



青藏高原及其毗邻山区蒙古 绣线菊谱系地理学研究

王久利^{1,2}, 高庆波¹, 付鹏程³, GULZAR Khan^{1,2}, 陈世龙¹, 张发起^{1,4*}

(1 中国科学院高原生物适应与进化重点实验室, 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; 2 中国科学院大学, 北京 100039; 3 洛阳师范学院 生命科学学院, 河南洛阳 471022; 4 西南大学 生命科学学院, 重庆 400715)

摘要:以青藏高原及其毗邻山区的蒙古绣线菊 23 个居群 324 个个体为研究对象, 选取叶绿体 DNA 非编码区 *trnL-trnF* 和 *rps15-ycf1* 片段对蒙古绣线菊进行谱系地理学研究。结果表明: (1) 该研究区域中蒙古绣线菊亲缘关系相近的单倍型多发生于同一居群中, 存在着明显的谱系地理学关系。(2) 所检测得到的 35 个单倍型中, 大约 71.4% 是居群内特有的单倍型, 而出现频率最高的 H1 是最古老的单倍型, 贝叶斯分析和单倍型简约网状图显示 35 个单倍型聚为地理分布范围各不相同的 3 个分支。(3) 歧点分布分析得到分布图呈多峰曲线, 说明蒙古绣线菊居群在较长的时间内发展稳定, 没有经历突然的近期扩张。(4) BEAST 分析结果显示, 在 45 Mya 左右开始出现蒙古绣线菊的谱系分支的分化。研究认为, 蒙古绣线菊在青藏高原及其毗邻山区可能至少存在 3 个冰期避难所, 其在青藏高原及其毗邻山区的分布格局主要是第四纪冰期-间冰期气候动荡、青藏高原隆升的共同作用的结果。

关键词: 蒙古绣线菊; 谱系地理学; 冰期避难所; 青藏高原; 叶绿体 DNA

中图分类号: Q789; Q948.5 文献标志码: A

Phylogeography of *Spiraea mongolica* (Rosaceae) on the Qinghai-Tibetan Plateau and Adjacent Highlands

WANG Jiuli^{1,2}, GAO Qingbo¹, FU Pengcheng³, GULZAR Khan^{1,2}, CHEN Shilong¹, ZHANG Faqi^{1,4*}

(1 Key Laboratory of Adaption and Evolution of Plateau Biota, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China; 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; 3 School of Life Sciences, Luoyang Normal University, Luoyang, He'nan 471022, China; 4 School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: In the current study, phylogeographic structure of *Spiraea mongolica* (Rosaceae) was investigated based on cpDNA markers (*trnL-trnF* and *rps15-ycf1*). Three hundreds and twenty four individuals distributed in 23 natural populations were used in the study covering the QTP and adjacent highlands. The result showed that: (1) The closely related haplotypes in this study tending to occur in same population indicated significantly phylogeographic pattern within the entire distribution range. (2) About 71.4% of the 35 haplotypes detected from all individuals were endemic in certain population; phylogenetic analysis divided all the haplotypes into three highly supported clades, in which H1 was the more ancient and highly distributed haploptype. (3) Mismatch distribution analysis indicated the species had experienced demographic expansion up to some extent since long time, but the expansion was not so rapid. (4) The results of BEAST

收稿日期: 2014-05-27; 修改稿收到日期: 2014-08-31

基金项目: 国家自然科学基金(31270270); 青海省国际科技合作项目(2014-HZ-812)

作者简介: 王久利(1991-), 男, 在读硕士研究生, 主要从事系统与进化植物学研究。E-mail: wang_jiul@163.com

* 通信作者: 张发起, 博士, 助理研究员, 主要从事高山植物的进化与适应研究。E-mail: fqzhang@nwipb.cas.cn

analysis revealed that cladistics differentiation of *S. mongolica* occurred about 45 Mya. This research suggested that there are no less than three glacial refugia of *S. mongolica* in the QTP and adjacent highlands. The distribution of *S. mongolica* on the QTP and adjacent highlands was due to the combine effects of climatic instability during quaternary glacial-interglacial episodes and the uplifting of QTP.

Key words: *Spiraea mongolica*; phylogeography; glacial refugia; Qinghai-Tibetan Plateau; cpDNA

谱系地理学(phylogeography)自 1987 年首次由 Avise 提出,现已成为研究物种进化历史的重要手段,其通过描述物种现存遗传分布格局和谱系关系来推测物种的冰期进化历史,揭示气候和环境变化对现存类群生物地理分布格局的影响^[1-4]。已有研究表明,对现存类群的分布格局影响最大的是第四纪冰期与间冰期的交互引起的气候变化,极大地改变了物种的现代生物地理分布格局及遗传结构^[5-6]。

青藏高原是世界上最大、最高、最年轻的高原,海拔高度平均 4 000 m 以上,有“世界屋脊”、“地球第三极”之称^[7]。青藏高原地区是全球生物多样性热点之一,具有极高的生物多样性,包含很多的高原特有物种^[8]。青藏高原地区还是受到全球气候与环境变化影响最为强烈的地区之一,也成为全球气候变化的“放大器”^[9]。青藏高原经历过几次大规模的隆升,其中在 3.6~1.2 百万年(My, million years ago; 约处于晚第三纪至第四纪)发生的隆升速度快且规模大,其对高原物种的影响也最大^[7,10]。青藏高原隆升及第四纪冰期气候变化对中国西部乃至东亚地区的气候、环境及生态等都产生了深远的影响^[11],因此该地区已成为谱系地理研究的热点地区。

