

基于叶绿体DNA *trnL-F* 序列研究肋果沙棘的谱系地理学

^{1,2,3}孟丽华 ¹杨慧玲 ²吴桂丽 ^{1,2}王玉金*

¹(中国科学院西北高原生物研究所高原生物适应与进化重点实验室 西宁 810008)

²(兰州大学生命科学学院干旱与草地重点实验室 兰州730000)

³(中国科学院研究生院 北京 100049)

Phylogeography of *Hippophae neurocarpa* (Elaeagnaceae) inferred from the chloroplast DNA *trnL-F* sequence variation

^{1,2,3}Li-Hua MENG ¹Hui-Ling YANG ²Gui-Li WU ^{1,2}Yu-Jin WANG*

¹(Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China)

²(MOE Key Laboratory of Arid and Grassland Ecology, School of Life College, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

³(Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract The topological effect of the Qinghai-Tibetan Plateau during the Quaternary climatic oscillation must have important effects on spatial distribution and genetic structure of organisms distributed there. At the same time, the ecological niches provided by the uplifts of the plateau and the following Quaternary climatic changes may have promoted morphological differentiation and speciation of plants occurring there. The plateau endemic *Hippophae neurocarpa* (Elaeagnaceae) is a dominant shrub species along the streams or rivers and it also occurs in the semiarid ecosystem. This species is recognized as two separate subspecies, i.e. ssp. *neurocarpa* and ssp. *stellatopilosa*, mainly according to the appendages on leaves and different habitat preferences. The former is characteristic of scale-like appendages on the leaves and distributed in the drier and colder habitats while the latter has stellate hairs with a preference of occurring in the wetter and warmer habitats. It is interesting to know whether the morphological sub-speciation of *H. neurocarpa* is correlated with the intra-specific chloroplast phylogeny. In addition, this species also provide a good proxy to test the hypothesis that a few cold- or dry-tolerating species survive in the high altitude region of the plateau during the Quaternary glacial stages. In this study, we examined chloroplast *trnL-F* sequence variation from both subspecies of *H. neurocarpa*. The chloroplast genome was found to be maternally inherited in *Hippophae* and the intraspecific genealogy may reflect the maternal lineage sorting between both subspecies. A total of eight haplotypes were recovered through sequencing 70 individuals from 14 populations. One was shared by both subspecies, and four and three were only found in ssp. *neurocarpa* and ssp. *stellatopilosa* respectively. These findings suggested that two subspecies did not show genealogical concordance with morphological differentiation in this fragment. The constructed nested cladogram classified eight haplotypes into three lineages: one consisted of endemic haplotypes of ssp. *neurocarpa* and the other two included haplotypes from both subspecies with those of ssp. *neurocarpa* at the tip positions. In addition, the unique haplotypes recovered in the high altitude suggested that this species might have survived in these arid habitats. The contiguous range expansion was detected from these different refugia.

Key word contiguous range expansion, cpDNA, *Hippophae neurocarpa*, phylogeography, Qinghai-Tibetan Plateau, refugia, sub-speciation, *trnL-F*.

摘要 由于青藏高原的地理效应, 第四纪冰期气候的反复变化应对现今该地区生物的地理分布及其居群遗传结构产生重大影响。肋果沙棘 *Hippophae neurocarpa* 是青藏高原地区的一个特有种, 根据叶上的附属物(星状鳞毛或者鳞片状鳞毛)分为两个亚种: 肋果沙棘亚种 subsp. *neurocarpa* 和密毛肋果沙棘亚种 subsp. *stellatopilosa*。依据母系遗传的叶绿体DNA片段对该物种谱系地理学进行研究不仅能阐明该物种冰期避难所, 而且对于理解两个亚种的母系分化也具有重要意义。共对两个亚种14居群的70个个体的 *trnL-F* 序列进行了测序, 共发现8种单倍型, 其中5种单倍型出现在肋果沙棘亚种中, 4种出现在密毛肋果沙棘亚

2007-02-12收稿, 2007-04-20收修改稿。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: yujinwang@gmail.com)。

种中, 两个亚种共享一种单倍型。种内谱系分化与两个亚种形态上的分化不一致。嵌套进化分支把8种单倍型分为三支: 一支为肋果沙棘亚种, 其他两支中两个亚种单倍型嵌套组成, 且肋果沙棘亚种处于进化末端。我们的研究结果还表明肋果沙棘在冰期可能在高海拔地区存在多个避难所, 并且存在来自避难所的邻域扩张。

关键词 邻域扩张; 叶绿体DNA; 肋果沙棘; 谱系地理学; 青藏高原; 避难所; 亚种分化; *trnL-F*序列

植物对环境与气候变化的响应表现为表型、生理和地理分布区的改变以及适应性进化(或者新的物种产生)(Etterson & Shaw, 2001)。物种分布区的变化不可避免地影响种群的遗传结构(Hartl & Clark, 1997); 因此, 对一个种群遗传结构的研究可以追溯植物种群的历史分布过程(Abbott et al., 2000; Hewitt, 2000; Petit et al., 1997, 2003, 2004)。以此为主要研究目的发展起来的谱系地理学(phylogeography), 还将物种分化和基因谱系的筛选作为其主要内容之一(Newton et al., 1999; Avise, 2000)。青藏高原是全世界最高最大的高原, 海拔高度平均在4500 m以上, 是全球气候与环境变化最为强烈的地区(施雅风等, 1998)。尽管该地区在冰期没有像欧洲、北极或者北美发生大规模的冰盖, 但在冰期产生的区域地理气候必将对青藏高原地区和周围地区分布的动植物产生重要影响, 造成物种的消退或扩张以及形态分化。通过对该地区一些森林物种的研究发现, 他们的种群遗传结构明显存在环境变迁带来的遗传痕迹(genetic signature)(Song et al., 2003; 杨瑞等, 2005; 张茜等, 2005; Zhang et al., 2005)。

