

## 虎耳草属山羊臭组的界定和系统发育： 核糖体 DNA ITS 序列证据

<sup>1,2</sup>张得钧 <sup>1,2</sup>陈生云 <sup>1,2</sup>高庆波 <sup>1,2</sup>段义忠 <sup>1</sup>陈世龙\*

<sup>1</sup>(中国科学院高原生物适应与进化重点实验室, 中国科学院西北高原生物研究所 西宁 810001)

<sup>2</sup>(中国科学院研究生院 北京 100049)

## Circumscription and phylogeny of *Saxifraga* sect. *Ciliatae*: Evidence from nrDNA ITS sequences

<sup>1,2</sup>De-Jun ZHANG <sup>1,2</sup>Sheng-Yun CHEN <sup>1,2</sup>Qing-Bo GAO

<sup>1,2</sup>Yi-Zhong DUAN <sup>1</sup>Shi-Long CHEN\*

<sup>1</sup>(Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China)

<sup>2</sup>(Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract** The largest section of the genus *Saxifraga* (Saxifragaceae), sect. *Ciliatae*, consists of 175 morphologically diverse species. This section is mainly distributed in the Qinghai-Tibetan Plateau and adjacent regions of southwest China and more than 80% of the total number of species are endemic to this region. It remains unknown whether this section is monophyletic and up to now no study has been conducted on the infra-sectional phylogeny. In this study, ITS sequences of the nuclear ribosomal DNA were firstly determined for 33 species mainly from this section and related sections. We further downloaded the corresponding sequences of the same DNA region for the other 22 species of *Saxifraga* and *Mitella* from GenBank. All sequences were together used to construct the phylogenetic trees. The main implications of the phylogenetic analyses include: (1) sect. *Ciliatae*, as traditionally defined, constitutes as a monophyletic clade and its sister group is a well supported clade that includes species from 8 sections such as sect. *Porphyron*, sect. *Saxifraga* and sect. *Mesogyne*; (2) three morphological subsections, i.e., subsect. *Gemmiparae*, subsect. *Hirculoideae* and subsect. *Rosulares* were tentatively recovered despite the relatively low statistic bootstrap support for the last one; however, subsect. *Flagellares* and subsect. *Hemisphaericae* were not recognized as separate entities, and nested within subsect. *Gemmiparae*; (3) subsect. *Hirculoideae* and subsect. *Rosulares* clustered together as sister subclades while subsect. *Gemmiparae* diverged early. In addition, our results suggest that the paired variation of ITS sequences in sect. *Ciliatae* is relatively low between the sampled species in spite of their diverse morphology. It is suggested that such a scenario may mirror rapid speciation in this section that probably triggered by the uplifts of the Qinghai-Tibetan Plateau and the extensive selection pressure under the alpine environments.

**Key words** circumscription, ITS, phylogeny, *Saxifraga* sect. *Ciliatae*.

**摘要** 虎耳草属 *Saxifraga* 山羊臭组 sect. *Ciliatae* 是该属中最大的一个组, 共有175种, 主要分布在喜马拉雅地区, 我国分布有166种, 占总种数的95%; 其中, 112种为中国特有。约80%的种类分布在我国青藏高原和西南地区, 是中国喜马拉雅植物成分的代表类群。山羊臭组内物种分化十分显著, 分类处理也很困难, 该组是否为单系类群, 组下的系统发育关系也不清楚, 均需进一步验证。本文测定了虎耳草属山羊臭组及其他组33种植物样品的核糖体DNA内转录间隔区ITS序列, 并从GenBank调取虎耳草组 sect. *Saxifraga* 等组和近缘属喷呐草属 *Mitella* 共22种植物的该序列。ITS分析结果表明: (1) 所研究的山羊臭组类群聚为单独一支, 而且与垫状组 sect. *Porphyron*、虎耳草组、球茎组 sect. *Mesogyne* 和仅在欧洲分布的 sect. *Cymbalaria* 和 sect. *Cotylea* 等8个组聚成的另一分支构成姊妹群; (2) 根据形态特征建立的山羊臭组的3个亚组即唐古拉亚组 subsect. *Hirculoideae*、莲座状亚组 subsect. *Rosulares* 和具芽亚组 subsect. *Gemmiparae* 各自聚为一支, 但是莲座状亚组这一支的支持率较低。同时, 山羊臭组的鞭匍枝亚组 subsect. *Flagellares* 和 subsect. *Hemisphaericae* 的代表类群单独聚为一支, 位于具芽亚组类群分支内部而不能成立; (3) 唐古拉亚组和莲座状亚组又聚为一亚分支与具芽亚组构成姊妹群, 而且具芽亚组最早从山羊臭组这一支中分化出来。

2007-06-21 收稿, 2007-09-19 收修改稿。

\* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: slchen@nwipb.ac.cn; Tel.: 86-971-6110067)。

我们的研究还发现山羊臭组内种间形态分化较大, 而ITS碱基变异较小, 这可能是山羊臭组类群在青藏高原及毗邻地区的高山环境下物种快速分化的结果。

**关键词** 界定; ITS序列; 系统发育; 虎耳草属山羊臭组

虎耳草属 *Saxifraga* L. 是虎耳草科 Saxifragaceae 最大的属, 约有400种 (Engler & Irmscher, 1916, 1919; Spongberg, 1972; Kohlein, 1984; Gornall, 1987; Webb & Gornall, 1989; 潘锦堂, 1992; Pan et al., 2001), 主要分布在北极和北温带, 该属的多样性中心在北美西部、东亚和喜马拉雅-青藏高原地区; 生于林缘、草原、冻土地带、岩坡石隙。长期以来, 该属在形态学、细胞学、生境等方面的变异很大, 因此虎耳草属分类学研究一直存在争议。自Linnaeus (1753) 建立虎耳草属以来, 先后有很多分类学家对该属进行了分类学研究, 如Haworth (1812, 1821) 虽摒弃了Linnaeus建立的广义虎耳草属分类系统, 将该属分成16个属, 但Linnaeus的虎耳草属分类系统还是被后来的许多学者接受并进一步完善 (Don, 1822; Tausch, 1823; Seringe, 1830; Engler, 1872; Engler & Irmscher, 1916, 1919; Gornall, 1987; Webb & Gornall, 1989; 潘锦堂, 1992; Pan et al., 2001)。

