

## 利用植物 DNA 条形码构建亚热带森林群落系统发育关系 ——以鼎湖山样地为例\*

裴男才

(中国林业科学研究院热带林业研究所, 广东 广州 510520)

**摘要:** 在群落水平上重建植物系统发育关系是当前植物系统学研究的一项重要内容; DNA 条形码技术的出现为这一工作的开展提供了便利。本文选取国际通用的植物 DNA 条形码 (*rbcL*, *matK* 和 *psbA-trnH*), 对鼎湖山大样地的 183 个物种 (隶属于 24 目 51 科 110 属) 进行测序; 分别利用两位点和三位点 DNA 条形码组合构建该样地植物群落的系统发育关系, 并比较不同位点组合构建出的群落系统发育关系的拓扑结构和节点支持率; 最后选出一个具有最好拓扑结构和最高节点支持率的鼎湖山大样地群落系统发育关系。在目、科和属这三个水平上, 三位点条形码片段组合构建的群落系统发育关系与 APG 系统获得较好匹配; 有些进化分支在相应的 APG 系统位置解决得不好, 却在条形码序列构建的系统发育关系中得到了较好解决。表明综合使用不同进化速率的 DNA 条形码片段并采取三位点超级矩阵的组合策略, 在未采用 APG 系统大框架的情况下, 也能快速而又相对准确地构建出鼎湖山亚热带森林植物群落的系统发育关系。

**关键词:** DNA 条形码; 系统发育关系重建; 植物群落; 鼎湖山大样地; 亚热带森林

中图分类号: Q 948.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0845(2012)03-263-08

## Building a Subtropical Forest Community Phylogeny Based on Plant DNA Barcodes from Dinghushan Plot

PEI Nan-Cai

(Research Institute of Tropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Guangzhou 510520, China)

**Abstract:** Reconstructing phylogenies at the community scale remains a fundamental but important work for current researches related to plant systematics, which can be facilitated due to the arising of plant DNA barcodes. We sampled, sequenced, and employed *matK*, *rbcL* and *psbA-trnH* to generate a multi-locus barcode for 20-ha Dinghushan subtropical forest dynamics plot, with 183 angiosperm species belonging to 110 genera (51 families from 24 orders) in South China. Compared to the two-locus barcode (*rbcL+matK*, and *rbcL+psbA-trnH*), the supermatrix of three barcode loci discriminated most of closed related taxa and generated a better-resolved community phylogeny utilizing an unconstraint approach in the Dinghushan plot, providing a first case that a subtropical forest plot with similarly limited taxon sampling with fewer orders and families could also provide significant congruence to the overall angiosperm phylogeny.

**Key words:** DNA barcoding; Phylogenetic reconstruction; Plant community; Dinghushan forest dynamics plot; Subtropical forests

利用 DNA 条形码方法构建现存被子植物的系统发育关系为当前植物系统学研究的发展提供了

新思路, 但也面临着不小的挑战 (Kress 和 Erickson, 2012; Hollingsworth 等, 2011)。在群落水平

\* 基金项目: 中国林业科学研究院热带林业研究所基本科研业务费专项基金 (RITFYWZX201208), 林业公益性行业科研专项 (200804006) 及珠三角森林生态系统定位站研究内容 (2007/66 号)

收稿日期: 2011-12-02, 2012-01-17 接受发表

作者简介: 裴男才 (1984-) 男, 博士, 助理研究员。主要从事植物系统发育和群落生态学方面的研究。E-mail: nancai.pei@gmail.com

上, 简易的群落系统发育关系可以通过包含分子或系统发育演化关系信息的在线软件获得 (如 PhyloMatic) (Webb 和 Donoghue, 2005), 但是通过这种简易方法获得的群落系统发育关系常依赖于在线软件所包含的信息量, 且通常不能得到拓扑结构较好的系统发育关系, 更没有相应的节点支持率; 然而, 即便是这种相对不准确的系统发育关系 (存在较多的 polytomy, 也即多分支拓扑结构; 通常认为二歧分支是得到解决且可被接受的拓扑结构), 在物种信息缺乏, 或是仅有极少量分子方面研究的自然森林群落中也难以获得。因此, 人们急需寻找新方法或技术手段来解决这个难题, DNA 条形码的出现则为此提供了机遇。

生物 DNA 条形码技术最初的目的是通过一段通用的标准 DNA 序列对物种进行识别和鉴定 (Hebert 等, 2003; Kress 等, 2005; CBOL Plant Working Group, 2009)。CBOL (The Consortium for the Barcode of Life) Plant Working Group (国际植物条形码工作组) 推荐叶绿体基因片段 *rbcL* 和 *matK* 作为陆生植物的核心 DNA 条形码。与此同时, 也有学者利用其他候选片段做了大量的比较和验证工作, 提出叶绿体基因间隔区 *psbA-trnH* 和核基因片段 ITS (internal transcribed spacer) 也应作为陆生植物的标准 DNA 条形码核心片段 (Kress 和 Erickson, 2007; Hollingsworth 等, 2011; China Plant BOL Group, 2011)。DNA 条形码可用于构建相应的通用生物条形码文库 (Janzen 等, 2009), 为当前生物多样性研究和保护工作提供重要的资讯和技术平台。此外, 基于 DNA 条形码片段测序所获得的分子序列, 还可用于构建特定生物类群的系统发育关系, 由此促进群落生态学与进化生物学等相关学科的整合与发展 (Kress 等, 2009; Valentini 等, 2009; Gonzalez 等, 2010; 裴男才等, 2011)。

