

## 利用 SSCP 建立骨碎補科植物 *LEAFY* 基因之 PCR 引子以探討陰石蕨複合種群之親緣關係

陳正為<sup>1)</sup> 郭立園<sup>2)</sup> 李文汕<sup>3)</sup> 邱文良<sup>4)</sup>

關鍵字：骨碎補科、*LEAFY*、低複份核基因、親緣關係、複合種群

**摘要：**複合種群的網狀演化在蕨類植物中一直是個受到關注的題目，以 DNA 序列重建物種的親緣關係，已然成為近代釐清網狀演化的主要方法。具有雙親遺傳及演化快速特性的低複份核基因，特別適合做為探討網狀演化的分子標記，然而在蕨類植物中卻僅有非常少數的片段被發表。本研究利用 SSCP 針對骨碎補科植物設計低複份核基因 *LEAFY* 之 PCR 引子，以探討陰石蕨複合種群之網狀演化。親緣關係樹支持引子所增幅片段之同源性，而陰石蕨複合種群內高度的遺傳變異則暗示可能有隱蔽種的存在。本研究結果顯示具有高度變異的 *LEAFY* 基因可做為探討低階分類群問題之分子標記。

### 前 言

生物細胞內含有兩套以上染色體組之個體稱之為多倍體(polyploidy)，而雜交(hybrid)指的是不同演化譜系之間產生橫向的基因交流。長久以來多倍體化與雜交事件被認為在基因多樣性的維持與物種演化上扮演重要的角色(Stebbins, 1950; Ohno, 1970; Rieseberg, 1997)。然而當多倍體化與雜交事件發生於同一個譜系之中時，演化經常呈現複雜的網狀結構而非常見的二分分支，稱之為網狀演化(reticulate evolution)。

- 
- 1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。
  - 2) 國立台灣大學生態與演化生物學研究所博士班研究生。
  - 3) 國立中興大學園藝學系副教授。
  - 4) 台灣林業試驗所植物園組副研究員，通訊作者。

Grant(1971)在其著作《Plant speciation》中將複合種群(species complex)定義為：一群種內形態變異大，造成彼此間界線模糊的物種。涉及多倍體化與雜交事件之網狀演化則是複合種群所形成的主要原因。陰石蕨(*Humata repens* (L.f.) Diels)為骨碎補科常綠多年生附生植物，是本科植物中分布最廣的分類群之一。Nootboom(1994)曾在其骨碎補科專論中提到，陰石蕨屬中有許多分類群在形態上呈現連續性變異，且彼此之間存在中間型，因此將本屬超過 80%具有二至四回羽狀複葉的分類群歸併至陰石蕨下。由於形態上的連續性變異，本研究將其定義為一複合種群。

早期研究網狀演化的方法包括了比較形態上的特徵、計算染色體數目及觀察染色體減數分裂時期的配對情形等(Warren and Wagner, 1954; Tryon, 1957; Gillespie, 1962; Hauke, 1963)。由於涉及多倍體化與雜交事件增加了問題的複雜度，僅利用早期的方法通常無法有效釐清各分類群間之關係。隨著分子生物學的快速發展，近年來許多研究分別利用質體 DNA 與核 DNA 兩種不同遺傳特性的分子標誌重建親緣關係，再從分別重建的兩種親緣關係樹所產生的不一致性來確認多倍體起源與雜交事件，這樣的方法釐清了許多複合種群的問題(Ebihara *et al.*, 2005; Popp and Oxelman, 2007; Lihova *et al.*, 2008; Rousseau-Gueutin *et al.*, 2009; Grusz *et al.*, 2009)。

蕨類植物中已有許多質體 DNA(主要為葉綠體)的引子序列被發表，相對而言核 DNA 僅有少數的片段可供選擇。直至目前為止，大多數的核 DNA 序列來自於核糖體。雖然核糖體基因具有遺傳自雙方親本的特性，能夠反映出網狀演化的歷史，然而許多研究指出一致性演化(concerted evolution)的現象普遍存在於核糖體基因中，因而導致無法得到真實的演化樹。細胞核內基因(nuclear genes)擁有大量的獨立基因座且遺傳自雙方親本，相較於質體基因片段擁有更快的演化速率，對於低階的分類階層有較高的解析力，因此特別適合作為釐清網狀演化的分子工具。近年來在開花植物中有越來越多的研究成功的建立低複份核基因(low-copy nuclear genes)分子標誌，顯示其重建網狀演化歷史的可行性(Lihova *et al.*, 2008; Rousseau-Gueutin *et al.*, 2009)。然而在蕨類植物中卻只有 *LEAFY*、*PgiC* 與 *gapCp* 等少數片段曾經被提出(Ishikawa *et al.*, 2002; Ebihara *et al.*, 2005; Shepherd *et al.*, 2008; Schuettpelz *et al.*, 2008)。

