

利用叶绿体 DNA *trnL-F* 序列初步探讨菊科 风毛菊属的系统发育

^{1,2}王 玉 金 * ¹刘 建 全 *

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 810008)

²(中国科学院研究生院 北京 100039)

A preliminary investigation on the phylogeny of *Saussurea* (Asteraceae : Cardueae) based on chloroplast DNA *trnL-F* sequences

^{1,2}WANG Yu-Jin * ¹LIU Jian-Quan *

¹(Laboratory of the Qinghai-Tibet Plateau Biological Evolution and Adaptation, Northwest Plateau Institute of Biology,
the Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China)

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

Abstract *Saussurea* DC., a highly diversified genus with about 400 species in the Asteraceae, has been an extremely difficult group in both taxonomical and phylogenetic studies. The monophyletic origin, infrageneric classification and systematic positions of some species with unique gross morphology remain unclear for this genus. The main aim of this study was to examine infrageneric relationships of *Saussurea* as inferred from molecular evidence against the existing supraspecific classification on the basis of the morphological characteristics. In addition, we intended to use phylogenetic analyses of DNA sequence data to investigate systematic position and relationship of each species in sect. *Pseudoeriocoryne* (subgen. *Eriocoryne*) and test the monophyly of this section, which is likely to be established based on the morphological characters with convergent evolution. We sequenced chloroplast DNA *trnL-F* for all four species of sect. *Pseudoeriocoryne* and other 33 species, which represent the recognized five subgenera in *Saussurea*, and conducted a phylogenetic analysis together with 14 related genera in the Cardueae Cass. The variation of *trnL-F* sequences is very low among the sampled species in spite of their extremely diverse morphology. Five subgenera in *Saussurea* delimited based on morphological characters were unrecognized on all most parsimonious trees. Sect. *Pseudoeriocoryne* is a polyphyletic group, and the four species in this section were found to be distantly related to each another, and showed no close relationship with the other species in subgen. *Eriocoryne*. The morphological characters to circumscribe this section had separately evolved four times. An 18-bp insertion was identified for *S. polycolea* var. *acutisquama* in sect. *Pseudoamphilaena* of the subgen. *Amphilaena* and other four species, *S. hieracioides*, *S. superba*, *S. tatsienensis* and *S. katochaete* from the subgen. *Saussurea*. This long and unique insertion was only recognized for these five species in the total Cardueae, and it must have evolved before the

*

2003-07-02 收稿, 2003-12-02 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), 全国优秀博士论文专项基金和国家自然科学基金 (30000012) 资助 (Supported by a Knowledge Innovation Project of the Chinese Academy of Sciences (Grant No. KSCXZ-SW-106), Special Fund of Outstanding PhD Dissertation and the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 30000012))。

*两位作者对此文具有平等的贡献并负有相同的责任 (Both authors contributed equally to this work. E-mail: ljyqdy@public.xn.qh.cn)。

morphological diversification of this species complex. However, this insertion was not found in *S. polycolea* and another population of *S. katochaete*. Therefore, the insertion found in *S. polycolea* var. *acutisquama* and *S. katochaete* might have resulted from haplotype introgression or retaining because of hybridization. This study demonstrates for the first time that species even within a genus had also undergone convergent evolution in their morphology under the same ecological selection pressure of the Qinghai-Tibet arid habitats. This implication is especially important for those researches, which study relationships of the species distributed there and name taxonomical entities based exclusively on the gross morphology. In addition, our preliminary results indicate that *Saussurea* provides a typical case for studying rapid speciation, reticulate and convergent evolution under the arid habitats.

Key words *Saussurea*, *trnL-F*, phylogeny, convergent evolution.

摘要 风毛菊属 *Saussurea* DC. 是菊科物种分化十分剧烈和分类处理十分困难的一个属。该属的单系起源性质、属下分类系统以及一些独特形态物种的系统位置尚不清楚,有待进一步验证。本文测定了代表该属 5 个亚属 37 种植物 43 个样品和川木香属 *Dolomiaea* DC. 的 1 种样品的叶绿体 DNA *trnL-F* 序列,并调取菜蓟族 *Cardueae* Cass. 与风毛菊属具有一定亲缘关系的 13 属的该序列,一起进行了分支分析,重点验证该属的属下形态分类系统以及形态特殊、青藏高原地区特有的雪兔子亚属 subgen. *Eriocoryne* 中假雪兔子组 sect. *Pseudoeriacoryne* 的单系性质。研究结果表明:(1)尽管风毛菊属 5 个亚属形态变异极大,但种间的 *trnL-F* 碱基变异却非常小;(2)根据形态学划分的 5 个亚属在分支图上没有得到分辨;(3)根据无明显茎、叶呈莲座状包被头状花序等特征建立的假雪兔子组是一多系群,与其他雪兔子亚属的种类也没有密切的亲缘关系,其共同拥有的形态学特征分别起源了 4 次;(4)雪莲亚属假雪莲组 subgen. *Amphilaena* sect. *Pseudoamphilaena* 中的多鞘雪莲 *S. polycolea* 变种尖苞雪莲 *S. polycolea* var. *acutisquama* 与风毛菊亚属 subgen. *Saussurea* 的长毛风毛菊 *S. hieracioides*、美丽风毛菊 *S. superba*、打箭风毛菊 *S. tatsienensis* 和重齿风毛菊 *S. katochaete* 具有一段长 18 个碱基的插入,但多鞘雪莲原变种和重齿风毛菊另一居群无此插入;这一插入在整个菜蓟族和风毛菊属中都十分特殊,是一次进化事件的结果,这一复合体的形态分化应该是在这一进化事件发生之后进行的;而尖苞雪莲和重齿风毛菊拥有这一特殊序列可能是由于杂交而导致种内存在不同的单倍性。研究结果证实青藏高原极端环境下即使在较低的分类等级——属内、种间的形态特征也存在相同选择压力下的生态趋同进化。这一点在利用形态特征研究该地区物种的亲缘关系和命名自然分类等级时应予以特别重视。风毛菊属提供了研究极端环境下物种快速分化、网状进化和趋同进化的典型范例。

关键词 风毛菊属; 叶绿体 DNA *trnL-F* 序列; 系统发育; 趋同进化

风毛菊属 *Saussurea* DC. 主要分布于亚洲中部与东部等环境较为恶劣的山区,如极端干旱的荒漠和寒、旱的青藏高原地区,约 400 余种;该属种类以植株无刺,冠毛两层,内层羽毛状,基部联合,整体脱落,外层较短,糙毛状或短羽毛状,分散脱落而与菜蓟族 *Cardueae* Cass. 的其他各属相区别,但是正如菊科中的许多大属一样,该属的部分鉴别特征也与其他属,如苓菊属 *Jurinea* Cass. 相联系(Dittrich, 1977; Bremer, 1994)。Lipschitz (1979) 根据是否具有色膜质或者密被绵毛苞片、总苞片是否被膜质附属物、瘦果顶端是否具小冠等形态学特征将该属划分为 6 个亚属:苓菊亚属 subgen. *Jurinea* (Baill.) Lipsch.、雪兔子亚属 subgen. *Eriocoryne* (DC.) Hook. f.、雪莲亚属 subgen. *Amphilaena* (Stschegl.) Lipsch.、附片亚属 subgen. *Theodora* (Cass.) Lipsch.、齿冠亚属 subgen. *Florovia* (DC.) Lipsch. 和风毛菊亚属 subgen. *Saussurea*, 又根据植株是否具绵毛或者叶是否被密毛、是否具花托托

片、总苞片等特征又在雪兔子亚属、雪莲亚属、风毛菊亚属下建立了多个组。这一分类系统广泛应用于《中国植物志》(石铸,靳淑英,1999)和各地地方植物志(刘尚武等,1985;刘尚武,1996;Ohba & Malla, 1988)。苓菊亚属的两种植物 *S. ceratocarpa* Decne. 和 *S. cardui-cephala* (Iljin) Iljin 原来放在苓菊属中,这两种植物据记载分布在喜马拉雅和中亚,中国的西藏和新疆应有分布;但我国的研究者既未在苓菊属记载这两种植物,在《中国植物志》中也把它们排除在风毛菊属之外。目前,根据《中国植物志》的分类处理,风毛菊属属下仅含 5 个亚属(石铸,靳淑英,1999)。风毛菊属内亚属的分类鉴定特征,如有色和绵毛苞片,存在于许多高山植物中,如塔黄 *Rheum nobile* Hook. f. & Thomson 等植物也存在有色苞片;而绵毛状的叶状苞片也发现于 *Eriophyton wallichii* Benth. 等植物中;这些特化特征被证明具有保证温度恒定、防止紫外线损伤等生态适应功能,从而保证了这些高山植物在极端环境下的正常生长繁殖,是趋同进化的结果(Omori & Ohba, 1996; Omori et al., 2000; Terashima et al., 1993, 1995; Tsukaya & Tsuge, 2001)。因此,根据趋同适应特征建立的风毛菊属属下分类系统极有可能是非自然的;风毛菊属孢粉学和果实微形态有限的种类研究也表明,一些种类的系统位置也与原有的亚属归类不一致(黄运平,尹祖棠,1994; Petit et al., 1996)。