DNA 条形码出现后, 只需使用标准片段对群落内的物种进行测序, 并辅以合适的系统发育树构建方法 (如 *rbcL+matK+psbA-trnH* 超级矩阵) 就可以得到较好的拓扑结构和较高的节点支持率。在热带地区的巴拿马 Barro Colorado Island (BCI) 热带雨林森林样地, 物种多样性较高, 单独使用 DNA 序列建树 (也即 “不受约束树”, an unconstraint tree) 即获得了精确的群落系统发

育关系 (Kress 等, 2009)。在亚热带地区的波多黎各 Luquillo 湿地森林样地, 物种多样性较低, 利用 APG 系统 (APGIII, 2009) 的大框架并对各分支末端的类群使用 DNA 条形码序列的建树方法 (也即 “受约束树”, a constraint tree), 也获得了精确的群落系统发育关系 (Kress 等, 2010)。然而, 在典型的南亚热带森林群落中, 是否单独利用 DNA 条形码序列所构建的群落系统发育关系也能与 APG 基本保持一致, 答案尚不明确。

本研究使用植物 DNA 条形码的两个核心片段 (叶绿体基因 *rbcL* 和 *matK*) 和另一个重要的补充片段 (叶绿体基因间隔区 *psbA-trnH*), 获得该 3 个片段的超级矩阵并构建鼎湖山森林动态样地 183 个物种的群落系统发育关系。求证在物种丰富度较低的亚热带鼎湖山森林样地中, 单独利用 DNA 条形码序列信息所构建的群落系统发育关系与 APG 系统的也能保持一致。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究地点与样品采集

鼎湖山南亚热带 20 hm<sup>2</sup> 森林动态监测大样地位于广东肇庆市鼎湖山国家自然保护区内。该样地建成于 2005 年, 是中国森林生物多样性监测网络 (<http://www.cf-biodiv.org/>) 的关键节点, 同时也是 CTFS 全球网络 (<http://www.ctfs.si.edu/>) 的重要组成部分 (Ye 等, 2008)。该大样地中共有 183 个木本被子植物物种被采集到样品, 涉及 24 目 51 科 110 属 (按 APG 系统; 72 个属含有一个物种, 38 个属含有两个或更多物种, 14 个属含有三个或更多物种), 其中属于木兰类植物分支的有 2 目 2 科 22 种, 属于单子叶植物分支的有 2 目 2 科 2 种, 属于真双子叶植物分支的有 20 目 47 科 159 种。

### 1.2 DNA 提取

本研究利用标准 CTAB 方法 (Doyle 和 Doyle, 1987) 对新鲜的嫩叶片和树皮韧皮部 (如 *Ilex chapaensis*、*Ilex rotunda* 和 *Symplocos wikstroemifolia*) 进行总 DNA 提取, 除实验部分的 DNA 之外, 其余的均保存在 -80 °C 冰柜。对少数富含次生代谢物质或者油脂的物种 (如樟科植物), 则在 CTAB 程序之前增加冰浴的步骤以消除芳香组织的影响 (Khanuja 等, 1999)。

本研究采用一种新的策略使用 DNA 条形码片段进行测序, 既达到数据分析时足够的信息量 (Heath 等, 2008), 又不大幅度增加实验成本: (1) 通过样地数据库提供的树牌号对物种进行定位采样, 咨询植物分类学专家确保物种鉴定准确; (2) 每个物种挑选 1~2 个个

体, 每个个体完成 3 个片段的测序反应, 其中 *rbcL* 只需一个反应, 而 *matK* 由于序列长度在 900 bp 左右, 超过一个反应 600 bp 的限度而需要双向测序, *psbA-trnH* 由于在部分物种中存在 POLY 结构而需要双向测序 (通常是碱基 T 或者 A 的多个连续出现而使得后面的序列峰型混乱, 造成后部分的序列不可用); (3) 将获得的序列在 GenBank 上进行 BLAST 搜索, 如发现序列与原始物种存在明显不一致的情况, 寻找原因并重新采样, 咨询专家, 再次测序, 直到序列的 BLAST 结果与原始物种信息匹配为止。

