



祁连山区特有物种黑虎耳草的 居群遗传多样性研究

王智华^{1,2}, 李小娟³, 曹倩^{1,2}, 马小磊^{1,2}, 高庆波^{1,4*}

(1 中国科学院 西北高原生物研究所, 高原生物适应与进化重点实验室, 西宁 810001; 2 中国科学院大学, 北京 100049; 3 青海民族大学 生态环境与资源学院, 西宁 810007; 4 中国科学院 西北高原生物研究所, 青海省作物分子育种重点实验室, 西宁 810001)

摘要: 利用叶绿体基因(*rbcL* 和 *trnS-G*)及核糖体 DNA 内转录间隔区(ITS), 对祁连山区狭域分布的特有物种黑虎耳草 8 个居群(115 个个体)进行遗传多样性研究, 旨在揭示黑虎耳草的居群遗传结构及其历史进化过程。结果表明: (1) 所有取样个体共检测到 4 个 cpDNA 单倍型和 9 个 ITS 单倍型, 其中祁连山东南部的居群固定较多的单倍型和特有单倍型, 而西北部居群只固定少数几个广泛分布的单倍型, 且遗传多样性普遍较低。(2) 基于 cpDNA 数据和 ITS 数据的分子变异分析(AMOVA)显示, 遗传变异主要来源于居群内。(3) 基于 cpDNA 数据的中性检验表明, Tajima's *D*(-1.012 30, $P > 0.05$)和 Fu & Li's D^* (-2.066 77, $P > 0.05$)均为负值, 均不显著; 歧点分布分析结果显示, 黑虎耳草居群经历过近期的扩张事件。根据物种现有遗传分布格局推测, 黑虎耳草在第四纪冰期时退缩到祁连山东南部的边缘避难所, 间冰期或冰期后回迁到祁连山西北部地区, 在回迁过程中由于奠基者效应导致祁连山西北部的居群仅固定少数广泛分布的单倍型, 并呈现出较低的遗传多样性; 由于居群较小且相互隔离, 该物种经历了严重的瓶颈效应和遗传漂变, 导致该物种总遗传多样性(H_T)和居群平均遗传多样性(H_S)远低于虎耳草属其他青藏高原-喜马拉雅广域分布的物种。

关键词: 黑虎耳草; 狭域特有物种; 居群遗传多样性; 祁连山; 遗传结构

中图分类号: Q347; Q349⁺.5 文献标志码: A

Population Genetic Analysis of a Qilian Mountains Endemic Species *Saxifraga atrata* (Saxifragaceae)

WANG Zhihua^{1,2}, LI Xiaojuan³, CAO Qian^{1,2}, MA Xiaolei^{1,2}, GAO Qingbo^{1,4*}

(1 Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China; 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3 The College of Ecological Environment and Resources, Qinghai Nationalities University, Xining 810007, China; 4 Key Laboratory of Crop Molecular Breeding of Qinghai Province, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China)

Abstract: Chloroplast DNA fragments (*rbcL*, *trnS-G*) and nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) were employed for studying population genetic diversity of *Saxifraga atrata*, which has a narrow distribution range endemic to the Qilian Mountains. The aim was to reveal genetic structure and population historical evolution of *S. atrata*. The results showed that: (1) four cpDNA and nine ITS haplotypes were isolated among the 115 individuals. Populations from the southeast edge of the Qilian Mountains showed high haplotype richness and uniqueness, whereas northwest populations only harbored

收稿日期: 2020-10-16; 修改稿收到日期: 2020-12-26

基金项目: 青海省应用基础研究项目(2019-ZJ-7019); 青海省“高端创新人才千人计划”

(作者简介: 王智华(1995-), 男, 在读硕士研究生, 主要从事青藏高原植物适应与进化研究。E-mail: r304339275@qq.com/www.cnki.net)

* 通信作者: 高庆波, 研究员, 硕士生导师, 主要从事虎耳草属植物分类学及系统发育学研究。E-mail: qbgao@nwipb.cas.cn

a few widespread haplotypes and usually showed low levels of genetic diversity. (2) Analysis of molecular variance (AMOVA) based on both cpDNA and ITS datasets showed that most variations were from within-populations. (3) Neutrality tests based on cpDNA dataset exhibited negative values, but not significant. However, mismatch distribution analysis strongly supported a recent expansion of *S. atrata*. According to extant genetic structure, we speculated that *S. atrata* retreated to the southeastern refugia of the Qilian Mountains during the Quaternary. The northwest populations were the result of recolonization during inter-glacial or post-glacial periods. Founder effect associated with recolonization should be responsible for haplotype impoverishment and low levels of genetic diversity of northwest populations. Bottleneck effect and genetic drift might be much severe in this narrow endemic species due to small population size and fragmentation, resulting in extremely low levels of total genetic diversity and average within-population diversity compared with other *Saxifraga* species widespread in the Qinghai-Tibet Plateau and Himalayas.