近年来青藏高原地区植物谱系地理学的研究得到了较快的发展,研究发现各个物种的谱系地理结构各有不同,按照避难所位置可将其分为 2 种不同的谱系地理模式^[12]。其中对青海云杉(*Picea crassifolia*)、长花马先蒿(*Pedicularis longiflora*)等多数研究结果支持青藏高原边缘避难所模式,冰期时植物退缩至高原边缘的低海拔区域的避难所中,冰期结束后从这些边缘避难所向高原台面回迁形成现今生物地理分布格局^[13-14]。但是在对露蕊乌头(*Aconitum gymnantrum*)、西川红景天(*Rhodiola alsia*)等研究中发现,耐寒物种在冰期时并未完全退缩至高原边缘的避难所内,在高原台面上也存在微型避难所,即高原台面微型避难所模式^[15-17]。青藏高原地区的植物物种的演化历史不尽相同,对分布于该地区的建群种等物种的谱系地理学研究尚需要进一步大力开展,从而为探讨高山植物演化历史与高原隆升、第四纪冰期的关系提供依据,揭示现存

生物地理分布格局形成的主要历史成因^[12,18]。

绣线菊亚科(Spiraeoideae)是蔷薇科(Rosaceae)中最古老的亚科,共有 22 属 260 余种,中国有 8 属 100 余种,全为落叶性(本亚科包括常绿和落叶两大类群,后者为进化类群),绣线菊属(*Spiraea* L.)又是绣线菊亚科中最原始的属,在系统进化过程中,衍生出形态各异而亲缘关系紧密的绣线菊种类^[19]。蒙古绣线菊(*Spiraea mongolica*)为蔷薇科绣线菊属落叶灌木,多见于海拔 1 500~4 700 m 的山坡灌丛等处,是青藏高原地区高山灌丛的主要建群种,对维持高寒草甸生态系统的稳定具有重要意义^[20]。在之前对同属异域分布的近缘种高山绣线菊的研究中发现,高山绣线菊在青藏高原台面、东南边缘横断山区等地存在多个冰期避难所,并且没有表现出大规模的种群集体扩张和迁移的现象^[21-22]。为了验证青藏高原地区的绣线菊属物种是否存在类似高山绣线菊的谱系地理格局,本研究选取叶绿体 DNA(cpDNA)非编码区 *trnL-trnF* 和 *rps15-ycf1* 片段对青藏高原及其毗邻山区的蒙古绣线菊进行谱系地理学研究,以期揭示该物种居群内与居群间的遗传分布式样,进而推测其在青藏高原地区的冰期避难所与冰期后扩散历史,探讨蒙古绣线菊现今生物地理分布格局的主要历史成因,为青藏高原地区物种的谱系地理学研究提供一个新的案例。

1 材料和方法

1.1 实验材料

研究材料采自青海、川西、滇西北等青藏高原及其毗邻山区。每个居群随机采集 4~35 个个体,个体之间至少间隔 100 m,共采集到蒙古绣线菊 23 个居群 324 个个体(表 1)。此外,同时选择华北珍珠梅(*Sorbaria kirilowii*; 凭证号 chen2012034,四川若尔盖,103°27'49.1"E,33°40'50.6"N,海拔高度 3 150 m)作为研究中的外类群,一并在野外进行采集。采集植物生长良好的新鲜、幼嫩叶片后,迅速用硅胶干燥并带回实验室于 -20 °C 保存备用。所采集的凭证标本存于中国科学院西北高原生物研究所青藏高原生物标本馆(HNWP)。

表 1 蒙古绣线菊居群采集信息

Table 1 Populations sampling information of *S. mongolica*

编号 Code	采集地 Locality	纬度 Latitude/N	经度 Longitude/E	海拔 Altitude/m	采样数 N
P1	青海湟中 Huangzhong, Qinghai	36°23'	101°33'	3 080	17
P2	甘肃渭源 Weiyuan, Gansu	35°01'	103°59'	2 530	13
P3	四川松潘 Songpan, Sichuan	32°56'	103°42'	3 300	20
P4	四川茂县 Maoxian, Sichuan	32°05'	103°43'	2 240	15
P5	四川泸县 Luxian, Sichuan	31°25'	105°08'	1 900	13
P6	四川红原 Hongyuan, Sichuan	32°46'	102°21'	3 654	35
P7	四川红原 Hongyuan, Sichuan	31°52'	102°40'	3 970	21
P8	四川丹巴 Danba, Sichuan	30°32'	101°37'	3 410	19
P9	云南中甸 Zhongdian, Yunnan	27°34'	99°51'	3 450	4
P10	四川乡城 Xiangcheng, Sichuan	29°07'	99°58'	3 910	11
P11	四川雅江 Yajiang, Sichuan	30°09'	100°40'	4 290	9
P12	四川炉霍 Luhuo, Sichuan	31°37'	100°43'	3 460	5
P13	青海门源 Menyuan, Qinghai	37°24'	101°57'	3 150	13
P14	青海互助 Huzhu, Qinghai	36°20'	101°54'	2 690	13
P15	四川若尔盖 Ruogai, Sichuan	33°36'	103°13'	2 970	21
P16	四川阿坝 Aba, Sichuan	32°48'	102°02'	3 380	15
P17	四川壤塘 Rangtang, Sichuan	32°19'	100°49'	3 430	7
P18	青海平安 Ping'an, Qinghai	36°17'	101°58'	3 160	5
P19	云南玉龙 Yulong, Yunnan	27°02'	100°11'	3 420	6
P20	云南香格里拉 Shangrila, Yunnan	27°37'	99°40'	3 580	10
P21	云南德钦 Deqin, Yunnan	28° 23'	98°59'	4 210	15
P22	四川乡城 Xiangcheng, Sichuan	29°07'	99°37'	3 740	23
P23	四川沙贡 Shagong, Sichuan	29°08'	100°02'	4 610	14

