

用nrDNA ITS序列探讨狭蕊龙胆属及其近缘属 (龙胆科)的系统发育

^{1,2}陈生云 ¹陈世龙* ^{1,2}夏涛 ^{1,2}王玉金

¹(中国科学院西北高原生物研究所青藏高原生物进化与适应开放实验室 西宁 810001)

²(中国科学院研究生院 北京 100039)

Phylogeny of *Metagentiana* and related genera (Gentianaceae) inferred from nuclear ribosomal ITS sequences

^{1,2}CHEN Sheng-Yun ¹CHEN Shi-Long* ^{1,2}XIA Tao ^{1,2}WANG Yu-Jin

¹(Qinghai-Tibet Biological Evolution and Adaptation Laboratory, Northwest Plateau Institute of Biology,
the Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China)

²(Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract The infrageneric phylogeny of *Metagentiana*, a newly erected genus in the Gentianaceae, was constructed based on the analysis of the nucleotide sequences of the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA of 10 representative species of this genus and 22 species of *Gentiana*, *Tripterospermum* and *Crawfordia*. The analysis indicates that the genus *Metagentiana* is polyphyletic, because all sampled species of *Tripterospermum* and *Crawfordia* are clearly embedded within *Metagentiana*. The species of *Tripterospermum* and *Crawfordia* also did not cluster respectively as two monophyletic clades. These results do not merit status of three separate genera. However, these three genera clustered together as a monophyletic clade sister to *Gentiana*, which is in agreement with the previous conclusions on the separation of *Metagentiana* from *Gentiana* and its closer relationship to *Tripterospermum* and *Crawfordia* based on studies of gross morphology, floral anatomy, chromosomes, palynology and embryology. The ITS sequences do not provide sufficient information to make a robust estimation of the phylogenetic relationships among dysploid cytotypes of $x=17$, 21 and 23, within the *Metagentiana*, *Tripterospermum* and *Crawfordia* complex, but the preliminary results seem to indicate their reticulate and paralleling evolution.

Key words *Metagentiana*, ITS sequence, phylogeny, *Tripterospermum*, *Crawfordia*, *Gentiana*.

摘要 运用核糖体DNA内转录间隔区ITS序列对狭蕊龙胆属*Metagentiana* 10种及其近缘属22种植物进行了系统发育分析。ITS分析结果表明狭蕊龙胆属是一个多系群:在系统发育树上,双蝴蝶属*Tripterospermum*和蔓龙胆属*Crawfordia*的种类位于狭蕊龙胆属各分支中,而且双蝴蝶属和蔓龙胆属的种类也相互交叉;这一结果不支持将3个属各自独立为属。但是,在所有分析中,3个属共同形成一单系分支,是龙胆属*Gentiana*的姊妹群;这一结果与形态学、花部解剖学、细胞学、孢粉学和胚胎学等证据基本一致,

2004-11-09 收稿, 2005-09-16 收修改稿。

基金项目:中国科学院知识创新工程方向性项目(KSCXZ-SW-106); 国家自然科学基金(30170066)资助(Supported by a Knowledge Innovation Project of the Chinese Academy of Sciences (Grant No. KSCXZ-SW-106) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 30170066))。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: chenshil@public.xn.qh.cn; Tel.: 0971-6110067)。

狭蕊龙胆属应该从龙胆属中分离出来,它与双蝴蝶属和蔓龙胆属有更为密切的亲缘关系。根据分支图,在狭蕊龙胆属、双蝴蝶属和蔓龙胆属组成的复合群中,现已知的染色体基数 $x = 17, 21$ 和 23 可能存在网状和平行进化。

关键词 狭蕊龙胆属; ITS序列; 系统发育; 双蝴蝶属; 蔓龙胆属; 龙胆属

狭蕊龙胆属 *Metagentiana* T. N. Ho & S. W. Liu 是由Ho等(2002)最近从龙胆属 *Gentiana* (Tourn.) L. 中划分出来新成立的一个属,全世界共有14种,12种分布在中国,且集中在青藏高原的东南部横断山地区,其余2种分布在缅甸东部和泰国,生长在海拔800 - 4400 m的山坡草地、林缘、林下及灌丛中。该属与其近缘类群龙胆属、双蝴蝶属 *Tripterospermum* Blume 和蔓龙胆属 *Crawfordia* Wall. 因其花冠裂片间具褶而被称为褶花类群(Ho & Pringle, 1995)。狭蕊龙胆属曾是龙胆属中的一个组,即狭蕊组 *sect. Stenogyne* Franchet (Franchet, 1884; Kusnezov, 1894; Pringle, 1978; Ho & Liu, 1990; Yuan & Küpfer, 1993)。Smith(1965)首先认识到这一群植物与蔓龙胆属和双蝴蝶属亲缘关系较近,而与龙胆属较远。L ve和L ve(1976)随后把狭蕊龙胆属归入双蝴蝶属中,作为该属的一个亚属 *Tripterospermum* subgen. *Stenogyne* 处理。但是,Halda(1995)仍然认为这一群植物应放在龙胆属中,但考虑到与其他种类的区别,将这群植物处理为龙胆属的一个亚属。Yuan等(1996)基于ITS序列对龙胆属内各组的分子系统学研究表明,狭蕊龙胆属应从龙胆属中分出,它实际上与蔓龙胆属和双蝴蝶属的亲缘关系较近。何廷农等(1996)根据形态学、孢粉学和细胞学证据,指出狭蕊龙胆属可能是龙胆属和双蝴蝶属杂交起源的类群。随后,Ho等(2002)重新根据形态学、花部解剖学、细胞学、孢粉学、胚胎学特征及分子系统学证据的综合分析,认为这群植物确与蔓龙胆属和双蝴蝶属亲缘关系较近,而且比这两个属原始;鉴于其特殊的形态特征,应独立为属,即狭蕊龙胆属。但是,这一处理未得到Struwe等(2002)的支持,他们仍然坚持将该群植物放在龙胆属中。除狭蕊龙胆属的系统位置存在一定疑问外,属内种间关系没有人进行过研究,而且该属内部分种类的染色体数据表明,该属存在较高的非连续性的染色体基数变异, $x = 23, 21, 17$ (Yuan & Küpfer, 1993; 陈世龙等, 1997; Ho et al., 2002),这些染色体基数之间的演化关系如何?是否染色体基数相同的种类有共同的起源?这也是本文拟解决的问题。