肋果沙棘*Hippophae neurocarpa* S. W. Liu & T. N. He主要分布在青藏高原的高海拔地区, 包括青海、西藏、四川和甘肃4个省份。该物种在形态上可明显分为两个亚种: 密毛肋果沙棘*ssp. stellatopilosa*和肋果沙棘*ssp. neurocarpa* (廉永善, 2000)。它们之间的主要区别在于: 前者叶片下面密被星状鳞毛, 叶缘明显反卷; 而后者叶片下面密被鳞片状鳞毛, 叶缘通常平展。两个亚种的分布格局比较特殊: 密毛肋果沙棘主要分布在高原南边, 而肋果沙棘分布在高原北面。高原从南到北不仅存在温度的递减, 而且还存在降雨量的差异(施雅风等, 1998)。两个亚种形态分化是否具有相应的遗传谱系分化是令人十分感兴趣的问题。更为重要的是高海拔分布的该物种应对气候变迁的响应更为显著, 在第四纪全球气候震荡中可能存在比较明显的种群大小和分布范围变化, 因而

十分适合作为该地区的一个模式种来研究高山植物的谱系地理学。

DNA测序技术是目前谱系地理学研究中运用最广的技术之一(Chiang et al., 2001)。而植物谱系地理学研究中主要集中研究叶绿体DNA(chloroplast DNA, cpDNA)片段: 该基因组具有分子量小、单亲遗传、多拷贝、结构简单及碱基序列重组少等特点, 有利于进行遗传分析(Clegg et al., 1994)。此外, 植物叶绿体基因的某些区域, 特别是一些非编码区域存在相对较高的核苷酸置换率(Hamilton, 1999), 不仅适合于重建物种之间的亲缘关系(Liu et al., 2002, 2006; 王玉金等, 2004; Wang et al., 2005, 2007), 同样也适合于种内的谱系地理学(Zhang et al., 2005, 2006)。沙棘属的cpDNA是母系遗传(Bartish et al., 2002, 2006), 因而利用该DNA片段构建的谱系地理学分布格局可用来阐明以种子作为传播途径的种群变化。在本研究中, 我们对肋果沙棘2个亚种14个种群70个个体的cpDNA *trnL-F*片段进行了测序, 主要目的是通过初步取样的研究, 回答如下两个关键问题: (1)该物种是否在冰期以及冰期后的气候变迁中存在强烈的种群动态变化? (2)两个亚种是否存在明显的遗传分化, 具有不同的单倍型?

1 材料和方法

1.1 样品采集

青藏高原地区的肋果沙棘原始灌木林, 每个居群内取样个体之间至少间隔100 m, 按分布可以分为两个地理区域: 包括高原北部的7个居群(居群1-7, 为肋果沙棘亚种的居群)和南部的7个居群(居群8-14, 为亚种密毛肋果沙棘的居群), 每个居群初步取样5个, 共70个个体(表1)。野外采集叶片, 硅胶迅速干燥后带回实验室。肋果沙棘两个亚种在四川西北部都有分布, 但亚种之间的形态分化不明显, 从形态上看可能存在亚种之间的杂交。更为重要的是, 这里分布的两个亚种

表1 肋果沙棘材料来源(1-7, 肋果沙棘; 8-14, 密毛肋果沙棘)及叶绿体 $trnL-F$ 单倍型在各居群中的个体数, 单倍型多样性指数(h)及核苷酸多样性指数(π)**Table 1** Origin of materials, individuals of haplotype, estimates of haplotype diversity (h) and nucleotide diversity (π) in the 14 populations (1-7, ssp. *neurocarpa*; 8-14, ssp. *stellatopilosa*) of *Hippophae neurocarpa*

