

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2020.30390

付鹏程, 谭金舟, 王宏宇, 孙姗姗. 横断山地区六叶龙胆复合群的遗传分化与种群动态历史[J]. 植物科学学报, 2020, 38(3): 390-399  
Fu PC, Tan JZ, Wang HY, Sun SS. Genetic divergence and demographic history of *Gentiana hexaphylla* Maximowicz ex Kusnezow (Gentianaceae) complex in Hengduan Mountains[J]. *Plant Science Journal*, 2020, 38(3): 390-399

# 横断山地区六叶龙胆复合群的遗传分化与种群动态历史

付鹏程, 谭金舟, 王宏宇, 孙姗姗\*

(洛阳师范学院生命科学学院, 河南洛阳 471934)

**摘要:** 以六叶龙胆(*Gentiana hexaphylla* Maximowicz ex Kusnezow)复合群的21个居群为材料, 首先通过居群内关键形态性状的统计对复合群加以区分, 随后以叶绿体片段 *trnS-trnG* 为分子标记, 对其遗传分化与种群动态历史进行研究。结果显示: 六叶龙胆复合群21个居群共鉴定出20个单倍型, 居群平均单倍型多样性、核苷酸多样性和核苷酸多样性指数分别为0.444、0.00732和3.73, 表现出较高的遗传多样性水平; 居群间共享单倍型少, 遗传变异主要发生在居群间(72.74%)。贝叶斯分析结果表明复合群内的遗传分化主要发生在近两百万年以内。歧点分布分析和中性检验结果均显示, 复合群近期未经历明显的居群扩张。因此, 六叶龙胆复合群的遗传分化可能是横断山地区第四纪环境与气候变化以及高山峡谷地貌的地理隔离两者共同作用的结果。

**关键词:** 六叶龙胆; 复合群; 遗传分化; 种群历史; 横断山地区

中图分类号: Q347

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2020)03-0390-10

## Genetic divergence and demographic history of *Gentiana hexaphylla* Maximowicz ex Kusnezow complex (Gentianaceae) in Hengduan Mountains

Fu Peng-Cheng, Tan Jing-Zhou, Wang Hong-Yu, Sun Shan-Shan\*

(College of Life Science, Luoyang Normal University, Luoyang, Henan 471934, China)

**Abstract:** The Hengduan Mountains are a global biodiversity center and hotspot of plant evolution research. Being endemic to the Hengduan Mountains, *Gentiana hexaphylla* Maximowicz ex Kusnezow shows continuous morphological characters with many of its closely related species. In this study, 21 populations were sampled to distinguish the *G. hexaphylla* complex through key morphological characters at the population level, and to explore genetic divergence and demographic history based on one chloroplast fragment. The number of haplotypes, average haplotype diversity, nucleotide diversity, and genetic diversity index( $\pi$ ) were 0.444, 0.00732, and 3.73, respectively, indicating high genetic diversity in the complex. Haplotypes were rarely shared among populations and most genetic variation occurred among populations (72.74%) rather than within populations (27.26%). Bayesian analysis indicated that genetic divergence in the complex occurred within the last two million years. Mismatch distribution and neutrality tests consistently showed that the *G. hexaphylla* complex has not experienced significant population expansion recently. In conclusion, genetic divergence within the *G. hexaphylla* complex has been shaped by climatic and environmental changes

收稿日期: 2019-10-10, 退修日期: 2019-12-17。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31600296); 河南省高等学校青年骨干教师培养计划。

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (31600296) and Foundation of Henan Provincial Youth Backbone Teachers.

作者简介: 付鹏程(1988-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为植物进化遗传学(E-mail: fupengc@lynu.edu.cn)。

\* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: sss823129@126.com)。

during the Quaternary as well as by geological isolation in the Hengduan Mountains.

**Key words:** *Gentiana hexaphylla*; Complex; Genetic divergence; Demographic history; Hengduan Mountains

横断山地区是我国生物多样性最高的地区,也是世界生物多样性热点区域之一<sup>[1]</sup>。该地区不仅孕育了数目众多的植物类群,同时也是多个类群的起源中心和分化中心<sup>[2]</sup>,如龙胆属(*Gentiana*)<sup>[3]</sup>、虎耳草属(*Saxifraga*)<sup>[4]</sup>等。因此,该地区一直是植物物种形成研究的热点区域<sup>[5-10]</sup>。

龙胆属是典型的高山类群,广布于全世界的高山地区<sup>[11]</sup>。青藏高原及其毗邻区域是龙胆属的分化和分布中心,并由该地区扩散到全世界<sup>[3, 11]</sup>;然而龙胆属在该地区的分化历史并不清楚。六叶龙胆(*G. hexaphylla* Maximowicz ex Kusnezow)是多年生草本植物,隶属于龙胆属多枝组(section *Kudoa* (Masamune) Satake & Toyokuni ex Toyokuni)轮叶系(series *Verticillatae* Marquand),生于海拔2700 ~ 4400 m的山坡草地、山坡路旁、高山草甸及灌丛中,集中分布于横断山区,是该地区的特有类群<sup>[11]</sup>。其花色艳丽,具有较高的园艺观赏价值,目前已用于园艺栽培与育种<sup>[12]</sup>。轮叶系共包含8个物种,以茎生叶3 ~ 7枚轮生为主要特征,区别于龙胆属其他类群的叶对生性状<sup>[13]</sup>。以轮生叶数目为主要特征,轮叶系中的三叶龙胆(*G. ternifolia* Franchet)、四叶龙胆(*G. tetraphylla* Maximowicz ex Kusnezow)、五叶龙胆(*G. viatrix* H. Smith)和六叶龙胆虽在茎生叶数目上存在差异,但其并不是稳定的性状,在种内、居群内甚至是同一个植株上都存在变异。例如,六叶龙胆的茎生叶可能为5 ~ 7枚<sup>[13]</sup>,其中6枚占绝大多数。而四叶龙胆和五叶龙胆自发表以来,标本记录极少,其分类地位仍存在争议<sup>[14]</sup>,分类学研究有待进一步开展。本研究在野外考察中发现,六叶龙胆居群中常分布有三叶龙胆、四叶龙胆和五叶龙胆,因此暂将其按六叶龙胆复合群处理。目前关于六叶龙胆复合群进化遗传学方面的研究仅包括叶绿体基因组结构分析、系统发育关系重建等<sup>[15]</sup>,尚未见其群体遗传学研究的报道<sup>[16]</sup>。