像风毛菊属这类种类繁多的大属,要进行全面的分子系统学研究首先面临取材上的困难(Pelser et al., 2002)。建立一个可靠的分子系统发育关系,理想的结果是将所有的种类都包括在其中;但是时间和经费限制常造成在短期内无法完成这样的工作。另外一种选择是将这样一个大属分解为单系的多个类群,逐个进行研究,这样就能减少由于类群取样不全所造成的误差(Starr & Ford, 2001)。但是,对于这些大属来说,专著性修订十分罕见,并且已有的单基于形态学建立的属下分类系统大都是非自然的,其本身的科学性都需要进一步验证(Bohs & Olmstead, 1997)。已有的研究发现许多大属,如千里光属 *Senecio* L. (Pelser et al., 2002)、薹草属 *Carex* L. 以及 *Acacia* Mill. 等大属都不是一个单系群;因此,从一个种或者组出发,以点划圆的方式研究其系统位置和亲缘关系,构建一个基本的发育框架,然后逐渐扩大种类数目,最终对所有种类的系统位置和亲缘关系进行修订,可能才是最佳的选择(Pelser et al., 2002)。

雪兔子亚属一共有 26 个种,主要分布在青藏高原;根据是否具有明显的茎、植株被毛状况和头状花序着生位置与体态分为真雪兔子组 sect. *Eriocoryne*、假雪兔子组 sect. *Pseudoe-riocoryne* Lipsch. 和大理雪兔子组 sect. *Cincta* Lipsch. (Lipschitz, 1979)。假雪兔子组主要以植株无明显的茎,叶呈莲座状、铺地,头状花序在莲座状叶丛中形成球形或者半球形的总花序区别于其余两组植物,仅含 4 种:草甸雪兔子 *S. thoroldii* Hemsl.、拉萨雪兔子 *S. kingii* C. E. C. Fisch.、肉叶雪兔子 *S. thomsonii* C. B. Clarke 和星状雪兔子 *S. stella* Maxim.。该组的鉴别特征与用于亚属分类的苞片等特征类似,可能是趋同进化的结果,因为茎矮化、花序聚生并被莲座状叶丛包被也在高山植物中普遍存在(Ohba & Malla, 1988; Körner, 1999)。如果除去这些趋同性特征,这 4 种植物之间的其他形态学特征相差十分悬殊:拉萨雪兔子为二年生草本,根木质化,总苞片具叶质附片,瘦果具横皱纹并被蛛丝状毛;肉叶雪兔子总苞片椭圆形,花托突起,没有托片;草甸雪兔子的冠毛黑色;星状雪兔子的叶红色,星状排列。这些特征在这个组甚至整个风毛菊属中都十分特殊,因此,不仅这

4 种植物组成假雪兔子组的单系性质值得怀疑,外部形态特征可能存在的趋同进化需要证明,而且它们在风毛菊属的系统位置也值得深入研究。

DNA 数据,特别是 DNA 序列在揭示菊科植物的系统发育和进化以及分类处理方面起到了不可替代的重要作用(Jansen & Kim, 1996),尤其是对于这个科的众多形态学特征模糊、在系统发育和分类方面都十分困难的问题属(Francisco-Ortega et al., 1997, 2001; Kim et al., 1998; Panero et al., 1999; Häffner & Hellwig, 1999; Bain & Golden 2000; Karis et al., 2001; Park et al., 2001)。在菊科中,经常使用的 DNA 序列主要是 ITS、*ndhF* 和 *tmL-F* 等区域的序列。*tmL-F* 区域序列包括两段非编码的叶绿体 DNA 序列,*tmL* 内含子和 *tmL/tmF* 区间序列(Taberlet et al., 1991)。尽管只有 800 bp 左右长,这段序列为属内系统发育到族的划分都提供了重要的信息(Bayer & Starr, 1998; Bayer et al., 2000; O'Hanlon & Peakall, 2000; Pelsner et al., 2002)。这段序列,特别是在揭示菊科中有可能不是单系的大属的系统发育方面比其他序列更有优势,因为它能同时表现属内系统发育与属间关系,这已在菊科的多个大属研究中得到认可(Fernández et al., 2001; Pelsner et al., 2002)。国内利用 DNA 数据研究一些被子植物的属下系统发育取得了重要进展(高连明等, 2003; 张富民等, 2003)。但是,至今未见风毛菊属分子系统学研究的有关报道,该属的种类可能不是单系群,因而利用 *tmL-F* 序列可以更为广泛检查所研究种的亲缘关系和系统位置。此外,根据已有的属下分子系统学的研究结果,分子进化与形态进化一般都呈正相关(Gaut et al., 1992, 1993),而风毛菊属形态分化十分丰富,理论上该序列能得到较为理想的分支进化关系,因为利用 *tmL-F* 序列研究菊科具有一般形态分化的属都得到了较为理想的分辨关系(Bayer et al., 2000; Fernández et al., 2001; Liu et al., 2002)。本文尝试应用 *tmL-F* 区域序列分析风毛菊属的单系性质、属下分类系统和形态性状可能存在的趋同进化问题。以假雪兔子组的 4 种植物为主要对象,对分布在青藏高原地区位于 5 个亚属的另外 34 种植物进行了广泛取样,测定叶绿体 DNA *tmL-F* 序列,和菜蓟族的另外 14 属一起进行分支分析;重点探讨形态十分特殊的假雪兔子组的单系性质、形态趋同进化和每种植物的亲缘关系,并在该属下利用该分子数据建立一个初步的代表整个属下形态分类系统的框架,为将来的深入研究提供基础。

1 材料和方法

1.1 材料来源

本次研究的绝大部分种类,分别是由第二作者 1999 年至 2002 年夏季采自西藏、青海和四川的高海拔地区,在野外仔细观察其形态特征后,选择能代表其居群形态特征的个体,利用硅胶干燥叶片保存。凭证标本存中国科学院西北高原生物研究所植物标本馆(HNWP)。它们代表风毛菊属 5 个亚属 12 个组,基本覆盖了该属在亚属和组级水平的形态变异范围。尽管风毛菊属的分类学研究已经积累了大量的资料(石铸,靳淑英, 1999),但是根据《中国植物志》,该属的种类鉴定仍然十分困难,许多种类的合并以及发表的新分类群是否应当成立还有待野外的实地考察。我们主要依据《中国植物志》、《西藏植物志》和《青海植物志》鉴定本研究涉及的种类。由于这三本书对部分种类的处理相差甚远,对这些种类主要依据我们课题组近年来对部分模式标本的考订以及野外考察的结果进行了

初步定名;这些物种的分类学修订将在今后讨论和发表。即使如此,仍有部分研究材料,如 Liu 1002、Liu 1016、Liu 1077、Liu 1233 等,无法归入到已经发表的合适种类中,我们将这些种类作为近缘种的类似种处理,它们是否代表了新分类群、是否是杂交渗入的个体、是否是近缘种的极端变异个体,还有待对其所在复合体进行全面的物种生物学研究后才能得出科学的结论。本文测定的种类名称、定名人、材料采集地及它们在 Lipschitz (1979) 专著性修订中所归属的亚属和组别详见表 1。

1.2 实验方法

总 DNA 提取采用改进的 CTAB 法 (Doyle & Doyle, 1987)。*tmL-F* 区扩增使用引物“c” 5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG 3' 和“f” 5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG 3' (Taberlet et al., 1991)。50 mL 反应体积含:双蒸水 25 mL, 10 × Tris-HCl 缓冲液 (pH 9.2, 25 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂) 5 mL, dNTP 5 mL (8 mmol/L), 引物“c”和“f”各 2.5 mL (2 mmol/L), *Taq* 酶 0.3 mL (Unit/mL) 以及模板 10 mL (12.5 mmol/L)。扩增条件:70 1 min, 接以 94 1 min, 55 20 s, 72 50 s, 循环 2 次,再以 94 20 s, 55 20 s, 72 50 s, 循环 38 次,在 72 保温 4 min。扩增得到的 PCR 产物利用 CASpure PCR Purification Kit (上海中科开瑞生物芯片科技股份有限公司) 纯化。纯化后的产物利用同样的引物(“c”和“f”)和 Amersham 公司的 DYEnamic Dye Terminator Cycle Sequencing Kit 试剂盒进行测序 PCR 扩增,条件为:94 15 s, 50 15 s, 60 90 s, 循环 25 次。产物用 Amersham 公司的 Autoseq 96 Plates 纯化,在 MegaBACE 500 DNA Analysis System 上进行测序。每条链均能完整读出约 800 bp, 正反两条链相互重叠大于 90%。

同一物种形态一致的不同居群在测序后发现拥有完全不同的序列;或者两个种形态上差别十分大,但测序后又发现其序列完全相同。针对具有这种情况的部分物种进行了两次从提取总 DNA、PCR 扩增到测序的重复,以克服材料混淆、PCR 错配和测序等实验误差。对这类材料,第二次重复均得到与第一次完全相同的序列结果。

tmL-F 范围根据 GenBank 下载的茛蓂族植物序列确定;每种植物的序列注册 GenBank,并自 GenBank 调取茛蓂族与风毛菊属相关 13 个属的序列。所有种类的序列接收号见表 1。

