

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201603011

引文格式: 张华杰, 李庆军. 中甸灯台报春与鹅黄灯台报春的系统演化 [J]. 广西植物, 2017, 37(2): 153-161

ZHANG HJ, LI QJ. Phylogenetic analysis of *Primula chungensis* and *P. cockburniana* [J]. Guihaia, 2017, 37(2): 153-161

中甸灯台报春与鹅黄灯台报春的系统演化

张华杰, 李庆军*

(中国科学院西双版纳热带植物园, 昆明 650201)

摘要: 中甸灯台报春和鹅黄灯台报春在形态上较为相似, 通常被认为是亲缘关系较近的物种。该研究选取核基因 ITS 序列和叶绿体 *trnL-F* 为分子标记, 利用贝叶斯的方法构建系统树, 在用两种分子标记构建的系统树中, 两种报春均以 0.81 的支持率聚成一个分支, 明确了两种报春的姐妹种关系。首先, 通过选取两个物种的五个形态学性状, 进行主成分分析, 聚类结果中两种报春各自的个体分别聚在两块区域, 表明两种报春的形态学性状产生了明显的分化, 且中甸灯台报春的花部各性状值明显大于鹅黄灯台报春, 表明花部综合征和繁育系统间的相关联系。然后, 通过用 8 对 SSR 分子标记对两种报春进行 STRUCTURE 聚类分析, 结果检测 K 的最适值为 2, 此时中甸灯台报春和鹅黄灯台报春的个体各自以不同颜色聚成界限清晰的两块区域, 揭示了两种报春在分子水平上也产生了显著而稳定的分化, 通过 Ima2 软件, 依据叶绿体联合序列, 计算了两种报春的分化时间大约是在更新世, 推测这两个姐妹种的物种分化受更新世气候动荡和一些地质历史事件的影响。最后, 运用 maxent 软件分析两个物种的生态位差异, 结果表明最干季节降水量、年均降水量和季节性降水量对中甸灯台报春的分布有重要影响, 最冷季节平均温度、最干月降水量、年均降水量和季节性降水量对鹅黄灯台报春的分布有重要影响, 两个物种间的生态位产生了分化。由此推测, 这种生态位的差异是物种分化的结果, 同时也是物种间系统演化的重要驱动力。

关键词: 中甸灯台报春, 鹅黄灯台报春, 姐妹种, SSR, 生态位

中图分类号: Q949 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2017)02-0153-10

Phylogenetic analysis of *Primula chungensis* and *P. cockburniana*

ZHANG Hua-Jie, LI Qing-Jun*

(Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China)

Abstract: *Primula chungensis* and *P. cockburniana*, are usually considered as close species for the similar morphological traits. We reconstructed the phylogenetic trees with the Bayesian inference method based on two DNA fragments, the molecular marker we chose was internal transcribed spacer and chloroplast fragment *trnL-F*, among the two phylogenetic trees we reconstructed, *P. chungensis* and *P. cockburniana* got into a branch with 0.81 support, which indicated that *P. chungensis* and *P. cockburniana* were sister species. we also utilized principle component analysis based on five morphological traits, and the two species got into two clusters, which indicated that in term of the morphology, there was significant differentiation between the two species, and this differentiation had an important relationship with the mating

收稿日期: 2016-06-11 修回日期: 2016-07-29

基金项目: 中国和云南省政府自然科学基金(U1202261); 国家自然科学基金项目 Symbol@@@ (31500194); 中国科学院“135”计划项目(XTBG-F01, T01) [Supported by the Joint Funds of the National Science Foundation of China and Yunnan Provincial Government (U1202261); National Natural Science Foundation of China (31500194); “The 13rd Five-Year Plan” of Chinese Academy of Sciences (XTBG-F01, T01)].

作者简介: 张华杰(1990-) 女, 河南周口人, 硕士研究生, 研究方向为植物进化生态学 (E-mail) zhanghuajie@xtbg.ac.cn.

* 通信作者: 李庆军, 博士, 研究员, 研究方向为植物进化生态学 (E-mail) qjli@xtbg.ac.cn.

system, and we discussed the relationship between flora syndrome and breeding system of these two species. We chose eight pairs of SSR primers and sent the polymerase chain reaction production to the company to measure the peak value, according to the analysis of the software STRUCTURE based on the nuclear microsatellite marker, the appropriate value of K was two, the result of structure consisted of two area and with different colors, the red area represented the population of *P. cockburniana*, and the green area represented the populations of *P. chungensis*, which meant that there was significant and stable differentiations between the two species on the molecular level. Then we calculated the differentiation time between the two species with Im2 based on the united chloroplast fragments, which showed turbulent environment and geological and historical accidents in Pleistocene may have an important effect on the differentiation of the two species. Finally we analysed the ecological niches of the two species with the software maxent. The results indicated that the precipitation of the driest quarter, range of annual temperature, isothermality and the annual average precipitation had important effects on the distribution of *P. chungensis*, the mean temperature of the coldest quarter, precipitation of the driest month, annual average precipitation and the precipitation seasonality had an important effect on the distribution of *P. cockburniana*. We speculate that the different ecological niches had been influenced by the phylogenetic evolution of the species, and in turn the different niches can also promote the phylogenetic evolution process.

Key words: *Primula chungensis*, *P. cockburniana*, sister species, SSR, ecological niche

物种形成是基本的进化过程,是指一个物种通过适应不同生境分化出新物种的过程,也是生物多样性产生的基本机制(Craft, 1983)。在探究物种形成过程中,界定物种间的系统位置及其相互关系对于认识生物多样性的形成过程具有重要意义,而物种分化的机制和过程,一直是进化生物学领域研究的热点和难点(Michalke, 2012)。物种间的分化程度、进化状况都强烈地受到过去历史事件的影响,因此对物种分化现状的分析,可用于推测过去的气候、地质历史事件(Strasburg et al, 2012)。对物种或种群进化历史的揭示,可为分析物种的进化潜能提供重要信息,从而能对稀有或濒危物种采取科学有效的保护措施(Nosil & Feder, 2012)。