叶绿体在被子植物中主要为母系遗传,因此可以反映植物随种子传播而发生的扩散与迁移过程<sup>[17]</sup>,常用于种群历史研究<sup>[18]</sup>;加之其在不同植

物类群间易于扩增,且变异速率较高,是遗传多样性研究常用的分子标记<sup>[19, 20]</sup>。因此,本研究首先基于形态形状,尝试在居群水平对六叶龙胆复合群加以区分;随后以母系遗传的叶绿体片段为分子标记,通过群体遗传学分析探讨其在横断山地区的遗传分化与种群动态历史,以期为六叶龙胆复合群的多样性保护和可持续开发利用提供理论指导,并为横断山地区的植物进化遗传学研究提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

在横断山地区采集六叶龙胆13个居群共139个个体,及其近缘类群8个居群共130个个体(表1)。由于茎生叶数目变异大,采集后对每个植株所有茎的轮生叶数目进行统计。采集的新鲜叶片用硅胶快速干燥,密封保存在-20℃中。

### 1.2 DNA提取、片段扩增与测序

采用改良的CTAB法<sup>[21]</sup>提取叶片总DNA,通过片段筛选,选用有效信息位点较多的[22]片段对所有个体进行PCR扩增。扩增体系为20 μL,包括:2.0 μL 10 × Buffer(含Mg<sup>2+</sup>)、1.0 μL dNTP(2.5 mmol/L)、0.8 μL正、反向引物(10 mmol/L)、0.2 μL Taq聚合酶、0.5 μL DNA模板(约15 ng)。反应条件为:94℃预变性5 min, 94℃变性45 s, 53℃退火45 s, 72℃延伸30 s;扩增33个循环,最后72℃延伸6 min。PCR扩增产物经纯化后送测序。

### 1.3 数据分析

测序结果采用Geneious PRO 3.5.6软件<sup>[23]</sup>进行比对,随后用DnaSP5.1软件<sup>[24]</sup>统计单倍型(haplotype)个数。在ARLEQUIN 3.5.1.3软件<sup>[25]</sup>中计算基因多态性(*h*)、核苷酸多态性( $\pi$ )和遗传多样性指数(*Pi*)。用PERMUTCpSSR软件<sup>[26]</sup>计算居群内平均遗传多样性(average within population diversity, *h<sub>s</sub>*)、总遗传多样性(total haplotype diversity, *h<sub>T</sub>*)以及居群遗传分化系数*G<sub>ST</sub>*和*N<sub>ST</sub>*,并对算得的*G<sub>ST</sub>*和*N<sub>ST</sub>*进行1000次重复置换检验,以检测单倍型的分布是否具有显著的谱系地理结

构。运用 ARLEQUIN 3.5.1.3 软件包中的分子变异分析软件 (analysis of molecular variance, AMOVA)<sup>[27]</sup> 检测遗传变异在居群间和居群内的分布情况。中性检测 (neutrality test) 的 Fu's  $F_s$  和 Tajima's  $D$ <sup>[28]</sup>, 以及歧点分布 (mismatch distribution)<sup>[29]</sup> 分析也在 ARLEQUIN 3.5.1.3 软件中完成。中性检验中若 Tajima's  $D$  或 Fu's  $F_s$  显著性地为负值, 认为群体近期发生了居群扩张<sup>[28]</sup>。

基于最大似然法, 在 PhyML 3.0 软件<sup>[30]</sup> 中采用 SPR 方法建构单倍型之间的系统发育关系, 由 jModelTest 2.1.7 软件<sup>[31]</sup> 计算的核苷酸替换模型为 HKY。根据龙胆属的系统发育关系<sup>[3]</sup>, 以麻花苣 (*G. straminea* Maximowicz, KJ657732)、*G. parryi* Engelman (DQ398765) 和东俄洛龙胆 (*G. tongolensis* Franchet, MK251985) 为外类群。通过 NETWORK 4.6.1.1 软件<sup>[32]</sup> 以最大简约法为原则构建单倍型的中央连接网络图 (Median-Joining Network)<sup>[32]</sup>。

采用 BEAST 2.4.6 软件<sup>[33]</sup>, 基于贝叶斯方法 (Bayesian) 估算六叶龙胆复合群各分支演化关系和分化时间。采用 jModelTest 2.1.7 软件<sup>[31]</sup> 计算 HKY 模型 ( $\kappa = 2.8$ )、严格分子钟模型和 Yule 模型。采用龙胆属秦苣组 (section *Cruciata* Gaudin) 化石记录进行校正, 化石参数设置同

Favre 等<sup>[3]</sup> 的方法。进行 3 次独立运算, 每次运算 10 000 000 代, 每隔 1000 代取一棵树, 去掉前 10% 的预热树。采用 Tracer1.5 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>) 查看有效采样规模 (effective sample size, ESS), 保证均大于 200。采用 TreeAnnotator 1.7.5 软件<sup>[34]</sup> 基于有效树产生一棵分支分化时间树。

## 2 结果与分析

### 2.1 居群内关键形态性状统计

六叶龙胆花枝多数丛生, 每个花枝上的茎生叶数目变异大, 因此本研究对每个植株所有花枝的轮生叶数目逐一进行计数, 统计不同轮生叶数目的茎的数量。结果表明 (图 1), 虽然茎生叶轮生数目在不同物种间存在重叠, 但该性状在居群内呈正态分布, 可以将不同物种区分开。