由於核基因片段可能含有長度相近的數個等位基因或複份基因，即使 PCR 產物在 agarose gel 上呈現單一條帶，還是無法利用直接定序的方式來檢測 PCR 產物的變異。傳統上利用 cloning 技術來分離單一產物(Small *et al.*, 2004)，然而這樣的方法不但經常會得到許多重複的序列，造成時間與金錢上的浪費，且過程中造成的 PCR error 也難以避免。為了更有效率的檢測 PCR 產物之多型性，本研究利用單股結構多型性(single strain conformation polymorphism, SSCP)，以骨碎補科植物為材料，針對低複份核基因 *LEAFY* 之 intron1 區域，重新設計骨碎補科專一性引子，檢測 PCR 產物之多型性及所得到序列之同源性。並且以 SSCP 分析方法進一步探討該科內陰石蕨複合種群的親緣關係。

## 材料方法

### 一、引子設計

比較基因庫(NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中已發表的陰地蕨(*Botrychium*)及莢果蕨(*Matteuccia*)*LEAFY* 序列(GenBank accession AF230077, AF105109; Frohlich and Parker, 2000), 尋找 *LEAFY* 基因序列上適合設計引子的區域。首先針對 intron 1 區域設計通用性的引子 POLFY fMEMG 及 POLFY rGEDG, 將骨碎補科植物各屬代表性材料基因片段增幅, 接著再由所得到的序列設計骨碎補科專一性引子 LFY F1 及 LFY R1, 最後為了配合 SSCP 的操作, 設計骨碎補科植物專一性引子 LFY F2 及 LFY R2 以增幅較短的片段。詳細的引子序列列於表 1, 本研究所有的引子皆設計在轉譯區域(coding region)的表現子(exon)上, 引子相對位置如圖 1。

表 1. 本研究所設計之引子序列

Table 1. Primers sequence designed in this study.

引子	序列 5' to 3'	類別
POLFY fMEMG	ATGGARATGGGYTTCACCTGT	通用
POLFY rGEDG	TCATCMCCRTCCTCACCAG	通用
LFY F1	AACATGATGGAGCAAGARATAGATGATGT	專一性
LFY R1	TCATCCCCSTCCTCACCAG	專一性
LFY F2	CAGATGATAGTGGCATGGTTG C	SSCP
LFY R2	GAGTTCAAATTC AAGGGACCATTTGTG	SSCP

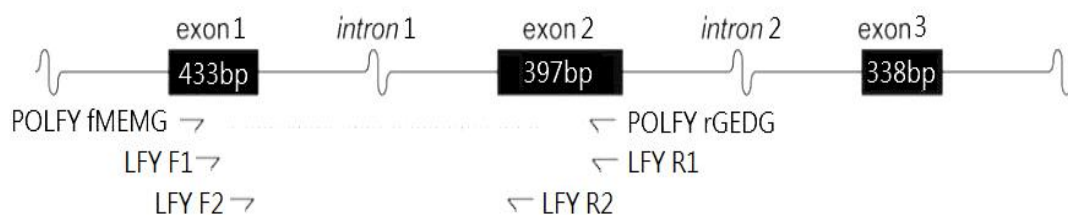


圖 1. 本研究中所使用的 *LEAFY* 序列片段及引子位置。表現子及內含子之編號依據莢果蕨之 *LEAFY* 基因(GenBank accession AF105109; Frohlich and Parker, 2000)。

Fig. 1. Portion of the *LEAFY* gene used in this study, with priming sites indicated. Exon and intron numbers follow those given for the *Matteuccia LEAFY* gene (GenBank accession AF105109; Frohlich and Parker, 2000).

## 二、植物材料

為了設計專一性引子及檢測所增幅序列之同源性，於骨碎補科植物中的各屬取樣兩種以上材料做為代表，所有取樣均為二倍體以簡化實驗結果，骨碎補科屬級分類系統依照 Kato and Tsutsumi(2008)。陰石蕨複合種群材料主要採集自台灣各地區，包含觀察到的不同形態變異與不同倍體數，部分材料採集於國外地區。另外以蓀蕨屬植物 *Oleandra wallichii* 做為外群，詳細材料資訊列於表 2。

表 2. 本研究樣本之採集資訊及倍體性

Table 2. Collecting information and ploidy of materials used in this study.