报春花属(*Primula* L.)是报春花科(Primulaceae)的第一大属,共有25个组,近500余种(胡启明, 1990)。广布于欧亚大陆温带地区,沿东喜马拉雅山两侧到云南、四川西部是本属的现代分布中心(吴之坤等, 2006)。报春花是世界著名的观赏花卉,灯台报春组(sect. *Proliferae*)花色艳丽,花序独特,具有很高的观赏价值(Richards, 2014)。Pax(1888)基于显著的轮状花序将25~30个物种归并为灯台报春组。灯台报春组拥有原始的轮状花序和三沟型花粉,种间容易杂交,种间关系比较复杂(Wilkins, 2011)。Martins et al(2003)用ITS序列构建过报春花科的系统树。Vos et al(2014)为了探究花部综合征和花柱繁育系统的关系,构建了报春花属124种报春的系统树,然而灯台报春组内的系统进化关系很少有学者探究,物种内的进化历史也值得深入探讨。

中甸灯台报春(*Primula chungensis*)是灯台报春组多年生的草本植物,根茎极短;叶椭圆形、矩圆形或倒卵状短圆形,先端圆形,基部楔状渐窄,边缘具不明显的波状浅裂和不整齐的小牙齿,中脉和侧脉宽扁,在下面稍隆起,叶柄不明显或长达叶片的1/4;花萼通常1枚,自叶丛中抽出,节上微被粉,具伞形花序。花期5~6月,单花花期4~6d,每个植株花期约1个月。模式标本采于云南香格里拉县,主要分布于云南西北部、四川西南部和西藏东南部。

鹅黄灯台报春(*P. cockburniana*)是二年生草本植物,具极短的根茎和成丛的支根;叶矩圆形至矩圆形倒卵形,先端圆形,基部近圆形或阔楔形,几乎不下延,因而叶片与叶柄具明显的界限,边缘呈不明显的浅波状,具细密的小牙齿,上面绿色,下面淡绿色,被粉质腺体;花期6~7月,果期8月。主要产于四川西部。生长于高山潮湿草地和林缘,海拔2900~4200m。模式标本采自康定。

中甸灯台报春和鹅黄灯台报春的形态学差异在于:鹅黄灯台报春花深橙黄色至橙红色,叶片基部钝圆或阔楔形几不下延,与叶柄有明显的界限,中甸灯台报春花浅橙黄色,叶片基部楔状渐狭窄(胡启明, 1990)。除了花色和叶片的差异外,两个物种间最显著的差异在于:中甸灯台报春存在花柱异型的现象,异型花柱是指被子植物中一种特殊的花多态现象和雌雄异位形式,即在一个居群内,根据雌蕊和雄蕊的高度,可以区别出两种或两种以上花的表型,而表型之间雌雄蕊的高度是互补的(Darwin, 1877; Ganders, 1979; Barrett & Richards, 1990)。在中甸灯台报春

中,有三种花柱形态,即长花柱型、短花柱型和等高花柱型,而鹅黄灯台报春只有一种花柱类型,即等高花柱类型(图1)。两个物种间的差异如表1所示,然而由于花色变异和叶片与叶柄的过渡程度的差异,在野外鉴定中很容易将这两个种混淆。

本研究试图通过构建系统树来阐明中甸灯台报春和鹅黄灯台报春的关系。通过对其形态学性状的测量,生境的考察以及分子方面的分析鉴定,对这两个物种进行深入的调查研究,这对其引种及资源保护具有重要的参考意义,并且对研究报春花的起源和进化提供重要的参考价值。通过对其分化时间的计算,以及生态位的模拟检测,探讨了促进物种形成的驱动力,并且推测了在物种形成过程中,不同的选择压力对植物形态学性状的影响。

表1 中甸灯台报春和鹅黄灯台报春的形态学性状差异
Table 1 Differences between *Primula chungensis* and *P. cockburniana*

物种 Species	花色 Color of the flower	叶片形状 Shape of the leaves	花柱类型 Patten of the style
中甸灯台报春 <i>Primula chungensis</i>	浅橙黄色 Light orange-yellow	叶片基部楔状渐狭窄 Base of the leaf is wedge-shaped and gradually narrow	长花柱型、短花柱型和等高花柱型 Long-styled morph, short-styled morph and homo-styled morph
鹅黄灯台报春 <i>P. cockburniana</i>	深橙黄色至橙红色 Deep orange-yellow to orange-red	叶片基部钝圆或阔楔形几不下延,与叶柄有明显的界限 Base of the leaf is obtuse or wide wedge-shaped, there is a fine line between the leaf and leafstalk	只有同型花柱 Homo-styled morph

1.2 花形态特征观测

在野外居群采样过程中,随机采集鹅黄灯台报春30朵完全开放的花,鉴于中甸灯台报春有三种花柱表型,每种表型选择30朵,共选择90朵进行形态学性状测量。对采集的报春花进行纵向解剖,用标尺放一旁做比例尺,照相后保存,通过软件ImageJ (Abràmoff, 2004) 测量关键的花形态学性状。包括花冠檐直径、花冠管长度、花冠口直径、花药长度、柱头宽5个性状(图2)。从这5个性状里提取出两条最主要的轴 axi.1, axi.2。先用R软件里的knn包里的kmeans函数进行聚类分析,再用ggplot2包里的geom_point函数绘制聚类图。

1.3 系统分析与SSR分析

植物总DNA的提取采取改良的CTAB的方法(Doyle, 1987)。ITS(internal transcribed spacer)序列和叶绿体序列是构建物种系统树常用的分子标记(Ngamriabsakul et al, 2000; Martins et al, 2003)。

1 材料与方法

1.1 材料

中甸灯台报春采样居群集中在西藏东南部,鹅黄灯台报春主要集中分布在四川西部,每个居群采集20~30个植株新鲜、完整的叶片,植株间隔至少10m,采集的叶片用硅胶迅速干燥后带回实验室进行总DNA提取。共采集中甸灯台报春4个居群和鹅黄灯台报春9个居群。此外,还采集了灯台报春组的粉被灯台报春(*Primula pulverulenta*),桔红灯台报春(*P. bulleyana*),霞红灯台报春(*P. beesiana*),橙红灯台报春(*P. auranti-ana*)。采样点信息见表2。