1.3 序列分析与系统树构建

序列排列用 Clustal X 软件完成 (Thompson et al., 1997),排完后适当手工校正。排好的序列用 PAUP* 4.0 (Swofford, 2000) 和 Mega 2.0 (Kumar et al., 2001) 进行系统发育分析。利用 PAUP* 4.0 做简约 (Parsimony) 分析时,空位 (gap) 始终作为缺失状态,使用启发式 (heuristic) 搜索最简约树,采用 100 次重复的随机加入 (random addition of 100 replicates) 寻找最简约树的岛屿 (islands) 分布 (Maddison, 1991)。利用 bootstrap (1000 次重复) (Felsenstein, 1985) 检验各分支的置信度。

2 实验结果

各类群的 *tmL-F* 序列长度在 773 - 838 bp 之间,排序后长 859 bp。在风毛菊属内,以下物种碱基变异是 0.000%,它们之间的序列完全相同,分别是:草甸雪兔子、草地风毛菊、抱茎风毛菊、渐尖风毛菊、湿地风毛菊与小花风毛菊,星状雪兔子、皱果风毛菊、康定

表 1 材料来源和 GenBank 注册号(采用 Lipschitz (1979) 的属下分类系统)

Table 1 Origin of materials and accession numbers in GenBank (The infrageneric classification is according to Lipschitz (1979))

分类群 Taxon	采集地 Locality	凭证标本 Voucher *	序列号 GenBank Acc. No.
风毛菊属 Saussurea DC.			
雪兔子亚属 Subgen. Eriocoryne (DC.) Hook. f.			
假雪兔子组 Sect. Pseudoeriocoryne Lipsch.			
草甸雪兔子 <i>S. thoroldii</i> Hemsl.	青海玛多 Madoi, Qinghai	刘建全 (J. Q. Liu) 813	AY328120
拉萨雪兔子 <i>S. kingii</i> C. E. C. Fisch.	西藏堆龙德庆 Doilungdê, Xizang	刘建全 (J. Q. Liu) 1104	AY328091
肉叶雪兔子 <i>S. thomsonii</i> C. B. Clarke	青海乌兰 Ulan, Qinghai	武素功 (S. G. Wu) k-784	AY328103
星状雪兔子 <i>S. stella</i> Maxim.	青海玉树 Yushu, Qinghai	刘建全 (J. Q. Liu) 856	AY328110
真雪兔子组 Sect. Eriocoryne (DC.) Kitam.			
昆仑雪兔子 <i>S. depxiangensis</i> Pamp.	青海称多 Chindu, Qinghai	刘建全 (J. Q. Liu) 839	AY328107
鼠麴雪兔子 <i>S. gnaphalodes</i> (Royle) Sch.-Bip.	青海称多 Chindu, Qinghai	刘建全 (J. Q. Liu) 837	AY328106
水母雪兔子 <i>S. medusa</i> Maxim.	青海湟源 Huangyuan, Qinghai	刘建全 (J. Q. Liu) 800	AY328102
齿冠亚属 Subgen. Florovia (DC.) Lipsch.			
青海风毛菊 <i>S. qinghaiensis</i> S. W. Liu & T. N. Ho	青海玉树 Yushu, Qinghai	魏振铎 (Z. D. Wei) 22470	AY328123
风毛菊亚属 Subgen. Saussurea			
风毛菊组 Sect. Saussurea			
渐尖风毛菊 <i>S. acuminata</i> Turcz. ex Fisch. & Mey.	青海互助 Huzhu, Qinghai	刘建全 (J. Q. Liu) 001	AY328127
长毛风毛菊 <i>S. hieracioides</i> Hook. f.	西藏曲松 Qusum, Xizang	刘建全 (J. Q. Liu) 1150	AY328117
打箭风毛菊 <i>S. tatsienensis</i> Franch.	四川白玉 Baiyù, Sichuan	刘建全 (J. Q. Liu) 669	AY328118
类似打箭风毛菊 <i>S. cf. tatsienensis</i> Franch.	青海囊谦 Nangqian, Qinghai	刘建全 (J. Q. Liu) 1002	AY328131
类似打箭风毛菊 <i>S. cf. tatsienensis</i> Franch.	青海囊谦 Nangqian, Qinghai	刘建全 (J. Q. Liu) 1016	AY328132
类似打箭风毛菊 <i>S. cf. tatsienensis</i> Franch.	青海巴青 Baqing, Qinghai	刘建全 (J. Q. Liu) 1077	AY328130
类似打箭风毛菊 <i>S. cf. tatsienensis</i> Franch.	西藏昌都 Qamdo, Xizang	刘建全 (J. Q. Liu) 1233	AY328129
美丽风毛菊 <i>S. superba</i> Anth.	青海治多 Zhidoi, Qinghai	刘建全 (J. Q. Liu) 929	AY328111
湿地风毛菊 <i>S. umbrosa</i> Kom.	青海互助 Huzhu, Qinghai	刘建全 (J. Q. Liu) 009	AY328125
小花风毛菊 <i>S. parviflora</i> (Poir.) DC.	青海互助 Huzhu, Qinghai	刘建全 (J. Q. Liu) 006	AY328124

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.
纤维组 Sect. Lagurathera (C. A. Mey. ex Endl.) Lipsch.			
达乌里风毛菊 <i>S. davurica</i> Adams	青海格尔木 Golmud, Qinghai	刘建全 (J. Q. Liu) 692	AY328101
全叶组 Sect. Pycnocephala Lipsch.			
西藏风毛菊 <i>S. tibetica</i> C. Winkl.	青海玛多 Madoi, Qinghai	刘建全 (J. Q. Liu) 826	AY328116
异色风毛菊 <i>S. brunneopilosa</i> Hand. - Mazz.	青海曲麻莱 Qumarl 尕, Qinghai	刘建全 (J. Q. Liu) 962	AY328113
无茎组 Sect. Acaules C. B. Clarke			
漂亮风毛菊 <i>S. bella</i> Ling	青海称多 Chindu, Qinghai	刘建全 (J. Q. Liu) 852	AY328108
重齿风毛菊 <i>S. katochaete</i> Maxim.	西藏昌都 Qamdo, Xizang	刘建全 (J. Q. Liu) 1258	AY328100
重齿风毛菊 <i>S. katochaete</i> Maxim.	青海治多 Zhidoi, Qinghai	刘建全 (J. Q. Liu) 935	AY328119
钻苞风毛菊 <i>S. subulata</i> C. B. Clarke	青海玛多 Madoi, Qinghai	刘建全 (J. Q. Liu) 814	AY328104
羽裂组 Sect. Cyathidium (Lindl. ex Royle) Ling			
革苞风毛菊 <i>S. coriacea</i> Y. L. Chen & S. Y. Liang	青海囊谦 Nangq 尕, Qinghai	刘建全 (J. Q. Liu) 1008	AY328093
康定风毛菊 <i>S. ceterach</i> Hand. -Mazz.	西藏加查 Gyaca, Xizang	刘建全 (J. Q. Liu) 1159	AY328095
水龙骨风毛菊 <i>S. polypodioides</i> Anth.	青海囊谦 Nangq 尕, Qinghai	刘建全 (J. Q. Liu) 1017	AY328094
弯齿风毛菊 <i>S. przewalskii</i> Maxim.	西藏江达 Jomda, Xizang	刘建全 (J. Q. Liu) 1266	AY328098
云南风毛菊 <i>S. yunnanensis</i> Franch.	西藏昌都 Qamdo, Xizang	刘建全 (J. Q. Liu) 010	AY328126
皱果风毛菊 <i>S. rhytidocarpa</i> Hand. -Mazz.	青海曲麻莱 Qumarl 尕, Qinghai	刘建全 (J. Q. Liu) 972	AY328114
附片亚属 Subgen. Theodorea (Cass.) Lipsch.			
附片组 Sect. Theodorea			
抱茎风毛菊 <i>S. chingiana</i> Hand. -Mazz.	青海互助 Huzhu, Qinghai	刘建全 (J. Q. Liu) 004	AY328122
草地风毛菊 <i>S. amara</i> (L.) DC.	青海互助 Huzhu, Qinghai	刘建全 (J. Q. Liu) 002	AY328121
京风毛菊组 Sect. Maritimae (Nakai) Lipsch.			
钻状风毛菊 <i>S. nematolepis</i> Ling	青海囊谦 Nangq 尕, Qinghai	刘建全 (J. Q. Liu) 1003	AY328092
雪莲亚属 Subgen. Amphilaena (Stschegl.) Lipsch.			
假雪莲组 Sect. Pseudoamphilaena Lipsch.			
多鞘雪莲 <i>S. polycolia</i> Hand. -Mazz.	青海玛多 Madoi, Qinghai	刘建全 (J. Q. Liu) 824	AY328128
尖苞雪莲 <i>S. polycolia</i> Hand. -Mazz. var. <i>acutisquama</i> (Ling) Lipsch.	青海治多 Zhidoi, Qinghai	刘建全 (J. Q. Liu) 931	AY328112

表 1 (续) Table 1 (continued)