分類群	代號	採集號	地點	倍體性
<i>Oleandra wallichii</i>	H169	Wade s.n.	台灣	-
<i>Davallodes hirsuta</i>	H184	Wade 869	菲律賓	二倍體
<i>Davallodes hymenophylloides</i>	H164	Wade 1099	印尼	二倍體
<i>Wibelia denticulata</i>	H185	Wade 872	印尼	二倍體
<i>Wibelia divaricata</i>	H153	K 013731	台灣	二倍體
<i>Araiostegiella clarkie</i>	H175	Wade 977	台灣	二倍體
<i>Davallia solida</i>	H215	Wade 1124	台灣	二倍體
<i>Davallia pentaphylla</i>	H154	Wade 1093	印尼	二倍體
<i>Davallia tyermanii</i>	H216	Wade s.n.	台灣	二倍體
<i>Davallia trichomanoides</i>	H203	Wade 1112	印尼	二倍體
<i>Humata sessilifolia</i>	H182	Wade 1115	印尼	二倍體
<i>Humata vestita</i>	H195	Wade 1125	印尼	二倍體
<i>Humata pectinata</i>	H187	Wade 758	台灣	二倍體
<i>Humata repens</i> complex	H051	Wade 726	台灣	三倍體
<i>Humata repens</i> complex	H210	Wade 398	台灣	三倍體
<i>Humata repens</i> complex	H206	Wade 951	台灣	四倍體
<i>Humata repens</i> complex	H191	Wade 873	菲律賓	二倍體

備註：-表示未知。

Note: - indicated unknown.

## 三、DNA 萃取、PCR、單股結構多型性分析及定序

以新鮮或乾燥幼葉為材料，使用 Geneaid Plant Genomic DNA Mini Kit 萃取 DNA，最後將 DNA 溶於 100µl 之無菌水。利用電泳及分光光度計確認產物濃度後，稀釋至適當濃度存放於-20°C 冰箱進行 PCR 用，原液保存於-80°C。

PCR 反應的總體積為 15 $\mu$ l，其中包含 1.5 $\mu$ l 稀釋十倍的 DNA 聚合酶緩衝液，1.2 $\mu$ l 的 dNTP，各 1.5 $\mu$ l 的雙方引子(10mM)、0.1 $\mu$ l 的 DNA 聚合酶、2 $\mu$ l 的 DNA 與 7.2 $\mu$ l 之無菌水。反應先以 94 $^{\circ}$ C 處理 5 分鐘，使雙股 DNA 呈現單股狀態，再以 94 $^{\circ}$ C 處理 1 分鐘、60-65 $^{\circ}$ C 處理 1.5 分鐘、72 $^{\circ}$ C 處理 0.5-1 分鐘(溫度及時間隨不同引子而異)，進行 35 次循環，最後保持 72 $^{\circ}$ C 處理 10 分鐘，保存 PCR 產物於 4 $^{\circ}$ C 下。

單股結構多型性(SSCP)分析原理如圖 2。實驗方法大致依照 Watano *et al.*(2004)，由於 SSCP 分析具有序列長度的限制，所有進行分析之 PCR 產物皆利用引子 LFY F2 配合 LFY R2 增幅而來。首先將 PCR 產物於 formamide(含 loading dye)中加熱至 98 $^{\circ}$ C 進行變性(denatured)，接著以 polyacrylamide Gel(7ml Acryamide/Bis = 29:1, 2ml glycerol, 1ml 10X TBE buffer, 8 $\mu$ l TEMED, 240 $\mu$ l APS)在 350 V 電壓下進行電泳 24 小時，最後利用銀染(silver staining)觀察 PCR 產物之條帶數量。將所有條帶自膠體上切下，使用 Geneaid Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit 將膠體內之單股 PCR 產物純化回收，依照原 PCR 條件再進行一次反應後，委託基隆米克斯公司進行定序。