ITS序列扩增采用的引物为ITS1(5'-AGAAGTCG-TAACAAGGTTTCCGTAGG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')(White et al, 1990)。trnL-F序列扩增采用通用引物为(5'-CGAAATCGG-TAGACGCTACG-3')和通用引物(5'-ATTTGAACTG-GTGACACGAG-3')(Taberlet et al, 1991)。每个物种选取2~3个个体进行目的条带扩增,PCR的反应体系为15 μL,在反应过程中,设置94℃预变性4min,94℃变性1min,退火52~55℃1min,72℃延伸1.5min,设置35个循环,72℃终延伸10min,扩增产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,经银染后观察结果,产物送公司进行测序。我们选取了灯台报春组的16个近缘种基于ITS序列构建系统发育树,以报春花属钟花组的锡金报春(*Primula sikkimensis*)作为外类群。其中,8种报春的ITS序列在Genbank下载,包括日本灯台报春(*P. japonica*)、川东灯台报春(*P. mallophylla*)、滇缅灯台报春(*P. burmanica*)、

表 2 鹅黄灯台报春(E)和中甸灯台报春(Z)居群的采样信息
Table 2 Sampling of the populations of *primula cockburniana* and *P. chungensis*

居群编码 Population code	采集地点 Location	经纬度 Latitude & Longitude	海拔 Altitude (m)
E1	木里县 912 林场 Muli County 912 forest farm	101°10'3.504" E , 28°12'26.053" N	3 353
E2	木里县鸭嘴 Muli County Yazui	101°8'17.025" E , 28°13'51.752" N	3 354
E3	木里县 916 林场 Muli County 916 forest farm	100°59'8.602" E , 28°31'1.597" N	3 354
E4	雅江县到道孚县途中 Site between Yajiang County and DaoFu County	101°21'44.379" E , 30°43'09.635" N	3 809
E5	康定县老榆林 Laoyulin Township , Kangding County	101°57'49.374" E , 29°56'55.038" N	3 118
E6	康定县雅佳梗 Yajiageng Township , Kangding County	101°59'03.012" E , 29°55'36.786" N	3 738
E7	九龙县汤古乡 Tangu Township , Jiulong County	102°14'03.091" E , 28°44'15.979" N	2 382
E8	九龙县瓦灰山 Wahui Mountain , Jiulong County	101°28'18.376" E , 29°16'20.331" N	3 864
E9	九龙县伍须海伍须村 Wuxu Village , Jiulong County	99°35'37.355" E , 26°34'39.815" N	3 498
Z1	林芝县鲁朗生态站附近 Ecology Station in Lulang Town , Linzhi County	94°44'37.675" E , 29°33'675" N	3 328
Z2	林芝县鲁朗兵站 Military Depot in Lulang Town , Linzhi County	94°43'52.68" E , 29°41'22.2" N	3 450
Z3	林芝县色季拉山 Shergyla Mountain , Linzhi County	94°33'12.48" E , 29°33'40.5" N	3 729
Z4	波密县 Bomi County	95°41'29.82" E , 29°47'14.46" N	3 689

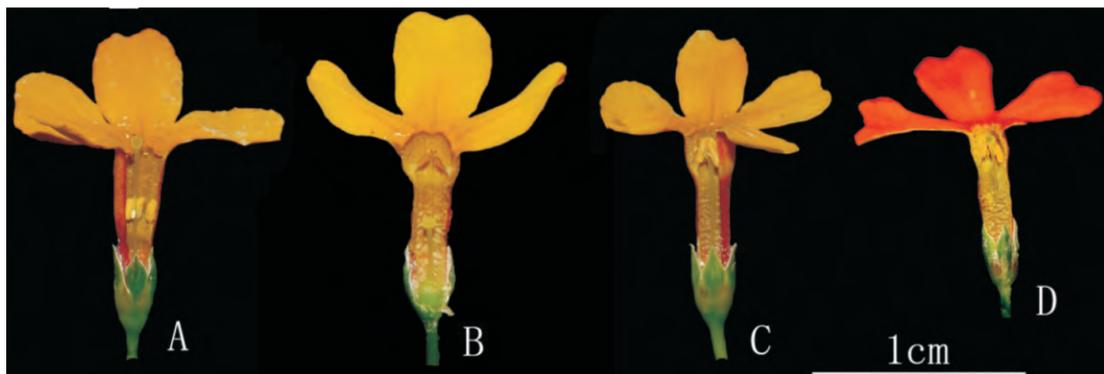


图 1 报春花花部解剖图 A. 中甸灯台报春长花柱型花朵; B. 中甸灯台报春短花柱型花朵;
C. 中甸灯台报春同型花柱类型; D. 鹅黄灯台报春, 只有一种同型的花柱类型。

Fig. 1 Antomy picture of the primrose A. Flower of longstyle of *P. chungensis*; B. Flower of shortstyle of *P. chungensis*; C. Flower of homostyle of *P. chungensis*; D. Flower of *P. cockburniana*, the flower is homostyle.

橙红灯台报春、芒齿灯台报春(*P. serratifolia*)、小花灯台报春(*P. prenantha*)、泽地灯台报春(*P. helodoxa*)、玉山灯台报春(*P. miyabeana*)。选取灯台报

春组的 12 个近缘种基于叶绿体 *trnL-F* 序列构建系统发育树, 以点地梅属的点地梅(*Androsace umbellata*)作为外类群。其中, 7 种报春的叶绿体序