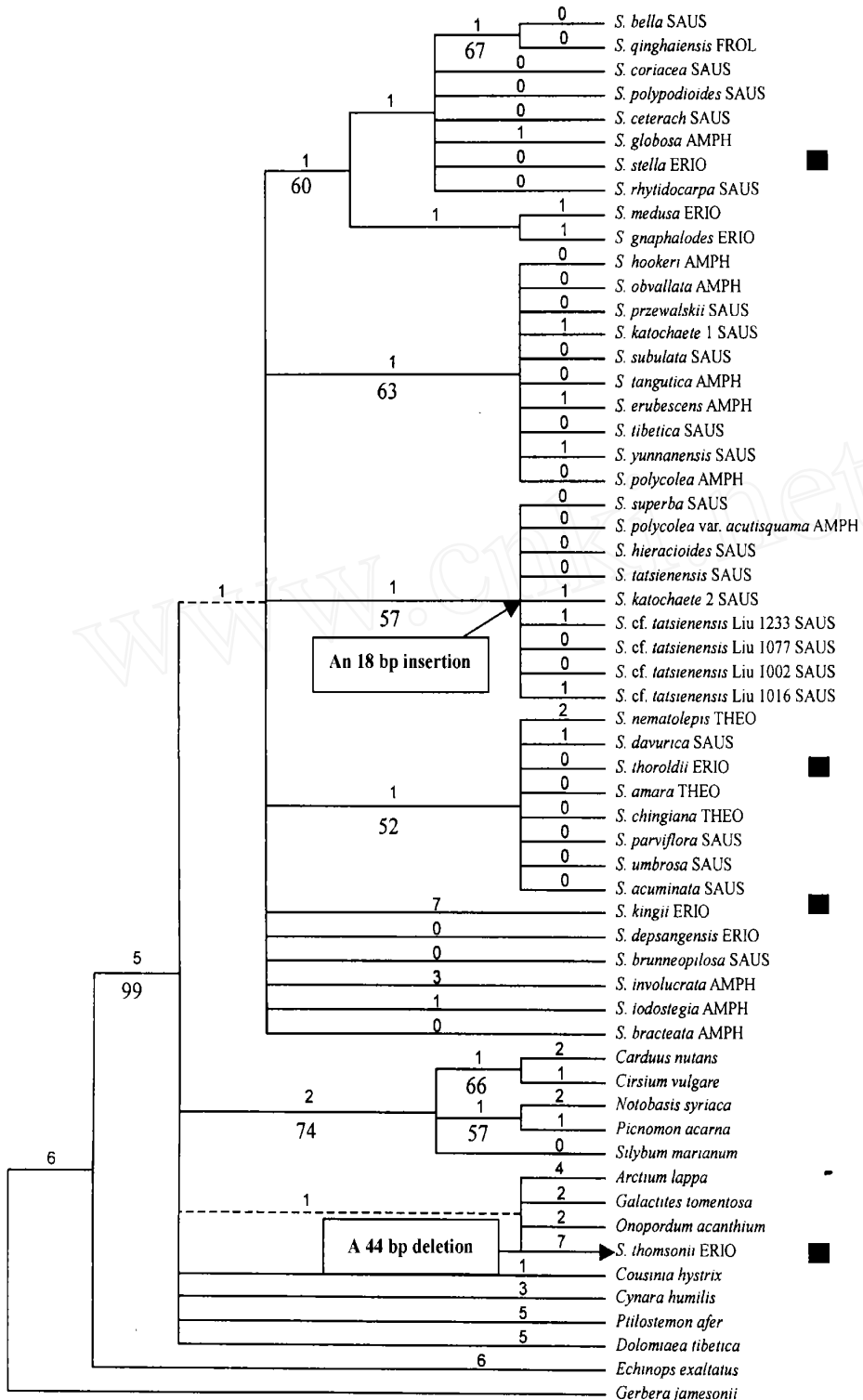
分类群 Taxon	采集地 Locality	凭证标本 Voucher*	序列号 GenBank Acc. No.
真雪莲组 Sect. Amphilaena			
苞叶雪莲 <i>S. obvallata</i> (DC.) Edgew.	西藏江达 Jomda, Xizang	刘建全 (J. Q. Liu) 1265	AY328097
红柄雪莲 <i>S. erubescens</i> Lipsch.	青海玉树 Yushu, Qinghai	刘建全 (J. Q. Liu) 855	AY328109
膜苞雪莲 <i>S. bracteata</i> Decne.	青海玛多 Madoi, Qinghai	刘建全 (J. Q. Liu) 808	AY328134
球花雪莲 <i>S. globosa</i> Chen	青海江达 Jomda, Xizang	刘建全 (J. Q. Liu) 1267	AY328099
唐古特雪莲 <i>S. tangutica</i> Maxim.	青海称多 Chindu, Qinghai	刘建全 (J. Q. Liu) 834	AY328105
椭圆苞雪莲 <i>S. hookeri</i> C. B. Clarke	西藏丁青 Dingqing, Xizang	刘建全 (J. Q. Liu) 1255	AY328096
雪莲花 <i>S. involucrata</i> (Kar. & Kir.) Sch.-Bip.	新疆, 具体地点不详 without precise locality, Xinjiang	刘建全 (J. Q. Liu) 005	AY328115
紫苞雪莲 <i>S. iodostegia</i> Hance	青海互助 Huzhu, Qinghai	刘建全 (J. Q. Liu) 003	AY328133
<i>Arctium lappa</i> L.		from GenBank	AF129824
<i>Carduus nutans</i> L.		from GenBank	AF129825
<i>Cirsium vulgare</i> (Savi.) Ten.		from GenBank	AF129826
<i>Cousinia hystrix</i> C. B. Clarke		from GenBank	AF129827
<i>Cynara humilis</i> Linn.		from GenBank	AF129829
西藏川木香 <i>Dolomiaea tibetica</i> S. W. Liu & J. Q. Liu	西藏桑日 Sangri, Xizang	刘建全 (J. Q. Liu) 1137	AY330342
<i>Echinops exaltatus</i> Schrad.		from GenBank	U82030, U82031
<i>Galactites tomentosa</i> Moench.		from GenBank	AF129831
<i>Gerbera jamesonii</i> Bolus ex Hook		from GenBank	U82036, U82037
<i>Notobasis syriaca</i> Cass.		from GenBank	AF129832
<i>Onopordum acanthium</i> L.		from GenBank	AF129833
<i>Picnomon acarna</i> (L.) Cass.		from GenBank	AF129834
<i>Ptilostemon efer</i> (Jacq.) Greuter		from GenBank	AF129835
<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.		from GenBank	AF129836

* 凭证标本均存放在中国科学院西北高原生物研究所植物标本馆 (HNWP)。

All the vouchers are preserved in herbarium of Northwest Plateau Institute of Biology, the Chinese Academy of Sciences (HNWP).

风毛菊、水龙骨风毛菊与革苞风毛菊, 尖苞雪莲、美丽风毛菊、长毛风毛菊、重齿风毛菊的一个居群 Liu 935、打箭风毛菊及两个类似打箭风毛菊的居群 Liu 1002 和 Liu 1077, 椭圆苞雪莲、苞叶雪莲、弯齿风毛菊、唐古特雪莲、西藏风毛菊、钻苞风毛菊与多鞘雪莲, 水母雪兔子与鼠麴雪兔子, 青海风毛菊与漂亮风毛菊, 以及膜苞雪莲、异色风毛菊与昆仑雪兔子之间。最大的碱基变异是 1.808%, 在假雪兔子组的两个种——拉萨雪兔子与肉叶雪兔子之间。

当空位作缺失处理时, 变异位点仅为 82 个, 其中信息位点 21 个, 占总长的 2.444%。启发式搜索得到位于一个岛屿中的 7 个最简约树, 其中的一个如图 1 所示, $CI = 0.943$; $RI = 0.935$; 步长 = 88。该简约树中在严格一致树中不存在的分支用虚线表示, 各分支长度



和 bootstrap 值也分别标记在该图上。利用邻接法构建的发育树见图 2。两个树在主要的分支上没有区别。序列完全相同的种类在两个树上基本上都构成一个内部单系分支,但膜苞雪莲、异色风毛菊与昆仑雪兔子并未组成一个独立的分支,这是因为它们之间不存在一个共同的区别于其余物种的碱基变异位点。肉叶雪兔子在简约性分析的 7 个最简约树中,4 次与其他属相结合,3 次与风毛菊属的种类结合在一起,但位于基部;在邻接树中,位于风毛菊属所有种类的基部。

尖苞雪莲、长毛风毛菊、美丽风毛菊、重齿风毛菊的一个居群 Liu 935、打箭风毛菊及一些类似打箭风毛菊的个体 Liu 1002、Liu 1016、Liu 1077 与 Liu 1233 在 *trnL* 内含子区共有一段长达 18 个碱基“TATCGAACTTCATAAAA”的插入,这段序列支持它们作为一个单系群。*Carduus nutans*、*Cirsium vulgare* 和 *Silybum marianum* 3 个种在该区还有一段“CAAA”的缺失。肉叶雪兔子在 *trnL/F* 间隔区具有一段“CTTATCACATGTGATATATGATACATGTAACAAATGAACATCT”长达 44 个碱基的缺失,这一段缺失是目前在菊科该 DNA 片段区域中发现的最长缺失之一(Bayer & Starr, 1998)。这一缺失支持该种的孤立位置。西藏川木香在该区具有一个 21 bp “ACCATTCACTACTCTTTATAC”的插入;*Gerbera jamesonii* 有两个 1 bp 的插入,*Notobasis syriaca* 具有一个 1 bp 的插入;*Arctium lappa*、*Carduus nutans*、*Echinops exaltatus*、*Gerbera jamesonii*、*Notobasis syriaca* 和 *Ptilostemon afer* 共同拥有 1 - 9 bp 的 4 个缺失。