### 1.3 PCR 扩增, 测序及三片段矩阵组合

本研究 PCR 扩增反应体系为 30  $\mu$ L, 测序引物为叶绿体片段 *rbcL* (长约 540 bp), *matK* (长约 900 bp) 和 *psbA-trnH* (长度范围 300 ~ 800 bp) (视引物类型和测序长度, PCR 扩增反应策略和序列编辑方法稍有不同)。以 *rbcL*, *matK* 和 *psbA-trnH* 的顺序在 MacClade4 中装载的 Se-Al v2.0a 11 Carbon 程序界面上依次排列 (Rambaut, 1996), 获得该 3 个片段的超级矩阵 (Supermatrix)。其中 *rbcL* 片段的进化速率较慢, 在构建群落系统发育关系时保证大框架的相对准确; 而 *matK* 和 *psbA-trnH* 的进化速率较快, 可用于近缘类群的识别和分类, 且需要将 *psbA-trnH* 的序列控制在目或者大科的范围内。具体操作细节可参见相关的研究综述 (裴男才等, 2011)。

### 1.4 鼎湖山样地群落系统发育构建

本研究采用超级矩阵的方法来构建鼎湖山样地植物群落系统发育树。构树方法为最大似然法 (maximum likelihood, ML), 分别比较了 3 种片段组合情况: *rbcL*+*matK*+*psbA-trnH*, *rbcL*+*matK*, 和 *rbcL*+*psbA-trnH*。ML 分析在 CIPRES 超级远程计算机 (Miller 等, 2009) 的 RA $\times$ ML 程序上 (Stamatakis, 2006) 进行操作。本研究从 19 棵拥有相似拓扑结构的系统发育树中选择一棵最优的树作分析, 并将其完成 200 次重复自展运算以获得拓扑结构上的节点支持率。选取 50% 以上的数值作为系统发育树上各节点的支持率, 也即拓扑结构为单系类群的概率。依据系统发育树上节点支持率的高低将进化枝分为 4 大类: 依次为高度支持 (自展支持率  $\geq 85\%$ )、中等支持 (自展支持率  $\geq 70\% \sim 84\%$ )、较弱支持 (自展支持率  $\geq 50\% \sim 69\%$ ) 以及极弱支持或没有支持率 (自展支持率  $< 50\%$ ) (表现为 polytomy 多分歧结构)。将各节点的自展支持率附在拓扑结构最优的系统发育树上后, 得到基于 DNA 序列构建的群落系统发育关系 (也即 barcode phylogeny)。同时, 准备一个 APG 认可的物种名录, 提交到 Phylomatic 在线软件 (与 APG 联网并可实时更新) (Webb 和 Donoghue, 2005) 上运行, 获得鼎湖山样地群落的简易系统发育关系 (也即 phylomatic phylogeny)。随后, 将 barcode phylogeny 上各进化分支的位置在

Mesquite 软件 (Maddison 和 Maddison, 2007) 上作适当调整, 与 phylomatic phylogeny 作比较, 并对照单独利用 DNA 条形码序列构建的群落系统发育关系与 APG 之间的一致性。

## 2 结果

本文采用 RA $\times$ ML 方法, 分别利用 3 种片段组合 (*rbcL*+*matK*, *rbcL*+*psbA-trnH* 以及 *rbcL*+*matK*+*psbA-trnH*) 构建鼎湖山大样地植物群落的系统发育关系。在综合评价了 3 种片段组合所获得的系统发育树的拓扑结构后, 发现三片段组合比两片段组合解决得更好。具体来说, 在目水平上, 三片段组合构建的鼎湖山森林样地 24 个目的条形码群落系统发育关系与 APG 系统能完好匹配 (图 1); 因此后续的分析仅利用这个群落系统发育关系而展开 (表 1)。在全部 51 科中, 有 50 科的物种都全部归类到正确的位置, 仅有五列木科的五列木被归类到近缘的山茶科。然而, 条形码系统发育关系和 APG 系统发育关系之间还是有些不一致的地方, 如豆目和壳斗目, 卫矛目和金虎尾目。三片段组合时, 全部的 51 科被准确地归类到 24 个目中 (图 2), 有些分支在相应的 APG 系统位置解决得不好, 而条形码序列构建的系统发育关系却能得到较好地解决 (如图 3 菊分支中的 Lamiales, Boraginaceae 和 Gentianales)。

与此同时, 在综合评价了 3 种片段组合所获得的系统发育树的节点支持率后, 发现三片段组合时自展支持率较高的节点数明显地比两片段组合要多。全部 24 个目都显示为单系, 其中的 20 个目节点支持率高于 85% (为高度支持); 51 个科当中, 除了五列木科, 其他的都显示为单系。在物种数  $\geq 2$  的 38 个属当中, 有 30 个属为单系 (占总属数的 78.95%), 而这些单系属中, 又有 96.67% 的属在节点得到高度支持。总体而言, 在三片段组合的 RA $\times$ ML 系统发育树上的节点数目, 得到高度支持的有 71.81%, 得到中等支持的有 10.10%, 得到较弱支持的有 13.30%, 而得到极弱支持的仅有 4.79%; 而在其他两片段组合的 RA $\times$ ML 系统发育树上, *matK*+*rbcL* 仅有 82.98% 的节点得到 50% 以上的支持率, *rbcL*+*psbA-trnH* 仅有 64.36% 的节点得到 50% 以上的