Key words: *Saxifraga atrata* Engl.; narrow endemic species; population genetic diversity; the Qilian Mountains; genetic structure

特有物种的形成及其居群的不连续分布通常与生境的片段化密切相关^[1-3],并受到随后气候波动和环境变化的影响^[3]。狭域分布的特有物种一般具有特殊的生态需求,竞争能力和扩散能力相对较弱,形成居群个体数较少且相互隔离的分布格局^[4-6]。狭域分布特有物种的居群由于受到瓶颈效应、遗传漂变、近交衰退等因素的影响,常常具有较低的遗传多样性^[3-4],更易受到环境波动和人类活动的影响,成为保护生物学关注的热点。

虎耳草属(*Saxifraga* L.)是虎耳草科(Saxifragaceae)最大的属,全世界约 500 种,主要分布在北半球的高山地区和环北极地区^[7]。中国分布有虎耳草属植物约 216 种,其中约 60% 为中国特有种,主要为青藏高原-喜马拉雅地区狭域分布种^[8]。目前,关于中国虎耳草属植物的研究主要集中在分类学^[9-13]、系统发育学^[14-15]、物种分化^[16-18]及广布物种的谱系地理学方面^[7,19-20]。在青藏高原-喜马拉雅地区狭域分布的特有虎耳草属植物遗传多样性研究鲜有报道。

黑虎耳草(*Saxifraga atrata* Engl.)隶属于虎耳草属小花组(sect. *Micranthes*)^[8]。分子系统发育学研究发现,小花组与虎耳草属其他物种亲缘关系较远,而与虎耳草科其他属亲缘关系较近,建议将小花组从虎耳草属分离出来,成立独立的属 *Micranthes* Haworth^[21-22]。由于缺乏可接受的中文名,本研究仍将黑虎耳草作为广义虎耳草属的物种来处理,并采用原有的拉丁名和中文名。黑虎耳草为多年生草本植物,叶基生,花多数,组成圆锥状或总状花序^[23]。该物种生于海拔 3 000~4 200 m 的高寒草甸或流石滩,为祁连山地区特有狭域分布

种^[23]。此外,黑虎耳草为传统藏药,以花入药,微苦,寒;退热,治肺部疾病^[23]。根据野外调查发现,该物种分布范围狭窄,居群间相互隔离,居群内个体数少,易受到生境变化及人类活动的影响。

本研究选取叶绿体 DNA(cpDNA) *rbcL*、*trnS-G* 片段和核糖体 DNA(nrDNA) 内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)对祁连山区狭域分布的特有物种黑虎耳草进行居群遗传多样性研究。目的在于揭示该物种现有居群的遗传多样性水平及其分布格局,探讨其现有遗传格局的历史成因。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验材料于 2015 年和 2017 年采自青海省祁连山地区,共采集黑虎耳草 8 个居群 115 个个体,包括贵德县、门源县、大通县各 1 个居群,祁连县 5 个居群(表 1;图 1, a, b)。每个居群随机采集 10~19 个个体,个体之间间隔 10 m 以上。选取生长良好植株的新鲜幼嫩叶片,随即用硅胶干燥,带回实验室存放于 -20 °C 冰箱备用。凭证标本由高庆波研究员鉴定,馆藏于中国科学院西北高原生物研究所青藏高原生物标本馆(青海,西宁)。

1.2 DNA 提取与 PCR 扩增

采用改良的 CTAB 法从硅胶干燥的叶片中提取总 DNA^[24]。采用通用引物对所有个体的 cpDNA *rbcL*、*trnS-G* 片段和 nrDNA ITS 片段进行 PCR 扩增^[25-27]。PCR 反应体系为 50 μ L, 包含 1.5 μ L DNA 模板 (20 ng/ μ L), 正反向引物各 1 μ L (10 μ mol/L), 2 μ L dNTPs (10 mmol/L), 5 μ L 10 \times PCR 缓冲液 (含 1.5 mmol/L $E\cdot Mg^{2+}$), 0.5 μ L (5 U)

表 1 黑虎耳草 8 个居群的采集信息

Table 1 Collecting information of eight populations of *S. atrata*

编号 Code	凭证标本 Voucher	采集地 Locality	纬度 Latitude(N)/°	经度 Longitude(E)/°	海拔 Altitude/m	个体数 Number
P1	Gao2015001	青海贵德 Guide, Qinghai	36.359 8	101.447 7	3 795	10
P2	Gao2017008	青海祁连 Qilian, Qinghai	38.026 6	100.230 7	3 895	15
P3	Gao2017020	青海祁连 Qilian, Qinghai	38.585 5	98.926 7	3 893	19
P4	Gao2017036	青海祁连 Qilian, Qinghai	38.610 4	99.475 1	4 145	13
P5	Gao2017053	青海祁连 Qilian, Qinghai	38.314 6	99.310 6	3 784	14
P6	Gao2017072	青海祁连 Qilian, Qinghai	37.999 8	100.917 7	3 654	15
P7	Gao2017080	青海门源 Menyuan, Qinghai	37.636 1	101.531 0	3 922	14
P8	Gao2017095	青海大通 Datong, Qinghai	37.211 5	101.800 8	3 681	15

μL) Taq DNA 聚合酶(TaKaRa, 大连), $39 \mu\text{L}$ 双蒸水。PCR 扩增程序为: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min; $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 45 s, $58 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 45 s, 循环 35 次; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 3 min。PCR 产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 然后送北京新时代众合科技有限公司进行双向测序, 测序引物同 PCR 扩增引物。

1.3 数据分析

首先利用 Chromas 2.6.4 软件对测序峰图进行核对, 并删除引物序列^[28]。利用 MEGA 7.0.26 软件对序列进行对位排列, 并加以手工微调, 然后裁剪成首尾整齐的序列^[29]。将 cpDNA 2 个片段进行串联合并后, 用 DnaSP 5.10 统计单倍型^[30]。对于 ITS 序列, 由于内转录间隔区 1(ITS1)的测序结果不理想, 本研究选取测序结果较好的 5.8S 核糖体 RNA (5.8S rRNA) 和内转录间隔区 2(ITS2)序列进行后续分析。若 ITS 正反序列在某位点均显示套峰, 且较弱峰图达到较强峰图的 1/4, 该位点被视为杂合位点^[31-32]。利用 DnaSP 5.10 软件包中的 PHASE 2.1 软件对 ITS 序列进行单倍型重建^[33-34]。随后对 ITS 序列的分析均基于分离出的 ITS 单倍型序列。