利用分子序列探讨菊科属内系统发育的研究,普遍存在内部分支分辨率和支持率较低的状况(Fernández et al., 2001; Garcia-Jacas et al., 2000, 2001, 2002; Vilatersana et al., 2000)。风毛菊属分支图内部的分辨率较低,主要是由于碱基变异太少所造成。菊科的其他属则主要是由于自征变异较多,而具有信息位点的变异较少造成的(Garcia-Jacas et al., 2000, 2002; Vilatersana et al., 2000)。与这些文献相比较,我们这里分析所得到的风毛菊属分支图中,*CI* 和 *RI* 值较高,树的拓扑结构相对稳定;尽管支持率存在同样较低的状况,但这些分支内部的大部分种类拥有相同的序列,因而这些分支的可信度较高,从中获得的信息对所讨论的问题具有较高的支持程度。

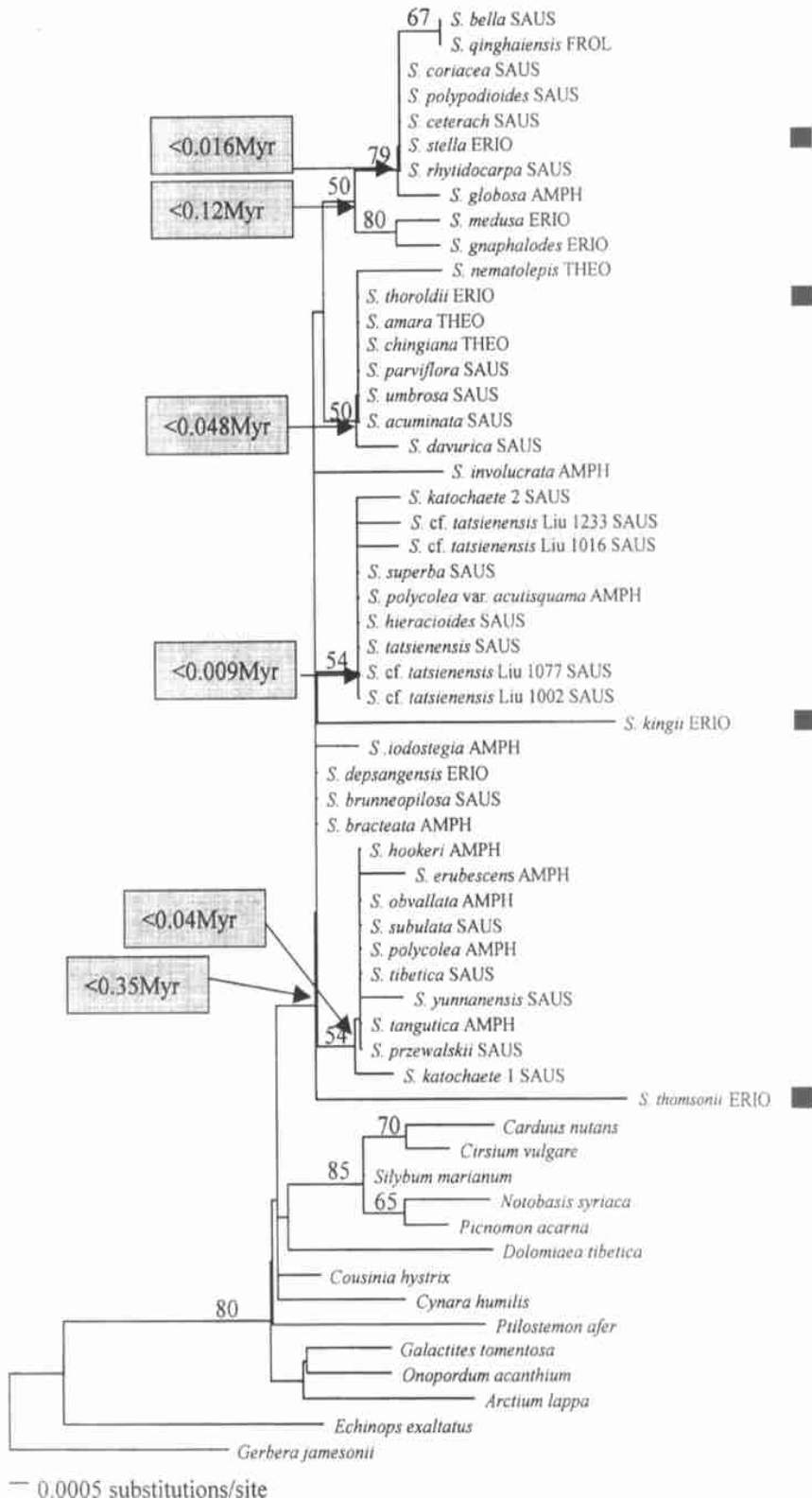
3 讨 论

3.1 拥有 18 bp 插入种类之间的演化关系

多鞘雪莲变种尖苞雪莲、长毛风毛菊、美丽风毛菊、重齿风毛菊的一个居群Liu 935、

图 1 7 个最简约树之一 (length = 88; *CI* = 0.943; *RI* = 0.935)。每个种名后的 ERIO、AMPH、SAUS、FROL 和 THEO 分别代表雪兔子亚属、雪莲亚属、风毛菊亚属、齿冠亚属和附片亚属。每一支上下数字代表的分别为支长和 bootstrap 支持。虚线表示该分支在严格一致树不存在。黑体方块表示植株无明显的茎,叶呈莲座状、铺地,头状花序在莲座状叶丛中形成球形或者半球形的总花序趋同性状。

Fig. 1. One of seven equally parsimonious trees (length = 88; *CI* = 0.943; *RI* = 0.935) from analysis of *trnL-F* sequence data of *Saussurea* species and genera in the Cardueae. ERIO, AMPH, SAUS, FROL and THEO following each species name are abbreviations of *Saussurea* subgen. *Eriocoryne*, subgen. *Amphilaena*, subgen. *Saussurea*, subgen. *Floronia* and subgen. *Theodorea* respectively. Numerals above and below branches indicate branch length and bootstrap support. Dashed lines denote branches that collapse in the strict consensus tree. Solid bars indicate convergent evolution of the acaulescence and the synflorescence with congested capitula in the rosette and prostrate leaves.



打箭风毛菊及一些类似打箭风毛菊的个体 Liu 1002、Liu 1016、Liu 1077 与 Liu 1233 在 *trnL* 内含子区共有一段长达 18 个碱基的插入。这一插入在所有已测序菜蓟族种类中十分独特,我们推测应当是一次进化事件的结果。但多鞘雪莲的原变种无此插入,却与来自雪莲亚属和风毛菊亚属的部分种类有相同的序列,结合为一单系支。尖苞雪莲与其原变种多鞘雪莲的区别仅在于它的总花序由 2 - 3 个头状花序组成,全部总苞片顶端急尖。由于菊科中杂交和网状进化频繁(Jansen & Kim, 1996),尖苞雪莲拥有这一特殊序列可能是由于杂交而导致不同的单倍性在该种中存在。当然,这一推论还需要从其他证据获得支持,即利用其他遗传途径的分子序列证实尖苞雪莲与其原变种确实是一姊妹群。重齿风毛菊的形态特征也完全不同于美丽风毛菊、长毛风毛菊等种,因为该种外层冠毛下翻,叶两面异色,上面绿色,无毛,下面白色,被稠密的白色绒毛,侧脉多对,在下面突起。我们检查了重齿风毛菊的两个居群(每一居群仅检查了 1 个个体,下同)的 *trnL-F* 序列,其中 Liu 935 居群具有该插入,而另一居群却无此插入。因此,该种植物两种完全不同的序列也可能是由于杂交而导致不同的单倍性存在。这种不完全的谱系筛选(incomplete lineage sorting),即通过多次物种进化事件后,当两个物种接触后仍能通过杂交带(hybridization zone)造成单倍性局部渗入,或者保留物种杂交起源时其祖先的遗传单倍性(Adviser, 1994, 2000),在杂交网状进化十分突出、物种分化时间十分晚的菊科近缘种复合体中经常发现(Comes & Abbott, 2001)。但是,我们还不能完全确定这两种植物中的单倍性渗入是由于它们本身是杂交起源而导致的单倍性保留,还是这两个物种与打箭风毛菊复合体的居群接触后形成杂交带而导致的局部单倍性渗入。将来有必要对这些物种不同分布地域的居群进行群体取样,检查其单倍性分布状况。