支持率 (表1)。如将条形码系统发育树与 Phylo-matic 产生的基于 APG 系统的进化树相比,前者有 99.45% 的节点得到二歧分支,后者只有 36.81% 的节点得到二歧分支。

### 3 讨论和结论

一个具有准确的拓扑结构和高的节点支持率的系统发育关系,能在计量群落系统发育多样性和离散程度时提供无偏差的估计,在探讨群落构建机制时提供详实的系统发育影响因素,并获得较为可靠的结果 (Kress 等, 2009; Swenson, 2009)。本研究在前人的基础上,比较了在 BCI 样地采用的“不受约束树”(Kress 等, 2009)和在 LFDP 样地的“受约束树”(Kress 等, 2010)构建方法,提出在南亚热带鼎湖山大样地森林群落中,单独利用 DNA 条形码序列信息并使用“不受约束”的构树方法,获得与 APG 较为一致的系统发育关系,甚至在某些分支上表现得更好。在鼎湖山大样地植物群落中,在科水平上,条形码方法构建的植物群落系统发育关系中各主要被子植物分支与 APG 系统保持很好的一致性 (图2);而某些目水平上的分支,在 APG 系统中的拓扑结构没有得到解决,却在条形码系统发育关系中得到了解决,如菊分支中的 Lamiales, Boraginaceae 和 Gentianales (图1)。相比之下,在 LFDP 样地中,由于采样方式的不同和可能存在的“长枝吸引”作用 (Kress 等, 2010),导致所获得的群落系统发育关系更为紊乱和复杂,在拓扑结构上显得与 APG 系统不那么吻合。而鼎湖山样地的例子说明,在物种丰富度较低、类群间关系较简单的局部植物类群中对有限数量的物种进行样本采集时,即使没有使用 APG 大框架而单独使用 DNA 条形码序列进行“不受约束”地构树,也能获得较好的群落系统发育关系。这是继 BCI 样地 (热带森林类型+“不受约束”方法构树)和 LFDP 样地 (亚热带森林类型+“受约束”方法构树)之后,在鼎湖山样地发现的第三种构建群落系统发育关系的成功经验 (亚热带森林+“不受约束”方法构树)。

除了以上提到的不同构树方法会显著影响局部区域内植物群落的系统发育关系,目标森林区域内前人研究结果 (如各植物类群的系统分类

表1 DHS 样地使用片段组合最大似然系统发育树的节点支持率

Order (n =)	Resolution									
	<i>rbcL</i> + <i>matK</i>					<i>rbcL</i> + <i>psbA-trnH</i>				
	<50%	50%~69%	70%~84%	≥85%		<50%	50%~69%	70%~84%	≥85%	
Fagales/Rosales/Fabales (30)	8	1	2	19	8	8	8	3	11	22
Malpighiales/Oxalidales/Celastrales (34)	4	7	3	20	14	2	2	1	17	26
Sapindales/Malvales/Myrtales (32)	1	6	1	24	3	6	3	3	20	25
Saxifragales/Ericales/Santalales (29)	4	5	4	16	16	2	2	2	9	18
Lamiales/Gentianales/Boraginaceae (21)	4	1	1	15	7	3	4	4	7	17
Apiales/Dipsacales/Aquifoliales (13)	4	2	0	7	8	1	1	1	3	6
Proteales/Sabiales (4)	0	0	0	4	1	1	1	0	2	4
Basal Angiosperms* (25)	7	1	2	15	10	4	3	3	8	15
TOTAL	32	23	13	120	67	27	17	9	77	135
	(17.02%)	(12.23%)	(6.92%)	(63.83%)	(35.64%)	(14.36%)	(9.04%)	(4.79%)	(40.96%)	(71.81%)

Table 1 ML ratchet support values for nodes of phylogenies using marker combinations in the DHS FDP. Results are partitioned taxonomically by order, with the number of nodes per order given in parentheses after the ordinal name. \* Basal Angiosperms comprised of Laurales, Magnoliales, Arecales, and Poales