### 2.2 居群的遗传多样性水平与遗传分化

本研究中, *trnS-trnG* 片段比对后的序列长度为 532 bp, 包含 79 个碱基插入/缺失、12 个碱基突变, 这些变异在六叶龙胆复合群中共鉴定到 20 种单倍型 (GenBank 号为 MN162106 ~ MN162125)。仅有 3 个居群的遗传多样性为 0 (P12、R2、R3) (表 1)。居群平均单倍型多样性、核苷酸多样性和核苷酸多样性指数分别为 0.444、

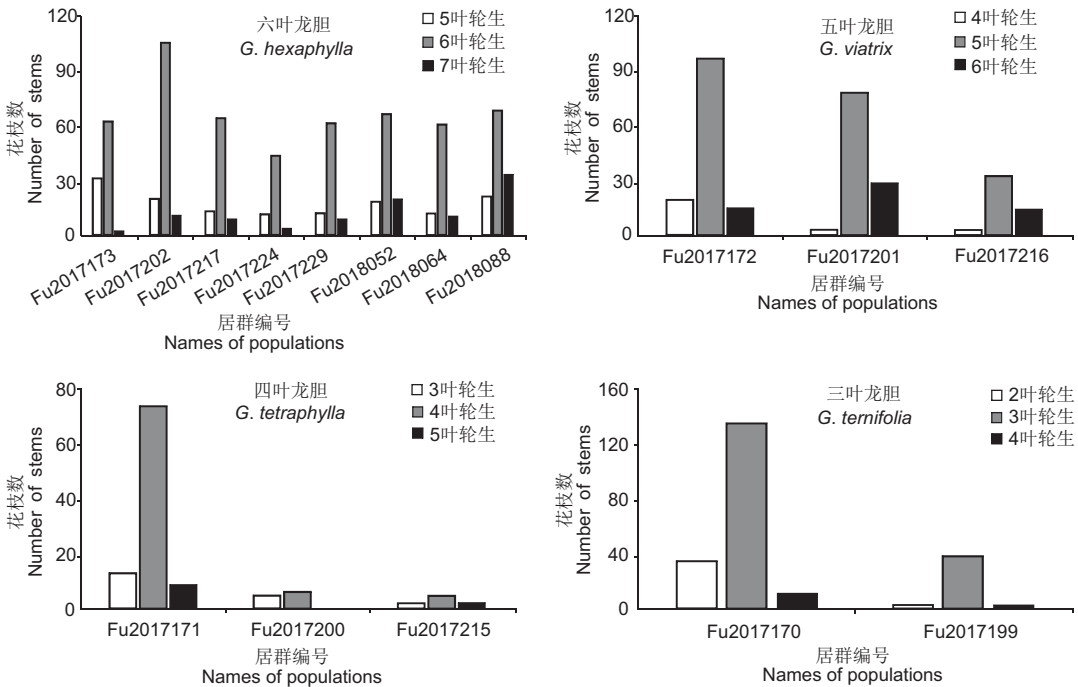


图 1 茎生叶轮生数在六叶龙胆复合群居群中的统计结果

Fig. 1 Number of stems and leaf whorls in *Gentiana hexaphylla* complex populations

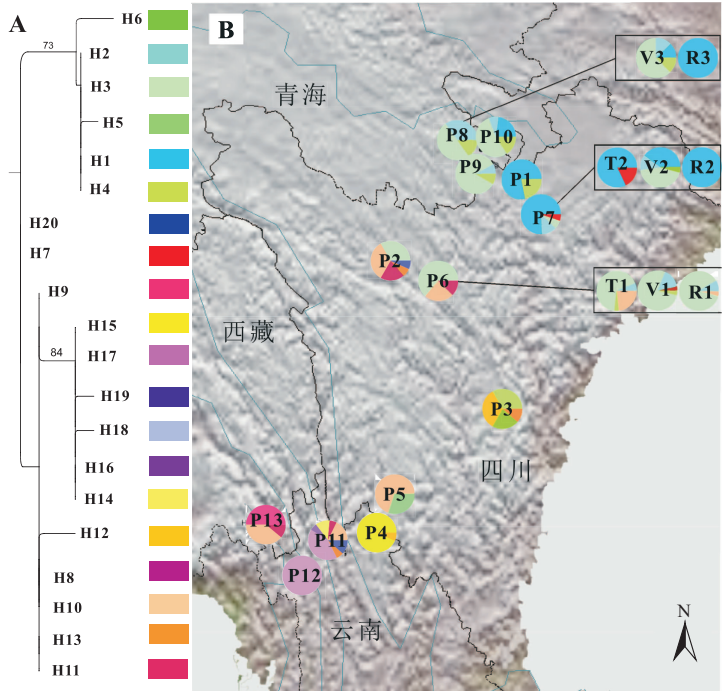
表 1 六叶龙胆复合群采样信息及各居群的遗传多样性  
Table 2 Sampling information and genetic diversity of *Gentiana hexaphylla* complex