中国现有虎耳草属植物216种, 其中139种是中国特有种 (Pan et al., 2001)。一直以来, 对我国虎耳草属植物进行分类学及相关研究的人较少。20世纪90年代以前, 少数分类学家曾对该属进行过研究 (吴征镒, 1984; 吴征镒, 潘锦堂, 1990); 1976年以后, 我国植物分类学家潘锦堂从形态学、解剖学、区系地理学等方面对我国分布的虎耳草属植物进行了详细的研究, 在Engler和Irmscher (1916-1919) 的虎耳草属分类系统基础上, 确定我国共有虎耳草属植物203种, 并将其分为8组7亚组31系和4亚系。这8个组是: 双喙组 sect. *Birostres* (Gornall) C. Y. Wu & J. T. Pan、斑点组 sect. *Punctatae* (Engl.) J. T. Pan、石荷叶组 sect. *Irregulares* Haw.、球茎组 sect. *Mesogyne* Sternb.、小花组 sect. *Micranthes* (Haw.) D. Don、山羊臭组 sect. *Ciliatae* Haw.、舌形组 sect. *Ligulatae* Haw. 和点地梅形组 sect. *Aretiaria* Sternb. (潘锦堂, 1978, 1982, 1990, 1991, 1992; Pan et al., 2006)。2001年, 在进行《Flora of China》编研时, 潘锦堂先生与国外合作者对我国虎耳草属进行了修订, 确立中国现有虎耳草属植物216种, 属下分7个组, 即小花组、石荷叶组、球茎组、垫状组 sect.

*Porphyrium* Tausch、虎耳草组 sect. *Saxifraga*、糙叶组 sect. *Trachyphyllum* (Gaudin) W. D. J. Koch 和山羊臭组 (Gornall et al., 2000; Pan et al., 2001)。比较潘锦堂 (1992) 和 Pan 等 (2001) 虎耳草属的分类系统, 发现山羊臭组在两个分类系统中均存在, 但在类群的归属上存在很大差异。在《Flora of China》中, 将《中国植物志》中舌形组的部分类群和点地梅形组的全部类群并入山羊臭组。除山羊臭组类群变化大外, 小花组和垫状组类群变化也较大, 将《中国植物志》中的双喙组和斑点组的所有类群并入了小花组, 而将舌形组中没有并入山羊臭组的类群移入垫状组中。

根据最近的分类处理, 山羊臭组 sect. *Ciliatae* 是虎耳草属中最大的一个组, 共有175种, 主要分布在喜马拉雅地区, 部分种分布到欧洲和北美; 我国分布有166种, 占总种数的95%; 其中, 112种为中国特有, 该组约80%的种类分布在我国青藏高原和西南地区 (Pan et al., 2001)。在该属最新的分类系统中, 山羊臭组组下没有进行亚组的区分, 仅为了检索的方便而分了7个检索表 (Pan et al., 2001)。但在Gornall (1987) 和潘锦堂 (1992) 的虎耳草属分类中, 山羊臭组类群均进行了亚组的区分, 在潘锦堂系统中分为4个亚组, 即具芽亚组 subsect. *Gemmiparae* Engl. & Irmsch.、唐古拉亚组 subsect. *Hirculoideae* Engl. & Irmsch.、莲座状亚组 subsect. *Rosulares* Gornall 和鞭匍枝亚组 subsect. *Flagellares* (Clarke) Engl. & Irmsch.; 而Gornall系统分了7个亚组, 即除了上述4个亚组外, 还有 subsect. *Hemisphaericae* (Engl. & Irmsch.) Gornall、subsect. *Cinerascentes* Engl. & Irmsch. 和 subsect. *Serpyllifoliae* Gornall。该类群是中国-喜马拉雅植物成分的代表类群, 其现代分布、分化中心在喜马拉雅山东部和横断山区 (即青藏高原的主体部分); 该组的起源中心也可能位于该地区的云南丽江一带 (Webb & Gornall, 1989; 潘锦堂, 1992; Ohba et al., 1995)。有关该地区植物的系统发育以及物种分化已有一些类群的研究, 如利用分子手段对菊科 Compositae 的橐吾属 *Ligularia* Cass.-垂头菊属 *Cremanthodium* Benth.-蟹甲草属

*Parasenecio* Smith & Small 复合群、风毛菊属 *Saussurea* DC.、蓼科 Polygonaceae 的大黄属 *Rheum* L. 和报春花科 Primulaceae 的点地梅属 *Androsace* L. 进行了物种分化的研究。结果表明, 在这些类群内, 尽管形态分化十分强烈, 但 DNA 水平的分化较小, 物种的快速形态分化类似于岛屿植物, 存在快速的适应性辐射分化 (Liu et al., 2002, 2006; 王玉金, 刘建全, 2004; 王玉金等, 2004; Wang et al., 2005)。

已有的分子系统学研究表明, 虎耳草属下的系统演化关系仍存在许多疑问。如 Soltis 等 (1996) 利用 *rbcL* 和 *matK* 基因对虎耳草属进行了分析, 结果表明该属不是一个单系群, 而且属下组的划分并不能准确地反映属内各类群的系统演化关系。Conti 等 (1999) 采用 ITS 和 *matK* 基因对欧洲分布的虎耳草属舌形组进行了研究, 认为舌形组也不是一个单系群, 该组一些类群与垫状组聚为一支; Vargas 等 (1999) 采用 ITS 基因对地中海地区分布的虎耳草组植物进行了分子地理学研究, 认为地中海可能对分布在欧洲和北非的虎耳草组植物起到了有效的隔离作用。然而, 目前对山羊臭组的系统学研究未见报道, 除潘锦堂先生对该组进行分类学研究外, 仅有一些该组植物的区系和新分类群研究 (罗鹏, 田晓琴, 1997; 金兰, 1998; 庄璇, 2001)。事实上, 山羊臭组同样存在许多系统学问题: (1) 山羊臭组是否像 Webb 和 Gornall (1989) 所阐述的一样, 能构成一个单系群? 组的划分是否合理, 为什么在《Flora of China》(Pan et al., 2001) 编研时, 将舌形组的大部分种都划到山羊臭组, 而没有把它们列入垫状组或其他组; (2) 山羊臭组内类群间的系统演化关系如何? (3) Webb 和 Gornall (1989) 认为山羊臭组可能与 *sect. Cymbalaria* 亲缘关系最近, 主要是因为这两组植物的黄色花瓣基部都稍有膨胀、而且染色体基数非常接近 (山羊臭组  $x=8$ , *sect. Cymbalaria*  $x=9$ )。山羊臭组究竟与哪一个组的亲缘关系最近, 是 *sect. Cymbalaria*, 还是其他组?