利用 PERMUT 软件计算居群内平均遗传多样性(H_S)、总遗传多样性(H_T)以及 2 个居群遗传分化系数 G_{ST} 和 N_{ST} ^[35]。 G_{ST} 仅考虑单倍型频率, N_{ST} 兼顾了单倍型频率和单倍型之间的相似性。用 1 000 次的重复置换检验对 N_{ST} 和 G_{ST} 进行比较, 当 N_{ST} 显著大于 G_{ST} 时, 表明居群在分布范围内具有显著的谱系地理结构。利用 Arlequin 3.11 计算每个居群的遗传多样性(h)和核苷酸多样性(π)^[36-37]。利用 Arlequin 软件包中的分子变异分析(AMOVA)检测居群内和居群间的遗传变异分布格局, 并对居群间遗传变异分化系数 F_{ST} 进行评价(1 000 次置换检验)^[36-37]。

中央连接网状图可以更好地揭示遗传分化较小的单倍型之间的系统发育关系。以最大简约法为原则, 利用 NETWORK 10.1.0.0 软件构件 cpDNA 和 ITS 单倍型的中央连接网状图^[38-39]。多碱基的插入/缺失和点突变被认为是通过一步突变形成, 设置相同的权重。在中央连接网状图中, 古老的单倍型多位于网络图的内部, 年轻的单倍型多位于网络图的边缘^[40-41]。

基于 cpDNA 数据进行歧点分布分析来预测黑虎耳草居群的历史动态。若歧点分布呈现单峰曲线, 表明居群经历了近期扩张; 若歧点分布呈现多峰曲线, 则表示在较长的时间内居群大小相对稳定, 并处于个体平衡中^[42-46]。利用 1 000 次的自展重来产生居群扩张模型的预期分布。Tajima's D 和 Fu & Li's D^* 两种无限突变位点模型的中性检验也被用来预测居群历史动态, 显著的负值说明居群可能经历过近期扩张^[47-48]。歧点分布分析和中性检验均在 DnaSP 5.10 软件中完成^[30]。

2 结果与分析

2.1 单倍型/基因型变异位点和地理分布格局

DNA 分子序列对位排列后, 黑虎耳草 8 个居群 115 个个体 cpDNA 联合片段(*rbcL*, *trnS-G*)的序列总长度为 1 269 bp(H1/H2/H3 和 H4 中 *rbcL* 片段的 GenBank 登录号分别为 MW296152 和 MW296153; H1、H2、H3 和 H4 中 *trnS-G* 片段的 GenBank 登录号分别为 MW296154、MW296155、MW296156 和 MW296157)。通过 DnaSP 软件分析, 共得到 4 个单倍型(H1~H4), 检测出 4 个变异位点, 其中 1 个位点为点突变, 另外 3 个位点为插入/缺失(表 2)。单倍型 H2 出现频率最高, 出现在黑虎耳草所有 8 个居群中; 其次为单倍型 H3, 出现

在 5 个居群中;单倍型 H1 和 H4 分别只出现在祁连山东南部居群 P1 和 P8 中(图 1,b;表 3)。基于 cpDNA 数据的居群遗传多样性(h)变化范围为 0~0.538 5;居群核苷酸多样性(π)变化范围为 0~0.002 130(表 3)。

由于 ITS1 的测序结果不理想,本研究选取 5.8S+ITS2 序列进行后续分析。对位排列后的序列长度为 408 bp。利用 PHASE 软件进行单倍型分离,共得到 9 个单倍型(G1~G9,GenBank 登录号分别为 MW296143、MW296144、MW296145、MW296146、MW296147、MW296148、MW296149、MW296150 和 MW296151),检测出 10 个变异位点(表 4)。其中 G1 出现频率最高,出现在所有 8 个居

表 2 黑虎耳草 cpDNA 单倍型变异位点

Table 2 Mutation sites of cpDNA haplotypes of *S. atrata*

单倍型 Haplotype	变异位点 Mutation site			
	<i>rbcL</i>	<i>trnS-G</i>		
	404	821	846	1109
H1	C	—	TAA	TCTTA
H2	C	—	—	—
H3	C	—	—	TCTTA
H4	T	AA	—	TCTTA