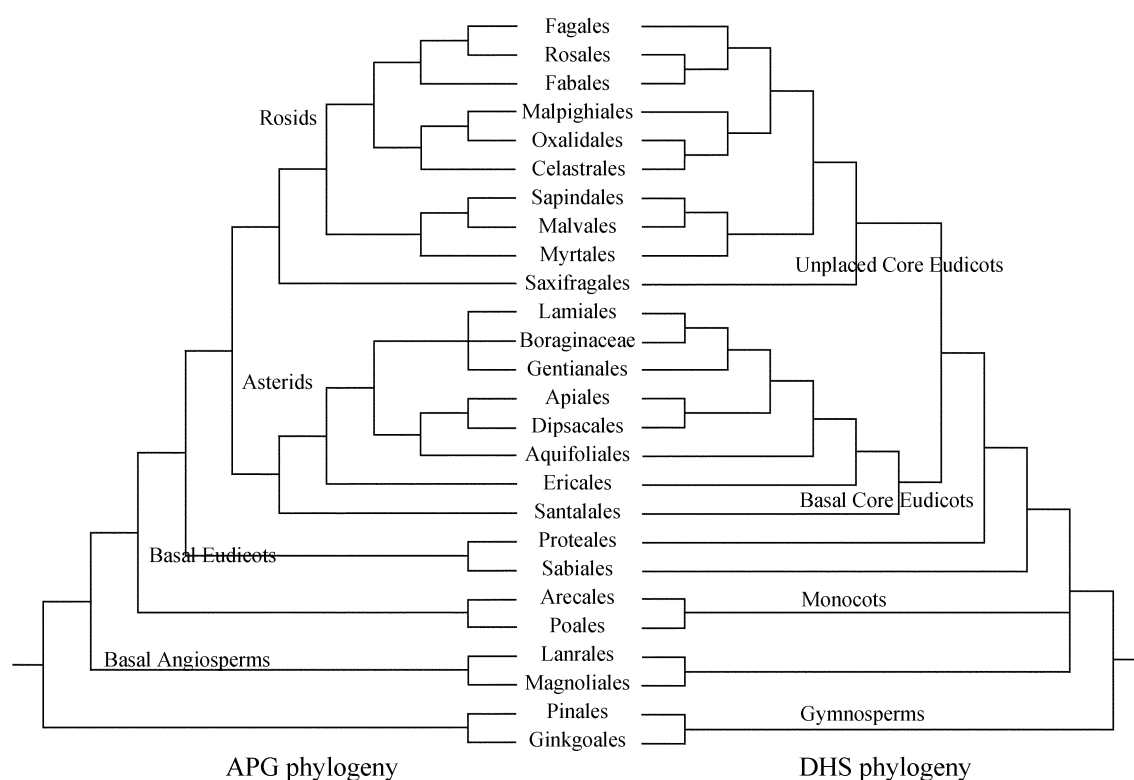


图1 DHS大样地木本植物24个目条形码与APG系统发育关系比较

图左侧表示基于APG获得的系统发育关系，图右侧表示基于条形码序列数据构建的最大似然分析。图两侧多数分支均有较好的吻合，少数分支上（例如，豆目和壳斗目；卫矛目和金虎尾目）存在差异

Fig. 1 Comparison of phylogenetic relationships based on barcode sequence data versus the Angiosperm Phylogeny Group. Comparison of the phylogenetic relationships of 24 orders of flowering woody plants found in the Dinghushan FDP between the maximum likelihood analysis of the barcode sequence data (the right-hand side) and the APG (APGIII, 2009) (the left-hand side). In several lineages, the three-locus barcode phylogeny slightly contradicted the APG III topology (e. g., Fabales and Fagales; Celastrales and Malpighiales)

信息、提交到 GenBank 的 DNA 序列信息等) 的数量和精细程度也会对系统发育关系的构建产生作用。巴拿马的 BCI 样地有着悠久的科研历史和庞大的数据积累，而其他森林样地的许多科研工作相对来说处于起步阶段，这种不对称最终反映到 Phylomatic 在线软件进行群落的系统发育关系估计上：BCI 样地的系统发育树拓扑结构与 APG 系统的一致性，将明显优于其他森林样地与 APG 系统的一致性。利用 DNA 条形码和 Phylomatic 两种方法都可构建出群落系统发育关系，但两者各有优缺点：Phylomatic 方法可快速利用在线软件平台，无需成本即可获得群落内各物种系统发育关系，但结果精确程度不够，适合粗略的研究；DNA 条形码方法需要较高的实验成本，技术要求较高，但得到的群落系统发育关系精确程度高，适合精细的研究。

探索当前生物群落的构建方式，解释影响特定群落结构可能的生物学过程，预测大空间尺度和长时间跨度生物多样性的未来分布格局，是当前和未来一段时间植物系统发育和群落生态学研究的重要内容。Campbell O. Webb 提出将系统发育、性状进化和群落结构三方面结合起来，以探讨群落结构与物种共存之间的联系，同时基本明确了系统发育群落生态学的主要任务和研究思路 (Webb, 2000; Webb 等, 2002)。事实证明，虽然系统发育分析方法在比较生物学研究中也存在一些缺点 (Losos, 2011)，但当人们充分考虑群落内物种的亲缘关系以及不同物种的多度因素 (Burns 和 Strauss, 2011)，或者从不同生境和空间尺度的水平上分析群落的系统发育结构时 (Duarte, 2011; Kooyman 等, 2011; Zhang 等, 2011)，系统发育分析方法仍然是当前植物系统