ITS序列在研究属内种间和较近的族间、属间关系时都表现出较高的趋异率和信息位点百分率,为类群内部的系统发育重建提供了较好的支持(Hodges & Arnold, 1994; 刘建全等, 2000; 洪亚平等, 2001; 朱惠芬等, 2002; 高连明等, 2002; 包颖,葛颂, 2003; 王玉金等, 2004),特别是已被广泛应用到龙胆科 *Gentianaceae* 中属间和种间的分子系统演化研究中(Yuan & Küpfer, 1995, 1997; Yuan et al., 1996, 2003; Liu et al., 2001, 2002a, b)。但迄今为止,仅Yuan等(1996)在龙胆属的分子系统学研究中包含狭蕊龙胆属的2个种,还没有对该属及其近缘的褶花类群进行全面的分子系统学的研究。因此,本文在已有的工作基础上,新测定了狭蕊龙胆属10种及相关类群10种,共20种植物的ITS序列,并从GenBank中调取龙胆属以及獐牙菜亚族 *Swertiinae* 有关属共12种植物的ITS序列,一并进行分支分析,重点探讨:(1)狭蕊龙胆属与龙胆属、双蝴蝶属和蔓龙胆属的亲缘关系;(2)狭蕊龙胆属内的系统发育,特别是该属内具不同染色体基数种类之间的演化关系。

1 材料和方法

1.1 材料

本文采用的狭蕊龙胆属、双蝴蝶属、蔓龙胆属、龙胆属和大钟花属 *Megacodon* (Hemsl.) H. Smith 的 20 种植物叶片, 其中 6 种采自蜡叶标本, 14 种为野外硅胶快速干燥的新鲜叶片。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)。另有龙胆属和獐牙菜亚族有关属共 12 种植物的 ITS 序列调自 GenBank, 主要是根据 Yuan 等 (1996) 的研究。

1.2 实验方法

硅胶干燥叶片的总 DNA 提取采用改进的 CTAB 法 (Doyle & Doyle, 1987), 而来自标本的叶片采用 CASuper Plant Genomic DNA Isolation Kit 试剂盒 (上海中科开端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'-AGAAATCGTAACAAGGTTTCCGTAGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。扩增反应在 Biometra thermal cycler PCR 扩增仪上进行, 反应体系为 25 μ L, 内含: 10 \times PCR 缓冲液 (1.5 mmol/L $MgCl_2$) 2.5 μ L, 10 mmol/L dNTPs 0.5 μ L, 引物 ITS1 和 ITS4 各 1.25 μ L (5 pmol/L), $MgCl_2$ 0.5 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 0.25 μ L (1.25 U), 总 DNA 模板 1 μ L (10–20 ng) 以及双蒸水 17.75 μ L。扩增反应程序为: 94 $^{\circ}C$ 预变性 4 min, 94 $^{\circ}C$ 变性 50 s, 53 $^{\circ}C$ 退火 50 s, 72 $^{\circ}C$ 延伸 50 s, 36 个循环, 最后 72 $^{\circ}C$ 保温 7 min。扩增产物采用 CASpure PCR Purification Kit 试剂盒 (上海中科开端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 和 Amersham 公司的 DYEnamic Dye Terminator Cycle Sequencing Kit 试剂盒进行测序 PCR 扩增, 反应体系为 10 μ L, 包括: PCR 纯化产物为 1.0–2.0 μ L, 引物各 1 μ L, ET 2.5 μ L, 4.5–5.5 μ L 双蒸水; 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 500 DNA Analysis System (Amersham Biosciences Corp.) 上进行测序。每条链均能完整读出约 650 bp, 正反两条链相互重叠 90% 以上。

ITS 范围根据 GenBank 下载的龙胆科植物序列确定, 每种植物的序列注册于 GenBank 中, 同时从 GenBank 调取龙胆科中龙胆属、扁蕾属 *Gentianopsis* Ma、喉毛花属 *Comastoma* (Wettst.) Toyokuni 和肋柱花属 *Lomatogonium* A. Br. 共 12 种植物的序列。所有种类的序列接收号见表 1。

1.3 外类群选择

Struwe 等 (2002) 将龙胆族 tribe Gentianeae 分为 2 个亚族, 即龙胆亚族 subtribe Gentianinae 和獐牙菜亚族 subtribe Swertiinae。其中龙胆亚族, 即褶花类群包括龙胆属、狭蕊龙胆属、双蝴蝶属和蔓龙胆属; 而獐牙菜亚族包括喉毛花属、扁蕾属和肋柱花属等 14 个属。本研究选取獐牙菜亚族大钟花属、扁蕾属、喉毛花属和肋柱花属各 1 种作为外类群。

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

表1 材料来源、染色体数和GenBank注册号(采用何廷农(1988)的属下分类系统)

Table 1 Origin of materials, chromosome numbers of species studied and accession numbers in GenBank (The infrageneric classification follows Ho, 1998)