1.2 DNA 的提取与 PCR 扩增

采用改良的 CTAB 法从硅胶干燥的叶片中提取蒙古绣线菊总 DNA^[23], 采用通用引物对所有个体的 cpDNA *trnL-trnF* 和 *rps15-ycf1* 片段进行 PCR 扩增^[24-25]。PCR 扩增反应体系为 25 μL : 2.5 μL 的 10 \times PCR Buffer (含 1.5 mmol/L MgCl_2), 0.3 μL 10 mmol/L dNTP, 正反引物各 1.0 μL (5 pmol/L), *Taq* DNA 聚合酶 (*TaKaRa*, 大连) 1 个单位, 15~30 ng 总 DNA 模板, 用双蒸水补足 25 μL 。PCR 扩增反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 30 个循环的 94 $^{\circ}\text{C}$ 加热变性 1 min, 54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 扩增产物用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳进行电泳检测, 然后用 *TaKaRa* DNA Fragment Purification Kit Ver. 2.0 试剂盒 (*TaKaRa*, 大连) 纯化, 在中国科学院高原生物适应与进化实验室用 ABI 3730 xl 型基因测序仪 (Applied Biosystems, 加拿大) 正反测序。

1.3 数据分析

运用 CLUSTAL X 测序序列进行对位排列^[26], 并加以手工校对。利用 MEGA 6.0.4 软件统计序

列的碱基组成^[27], 利用 DnaSP 软件统计 cpDNA 联合序列的变异位点并确定单倍型^[28]。运用 Arlequin ver 3.5 计算单倍型多样性 (*He*) 和核苷酸多样性 (π)^[29], 中性检验中的 Tajima's D 与歧点分布分析也在 Arlequin 中完成。

利用 Arlequin 软件包中的分子变异分析方法 (AMOVA) 检测居群内和居群间的遗传变异水平, 并对单倍型分布的 F_{ST} 进行评价 (1 000 次重复置换检测)^[30]。运用 PERMUT 软件计算居群内平均遗传多样性 (h_{S})、总遗传多样性 (h_{T})、居群间遗传分化系数 (G_{ST}) 和 (N_{ST})^[31]。其中 G_{ST} 仅考虑单体型频率, 而 N_{ST} 则考虑了单体型频率及其遗传差异。使用 U-统计方法对 G_{ST} 和 N_{ST} 进行比较 (1 000 次重复置换检测) 以检测单倍型变异的地理分布模式。本研究中, 假设 cpDNA 变异处于漂变-迁移平衡 (drift-migration equilibrium), 对于单倍体数据, 物种水平上居群间的平均基因流 $N_{\text{m}} = (1 - F_{\text{ST}}) / 2F_{\text{ST}}$ ^[32-33]。Tajima's D, Fu 和 Li's D^* 两种无限突变位点模型的中性检验方法检测及歧点分布都在 DnaSP 4.0 程序中完成^[34-36]。

单倍型之间的网络关系通过软件 NETWORK^[37]以最大简约法为原则构建了单倍型中央连接网状图(median-joining network)^[38]。在运行该软件时,对于多碱基的插入、缺失或突变位点,被认为是通过一步突变(one step mutation)形成,之后该谱系图进行手工调整。在单倍型 Network 图中,近代起源的单倍型发生在网络图的边缘位置,原始的单倍型多存在于网络图的内部^[39-40]。通过 Mr-Modeltest 2.3 检测进行贝叶斯分析的最优核苷酸替代模型^[41],以随机树为起始树,同时起始 4 条马尔科夫链,3 条热链和 1 条冷链,每隔 100 代保存 1 棵树,共运算 3 000 000 代,弃去前 25% 的预热树,剩余的树用来计算一致树,各分支的后延概率。软件 BEAST 1.7.1 利用贝叶斯马尔可夫链—蒙特卡罗链方法(bayesian MCMC)同时估算分支演化关系和各分支分化年龄^[42]。在核苷酸替代模型选用 GTR+R、分支模型选用 Yule speciation process 的情况下,核苷酸替代速率使用植物 cpDNA 的平均替换速率 1.5×10^{-9} s/s/y 进行计算,以珍珠梅属的化石时间(65 Mya)^[43]标定外类群的共同祖先时间。

所有计算均采用 2 次平行的 MCMC 运算进行,每个平行运算 10 000 000 代,每隔 1 000 代取 1 棵树,弃去前 10% 预热树,保留剩余的 90% 为有效树。利用 Tracer V1.5^[44]计算有效采样规模(ESS);同时,通过 TreeAnnotator 1.7.1(包含在 BEAST 软件包中)基于有效树产生 1 颗分支分化时间树并计算相关参数及其后延分布。最后,利用 FigTree 1.3.1^[45]查看分支分化时间树、各分支的分化时间及其 95% 可信区间(95% HPD)等计算结果。

2 结果与分析

2.1 蒙古绣线菊的单倍型分布

对 23 个居群 324 个个体的 *trnL-trnF* 和 *rps15-ycf1* 片段进行测序,Clustal X 软件对位排列后的矩阵长度为 1 514 bp,通过 DnaSP 软件鉴定出 35 个单倍型(表 3)。在检测出的 35 个单倍型中,单倍型 H1 出现的频率最高,有 105 个个体拥有此单倍型。每个居群的遗传多样性(He)、核苷酸多样性指数(π)、单倍型组成及频率见表 2。

表 2 蒙古绣线菊 23 个居群的单倍型组成、单倍型多样性和核苷酸多样性

Table 2 Haplotypes composition, gene diversity (He) and nucleotide diversity (π) of *S. mongolica* in the 23 populations