核糖体 DNA 中的内转录间隔区 (ITS) 序列由于可以提供较丰富的信息位点, 已被广泛应用于研究被子植物属内种间、近缘属间乃至科内的系统发育和分类问题 (Baldwin, 1993; Baldwin et al., 1995; Vargas et al., 1998; Liu et al., 2002, 2006; 田欣, 李德铎, 2002; Wang et al., 2005)。ITS 序列在研究虎耳草属属内组间关系时也得到了较好的应用 (Conti et

al., 1999; Vargas et al., 1999; Vargas, 2000)。因此, 本文在前人研究的基础上, 通过对虎耳草属山羊臭组及相关类群的 ITS 序列分析, 探讨其系统演化关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

本文采用的虎耳草属山羊臭组及其他组共 33 种植物叶片, 其中 12 种采自腊叶标本, 其余 21 种为野外硅胶快速干燥的新鲜叶片, 山羊臭组的种类共有 28 种, 涉及 5 个亚组, 材料来源见表 1。凭证标本保存于中国科学院西北高原生物研究所标本馆 (HNWP)。本文所用虎耳草组、*sect. Cymbalaria* 和 *sect. Gymnopera* 等组共 22 种植物的 ITS 序列均调自 GenBank, 主要是根据 Vargas 等 (1999) 和 Vargas (2000) 的研究。

### 1.2 实验方法

硅胶干燥叶片的总 DNA 提取采用 CTAB 法 (Doyle & Doyle, 1987), 来自标本的叶片采用 CASuper Plant Genomic DNA Isolation Kit 试剂盒 (上海中科开瑞生物芯片科技股份有限公司) 进行提取。ITS 区的扩增采用 White 等 (1990) 描述的通用引物 ITS1 (5'-AGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGT-AGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。扩增反应在 Biometra Thermal Cycler PCR 扩增仪上进行, 具体扩增程序参照陈生云等 (2005) 的方法完成。扩增产物采用 CASpure PCR Purification Kit 试剂盒 (上海中科开瑞生物芯片科技股份有限公司) 纯化。纯化后的产物利用相同的引物 ITS1 和 ITS4 进行测序反应, 反应体系为 10  $\mu$ L, 包括: PCR 纯化产物为 1.0–2.0  $\mu$ L, 引物各 1  $\mu$ L, ET 1.0  $\mu$ L, 双蒸水 6–7  $\mu$ L; 程序为: 95  $^{\circ}$ C 8 s, 95  $^{\circ}$ C 15 s, 50  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 90 s 循环 31 次, 然后 60  $^{\circ}$ C 保温 90 s。产物用 Autoseq 96 Plates (Amersham 公司) 进行纯化, 并在 MegaBACE 500DNA Analysis System (Amersham Biosciences Corp.) 上进行测序。每条链均能完整读出约 700 bp, 正反两条链相互重叠 90% 以上。

ITS 范围根据 GenBank 下载的虎耳草属植物序列确定, 新测序列注册于 GenBank 中, 同时从 GenBank 调取虎耳草组、*sect. Cymbalaria*、*sect. Gymnopera* 等有关组共 20 种植物的 ITS 序列。所有种类的序列号见表 1。

表1 材料来源(采用Gornall (1987)、潘锦堂(1992)和Pan等(2001)的属下分类系统)

Table 1 The origin of materials (The infrageneric classification follows Gornall, 1987; Pan, 1992; Pan et al., 2001)