居群编号 Population code	凭证标本号 Voucher reference	采样地点 Locality	经纬度 Latitude and Longitude	海拔 (m) Altitude	个体数 No.	单倍型组成 Haplotype	单倍型多样性 ( <i>h</i> ) Haplotype diversity	核苷酸多样性 ( $\pi$ ) Nucleotide diversity	遗传多样性 指数 (PI) Genetic diversity Index
六叶龙胆 <i>Gentiana hexaphylla</i>									
P1	Fu2016027	四川阿坝	102°06'N, 32°45'E	3937	18	H1(14), H4(4)	0.366 ± 0.112	3.602 ± 2.428	1.83
P2	Fu2016046	四川色达	100°06'N, 31°49'E	4483	15	H3(5), H10(5), H11(3), H13(1), H20(1)	0.781 ± 0.064	14.332 ± 7.972	7.30
P3	Fu2016087	四川康定	101°47'N, 30°04'E	4224	9	H4(3), H8(2), H12(3), H14(1)	0.806 ± 0.089	25.476 ± 14.379	13.22
P4	Fu2016150	云南香格里拉	99°49'N, 28°34'E	4321	15	H12(1), H15(14)	0.133 ± 0.112	12.877 ± 7.246	6.40
P5	Fu2016156	四川乡城	100°03'N, 28°49'E	4628	10	H5(3), H10(7)	0.467 ± 0.132	11.942 ± 7.026	6.07
P6	Fu2017173	四川炉霍	100°43'N, 31°44'E	4022	25	H3(16), H10(6), H11(3)	0.540 ± 0.089	13.635 ± 7.391	6.94
P7	Fu2017202	四川红原	102°14'N, 32°39'E	3731	42	H1(32), H2(5), H3(3), H7(2)	0.408 ± 0.089	6.506 ± 3.787	3.32
P8	Fu2017217	青海久治	101°28'N, 33°12'E	3717	20	H2(7), H3(10), H4(3)	0.638 ± 0.064	1.468 ± 1.263	0.75
P9	Fu2017224	青海久治	101°33'N, 33°23'E	3768	12	H2(1), H3(10), H4(1)	0.318 ± 0.164	0.655 ± 0.788	0.33
P10	Fu2017229	青海久治	101°19'N, 33°22'E	4048	13	H1(3), H2(1), H3(7), H4(2)	0.680 ± 0.112	5.078 ± 3.266	2.59
P11	Fu2018052	云南德钦	99°04'N, 28°20'E	4326	17	H10(3), H11(1), H14(2), H16(1), H17(7), H18(1), H19(2)	0.809 ± 0.079	14.174 ± 7.835	7.06
P12	Fu2018064	云南贡山	98°45'N, 28°04'E	3900	14	H17(14)	0	0	0.00
P13	Fu2018088	西藏察隅	98°04'N, 28°36'E	4330	18	H9(9), H10(7), H11(2)	0.621 ± 0.067	7.753 ± 4.558	3.92
三叶龙胆 <i>G. ternifolia</i>									
T1	Fu2017170	四川炉霍	100°43'N, 31°44'E	4022	31	H2(2), H3(21), H4(1), H10(7)	0.501 ± 0.088	10.309 ± 5.698	5.25
T2	Fu2017199	四川红原	102°14'N, 32°39'E	3731	11	H1(9), H7(2)	0.327 ± 0.153	8.442 ± 5.112	4.26
四叶龙胆 <i>G. tetraphylla</i>									
R1	Fu2017171	四川炉霍	100°43'N, 31°44'E	4022	24	H2(2), H3(21), H10(1)	0.236 ± 0.109	2.605 ± 1.871	1.33
R2	Fu2017200	四川红原	102°14'N, 32°39'E	3731	2	H1(2)	0	0	0.00
R3	Fu2017215	青海久治	101°28'N, 33°12'E	3717	2	H2(2)	0	0	0.00
五叶龙胆 <i>G. viatrix</i>									
V1	Fu2017172	四川炉霍	100°43'N, 31°44'E	4022	27	H2(4), H3(21), H4(1), H11(1)	0.385 ± 0.108	2.799 ± 1.964	1.43
V2	Fu2017201	四川红原	102°14'N, 32°39'E	3731	25	H1(10), H2(3), H3(11), H6(1)	0.657 ± 0.055	8.330 ± 4.749	4.34
V3	Fu2017216	青海久治	101°28'N, 33°12'E	3717	8	H1(1), H2(1), H3(5), H4(1)	0.643 ± 0.184	3.782 ± 2.726	1.93



0.00732 和 3.73，在居群内表现出较高的遗传多样性水平，且未发现遗传多样性水平明显高于其他地区的区域(图 2)。在六叶龙胆的近缘类群中并未鉴定出特有单倍型，其遗传组成与同域分布的六叶龙胆相同。居群内平均遗传多样性  $h_s$  为 0.443，总的遗传多样性  $h_T$  为 0.860，遗传分化系数  $N_{ST}$  和  $G_{ST}$  分别为 0.752 和 0.484，且  $N_{ST}$  显著大于  $G_{ST}$

( $P < 0.01$ )，说明六叶龙胆复合群具有显著的谱系地理结构。AMOVA 分析结果表明，大部分遗传变异(72.74%)发生在复合群的居群间，少量变异(27.26%)发生在居群内；六叶龙胆与近缘类群间的分析结果说明，仅有 5.35%的遗传变异存在于类群间，大部分遗传变异存在于类群的居群间(68.13%)和居群内(26.52%)(表 2)。



A: 基于最大似然法构建的单倍型系统发育关系图。B: 单倍型地理分布式样。饼图为不同采样点中各单倍型的频率。P: 六叶龙胆 (*Gentiana hexaphylla*)；T: 三叶龙胆 (*G. ternifolia*)；V: 五叶龙胆 (*G. viatrix*)；R: 四叶龙胆 (*G. tetraphylla*)。  
A: Maximum likelihood phylogeny of 20 chloroplast haplotypes.; B: Geographical distribution of haplotypes across sampled populations. Pie charts display haplotype frequencies in each locality.