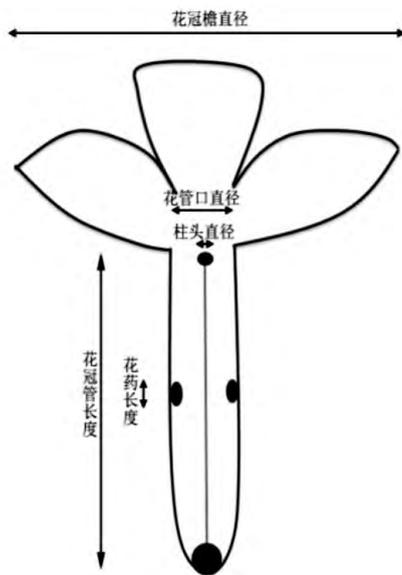


图 2 报春花花部解剖模式图

Fig. 2 Anatomical model picture of the primrose

列在 Genebank 下载,包括橙红灯台报春(*P. auranti-ana*)、齿叶灯台报春(*P. serratifolia*)、小花灯台报春(*P. prenantha*)、灯台报春(*P. prolifera*)、泽地灯台报春(*P. helodoxa*)、玉山灯台报春(*P. miyabeana*)、香海仙报春(*P. wilsoni*)。PCR 后的产物进行测序,测序结果导入软件 Sequencher 4.14 (Codes, 2000) 进行编辑,用 MegAlign (Clewley, 1997) 将碱基序列调成矩阵的模式,用 MEGA4.0 (Tamura et al 2007) 打开调整编辑序列,用 jmodeltest 0.1 (Posada, 2008) 选取合适的模型,用 mesquite (Maddison, 2001) 将矩阵调整成 nex 的模式,用 MrBayes (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) 软件分别对 ITS 序列和 *trnL-F* 序列进行贝叶斯建树。

SSR (sequence tagged microsatellite site) 序列是广泛存在于真核生物基因组中的较短重复序列,在研究居群的遗传结构和物种间的亲缘关系等方面有重要作用 (Barker, 1997; Mateus et al, 2004)。吴之坤和张长芹 (2010) 基于转录组开发了海仙报春的 54 对 SSR 引物,本研究从中筛选出 8 对容易扩增多态性较好的 SSR 引物序列 (表 3)。将扩增产物先进行荧光标记后殖民再进行峰值的测定。选取中甸灯台报春 4 个居群共 154 个个体,鹅黄灯台报春 9 个居群共 203 个个体进行分析,荧光标记 PCR 的反应条件为巢式 PCR (Schuelke, 2000)。设置 94 °C 预变

性 4 min,退火 52~55 °C,72 °C 延伸 1.5 min; 设置 30 个循环,94 °C 变性 1 min,退火 52~55 °C,72 °C 延伸 1.5 min; 设置 8 个循环,结果用软件 GeneMaker v2.2.0 (Lukashin & Borodovsky, 1998) 进行峰值测定。

1.4 物种分化时间的计算及生态位的比较

Ima (isolation with migration analysis) 是基于隔离-迁移模型,对基因位点间的差异性进行分析,描述两个关系紧密的群体或物种关系的软件 (Hey & Nielsen, 2007),针对不同的位点,可以采用不同的核苷酸替代模型和进化速率,我们选取叶绿体片段进行 Ima 分析。其中,鹅黄灯台选 14 个个体,中甸灯台选 21 个个体,联合叶绿体 *psbA-trnH*, *atpB-rbcL*, *trnL-F* 片段。设置叶绿体每个位点每年的突变率平均为 1.52×10^{-9} (Yamane et al, 2006),置信区间设置为 (0.000 001, 0.000 1) (Li & Graur, 1991; Richardson et al, 2001)。Maxent 即最大熵模型 (maximum entropy mode),通过对物种已知分布数据和环境数据,探究对物种分布影响最大的气候因子 (Phillips et al, 2006)。将实地采集的物种信息及在 CVH 中查到的信息进行搜集,联合在标本馆中搜集的信息进行整理归纳,从 wordlim 里下载 19 个生态因子,运用现有物种分布信息监测物种生态位的差异。

2 结果与分析

2.1 中甸灯台报春和鹅黄灯台报春的系统发育关系

核基因 ITS 序列排列后片段长度为 631 bp,用 jModelTest 0.1 寻找用于 Bayesian 分析的模型,通过 AIC 方法算出最适模型为 TPM1uf+I+G,叶绿体基因序列排列后片段长度为 657 bp,用 AIC 方法算出最适模型为 GTR。在用贝叶斯构建的两个系统树 (图 3) 中,中甸灯台报春和鹅黄灯台报春都以较高的支持率 0.81 聚成一个分支,故认为,中甸灯台报春和鹅黄灯台报春为亲缘关系很近的姐妹种。

2.2 两种报春的形态学差异

从图 4 中的散点分布可以看出,中甸灯台报春和鹅黄灯台报春的个体分别聚在两块区域,且两块区域间区分较明显,这从形态学上来说,两个姐妹种间的差异明显且稳定,两个姐妹种之间产生了形态学上稳定的分化。从各解剖结构测量值上,可以知道中甸灯台报春的花朵显著大于鹅黄灯台报春,我们推测这种花部特征与交配系统密不可分,花部形