分类群 Taxon	采集地 Locality	凭证标本 Voucher	序列号 GenBank Acc. No.
<b>虎耳草属 <i>Saxifraga</i> L.</b>			
<b>山羊臭组 sect. <i>Ciliatae</i> Haw.</b>			
鞭匐枝亚组 subsect. <i>Flagellares</i> (Clarke) Engl. & Irmsch.			
棒腺虎耳草 <i>S. consanguinea</i> W. W. Smith	青海囊谦 Nangqên, Qinghai	陈世龙(S. L. Chen) 2002042	EU158837
朗县虎耳草 <i>S. nangxianensis</i> J. T. Pan	西藏错那 Cona, Xizang	青藏队(Qinghai-Xizang Exped.) 751492	EU158850
<b>subsect. <i>Hemisphaericae</i> (Engl. &amp; Irmsch.) Gornall</b>			
治多虎耳草 <i>S. zhidoensis</i> J. T. Pan	青海玉树 Yushu, Qinghai	王为义(W. Y. Wang) 85-608	EU158862
<b>唐古拉亚组 subsect. <i>Hirculoideae</i> Engl. &amp; Irmsch.</b>			
优越虎耳草 <i>S. egregia</i> Engl.	四川色达 Sêrtar, Sichuan	陈世龙(S. L. Chen) 2003075	EU158836
无睫毛虎耳草 <i>S. egregia</i> var. <i>eciliata</i> J. T. Pan	四川阿坝 Aba, Sichuan	陈世龙(S. L. Chen) 2003035	EU158842
山羊臭虎耳草 <i>S. hirculus</i> L.	OS	Brochmann 93-219 from GenBank	AF374823/24
近优越虎耳草 <i>S. hookeri</i> Engl. & Irmsch.	西藏曲水 Qüxü, Xizang	陈世龙(S. L. Chen) 2002085	EU158840
贡山虎耳草 <i>S. insolens</i> Irmsch.	云南丽江 Lijiang, Yunnan	陈世龙(S. L. Chen) 2003147	EU158841
林芝虎耳草 <i>S. isophylla</i> H. Smith	西藏林芝 Nyngchi, Xizang	青藏队(Qinghai-Xizang Exped.) 751144	EU158848
毛叶虎耳草 <i>S. kingiana</i> Engl. & Irmsch.	西藏聂拉木 Nyalam, Xizang	西藏中草药普查队(Xizang Chinese Medicine General Survey Team) 1556	EU158851
洱源虎耳草 <i>S. peplidifolia</i> Franch.	云南大理 Dali, Yunnan	陈世龙(S. L. Chen) 2003129	EU158843
狭瓣虎耳草 <i>S. pseudohirculus</i> Engl.	西藏曲松 Qusum, Xizang	陈世龙(S. L. Chen) 2002107	EU158844
山地虎耳草 <i>S. sinomontana</i> J. T. Pan & Gornall	青海大武 Dawu, Qinghai	陈世龙(S. L. Chen) 2003015	EU158834
唐古特虎耳草 <i>S. tangutica</i> Engl.	青海大武 Dawu, Qinghai	陈世龙(S. L. Chen) 2003004	EU158858
小中甸虎耳草 <i>S. xiaozhongdianensis</i> J. T. Pan	云南中甸 Zhongdian, Yunnan	陈世龙(S. L. Chen) 2003168	EU158835
<b>具芽亚组 subsect. <i>Gemmiparae</i> Engl. &amp; Irmsch.</b>			
马耳山虎耳草 <i>S. balfourii</i> Engl. & Irmsch.	云南鹤庆 Heqing, Yunnan	陈世龙(S. L. Chen) 2003164	EU158838
短柄虎耳草 <i>S. brachypoda</i> D. Don	西藏林周 Lhünzhub, Xizang	西藏中草药普查队(Xizang Chinese Medicine General Survey Team) 1926	EU158855
芽生虎耳草 <i>S. gemmipara</i> Franch.	云南丽江 Lijiang, Yunnan	陈世龙(S. L. Chen) 2003142	EU158859
伏毛虎耳草 <i>S. strigosa</i> Wall. ex Ser.	云南大理 Dali, Yunnan	陈世龙(S. L. Chen) 2003135	EF369514
流苏虎耳草 <i>S. wallichiana</i> Sternb.	云南鹤庆 Heqing, Yunnan	陈世龙(S. L. Chen) 2003166	EU158847
<b>莲座状亚组 subsect. <i>Rosulares</i> Gornall</b>			
丁青虎耳草 <i>S. dingqingensis</i> J. T. Pan	西藏丁青 Dêngqên, Xizang	陈世龙(S. L. Chen) 2002053	EU158857
小芽虎耳草 <i>S. gemmiger</i> Engl. var. <i>gemmuligera</i> (Engl.) J. T. Pan & Gornall	青海达日 Darlag, Qinghai		EU158856
小斑虎耳草 <i>S. punctulata</i> Engl.	西藏亚东 Yadong, Xizang	青藏队(Qinghai-Xizang Exped.) 75-7344	EU158854
红虎耳草 <i>S. sanguinea</i> Franch.	青海久治 Jiuzhi, Qinghai	青藏队(Qinghai-Xizang Exped.) 71-616	EU158849
打箭虎耳草 <i>S. tatsienluensis</i> Engl.	四川鹧鸪山 Mt. Zhegu, Sichuan	陈世龙(S. L. Chen) 2003048	EU158845
篦齿虎耳草 <i>S. umbellulata</i> var. <i>pectinata</i> (Marquand & Airy Shaw) J. T. Pan	西藏昌都 Qamdo, Xizang	陈世龙(S. L. Chen) 2002137	EU158832
小伞虎耳草 <i>S. umbellulata</i> Hook. f. & Thoms.	西藏加查 Gyaca, Xizang	陈世龙(S. L. Chen) 2002118	EU158833
爪瓣虎耳草 <i>S. unguiculata</i> Engl.	青海大里加山 Mt. Dalijia, Qinghai	陈世龙(S. L. Chen) 2004033	EU158839
<b>小花组 sect. <i>Micranthes</i> (Haw.) D. Don</b>			
黑虎耳草 <i>S. atrata</i> Engl.	青海互助 Huzhu, Qinghai	吴玉虎(Y. H. Wu) 3057	EU158852
黑蕊虎耳草 <i>S. melanocentra</i> Franch.	青海大武 Dawu, Qinghai	陈世龙(S. L. Chen) 2003001	EU158846
多叶虎耳草 <i>S. pallida</i> Wall. ex Ser.	西藏米林 Mainling, Xizang	青藏队(Qinghai-Xizang Exped.) 75-1328	EU158863
<i>S. stellaris</i> L.	WS	Horandl 2703, from GenBank	AF374827/28
<b>石荷叶组 sect. <i>Irregulares</i> Haw.</b>			
齿瓣虎耳草 <i>S. fortunei</i> Hook. f.	WS	Soltis 2519, from GenBank	AF374821/22
<b>糙叶组 sect. <i>Trachyphyllum</i> (Gaudin) W. D. J. Koch</b>			
<i>S. tricuspidata</i> Rottb.	WS	Parker s.n., from GenBank	AF087601/31
<b>球茎组 sect. <i>Mesogyne</i> Sternb.</b>			
零余虎耳草 <i>S. cernua</i> L.	甘肃张掖 Zhangye, Gansu	黄荣福(R. F. Huang) 91-3119	EU158861

表1 (续) Table 1 (continued)

分类群 Taxon	采集地 Locality	凭证标本 Voucher	序列号 GenBank Acc. No.
<b>垫状组sect. <i>Porphyron</i> Tausch</b>			
具梗虎耳草 <i>S. afghanica</i> Aitch. & Hemsl.	青海囊谦Nêngqên, Qinghai	王为义(W. Y. Wang) 82-0016	EU158853
<i>S. blepharophylla</i> A. Kern. ex Kolb.	Alps, Austria, Schladminger Tauern	from GenBank	AF504545
挪威虎耳草 <i>S. oppositifolia</i> L.	Alsaka, Anchorage	from GenBank	AF502089
垫状虎耳草 <i>S. pulvinaria</i> H. Smith	新疆塔什库尔干 Taxkorgan, Xingjiang		EU158860
<i>S. smalliana</i> Hulten	Alaska, Seward peninsula	from GenBank	AF504544
<b>虎耳草组sect. <i>Saxifraga</i></b>			
<i>S. aphylla</i> Ten.	Austria, Innsbruck	D. Gómez, from GenBank	AF261160
<i>S. babiana</i> T. E. Díaz & Fern. Prieto	Spain, León, Truébano	2992PV, from GenBank	AJ233879
<i>S. bulbifera</i> L.	Italy, Fiuminata	from GenBank	AF261166
<i>S. exarata</i> Griseb.	Austria, Glochturm, Plats	D. Gómez 1994, from GenBank	AJ233861
<i>S. granulata</i> Desf.	Spain, Málaga, Jubrique	3PV97, from GenBank	AJ233860
<i>S. osloensis</i> Knaben	WS	Brochmann s.n., from GenBank	AF087608/38
<i>S. pentadactylis</i> Lapeyr.	Andorra, El serrat	Aedo et al., 11918SC, from GenBank	AJ233862
<b>sect. <i>Cotylea</i> Tausch</b>			
<i>S. rotundifolia</i> L.	Cult., K	BBG 267-94-80-10, from GenBank	AF087598/ AF087628
<b>sect. <i>Cymbalaria</i> Griseb.</b>			
<i>S. cymbalaria</i> L.	WS	Ferguson s.n., from GenBank	AF087599/ AF087629
<i>S. hederacea</i> M. Bieb.	Libya, Wadi Kouf	Davis 50203, from GenBank	AF261182
<b>sect. <i>Gymnopera</i> D. Don</b>			
<i>S. spathularis</i> Brot.	Spain, Pontevedra, Vilasobroso	Vargas et al., 21ML88 from GenBank	AJ233858
<b>sect. <i>Hetersia</i> (Rafinesque ex Small) A. M. Johnson</b>			
<i>S. mertensiana</i> Bong.	WS	Grable 11586, from GenBank	AY231367
<b>sect. <i>Xanthizoon</i> Grisebach</b>			
<i>S. aizoides</i> L.	OS	Brochmann 92-78-1, from GenBank	AF087624/ 087594
<b>外类群Outgroup</b>			
<b>喷呐草属<i>Mitella</i> Tour. ex L.</b>			
喷呐草 <i>M. nuda</i> L.		from GenBank	AB163495
<i>M. kiusiana</i> Makino		from GenBank	AB163527