群中,其余 ITS 单倍型多为居群特有单倍型,绝大

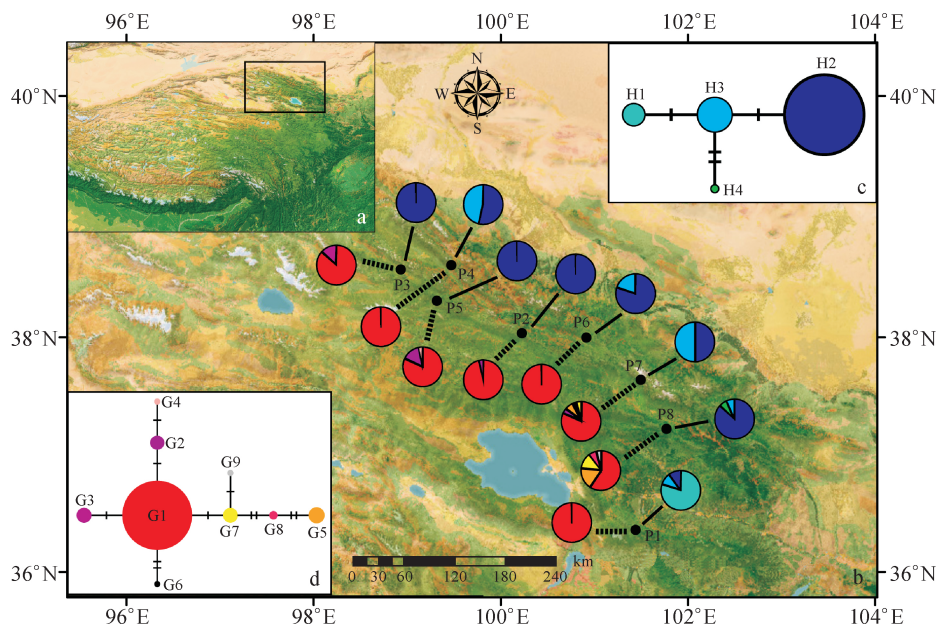
部分只出现在祁连山东南部居群中(P7、P8)。基于 ITS 数据的居群遗传多样性(h)变化范围为 0~0.609 2;居群核苷酸多样性(π)变化范围为 0~0.003 589(表 3)。

2.2 单倍型间的系统发育关系

cpDNA 和 ITS 单倍型检测出较少的突变位点,表明序列之间的遗传分化较小。Network 软件可更好地揭示系统进化关系较近的序列之间的系统发育关系。基于最大似然法构建的中央连接网状图显示,居群共享单倍型,如 cpDNA H3 和 ITS G1,位于网络图的中央位置,根据溯祖理论,推测为较古老的单倍型。居群特有的单倍型一般位于网络图的边缘,可能是通过近期分化衍生而来的年轻单倍型(图 1,c,d)。

2.3 居群遗传结构

基于 cpDNA 数据计算得出黑虎耳草居群内平均遗传多样性(H_s)为 0.257、总遗传多样性(H_T)为 0.464,两个遗传分化系数 G_{ST} 和 N_{ST} 分别为 0.447 和 0.513。 N_{ST} 大于 G_{ST} 但不显著,表明黑虎耳草在整个分布范围内没有明显的谱系地理结构。ITS 数据揭示了相似的居群遗传结构: $H_s = 0.194, H_T = 0.219, G_{ST} = 0.112, N_{ST} = 0.122; N_{ST} > G_{ST} (P > 0.05)$ 。基于 cpDNA 和 ITS 数据



a, b 饼状图表示每个居群中 cpDNA(实线)和 ITS(虚线)单倍型的频率;c, d 分别为基于 cpDNA 和 ITS 单倍型构建的中央连接网状图

图 1 黑虎耳草 8 个居群的采样图及 cpDNA 和 ITS 单倍型分布图

a and b pie charts show the proportion of haplotypes of cpDNA (solid line) and ITS (dashed line) within each population;

c and d show the median-joining networks based on haplotypes of cpDNA and ITS, respectively

表 3 黑虎耳草 8 个居群的单倍型/基因型组成及多样性信息

Table 3 Haplotype/genotype composition and diversity of the eight sampled populations of *S. atrata*

居群 编号 Code	cpDNA			ITS		
	单倍型组成(个体数) Haplotype composition (No. of individuals)	遗传多样性 Gene diversity(<i>h</i>)	核苷酸多样性 Nucleotide diversity ($\pi \times 10^3$)	基因型组成(个体数) Genotype composition (No. of individuals)	遗传多样性 Gene diversity (<i>h</i>)	核苷酸多样性 Nucleotide diversity ($\pi \times 10^3$)
P1	H1 (8); H2 (1); H3 (1)	0.377 8	1.631	G1/G1 (10)	0.000 0	0.000
P2	H2 (15)	0.000 0	0.000	G1/G1 (14); G1/G2 (1)	0.066 7	0.163
P3	H2 (19)	0.000 0	0.000	G1/G1 (14); G1/G3 (5)	0.234 7	0.575
P4	H2 (7); H3 (6)	0.538 5	2.130	G1/G1 (13)	0.000 0	0.000
P5	H2 (14)	0.000 0	0.000	G1/G1 (9); G1/G2 (4); G1/G4 (1)	0.314 8	0.921
P6	H2 (12); H3 (3)	0.342 9	1.356	G1/G1 (15)	0.000 0	0.000
P7	H2 (7); H3 (7)	0.538 5	2.130	G1/G1 (9); G1/G2 (1); G1/G5 (2); G1/G6 (1); G1/G7 (1)	0.328 0	1.712
P8	H2 (13); H3 (1); H4 (1)	0.257 1	1.294	G1/G1 (5); G1/G5 (3); G5/G7 (1); G5/G9 (1); G1/G7 (3); G1/G8 (2)	0.609 2	3.589

表 4 黑虎耳草 ITS 单倍型变异位点

Table 4 Mutation sites of ITS haplotypes of *S. atrata*

单倍型 Haplotype	变异位点 Mutation site									
	234	235	238	248	271	288	355	368	371	390
G1	T	A	G	G	G	G	G	G	C	G
G2	T	A	G	G	G	G	G	G	T	G
G3	T	T	G	G	G	G	G	G	C	G
G4	T	A	G	G	G	G	G	G	T	C
G5	G	A	A	G	A	G	G	G	C	G
G6	T	A	G	G	G	G	T	A	C	G
G7	T	A	G	A	G	G	G	G	C	G
G8	G	A	A	A	G	G	G	G	C	G
G9	T	A	G	A	G	T	G	G	C	G