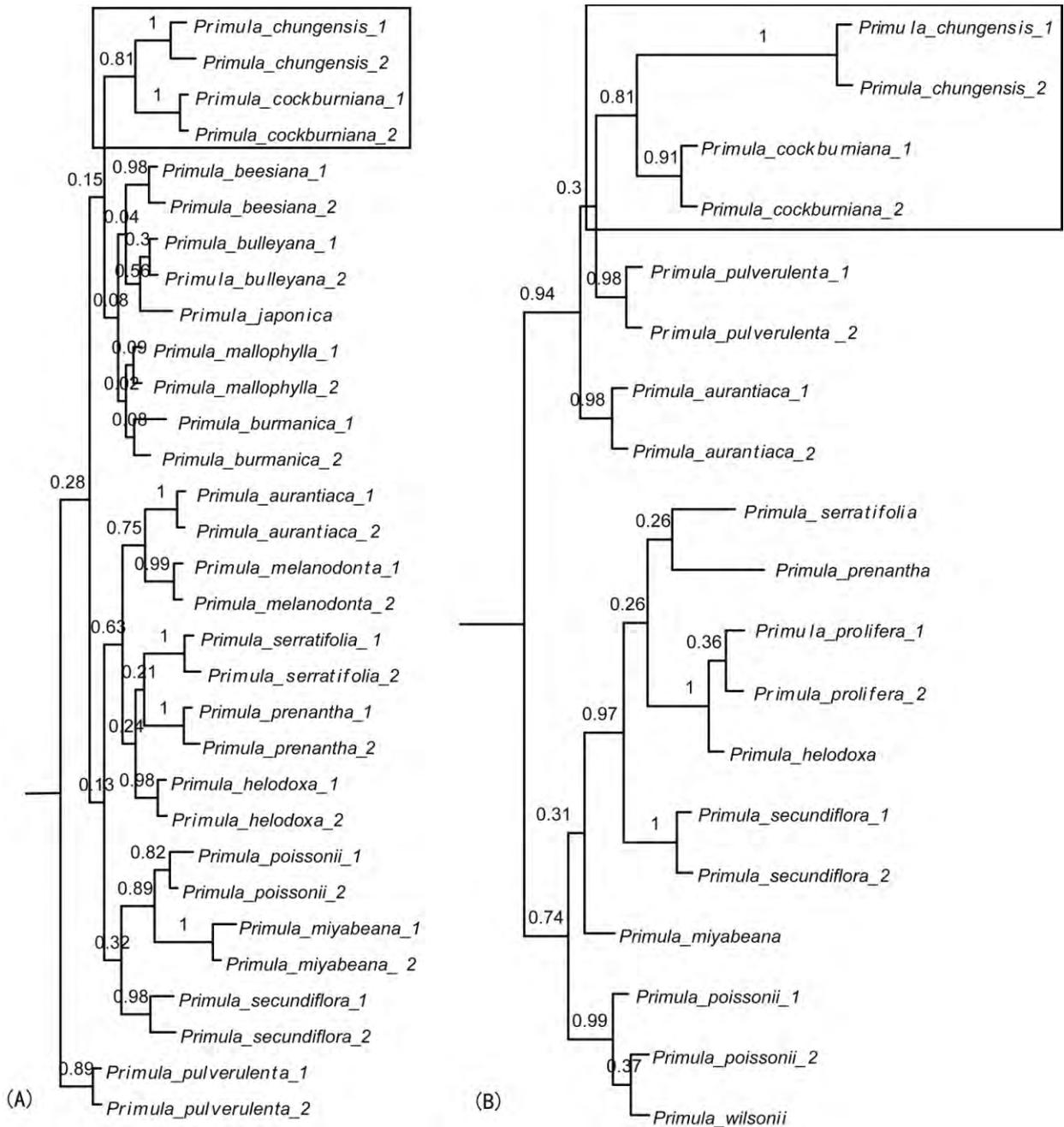


图 3 用贝叶斯方法构建系统进化树 (A) 基于 ITS 序列构建的进化树; (B) 基于 trn L-F 序列构建的进化树。
在这两个系统树中, 中甸灯台报春和鹅黄灯台报春都以 0.81 的支持率聚成一个分支。

Fig. 3 Phylogenetic tree based on the Bayesian method (A) Phylogenetic tree based on ITS sequences. (B) Phylogenetic tree based on trn L-F sequences. In the phylogenetic tree, *P. chungensis* and *P. cockburniana* in a branch with 0.81 support rate.

态对访花昆虫对花部的拜访有重要影响。鹅黄灯台报春有很高的自交亲和性, 而通过对中甸灯台报春进行套袋实验表明, 传粉昆虫对中甸灯台报春的繁殖成功具有很高的贡献率, 且在野外实验和观测中, 熊蜂为其有效的传粉者, 故相对于鹅黄灯台报春来

说, 中甸灯台报春对花设计的资源投入相对较多, 拥有更大的花展示, 表明交配系统在塑造花部性状过程中的重要作用。

2.3 SSR 的 structure 聚类分析

通过对这两个物种共 357 个个体进行 structure

表 3 SSR 引物信息
Table 3 Information of the SSR primers

序号 Number	正向引物(5'→3') Forward primer (5'→3')	反向引物(5'→3') Reverse primer (5'→3')
1	TGTAAAACGACGGCCAGTCATGTTCCACAGGAAATTAT	GCTGTTTGGTTGGAAAGAA
2	TGTAAAACGACGGCCAGTCAGTCGTGCCATCAATTAG	TGGAAGCGAAGGGATAAATG
3	TGTAAAACGACGGCCAGTTTTTTGGAAATTCACCTTGCTCA	AGACCCCTTGATCTGCTCCA
4	TGTAAAACGACGGCCAGTTCGAGAGGGTTCACTTTTG	CTAGCGCCGAGGAGCTTAT
5	TGTAAAACGACGGCCAGTGGCCAAACTTTAGTTTCTGTTTTT	GAAGAAGGTGATGGGGTGA
6	TGTAAAACGACGGCCAGTACACCACAGAAGCGAGACTG	AGAGATGAGCCGCTGAAGAA
7	TGTAAAACGACGGCCAGTTGACGCAGTTGTGAAAAGTCTC	GGGGTGGATCGCTCAGAA
8	TGTAAAACGACGGCCAGTTCATCTCTCTCAAACACT	GCGACGAGCCATAAGACTA

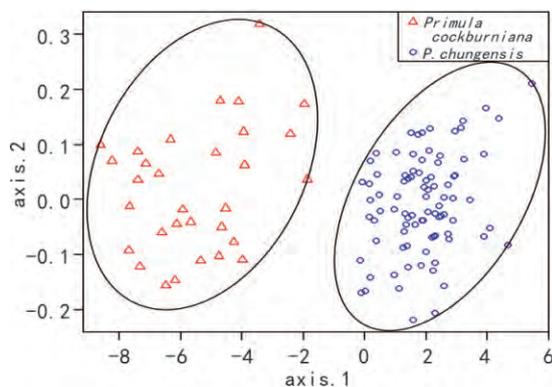


图 4 两种报春花的主成分分析 30 个三角形代表鹅黄灯台报春, 90 个圆点代表中甸灯台报春。

Fig. 4 Principal component analysis of the two kinds of the primroses The 30 triangles represent *P. cockburniana*, the 90 dots represent *P. chungensis*.