居群号 Popula- tion No.	采样地 Locality	纬度 Latitude	经度 Longitude	海拔 Alt. (m)	样本数 n	个体数 No. of individuals								单倍型多样 性指数 h	核苷酸多样 性指数 π
						H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8		
1	四川石渠 Shiqu, Sichuan	32°59'	098°20'	3970	5	0	2	0	0	0	0	0	3	0.6000	0.1000
2	青海玛沁 Maqên, Qinghai	34°34'	099°54'	3750	5	0	0	3	0	2	0	0	0	0.6000	0.0545
3	青海祁连 Qilian, Qinghai	38°08'	100°39'	3100	5	0	0	3	2	0	0	0	0	0.6000	0.0545
4	青海天峻 Tianjun, Qinghai	37°15'	099°06'	3370	5	0	0	5	0	0	0	0	0	0.0000	0.0000
5	青海格尔木 Golmud, Qinghai	35°53'	093°51'	4030	5	0	0	5	0	0	0	0	0	0.0000	0.0000
6	青海曲麻莱 Qumarlêb, Qinghai	34°52'	095°49'	4070	5	0	5	0	0	0	0	0	0	0.0000	0.0000
7	甘肃玛曲 Maqu, Gansu	34°06'	101°41'	3340	5	0	0	4	1	0	0	0	0	0.4000	0.0364
8	青海玉树 Yushu, Qinghai	33°01'	097°06'	3620	5	0	5	0	0	0	0	0	0	0.0000	0.0000
9	青海玉树 Yushu, Qinghai	32°39'	096°36'	3960	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0.0000	0.0000
10	青海囊谦 Nangqên, Qinghai	32°21'	096°26'	3680	5	0	0	0	0	0	3	2	0	0.6000	0.0545
11	西藏类乌齐 Leiwuqi, Xizang	31°12'	096°36'	3800	5	4	0	0	0	0	1	0	0	0.4000	0.0364
12	西藏类乌齐 Riwoqê, Xizang	31°11'	096°29'	3950	5	4	0	0	0	0	1	0	0	0.4000	0.0364
13	西藏江达 Jomda, Xizang	31°22'	096°21'	3920	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0.0000	0.0000
14	西藏丁青 Dêngqên, Xizang	31°28'	095°25'	4190	5	2	0	0	0	0	3	0	0	0.6000	0.0545

与中国沙棘 *H. rhamnoides* L. 存在比较频繁的杂交和基因流(Sun et al., 2002, 2003, 2006), 因而对于分析肋果沙棘两个亚种之间的分化以及利用单倍型多样性来推导冰期避难所存在问题。因此本文的研究未包括这些居群, 所选择的居群在形态上都是能非常明显地区分为两个亚种, 不存在形态上的过渡性的材料。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA分析

依据CTAB法(Doyle & Doyle, 1987)从硅胶干燥的叶片中提取总DNA。对cpDNA的 $trnL-F$ 区段进行PCR扩增, 使用通用引物c (CGAAATCGGTAGACGCTACG) 和 f (ATT-TGAAGTGGTGACACGAG) (Taberlet et al., 1991)。PCR反应体系在25 μ L体积中进行, 包括植物DNA 10-40 ng, Tris-HCl 50 mmol/L, MgCl₂ 1.5 mmol/L, BSA 250 μ g, dNTPs 0.5 mmol/L及正反引物各6.25

pmol和Taq DNA聚合酶0.75单位。反应程序如下: 先在94 $^{\circ}$ C条件下变性4 min, 接以94 $^{\circ}$ C 50 s, 52 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 1.30 min, 循环32次, 最后在72 $^{\circ}$ C条件下延伸7 min。扩增得到的PCR产物用CASpure PCR Purification Kit纯化试剂盒(上海中科开瑞生物芯片科技股份有限公司)按被推荐的步骤纯化; 用于序列测序的引物是可以测定整个扩增 $trnL-F$ 区段的, 与扩增引物相同; 用Amersham公司的DYEnamic Dye Terminator Cycle Sequencing Kit进行测序PCR扩增, 条件为: 94 $^{\circ}$ C 15 s, 50 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 90 s, 循环25次。产物用Amersham公司的Autoseq 96 Plates纯化, 在MegaBACE 500 DNA Analysis System (Amersham Biosciences)上进行测序。共对70个个体进行了PCR扩增片段的全序列测序(每个居群测序的个体数目见表1)。用CLUSTAL X (Thompson et al., 1997)软件对测定的序列进行对

位排序, 并加以手工校对。

1.2.2 数据处理 基因的遗传多样性 H_S 和 H_T (分别为居群内和居群间平均遗传多样性)以及居群遗传分化 G_{ST} 和 N_{ST} 值(Raymond & Pousset, 1995)等依照Pons和Petit (1996)所描述的方法, 用程序PERMUT计算。居群间的 N_{ST} 值用1000次置换进行置换检验(Burban et al., 1999)。我们利用这些多样性计算结果检验单倍型变异的地理分布模式。

应用ARLEQUIN软件包(version 3.0; Excoffier et al., 2005)对全部居群和两区域(两亚种的分布区)的单倍型指数 h (Nei, 1987), 核苷酸多样性指数 π 以及中性检验统计值进行计算。为了推导目前的居群结构和居群历史, 根据Templeton等(1992)所给出的原理创建单倍型的系统嵌套分支图。利用GEODIS (version 2.4; Posada et al., 2000)进行嵌套分支分析(NCA)。

2 结果

对14个居群70个个体(每个居群5个)进行了叶绿体非编码DNA *trnL-F*片段的全序列测定; 通过排序发现, 所有个体的序列长618–622 bp; 碱基序列分析结果显示, 共存在8种单倍型, 即H1–H8 (如表2; GenBank注册号: AYD14056–AYD14065)。这8种单倍型是由7个位点的差异引起的。在165、334、431、556、588和605位点处分别发生了一个碱基的替换(C↔T, C↔T, A↔T, C↔T, C↔A, C↔T), 在559位点处发生了一个5 bp的插入或者缺失。