编号 Code	单倍型(个体数) Haplotypes(Number of individuals)	单倍型多样性 Gene diversity(He)	核苷酸多样性 Nucleotide diversity (π ; 100X)
P1	H1(17)	0.000 0	0.000 0
P2	H1(4); H2(1); H3(2); H4(4); H5(2)	0.820 5	0.202 9
P3	H2(3); H5(7); H6(3); H7(1); H8(1); H9(1); H10(4)	0.826 3	0.212 5
P4	H1(12); H11(3)	0.342 9	0.183 0
P5	H1(3); H11(10)	0.384 6	0.205 3
P6	H2(33); H5(1); H11(1)	0.112 6	0.049 6
P7	H1(16); H12(1); H13(2); H14(1); H15(1)	0.423 8	0.037 7
P8	H1(12); H12(1); H14(4); H16(1); H17(1)	0.578 9	0.051 8
P9	H17(4)	0.000 0	0.000 0
P10	H1(1); H12(9); H18(1)	0.345 5	0.068 3
P11	H1(6); H19(3)	0.500 0	0.033 5
P12	H20(2); H21(1); H22(2)	0.800 0	0.201 2
P13	H1(6); H4(3); H23(4)	0.692 3	0.056 8
P14	H1(7); H4(5); H24(1)	0.602 6	0.055 0
P15	H1(5); H2(10); H4(4); H25(1); H28(1)	0.709 5	0.183 6
P16	H1(7); H2(7); H26(1)	0.600 0	0.169 1
P17	H1(2); H4(1); H27(4)	0.666 7	0.057 5
P18	H1(1); H4(4)	0.400 0	0.026 8
P19	H29(3); H30(2); H31(1)	0.733 3	0.134 1
P20	H1(1); H30(9)	0.200 0	0.013 4
P21	H12(13); H30(2)	0.247 6	0.049 8
P22	H1(3); H12(5); H30(3); H32(1); H33(1)	0.719 4	0.104 4
P23	H1(2); H12(9); H34(2); H35(1)	0.582 4	0.095 1

2.2 居群遗传结构特征

通过 PERMUT 程序计算得出蒙古绣线菊居群内平均遗传多样性 H_S 值(0.491)、总的遗传多样性 H_T 值(0.884)、居群间遗传分化 G_{ST} 值(0.444)和 N_{ST} 值(0.539)。使用 U-统计方法对蒙古绣线菊单倍型变异的地理结构进行检验后发现 N_{ST} 极显著大于 G_{ST} ($P < 0.01$),表明本研究区域中蒙古绣线菊亲缘关系相近的单倍型发生于同一居群中,存在着明

表 4 蒙古绣线菊 23 个居群的分子遗传变异分析结果

Table 4 Analysis of molecular variance(AMOVA) for the 23 populations of *S. mongolica*

变异来源 Source of variation	自由度 Degree of freedom	总方差 Sum of squares	变异成分 Variance components	变异比例 Percentage of variation/%
居群间 Among populations	22	284.77	0.87	54.50
居群内 Within populations	301	220.27	0.73	45.50
总计 Total	323	505.04	1.60	
固定指数 Fixation index	$F_{ST} = 0.545\ 04 (P < 0.001)$			

显的谱系地理学关系^[46]。分子变异分析(AMOVA)的结果表明,居群间的遗传变异为 54.50%,而居群内的遗传变异为 45.50%, $F_{ST} = 0.545\ 04 (P < 0.001)$,表 4)。假设该片段变异处于漂变-迁移平衡,则基于 F_{ST} 值估算出物种水平上居群间的平均基因流值(N_m)为 0.41。

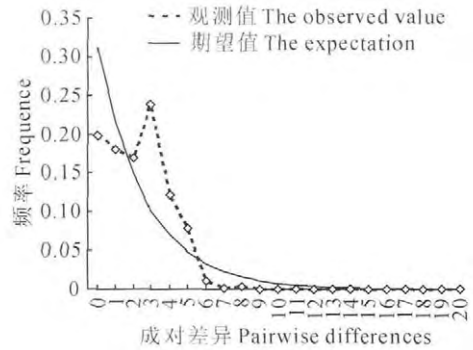


图 1 蒙古绣线菊 324 个体 2 个叶绿体 DNA 片段数据的歧点分布分析

Fig. 1 Mismatch distribution for 324 individuals of *S. mongolica* based on two cpDNA fragments