分类群 Taxon	采集地 Locality	凭证标本 Voucher	染色体数 Chromosome number (2n/n)	序列号 GenBank Acc. No.
狭蕊龙胆属 <i>Metagentiana</i> T. N. Ho & S. W. Liu				
红花狭蕊龙胆 <i>M. rhodantha</i> (Franch.) T. N. Ho & S. W. Liu	云南昆明 Kunming, Yunnan	陈世龙 (S. L. Chen) 03123	46/23	AY562174
紫毛狭蕊龙胆 <i>M. villifera</i> (H. W. Li ex T. N. Ho) T. N. Ho & S. W. Liu	四川筠连 Yunlian, Sichuan	川经宜 (Yibing Division, Sichuan Economic Pl. Exped.) 0018	?	AY858672
锯齿狭蕊龙胆 <i>M. serra</i> (Franch.) T. N. Ho, S. W. Liu & S. L. Chen	云南丽江 Lijiang, Yunnan	陈世龙 (S. L. Chen) 03141	34/17	AY562175
报春花狭蕊龙胆 <i>M. primuliflora</i> (Franch.) T. N. Ho & S. W. Liu	云南昆明 Kunming, Yunnan	陈世龙 (S. L. Chen) 03124	42/21	AY562178
高贵狭蕊龙胆 <i>M. gentilis</i> (Franch.) T. N. Ho & S. W. Liu	云南昆明 Kunming, Yunnan	陈世龙 (S. L. Chen) 03122	42/21	AY562177
毛脉狭蕊龙胆 <i>M. souliei</i> (Franch.) T. N. Ho, S. W. Liu & S. L. Chen	云南丽江 Lijiang, Yunnan	陈世龙 (S. L. Chen) 03146	46/23	AY562170
翼萼狭蕊龙胆 <i>M. pterocalyx</i> (Franch.) T. N. Ho & S. W. Liu	云南鹤庆 Heqing, Yunnan	陈世龙 (S. L. Chen) 03158	34/17	AY562171
条纹狭蕊龙胆 <i>M. striata</i> (Maxim.) T. N. Ho, S. W. Liu & S. L. Chen	四川道孚 Dawu, Sichuan	陈世龙 (S. L. Chen) 03081	46/23	AY562173
滇东狭蕊龙胆 <i>M. eurycolpa</i> (Marq.) T. N. Ho & S. W. Liu	云南禄劝 Luquan, Yunnan	张英伯 (Y. P. Chang) 0274	?	AY858673
蔓枝狭蕊龙胆 <i>M. leptoclada</i> (I. B. Balfour & Forrest) T. N. Ho & S. W. Liu	云南大理 Dali, Yunnan	刘慎愕 (T. N. Liou) 22798	?	AY858674
双蝴蝶属 <i>Tripterospermum</i> Blume				
双蝴蝶组 sect. <i>Tripterospermum</i>				
峨眉双蝴蝶 <i>T. cordatum</i> (Marq.) H. Smith	云南昆明 Kunming, Yunnan	陈世龙 (S. L. Chen) 03112	46/23	AY562172
尼泊尔双蝴蝶 <i>T. volubile</i> (D. Don) Hara	西藏聂拉木 Nyalam, Xizang	Anonymous 1279	?	AY858667
宽翅组 sect. <i>Platyspermum</i> C. J. Wu				
双蝴蝶 <i>T. chinense</i> (Migo) H. Smith	浙江天目山 Mt. Tianmushan, Zhejiang	刘尚武 (S. W. Liu) 160810	46/23	AY858668
蔓龙胆属 <i>Crawfordia</i> Wall.				
四川蔓龙胆 <i>C. tibetica</i> Franch.	四川贡嘎山 Mt. Gongga, Sichuan	陈世龙 (S. L. Chen) 03097	?	AY563383
披针叶蔓龙胆 <i>C. delavayi</i> Franch.	云南大理苍山 Cangshan, Dali, Yunnan	陈世龙 (S. L. Chen) 03140	46/23	AY562176

表 1 (续) Table 1 (continued)

分类群 Taxon	采集地 Locality	凭证标本 Voucher	染色体数 Chromosome number (2n/n)	序列号 GenBank Acc. No.
穗序蔓龙胆 <i>C. speciosa</i> Wall.	西藏错那 Cona, Xizang	Anonymous 751592	?	AY858675
龙胆属 <i>Gentiana</i> (Tourn.) L.				
秦艽组 sect. <i>Cruciata</i> Gaudin				
麻花苳 <i>G. straminea</i> Maxim.	甘肃玛曲 Maqu, Gansu	from GenBank	52/13	AF346015
多枝组 sect. <i>Monopodiae</i> (H. Smith) T. N. Ho				
青藏龙胆 <i>G. futtereri</i> Diels & Gilg	西藏丁青 Dêngqên, Xizang	刘建全 (J. Q. Liu) 1056	?	AY858669
粗根龙胆 <i>G. callistantha</i> Diels & Gilg	甘肃碌曲 Luqu, Gansu	袁永明 (Y. M. Yuan) Y92-298 from GenBank	26/13	Z48078 Z48095
微籽组 sect. <i>Microsperma</i> T. N. Ho				
露蕊龙胆 <i>G. vernayi</i> Marq.	西藏加查 Gyaca, Xizang	刘建全 (J. Q. Liu) 1158	26/13	AY858670
微籽龙胆 <i>G. delavayi</i> Franch.	云南丽江 Lijiang, Yunnan	袁永明 (Y. M. Yuan) Y92-229	26/13	Z48099 Z48080
小龙胆组 sect. <i>Chondrophylla</i> Bunge				
钻叶龙胆 <i>G. haynaldii</i> Kanitz	西藏昌都 Qamdo, Xizang	刘建全 (J. Q. Liu) 1242	12/6	AY858671
弯茎龙胆 <i>G. flexicaulis</i> H. Smith ex Marq.	陕西太白山 Mt. Taibaishan, Shaanxi	袁永明 (Y. M. Yuan) 92-264 from GenBank	14/7	Z71937 Z71938
陕南龙胆 <i>G. piasezkii</i> Maxim.	甘肃岷县 Ming Xian, Gansu	袁永明 (Y. M. Yuan) 92-272 from GenBank	36/18	Z71955 Z71956
肾叶龙胆 <i>G. crassuloides</i> Bureau & Franch.	陕西太白山 Mt. Taibaishan, Shaanxi	袁永明 (Y. M. Yuan) 92-265 from GenBank	40/20	Z71935 Z71936
柱果组 sect. <i>Dolichocarpa</i> T. N. Ho				
偏翅龙胆 <i>G. pudica</i> Maxim.	甘肃玛曲 Maqu, Gansu	G178 from GenBank	20/10	Z71961 Z71962
匍茎组 sect. <i>Isomeria</i> Kusnez				
平龙胆 <i>G. depressa</i> D. Don	西藏樟木 Zham, Xizang	袁永明 (Y. M. Yuan) 92-118 from GenBank	24/12	Z48062 Z48081
高山龙胆组 sect. <i>Frigida</i> Kusnez.				
高山龙胆 <i>G. algida</i> Pall.	美国科罗拉多 Colorado, USA	袁永明 (Y. M. Yuan) 91-S10 from GenBank	24/12	Z48142 Z48117
大钟花属 <i>Megacodon</i> (Hemsl.) H. Smith				
大钟花 <i>Meg. stylophorus</i> (C. B. Clarke) H. Smith	云南丽江 Lijiang, Yunnan	葛学军 (X. J. Ge) 106	?	AY858679