每一个居群单倍型的地理分布情况见图1。高原北部的居群(居群1–7, 亦即肋果沙棘亚种的居群)共有5种单倍型, 分别是H2、H3、H4、H5和H8, 单倍型H3占有绝对优势, H5、H8仅分别在居群2和1中出现; 高原南部的居群(居群8–14, 即亚种密毛肋果沙棘的居群)共有4种单倍型, 分别是H1、H2、H6和H7, 单倍型H1和H6分布较为广泛, H7只在居群10

表2 肋果沙棘*trnL-F* 8种单倍型之间的序列区别

Table 2 The *trnL-F* sequence difference among the eight recovered haplotypes in *Hippophae neurocarpa*

单倍型 Haplotype	核苷酸位点 Site						
	1	3	4	5	5	5	6
	6	3	3	5	5	8	0
	5	4	1	6	9	8	5
H1	C	C	A	T	GTGAT	C	T
H2	T	C	T	T	–	A	T
H3	C	T	T	C	GTGAT	A	T
H4	T	T	T	C	GTGAT	A	T
H5	C	T	T	C	GTGAT	A	C
H6	C	C	T	T	GTGAT	C	T
H7	T	C	T	T	GTGAT	C	T
H8	C	C	T	T	–	A	T

表3 肋果沙棘两个亚种遗传多样性

Table 3 Genetic diversity of two subspecies in *Hippophae neurocarpa*

多样性参数 Diversity parameters	种 species	肋果沙棘亚种 ssp. <i>Neurocarpa</i>	密毛肋果沙棘亚种 ssp. <i>stellatopilosa</i>
H_S	0.300 (0.0749)	0.314 (0.1143)	0.286 (0.1056)
H_T	0.847 (0.0280)	0.676 (0.1296)	0.726 (0.0824)
G_{ST}	0.646 (0.0867)	0.535 (0.1648)	0.606 (0.1767)
V_S	0.123 (0.0348)	0.112 (0.0408)	0.171 (0.0765)
V_T	0.793 (0.0581)	0.710 (0.1965)	0.603 (0.1655)
N_{ST}	0.845 (0.0466)	0.842 (0.0732)	0.716 (0.1605)
$N_{ST} - G_{ST}$	0.199**	0.307**	0.110**

** 表示在 $P < 0.01$ 的水平上与零是有显著性差异的。

** significantly different from 0 ($P < 0.01$).

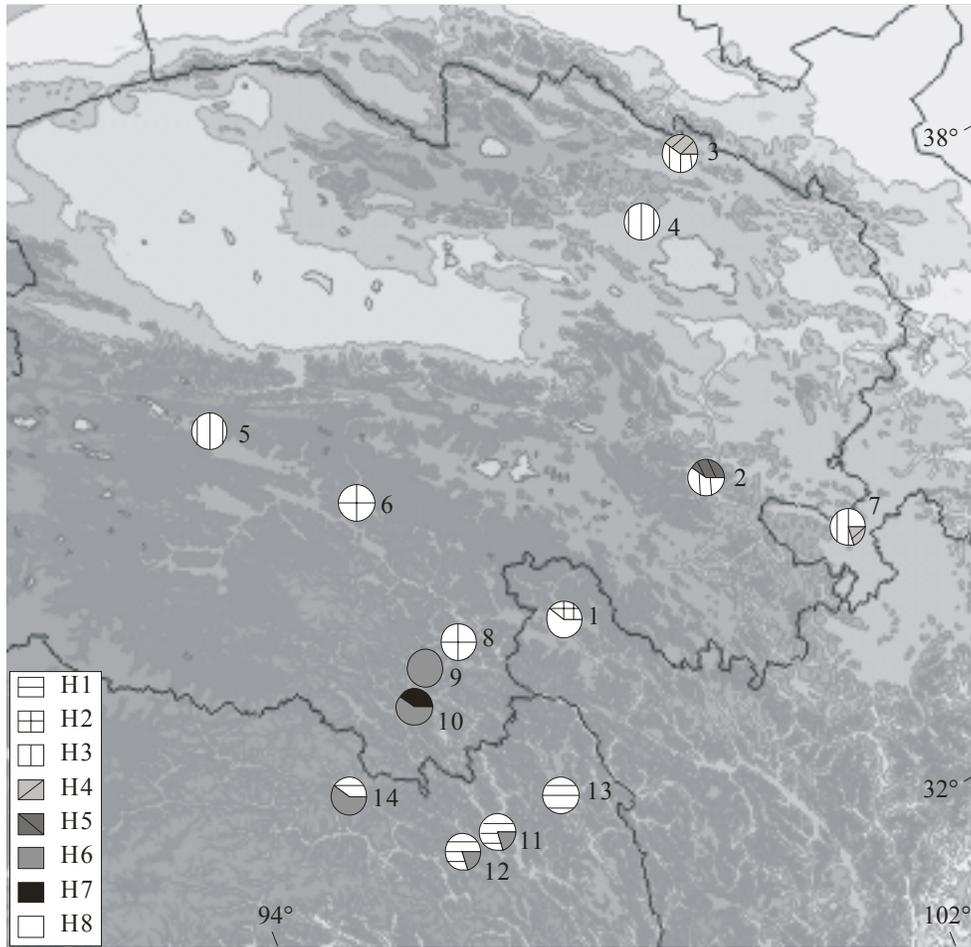


图1 肋果沙棘两个亚种(1-7, 肋果沙棘亚种; 8-14密毛肋果沙棘亚种)取样居群的地理分布及相应的单倍型
 Fig. 1. The sampled populations (1-7, *ssp. neurocarpa*; 8-14, *ssp. stellatopilosa*) and the recovered haplotypes in *Hippophae neurocarpa* in the present study.