美丽风毛菊在《中国植物志》上归入长毛风毛菊(石铸,靳淑英,1999),但我们的野外考察发现长毛风毛菊、美丽风毛菊和打箭风毛菊等种类外形上十分类似,且在叶两面和茎上被毛的多少、毛的长短,以及叶缘是否具齿及缘毛、总苞片颜色和被毛状态等形态特征上变化十分复杂,即使在一个居群内也存在部分形态特征的连续变异。如果将头状花序多于 1 个的标本独立为打箭风毛菊,可能依据叶全缘、有白色密缘毛,总苞片黑紫色、无毛建立的美丽风毛菊也应当成立;否则,将这一复合体作为一个种处理更为合适;它们拥有相同的 *trnL-F* 序列也支持这种处理。即使按照细分原则,也极难将我们考察收集的居群标本划分到某一种中,如 Liu 1002、Liu 1016、Liu 1077、Liu 1233 等居群中主要是多头花序,但也存在单头花序,且在叶形态和被毛状况上更类似美丽风毛菊,我们暂把这些居群作为打箭风毛菊的类似种处理。此外,根据我们室内的标本研究,这一复合体还包括雅龙江风毛菊 *S. hultenii* Lipsch.、*S. villosa* Franch. 等种类。因此,该复合体的物种分化和分类处

图 2 邻接系统发育树。每个种名后的 ERIO、AMPH、SAUS、FROL 和 THEO 分别代表雪兔子亚属、雪莲亚属、风毛菊亚属、齿冠亚属和附片亚属。每一支上的数字代表 bootstrap 支持。黑体方块表示植株无明显的茎,叶呈莲座状、铺地,头状花序在莲座状叶丛中形成球形或者半球形的总花序趋同性状。每一分支粗略估测的分化时间用浅淡色方块表示。
Fig. 2. Neighbor-joining phylogeny under Kimura's two-parameter from analysis of *trnL-F* sequence data of *Saussurea* and genera in the Cardueae. ERIO, AMPH, SAUS, FROL and THEO following each species name are abbreviations of *Saussurea* subgen. *Eriocoryne*, subgen. *Philolaena*, subgen. *Saussurea*, subgen. *Florovia* and subgen. *Theodora* respectively. Numerals above branches indicate bootstrap support. Solid bars indicate convergent evolution of the acaulescence and the synflorescence with congested capitula in the rosette and prostrate leaves. Pale bars indicate the crudely estimated divergence time.

理还有待于进一步研究。

3.2 假雪兔子组的多系性质和形态性状的趋同进化

我们的研究表明雪兔子亚属假雪兔子组是一多系群,其所含的4种植物在分支图上没有亲缘关系。肉叶雪兔子在所有分析树上始终是位于风毛菊树种类之外,或者是基部分支,或者与其他属相结合;该种发现的长达44 bp的缺失也表明该种的孤立位置。拉萨雪兔子在所有简约性分支图上也始终是风毛菊属内一独立的分支。拉萨雪兔子二年生的生活习性和近木质化的根在其原来所在的雪兔子属中比较特殊,但在风毛菊亚属的一些种中也存在这一性状。总苞具有附片,也发现于附片亚属的植物中,但这两类附片的形态不一样。拉萨雪兔子的瘦果被蛛丝状毛和横皱纹,这两个性状单独存在于漂亮风毛菊与革苞风毛菊等种中。由于菊科分类性状的缺乏,经常使用系列性状组合作为分类和系统发育的判断标准(Bremer, 1994),拉萨雪兔子的这些性状组合在整个风毛菊属中十分特殊。星状雪兔子和皱果风毛菊、康定风毛菊、水龙骨风毛菊及革苞风毛菊的序列完全相同,它们与雪兔子亚属的水母雪兔子和鼠麴雪兔子组成一支,位于分支图的顶端。草甸雪兔子和草地风毛菊、渐尖风毛菊、湿地风毛菊、小花风毛菊及抱茎风毛菊的序列完全相同,它们与钻状风毛菊、达乌里风毛菊组成一支,这些种类分别来自雪莲亚属、风毛菊亚属和附片亚属。

假雪兔子组的4种植物拥有如下共同的特征:植株无明显的茎,叶呈莲座状、铺地,头状花序在莲座状叶丛中形成球形或者半球形的总花序(Lipschitz, 1979)。这4种植物的非单系性质说明这些形态特征的相似性是由于趋同进化所造成的。因为这些特征也存在于高山植物的其他科中,曾被作为科间趋同进化、适应于高山环境的一种特殊相似形态反复指出过(Ohba & Malla, 1988; Körner, 1999)。但是,在属内具有这类相似形态的种类一般认为来自同一祖先,因为它们经常作为一个单独的自然分类等级来处理,如柳属中的青藏垫柳组 *Salix* L. sect. *Lindleyanae* Schneid. (周以良等, 1984)、杜鹃属杜鹃组中的高山杜鹃亚组 *Rhododendron* L. sect. *Rhododendron* (Balf. f.) Sleumer subsect. *Laponica* (方瑞征, 1999)、点地梅属中的高山组 *Androsace* L. sect. *Chamaejasme* Koch. (杨永昌, 黄荣富, 1990)、虎耳草属山羊臭组中的莲座状亚组 *Saxifraga* Tourn. ex L. sect. *Ciliatae* Haw. subsect. *Rosulares* Gornall (潘锦堂, 1992)等。高山植物这种属内种间的形态趋同进化长期被忽视的主要原因之一,是因为没有相对独立的证据来证实。依据形态讨论形态的演化趋势和种间关系时,对于这种形态上本身经历了趋同进化的类群来说,十分不利,经常陷入循环论证的“泥潭”,很容易得出错误的结论(Kadereit, 1994; 刘建全, 2002)。初步的 *trnL-F* 序列分析发现外部形态相似的假雪兔子组4种植物来源于不同的祖先,尽管这一结论还需要进一步验证,因为分支内部的支持率还不是很高,但这一结果无疑表明高山植物属内依据类似趋同性状划分的自然分类群有必要检验其单系起源性质。

3.3 风毛菊属的单系性质和属下分类系统

此次研究种类分别代表了风毛菊属的5个亚属12个组,基本覆盖了该属的形态范围。菊科中大属范围总是存在界定困难、属间界限模糊等问题(Bremer, 1994),已有的研究发现,很多大属都不是单系发生群,如千里光属(Pelser et al., 2002)。我们的研究结果表明所分析的风毛菊属种类在菜蓟族中形成一个单系群没有得到有力支持;其中肉叶雪

兔子的系统位置最为独特,它似乎应单独成支,或者与 *Arctium* L. 等 3 属有一定的联系。此外,与该属在形态特征上过渡的一些属,如苓菊属、球菊属 *Bolocephalus* Hand.-Mazz. 和毛蕊菊属 *Pilosomon* Iljin 等,目前还没有分子数据,限制了和风毛菊属种类的一起分析。特别是苓菊亚属两个种的系统位置值得研究,因为 Lipschitz (1979) 把它们作为风毛菊属的一个亚属来处理时,也指出这两个种是否应归入风毛菊属、苓菊属或者成立为一个单独的属,根据其过渡特征不能明断。此外,风毛菊属取样的种类还相对较少,该属的范围还需要从该属和其邻近属选择更为广泛的代表类群进行分支分析,才能得出可靠的结论。

我们的研究结果表明雪兔子亚属、雪莲亚属和风毛菊亚属都不是单系群。雪兔子亚属除前面讨论的假雪兔子组以外,本研究还包括 3 种:水母雪兔子、鼠麴雪兔子与昆仑雪兔子。它们属于真雪兔子组,整个植株被厚毛;但是水母雪兔子被绵毛,而另外两种植物被绒毛。但序列分析结果表明:水母雪兔子和鼠麴雪兔子拥有完全相同的序列,而昆仑雪兔子却与膜苞雪莲、异色风毛菊两个来自雪莲亚属和风毛菊亚属的种类拥有完全一致的序列。很显然,以被毛建立的真雪兔子组也不是单系群。雪莲亚属的主要特征是有色苞片;如图 1 和图 2 所示,所测的种类位于 3 个分支上或者独立为支,部分物种与雪莲亚属和风毛菊亚属的种类具有完全相同的序列。由于雪兔子亚属和雪莲亚属的种类分别与风毛菊亚属的种类组合成分支,而造成风毛菊属下种类丰富的 3 个亚属的分类界限都不清楚。属于齿冠亚属具有齿冠的青海风毛菊与漂亮风毛菊具有完全相同的序列,且位于分支顶端(图 1, 2);来自附片亚属的 3 个种:钻状风毛菊、草地风毛菊、抱茎风毛菊与来自雪兔子亚属的草甸风毛菊以及风毛菊亚属的渐尖风毛菊、湿地风毛菊和小花风毛菊拥有相同或者相似的序列,组成一支。风毛菊属属内亚属的界定同假雪兔子组相似,可能都是依据具有趋同进化历史的性状建立的;这一推测还有待在每一个亚属内选取更多的种类、利用分辨率更高的基因或者 DNA 片段序列进行研究。