### 1.3 外类群选择

本研究选取虎耳草科喷呐草属*Mitella* Tour. ex L.的两种植物喷呐草*M. nuda* L.和*M. kiusiana* Makino作为外类群, 序列调自GenBank, 序列号见表1。

### 1.4 数据分析

序列排列用CLUSTAL X软件(Thompson et al., 1997)自动完成后, 用手工适当校正以使序列更加合理。排好的序列用PAUP\* 4.0b10软件(Swofford, 2003)进行数据分析。空位(gap)始终作为缺失状态。简约性Parsimony分析采用如下选项完成, 即树二组重新连接TBR、启发式搜索Heuristic search、多重性选择MULPARS、ACCTRAN优化和100次随机附

加的重复, 用自展法Bootstrap analysis检验系统树, 自展数据集为1000次(Maddison, 1991)。利用MrBayes 3.0b4软件(Ronquist & Huelsenbeck, 2003)构建贝叶斯推论Bayesian inference (BI)分子系统树, 选用GTR+G为最适于拟合该数据集的DNA进化模型, 同时建立4个马尔可夫链, 共运行500万代, 每100代抽样一次, 忽略全部动态抽样5000次, 对剩余的45000次静态抽样计算合意树, 以后验概率(posterior probability)(PP)作为评估参数。

## 2 结果

在所研究虎耳草属山羊臭组28种中, 种间最小

碱基差异为0, 存在于篦齿虎耳草*Saxifraga umbellulata* var. *pectinata*和丁青虎耳草*S. dingqingensis*之间; 最大的为1.48%, 存在于伏毛虎耳草*S. strigosa*与打箭虎耳草*S. tatsienluensis*和爪瓣虎耳草*S. unguiculata*之间。

本文测得的33种虎耳草属植物的ITS区序列和从GenBank获得的20种虎耳草属植物的ITS区(含5.8S)序列的长度范围为647–681 bp。空位作为缺失处理时, ITS全序列排序后的长度为715 bp, 其中有263个信息位点, 占总位点的36.7%。ITS1的长度范围为247–316 bp, 排序后长度为350 bp, 其中有120

个信息位点, 占总位点的34.3%; ITS2的长度范围为66–238 bp, 排序后长度为253 bp, 其中信息位点14个, 占总位点的5.5%。

以喷呐草*Mitella nuda*和*M. kiusiana*为外类群, 启发式搜索获得704棵简约树, 最大简约树(maximum parsimony, MP)之一如图1所示, 步长=1479,  $CI=0.523$ ,  $RI=0.809$ , 并给出重复1000次各分支的自展支持率BV (bootstrap value)值。利用贝叶斯推论法构建的贝叶斯系统树(Bayesian inference, BI)见图1, 同时也标明后验概率PP值。BI树和MP树的拓扑结构基本一致, 只是支持率略有不同。