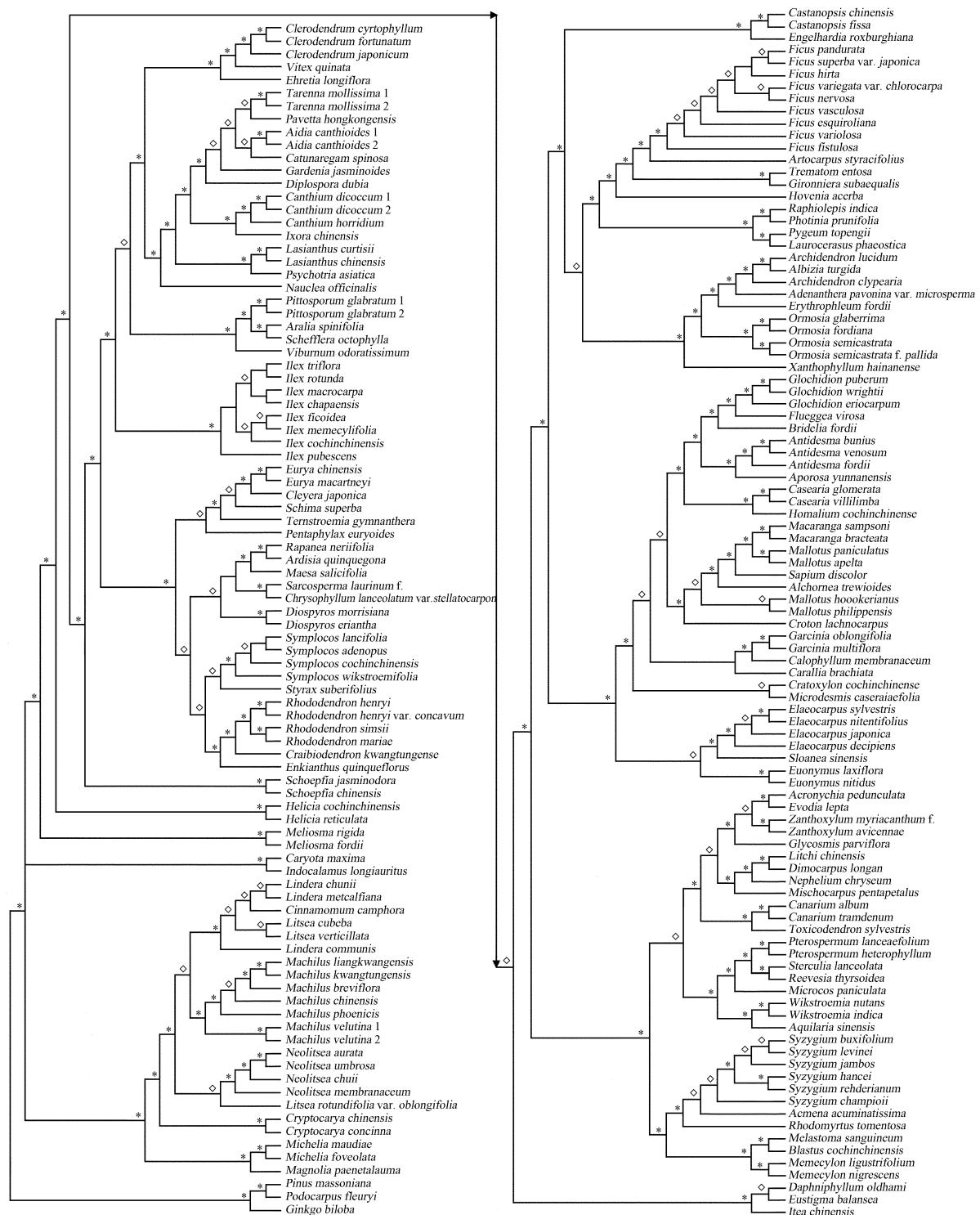


图2 DHS 大样地 183 物种的群落系统发育树

图示的系统发育关系由条形码片段 (*rbcL*, *matK* 和 *psbA-trnH*) 构建的最大似然分析所得。每个节点自展支持率数值用星号 ( $\geq 85\%$ , 为高度支持) 或者菱形 (70%–84%, 为中等支持; 50%–69%, 为较弱支持) 表示

Fig. 2 Community phylogeny of 183 species in the Dinghushan Forest Dynamics Plot

The community phylogeny is based on a maximum likelihood analysis of *rbcL*, *matK* and *psbA-trnH* sequence data.