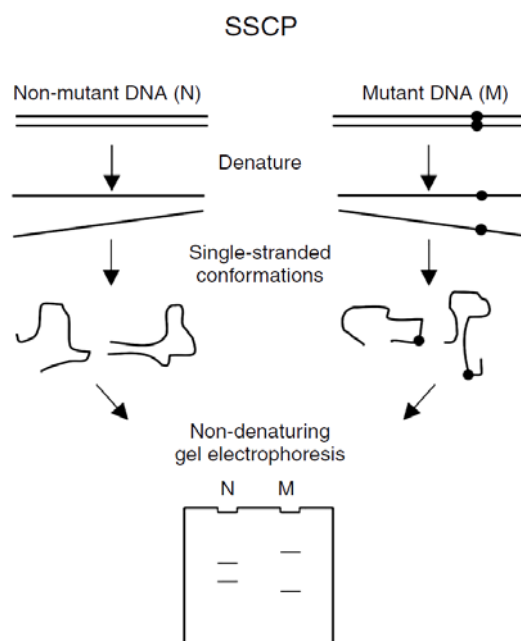


圖 2. PCR-based SSCP 分析原理(Small *et al.*, 2004)。一個點突變的發生(以 DNA 上的黑點表示)導致產生不同的 DNA 單股結構，進而影響 DNA 單股在非變性膠體上的移動性。

Fig. 2. The principle of PCR-based SSCP analysis(after Small *et al.*, 2004). A point mutation (represented by a dot on a DNA strand) leads to the formation of different single-strand conformations of the mutant DNA (M) compared with the nonmutant molecule (N), resulting in differential mobilities in a non-denaturing gel matrix.

#### 四、序列排序及親緣關係分析

將所得到的序列送至 NCBI 基因庫進行比對確認產物後，利用軟體 BioEdit 將序列進行排序，並且以人工校正。所得到的序列矩陣資料使用 Garli(Zwickl, 2006)軟體，以最大概率法(maximum likelihood, ML)方式重建親緣關係樹。並且使用靴帶分析(bootstrap analysis)以獲得各個支序的統計支持度。最後使用軟體 Tree view 及 FigTree 檢視親緣關係樹並標上 bootstrap 數值後將圖形輸出。

## 結 果

#### 一、單股結構多型性分析

本研究於骨碎補科中各屬選取至少兩個二倍體材料進行分析。以專一性引子 FLY F2 配合 FLY R2 於適當溫度( $T_m = 65^\circ\text{C}$ )下增幅 *LEAFY* intron 1 片段，所有個體之 PCR 產物在 agarose 膠體上均為單一條帶，且長度與預期的片段相符。然而直接定序後，發現多數材料非單一產物，因此將 PCR 產物材料進行 SSCP 分析。

二倍體個體於 polyacrylamide 膠體上呈現 2 至 3 個條帶。定序後發現在具有 2 個條帶個體的情形中，所得到的 2 條序列完全相同。而在具有 3 個條帶個體的情形中，定序結果顯示其中 2 條序列完全相同，另 1 條則與其他 2 條序列具有 1 至 16 個鹼基的差異。多倍體個體於 polyacrylamide 膠體上呈現 3 個以上的條帶，比較同一個個體的所有序列之間具有 1 至 18 個鹼基的差異。

#### 二、序列資訊

利用 SSCP 技術分離核基因片段 *LEAFY* intron 1 之 PCR 產物，包含 intron 1 之全長及少部分之 exon 1 與 exon 2。共獲得 37 條序列，序列長度變化從 280bp 至 428bp。排序後資料矩陣全長為 473bp，以此資料矩陣進行親緣關係分析。具有變異的特徵佔 22.8% (108bp)，具簡約意義之特徵佔 21.3% (101bp)。24 個長度 1 至 120 個鹼基對之插入或缺失事件，造成不同的分類群在序列長度上有很大的不同。

#### 三、親緣關係分析

將 *LEAFY* 片段資料矩陣以 Maximum Likelihood 方法進行分析，所得到的最可能親緣關係樹( $\ln = -2305.77$ )如圖 3。所有二倍體個體僅具一至兩個等位基因，且每個個體的所有序列皆形成高度支持的支序，基因樹與種間關係相符，證實本研究利用引子 LFY F2 與 LFY R2 所增幅的 *LEAFY* intron 1 序列之同源性。除陰石蕨屬與骨碎補屬的骨碎補節(*D. solida* 與 *D. pentaphylla*)形成一個高度支持的支序(BS=96%)外，其餘各屬均形成高度支持的支序，然而屬間關係呈現多叉狀無法解析。

親緣關係樹顯示陰石蕨複合種群與熱帶陰石蕨(*H. vestita*)及馬來陰石蕨(*H. pectinata*)共同形成一個高度支持的支序(BS=97%)。陰石蕨複合種群中，三倍體個體 H051 的三個

等位基因形成一個獨立的支序，僅有一個鹼基的差異。H210(2n=120=3x)及H206(2n=160=4x)均具有三個等位基因，且彼此間具有 13 至 21 個鹼基的差距。二倍體個體 H191 之兩個等位基因，與 H210 及 H206 的各一個等位基因形成一個獨立的支序，且序列上僅有一個鹼基的差異。