表 5 黑虎耳草 8 个居群的分子变异分析

Table 5 Analysis of molecular variance for the eight populations of *S. atrata*

分子片段 Fragment	变异来源 Source of variation	自由度 Degrees of freedom	总方差 Sum of squares	变异成分 Variance component	变异比例 Percentage of variation/%	F_{ST}
cpDNA	居群间 Among populations	7	62.188	0.577 02	48.17	0.481 75 ($P < 0.01$)
	居群内 Within populations	107	66.421	0.620 75	51.83	
	总计 Total	114	128.609	1.197 78		
ITS	居群间 Among populations	7	6.423	0.025 58	12.16	0.121 56 ($P < 0.01$)
	居群内 Within populations	222	41.042	0.184 87	87.84	
	总计 Total	229	47.465	0.210 46		

的分子变异分析结果均表明,黑虎耳草现有遗传变异主要存在于居群内(cpDNA: 51.83%; ITS: 87.84%),居群遗传分化系数(F_{ST})分别为0.481 75和0.121 56(表 5)。

2.4 基于 cpDNA 联合序列的居群历史动态分析
对黑虎耳草 cpDNA 联合序列所有个体进行中性检验,结果表明, Tajima's D (-1.012 30, $P > 0.05$)和 Fu & Li's D (-2.066 77, $P > 0.05$)均

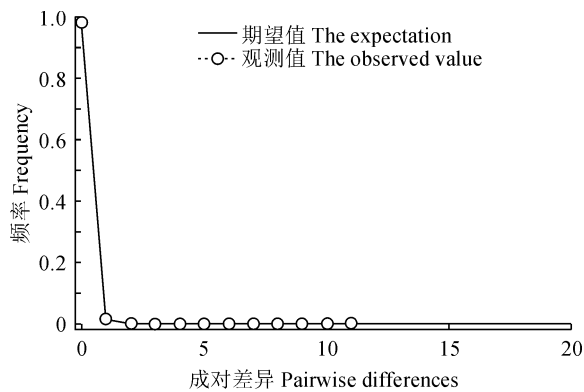


图2 黑虎耳草 115 个体叶绿体 DNA 联合片段歧点分布分析

Fig.2 Mismatch distribution analysis for the 115 individuals based on combined cpDNA fragments of *S. atrata*

为负值,均不显著。歧点分布分析结果显示,在黑虎耳草整个分布范围内观测到的歧点分布与居群扩张模型预测值高度一致(图2),说明该物种在整个分布范围内经历过近期扩张现象。

3 讨论

3.1 黑虎耳草的居群遗传结构和进化历史

狭域分布物种是否具有较低的遗传多样性仍存在争议^[49]。一般认为,与同属广域分布物种相比,狭域分布物种往往具有较低的遗传多样性。这是因为,狭域分布物种更容易受到如下因素的影响:1)较小的有效居群大小;2)奠基者效应和瓶颈效应;3)遗传漂变和近交衰退;4)较低的扩散能力和竞争能力^[4]。然而,Gitzendanner对分别来自同属的30多对狭域/广域分布物种的遗传多样性进行比较,发现上述观点过于概括^[49]。受亲缘关系远近的影响,有些属植物的遗传多样性普遍较高,有些属的普遍较低,而对于同属植物来说,大部分情况下狭域分布物种的遗传多样性比广域分布物种低,少部分狭域物种的遗传多样性与广域物种相当,甚至更高^[49]。

物种水平的总遗传多样性(H_T)常被用来比较不同物种间的遗传多样性水平^[49]。基于cpDNA和ITS数据的遗传变异分析表明,黑虎耳草总遗传多样性水平较低(cpDNA: $H_T = 0.464$; ITS: $H_T = 0.219$)。明显低于虎耳草属其他青藏高原-喜马拉雅广域分布物种,如山地虎耳草(*Saxifraga sinomontana*; cpDNA: $H_T = 0.978$; ITS: $H_T = 0.896$)^[7]、小伞虎耳草(*S. umbellulata*; cpDNA: $H_T = 0.964$; ITS: $H_T = 1.000$)^[13]、篦齿虎耳草(*S. pa-*

973)^[13]、唐古特虎耳草(*S. tangutica*; cpDNA: $H_T = 0.933$)^[19]、优越虎耳草(*S. egregia*; cpDNA: $H_T = 0.868$)^[20]等。这可能是由于:1)所选的分子片段进化速率较慢,低估了黑虎耳草物种水平和居群水平的遗传多样性;2)黑虎耳草在居群历史进化中经历了严重的奠基者效应和瓶颈效应。真核生物核糖体DNA内转录间隔区(ITS)被5.8S rRNA基因分为内转录间隔区1(ITS1)和内转录间隔区2(ITS2)^[50]。其中,5.8S rRNA基因较为保守,而ITS1和ITS2变异速率较快。由于ITS1区域测序结果不理想,本研究仅使用5.8S和ITS2区域的序列会低估基于ITS数据计算出的黑虎耳草物种水平和居群水平的遗传多样性。然而,本研究选用的cpDNA分子标记与小伞虎耳草和篦齿虎耳草相同^[13]。基于cpDNA数据计算出的黑虎耳草遗传多样性远低于后者,说明黑虎耳草本身遗传多样性较低,而不是由于分子片段的选取偏向。黑虎耳草物种水平和居群水平较低的遗传多样性可能与该物种的居群进化历史有关。