聚类分析 我们看到, 无论是 $L'(K)$ 值还是 ΔK 值, 都是在 K 值为 2 时, 其值具有明显的转折点, 即 K 的最适值为 2, 当 $K=2$ 时, 可以看到聚类结果形成颜色分明的两个分支, 其中绿色的是中甸灯台报春的个体, 红色的是鹅黄灯台报春的个体。从聚类结果(图 5) 可以看出, 中甸灯台报春和鹅黄灯台报春在分子水平上是聚类明显的两个物种。即两个物种间的分子组成成分相差较明显, 在分子方面, 两个物种间也产生了稳定的分化。

2.4 物种间的分化时间

联合的叶绿体的序列长度为 1 650 bp, 通过 I_{ma2} 计算, 两个物种间的分化时间大约在 13.058 2 万年前, 处于更新世时期, 更新世时期地球经历了剧烈的气候动荡和地质形成过程。对动植物来说, 更

新世时期气候的动荡对物种的形成和分化以及分布格局有重要的影响, 特别是对今天的姐妹种之间的形成和分化有重要的作用 (Soltis, 2013)。这种冰期间冰期气候的剧烈变化可能对这两种报春的形成和分化产生了重要的影响。

2.5 物种间生态位的差异

共收集了中甸灯台报春 9 个地理分布信息, 鹅黄灯台报春 18 个地理分布信息。通过软件对生态位进行检测, 从气候因子的贡献率可以看出来, 在中甸灯台报春中, bio17、bio7、bio3、bio12 即最干季节降水量、年均温变化范围、等温性和年均降水量对其分布有重要的影响(表 4)。在鹅黄灯台报春中, bio11、bio14、bio12、bio15 即最冷季节平均温度、最干月降水量、年均降水量和季节性降水量对其分布有重要的影响(表 5)。由此可见, 两种报春的生态位发生了一定程度的分化。

3 讨论

报春花属灯台报春组拥有较原始的轮状花序和三沟型花粉, 组间物种因为形态和生境上的相似性, 种间易杂交 (Wilkins, 2011)。因此, 通过多方面探究理清组内的物种关系, 对报春花属的起源和进化有重要意义。本研究通过用贝叶斯的方法构建关于核糖体和叶绿体的系统树, 两棵树一致表明了中甸灯台报春和鹅黄灯台报春的姐妹种关系。除去花柱异型的特征, 我们用另外五组形态学性状进行主成分聚类分析, 发现两种报春的性状产生了稳定的分化, 即中甸灯台报春的各花部性状大于鹅黄灯台报春的。而通过 SSR 的分析数据表明, 在分子上两个

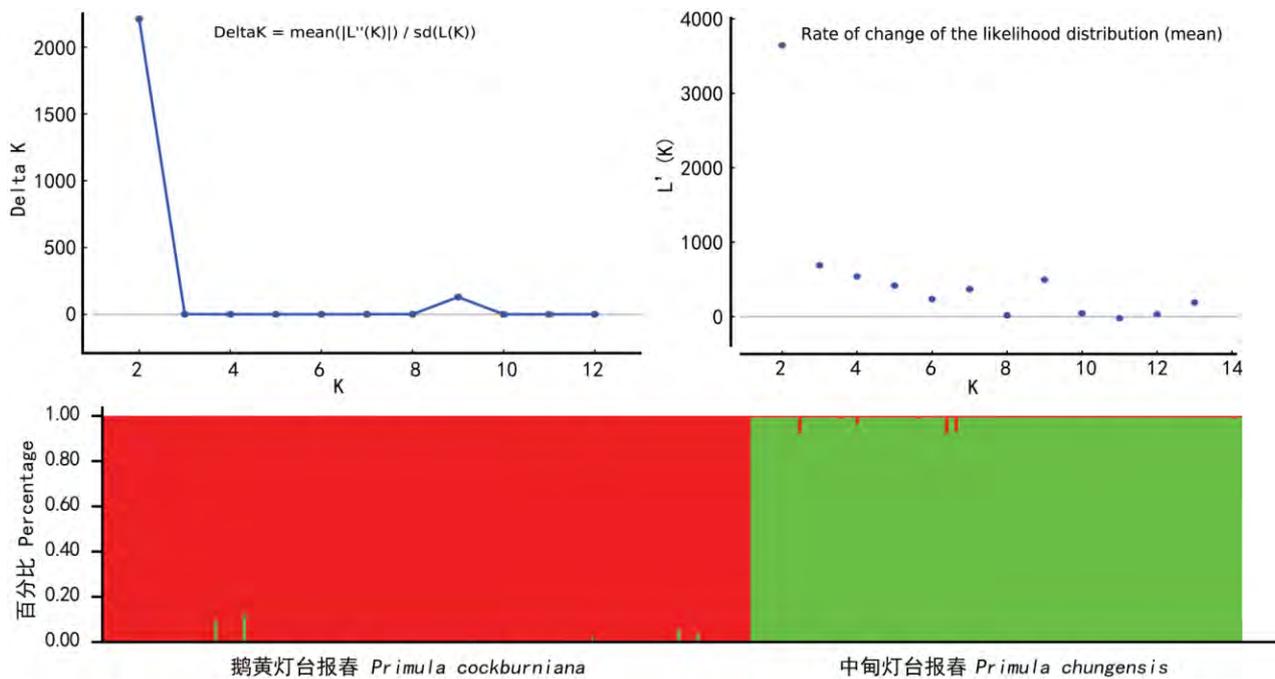


图 5 基于 SSR 序列的遗传结构分析
Fig. 5 Summary of structure analysis based on the SSR data

表 4 环境变量在中甸灯台报春分布中的贡献率

Table 4 Analysis of variable contributions of *P. chungensis*

生态因子变量 Ecological factor variable	贡献率 Contribution rate	变量排列重要值 Permutation importance value
bio17	34.1	36.8
bio7	28.7	43.5
bio3	12.5	1.7
bio12	12.2	14.3
bio15	11.8	3.8
bio13	0.6	0
bio19	0	0
bio18	0	0
bio16	0	0
bio14	0	0
bio9	0	0
bio8	0	0
bio6	0	0
bio5	0	0
bio4	0	0
bio2	0	0
bio11	0	0
bio10	0	0
bio1	0	0

姐妹种的遗传背景也发生了稳定而显著的分化。通过对两种报春种间关系的界定,为物种的引种和保护提供了参考价值。Ima 的分析表明,这两个分化较为稳定的姐妹种,其分化时间大约是在更新世时期,故我们推测更新世时期气候的动荡,地质历史的形成时期,特别是冰期间冰期的反复震荡对全球气候的影响,对姐妹种的分化产生了一定的促进作用。