图 2 六叶龙胆复合群 20 种叶绿体单倍型的地理分布式样与系统发育关系  
Fig. 2 Geographical distributions and phylogenetic relationships of 20 chloroplast haplotypes identified in *Gentiana hexaphylla* complex

表 2 六叶龙胆复合群 AMOVA 分析  
Table 2 AMOVA of *Gentiana hexaphylla* complex

变异来源 Source of variation	自由度 <i>df</i>	平方和 Sum of squares	变异组成 Variance components	变异百分比(%) Percentage of variation
复合群				
居群间 Among populations	20	1766.245	5.15	72.74
居群内 Within populations	337	649.716	1.93	27.26
总计 Total	357	2415.961	7.07	
六叶龙胆与其他类群				
组间 Among groups	1	179.52	0.39	5.35
组内居群间 Among populations within groups	19	1586.73	4.95	68.13
居群内 Within populations	337	649.72	1.93	26.52
总计 Total	357	2415.96	7.27	

系统发育关系分析结果表明，六叶龙胆复合群 20 种单倍型分布在两个大的支系中，其内部分支的支持率均较低( $< 60\%$ )。两个支系在地理分布上有一定的规律，即一个支系主要集中在该复合群分布区的北部，另一个支系集中在分布区的南部(图 2: A)。中央连接网络图的拓扑结构与系统发育树相同，说明复合群内存在两个支系，同时表明六叶龙胆复合群并不存在明显的中央单倍型(图 3)。分化时间分析结果显示，六叶龙胆复合群两个支系的分化时间为 2.17 Ma (95% 置信区间: 1.06 ~ 4.77 Ma)，支系内的遗传分化主要发生在 0 ~ 2.0 Ma(图 4)。

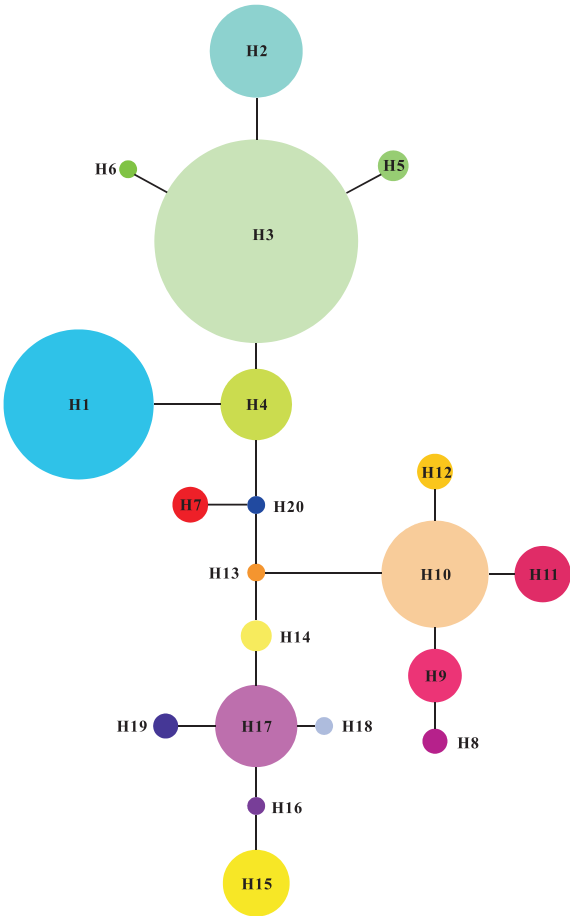
2.3 种群历史

歧点分布的分析结果表明，在两种扩张模型假设下，六叶龙胆复合群均为多峰曲线(图 5)，说明在较长时间段内种群大小相对稳定，未发生明显的

扩张<sup>[29]</sup>。六叶龙胆复合群的中性检验结果显示，Fu's  $F_s$  为 15.458 ( $P = 0.959$ )，Tajima's  $D$  为  $-0.498$  ( $P = 0.350$ )，说明群体近期内未发生明显的居群扩张。因此两种分析结果均表明六叶龙胆复合群近期并未经历明显的居群扩张。