Nodes with strong ( $\geq 85\%$ ), moderate (70%–84%) and/or weak (50%–69%) bootstrap support are indicated by an asterisk and by a diamond. The tree was rooted with Ginkgo, Podocarpus and Pinus

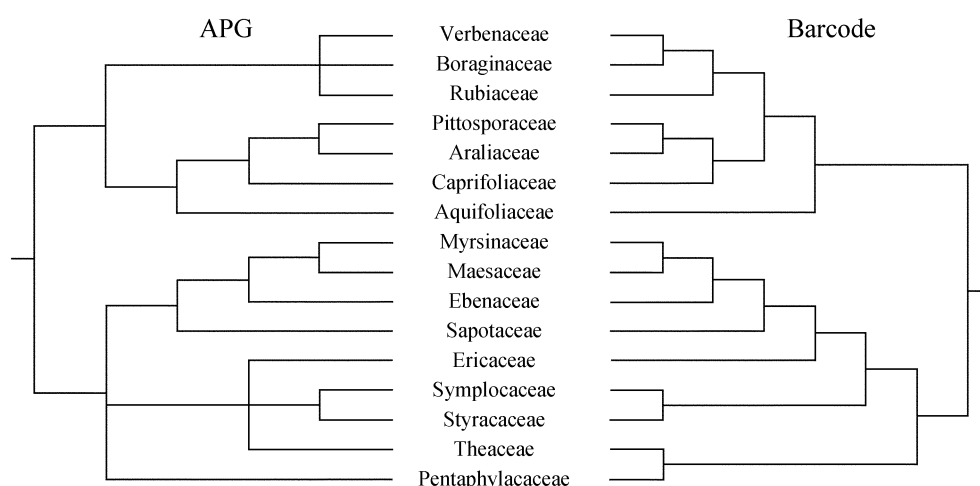


图3 DHS 大样地植物菊分支科水平上系统发育关系比较

图左侧表示基于 APG 获得的科水平上系统发育关系，图右侧表示基于条形码序列数据构建的最大似然分析

Fig. 3 Comparison of the family-level relationships within the Asterids clade

The topology on the left-hand side represents the phylogenetic relationships of families obtained from the APG III (2009) consensus phylogeny, while the topology on the right-hand side represents the DHS phylogeny generated with the ML analysis of the barcode sequence data

发育和群落生态学研究的重要手段。同时，综合在热带-亚热带-温带森林中获得的研究结果，可为当前存在激烈争论的有关物种共存理论和多样性维持机制提供更全面的解释（牛克昌等，2009；Cadotte 等，2010；Chisholm 和 Pacala，2010；Cooper 等，2010；Holdaway 等，2011）。未来还可将 DNA 条形码和 Phylomatic 两种方法同时用于系统发育多样性、系统发育 beta 多样性、跨区域生物地理分析以及全球尺度下植物功能性状进化研究（裴男才，2011；Swenson 等，2011；冯刚等，2011）。

**致谢** 2011 全国系统与进化植物学研讨会暨第十届青年学术研讨会组委会，及《植物分类与资源学报》主编李德铎研究员的邀稿；鼎湖山自然保护区管理局为本研究提供的野外采样便利和中科院华南植物园分子生态学组为本实验提供的平台支持；李健容女士和审稿专家在本文成稿过程中提供的帮助。

## 〔参 考 文 献〕

- APG III, 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III [J]. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **161** (2): 105—121
- Burns JH, Strauss SY, 2011. More closely related species are more ecologically similar in an experimental test [J]. *Proceedings of*

*the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108** (13): 5302—5307

Cadotte MW, Davies TJ, Regetz J *et al.*, 2010. Phylogenetic diversity metrics for ecological communities: integrating species richness, abundance and evolutionary history [J]. *Ecology Letters*, **13** (1): 96—105

CBOL Plant Working Group, 2009. A DNA barcode for land plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106** (31): 12794—12797

China Plant BOL Group, 2011. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108** (49): 19641—19646

Chisholm RA, Pacala SW, 2010. Niche and neutral models predict asymptotically equivalent species abundance distributions in high-diversity ecological communities [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107** (36): 15821—15825

Cooper N, Jetz W, Freckleton RP, 2010. Phylogenetic comparative approaches for studying niche conservatism [J]. *Journal of Evolutionary Biology*, **23**: 2529—2539

Doyle JJ, Doyle JL, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochemical Bulletin*, **19**: 11—15

Duarte Lds, 2011. Phylogenetic habitat filtering influences forest nucleation in grasslands [J]. *Oikos*, **120** (2): 208—215

Feng G (冯刚), Zhang J L (张金龙), Pei N C (裴男才) *et al.*, 2011. Comparison of phylobetadiversity indices based on com-