表 1 (续) Table 1 (continued)

分类群 Taxon	采集地 Locality	凭证标本 Voucher	染色体数 Chromosome number (2n/n)	序列号 GenBank Acc. No.
扁蕾属 <i>Gentianopsis</i> Ma				
湿生扁蕾 <i>Gs. paludosa</i> (Hook. f.) Ma	甘肃玛曲 Maqu, Gansu	袁永明 (Y. M. Yuan) 92-314 from GenBank	26/13	Z48106 Z48131
喉毛花属 <i>Comastoma</i> (Wettst.) Toyokuni				
喉毛花 <i>C. pulmonarium</i> (Turcz.) Toyokuni	四川若尔盖 Zoigê, Sichuan	袁永明 (Y. M. Yuan) 92-279 from GenBank	18/9	Z48144 Z48121
肋柱花属 <i>Lomatogonium</i> A. Br.				
肋柱花 <i>L. carinthiacum</i> (Wulf.) Reichb.	德国 Without precise locality, Germany	V. Zuev 6649 from GenBank	32/16	AJ294634 AJ294694

凭证标本存放在中国科学院西北高原生物研究所植物标本馆(HNWP);染色体数目依据 Yuan & Küpfer (1993)、陈世龙等(1997)和 Ho 等(2002)的报道;问号表示不能肯定或未知。

All the vouchers are preserved in the herbarium of Northwest Plateau Institute of Biology, the Chinese Academy of Sciences (HNWP). Chromosomal numbers are compiled based on reports by Yuan & Küpfer (1993), Chen et al. (1997) and Ho et al. (2002); question mark indicates that the chromosome number is not affirmative or unknown.

列更加合理。由于5.8S rDNA序列高度保守,因此本研究全部种类均加入相同序列。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,选用最适于拟合该数据集的DNA进化模型为GTR+G,同时建立4个马尔可夫链,共运行200万代,每100代抽样一次,忽略全部动态抽样2000次,对剩余的18000次静态抽样计算合意树,以后检验概率(posterior probability)PP作为评估参数。

2 结果

在狭蕊龙胆属10个种中最小碱基差异为0.96%,存在于滇东狭蕊龙胆*Metagentiana eurycolpa*和蔓枝狭蕊龙胆*M. leptoclada*之间;最大的为7.22%,存在于翼萼狭蕊龙胆*M. pterocalyx*和红花狭蕊龙胆*M. rhodantha*之间。在由狭蕊龙胆属、双蝴蝶属和蔓龙胆属组成的复合群中,最大的碱基差异为10.6%,存在于翼萼狭蕊龙胆和披针叶蔓龙胆*Crawfordia delavayi*之间;最小的碱基差异为0.8%,存在于四川蔓龙胆*C. tibetica*和峨眉双蝴蝶*Tripterospermum cordatum*之间。狭蕊龙胆属与龙胆亚族其他属的最大碱基差异为13.8%,存在于高贵狭蕊龙胆*M. gentilis*和肾叶龙胆*Gentiana crassuloides*之间。

扩增出的ITS序列长度在608–633 bp之间,排序后长644 bp。当空位作为缺失处理时,在所有的矩阵位点中,181个为信息位点,占总位点的28.11%。用最大简约法寻找得到128棵最简约树,其中一最大简约树(maximum parsimony, MP)如图1所示,简约树长度为662步,