花柱异型是由一对等位基因控制的性状(Wedderburn & Richards 1992; Nowak et al, 2015)。我们推测在更新世时期,两个物种的共同祖先产生了基因突变,这种突变基因型由于适合特定的生境,故在适合自身生境范围进行扩散。两种报春分布范围产生了一定分化。而不同生境内由于生态位的不同,选择压力不同,物种交配系统受到影响,产生了不同的交配系统。花作为被子植物的繁殖器官,具有很高的变异性,为适应不同的环境以利于植物的繁殖延续,花部性状易产生适应性的进化(Dafni 1996; Bynum & Smith, 2001; Galen, 2005)。基于鹅黄灯台报春同型的花柱系统,且自交亲和性较高,可能对传粉昆虫的依赖性较小,而在中甸灯台报春中,传粉昆虫对中甸灯台报春的繁殖成功有很高的贡献率,故相对于鹅黄灯台报春来说,对花展示的资

表 5 环境变量在鹅黄灯台报春分布中的贡献率

Table 5 Analysis of variable contributions of *P. cockburniana*

生态因子变量 Ecological factor variable	贡献率 Contribution rate	变量排列重要值 Permutation importance value
bio11	70.3	40.2
bio14	9.6	0.7
bio12	5.7	24.7
bio15	4	2.8
bio6	3.9	0
bio19	3.1	13.9
bio13	1.9	1.3
bio18	1.1	15
bio7	0.2	0.1
bio2	0.1	1.5
bio16	0.1	0
bio9	0	0
bio8	0	0
bio5	0	0
bio4	0	0
bio3	0	0
bio17	0	0
bio10	0	0
bio1	0	0

源投入相对较多,中甸灯台报春拥有更大的花展示。通过对这两种报春的分化历史进行探究,为更新世时期气候的动荡促进物种的分化提供了新的参考,同时揭示了花部综合征和繁育系统间的相互联系。

参考文献:

- ABRÀMOFF MD, MAGALHÃES PJ, RAM SJ, 2004. Image processing with ImageJ [J]. *Biop Int*, 11(7): 36–42.
- BARKER JSF, MOORE SS, HETZEL DJS, et al, 1997. Genetic diversity of Asian water buffalo (*Bubalus bubalis*): microsatellite variation and a comparison with protein-coding loci [J]. *Anim Genet*, 28(2): 103–115.
- BARRETT SCH, RICHARDS JH, 1990. Heterostyly in tropical plants [J]. *Mem NY Bot Gard*, 55: 35–61.
- BYNUM MR, SMITH WK, 2001. Floral movements in response to thunderstorms improve reproductive effort in the alpine species *Gentiana algida* (Gentianaceae) [J]. *Am J Bot*, 88(6): 1088–1095.
- CLEWLEY JP, ARNOLD C, 1997. Megalign [J]. *Seq Data Anal Guide*: 119–129.
- CODES G, 2000. Sequencher: Version 4.1. 2. Gene Codes Corporation [J]. *Ann Arbor*.
- CRACRAFT J, 1983. Species concepts and speciation analysis

- [J]. *Curr Ornithol*, 1: 159–187.
- DAFNI A, 1996. Autumnal and winter pollination adaptations under Mediterranean conditions [J]. *Boccone*, 5(1): 171–181.
- DARWIN C, 1877. The different forms of flowers on plants of the same species [M]. London: John Murray
- DOYLE JJ, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem Bull*, 19: 11–15.
- GALEN C, 2005. It never rains but then it pours: the diverse effects of water on flower integrity and function [J]. *Reprod Alloc Plant*: 77–95.
- GANDERS FR, 1979. The biology of heterostyly [J]. *NZ J Bot*, 17(4): 607–635.
- HEY J, NIELSEN R, 2007. Integration within the Felsenstein equation for improved Markov chain Monte Carlo methods in population genetics [J]. *Proc Nat Acad Sci*, 104(8): 2785–2790.
- LI WH, GRAUR D, 1991. Fundamentals of molecular evolution [M]. Sinauer Associates.
- LUKASHIN AV, BORODOVSKY M, 1998. GeneMark.hmm: new solutions for gene finding [J]. *Nucl Acid Res*, 26(4): 1107–1115.
- MADDISON WP, MADDISON DR, 2001. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis [J].
- MARTINS L, OBERPRIELER C, HELLWIG FH, 2003. A phylogenetic analysis of Primulaceae s.l based on internal transcribed spacer (ITS) DNA sequence data [J]. *Plant Syst Evol*, 237(1–2): 75–85.
- MATEUS JC, PENEDO MCT, ALVES VC, et al, 2004. Genetic diversity and differentiation in Portuguese cattle breeds using microsatellites [J]. *Anim Genet*, 35(2): 106–113.
- MICHALKE B, 2012. Manganese exposure and neurodegenerative diseases—investigations with Mn speciation analysis [J]. *Zentr Arbei Arbei Ergon*, 62: 156–158.
- NGAMRIABSAKUL C, NEWMAN MF, CRONK QCB, 2000. Phylogeny and disjunction in *Roscoea* (Zingiberaceae) [J]. *Edin J Bot*, 57(1): 39–61.
- NOSIL P, FEDER JL, 2012. Genomic divergence during speciation: causes and consequences [J]. *Phil Trans Roy Soc B—Biol Sci*, 367(1587): 332–342.
- NOWAK MD, RUSSO G, SCHLAPBACH R, et al, 2015. The draft genome of *Primula veris* yields insights into the molecular basis of heterostyly [J]. *Genome Biol*, 16(1): 1–17.
- PAX F, 1888. Monographische übersicht über die Arten der Gattung *Primula* [M]. Leipzig: W. Engelmann.
- PHILLIPS SJ, ANDERSON RP, SCHAPIRE RE, 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions [J]. *Ecol Mod*, 190(3): 231–259.
- POSADA D, 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging [J]. *Mol Biol Evol*, 25(7): 1253–1256.
- RICHARDS J, 2014. *Primula* [M]. London: Pavilion Books.
- RICHARDSON JE, PENNINGTON RT, PENNINGTON TD, et al, 2001. Rapid diversification of a species-rich genus of neotropical rain forest trees [J]. *Science*, 293(5538): 2242–2245.
- RONQUIST F, HUELSENBECK JP, 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. *Bioinformatics*, 19(12): 1572–1574.
- SCHUELKE M, 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments [J]. *Nat Biotechnol*, 18(2): 233–234.