中存在; 8种单倍型中仅有单倍型H2共存于两个地区, 亦即两个亚种共享。

由ARLEQUIN计算出每个居群的 h , 平均值为0.30 (0.00-0.60); π 平均值为0.0305 (0-0.0545) (表1, 4)。中性检验见表4, 在划分的3个组中, 无论Tajima还是Fu和Li的检验值 D 或者 D^* 均不违背零假设, 表明 $trnL$ -F片段在肋果沙棘中呈中性进化(Fu, 1997)。在肋果沙棘的14个居群中, 居群内平均遗传多样性 H_S (se)为0.300 (0.0749), 居群间总的平均遗传多样性 H_T (se)为0.847 (0.0280), 总的居群遗传变异 G_{ST} (se)值为0.646 (0.0867), N_{ST} (se)值0.845 (0.0466), 且 N_{ST} 与 G_{ST} 之间具有显著性差异($N_{ST} > G_{ST}$, $P < 0.01$)。在肋果沙棘亚种的7个居群中(图1, 居群1-7), H_S

(se)为0.314 (0.1143), H_T (se)为0.676 (0.1296), G_{ST} (se)值为0.535 (0.1648), N_{ST} (se) 值为0.842 (0.0732), 其 N_{ST} 与 G_{ST} 之间有显著性差异($N_{ST} > G_{ST}$, $P < 0.01$)。在密毛肋果沙棘的7个居群中(图1, 居群8-14), H_S (se)为0.286 (0.1056), H_T (se)为0.726 (0.0824), G_{ST} (se)值为0.606 (0.1767), N_{ST} (se)值0.716 (0.1605), 其 N_{ST} 与 G_{ST} 也是有显著性差异($N_{ST} > G_{ST}$, $P < 0.01$)。

叶绿体单倍型的嵌套分支图有4个第一水平上的分支(图2)。其中分支1-1、1-2、1-3是由8种单倍型组成, 而1-4是其假定的祖先型。地理与遗传关系模式的检验估算出的地理距离参数(如表5)表明在分支1-2中存在近距离的扩张, 但因取样不足, 在所有分支基础上不能判定是居群破碎化, 扩张还是

表4 肋果沙棘单倍型多样性指数(*h*), 核苷酸多样性指数(π)以及中性检验统计值

Table 4 Haplotype diversity (*h*), nucleotide diversity (π) and neutral test statistics in two subspecies of *Hippophae neurocarpa*

	居群数 No. of populations	单倍型数 No. of haplotypes	<i>h</i>	π	Tajima's <i>D</i>	Fu & Li's <i>D</i> *
种 Species	14	8	0.3000	0.0305	0.2625	0.2430
亚种肋果沙棘 <i>ssp. neurocarpa</i>	7	5	0.3143	0.0351	0.4083	0.2812
亚种密毛肋果沙棘 <i>ssp. stellatopilosa</i>	7	4	0.2857	0.0260	0.1166	0.2047

表5 肋果沙棘单倍型嵌套分支分析

Table 5 Nested clad analyses of eight haplotypes recovered in *Hippophae neurocarpa*

零步分支Zero-step						一步分支One-step					
Hap	Pos	<i>D_c</i>	<i>P</i>	<i>D_n</i>	<i>P</i>	Clade	Pos	<i>D_c</i>	<i>P</i>	<i>D_n</i>	<i>P</i>
H5	I	0.000	0.199	159.581	0.097						
H4	T	203.282	0.097	240.334	0.097						
I-T	-	-203.282	0.097	-80.753	0.097	1-1	T	208.033	0.289	399.482 _L	0.025
H2	I	128.495 _S	<0.001	149.379 _S	<0.001						
H1	T	77.760 _S	0.001	313.058	0.352						
H3	T	287.191	0.332	388.624 _L	<0.001						
I-T	-	-68.941	0.085	-206.860 _S	<0.001	1-2	T	303.423 _L	0.031	299.711 _L	0.034
H7	I	0.000	0.170	21.590	0.052						
H6	T	74.726	0.160	73.752	0.097						
H8	T	0.000 _S	0.029	178.231 _L	0.002						
I-T	-	-60.715	0.348	-71.751	0.052	1-3	T	85.369 _S	<0.001	191.164 _S	<0.001
						1-4	I	0.000	1.000	0.000	<0.001
						I-T	-	0.000	<0.001	0.000	<0.001

Hap, 单倍型; I, 内部结点; I-T, 内部结点与末端结点之间距离的平均差异; Pos, 位置; “S”和“L”分别表示显著性小和大; T, 末端结点。
Hap, haplotype; I, inter node; I-T, the average difference between inter and tip nodes; Pos, position; “S” and “L”, significantly smaller or larger than the corresponding values; T, tip.