第四纪冰期和间冰期循环所引起的气候波动对物种的遗传分化和特有物种形成产生了深远影响^[51-52]。谱系地理学通过研究物种现有的遗传分布格局,推测其历史成因,重建生物区系进化历史^[53]。由于独特的地质气候历史和复杂的地理拓扑结构,青藏高原及其周边地区的高山植物对第四纪冰期的响应表现出不同的谱系地理模式^[54]。其中一种模式认为,冰期时青藏高原台面的居群退缩到海拔较低的东南部边缘避难所内,间冰期或冰期后重新扩散到高原台面。与之相对应的遗传多样性分布格局为,高原东南部边缘避难所内的居群由于分化时间较长积累了较多的遗传变异,拥有较多的单倍型和特有单倍型,具有较高的遗传多样性。而高原台面的居群由于回迁过程中的奠基者效应仅固定少数分布广泛的单倍型,常呈现出较低的遗传多样性。位于祁连山脉东南部的黑虎耳草居群,如P1、P7和P8,固定了几乎所有的cpDNA单倍型和ITS基因型,并具有较高的基因多样性和(或)核苷酸多样性。而祁连山西北部的居群仅固定少数广泛分布的cpDNA单倍型和ITS基因型,基因多样性和核苷酸多样性普遍较低。根据黑虎耳草居群现有的遗传分布格局推测,第四纪冰期时该物种退缩到祁连山东南部边缘避难所,间冰期或冰期后回迁到祁连山西北部地区。这也得到了中性检验和歧点分布分析的支持。虽然中性检验呈现不显著的负值,

而歧点分布分析结果显示,在黑虎耳草整个分布范围内观测到的歧点分布与居群扩张模型预测值高度一致,说明该物种在整个分布范围内经历过近期扩张现象。符合上述谱系地理模式的物种还有长花马先蒿(*Pedicularis longiflora*)^[55]、青海云杉(*Picea crassifolia*)^[56]、祁连圆柏(*Juniperus przewalskii*)^[57]等。然而,狭域分布物种由于居群较小且相互隔离,更易受到瓶颈效应和遗传漂变的影响,导致黑虎耳草呈现较低的遗传多样性。

3.2 保护生物学建议

狭域分布的特有物种常呈现出较低的遗传多样性,更易受到环境波动和人类活动的影响,成为保护生物学关注的热点^[3-4]。青藏高原地理拓扑结构复杂、生境多样、生态位分化明显,是世界生物多样性热点地区,也是世界上特有种密度最高的地区之一^[58]。黑虎耳草为狭域分布的特有物种,只分布在祁连山区,生于高寒草甸和流石滩。该物种各居群

间相互隔离,每居群个体数较少。较小的居群常不足以抵消遗传漂变、近交衰退及生境随机波动的影响^[3]。

所幸的是,黑虎耳草的绝大多数居群位于祁连山国家公园范围内,最大限度地限制了人类活动对该物种的影响,有助于该物种居群大小的稳定和增长。居群遗传分布格局研究有助于保护策略的制定,可以在自然居群中最大限度地保存物种的遗传多样性。值得注意的是,固定特有单倍型或基因型最多的2个居群P1和P8,位于祁连山国家公园范围之外。建议对这些区域进行持续稳定的生态监测,避免放牧强度过高,维持生态系统的相对稳定,必要时可以对这2个居群进行种质资源搜集并实施迁地保护。黑虎耳草作为一种藏药,尝试开发其规模繁殖的方法可以减轻对野生资源的需求压力,对保护其多样性也有一定积极意义。

参考文献:

- [1] THOMPSON J D, LAVERGNE S, AFFRE L, *et al.* Ecological differentiation of Mediterranean endemic plants [J]. *Taxon*, 2005, **54**(4): 967-976.
- [2] MAYOL M, PALAU C, ROSSELLÓ J A, *et al.* Patterns of genetic variability and habitat occupancy in *Crepis triasii* (Asteraceae) at different spatial scales: insights on evolutionary processes leading to diversification in continental islands [J]. *Annals of Botany*, 2012, **109**(2): 429-441.
- [3] GARGIULO R, CASTRO O D, GUACCHIO E D, *et al.* Genetic diversity and origin of the rare, narrow endemic *Asperula crassifolia* (Rubiaceae) [J]. *Plants Systematics and Evolution*, 2019, **305**(3): 181-192.
- [4] CRAWFORD D J, RUIZ E, STUESSY T F, *et al.* Allozyme diversity in the endemic flowering plant species of the Juan Fernandez Archipelago, Chile: ecological and historical factors with implications for conservation [J]. *American Journal of Botany*, 2001, **88**(12): 2 195-2 203.
- [5] KARRON J D. A comparison of levels of genetic polymorphism and self-compatibility in geographically restricted and widespread plant congeners[J]. *Evolutionary Ecology*, 1987, **1**(1): 47-58.
- [6] LAVERGNE S, THOMPSON J D, GARNIER E, *et al.* The biology and ecology of narrow endemic and widespread plants: a comparative study of trait variation in 20 congeneric pairs [J]. *Oikos*, 2004, **107**(3): 505-518.
- [7] LI Y, GAO Q B, GENGJI Z M, *et al.* Rapid intraspecific diversification of the alpine species *Saxifraga sinomontana* (Saxifragaceae) in the Qinghai-Tibetan Plateau and Himalayas [J]. *Frontiers in Genetics*, 2018, **9**: 381.
- [8] WU C Y, RAVEN P H. *Flora of China* [M]. Beijing: Science Press; St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 2001, **8**: 208-334.
- [9] 潘锦堂. 青藏高原虎耳草属植物的初步研究[J]. *植物分类学报*, 1978, **16**(2): 11-35.
- PAN J T. The genus *Saxifraga* in Qing-zang Plateau [J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 1978, **16**(2): 11-35.
- [10] 吴征镒, 潘锦堂. 横断山虎耳草属新分类群[J]. *植物分类学报*, 1990, **28**(1): 54-67.
- WU C Y, PAN J T. New taxa of the genus *Saxifraga* from Hengduan Mountains [J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 1990, **28**(1): 54-67.
- [11] 潘锦堂. 中国虎耳草属新分类群[J]. *植物分类学报*, 1990, **28**(5): 384-396.
- PAN J T. New taxa of the genus *Saxifraga* from China [J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 1990, **28**(5): 384-396.
- [12] 潘锦堂. 中国虎耳草属的研究[J]. *植物分类学报*, 1991, **29**(1): 1-24.
- PAN J T. A study on the genus *Saxifraga* L. from China [J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 1991, **29**(1): 1-24.
- [13] GAO Q B, LI Y, GENGJI Z M, *et al.* Population genetic differentiation and taxonomy of three closely related species of