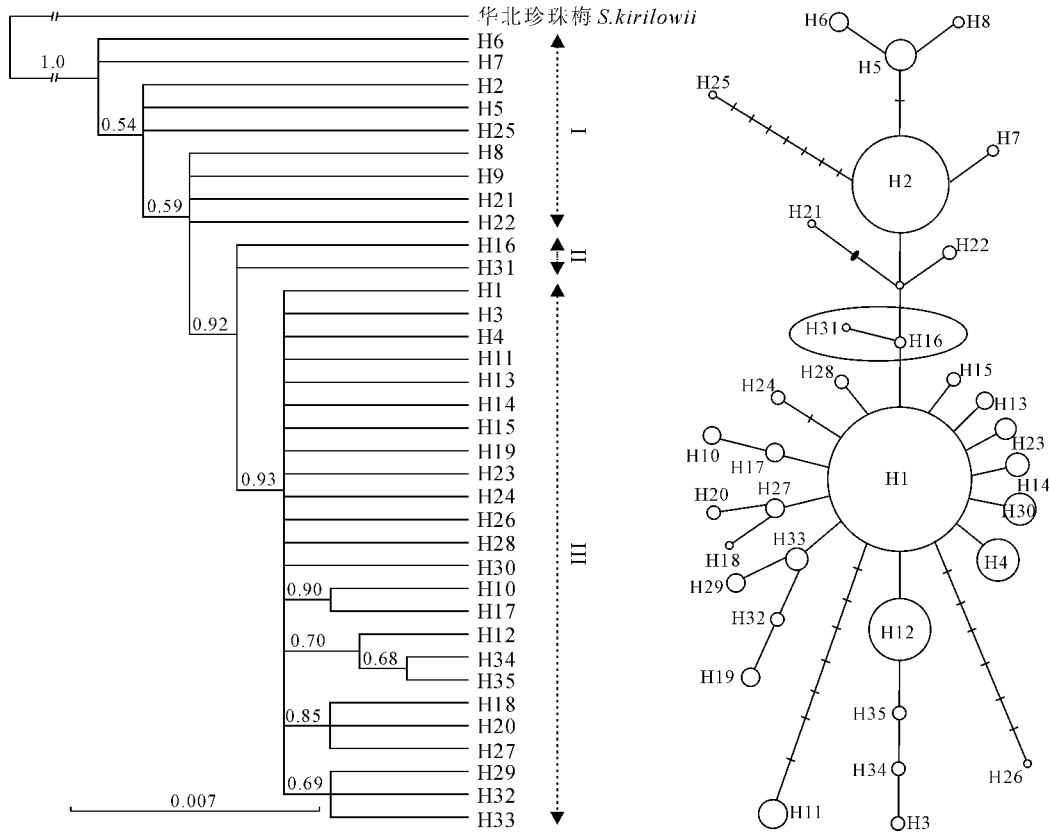


图 2 蒙古绣线菊 35 种单倍型的贝叶斯系统演化树和中央连接网状图
分支上的数字为贝叶斯后验概率

Fig. 2 Phylogenetic tree and median-joining network of 35 haplotypes from *S. mongolica*
Bayesian posterior probabilities are shown on the branches

2.3 cpDNA 联合序列的歧点分布

对蒙古绣线菊 cpDNA 联合序列所有个体进行歧点分布分析的结果表明,在整个蒙古绣线菊的整个分布范围内,观测到的歧点分布呈多峰曲线(图 1),表明在较长的时间内居群大小相对稳定,并处于个体平衡中,没有经历突然的近期扩张。中性检验表明 Tajima's D 值不显著(-1.225 50; $P > 0.10$),符合中性假说,说明种群呈现一个稳定的状态,与歧点分布分析的结果相一致。

2.4 不同单倍型之间的谱系关系

以华北珍珠梅为外类群对蒙古绣线菊的 35 种单倍型进行贝叶斯分析产生的 50% 多数一致树如图 2 左图所示。在贝叶斯系统演化树中,所有的 35 种单倍型聚为 3 个分支(I、II、III)。用 NETWORK 构建的单倍型简约网状图结果与贝叶斯分析产生的系统演化树拓扑结构相似,但是显示单倍型之间的关系更清晰(图 2 右图)。单倍型的网状结构分别以单倍型 H1 和 H2 为中心形成 2 个“星状”系统发育结构。在贝叶斯分析中,分支 III 中有相当数量的单

倍型,如 H1、H3、H4 等,系统位置不能确定。但是在 NETWORK 分析中可以清晰地看到单倍型 H1 是一个较古老的单倍型,经过一步突变分别形成了 H4,而 H3 是由 H1 经过多步突变产生而来。

以珍珠梅属的华北珍珠梅为外类群对蒙古绣线菊的 35 种单倍型各分支进行分子钟模型的分歧时间估算(图 3)。BEAST 分析的 2 次平行 MCMC 运算结果十分相近,因此,为了提高计算精确度,通过 Tracer 1.5 将 2 次运算结果合并;合并后所有相关参数(如:支长、分支支持率和分支年龄)的有效采样范围均大于 300,这表示相关参数的后延分布采样已经充足。惩罚似然方法计算时进行了 100 次重复以计算每个分支年龄的 95% 置信区间。BEAST 分析结果显示,在 4 500 万年左右开始出现蒙古绣线菊的谱系分支的分化。

3 讨论

基因流分析显示蒙古绣线菊居群间基因交流不够频繁,表明蒙古绣线菊的居群内和居群间都存在明显的基因流限制,这与叶绿体 DNA 的传播方式有关,叶绿体 DNA 遗传属于母系遗传,通过种子随风传播。青藏高原和横断山区千沟万壑的复杂地形造就了居群间的地理隔离,同时也严重影响了种子的随风传播距离^[47],从而在一定程度上阻隔了居群间的基因交流。

新衍生出的单倍型往往与原始单倍型形成“星状”结构,原始单倍型一般处于“星状”结构的中心^[2]。蒙古绣线菊的单倍型中央连接网状图呈现以单倍型 H1 为中心的典型的星状结构,表明单倍型 H1 可能是这 35 个单倍型中最原始的单倍型。在所有的单倍型中,H1 出现的频率最高,且发现于大多数的居群中,说明其有共同起源。蒙古绣线菊的 35 个单倍型中,大约 71.4% 是居群内特有的单倍型,这可能是由于气候的强烈浮动导致居群反复收缩和扩张以及种群爆发产生^[2,48]。然而本研究结果显示蒙古绣线菊在历史上曾连续分布,由于青藏高原隆升和冰期间冰期的交替作用使居群片段化,或形成多个避难所,瓶颈效应(bottleneck effect)使得不同单倍型在居群中随机固定,从而形成大量居群特有单倍型。

蒙古绣线菊的单倍型系统演化树显示单倍型分别形成 3 个分支(图 2),这 3 支的地理分布范围各不相同,而这一拓扑结构和单倍型的中央连接网络图结果相一致。单倍型的分歧时间结果显示,分支