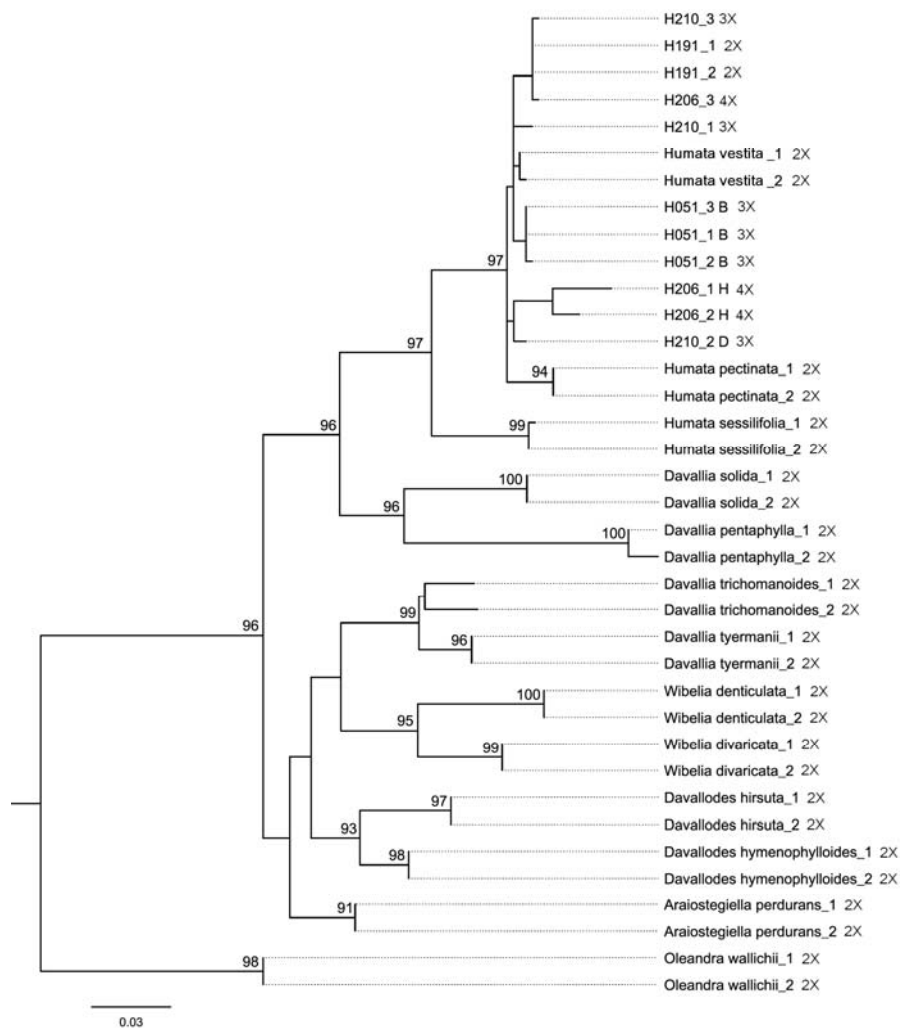


圖 3. 以 Maximum Likelihood 分析核基因片段 *LEAFY* 所得到的骨碎補科植物親緣關係樹。陰石蕨複合種群個體均以代號表示，其後數字為等位基因編號並註記倍體性。僅顯示支持度高於 80% 之值。

Fig. 3. Nuclear phylogeny of Davalliaceae based on *LEAFY*. All the individuals of *H. repens* complex shown in number following with allele number and ploidy level. Bootstrap value under 80% was not shown.

## 討 論

### 一、單股結構多型性分析

SSCP 是一個快速且能夠檢測大量序列多型性的方法，已被大量的應用於生物醫學方面的研究，然而僅有少數演化生物學研究應用此方法(Lessa and Applebaum, 1993; Potts, 1996; Ebihara *et al.*, 2005)。單一複份基因的情形下，同源(homozygote)二倍體與異源(heterozygote)二倍體於 SSCP 膠體上應該分別具有 2 個及 4 個條帶(圖 2)。本研究結果發現多數二倍體個體的確僅有 2 個條帶，經定序後確認為相同產物，顯示其為同源二倍體；但部份材料於膠體上可見 3 個明顯條帶，推測這些材料為異源二倍體。由於四個單股 DNA 其中兩股之結構類似，無法於膠體上解析開來，因此出現 3 個條帶。經定序後確認其中一個條帶具有序列多形性，差異介於 1 至 16 個鹼基。研究結果亦發現多倍體個體具有 3 個以上的條帶，序列之間具有 1 至 18 個鹼基的差異，顯示為異源多倍體。前人研究以 SSCP 技術分離長度約 300bp 之 PCR 產物時，能夠檢測出單一鹼基的差異(Gasser *et al.*, 2006)，本研究所分析的序列長度約為 500bp，序列過長可能是造成膠體解析力無法解析至單一鹼基差異的原因之一。