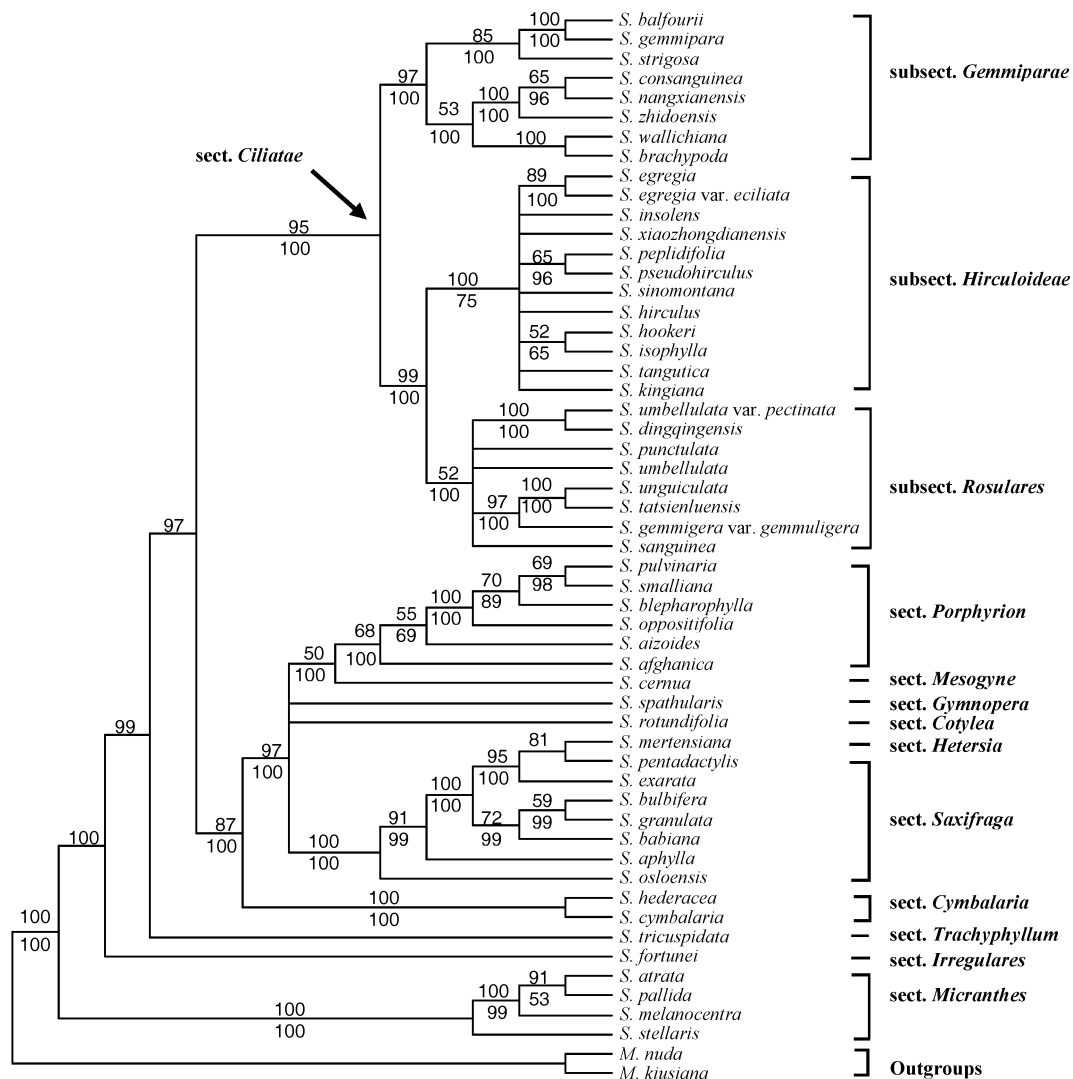


图1 根据ITS序列数据得到的704个最简约树的一个(length=1479,  $CI=0.523$ ,  $RI=0.809$ )和Bayesian 50%多数一致性树。分支上、下数字分别代表最简约树(MP)的自展支持率和Bayesian后验概率。

Fig. 1. One of the 704 most parsimonious trees (length=1479,  $CI=0.523$ ,  $RI=0.809$ ) and fifty percent of Bayesian majority rule consensus tree obtained from ITS sequence data. Numbers above and below the branches indicate bootstrap support and the Bayesian posterior probabilities, respectively.

比较简约法和贝叶斯法的分析结果, 发现两种方法构建的系统发育关系极为吻合(图1), 所研究的虎耳草属类群分为五支: 山羊臭组所选类群聚为一支, 并在两种方法中得到BV值和PP值分别为95%和100%的支持率; 垫状组sect. *Porphyron*、虎耳草组sect. *Saxifraga*和sect. *Gymnopera*等8个组聚为一支, BV值和PP值分别为87%和100%; 各有一个代表种的糙叶组sect. *Trachyphyllum*和石荷叶组sect. *Irregulares*各自聚为一支; 小花组sect. *Micranthes*同样也单独聚为一支, BV值和PP值均为100%, 位于上述分支的最基部。

山羊臭组分支内所涉及的5个亚组分为两大支, 其中一支包括唐古拉亚组subject. *Hirculoideae*和莲座状亚组subject. *Rosulares*, 且这两个组均单独聚为一亚分支; 而具芽亚组subject. *Gemmiparae*、鞭匍枝亚组subject. *Flagellares*和subject. *Hemisphaericae*(在潘锦堂(1992)系统中为点地梅形组)聚为另一支, 其中鞭匍枝亚组和subject. *Hemisphaericae*的代表类群又聚为单独一支而位于具芽亚组类群的分支内部。因此, 具芽亚组、唐古拉亚组和莲座状亚组分别聚为单独一支, 这3个亚组分支的BV值和PP值分别为97%、100%、52%和100%、75%、100%, 而且具芽亚组最早从这一支中分出。

### 3 讨论

比较潘锦堂(1992)和Pan等(2001)虎耳草属山羊臭组的分类系统, 本文的ITS分析表明重新界定的山羊臭组(Pan et al., 2001)是一个单系类群, 与叶绿体*matK*和*rbcL*基因序列分析的结果一致(Soltis et al., 1996)。从图1来看, 我们所选《Flora of China》中的山羊臭组代表类群均聚为一支, 而且与垫状组、虎耳草组、球茎组和仅在欧洲分布的sect. *Cymbalaria*和sect. *Cotylea*等8个组聚成的分支构成姊妹群。显然, sect. *Cymbalaria*在后一分支中形成一个独立的亚分支位于这一姊妹群的基部, 表明sect. *Cymbalaria*相对于该姊妹群的其他组, 与山羊臭组亲缘关系最近。因此, ITS分析结果支持山羊臭组与sect. *Cymbalaria*亲缘关系最近的观点(Webb & Gornall, 1989)。

我们的ITS研究结果支持Gornall (1987)虎耳草属分类系统以及Pan等(2001)根据形态特征对山羊

臭组的重新组合, 即虎耳草属山羊臭组应该包括潘锦堂(1992)分类系统中舌形组的垂头亚组subject. *Nutantes* Engl. & Irmisch.和小果亚组subject. *Microgynae* J. T. Pan与点地梅形组的所有类群, 舌形组的对叶亚组subject. *Oppositifoliae* Hayek应为垫状组, 而斑点组应移入小花组中, 且舌形组的类群在中国没有分布(Pan et al., 2001)。从图1可以看出, 在潘锦堂(1992)分类系统中, 舌形组包括43种, 组下分为3个亚组即垂头亚组、对叶亚组和小果亚组; 而点地梅形组仅包括3种。舌形组的4个代表种即棒腺虎耳草 *S. consanguinea* 和朗县虎耳草 *S. nangxianensis* 隶属小果亚组; 而狭瓣虎耳草 *S. pseudohirculus*和唐古特虎耳草 *S. tangutica*隶属垂头亚组; 这4个种与点地梅形组的一个代表种治多虎耳草 *S. zhidoensis*均聚到山羊臭组中, 而且这些代表种都没有单独聚为一支, 而是与山羊臭组的类群聚在不同的支上; 同时舌形组另外3个代表种垫状虎耳草 *S. pulvinaria*、具梗虎耳草 *S. afghanica*和挪威虎耳草 *S. oppositifolia*隶属对叶亚组却聚到垫状组中。另外, 我们没有得到双喙组类群的研究材料, 斑点组仅包括了3种, 其代表种多叶虎耳草 *S. pallida*聚到小花组中。本研究ITS分析结果与欧洲分类学家对虎耳草属属下分类系统的观点一致(Engler & Irmischer, 1916, 1919; Gornall, 1987; Webb & Gornall, 1989)。在《Saxifrages of Europe》(Webb & Gornall, 1989)中, 舌形组仅包括8个种, 主要分布在欧洲, 个别种分布到南亚和北美地区。Conti等(1999)对虎耳草属舌形组的分子系统学研究表明, 舌形组不是一个单系类群。潘锦堂(1992)分类系统中的舌形组3个亚组、点地梅形组和斑点组, 在Gornall (1987)的虎耳草属分类系统中均有归属, 即舌形组垂头亚组的类群归在山羊臭组唐古拉亚组中, 舌形组小果亚组的类群归在山羊臭组鞭匍枝亚组中, 舌形组对叶亚组的类群归在垫状组的对叶亚组中; 点地梅形组归在山羊臭组中, 而斑点组归在小花组中(Gornall, 1987)。由此可知, 潘锦堂(1992)虎耳草属分类系统中舌形组、点地梅形组和斑点组的分类处理欠妥。如前所述, 虎耳草属山羊臭组内的分类系统在潘锦堂(1992)和Pan等(2001)的系统中也有很大区别。在潘锦堂(1992)系统中, 主要依据茎基部或叶腋是否具芽、具鞭匍枝以及茎基部是否具莲座叶丛、叶片质地、叶脉类型等特征将山羊臭