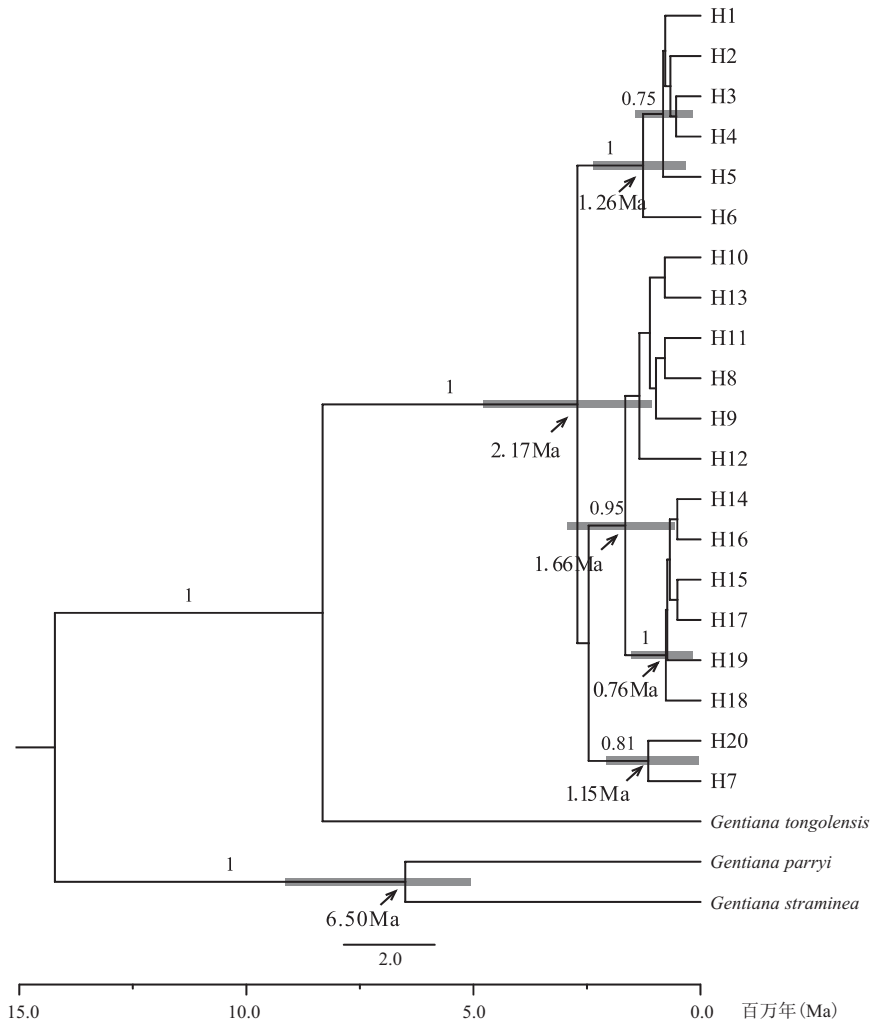
3 讨论

龙胆属轮叶系物种以其枝上茎生叶轮生数目为主要分类特征，但在野外考察中发现存在大量的过渡类型。因此，基于居群的物种概念<sup>[35]</sup>，本研究统计了采样点居群内各个植株的茎生叶数目，结果发现虽然茎生叶的轮生数目在不同物种间存在重叠，但在每个物种内仍然呈正态分布，从形态上可以区分不同的类群。因此，对于在居群或种间存在连续性状的类群，基于居群的物种概念是从形态学对其进行分类的有效手段。



饼图大小表示单倍型数量。  
Pie charts display number of each haplotype.

图 3 基于叶绿体片段数据的六叶龙胆复合群的中央网络连接图  
Fig. 3 Median-joining network of *Gentiana hexaphylla* complex based on cpDNA data



枝上数值表示贝叶斯后验概率，主要节点的分化时间用箭头表示，灰条表示 95% 的置信区间。  
Numbers on branches indicate Bayesian posterior probabilities. Node age estimates are marked with black arrows. Gray bars represent 95% highest posterior densities.

图 4 基于贝叶斯算法的六叶龙胆复合群叶绿体单倍型一致树及支系间的分化时间  
Fig. 4 Majority rule consensus phylogenetic tree of chloroplast haplotypes detected in *Gentiana hexaphylla* complex based on Bayesian inference

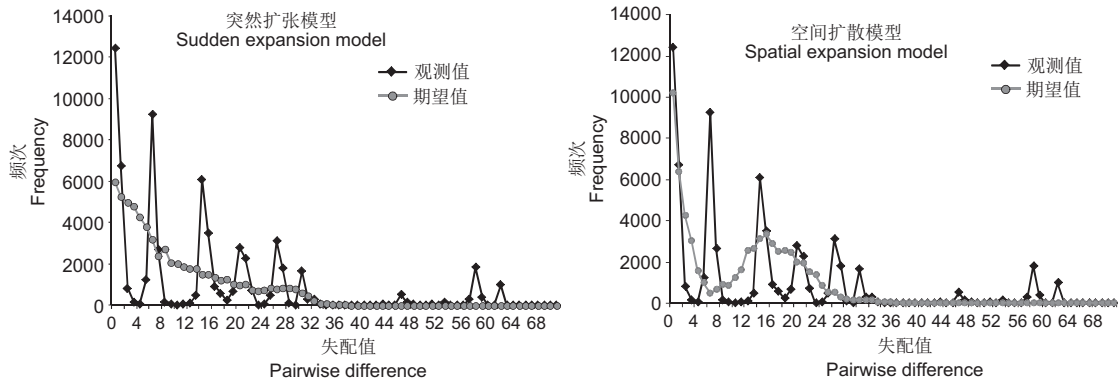


图 5 六叶龙胆复合群歧点分布分析曲线  
Fig. 5 Mismatch distribution analysis of *Gentiana hexaphylla* complex

本研究以居群的形态性状为分类依据,采用叶绿体基因片段对六叶龙胆复合群进行群体遗传学分析,结果表明该复合群不能被区分开来,同域分布的不同类群间遗传组成基本相同。这种遗传相似性可能与本研究采用的分子标记数量较少有关,因而无法检测到足够多的遗传变异;也可能是由于同域分布的近缘物种间的杂交或渐渗所致,尤其是近缘类群间容易发生杂交<sup>[36, 37]</sup>。此外,六叶龙胆复合群物种间的单倍型共享现象,也有可能是由于物种近期发生分化,导致了不完全的谱系筛选(incomplete lineage sorting),而龙胆属刚好属于典型的近期分化类群<sup>[3]</sup>。因此,该复合群中的物种分类地位仍需通过如单拷贝核基因数据或者全基因组的高通量数据分析进一步确定。

横断山地区因其独特的深切峡谷地貌和适宜的水热条件,孕育了丰富且别具特色的动植物类群。而在历史上的冰期,横断山地区是我国高山植物最重要的冰期避难所<sup>[5, 6, 9]</sup>,是诸多类群的汇集地与间冰期时再次扩张的起点。基于叶绿体基因片段的六叶龙胆复合群的群体遗传学分析结果表明,该复合群居群内的遗传多样性水平较高,没有明显的遗传多样性中心与分化中心;此外,特有单倍型散布于不同居群内。这种岛屿状的遗传分布式样与冰缘植物绵参(*Eriophyton wallichii* Benthams)、石砾唐松草(*Thalictrum squamiferum* Lecoyer)、拟耧斗菜(*Paraquilegia microphylla* (Royle) J. R. Drummond & Hutchinson)、垫紫草(*Chionocharis hookeri* (C. B. Clarke) I. M. Johnston)<sup>[38]</sup>和高山栎组植物(*Quercus* sect. *Heterobalanus*)<sup>[19]</sup>等比较相似;与部分高山植物如鲜卑花属(*Sibiraea*)<sup>[39]</sup>、绣线菊属(*Spiraea*)<sup>[40]</sup>等在避难所遗传多样性高、高原台面遗传组成单一的遗传分布式样有所不同。虽然本研究检测到六叶龙胆复合群内存在明显的谱系地理结构,但无法鉴定出一个明显的冰期避难所;其分布区南部与北部固定的叶绿体单倍型之间存在较明显的遗传分化,形成了两个亚支系,因此该复合群在横断山脉地区可能存在至少两个微型避难所。这种多个微型避难所格局与高山植物山地虎耳草(*Saxifraga sinomontana* J. T. Pan & Gornall)<sup>[41]</sup>比较相似,但后者在青藏高原台面上也存在微型避难所。六叶龙胆复合群的遗传分化主要发生在第四纪,此时青藏高原和横断山脉已基本