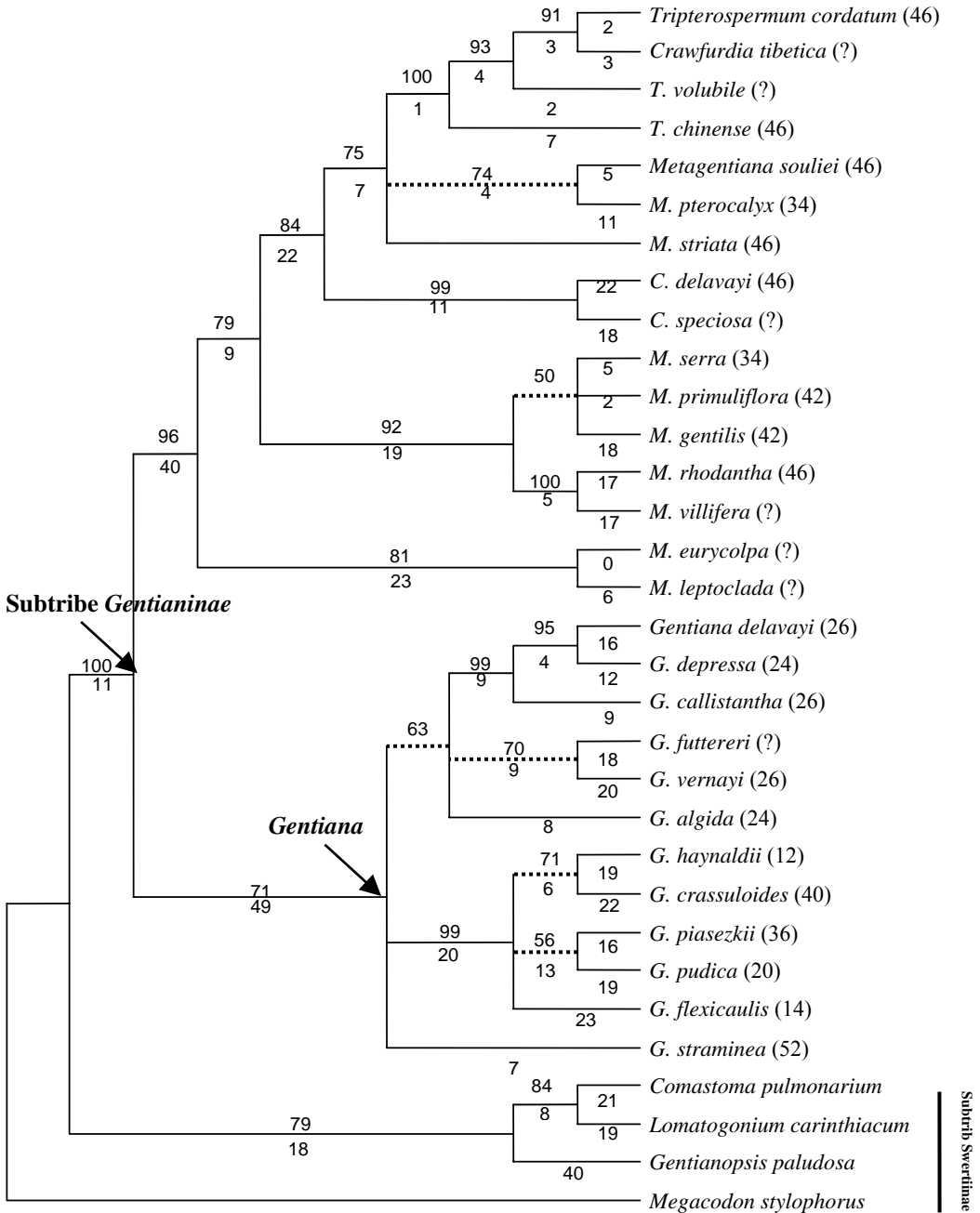


图1 ITS序列数据128个最简约树之一(length=662, CI=0.594, RI=0.735) 分支上下数字分别代表自展百分比和分支长度。虚线表示该分支在严格一致树上不存在。竖线表明外类群。括号中的数字为染色体数目(问号表示未知)。
Fig. 1. One of the 128 most parsimonious trees obtained from ITS sequence data (length=662, CI=0.594, RI=0.735). Numbers above and below the branches indicate bootstrap support and branch length, respectively. Dashed lines denote branches that collapse in the strict consensus tree. Vertical bar delimits outgroups. The numbers in the brackets following each species represent the somatic chromosome number of the relevant species (Question mark means that chromosome numbers are not available).

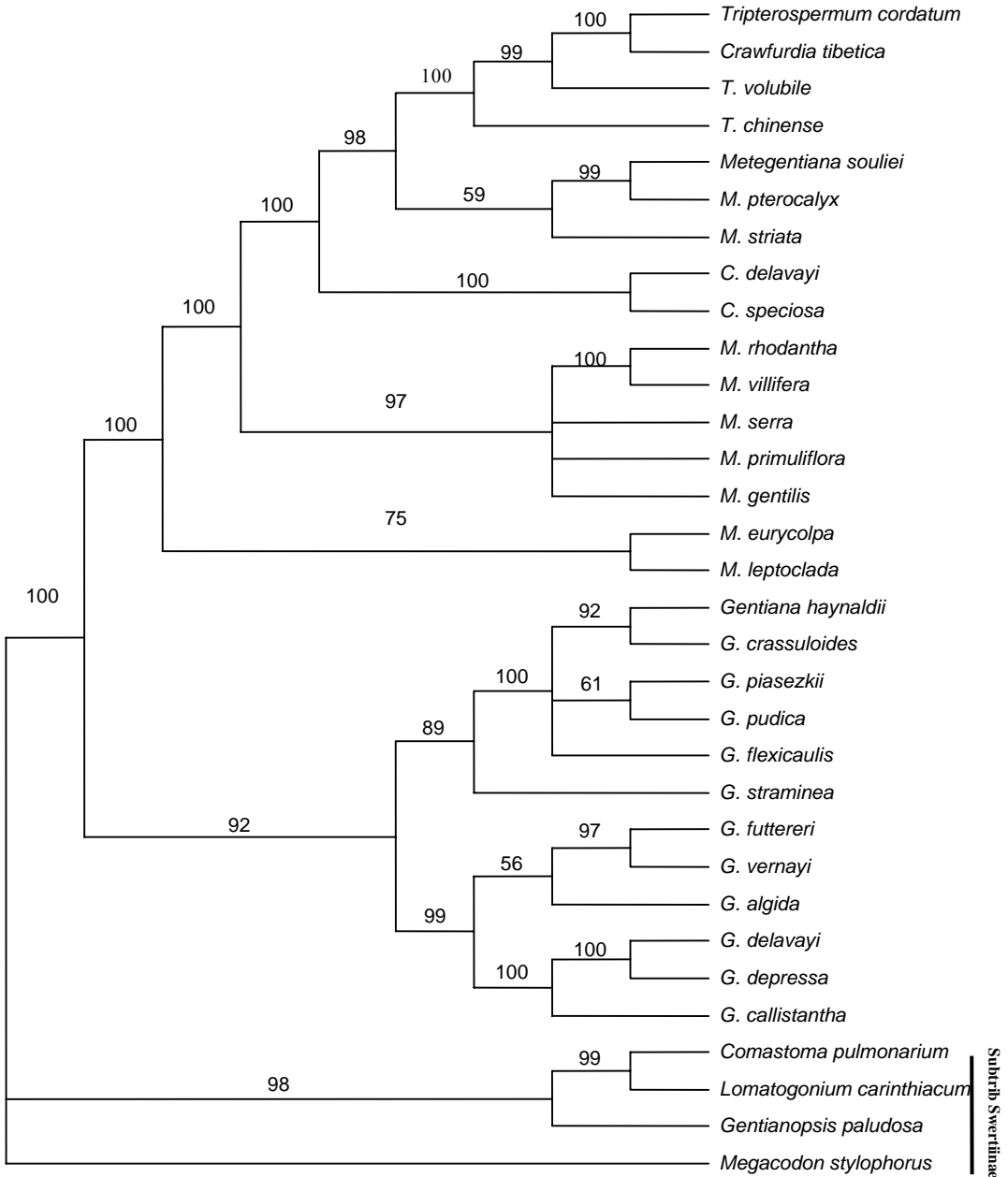


图2 ITS序列的Bayesian 50%多数一致性树 分支上的数字表示Bayesian后概率, 竖线表明外类群。
Fig. 2. Fifty percent of Bayesian majority rule consensus tree of ITS sequence data. Numbers above internodes indicate the Bayesian posterior probabilities. Vertical bar delimits outgroups.