本研究以 SSCP 技術分離核基因片段 LEAFY 之 PCR 產物，共獲得 37 條序列，雖然 SSCP 膠體尚無法解析至單一鹼基差異，但大多數個體內發現之等位基因少於或等於其倍體性，能夠有效避免 cloning 過程中產生的 PCR error 干擾親緣關係樹之結構，因此獲得較佳品質之序列資料。PCR-SSCP 之解析力會受到 PCR 產物之 GC content 及序列長度(Li *et al.*, 2003)、引子濃度(Cai and Tuitou, 1993)、電泳時溫度(Chen *et al.*, 1995)、緩衝液成分(Kukita *et al.*, 1997)與膠體成分及濃度(Savov *et al.*, 1992)等因子所影響，未來可嘗試利用提高膠體濃度及縮短序列長度等方式增加膠體之解析力。

### 二、陰石蕨複合種群之網狀演化

雜交事件在蕨類植物中經常被報導，許多研究利用外部形態特徵及高比例的不孕性孢子推測其雜交起源(Barrington, 1986; Kuo, 1988; Taylor, 2002; Park and Kato, 2003; Moran and Watkins, 2004; Willis and Nester-Hudson, 2006; Aguiar *et al.*, 2007; Chao *et al.*, 2010)。近年來仰賴分子資料的加入，許多研究得以更進一步確認雜交事件中父母系親本的來源(Hildebrand *et al.*, 2002; Perrie *et al.*, 2003; Ebihara *et al.*, 2005; Terada and Takamiya, 2006; Chang *et al.*, 2009; Grusz *et al.*, 2009)。由於形態上的連續性變異，曾有學者推測雜交事件可能參與陰石蕨複合種群之演化歷史(Nootboom, 1994)。

研究結果顯示陰石蕨複合種群與熱帶陰石蕨及馬來陰石蕨具有非常近的親緣關係，在親緣關係樹上共同形成一個高度支持的支序。複合種群內之遺傳距離反而大於與此兩個分類群之距離，顯示本複合種群為多系群，推測含有一個以上的隱蔽種存在。H206 及 H210 均具有三個等位基因，且彼此間具有較大的遺傳差異(13 至 21 個鹼基)，可能為複合種群內不同隱蔽種間之雜交起源類群。H051 之所有等位基因形成一個單系群，僅有一個鹼基



對之差異，顯示其基因組成較為單純。此三倍體在形態上相對穩定，單純的基因組成可能是主要原因。採集自菲律賓呂宋的二倍體個體(H191)與 H206 及 H210 僅有 1 鹼基對的差異；而採集自印尼爪哇的熱帶陰石蕨與 H051 僅有 4 個鹼基對的差異。序列上的高度相似，顯示此兩個二倍體可能皆為參與陰石蕨複合種群網狀演化的祖先種之一。