(下转第 259 页 Continue on page 259)

(C-25) , 31.7 (C-2) , 31.9 (C-8) , 34.1 (C-22) , 36.4 (C-10) , 36.5 (C-20) , 38.3 (C-12) , 39.8 (C-4) , 42.3 (C-11) , 45.8 (C-24) , 50.1 (C-9) , 56.1 (C-17) , 56.8 (C-14) , 71.8 (C-3) , 121.7 (C-6) , 140.8 (C-5) 。以上数据与张洪财等(2016) 报道基本一致, 故鉴定 9 为 β -谷甾醇。

3 结论

本研究从金樱根乙醇浸膏的乙酸乙酯萃取部位分离得到 9 个化合物, 其中化合物 2、4、5、7 为首次从该植物中分离得到, 这些分离得到的化合物多为儿茶素类化合物和五环三萜类化合物, 且多以同分异构体的形式存在。儿茶素类化合物大多具有抗氧化、抗菌等活性, 三萜类化合物大多具有抗肿瘤、抗菌、抗病毒、抗炎等活性。因此我们将进一步对所分离的得到的化合物进行生物活性的研究, 从而为该药用植物的充分利用提供科学依据。

参考文献:

- THE NATIONAL ASSEMBLY OF CHINESE HERBAL MEDICINE EDITORIAL, 1975. The national assembly of Chinese herbal medicine [M]. Beijing: People's Medical Publishing House: 490. [全国中草药汇编编写组, 1975. 全国中草药汇编 [M]. 北京: 人民卫生出版社: 490.]
- LI SZ, 1975. Compendium of materia medica [M]. Beijing: People's Medical Publishing House: 2096-2097. [李时珍, 1975. 本草纲目 [M]. 北京: 人民卫生出版社: 2096-2097.]
- GERMAIN NTCHATCHO, LUISELLA VEROTTA, PAOLA VITA FINZI, et al, 2009. A new β -D-glucopyranosyl 2-oxo-urs-12-en-28-oate from the Cameroonian plant *Combretum bracteatum* [J]. Nat Prod Comm, 4(12): 1631-1636.
- GUAN XL, HUANG YL, LIU CL, et al, 2014. Study on the chemical constituents of *Litchi chinensis* pericarp(1) [J]. Guihaia, 34(2): 151-154. [关小丽, 黄永林, 刘春丽, 等, 2014. 荔枝皮化学成分的研究(1) [J]. 广西植物, 34(2): 151-154.]
- HUANG JY, LU WJ, TAN X, et al, 2015. Chemical constituents from *Macaranga denticulate* root [J]. J Chin Med Mat, 8: 1671-1673. [黄建猷, 卢文杰, 谭晓, 等, 2015. 中平树根化学成分研究 [J]. 中药材, 8: 1671-1673.]
- LI YF, HU LH, LOU FC, 2003. Studies on the constituents of *Rosa multiflora* [J]. Chin Pharm J, 5: 16-18. [李延芳, 胡立宏, 楼凤昌, 2003. 野蔷薇根化学成分的研究 [J]. 中国药理学杂志, 5: 16-18.]
- LIU DL, ZHU S, MA R, et al, 2010. Triterpenoids from the roots of *Rose odorata* var. *gigantea* [J]. Chin J Nat Med, 1: 12-15. [刘岱琳, 朱珊, 马荣, 等, 2010. 固公果根中的三萜类成分 [J]. 中国天然药物, 1: 12-15.]
- WU XP, HUANG XY, ZHANG XP, et al, 2014. Triterpenoid components from *Rosa cymosa* [J]. Chin Herb Med, 5: 626-630. [吴小鹏, 黄小燕, 张小坡, 等, 2014. 小果蔷薇中三萜类化学成分研究 [J]. 中草药, 5: 626-630.]
- ZHANG CF, GUI X, SUN QS, et al, 2003. Tannins from the stem of *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm [J]. Chin J Nat Med, 4: 12-14. [张朝凤, 贵新, 孙启时, 等, 2003. 乌药茎中鞣质类成分研究 I [J]. 中国天然药物, 4: 12-14.]
- ZHANG HC, WANG Y, HUO Y, et al, 2016. Chemical constituents from *Ledum palus* L. [J]. Chin Trad Pat Med, 3: 587-590. [张洪财, 王宇, 霍研, 等, 2016. 细叶杜香化学成分的研究 [J]. 中成药, 3: 587-590.]
- ZUO GY, LIU SL, XU GL, et al, 2008. Triterpenoids from the roots of *Rubus obcordatus* (Rosaceae) [J]. Act Bot Yunnan, 3: 381. [左国营, 刘树玲, 徐贵丽, 等, 2008. 钻地风的三萜类成分 [J]. 云南植物研究, 3: 381.]
- WHITE TJ, BRUNS T, LEE S, et al, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [J]. PCR Protocols, 18(1): 315-322.
- WILKINS JS, 2011. Philosophically speaking, how many species concepts are there [J]. Zootaxa, 2765: 58-60.
- YAMANE K, YANO K, KAWAHARA T, 2006. Pattern and rate of indel evolution inferred from whole chloroplast intergenic regions in sugarcane, maize and rice [J]. DNA Res, 13(5): 197-204.
- WU ZK, ZHANG CQ, 2010. Comparative study of pollination biology of two closely related alpine *Primula* species, namely *Primula beesiana* and *P. bulleyana* (Primulaceae) [J]. J Syst Evol, 48(48): 109-117.
- HU QM, 1990. Flora Reipublicae Popularis Sinicae [M]. Beijing: Science Press, 59(2): 1-332. [胡启明, 1990. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 59(2): 1-332.]
- WU ZK, ZHANG CQ, 2006. The resource investigation of primorose in northwest of Yunnan Province [J]. Guihaia, 26(1): 49-55. [吴之坤, 张长芹, 2006. 滇西北玉龙雪山报春花种质资源的调查 [J]. 广西植物, 26(1): 49-55.]
- WEDDERBURN FM, RICHARDS AJ, 1992. Secondary homostyly in *Primula* L.; evidence for the model of the 'S' supergene [J]. New Phytol, 121(4): 649-655.

(上接第 161 页 Continue from page 161)