一致性指数CI和维持性指数RI分别为0.594和0.735。MP树中在严格一致树中不存在的分支用虚线表示,同时对各分支长度和自展百分比值也分别标记在分支上下。利用贝叶斯推论法构建的贝叶斯推论分子系统树(Bayesian inference, BI)见图2。MP树和BI树拓扑结构基本一致,但是与MP树相比,BI树在各分支上给出很高的分辨率和很好的支持。

从图1、2中可以看出,所研究的4个属分为两大支:龙胆属各组的种类构成一大分支,在两种方法中均得到较高的支持率,自展支持率(bootstrap value)BV值和后验概率PP值分别为71%和92%;狭蕊龙胆属、双蝴蝶属和蔓龙胆属的种类聚在另一支上,BV值和PP值分别为96%和100%。狭蕊龙胆属的种类没有聚为单独的一支,毛脉狭蕊龙胆*M. souliei*($x = 23$)、翼萼狭蕊龙胆($x = 17$)和条纹狭蕊龙胆*M. striata*($x = 23$)与双蝴蝶属和蔓龙胆属的种类聚为一支,狭蕊龙胆属其余的种类聚为另外两支,锯齿狭蕊龙胆*M. serra*($x = 17$)、报春花狭蕊龙胆*M. primuliflora*($x = 21$)、高贵狭蕊龙胆($x = 21$)、红花狭蕊龙胆($x = 23$)和紫毛狭蕊龙胆*M. villifera*聚为一支,而滇东狭蕊龙胆和蔓枝狭蕊龙胆聚为另一支位于狭蕊龙胆属、双蝴蝶属和蔓龙胆属分支的最基部。同时,双蝴蝶属和蔓龙胆属的种类在两种分析方法中都处于狭蕊龙胆属中,其中蔓龙胆属的3个种也没有聚为单独的一支,而是四川蔓龙胆和来自双蝴蝶属的峨眉双蝴蝶聚为一支。

3 讨论

尽管已有的ITS分子证据暗示狭蕊龙胆属应该从龙胆属中分出来,但由于仅涉及到该属的2种植物,因而未能作进一步的处理(Yuan et al., 1996)。我们这里研究了该属10种植物的ITS序列,在MP和BI树上(图1,2),龙胆属均与狭蕊龙胆属、蔓龙胆属和双蝴蝶属复合群分成两大支。ITS序列分析表明狭蕊龙胆属应该从龙胆属中独立出来,我们的研究结果支持把龙胆属狭蕊龙胆组从龙胆属中独立出来的观点(Yuan et al., 1996; Ho et al., 2002)。

在形态特征上,狭蕊龙胆属和龙胆属有较大区别,首先狭蕊龙胆属以无柄宽卵形叶到卵状三角形叶和花基部具有一对叶状苞片极易与龙胆属区分;其次,狭蕊龙胆属的花单生茎顶,而龙胆属为聚伞花序;狭蕊龙胆属花丝线形和雄蕊不整齐,而龙胆属花丝基部增宽且整齐。但是,狭蕊龙胆属在生境、习性和花部特征上与双蝴蝶属和蔓龙胆属有较多相似的特征,如花大型;褶大,极偏斜;3个属均生长在林下、林缘、灌丛或林缘附近的山坡草地(何廷农,1988)。在花粉形态特征上,Nilsson(1967)在全面研究了龙胆亚族的花粉形态后,认为狭蕊龙胆属与蔓龙胆属和双蝴蝶属有较近的亲缘关系。同样,在胚胎学特征上,狭蕊龙胆属与蔓龙胆属和双蝴蝶属拥有较多的相似特征,如花药壁的中层为1层;绒毡层均来源于初生壁细胞,属单型起源,腺质型绒毡层;子房横切面有4列胚珠,为减缩侧膜胎座,胚珠类型为hypertropous;反足细胞3个,偶肥大;胚发育属茄型酸浆II变型等;而与龙胆属有较大的差异,如龙胆属的花药壁中层为2层,药室内壁正常纤维状加厚,花药表皮层减退,龙胆属的绒毡层为异型起源,其绒毡层经多次平周分裂,形成多层绒毡层细胞,并在一些地方堆积成“类胎座”;龙胆属的子房横切面有10-30列胚珠,为超侧膜座,胚珠倒生等(何廷农等,2000;陈世龙等,2000)。综上所述,核糖体DNA ITS区序列分析结果和形态学、孢粉学和胚胎学等方面特征均表明狭蕊龙胆属与蔓龙胆属和双蝴蝶属比与龙胆属有较近的亲缘关系。

狭蕊龙胆属确实应放在双蝴蝶属和蔓龙胆属一支。但是,我们的研究结果表明,狭蕊龙胆属不是一个单系类群。在MP树和BI树上(图1,2),双蝴蝶属和蔓龙胆属的种类分别与狭蕊龙胆属的有关种类结合在一起,并且还得到较高的支持,BV值和PP值分别为75%和98%,如毛脉狭蕊龙胆、翼萼狭蕊龙胆和条纹狭蕊龙胆与双蝴蝶属和蔓龙胆属的种类聚为一支。

