. shimurae 的拷贝聚在相同的分支 中,显示这几个类群间存在遗传物质的交流,为异 源多倍体。这一结论支持 Matsumoto 等(2003)的 观点,认为倒挂铁角蕨、A. boreale 和 A. shimurae 间存在自然杂交的现象。确定江苏铁角蕨和庐山 铁角蕨的细胞倍性还需要细致的细胞学的研究, 我们通过流式细胞分析,初步认为这一类群可能 为四倍体。江苏铁角蕨和庐山铁角蕨分别具有两 个不同的拷贝,其中相似的两个拷贝两两聚在了 一个分支中,显示这一类群可能是同源多倍体,与 其他基因组可能不存在杂交重组。但是,由于可能 存在谱系分选事件及基因拷贝丢失的影响,该类群 多倍体的起源方式的确定还需要引入更多的核基 因片段建立多个系统发育树来进行比较研究。

〔参考文献〕

- 洪德元, 1990. 植物细胞分类学 [M]. 北京: 科学出版社
- 江苏省植物研究所,1977. 江苏植物志(上册)[M]. 南京: 江苏 科学技术出版社
- 吴兆洪, 1999. 中国植物志 第4卷第2分册 [M]. 北京:科学出版社
- Akaike H, 1974. A new look at the statistical model identification [J]. *IEEE Transactions on Automatic Control*, **19**: 716–723
- Beck JB, Windham MD, Yatskievych G et al., 2010. A diploids-first approach to species delimitation and interpreting polyploid evolution in the fern genus Astrolepis (Pteridaceae) [J]. Systematic Botany, 35: 223–234
- Chang YF, Li J, Lu SG et al., 2013. Species diversity and reticulate evolution in the Asplenium normale complex (Aspleniaceae) in China and adjacent areas [J]. Taxon, 62: 673—687
- Dolezel J, Greilhuber J, Suda J, 2007. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry [J]. Nature Protocols, 2: 2233—2244
- Doyle JJ, Doyle JL, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh tissue [J]. *Phytochemistry*, **19**: 11–15
- Ebihara A, Nitta JH, Ito M, 2010. Molecular species identification with rich floristic sampling: DNA barcoding of the pteridophyte flora of Japan [J]. *PloS ONE*, 5: 15–36
- Gastony GJ, Yatskievych G, 1992. Maternal inheritance of the chloroplast and mitochondrial genomes in cheilanthoid ferns [J]. American Journal of Botany, 79: 716–722
- Grant V, 1981. *Plant Speciation*, 2nd ed [M]. New York: Columbia University Press
- Grusz AL, Windham MD, Pryer KM, 2009. Deciphering the origins of apomictic polyploids in the *Cheilanthes yavapensis* complex (Pteridaceae) [J]. *American Journal of Botany*, 96: 1636– 1645
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V et al., 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-lieklihood phylogenies: assessing the performance of PhML 3.0 [J]. Systematic Biology, 59: 307-321
- Huelsenbeck JP, Ronquist F, 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny [J]. Bioinformatics, 17: 754—755
- Ito H, 1972. A new variety of Asplenium normale [J]. The Journal of Japanese Botany, 47: 186—187
- Iwatsuki K, 1995. Flora of Japan [M]. Tokyo: Kodansha
- James KE, Schneider H, Ansell SW et al., 2008. Diversity arrays technology (DArT) for pan-genomic evolutionary studies of nonmodel organisms [J]. PLoS ONE, 3: E1682—1694
- Kurata S, 1963. Notes on Japanese ferns (29) [J]. Journal of Geobotany (Kanazawa), 11: 98–102
- Lin YX, Viane R, 2012. Flora of China: Aspleniaceae [M]. Beijing:

Science Press; St. Louis, Missouri: Missouri Botanical Garden Press

- Matsumoto S, Iwashina T, Kitajima J et al., 2003. Evidence by flavonoid markers of four natural hybrids among Asplenium normale and related species (Aspleniaceae) in Japan [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 31: 51-58
- Matsumoto S, 1975. Cyto-ecological study of three types of Asplenium normale [J]. Journal of the Nippon Fernist Club, 2: 338-340
- Nakaike T, 1992. New Flora of Japan, Pteridophyta, Revised & Enlarged [M]. Tokyo: Shibundo
- Posada D, 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging [J]. Molecular Biology Evolution, 25: 1253—1256
- Schneider H, Ranker TA, Russell SJ et al., 2005. Origin of the endemic fern genus Diellia coincides with the renewal of Hawaiian terrestrial life in the Miocene [J]. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences, 272: 455–460
- Schneider H, Russell SJ, Cox CJ et al., 2004. Chloroplast phylogeny of asplenioid ferns based on rbcL and trnL-F spacer sequences (Polypodiidae, Aspleniaceae) and its implications for biogeography [J]. Systematic Botany, 29: 260-274
- Soltis DE, Buggs RJA, Doyle JJ et al., 2010. What we still don't know about Polyploidy [J]. Taxon, 59: 1387-1403
- Swofford DL, 2002. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods). Version 4 [M]. Mass: Sinauer Associates, Sunderland
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G et al., 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA [J]. Plant Molecular Biology, 17: 1105-1109
- Trewick SA, Morgan-Richards M, Russell SJ et al., 2002. Polyploidy, phylogeography and Pleistocene refugia of the rockfern Asplenium ceterach: evidence from chloroplast DNA [J]. Molecular Ecology, 11: 2003—2012
- Van den Heede CJ, Viane RLL, Chase MW, 2003. Phylogenetic analysis of Asplenium subgenus Ceterach (Pteridophyta: Aspleniaceae) based on plastid and nuclear ribosomal ITS DNA sequences [J]. American Journal of Botany, 90: 481—495
- Vogel JC, Russel SJ, Rumsey FJ et al., 1998. Evidence for maternal transmission of chloroplast DNA in the genus Asplenium (Aspleniaceae, Pteridophyta) [J]. Acta Botanica, 111: 247—249
- Wang ZR, 1988. A preliminary report on the cytology of some species of Asplenium from China [A]. In: Shing KH, Kramer KU (eds.), Proceedings of the International Symposium on Systematic Pteridology [M]. Beijing: China Science and Technology Press
- Wang ZR (王中仁), Wang KQ (王可青), Zhang F (张方) et al., 2003. A biosystematic study on Aspleniumsarelii complex [J]. Acta Botanica Sinica (植物学报), **45**: 1—14
- Wu ZH (吴兆洪), 1989. Materials of Chinese Aspleniaceae (I) [J]. Bulletin of Botanical Research (植物研究), 2: 79—95