- Saxifraga* (Saxifragaceae) from southern Tibet and the Hengduan Mountains [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, **8**: 1 325.
- [14] GAO Q B, LI Y H, GORNALL R J, *et al.* Phylogeny and speciation in *Saxifraga* sect. *Ciliatae* (Saxifragaceae): evidence from *psbA-trnH*, *trnL-F* and ITS sequences [J]. *Taxon*, 2015, **64**(4): 703-713.
- [15] TKACH N, RÖSER M, MIEHE G, *et al.* Molecular phylogenetics, morphology and a revised classification of the complex genus *Saxifraga* (Saxifragaceae) [J]. *Taxon*, 2015, **64**(6): 1 159-1 187.
- [16] EBERSBACH J, MUELLNER-RIEHL A N, FAVRE A, *et al.* Driving forces behind evolutionary radiations: *Saxifraga* section *Ciliatae* (Saxifragaceae) in the region of the Qinghai-Tibet Plateau [J]. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2018, **186**(3): 304-320.
- [17] EBERSBACH J, MUELLNER-RIEHL A N, MICHALAK I, *et al.* In and out of the Qinghai-Tibet Plateau: divergence time estimation and historical biogeography of the large arctic-alpine genus *Saxifraga* L. [J]. *Journal of Biogeography*, 2017, **44**(4): 900-910.
- [18] EBERSBACH J, SCHNITZLER J, FAVRE A, *et al.* Evolutionary radiations in the species-rich mountain genus *Saxifraga* L. [J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2017, **17**: 119.
- [19] 更吉卓玛, 李彦, 贾留坤, 等. 唐古特虎耳草谱系地理学研究[J]. 西北植物学报, 2018, **38**(2): 370-380.
GENGJI Z M, LI Y, JIA L K, *et al.* Phylogeography of *Saxifraga tangutica* Engl. (Saxifragaceae) [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2018, **38**(2): 370-380.
- [20] 贾留坤, 焦秀洁, 刘海瑞, 等. 喜马拉雅-横断山区优越虎耳草谱系地理学研究 [J]. 植物研究, 2018, **38**(5): 644-652.
JIA L K, JIAO X J, LIU H R, *et al.* Phylogeography of *Saxifraga egregia* in Himalaya-Hengduan Mountains [J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2018, **38**(5): 644-652.
- [21] SOLTIS D E, KUZOFF R K, CONTI E, *et al.* *matK* and *rbcL* gene sequence data indicated that *Saxifraga* (Saxifragaceae) is polyphyletic [J]. *American Journal of Botany*, 1996, **83**(3): 371-382.
- [22] SOLTIS D E, KUZOFF R K, MORT M E, *et al.* Elucidating deep-level phylogenetic relationships in Saxifragaceae using sequences for six chloroplastic and nuclear DNA regions [J]. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 2001, **88**(4): 669-693.
- [23] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1992, **34**(2): 82.
- [24] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material [J]. *Phytochemical Bulletin, Botanical Society of America*, 1987, **19**(1): 11-15.
- [25] FAY M F, SWENSEN S M, CHASE M W. Taxonomic affinities of *Medusagyne oppositifolia* (Medusagynaceae) [J]. *Kew Bulletin*, 1997, **52**(1): 111-120.
- [26] INNIS M A, GELFAND D H, SNINSKY J J, *et al.* PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications [M]. New York: Academic Press, 1990, 315-322.
- [27] HAMILTON M B. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation [J]. *Molecular Ecology*, 1999, **8**(3): 521-523.
- [28] Technelysium Pty Ltd. Chromas version 2.6.4 [PC/OL]. [2019-05-27]. <https://technelysium.com.au/wp/chromas/>.
- [29] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, **33**(7): 1 870-1 874.
- [30] LIBRADO P, ROZAS J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. *Bioinformatics*, 2009, **25**(11): 1 451-1 452.
- [31] FUERTES AGUILAR J, ROSSELLÓ, J A, NIETO FELINER G. Nuclear ribosomal DNA (nrDNA) concerted evolution in natural and artificial hybrids of *Armeria* (Plumbaginaceae) [J]. *Molecular Ecology*, 1999, **8**(8): 1 341-1 346.
- [32] FUERTES AGUILAR J, NIETO FELINER G. Additive polymorphisms and reticulation in an ITS phylogeny of thrifts (*Armeria*, Plumbaginaceae) [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2003, **28**(3): 430-447.
- [33] STEPHENS M, SMITH N J, DONNELLY P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data [J]. *American Journal of Human Genetics*, 2001, **68**(4): 978-989.
- [34] STEPHENS M, DONNELLY P. A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data [J]. *American Journal of Human Genetics*, 2003, **73**(5): 1 162-1 169.
- [35] PONS O, PETIT R J. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles [J]. *Genetics*, 1996, **144**(3): 1 237-1 245.
- [36] EXCOFFIER L, LAVAL G, SCHNEIDER S. Arlequin (ver. 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis [J]. *Evolutionary Bioinformatics*, 2005, **1**: 47-50.
- [37] EXCOFFIER L, LISCHER H E L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2010, **10**(3): 564-567.
- [38] BANDEL T H J, FORSTER P, RÖHL A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1999, **16**(1): 37-48.
- [39] POLZIN T, DANESHMAND S V. On Steiner trees and min-