千里光属是菊科、或者整个被子植物中发现的分子证据与形态分类极不吻合的一个属(Bain & Golden, 2000), Pelser 等(2002)所研究的组级分类中,只有极少数形态界定的组得到了分子证据的支持。我们初步的研究结果表明根据形态上划分的风毛菊属属下分类等级几乎没有一个能得到分子证据的支持。一个类群理想的分类系统应当反映其系统发育关系(Davis & Heywood, 1963),这也是植物分类学家毕生的追求。但是,对于这种形态经历了趋同进化、物种之间杂交与网状进化十分频繁、而种类多样化又是在极短时间内完成的属来说,如果在系统发育的基础上建立分类系统必将增加分类系统在实际应用鉴定中的困难。这种情况普遍存在于菊科的属下分类中(Pelser et al., 2002)。风毛菊属中莲座状形态和苞片性状是十分容易鉴别和归类的特征,但这些特征在科级水平肯定是趋同进化造成的。如果再进一步证实在属下也是如此,这些类群属内分类系统的建立将不得不依赖更加微小的特征。

3.4 风毛菊属物种的快速分化和 *trnL-F* 序列在该属系统学研究中的局限性

尽管利用分子进化速率来标记物种分化的准确时间还存在争议(Wilson et al., 1990; Gaut et al., 1992, 1993),但分子变异越小,物种分化的时间越晚已成了共识(Li, 1997)。DNA 序列差异仍广泛用于估计一个地区特征性植物物种多样化的大概历史时期(Richardson et al., 2001a, b)。风毛菊属的大部分种类产于青藏高原及其邻近地区,是该地区物种

多样化最为丰富的属之一。Richardson et al. (2001a) 总结了 *tml*-F 序列在被子植物各类群中的分子进化速率, 0.86 %/Myr - 1.64 %/Myr; 根据草本物种的 1.64 %/Myr 进化速率, 利用 Mega 2.0 程序 (Kumar et al., 2001) 估测我们所测风毛菊属种类物种分化的时间, 发现物种的分化时间在 30 万年内 (种间非匀速进化在此未考虑), 绝大部分物种的分化时间晚于 2 万年 (图 2)。我们必须指出这种估测十分不精确 (Richardson et al., 2001a), 因为在分支内不仅存在种间非匀速进化 (如拉萨雪兔子显然存在由于二年生的生活习性造成其分子进化快于多年生类群, 从而具有较长的分支长度), 而且不同类群、不同地区分子进化速度存在差异 (Wilson et al., 1990; Gaut et al., 1992, 1993)。但是这里估测的时间主要与青藏高原历史时期的环境变迁相比较, 该地区几个重要环境转折点之间的时间幅度显然大于估测误差。

关于青藏高原隆起的时间和幅度, 至今还存在争议。自印度板块和亚洲大陆碰撞连接之后, 高原隆起的历史也是复杂多变的, 可分为几个大的阶段, 大约从 4000 万年前开始 (Chung et al., 1998)。第一次隆升是 3000 万年至 4000 万年前, 上升 2000 m 左右, 后又因侵蚀而降低; 到 2000 万年前第二次上升; 到 1200 万年前喜马拉雅山再次上升, 接着下降, 但并未波及整个高原, 最后到 300 万年至 400 万年前青藏高原整体才强烈上升, 并延续到 170 万年左右; 最后一次隆升才彻底改变了该地区的水系, 导致亚洲季风气候的形成, 从而彻底改变了该地区的整体环境。这一观点得到了古生物以及冰川研究的支持 (Shi et al., 1998)。最近, An 等 (2001) 从亚洲季风形成的年代研究角度同样证实了这一推论。然而, Harrison 等 (1992) 认为 700 万年至 800 万年前青藏高原就已经达到目前的高度。特别是 Guo 等 (2002) 的秦安黄土剖面研究结果, 暗示高原南部的山地已在 2200 万年前已达到相当的高度, 其高度和规模足以阻挡来自海洋的水汽和改变大气环流, 为青藏高原的隆升提供了独立的看法。第四纪冰期始于大约 250 万年, 冰期与间冰期的反复交错却一直延续到 1 万年左右 (Shi et al., 1998)。同样属于菊科的毛冠菊属 *Nannoglottis* Maxim. 的 *tml*-F 碱基种间变异大于风毛菊属, 物种之间的分化时间也早于该属: 该属内物种的一次分歧大约在 340 万年左右, 与绝大多数中国学者认为高原的第一次大规模隆升时间基本相吻合; 而该属多数物种的分化是在 100 - 200 万年间 (Liu et al., 2002)。但对于风毛菊属来说, 本文的研究结果表明可能高原隆升 (无论是那一种观点) 对其物种分化的影响较小, 而近期冰期 - 间冰期的气候变化对该属的物种多样化起主导作用。

由于风毛菊属物种分化时间较晚, 从而造成分子 *tml*-F 碱基变异较少, 有系统学分析意义的信息位点缺乏。初步的研究结果发现多数内部分支不能得到有效支持和分辨。我们正在利用变异速率较快的 ITS 序列, 进行该属的系统发育重建。但正如 Comes 和 Abbott (2001) 所指出的, 对于这种分化时间非常晚的类群, 其 DNA 序列碱基的分化较小, 常规类群适用的基因或者 DNA 片段均无效, 而用于探讨种类变异的分子标记, 如 RAPD、SSR 和 AFLP 等才能更为有效地建立起这些类群的种间系统发育关系。此外, 本研究发现风毛菊属物种的遗传分化非常小, 时间非常短, 这种形态上的快速分化是否导致“生殖隔离”, 即目前根据形态上确认的“种”是否应该成立, 是值得深入研究的课题。

致谢 感谢刘尚武和潘锦堂两位教授协助鉴定标本和对部分标本具体种名的讨论。

参 考 文 献

- Advise J C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. New York: Chapman & Hall Press.
- Advise J C. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. MA, Cambridge: Harvard University Press.
- An Z S, Kutzbach J E, Prell W L, Port S C. 2001. Evolution of Asian monsoons and phased uplift of the Himalayan-Tibetan plateau since late Miocene times. *Nature* 411: 62 - 66.
- Bain J F, Golden J L. 2000. A phylogeny of *Packeria* (Senecioneae; Asteraceae) based on internal transcribed spacer region sequence data and a broad sampling of outgroups. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 16: 331 - 338.
- Bayer R J, Puttock C F, Kelchner S A. 2000. Phylogeny of South African Gnaphalieae (Asteraceae) based on two noncoding chloroplast sequences. *American Journal of Botany* 87: 259 - 272.
- Bayer R J, Starr J R. 1998. Tribal phylogeny of the Asteraceae based on two non-coding chloroplast sequences, the *tmL* intron and *tmL/tmF* intergenic spacer. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 85: 242 - 256.
- Bohs L, Olmstead R G. 1997. Phylogenetic relationships in *Solanum* (Solanaceae) based on *ndhF* sequences. *Systematic Botany* 22: 5 - 17.
- Bremer K. 1994. *Asteraceae: Cladistics and Classification*. Portland: Timber Press.
- Chung S L, Lo C H, Lee T Y, Zhang Y Q, Xie Y W, Li X H, Wang K L, Wang P L. 1998. Diachronous uplift of the Tibetan plateau starting 40 Myr ago. *Nature* 394: 769 - 773.
- Comes H P, Abbott R J. 2001. Molecular phylogeography, reticulation, and lineage sorting in Mediterranean *Senecio* sect. *Senecio* (Asteraceae). *Evolution* 55: 1943 - 1962.
- Chou Y L (周以良), Fang C-F (方振富), Zhao S-D (赵士洞), Yu C-Y (于兆英), Yang C-Y (杨昌友), Chao N (赵能). *Salix* L. In: *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* (中国植物志). Beijing: Science Press. 20 (2): 95 - 380.
- Davis P H, Heywood V H. 1963. *Principles of Angiosperm Taxonomy*. Edinburgh and London: Oliver & Boyd.
- Dittrich M. 1977. Cynareae—Systematic review. In: Heywood V H, Harborne J B, Turner B L eds. *The Biology and Chemistry of the Compositae*. London: Academic Press. 999 - 1015.
- Doyle J J, Doyle J L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material. *Phytochemical Bulletin* 19: 11 - 15.
- Fang R-Z (方瑞征). 1999. *Rhododendron* L. In: *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* (中国植物志). Beijing: Science Press. 57 (1): 19 - 213.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783 - 791.
- Fernández I A, Aguilar J F, Panero J L, Feliner G N. 2001. A phylogenetic analysis of *Doronicum* (Asteraceae, Senecioneae) based on morphological, nuclear ribosomal (ITS) and chloroplast (*tmL-F*) evidence. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20: 41 - 64.
- Francisco-Ortega J, Barber J C, Santos-Guerra A, Febles-Hernández R, Jansen R K. 2001. Origin and evolution of the endemic genera of Gnosperrminae (Asteraceae: Anthemideae) from the Canary Islands: evidence from nucleotide sequences of the internal transcribed spacers of the nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany* 88: 161 - 169.
- Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A, Hines A, Jansen R K. 1997. Molecular evidence for a Mediterranean origin of the Macaronesian endemic genus *Argyranthemum* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 84: 1595 - 1613.
- Gao L-M (高连明), Li D-Z (李德铎), Zhang C-Q (张长芹). 2003. Phylogenetic relationships of *Rhododendron* section *Azaleastrum* (Ericaceae) based on ITS sequences. *Acta Phytotaxonomica Sinica* (植物分类学报) 41: 173 - 179.
- García-Jacas N, Garnatje T, Susanna A, Vilatersana R. 2002. Tribal and subtribal delimitation and phylogeny of the Cardueae (Asteraceae): a combined nuclear and chloroplast DNA analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 22: 51 - 64.
- García-Jacas N, Susanna A, Mozaffarian V, Ilarslan R. 2000. The natural delimitation of *Centaurea* (Asteraceae: Cardueae): ITS sequence analysis of the *Centaurea jacea* group. *Plant Systematics and Evolution* 223: 185 -

199.