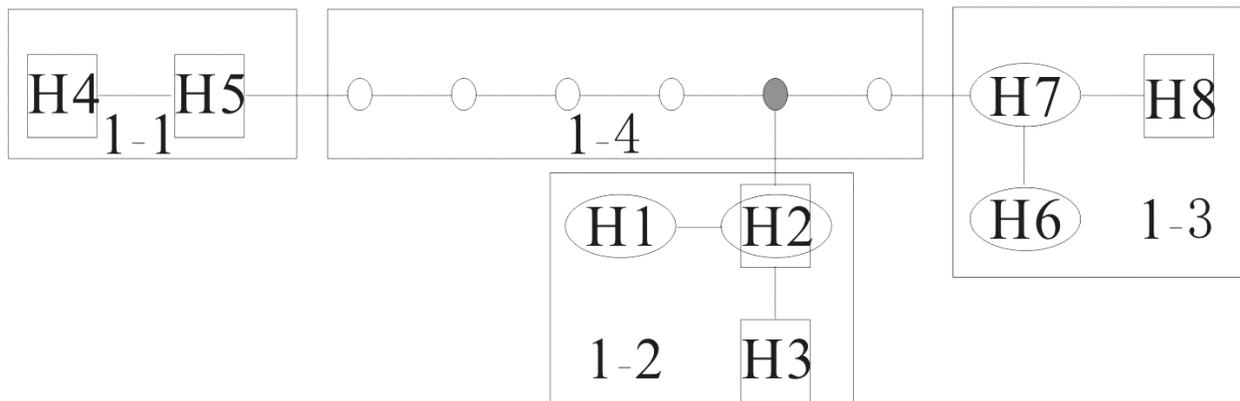


图2 肋果沙棘8种叶绿体DNA单倍型的进化分支网络图(正方形和椭圆形分别表示在亚种肋果沙棘和密毛肋果沙棘得到的单倍型)

Fig. 2. The nested cladogram of cpDNA haplotypes in *Hippophae neurocarpa* (rectangle and elliptic squares indicating the haplotypes respectively recovered in *ssp. neurocarpa* and *ssp. stellatopilosa*).

表6 根据嵌套分支分析检索得出的结论

Table 6 The inference from the nested clade analysis following the given keys

分支 Clade	卡方统计 Chi-square statistic	概率 <i>P</i>	检索 Clade key	推论 Inferences
1-1	5.000	0.199	1-19NO	破碎化Allopatric Fragmentation
1-2	94.000	<0.001	1-2-11YES,12NO	邻域扩张Contiguous Range Expansion
1-3	23.539	0.003	1-2-3-5-15-16-18NO	取样不足Geographical Sampling Scheme Inadequate to Discriminate Between Fragmentation, Range Expansion, and Isolation By Distance
整体 Total cladogram	0.000	<0.001	1-2-3-5-15-16-18NO	取样不足Geographical Sampling Scheme Inadequate to Discriminate Between Fragmentation, Range Expansion, and Isolation By Distance

隔离分化影响了地理分布格局(表6)。

3 讨论

叶绿体DNA序列的变异速度慢(Chiang et al., 2001), 通过cpDNA序列变异检测到的单倍型之间的分化应早于第四纪气候变化最为强烈的时候, 特别是最后一次冰期(Newton et al., 1997; Petit et al., 1997, 2003, 2004)。我们对肋果沙棘的\pi = 0.0305, 表4), 同样表明该片段DNA变异鉴定的单倍型不是由于种群变化或者选择压力, 特别是最后一次冰期后扩张造成的; 这在沙棘属的其他物种也是如此(Bartish et al., 2002, 2006; Sun et al., 2002, 2003, 2006)。叶绿体DNA的许多片段都具有这样的特点, 并在被子植物的一些物种中也得到验证, 因而其地理分布式样可用来研究物种在第四纪冰期中的居群动态变化(Demesure et al., 1996; Petit et al., 1997, 2004)。

我们的研究表明, 无论种内居群间的遗传分化($G_{ST} = 0.646$), 还是两个亚种内居群间的遗传分化(肋果沙棘亚种, $G_{ST} = 0.535$; 亚种密毛肋果沙棘, $G_{ST} = 0.606$)均非常大(表3), 表明居群间的种子基因交流较小; N_{ST} 显著大于 G_{ST} 则说明该物种单倍型具有明显的谱系地理结构。青藏高原东北部的森林植被在冰期可能已经大部分消失, 古孢粉检测表明这一地区没有大规模的森林花粉(施雅风等, 1998), 说明高原上的森林即使存在, 在这一时期也已经严重缩减; 肋果沙棘在这一时期也应该受到同样的影响, 造成居群大小的变化或者物种分布范围的变

化。肋果沙棘单倍型的分布较为复杂, 从分布图(图1)可以判断肋果沙棘可能存在多个高海拔地区的冰期避难所, 如H1、H2、H6与H4、H5分别分布在不同的地区, 未发现居群包括所有主要的单倍型。而H3在北边的多个居群出现, 则表明该单倍型可能在冰期后发生了扩张过程。NCA结果(表5, 表6)支持这一假设: 隔离分化是主要的分歧模式, 即存在不同的避难所; 而在分支1-2中存在邻域扩张。但是, 许多单倍型的地理分布式样由于取样不足, 他们之间的谱系地理分布的原因和机制仍然不清楚。