- imum spanning trees in hypergraphs [J]. *Operations Research Letters*, 2003, **31**(1): 12-20.
- [40] GOLDING G B. The detection of deleterious selection using ancestors inferred from a phylogenetic history [J]. *Genetics Research*, 1987, **49**(1): 71-82.
- [41] CRANDALL K A, TEMPLETON A R. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction [J]. *Genetics*, 1993, **134**(3): 959-969.
- [42] SLATKIN M, HUDSON R R. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations [J]. *Genetics*, 1991, **129**(2): 555-562.
- [43] ROGERS, A R, HARPENDING H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1992, **9**(3): 552-569.
- [44] HARPENDING H C, BATZER M A, GURVEN M, *et al.* Genetic traces of ancient demography [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, **95**(4): 1 961-1 967.
- [45] RAY N, CURRAT M, EXCOFFIER L. Intra-deme molecular diversity in spatially expanding populations [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2003, **20**(1): 76-86.
- [46] EXCOFFIER L. Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model [J]. *Molecular Ecology*, 2004, **13**(4): 853-864.
- [47] TAJIMA F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism [J]. *Genetics*, 1989, **123**(3): 585-595.
- [48] FU Y X, LI W H. Statistical tests of neutrality of mutations [J]. *Genetics*, 1993, **133**(3): 693-709.
- [49] GITZENDANNER M A, SOLTIS P S. Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners [J]. *American Journal of Botany*, 2000, **87**(6): 783-792.
- [50] 阚显照, 乔才元, 高 卉, 等. 长苞铁杉 nrDNA 内转录间隔区及 5.8S 的二级结构分析研究[J]. *激光生物学报*, 2007, **16**(3): 327-333.
- KAN X Z, QIAO C Y, GAO H, *et al.* Secondary structure analysis on the nrDNA internal transcribed spacers and 5.8 S in *Nothotsuga longibracteata* [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2007, **16**(3): 327-333.
- [51] HEWITT G. The genetic legacy of Quaternary ice ages [J]. *Nature*, 2000, **405**(6 789): 907-913.
- [52] HEWITT G M. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B - Biological Sciences*, 2004, **359**(1 442): 183-195.
- [53] AVISE J C. *Phylogeography: the History and Formation of Species* [M]. Cambridge, MA, USA: Harvard University Press, 2000.
- [54] 于海彬, 张镜铤. 青藏高原及其周边地区高山植物谱系地理学研究进展[J]. *西北植物学报*, 2013, **33**(6): 1 268-1 278.
- YU H B, ZHANG Y L. Advances in phylogeography of alpine plants in the Tibetan Plateau and adjacent regions [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2013, **33**(6): 1 268-1 278.
- [55] YANG F S, LI Y F, DING X, *et al.* Extensive population expansion of *Pedicularis longiflora* (Orobanchaceae) on the Qinghai-Tibetan Plateau and its correlation with the Quaternary climate change [J]. *Molecular Ecology*, 2008, **17**(23): 5 135-5 145.
- [56] MENG L H, YANG R, ABBOTT R J, *et al.* Mitochondrial and chloroplast phylogeography of *Picea crassifolia* Kom. (Pinaceae) in the Qinghai-Tibetan Plateau and adjacent highlands [J]. *Molecular Ecology*, 2007, **16**(19): 4 128-4 137.
- [57] ZHANG Q, CHIANG T Y, GEORGE M, *et al.* Phylogeography of the Qinghai-Tibetan Plateau endemic *Juniperus przewalskii* (Cupressaceae) inferred from chloroplast DNA sequence variation [J]. *Molecular Ecology*, 2005, **14**(11): 3 513-3 524.
- [58] 武素功, 杨永平, 费 勇. 青藏高原高寒地区种子植物区系的研究[J]. *云南植物研究*, 1995, **17**(3): 233-250.
- WU S G, YANG Y P, FEI Y. On the flora of the alpine region in the Qinghai-Xizang (Tibet) Plateau [J]. *Acta Botanica Yunnanica*, 1995, **17**(3): 233-250.

(编辑:宋亚珍)