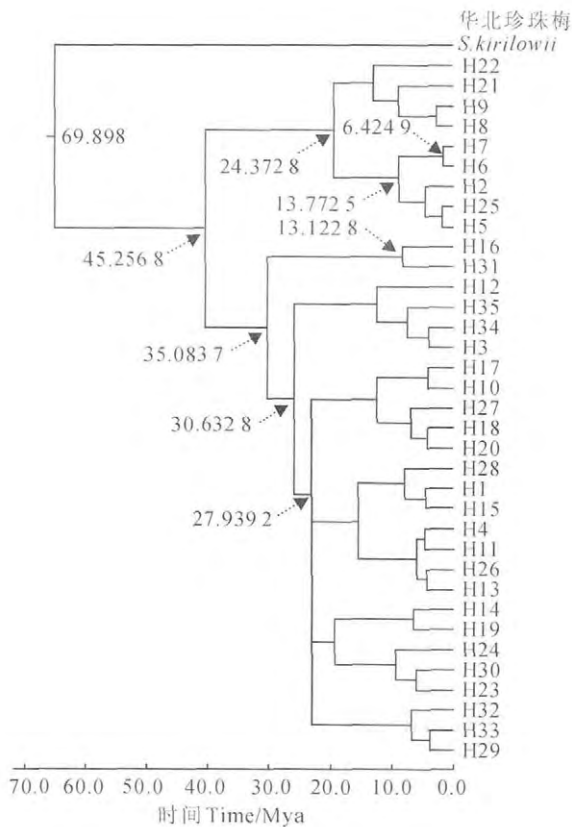


图 3 基于 cpDNA 2 个片段估算蒙古绣线菊 35 种单倍型的分歧时间

Fig. 3 Estimates of dates of divergence among 35 haplotypes from *S. mongolica* based on two cpDNA fragments

I 与另外 2 支(II 和 III)的分歧时间大概在 45 Mya,而这也是印度板块和亚欧板块相撞的时间^[49],两大板块的碰撞导致地理的剧烈变化,并引起了气候的大幅波动,这些变化可能引起了蒙古绣线菊的生境片段化,形成地理隔离,制约了基因流,导致遗传多样性分化,进而促成了不同单倍型出现,并保留下来。分支 II 和 III 这 2 支的分歧时间大概在 35 Mya,张克信等综述了前人工作,认为 45 Mya 到 34 Mya 间,青藏高原和全球气候基本都由温热到逐步降温,青藏高原在 34 Mya 达到最冷^[50],而 35 Mya 的低温气候环境对蒙古绣线菊的生存是一种挑战,这也促成了不同单倍体的形成和保留,最终导致分支 II 和 III 在这个阶段发生分歧。青藏高原的隆起过程很复杂,这期间也经历多次冰期与间冰期的反复^[51],复杂而历时久长的过程可能是蒙古绣线菊现今的分布格局和居群遗传多样性形成的一个主要因素。

对蒙古绣线菊单倍型变异的地理结构检验结果为 N_{ST} 极显著的大于 G_{ST} ($P < 0.01$),表明本研究中蒙古绣线菊亲缘关系相近的单倍型发生于同一居群中,存在着明显的分子系统地理学关系。在本研究区域主要存在 3 个相对独立的特有单倍型分布地区,分别是北部(P1、P13、P14 和 P18 所在的青海省东北部地区)、中部(P3、P6、P15 和 P16 所在的地区)以及南部(P7、P17、P22、P23、P10、P21、P20、P19 和 P9 所在的横断山区)。这 3 个区域的居群的单倍型都很丰富,且均发现一定数量的特有单倍型。冰期避难所假说认为,高遗传多样性的且有古老单倍型和较多特有单倍型的区域可能是该物种的冰期避难所,而不是简单的交融与混合(admixture)^[52-53]。单避难所假说认为,扩散地区不管是在居群间还是

居群内部都有着较低的遗传多样性,而且距离避难所越远,遗传多样性和单倍型的数量越低^[48,54-55]。本研究结果显然不支持蒙古绣线菊在冰期只有一个避难所,前文所述的 3 个区域可能是蒙古绣线菊的冰期避难所。多避难所假说得到青藏高原没有大冰盖的事实的支持,在没有被冰覆盖的呈片段化存在的地方可以让物种延续下来。这与之前青藏高原地区同属植物高山绣线菊(*Spiraea alpina*)的研究结果相一致^[56-57]。北部和中部避难所同属青藏高原东部边缘,青藏高原东部边缘存在蒙古绣线菊的冰期避难所这一结果与窄叶鲜卑花(*Sibiraea angustata*)^[58]、祁连圆柏(*Juniperus przewalskii*)^[59]、全缘叶绿绒蒿(*Meconopsis integrifolia*)^[60]等研究结果相吻合。蒙古绣线菊的 3 个避难所中,分支 II 上的单倍型仅分布在中部,而中部的众居群中也存在分支 III 和分支 I 上的一些单倍型,而这些单倍型也有偏向地分布于南部或北部,这表明蒙古绣线菊在冰期分别分布在 3 个避难所中,在冰期过去之后,各居群有并不迅猛的扩张,生境有所扩大,中部避难所也成了 3 个避难所的蒙古绣线菊的交融地带,最终形成现在的分布格局。

蒙古绣线菊在青藏高原地区的这种谱系地理结构与偏花报春(*Primula secundiflora*)^[61]、高山绣线菊^[56]等研究相一致,表明青藏高原地区的多个物种在第四纪冰期时存在不止一处且相互隔离的避难所。蒙古绣线菊现今的生物地理分布格局是第四纪冰期-间冰期气候动荡和青藏高原隆升的共同作用的结果。这一研究提供了青藏高原地区一个新的谱系地理学研究案例,丰富了对第四纪冰期青藏高原生物避难所和生物地理分布格局成因的理解。

参考文献:

- [1] AVISE J C, ARNOLD J, BALL R M, et al. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics[J]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1987, 18: 489-522.
- [2] AVISE J C. Phylogeography: the history and formation of species[M]. Cambridge: Harvard University Press, 2000.
- [3] SCHÖNSWETTER P, STEHLIK I, HOLDEREGGER R, et al. Molecular evidence for glacial refugia of mountain plants in the European Alps[J]. *Molecular Ecology*, 2005, 14(11): 3 547-3 555.
- [4] JARAMILLO-CORREA J P, BEAULIEU J, BOUSQUET J. Variation in mitochondrial DNA reveals multiple distant glacial refugia in black spruce(*Picea mariana*), a transcontinental North American conifer[J]. *Molecular Ecology*, 2004, 13(9): 2 735-2 747.
- [5] HEWITT G M. Post-glacial re-colonization of European biota[J]. *Biological Journal of the Linnean Society*, 1999, 68(1-2): 87-112.
- [6] HEWITT G M. Speciation, hybrid zones and phylogeography—or seeing genes in space and time[J]. *Molecular Ecology*, 2001, 10(3): 537-549.
- [7] 施雅风, 李吉均, 李炳元. 青藏高原晚新生代隆升与环境变化[M]. 广州: 广东科技出版社, 1998.
- [8] MYERS N, MITTERMEIER R A, MITTERMEIER C G, et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities[J]. *Nature*, 2000, 403(6 772): 853-858.

- [9] PAN B T(潘保田), LI J J(李吉均). Qinghai-Tibetan Plateau: A driver and amplifier of the global climatic change: III. The effects of the uplift of Qinghai-Tibetan Plateau on Climatic Changes[J]. *Journal of Lanzhou University*(Nat. Sci. Edi.) (兰州大学学报·自然科学版), 1996, **32**(1): 108—115.
- [10] 李吉均, 方小敏, 朱俊杰. 青藏高原形成演化, 环境变迁与生态系统研究[M]. 北京: 科学出版社, 1995, 53: 41—53.
- [11] CHANG D H. The Tibetan Plateau in relation to the vegetation of China[J]. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 1983, 564—570.
- [12] QIU Y X, FU C X, COMES H P. 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]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2011, **59**(1): 225—244.
- [13] MENG L, YANG R, ABBOTT R J, *et al.* Mitochondrial and chloroplast phylogeography of *Picea crassifolia* Kom. (Pinaceae) in the Qinghai-Tibetan Plateau and adjacent highlands[J]. *Molecular Ecology*, 2007, **16**(19): 4 128—4 137.
- [14] YANG F S, LI Y F, DING X, *et al.* Extensive population expansion of *Pedicularis longiflora* (Orobanchaceae) on the Qinghai-Tibetan Plateau and its correlation with the Quaternary climate change[J]. *Molecular Ecology*, 2008, **17**(23): 5 135—5 145.
- [15] WANG L, ABBOTT R J, ZHENG W, *et al.* History and evolution of alpine plants endemic to the Qinghai-Tibetan Plateau: *Aconitum gymnantrum* (Ranunculaceae)[J]. *Molecular Ecology*, 2009, **18**(4): 709—721.
- [16] GAO Q, ZHANG D, CHEN S, *et al.* Chloroplast DNA phylogeography of *Rhodiola alsia* (Crassulaceae) in the Qinghai-Tibet Plateau[J]. *Botany*, 2009, **87**(11): 1 077—1 088.
- [17] GAO Q, ZHANG D, DUAN Y, *et al.* Intraspecific divergences of *Rhodiola alsia* (Crassulaceae) based on plastid DNA and internal transcribed spacer fragments[J]. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2012, **168**(2): 204—215.
- [18] LIU J Q, SUN Y S, GE X J, *et al.* Phylogeographic studies of plants in China: advances in the past and directions in the future[J]. *Journal of Systematics and Evolution*, 2012, **50**(4): 267—275.
- [19] LU L D(陆玲娣). The evolution and distribution of subfam. Spiraeoideae(Rosaceae) of China, with special reference to distribution of the subfamily in the world[J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica* (植物分类学报), 1996, **34**(4): 361—375.
- [20] LU L D, GU C Z, LI C L, *et al.* Rosaceae in Flora of China[M]. Beijing: Science Press & Missouri; Missouri Botanical Garden Press, 2003: 46—434.
- [21] ZHANG F Q, GAO Q B, ZHANG D J, *et al.* Phylogeography of *Spiraea alpina* (Rosaceae) in the Qinghai-Tibetan Plateau inferred from chloroplast DNA sequence variations[J]. *Journal of Systematics and Evolution*, 2012, **50**(4): 276—283.
- [22] ZHANG F Q(张发起), GAO Q B(高庆波), DUAN Y ZH(段义忠), *et al.* Phylogeography of *Spiraea alpina* (Rosaceae) in Hengduan Mountains[J]. *Guihaia* (广西植物), 2012, **32**(5): 617—623.
- [23] DOYLE J, DOYLE J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material[J]. *Phytochemical Bulletin*, 1987, 19: 11—15.
- [24] TABERLET P, GIELLY L, PAUTOU G, *et al.* Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA[J]. *Plant Molecular Biology*, 1991, **17**(5): 1 105—1 109.
- [25] SCARCELLI N, BARNAUD A, EISERHARDT W, *et al.* A set of 100 chloroplast DNA primer pairs to study population genetics and phylogeny in monocotyledons[J]. *PLoS One*, 2011, **6**(5): e19954.
- [26] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAK F, *et al.* The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, **25**(24): 4 876—4 882.
- [27] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, *et al.* MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6. 0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, **30**(12): 2 725—2 729.
- [28] ROZAS J, ROZAS R. DnaSP, DNA sequence polymorphism: an interactive program for estimating population genetics parameters from DNA sequence data[J]. *Computer Applications in the Biosciences; CABIOS*, 1995, **11**(6): 621—625.
- [29] EXCOFFIER L, LISCHER H E. Arlequin suite ver 3. 5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2010, **10**(3): 564—567.
- [30] WEIR B S, COCKERHAM C C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure[J]. *Evolution*, 1984: 1 358—1 370.
- [31] GRIVET D, PETIT R. Phylogeography of the common ivy (*Hedera* sp.) in Europe: genetic differentiation through space and time[J]. *Molecular Ecology*, 2002, **11**(8): 1 351—1 362.
- [32] NEI M. Molecular Evolutionary Genetics[M]. New York: Columbia University Press, 1987.
- [33] SLATKIN M. Gene flow in natural populations[J]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1985, 16: 393—430.
- [34] TAJIMA F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism[J]. *Genetics*, 1989, **123**(3): 585—595.
- [35] FU Y X, LI W H. Statistical tests of neutrality of mutations[J]. *Genetics*, 1993, **133**(3): 693—709.
- [36] ROGERS A R, HARPENDING H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1992, **9**(3): 552—569.
- [37] WEIR B S, OTT J. Genetic data analysis II [J]. *Trends in Genetics*, 1997, **13**(9): 379.