分为4个亚组,这一分类系统与《*Saxifragas of Europe*》(Webb & Gornall, 1989)中山羊臭组分类系统一致。而在Pan等(2001)的系统中,没有进行组下分类,仅根据茎或叶基部是否具毛或腺毛以及茎基部是否具莲座叶丛和鞭匍枝等特征分了7个检索表来区分山羊臭组内的各分类群。迄今为止,有关山羊臭组内的系统演化关系研究未见报道。ITS分析结果表明唐古拉亚组和莲座状亚组为单系类群,且具有较近的亲缘关系;而鞭匍枝亚组和subsect. *Hemisphaericae*应归入具芽亚组。我们的研究结果支持将山羊臭组组下类群分为亚组的观点,而且应分为3个亚组,即唐古拉亚组、莲座状亚组和具芽亚组(潘锦堂, 1991, 1992; Gornall, 1987; Webb & Gornall, 1989)。

虽然我们的研究结果表明山羊臭组中根据形态特征建立的组下分类系统得到了分子证据的支持,但本研究也发现各亚组内种间的遗传分化非常小,特别是在唐古拉亚组和莲座状亚组中尤为明显,不能有效地建立起种间的系统发育关系。如在唐古拉亚组中,优越虎耳草*S. egregia*与其变种无睫毛虎耳草*S. egregia* var. *eciliata*的碱基变异为0, ITS序列长度相同,在形态上二者的区别在于优越虎耳草的萼片边缘具腺毛,无睫毛虎耳草的萼片边缘无毛。在莲座状亚组中,小斑虎耳草*S. punctulata*、小伞虎耳草*S. umbellulata*、篦齿虎耳草*S. umbellulata* var. *pectinata*和丁青虎耳草*S. dingqingensis*这4个种之间, ITS序列均相同,这4个种碱基变异最大为0.35%,存在于小斑虎耳草和小伞虎耳草之间,而碱基变异最小为0,存在于篦齿虎耳草和丁青虎耳草之间,篦齿虎耳草花瓣具2瘤体,而丁青虎耳草花瓣具8瘤体。由此推测,这种形态上分化较大,而ITS碱基变异较小,可能是物种在青藏高原及毗邻地区的高山极端环境下快速形成所致。而这种物种快速分化是否导致物种之间存在杂交,是一个值得深入研究的问题。特别是在虎耳草属中,已有研究发现,在欧洲和北美分布的该属虎耳草组的种间存在频繁的杂交(Webb & Gornall, 1989; Soltis et al., 1996; Vargas, 2000)。这种物种快速形成方式也在主要分布于青藏高原的菊科风毛菊属中存在(王玉金, 刘建全, 2004)。那么,在青藏高原极端环境下的物种快速分化是否是该地区植物形成的普遍式样,还需进一步对青藏高原地区分布的其他科属植物进

行验证。

**致谢** 感谢已故植物分类学专家潘锦堂老师鉴定标本;感谢郭松长博士在本文数据处理上的帮助,以及王海庆博士、沈裕琥博士、杨慧玲博士、夏涛博士、张得芳女士等在分子生物学实验中给予的指导。国家自然科学基金(30170066)资助。

## 参考文献

- Baldwin BG. 1993. Molecular phylogenetics of *Calycadenia* (Compositae) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA: chromosomal and morphological evolution reexamined. *American Journal of Botany* 80: 222–238.
- Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS, Donoghue MJ. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 247–277.
- Brochmann CT, Xiang QY, Brunsfeld SJ, Soltis DE, Soltis P. 1998. Molecular evidence for polyploid origins in *Saxifraga* (Saxifragaceae): the narrow arctic endemic *S. svalbardensis* and its widespread allies. *American Journal of Botany* 85: 135–143.
- Chen S-Y (陈生云), Chen S-L (陈世龙), Xia T (夏涛), Wang Y-J (王玉金). 2005. Phylogeny of *Metagentiana* and related genera (Gentianaceae) inferred from nuclear ribosomal ITS sequences. *Acta Phytotaxonomica Sinica* (植物分类学报) 43: 491–502.
- Chuang H (庄璇). 2001. New taxa of Saxifragaceae from Yunnan. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究) 23: 143–161.
- Conti E, Soltis DE, Hardig TM, Schneider J. 1999. Phylogenetic relationships of the silver saxifragas (*Saxifraga*, sect. *Ligulatae* Haworth): Implications for the evolution of substrate specificity, life histories, and biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13: 536–555.
- Don D. 1822. A monograph of the genus *Saxifraga*. *Transaction of the Linnean Society of London* 13: 341–452.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. *Phytochemical Bulletin* 19: 11–15.
- Engler HGA. 1872. Monographie der Gattung *Saxifraga* L. mit besonderer Berücksichtigung der geographischen Verhältnisse. Breslau.
- Engler HGA, Irmischer E. 1919. Saxifragaceae: *Saxifraga* Das Pflanzenreich, 67, 9 (IV 117): 449–709.
- Gornall RJ. 1987. An outline of a revised classification of *Saxifraga* L. *Botanical Journal of the Linnean Society* 95: 259–272.
- Gornall RJ, Ohba H, Pan J-T. 2000. New taxa, names, and combinations in the *Saxifraga* (Saxifragaceae) for the Flora of China. *Novon* 10: 375–377.
- Haworth AH. 1812. *Synopsis plantarum succulentarum*. London.
- Haworth AH. 1821. *Saxifragearum enumeratio*. London.
- Jin L (金兰). 1998. The ultrastructure of *Saxifraga tangutica* chloroplast and mitochondria. *Journal of Qinghai Normal*