### 參 考 文 獻

- Aguiar, S., L. G. Quintanilla, and J. Amigo. 2007. *Blechnum × rodriguezii* hybr. Nov., a deer fern Hybrid from Southern Chile. *Am. Fern J.* 97: 225-229
- Barrington, D. S. 1986. The morphology and cytology of *Polystichum × potteri* hybr. Nov. (= *P. acrostichoides* × *P. braunii*). *Rhodora* 88: 297-313.
- Cai, Q. Q. and I. Touitou. 1993. Excess PCR primers may dramatically affect SSCP efficiency. *Nucl. Acids Res.* 21: 3909-3910.
- Chang, H. M., W. L. Chiou, and J. C. Wang. 2009. Molecular evidence for genetic heterogeneity and the Hybrid origin of *Acrorumohra subreflexipinna* from Taiwan. *Am. Fern J.* 99: 61-77.
- Chao, Y. S., H. Y. Liu, Y. M. Huang, and W. L. Chiou. 2010. Reproductive traits of *Ptris cadierei* and *P. grevilleana* in Taiwan: Implications for their hybrid origins. *Bot. Stud.* 51: 209-216.
- Chen X., T. Baumstark, G. Steger, and D. Riesner. 1995. High resolution SSCP by optimization of the temperature by transverse TGGE. *Nucl. Acids Res.* 23: 4524-4525.
- Ebihara, A., H. Ishikawa, S. Matsumoto, S. J. Lin, K. Iwatsuki, M. Takamiya, Y. Watano, and M. Ito. 2005. Nuclear DNA, chloroplast DNA, and ploidy analysis clarified biological complexity of the *Vandenboschia radicans* complex (Hymenophyllaceae) in Japan and adjacent areas. *Am. J. Bot.* 92: 1535-1547.
- Frohlich, M. W. and D. S. Parker. 2000. The mostly male theory of flower evolutionary origins: from genes to fossils. *Syst. Bot.* 25: 155-170.
- Gasser, R. B., M. Hu, N. B. Chilton, B. E. Campbell, A. J. Jex, D. Otranto, C. Cafarchia, I. Beveridge, and X. Zhu. 2006. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for the analysis of genetic variation. *Nat. Protoc.* 2006: 3121-3128
- Gillespie, J. P. 1962. A theory of relationships in the *Lycopodium inundatum* complex. *Am. Fern J.* 52: 19-26.
- Grant, V. 1971. *Plant speciation*. Columbia University Press: New York, USA.
- Grusz, A. L., M. D. Windham, and K. M. Pryer. 2009. Deciphering the origins of apomictic polyploids in the *Cheilanthes yavapensis* complex (Pteridaceae). *Am. J. Bot.* 96: 1636-1645.
- Hauke, R. L. 1963. *Ataxonomic monograph of the genus Equisetum subgenus Hippochaete*.

- Nova Hedw. Beih. 8: 315-323.
- Hilbebrand, T. J., C. H. Haufler, J. P. Therrien, and C. Walters. 2002. A New hybrid *Polystichum* provides insights concerning the systematic of *Polystichum scouleri* and its sympatric congeners. *Am. Fern J.* 92: 214-228.
- Ishikawa, H., Y. Watano, K. Kano, M. Ito, and S. Kurit. 2002. Development of primer sets for PCR amplification on the PgiC gene in ferns. *J. Pl. Res.* 115: 65-70.
- Kato, M. and C. Tsutsumi. 2008. Generic classification of Davalliaceae. *Acta Phytotax. Geobot.* 59: 1-14.
- Kukita Y., T. Tahira, S. S. Sommer, and K. Hayashi. 1997. SSCP analysis of long DNA fragments in low pH gel. *Hum. Mutat.* 10: 400-407.
- Kuo, C. M. 1988. A new *Asplenium* hybrid from Taiwan. *Bot. Bull. Academia Sinica* 29: 109-111.
- Lessa, E. P. and G. Applebaum. 1993. Screening techniques for detecting allelic variation in DNA sequences. *Mol. Ecol.* 2: 119-129.
- Li, W., F. Gao, J. Liang, C. Li, H. Zhang, and Z. Tang. 2003. Estimation of the optimal electrophoretic temperature of DNA singlestrand conformation polymorphism by DNA base composition. *Electrophoresis* 24: 2283-2289.
- Lihova, J., K. K. Shimizu, and K. Marhold. 2006. Allopolyploid origin of *Cardamine asarifolia* (Brassicaceae): incongruence between plastid and nuclear ribosomal DNA sequences solved by a single-copy nuclear gene. *Mol. Phylogenet. Evol.* 39: 759-786.
- Moran, R. C. and J. E. Watkins Jr. 2004. *Lomariopsis* × *farrarii*: a new hybrid fern between *L. japurensis* and *L. vestita* (Lomariopsidaceae) from Costa Rica. *Brittonia* 56: 205-209.
- Nooteboom, H. P. 1994. Notes on Davalliaceae II. A revision of the genus *Davallia*. *Blumea* 39: 151-214.
- Ohno, S. 1970. *Evolution by gene duplication*. Springer-Verlag, New York.
- Park, C. H. and M. Kato. 2003. Apomixis in the interspecific triploid hybrid fern *Cornopteris christenseniana* (Woodsiaceae). *J. Plant. Res.* 116: 93-103.
- Perrie, L. R., P. J. Brownsey, P. J. Lockhart, and M. F. Large. 2003. Evidence for an allopolyploid complex in New Zealand *Polystichum* (Dryopteridaceae). *New Zealand J. Bot.* 41: 189-215.
- Popp, M. and B. Oxelman. 2007. Origin and evolution of North American polyploidy *Silene* (Caryophyllaceae). *Am. J. Bot.* 94: 330-349.
- Potts, W. K. 1996. PCR-based cloning across large taxonomy distances and polymorphism detection: MHC as a case study. In: *Molecular Zoology* (eds. Ferraris J. D. and S. R. Palumbi), pp. 181-194. Wiley-Liss, Inc., New York.