在双蝴蝶属的分支中,四川蔓龙胆始终与峨眉双蝴蝶结合为一亚分支,得到了较高的支持,其姊妹亚分支为尼泊尔双蝴蝶 *Tripterospermum volubile*,这样使得双蝴蝶属和蔓龙胆属也都不是单系类群。3个属种类的相互交叉结合似乎表明这3个属应合并为1个属,作为龙胆属的姊妹群。但是,由于本研究所涉及双蝴蝶属和蔓龙胆属的种类太少,仅有6种植物的ITS序列,而这两个属总共有41种(Ho & Pringle, 1995)。因此,这3个属的属间划分与种间亲缘关系还有待于进一步研究。

我们的ITS序列分析结果也验证了狭蕊龙胆属与双蝴蝶属和蔓龙胆属在生境、习性和形态学性状上的相互重叠关系。狭蕊龙胆属主要生长在灌丛或林缘附近的山坡草地,而双蝴蝶属和蔓龙胆属均生长在林下、林缘或灌丛中;狭蕊龙胆属花丝线形和雄蕊不整齐及花柱丝状与双蝴蝶属相似,而蔓龙胆属花丝基部增宽且整齐;狭蕊龙胆属和蔓龙胆属的子房基部的腺体裸露,而双蝴蝶属的子房基部具花盘(何廷农, 1988)。在生活习性上,狭蕊龙胆属为多年生或一年生直立草本,而双蝴蝶属和蔓龙胆属为多年生缠绕茎草本。狭蕊龙胆属在花部特征上很像双蝴蝶属和蔓龙胆属,而且这3个属的生境十分相近,ITS分析结果表明这3个属是共同起源的;但它们在生活习性上存在区别,本文的研究结果表明双蝴蝶属和蔓龙胆属的缠绕茎应该是适应林下生存的次生特征,可能存在趋同进化。

在细胞学特征上,狭蕊龙胆属已有8个种的染色体被研究过(Yuan & Küpfer, 1993; 陈世龙等, 1997; Ho et al., 2002)。现已发现该属中存在3种染色体基数,即 $x = 17, 21$ 和 23 。Yuan和Küpfer(1993)对龙胆属的染色体研究做了较全面的回顾,发现龙胆属中存在很高的异基数现象 $x=7-15, 21$ 。现已知蔓龙胆属和双蝴蝶属的染色体基数均为 $x = 23$ (陈世龙,未发表)。而龙胆科的原始基数可能是 $x=7$ (洪德元, 1990),显然狭蕊龙胆属、蔓龙胆属和双蝴蝶属的高基数均应是次生起源的。从图1、2可以看出,在狭蕊龙胆属、蔓龙胆属和双蝴蝶属这一分支上,狭蕊龙胆属现已知的3个基数 $x = 17, 21$ 和 23 可能存在平行进化。这3个属组成的单系支有3个明显的亚分支:在由狭蕊龙胆属5个种组成的分支中,同时存在3个染色体基数($x = 17, 21$ 和 23),即锯齿狭蕊龙胆($x=17$)、报春花狭蕊龙胆和高贵狭蕊龙胆($x = 21$)、红花狭蕊龙胆($x=23$)。同样,在由主要以双蝴蝶属和蔓龙胆属种类为主的另一分支中也存在不同的染色体基数($x = 17, 23$),即翼萼狭蕊龙胆($x = 17$)、毛脉狭蕊龙胆、条纹狭蕊龙胆、峨眉双蝴蝶、双蝴蝶 *Tripterospermum chinense*和披针叶蔓龙胆($x = 23$)。在狭蕊龙胆属中,具有相同染色体基数的种类也没有聚为一支,如红花狭蕊龙胆和条纹狭蕊龙胆($x=23$)、锯齿狭蕊龙胆和翼萼狭蕊龙胆($x=17$)。这一结果表明,狭蕊龙胆属、蔓龙胆属和双蝴蝶属类群中染色体数目相同的种类位于不同分支上,而同一单系分支上又拥有不相同的染色体基数,这可能与该群植物的祖先在不同生境下多次隔离,而这些隔离的种群又各自发生染色体非整倍性变化,再快速分化成种有关(Gielly & Taberlet, 1996; Yuan & Küpfer, 1997)。

致谢 感谢何廷农教授帮助鉴定标本及袁永明和葛学军研究员提供部分实验材料。

参 考 文 献

- Bao Y (包颖), Ge S (葛颂). 2003. Phylogenetic relationships among diploid species of *Oryza officinalis* complex revealed by multiple gene sequences. *Acta Phytotaxonomica Sinica* (植物分类学报) 41: 497–508.