- University (Natural Science)(青海师范大学学报(自然科学版)) 2: 49–53.
- Kohlein F. 1984. Saxifragaceae and related genera. London: Batsford.
- Linnaeus C. 1753. Species plantarum. Stockholm.
- Liu J-Q, Gao T-G, Chen Z-D, Lu A-M. 2002. Molecular phylogeny and biogeography of the Qinghai-Tibet Plateau endemic *Nannoglottis* (Asteraceae). Molecular Phylogenetics and Evolution 23: 307–325.
- Liu J-Q, Wang Y-J, Wang A-L, Hideaki O, Abbott R-J. 2006. Radiation and diversification within the *Ligularia-Cremathodium-Parasenecio* complex (Asteraceae) triggered by uplift of the Qinghai-Tibetan Plateau. Molecular Phylogenetics and Evolution 38: 31–49.
- Luo P (罗鹏), Tian X-Q (田晓琴). 1997. An investigation on folk medical plants of genus *Saxifraga* L. in Northwest Sichuan Plateau. Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacy (中国民族民间医药杂志) 25: 32–34.
- Maddison DR. 1991. The discovery and importance of multiple islands of most-parsimonious trees. Systematic Zoology 40: 315–318.
- Ohba H, Wu S-K, Akiyama S. 1995. *Saxifraga*: studies of the flora of the Kunlun and the Karakorum Mountains, Central Asia, 2. Journal of Japanese Botany 70: 225–232.
- Pan J-T (潘锦堂). 1978. The genus *Saxifraga* in Qing-Zang Plateau. Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报) 16 (2): 11–35.
- Pan J-T (潘锦堂). 1982. The relationship between distribution, evolution of *Saxifraga* L. subsect. *Gemmiparae* Engl. et Irmsch and Qing-Zang Plateau uplift. Acta Biologica Plateau Sinica (高原生物学集刊) 1: 27–34.
- Pan J-T (潘锦堂). 1990. New taxa of the genus *Saxifraga* from China. Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报) 28: 384–396.
- Pan J-T (潘锦堂). 1991. A study on the genus *Saxifraga* L. from China. Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报) 29: 1–24.
- Pan J-T (潘锦堂). 1992. *Saxifraga* L. In: Flora Reipublicae Popularis Sinicae (中国植物志). Beijing: Science Press. 34 (2): 35–231.
- Pan J-T, Gornall RJ, Ohba H. 2001. *Saxifraga* L. In: Wu Z-Y, Raven PH eds. Flora of China. Beijing: Science Press; St. Louis: Missouri Botanical Garden Press. 8: 280–345.
- Pan J-T (潘锦堂), Mei L-J (梅丽娟), Chen S-L (陈世龙), Zhang D-J (张得钧). 2006. *Saxifraga banmaensis* and *S. dingqingensis*, two new species of the Saxifragaceae from China. Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报) 44: 443–446.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19: 1572–1574.
- Seringe NC. 1830. Saxifragaceae. In: De Candolle A P ed. Prodromus systematics naturalist regni vegetabilis. Paris 4: 17–47.
- Soltis DE, Kuzoff RK, Conti E, Gornall R, Ferguson K. 1996. *matK* and *rbcL* gene sequence data indicate that *Saxifraga* (Saxifragaceae) is polyphyletic. American Journal of Botany 83: 371–382.
- Spongberg SA. 1972. The genera of Saxifragaceae in the southeastern United States. Journal of the Arnold 53: 409–498.
- Swofford DL. 2003. PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\* and other methods). Version 4.0b10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Tausch I F. 1823. Hortus Canalius. Decas 1, Prague.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: exible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research 25: 4876–4882.
- Tian X (田欣), Li D-Z (李德铎). 2002. Application of DNA sequences in plant phylogenetic study. Acta Botanica Yunnanica (云南植物研究) 24: 170–184.
- Vargas P. 2000. A phylogenetic study of *Saxifraga* sect. *Saxifraga* (Saxifragaceae) based on nrDNA ITS sequences. Plant Systematics and Evolution 223: 59–70.
- Vargas P, Baldwin B, Constance L. 1998. Nuclear ribosomal DNA evidence for a western North American origin of Hawaiian and South American species of *Sanicula* (Apiaceae). Proceedings of the National Academy of Sciences USA 95: 235–240.
- Vargas P, Morton CM, Jury SL. 1999. Biogeographic patterns in Mediterranean and Macaronesian species of *Saxifraga* (Saxifragaceae) inferred from phylogenetic analyses of ITS sequences. American Journal of Botany 86: 724–734.
- Wang A-L, Yang M-H, Liu J-Q. 2005. Molecular phylogeny, recent radiation and evolution of gross morphology of the rhubarb genus *Rheum* (Polygonaceae) inferred from chloroplast DNA *trnL-F* sequences. Annals of Botany 96: 489–498.
- Wang Y-J (王玉金), Li X-J (李小娟), Hao G (郝刚), Liu J-Q (刘健全). 2004. Molecular phylogeny and biogeography of *Androsace* (Primulaceae) and the convergent evolution of cushion morphology. Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报) 42: 481–499.
- Wang Y-J (王玉金), Liu J-Q (刘健全). 2004. A preliminary investigation on the phylogeny of *Saussurea* (Asteraceae: Cardueae) based on chloroplast DNA *trnL-F* sequences. Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报) 42: 136–153.
- Webb DA, Gornall RJ. 1989. Saxifragaceae of Europe. London: Christopher Helm.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ eds. PCR protocols: A guide to methods and application. San Diego, California: Academic Press. 315–322.
- Wu C-Y (吴征镒). 1984. Saxifragaceae. In: Index Florae Yunnanensis, Tomus I (云南种子植物名录, 上册). Kunming: The People's Publishing House, Yunnan. 228–246.
- Wu C-Y (吴征镒), Pan J-T (潘锦堂). 1990. New taxa of the genus *Saxifraga* from Hengduan Mountains. Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报) 28: 54–67.