- munity data from Gutianshan forest plot [J]. *Chinese Science Bulletin* (科学通报), **56** (34): 2857—2864
- Gonzalez MA, Roger A, Courtois EA *et al.*, 2010. Shifts in species and phylogenetic diversity between sapling and tree communities indicate negative density dependence in a lowland rain forest [J]. *Journal of Ecology*, **98** (1): 137—146
- Heath TA, Hedtke SM, Hillis DM, 2008. Taxon sampling and the accuracy of phylogenetic analyses [J]. *Journal of Systematics and Evolution*, **46** (3): 239—257
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL *et al.*, 2003. Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **270** (1512): 313—321
- Holdaway RJ, Richardson SJ, Dickie IA *et al.*, 2011. Species- and community-level patterns in fine root traits along a 120 000-year soil chronosequence in temperate rain forest [J]. *Journal of Ecology*, **99** (4): 991—1000
- Hollingsworth PM, Graham SW, Little DP, 2011. Choosing and using a plant DNA barcode [J]. *PLoS ONE*, **6** (5): e19254
- Janzen DH, Hallwachs W, Blandin P *et al.*, 2009. Integration of DNA barcoding into an ongoing inventory of complex tropical biodiversity [J]. *Molecular Ecology Resources*, **9**: 1—26
- Khanuja SPS, Shasany AK, Darokar MP *et al.*, 1999. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, **17**: 1—7
- Kooyman R, Rossetto M, Cornwell W *et al.*, 2011. Phylogenetic tests of community assembly across regional to continental scales in tropical and subtropical rain forests [J]. *Global Ecology and Biogeography*, **20** (5): 707—716
- Kress WJ, Erickson DL, 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants; the coding *rbcl* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region [J]. *PLoS ONE*, **2** (6): e508
- Kress WJ, Erickson DL, 2012. *DNA Barcodes: Methods and Protocols* [M]. Berlin: Humana Press
- Kress WJ, Erickson DL, Jones FA *et al.*, 2009. Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106** (44): 18621—18626
- Kress WJ, Erickson DL, Swenson NG *et al.*, 2010. Advances in the use of DNA barcodes to build a community phylogeny for tropical trees in a Puerto Rican forest dynamics plot [J]. *PLoS ONE*, **5** (11): e15409
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA *et al.*, 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102** (23): 8369—8374
- Losos JB, 2011. Seeing the Forest for the Trees: The Limitations of Phylogenies in Comparative Biology [J]. *The American Naturalist*, **177** (6): 709—727
- Maddison WP, Maddison DR, 2007. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis Version 2.0 [OL]. <http://mesquiteproject.org>
- Miller M, Holder M, Vos R *et al.*, 2009. The CIPRES Portals. [http://www.phylo.org/sub\\_sections/portal](http://www.phylo.org/sub_sections/portal)
- Niu KC (牛克昌), Liu YN (刘怿宁), Shen ZH (沈泽昊) *et al.*, 2009. Community assembly: the relative importance of neutral theory and niche theory [J]. *Biodiversity Science* (生物多样性), **17** (6): 579—593
- Pei NC (裴男才), 2011. Phylogenetic community ecology and trait evolution of lower subtropical forest in Dinghushan [PhD Thesis] (鼎湖山亚热带森林系统发育群落生态学与性状进化研究) Guangzhou: Graduate University of the Chinese Academy of Sciences
- Pei NC (裴男才), Zhang JL (张金龙), Mi XC (米湘成) *et al.*, 2011. Plant DNA barcodes promote the development of phylogenetic community ecology [J]. *Biodiversity Science* (生物多样性), **19** (3): 284—294
- Pei N, Lian JY, Erickson DL *et al.*, 2011. Exploring tree-habitat associations in a Chinese Subtropical Forest Plot using a molecular phylogeny generated from DNA barcode Loci [J]. *PLoS One*, **6** (6): e21273
- Rambaut A, 1996. Se-Al: sequence alignment editor. <http://evolve.zoo.ox.ac.uk/>
- Stamatakis A, 2006. RAXML-VI-HP: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models [J]. *Bioinformatics*, **22** (21): 2688—2690
- Swenson NG, 2009. Phylogenetic resolution and quantifying the phylogenetic diversity and dispersion of communities [J]. *PLoS ONE*, **4** (2): e4390
- Swenson NG, Anglada-Cordero P, Barone JA, 2011. Deterministic tropical tree community turnover: evidence from patterns of functional beta diversity along an elevational gradient [J]. *Proceedings of the Royal Society B*, **278**: 877—884
- Valentini A, Pompanon F, Taberlet P, 2009. DNA barcoding for ecologists [J]. *Trends in Ecology & Evolution*, **24** (2): 110—117
- Webb CO, 2000. Exploring the phylogenetic structure of ecological communities: an example for rain forest trees [J]. *The American Naturalist*, **156** (2): 145—155
- Webb CO, Ackerly DD, McPeck MA *et al.*, 2002. Phylogenies and community ecology [J]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **33**: 475—505
- Webb CO, Donoghue MJ, 2005. Phylomatic: tree assembly for applied phylogenetics [J]. *Molecular Ecology Notes*, **5** (1): 181—183
- Ye WH (叶万辉), Cao HL (曹洪麟), Huang ZL (黄忠良) *et al.*, 2008. Community structure of a 20 hm<sup>2</sup> lower subtropical evergreen broadleaved forest plot in Dinghushan, China [J]. *Journal of Plant Ecology* (植物生态学报), **32** (2): 274—286
- Zhang SB, Slik JWF, Zhang JL *et al.*, 2011. Spatial patterns of wood traits in China are controlled by phylogeny and environment [J]. *Global Ecology and Biogeography*, **20** (2): 241—250