隆升到现代高度<sup>[42]</sup>,造山运动对其遗传分化的影响可能小于第四纪的冰川作用,尽管横断山脉的隆升促进了该地区的物种分化<sup>[10]</sup>。青藏高原和横断山脉地区已有研究表明<sup>[5-7, 9]</sup>,该地区第四纪的环境与气候变化是物种在种水平或居群水平上遗传分化的主要因素<sup>[43]</sup>。此外,横断山地区特殊的高山峡谷地貌易于形成片段化的生境,起到了降低居群间基因流的作用,从而促进了种内的遗传分化。与此相对应是六叶龙胆复合群的遗传变异主要发生在种群间,这与该地区的其他植物如绵参(95.65%)、石砾唐松草(90.40%)、拟耧斗菜(96.19%)和垫紫草(98.07%)<sup>[38]</sup>以及印度块菌(*Tuber indicum*, 93.71%)<sup>[44]</sup>相似,而有别于遗传变异主要发生在种群内的青藏高原广布种如山地虎耳草(22.06%)<sup>[41]</sup>等。因此,六叶龙胆复合群岛状的遗传结构很可能是冰川运动导致的环境与气候变化和横断山地区特有的地形共同作用的结果。

与此岛屿状的遗传结构相对应,六叶龙胆复合群的种群进化历史分析结果表明其在近期并未经历明显的扩张,种群稳定,中央网络图也提示该类群没有发生整体扩张;这一结果也与上述冰缘植物<sup>[38]</sup>及高山栎<sup>[19]</sup>的歧点分布分析结果相同,但与经历了明显居群扩张的山地虎耳草<sup>[41]</sup>不同。此外,已有研究表明,横断山地区高山植物的分布范围会随着气候变暖而增大<sup>[45]</sup>;据此,六叶龙胆复合群在冰期过后将发生扩张,但与本研究结果不一致。考虑到复杂的遗传结构可能会对歧点分布分析产生影响,加之横断山地区的地形和地质历史复杂,六叶龙胆复合群的种群进化历史还有待进一步研究。

**致谢:**感谢洛阳师范学院韩赞、徐淦、龙宜和宋彦杰在样品采集和分子生物学实验中的帮助。

## 参考文献:

- [1] Marchese C. Biodiversity hotspots: a shortcut for a more complicated concept[J]. *Global Ecol Conser*, 2015, 3: 297-309.
- [2] Mosbrugger V, Favre A, Muellner-Riehl AN, Päckert M, Mulch A. Cenozoic evolution of Geo-Biodiversity in the Tibeto-Himalayan region[M]//Hoorn C, Perrigo A, Antonelli A. eds. *Mountains, Climate, and Biodiversity*. Netherlands: John Wiley & Sons, 2018.
- [3] Favre A, Michalak I, Chen CH, Wang JC, Pringle JS, et al. Out-of-Tibet: the spatio-temporal evolution of *Gentiana* (Gentianaceae)[J]. *J Biogeogr*, 2016, 43: 1967-



- 1978.
- [ 4 ] Ebersbach J, Muellner-Riehl AN, Michalak I, Tkach N, Hoffmann MH, *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]. *J Biogeogr*, 2017, 44(4): 900–910.
- [ 5 ] Qiu YX, Fu CX, Comes HP. Plant molecular phylogeography in China and adjacent regions: Tracing the genetic imprints of Quaternary climate and environmental change in the world's most diverse temperate flora[J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2011, 59(1): 225–244.
- [ 6 ] Liu JQ, Duan YW, Hao G, Ge XJ, Sun H. Evolutionary history and underlying adaptation of alpine plants on the Qinghai-Tibet Plateau [J]. *J Syst Evol*, 2014, 52(3): 241–249.
- [ 7 ] Wen J, Zhang JQ, Nie ZL, Zhong Y, Sun H. Evolutionary diversifications of plants on the Qinghai-Tibetan Plateau [J]. *Front Genet*, 2014, 5: 4.
- [ 8 ] Hughes CE, Atchison GW. The ubiquity of alpine plant radiations: from the Andes to the Hengduan Mountains[J]. *New Phytol*, 2015, 207(2): 275–282.
- [ 9 ] Sun H, Zhang J, Deng T, Boufford DE. Origins and evolution of plant diversity in the Hengduan Mountains, China [J]. *Plant Diversity*, 2017, 39(4): 161–166.
- [ 10 ] Xing Y, Ree RH. Uplift-driven diversification in the Hengduan Mountains, a temperate biodiversity hotspot [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(17): E3444–E3451.
- [ 11 ] Ho TN, Liu SW. A worldwide monograph of *Gentiana*[M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [ 12 ] Rybczyński JJ, Davey MR, Mikula A, eds. The Gentianaceae: Vol. 2: Biotechnology and Applications [M]. Berlin: Springer-Verlag, 2015.
- [ 13 ] Ho TN, Pringle JS. Gentianaceae [M]//Wu ZY, Raven PH, eds. Flora of China. Beijing: Science Press, 1995.
- [ 14 ] 郑斌. 龙胆属头花组和多枝组的分类学研究——兼论《湖北植物志》中两种龙胆的分类学地位[D]. 北京: 中国科学院大学, 2017.
- [ 15 ] Sun SS, Fu PC, Zhou XJ, Cheng YW, Zhang FQ, *et al.* The complete plastome sequences of seven species in *Gentiana* sect. *Kudoa* (Gentianaceae): Insights into plastid gene loss and molecular evolution[J]. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 493.
- [ 16 ] 孙珊珊, 付鹏程. 龙胆族(龙胆科)分类与进化研究进展[J]. 西北植物学报, 2019, 39(2): 363–370.
- Sun SS, Fu PC. Study on taxonomy and evolution of Gentianeae (Gentianaceae) [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2019, 39(2): 363–370.
- [ 17 ] Petit RJ, Aguinalde I, De Beaulieu JL, Bittkau C, Brewer S, *et al.* Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity[J]. *Science*, 2003, 300(5625): 1563–1565.
- [ 18 ] Li Y, Stocks M, Hemmälä S, Källman T, Zhu HT, *et al.* Demographic histories of four spruce (*Picea*) species of the Qinghai-Tibetan Plateau and neighboring areas inferred from multiple nuclear loci[J]. *Mol Biol Evol*, 2010, 27(5): 1001–1014.
- [ 19 ] Meng HH, Su T, Gao XY, Li J, Jiang XL, *et al.* Warm-cold colonization: response of oaks to uplift of the Himalaya-Hengduan Mountains [J]. *Mol Ecol*, 2017, 26(12): 3276–3294.
- [ 20 ] Xie C, Xie DF, Zhong Y, Guo XL, Liu Q, Zhou SD. The effect of Hengduan Mountains Region (HMR) uplift to environmental changes in the HMR and its eastern adjacent area: Tracing the evolutionary history of *Allium* section *Sikkimensia* (Amaryllidaceae) [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2019, 130: 380–396.
- [ 21 ] Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material[J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19(1): 11–15.
- [ 22 ] Hamilton MB. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation [J]. *Mol Ecol*, 1999, 8(3): 521–523.
- [ 23 ] Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, *et al.* Geneious basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data [J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(12): 1647–1649.
- [ 24 ] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451–1452.
- [ 25 ] Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows[J]. *Mol Ecol Resour*, 2010, 10(3): 564–567.
- [ 26 ] Pons O, Petit RJ. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles [J]. *Genetics*, 1996, 144(3): 1237–1245.
- [ 27 ] Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data[J]. *Genetics*, 1992, 131(2): 479–491.
- [ 28 ] Fu YX. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection [J]. *Genetics*, 1997, 147(2): 915–925.
- [ 29 ] Rogers AR, Harpending H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences [J]. *Mol Biol Evol*, 1992, 9(3): 552–569.
- [ 30 ] Guindon S, Gascuel O. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood [J]. *Syst Biol*, 2003, 52(5): 696–704.