- [38] BANDEL T H J, FORSTER P, RÖHL A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1999, **16**(1): 37–48.
- [39] GOLDING G. The detection of deleterious selection using ancestors inferred from a phylogenetic history[J]. *Genetical Research*, 1987, **49**(1): 71–82.
- [40] CRANDALL K A, TEMPLETON A R. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction[J]. *Genetics*, 1993, **134**(3): 959–969.
- [41] NYLANDER J. MrModeltest v2. Program distributed by the author[M]. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, 2004, 2.
- [42] DRUMMOND A J, RAMBAUT A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2007, **7**(1): 214.
- [43] TONG X D(佟希达), YANG X J(杨秀娟), LI ZH(李 珍), *et al.* A general review of the vegetation of Heilongjiang Province from late cretaceous to cenozoic[J]. *Bulletin of Botanical Research(植物研究)*, 1995, (2): 269–274.
- [44] RAMBAUT A A. Drummond. Tracer v1. 5. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer>, 2007.
- [45] RAMBAUT A. FigTree v1. 3. 1. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>, 2009.
- [46] PONS O, PETIT R. Measwring, testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles[J]. *Genetics*, 1996, **144**(3): 1 237–1 245.
- [47] EHRICH D, GAUDEUL M, ASSEFA A, *et al.* Genetic consequences of Pleistocene range shifts; contrast between the Arctic, the Alps and the East African Mountains[J]. *Molecular Ecology*, 2007, **16**(12): 2 542–2 559.
- [48] HEWITT G. The genetic legacy of the Quaternary ice ages[J]. *Nature*, 2000, **405**(6 789): 907–913.
- [49] GARZANTI E, VAN H T. The Indus clastics; forearc basin sedimentation in the Ladakh Himalaya(India)[J]. *Sedimentary Geology*, 1988, **59**(3): 237–249.
- [50] ZHANG K X(张克信), WANG G C(王国灿), HONG H L(洪汉烈), *et al.* The study of the Cenozoic uplift in the Tibetan Plateau: A review[J]. *Geological Bulletin of China(地质通报)*, 2013, **32**(1): 1–18.
- [51] LI J J(李吉均), FANG X M(方小敏). Study on the Tibet Plateau uplift and environmental changes[J]. *Chinese Science Bulletin(科学通报)*, 1998, **43**(15): 1 568–1 574.
- [52] PETIT R J, AGUINAGALDE I, DE BEAULIEU J L, *et al.* Glacial refugia; hotspots but not melting pots of genetic diversity[J]. *Science*, 2003, **300**(5 625): 1 563–1 565.
- [53] PROVAN J, BENNETT K. Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia[J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2008, **23**(10): 564–571.
- [54] HEUERTZ M, FINESCHI S, ANZIDEI M, *et al.* Chloroplast DNA variation and postglacial recolonization of common ash(*Fraxinus excelsior* L.) in Europe[J]. *Molecular Ecology*, 2004, **13**(11): 3 437–3 452.
- [55] PETIT R J, DUMINIL J, FINESCHI S, *et al.* Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations[J]. *Molecular Ecology*, 2005, **14**(3): 689–701.
- [56] ZHANG F Q(张发起), GAO Q B(高庆波), DUAN Y ZH(段义忠), *et al.* Phylogeography of *Spiraea alpina* (Rosaceae) in Hengduan Mountains[J]. *Guihaia(广西植物)*, 2012, **32**(5): 617–623.
- [57] ZHANG F Q(张发起), GAO Q B(高庆波), LI Y H(李印虎), *et al.* Molecular analysis of *Spiraea rosthornii* and *Spiraea myrtilloides* [J]. *Journal of Biology(生物学杂志)*, 2012b, **29**(4): 47–50.
- [58] DUAN Y, GAO Q, ZHANG F, *et al.* Phylogeographic analysis of the endemic species *Sibiraea angustata* reveals a marginal refugium in the Qinghai-Tibet Plateau[J]. *Nordic Journal of Botany*, 2011, **29**(5): 615–624.
- [59] ZHANG Q, CHIANG T Y, GEORGE M, *et al.* Phylogeography of the Qinghai-Tibetan Plateau endemic *Juniperus przewalskii* (Cupressaceae) inferred from chloroplast DNA sequence variation[J]. *Molecular Ecology*, 2005, **14**(11): 3 513–3 524.
- [60] YANG F S, QIN A L, LI Y F, WANG X Q. Great genetic differentiation among populations of *Meconopsis integrifolia* and its implication for plant speciation in the Qinghai-Tibetan Plateau[J]. *Plos One*, 2012, **7**(5): e37196.
- [61] WANG F Y, GONG X, HU C M, *et al.* Phylogeography of an alpine species *Primula secundi flora* inferred from the chloroplast DNA sequence variation[J]. *Journal of Systematics and Evolution*, 2008, **46**: 13–22.