- Chen S-L (陈世龙), Ho T-N (何廷农), Liu J-Q (刘建全), Hong D-Y (洪德元). 2000. Embryology of *Tripterospermum cordatum* (Gentianaceae). Acta Botanica Yunnanica (云南植物研究) 22: 53–58.
- Chen S-L (陈世龙), Ho T-N (何廷农), Liu J-Q (刘建全). 1997. The chromosome numbers of eight species in *Gentiana* (Gentianaceae) from alpine mountains of the western China. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica (西北植物学报) 17: 547–550.
- Doyle J J, Doyle J L. 1987. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. Phytochemical Bulletin 19: 11–15.
- Franchet A. 1884. Description de quelques especes de *Gentiana* de Yunnan. Bulletin de la Société Botanique de France 31: 373–378.
- Gao L-M (高连明), Yang J-B (杨俊波), Zhang C-Q (张长芹), Li D-Z (李德铎). 2002. Phylogenetic relationship of subgenus *Tsutsusi* (*Rhododendron*) based on ITS sequences. Acta Botanica Yunnanica (云南植物研究) 24: 313–320.
- Gielly L, Taberlet P. 1996. A phylogeny of the European gentianas inferred from chloroplast *trnL* (UAA) intron sequences. Botanical Journal of the Linnean Society 120: 57–75.
- Halda J J. 1995. Synopsis of the new system of the *Gentiana*. Acta Musei Richnoviensis Section Nature 3: 25–29.
- Ho T-N (何廷农). 1988. Gentianaceae. In: Flora Reipublicae Popularis Sinicae (中国植物志). Beijing: Science Press. 62: 53–289.
- Ho T-N (何廷农), Chen S-L (陈世龙), Liu J-Q (刘建全), Hong D-Y (洪德元). 2000. Embryology of *Gentiana striata* (Gentianaceae). Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica (西北植物学报) 20: 960–967.
- Ho T-N (何廷农), Chen S-L (陈世龙), Liu S-W (刘尚武). 2002. *Metagentiana*, a new genus of Gentianaceae. Botanical Bulletin of Academia Sinica 43: 83–91.
- Ho T-N, Liu S-W. 1990. The infrageneric classification of *Gentiana* (Gentianaceae). Bulletin of the British Museum (Natural History), Botany Series 20: 169–192.
- Ho T-N (何廷农), Liu S-W (刘尚武), Lu X-F (卢学峰). 1996. A phylogenetic analysis of *Gentiana* (Gentianaceae). Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报) 34: 505–530.
- Ho T-N (何廷农), Pringle J S. 1995. Gentianaceae. In: Wu Z-Y (吴征镒), Raven P H eds. Flora of China. Beijing: Science Press; St. Louis: Missouri Botanical Garden. 16: 1–140.
- Hodges S A, Arnold M L. 1994. Columbines: a geographically wide-spread species flock. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 91: 5129–5132.
- Hong D-Y (洪德元). 1990. Plant Cytotaxonomy (植物细胞分类学). Beijing: Science Press.
- Hong Y-P (洪亚平), Chen Z-D (陈之端), Lu A-M (路安民). 2001. Phylogeny of the tribe *Menispermeae* (Menispermaceae) reconstructed by ITS sequence data. Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报) 39: 97–104.
- Kusnezov N I. 1894. Subgenus *Eugentiana* of genus *Gentiana*. Trudy S.-Peterburghskago Obščestvah. Estestvoispytatelej, Otdelenie Botaniki 24 (2): 1–507.
- Liu J-Q (刘建全), Chen Z-D (陈之端), Lu A-M (路安民). 2000. The phylogenetic relationships of an endemic genus *Sinadoxa* in the Qinghai-Xizang Plateau: Evidence from ITS sequence analysis. Acta Botanica Sinica (植物学报) 42: 656–658.
- Liu J-Q, Chen Z-D, Lu A-M. 2001. A preliminary study of the phylogeny of the Swertiinae (Gentianaceae) based on ITS data. Israel Journal of Plant Science 43: 301–308.
- Liu J-Q (刘建全), Chen Z-D (陈之端), Lu A-M (路安民). 2002a. Molecular evidence for the sister relationship of the eastern Asia-North American intercontinental species pair in the *Podophyllum* group (Berberidaceae). Botanical Bulletin of Academia Sinica 43: 147–154.
- Liu J-Q, Chen Z-D, Lu A-M. 2002b. Molecular phylogeny and biogeography of the Qinghai-Tibet Plateau endemic *Nannoglottis* (Asteraceae). Molecular Phylogenetics and Evolution 23: 307–325.
- Löve A, Löve D. 1976. The natural genera of Gentianaceae. In: Kachroo P ed. Recent Advances in Botany, Prof. Mehra P N Commemorative. Delhi: Dehra Dun. 205–222.
- Maddison D R. 1991. The discovery and importance of multiple islands of most-parsimonious trees. Systematic Zoology 40: 315–318.
- Nilsson S. 1967. Pollen morphological studies in the Gentianaceae-Gentianinae. Grana Palynologica 7: 46–143.
- Pringle J S. 1978. Sectional and subgeneric names in *Gentiana* (Gentianaceae). Sida 7: 232–247.

- Ronquist F, Huelsenbeck J P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.
- Smith H. 1965. Notes on Gentianaceae. Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh 26: 237–258.
- Struwe L, Kadereit J W, Klackenberg J, Nilsson S, Thiv M, von Hagen K B, Albert V A. 2002. Systematics, character evolution, and biogeography of Gentianaceae, including a new tribal and subtribal classification. In: Struwe L, Albert V A eds. *Gentianaceae—Systematics and Natural History*. Cambridge: Cambridge University Press. 21–309.
- Swofford D L. 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods). Version 4.0b10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins D G. 1997. The Clustal X windows interface: exible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876–4882.
- White T J, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T J eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Application*. San Diego, California: Academic Press. 315–322.
- Wang Y-J (王玉金), Li X-J (李晓娟), 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.
- Yuan Y-M, Küpfer P. 1993. Karyological studies on *Gentiana* sect. *Frigida* s.l. and sect. *Stenogyne* (Gentianaceae) from China. *Bulletin de la Societe Neuchateloise des Sciences Naturelles* 116: 65–78.
- Yuan Y-M, Küpfer P. 1995. Molecular phylogenetics of the subtribe *Gentianinae* (Gentianaceae) inferred from the sequences of internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Plant Systematics and Evolution* 196: 207–226.
- Yuan Y-M, Küpfer P. 1997. The monophyly and rapid evolution of *Gentiana* sect. *Chodronphyllae* Bunge s.l. (Gentianaceae): evidence from the nucleotide sequences of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Botanical Journal of Linnean Society* 123: 25–43.
- Yuan Y-M, Küpfer P, Doyle J J. 1996. Infrageneric phylogeny of the genus *Gentiana* (Gentianaceae) inferred from nucleotide spacer (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany* 83: 641–652.
- Yuan Y-M, Wohlhauser S, Möller M, Chassot P, Mansion G, Grant J, Küpfer P, Klackenberg J. 2003. Monophyly and relationships of the tribe Exaceae (Gentianaceae) inferred from nuclear ribosomal and chloroplast DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 28: 500–517.
- Zhu H-F (朱惠芬), Yang J-B (杨俊波), Zhang C-Q (张长芹), Li D-Z (李德铎). 2002. Systematic position of *Primula secundiflora* (Primulaceae) inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequence data. *Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报)* 40: 133–138.