- Rieseberg, L. H. 1997. Hybrid origins of plant species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 28: 359-389.
- Rousseau-Gueutin, M., A. Gaston, A. Aïnouche, M. L. Aïnouche, K. Olbricht, G. Staudt, L. Richard, and B. Denoyes-Rothan. 2009. Tracking the evolutionary history of polyploidy in *Fragaria* L. (strawberry): New insights from phylogenetic analyses of low-copy nuclear genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 51: 515-530.
- Savov, A., D. Angelicheva, A. Jordanova, A. Eigel, and L. Kalaydjieva. 1992. High percentage acrylamide gels improve resolution in SSCP analysis. *Nucl. Acids Res.* 20: 6741-6742.
- Schuettpelz, E., A. L. Grusz, M. D. Windham, and K. M. Pryer. 2008. The utility of nuclear gapCp in resolving polyploidy fern origins. *Syst. Bot.* 33: 621-629.
- Shepher, L. D., L. R. Perrie, and P. J. Brownsey. 2008. Low-copy nuclear DNA sequences reveal a predominance of allopolyploids in a New Zealand *Asplenium* fern complex. *Mol. Phylogenet. Evol.* 49: 240-248.
- Small, R. L., R. C. Cronn, and J. F. Wendel. 2004. Use of nuclear genes for phylogeny reconstruction in plants. *Aust. Syst. Bot.* 17: 145-170.
- Stebbins, G. L. 1950. *Variation and evolution in plants*. New York, USA: Columbia University Press.
- Terada, Y. and M. Takamiya. 2006. Cytological and genetic study of two putative hybrids and their parents of *Athyrium* (Woodsiaceae; Pteridophyta) in Yakushima Island, Southwestern Japan. *Acta Phytotax. Geobot.* 57: 95-106.
- Taylor, W. C. 2002. *Isoetes* × *herb-wagneri*, an interspecific hybrid of *I. bolanderi* × *I. echinospora* (Isoetaceae). *Am. Fern J.* 92: 161-163.
- Tryon, A. F. 1957. A revision of the fern genus *Pellaea* section *Pellaea*. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 44: 125-193.
- Warren, H. and W. H. Jr., Wagner. 1954. Evolution in the Appalachian *Asplenium*. *Evolution* 8: 103-118.
- Watano, Y., A. Kanal, and N. Tani. 2004. Genetic structure of hybrid zones between *Pinus pumila* and *P. parviflora* var. *pentaphylla* (Pinaceae) revealed by molecular hybrid index analysis. *Am. J. Bot.* 91: 65-72.
- Willis, T. E. and J. E. Nester-Hudson. 2006. Characterization of a *Thelypteris* hybrid from Walker county, Texas. *Am. Fern J.* 96: 127-133.
- Zwickl, D. J. 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph.D. dissertation, The University of Texas at Austin.

## Development of PCR Primer Sets of the *LEAFY* Gene in Davalliaceae by SSCP and the Application to the Phylogeny of *Humata repens* Complex

Cheng-Wei Chen<sup>1)</sup> Li-Yaung Kuo<sup>2)</sup> Wen-Shann Lee<sup>3)</sup> Wen-Liang Chiou<sup>4)</sup>

Key words: Davalliaceae, *LEAFY*, Low-copy nuclear gene, Phylogeny, Species complex

### Summary

The reticulate evolution of species complex has long been an interesting topic. By the progress of molecular biology, the application of DNA-sequence data to decipher reticulate evolution is now frequently implemented currently. With the advantages of bi-parental inheritance and high rate of evolution, low-copy nuclear genes can provide valuable information for resolving reticulate evolution. However, only a few nuclear markers have been developed specifically for ferns. In this study, we present new primer sequences for the amplification of a portion of the nuclear *LEAFY* gene in Davalliaceae using SSCP then test in *Humata repens* complex. Phylogenetic analysis shows othology of the sequences amplified. The high divergence of the sequences suggests that there are several cryptic species within the *H. repens* complex. Our results also indicate that *LEAFY* holds considerable potential for addressing low taxonomy level questions.

---

1) Graduate student in MS. Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Ph. D student, Institute of Ecology and Evolutionary Biology, National Taiwan University.

3) Associate professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

4) Associate researcher, Division of Botanical Garden, Taiwan Forestry Research Institute.  
Corresponding author.