鉴定出的8种单倍型在两个亚种中的分布呈现较大差异: 仅有单倍型H2共享, 此单倍型也只存在于两个亚种交界的地区; 其他单倍型在两个亚种中则是各自独有(图1)。这一结果显然说明这两个亚种不存在分化明显的遗传谱系以及具有不同的单倍型。嵌套进化分支分析表明所有的单倍型可组成三支来源于假定的祖先型(图2): 一支为肋果沙棘亚种, 另两支由两个亚种嵌套组成, 并且肋果沙棘亚种的特有单倍型均处于分支末端。这一结果似乎表明肋果沙棘亚种间母系分化不是一次形成的: 该亚种特有的分支(1-1)中没有发现密毛肋果沙棘的祖先单倍型, 则有可能是由于密毛肋果沙棘取样太少或者祖先型已经在该亚种中灭绝造成的。这两个亚种的分化与叶上附属物以及分布生境密切相关: 有可能较潮湿环境下生长的密毛肋果沙棘亚种向北扩散后, 在干旱的生境里, 由原来的星状鳞毛转变为鳞片状鳞毛, 在对更为干旱环境的适应性进化中分化出了肋果沙棘亚种。我们还需要指出的是这两个亚种的叶绿体母系分化(即单倍型的产生)应该早于它们种群在第四纪气候变迁中的分布范围改变之前, 而冰期种群分布波动过程中又可能造成两个亚种之

间的杂交, 同样能导致两个亚种单倍型之间的相互交错分布。目前的研究结果表明, 尽管研究居群的形态特征各分化为两个明显的两个亚种, 但是母系遗传谱系结构方面它们并不是各自为单系群。显然, 这一问题仍然有待进一步深入研究。总之, 我们的初步研究结果表明肋果沙棘在冰期可能在高海拔地区存在多个避难所; 两个亚种之间在母系遗传谱系不存在明显分化的谱系结构, 而亚种的分化、特别是叶表皮附属物的分化可能是适应性分化的结果; 从而表明该物种为将来研究适应性进化和形态分化提供了一个极好的模式。

致谢 感谢刘建全教授帮助设计了野外实验, 指导实验数据的整理和图表的制作, 特别是帮助修改和撰写最后的论文。国家自然科学基金(30430560); 全国优秀博士论文专项基金; 西部之光项目; 中国科学院西北高原生物研究所领域前沿项目。

参考文献

- Abbott RJ, Smith LC, Milne RI, Crawford RMM, Wolff K, Balfour J. 2000. Molecular analysis of plant migration and refugia in the Arctic. *Science* 289: 1343–1346.
- Avise JC. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. Cambridge, Massachusetts, London: Harvard University Press.
- Bartish IV, Jeppsson N, Nybom H, Swenson U. 2002. Phylogeny of *Hippophae* (Elaeagnaceae) inferred from parsimony analysis of chloroplast DNA and morphology. *Systematic Botany* 27: 41–54.
- Bartish IV, Kadereit JW, Comes HP. 2006. Late Quaternary history of *Hippophae rhamnoides* L. (Elaeagnaceae) inferred from chalcone synthase intron (*Chsi*) sequences and chloroplast DNA variation. *Molecular Ecology* 15: 897–915.
- Burban C, Petit RJ, Carcreff E, Jactel H. 1999. Rangeland variation of the maritime pine bast scale *Matsucoccus feytaudi* Duc. (Homoptera: Matsucoccidae) in relation to the genetic structure of its host. *Molecular Ecology* 8: 1593–1602.
- Chiang SH, Baumann CA, Kanzaki M, Thurmond DC, Neudauer CL, Macara IG, Pessin JE, Saltiel AR. 2001. Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature* 410: 944–948.
- Clegg MT, Gaut BS, Learn GH, Monton BR. 1994. Rates and patterns of chloroplast DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 91: 6795–6801.
- Demesure B, Comps B, Petit RJ. 1996. Chloroplast DNA phylogeography of the common beech (*Fagus sylvatica* L.) in Europe. *Evolution* 50: 2515–2520.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material. *Phytochemical Bulletin* 19: 11–15.
- Etterson JR, Shaw PE. 2001. Constraint to adaptive evolution in response to global warming. *Science* 294: 151–154.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. ARLEQUIN (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47–50.
- Fu YX. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915–925.
- Hamilton MB. 1999. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology* 8: 521–522.
- Hartl DL, Clark AG. 1997. *Principles of population genetics*. Massachusetts: Sinauer.
- Hewitt G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907–913.
- Lian Y-S (廉永善). 2000. *The plant biology and chemistry of Hippophae*. Lanzhou: Gansu Science and Technology Press.
- Liu JQ, Gao TG, Chen ZD, Lu AM. 2002. Molecular phylogeny and biogeography of the Qinghai-Tibet Plateau endemic *Nannoglottis* (Asteraceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23: 307–325.
- Liu JQ, Wang YJ, Wang AL, Hideaki O, Abbott RJ. 2006. Radiation and diversification within the *Ligularia-Cremanthodium-Parasenecio* complex (Asteraceae) triggered by uplift of the Qinghai-Tibetan Plateau. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38: 31–49.
- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press.
- Newton AC, Allnot TR, Gillies ACM, Lowe AJ, Ennos RA. 1999. Molecular phylogeography, intraspecific variation and conservation of tree species. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 140–145.
- Petit RJ, Aguinagalde I, de Beaulieu J-L, Bittkau C, Brewer S, Cheddadi R, Ennos R, Fineschi S, Grivet D, Lascoux M, Mohanty A, Muller-Starck G, Demesure-Musch B, Palme A, Martin JP, Rendell S, Vendramin GG. 2003. Glacial refugia: Hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science* 300: 1563–1565.
- Petit RJ, Bialozyt R, Garnier-Géré P, Hampe A. 2004. Ecology and genetics of tree invasions: from recent introductions to Quaternary migrations. *Forest Ecology and Management* 197: 117–137.
- Petit RJ, Pineau E, Demesure B, Basilieri R, Ducouso A, Kremer A. 1997. Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 94: 9996–10001.
- Pons O, Petit RJ. 1996. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics* 144: 1237–1245.
- Posada D, Crandall KA, Templeton AR. 2000. GEODIS: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology* 9: 487–488.
- Raymond M, Pousset F. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280–1283.
- Shi Y-F (施雅风), Li J-J (李吉均), Li B-Y (李炳元). 1998. Uplift and environmental changes of Qinghai-Tibetan Plateau in the late Cenozoic. Guangzhou: Guangdong