- [31] Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing [J]. *Nat Methods*, 2012, 9(8): 772.
- [32] Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies [J]. *Mol Biol Evol*, 1999, 16(1): 37–48.
- [33] Bouckaert R, Heled J, Kühnert D, Vaughan T, Wu CH, *et al.* BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis [J]. *PLoS Comput Biol*, 2014, 10(4): e1003537.
- [34] Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A, Notes A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 [J]. *Mol Biol Evol*, 2012, 29(8): 1969–1973.
- [35] 洪德元. 生物多样性事业需要科学、可操作的物种概念[J]. 生物多样性, 2016, 24(9): 979–999.
- Hong DY. Biodiversity pursuits needs a scientific and operative species concept [J]. *Biodiversity Science*, 2016, 24(9): 979–999.
- [36] Abbott R, Albach D, Ansell S, Arntzen JW, Baird SJE, *et al.* Hybridization and speciation [J]. *J Evolution Biol*, 2013, 26(2): 229–246.
- [37] Nolte AW, Tautz D. Understanding the onset of hybrid speciation [J]. *Trends Genet*, 2010, 26(2): 54–58.
- [38] Luo D, Yue JP, Sun WG, Xu B, Li ZM, *et al.* Evolutionary history of the subnival flora of the Himalaya-Hengduan Mountains: First insights from comparative phylogeography of four perennial herbs [J]. *J Biogeogr*, 2016, 43(1): 31–43.
- [39] Fu PC, Gao QB, Zhang FQ, Xing R, Khan G, *et al.* Responses of plants to changes in Qinghai-Tibetan Plateau and glaciations: Evidence from phylogeography of a *Sibira* (Rosaceae) complex [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2016, 65: 72–82.
- [40] Khan G, Zhang FQ, Gao QB, Fu PC, Zhang Y, Chen SL. *Spiroides* shrubs on Qinghai-Tibetan Plateau: Multilocus phylogeography and palaeodistributional reconstruction of *Spiraea alpina* and *S. Mongolica* (Rosaceae) [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2018, 123: 137–148.
- [41] Li Y, Gao QB, Gengji ZM, Jia LK, Wang ZH, Gao QB. Rapid intraspecific diversification of the alpine species *Saxifraga sinomontana* (Saxifragaceae) in the Qinghai-Tibetan Plateau and Himalayas [J]. *Front Genet*, 2018, 9: 381.
- [42] Favre A, Päckert M, Pauls SU, Jähnig SC, Uhl D, *et al.* The role of the uplift of the Qinghai-Tibetan Plateau for the evolution of Tibetan biotas [J]. *Biol Rev*, 2015, 90(1): 236–253.
- [43] Muellner-Riehl AN. Mountains as evolutionary arenas: patterns, emerging approaches, paradigm shifts, and their implications for plant phylogeographic research in the Tibeto-Himalayan region [J]. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 195.
- [44] Feng B, Zhao Q, Xu JP, Qin J, Yang ZL. Drainage isolation and climate change-driven population expansion shape the genetic structures of *Tuber indicum* complex in the Hengduan Mountains region [J]. *Sci Rep-UK*, 2016, 6: 21811.
- [45] Liang QL, Xu XT, Mao KS, Wang MC, Wang K, *et al.* Shifts in plant distributions in response to climate warming in a biodiversity hotspot, the Hengduan Mountains [J]. *J Biogeogr*, 2018, 45(6): 1334–1344.

(责任编辑：周媛)