- Garcia-Jacas N, Susanna A, Mozaffarian V, Ilarslan R. 2001. Generic delimitation and phylogeny of the subtribe Centraureinae (Asteraceae): a combined nuclear and chloroplast DNA analysis. *Annals of Botany* 87: 503 - 515.
- Gaut B S, Muse S V, Clark W D, Clegg M T. 1992. Substitution rate comparisons between grasses and palms: synonymous rate differences at the nuclear gene *Adh* parallel rate differences at the plastid gene *rbxL*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 93: 10274 - 10279.
- Gaut B S, Muse S V, Clark W D, Clegg M T. 1993. Relative rates of nucleotide substitution in the chloroplast genome. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2: 89 - 96.
- Guo Z T, Ruddiman W F, Hao Q Z, Wu H B, Qiao Y S, Zhu R X, Peng S Z, Wei J J, Yuan B Y, Liu T S. 2002. Onset of Asian desertification by 22 Myr ago inferred from loess deposits in China. *Nature* 416: 159 - 163.
- Häffner E, Hellwig F H. 1999. Phylogeny of the tribe Cardueae (Compositae) with emphasis on the subtribe Carduinae: An analysis based on ITS sequence data. *Willdenowia* 29: 27 - 39.
- Harrison T M, Copeland P, Kidd W S F, Yin A. 1992. Raising Tibet. *Science* 255: 1663 - 1670.
- Huang Y-P (黄运平), Yin Z-T (尹祖棠). 1994. A preliminary study on the micromorphological features of achene surfaces of *Saussurea*. *Bulletin of Botanical Research (植物研究)* 14: 395 - 400.
- Jansen R K, Kim K J. 1996. Implications of chloroplast DNA data for the classification and phylogeny of the Asteraceae. In: Hind D J N, Beentje H J eds. *Compositae: Systematics. Proceedings of the International Compositae Conference, Kew, 1994*. Kew: Royal Botanic Gardens. 1: 317 - 339.
- Kadereit J W. 1994. Molecules and morphology, phylogenetics and genetics. *Botanica Acta* 107: 369 - 373.
- Karis P O, Eldenäs P, Källersjö M. 2001. New evidence for the systematic position of *Gundelia* L. with notes on delimitation of Arctoteae (Asteraceae). *Taxon* 50: 105 - 114.
- Kim H-G, Keeley S C, Vroom P S, Jansen R K. 1998. Molecular evidence for an African origin of the Hawaiian endemic *Hesperomannia* (Asteraceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95: 15440 - 15445.
- Körner C. 1999. *Alpine Plant Life—Functional Plant Ecology of High Mountain Ecosystems*. Berlin: Springer-Verlag.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, Nei M. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software. Tempe, Arizona: Arizona State University.
- Li W-H. 1997. *Molecular Evolution*. Sunderland: Sinauer.
- Lipschitz S. 1979. Genus *Saussurea* DC. (Asteraceae). *Lenipopoli: Lenipopoli Science Press*.
- Liu J-Q (刘建全). 2002. Congruence and incongruence between evidence from molecule and morphology in angiosperm systematics. *Acta Biologica Plateau Sinica (高原生物学集刊)* 15: 1 - 14.
- 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 S-W (刘尚武). 1996. *Saussurea* DC. In: Liu S-W (刘尚武) ed. *Flora Qinghaica (青海植物志)*. Vol. 3. Xining: Qinghai People Press.
- Liu S-W (刘尚武), Chen Y-L (陈艺林), Liang S-Y (梁松筠). 1985. *Saussurea* DC. In: Wu Z Y (吴征镒) ed. *Flora Xizangica (西藏植物志)*. Beijing: Science Press. 1: 601 - 971.
- Maddison D R. 1991. The discovery and importance of multiple islands of most-parsimonious trees. *Systematic Zoology* 40: 315 - 328.
- O' Hanlon P C, Peakall R. 2000. A simple method for the detection of size homoplasy among amplified fragment length polymorphism fragments. *Molecular Ecology* 9: 815 - 816.
- Ohba H, Malla S B eds. 1988. *The Himalayan Plants*. Tokyo: University of Tokyo Press.
- Omori Y, Ohba H. 1996. Pollen development of *Rheum nobile* Hook. f. & Thomson (Polygonaceae), with reference to its sterility induced by bract removal. *Botanical Journal of the Linnean Society* 122: 269 - 278.
- Omori Y, Takayama H, Ohba H. 2000. Selective light transmittance of translucent bracts in the Himalayan giant glasshouse plant *Rheum nobile* Hook. f. & Thomson (Polygonaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*

- 132: 19 - 27.
- Pan J-T (潘锦堂). 1992. *Saxifraga* Tourn. ex L. In: Flora Reipublicae Popularis Sinicae (中国植物志). Beijing: Science Press. 34 (2): 61 - 231.
- Panero J L, Francisco-Ortega J, Jansen R K, Santos-Guerra A. 1999. Molecular evidence for multiple origins of woodiness and a New World biogeographic relationship of the Macaronesian Island endemic *Peicallia* (Asteraceae: Senecioneae). Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 96: 13886 - 13891.
- Park S J, Koronpai E J, Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A, Jansen R K. 2001. Phylogenetic relationships of *Tolpis* (Asteraceae: Lactuceae) based on *ndhF* sequence data. Plant Systematics and Evolution 226: 23 - 33.
- Pelser P B, Gravendeel B, van der Meijden R. 2002. Tackling speciose genera: species composition and phylogenetic position of *Senecio* sect. *Jacobaea* (Asteraceae) based on plastid and nrDNA sequences. American Journal of Botany 89: 929 - 939.
- Petit D P, Mathez J, Qaid A. 1996. Early differentiation of the Cardueae sensu lato: morphology and pollen. In: Hind D J N, Beentje H J eds. Compositae: Systematics. Proceedings of the International Compositae Conference, Kew, 1994. Kew: Royal Botanic Gardens. 1: 79 - 93.
- Richardson J E, Pennington R T, Pennington T D, Hollingsworth P M. 2001a. Rapid diversification of a species-rich genus of neotropical rain forest trees. Science 293: 2242 - 2245.
- Richardson J E, Weitz F M, Fay M F, Cronk Q C B, Linder H P, Reeves G, Chase M W. 2001b. Rapid and recent origin of species richness in the Cape flora of South Africa. Nature 412: 181 - 183.
- Shi Y-F, Li J-J, Li B-Y. 1998. Uplift and Environmental Changes of Qinghai-Tibetan Plateau in the late Cenozoic. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press.
- Shi Z (石铸), Jin S-Y (靳淑英). 1999. *Saussurea* DC. In: Flora Reipublicae Popularis Sinicae (中国植物志). Beijing: Science Press. 78 (2): 1 - 243.
- Starr J R, Ford B A. 2001. The taxonomic and phylogenetic utility of vegetative anatomy and fruit epidermal silica bodies in *Carex* section *Phyllostachys* (Cyperaceae). Canadian Journal of Botany 79: 362 - 379.
- Swofford D L. 2000. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods). Version 4. Sunderland: Sinauer Associates.
- Taberlet P T, Gelly L, Patou G, Bouvet J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. Plant Molecular Biology 17: 1105 - 1109.
- Terashima I, Masuzawa T, Ohba H. 1993. Photosynthetic characteristics of a giant alpine plant, *Rheum nobile* Hook. f. et Thomson and of some other alpine species measured at 4300 m, in the eastern Himalaya, Nepal. Oecologia 95: 194 - 201.
- Terashima I, Masuzawa T, Ohba H, Yokoi Y. 1995. Is photosynthesis suppressed at higher elevations due to low CO₂ pressure? Ecology 76: 2663 - 2668.
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins D G. 1997. The Clustal-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research 25: 4876 - 4882.
- Tsukaya H, Tsuge T. 2001. Morphological adaptation of inflorescences in plants that bloom at low temperature in early spring: the convergent evolution of downy plants. Plant Biology 3: 536 - 543.
- Vilatersana R, Susanna A, Garcia-Jacas N, Garnatje T. 2000. Generic delimitation and phylogeny of the *Carduncellus-Carthus* complex (Asteraceae) based on ITS sequences. Plant Systematics and Evolution 221: 89 - 105.
- Wilson M A, Gaut B, Clegg M T. 1990. Chloroplast DNA evolves slowly in the palm family. Molecular Biology and Evolution 7: 303 - 314.
- Yang Y-C (杨永昌), Huang R-H (黄荣富). 1990. *Androsace* L. In: Flora Reipublicae Popularis Sinicae (中国植物志). Beijing: Science Press. 59 (1): 147 - 201.
- Zhang F-M (张富民), Ge S (葛颂), Chen W-L (陈文俐). 2003. Phylogeny of *Aconitum delavayi* complex (Ranunculaceae) based on evidence from nuclear ribosomal ITS sequences. Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报) 41: 220 - 228.