- Science & Technology Press.
- Song B-H, Wang X-Q, Wang X-R, Ding K-Y, Hong D-Y. 2003. Cytoplasmic composition in *Pinus densata* and population establishment of the diploid hybrid pine. *Molecular Ecology* 12: 2995–3001.
- Sun K, Chen W, Ma R-J, Chen X, Li A, Ge S. 2006. Genetic variation in *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* (Elaeagnaceae) revealed by RAPD markers. *Biochemical Genetics* 44: 186–197.
- Sun K, Chen X-L, Ma R-J, Li C-B, Wang Q, Ge S. 2002. Molecular phylogenetics of *Hippophae* L. (Elaeagnaceae) based on the internal transcribed spacer (ITS) sequences of nrDNA. *Plant Systematics and Evolution* 235: 121–134.
- Sun K, Ma R-J, Chen X-L, Li C-B, Ge S. 2003. Hybrid origin of the diploid species *Hippophae goniocarpa* Lian, Chen & Sun, evidence from the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear rDNA. *Belgian Journal of Botany* 136: 91–96.
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105–1109.
- Templeton AR, Crandall KA, Sing CF. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132: 619–633.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewinak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876–4882.
- Wang A-L, Yang M-H, Liu J-Q. 2005. Molecular phylogeny, recent radiation and evolution of gross morphology of the rhubarb genus *Rheum* (Polygonaceae) inferred from chloroplast DNA *trnL-F* sequences. *Annals of Botany* 96: 489–498.
- Wang Y-J, Liu J-Q, Miehle G. 2007. Phylogenetic origins of the Himalayan endemic *Dolomiaea*, *Diplazoptilon* and *Xanthopappus* (Asteraceae: Cardueae) based on three DNA regions. *Annals of Botany* 98: 182–196.
- Wang Y-J (王玉金), Li X-J (李晓娟), Hao G (郝刚), Liu J-Q (刘建全). 2004. Molecular phylogeny and biogeography of *Androsace* (Primulaceae) and the convergent evolution of cushion morphology. *Acta Phytotaxonomica Sinica* (植物分类学报) 42: 481–499.
- Yang R (杨瑞), Meng L-H (孟丽华), Zhang Q (张茜), Liu J-Q (刘建全). 2005. The mitochondrial DNA *nad1* sequence variation of *Picea crassifolia* (Pinaceae) in the Qinghai-Tibetan Plateau platform and adjacent populations. *Acta Ecologica Sinica* (生态学报) 25: 3307–3313.
- Zhang Q (张茜), Yang R (杨瑞), Wang Q (王钦), Liu J-Q (刘建全). 2005. Phylogeography of *Juniperus przewalskii* (Cupressaceae) inferred from the chloroplast DNA *trnT-trnF* sequence variation. *Acta Phytotaxonomica Sinica* (植物分类学报) 43: 503–512.
- Zhang Q, Chiang TY, George M, Liu JQ, Abbott RJ. 2005. Phylogeography of the Qinghai-Tibetan Plateau endemic *Juniperus przewalskii* (Cupressaceae) inferred from chloroplast DNA sequence variation. *Molecular Ecology* 14: 3513–3524.
- Zhang X-L (张小兰), Ge X-J (葛学军), Liu J-Q (刘建全), Yuan Y-M (袁永明). 2006. Morphological, karyological and molecular delimitation of two gentians: *Gentiana crassicaulis* versus *G. tibetica* (Gentianaceae). *Acta Phytotaxonomica Sinica* (植物分类学报) 44: 627–640.