

# 基于叶绿体DNA *trnT-trnF* 序列研究祁连圆柏的 谱系地理学

<sup>1,3</sup>张茜 <sup>1,3</sup>杨瑞 <sup>2</sup>王钦 <sup>2,1</sup>刘建全\*

<sup>1</sup>(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)

<sup>2</sup>(兰州大学干旱与草地生态学重点实验室 兰州 730000)

<sup>3</sup>(中国科学院研究生院 北京 100039)

## Phylogeography of *Juniperus przewalskii* (Cupressaceae) inferred from the chloroplast DNA *trnT-trnF* sequence variation

<sup>1,3</sup>ZHANG Qian <sup>1,3</sup>YANG Rui <sup>2</sup>WANG Qin <sup>2,1</sup>LIU Jian-Quan\*

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

<sup>2</sup>(Key Laboratory of Arid and Grassland Ecology, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

<sup>3</sup>(Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

**Abstract** The topological effect of the Qinghai-Tibet Plateau during the Quaternary climatic oscillation must have important effects on the patterns of spatial distribution and genetic structure of organisms distributed there. To obtain a better understanding of the historical dynamics of present-day species in this region, we examined the population structure of chloroplast *trnT-trnF* sequence variation in *Juniperus przewalskii*, an endemic tree species mainly distributed in the northeast plateau. Data were obtained for 392 trees from 20 populations covering the total distributional range of the species. Three cpDNA haplotypes were recorded and were structured into two geographical areas: haplotype A was present on the plateau platform, while all three haplotypes occurred along the plateau edge. Total genetic diversity,  $H_T$ , was 0.511, with most variation distributed among rather than within populations ( $G_{ST}=0.847$ ). Along the low altitudinal plateau edge, haplotypes A, B and C tended to be fixed or nearly fixed in different populations, indicating that the species may have survived the last glacial period in different refugia within this area, and the bottlenecks due to the repeated reduction and expansion of the population size resulted in the reduction of biodiversity. However, in one population both haplotypes occurred at intermediate frequencies, indicating the possibility of a contact zone or less strong bottleneck effect. On the eastern plateau platform, haplotype A was commonly fixed in the current disjunct populations, suggesting a common postglacial recolonization and a following founder effect. Our results indicate that there might exist in multi-glacial refugia in the plateau edge and both bottleneck and founder effects resulting from the repeated climatic oscillation combined had played important roles in

2004-11-25 收稿, 2005-06-05 收修改稿。

基金项目: 中国科学院知识创新工程方向性项目(KSCX-SW-106); 国家自然科学基金重点项目(30430560); 全国优秀博士论文作者专项基金(200327)资助(Supported by the Knowledge Innovation Project of the Chinese Academy of Sciences (Grant No. KSCX-SW-106), the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 30430560) and Foundation for Author of National Excellent Doctoral Dissertation (Grant No. 200327)。

\* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: ljdxxy@public.xn.qh.cn; Tel.: 0971-6153387; Fax: 0971-6143282)。

shaping the current haplotype distribution pattern of this tree species.

**Key word** Qinghai-Tibet Plateau, *Juniperus przewalskii*, cpDNA, *trnT-trnF*, phylogeography, bottleneck, founder effect.

**摘要** 由于青藏高原的地貌效应,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。本文对这一地区特有分布物种祁连圆柏*Juniperus przewalskii* Kom.整个分布区内20居群392个个体的*trnT-trnF*序列变化进行了研究;共发现3种单倍型(haplotype),构成两种地理区域:高原台面上的居群主要固定Hap A,而Hap A、Hap B和Hap C在高原边缘居群均有分布。所有居群总的遗传多样性 $H_T = 0.511$ ,  $G_{ST} = 0.847$ 。在低海拔的高原边缘,Hap A、Hap B和Hap C高频率固定在不同的居群中,表明可能存在多个不同的避难所,居群反复缩小和扩张的瓶颈效应造成了遗传多样性的丢失。而边缘的一个居群含有两种相似单倍型频率则可能是冰期后迁移融合而成或者该居群在冰期经受的瓶颈作用更弱。高原台面东部间断分布的居群只固定Hap A,表明它们可能经历了冰期后共同的回迁过程和由此产生的奠基者效应。我们的研究结果表明祁连圆柏在冰期可能存在多个避难所,瓶颈效应和奠基者效应造成了这些居群现在的遗传多样性分布式样。

**关键词** 青藏高原; 祁连圆柏; 叶绿体DNA; *trnT-trnF*序列; 谱系地理学; 瓶颈效应; 奠基者效应

谱系地理学(phylogeography)是以生物地理学为基础,通过分子的手段,将居群遗传变异与宏观地理分布及孢粉学和考古学相结合,阐述物种现代居群分布形成的历史原因以及遗传多样性分布式样的学科(Avise, 1987, 1994)。谱系地理学的研究能够深入理解物种演化与地质、气候历史事件之间的关系,特别是在鉴别第四纪遭受冰川覆盖地区物种的避难所以及重建它们冰期后的扩张路线方面发挥了重要作用(如Abbott et al., 2000)。第四纪气候冰期与间冰期反复交错对原地保留居群产生的瓶颈作用(bottlenecks)和冰期后生物回迁(recolonization)产生的奠基者效应(founder effect)使得欧洲以及北极等地区的生物物种遗传多态性具有与冰川发育(advancement)与消退(recession)相对应的分布格局(Hewitt, 1996, 2000)。

尽管在我国没有像欧洲、北极或者北美那样发生过大规模的冰盖,但是巨大的青藏高原在冰期产生的区域地理气候必将对该地区和周围地区分布的动植物产生重要影响。已有的花粉化石证据表明在第四纪冰期的气候变迁中青藏高原植物发生了相应的分布变化:在距今大约21000年的最后一次大冰期时,高原森林只存在于东南部的避难所,而在随后的间冰期,森林又覆盖了高原除西北部以外的大部分地区(唐领余等, 1998)。青藏高原目前的主要森林群落存在于东南部,在其东北部的青海、甘肃地区存在间断的森林群落,这些森林岛屿之间是高寒草甸和荒漠生态系统。祁连圆柏*Juniperus przewalskii* Kom.(Cupressaceae)为这些森林群落日坡的主要建群种(图1),分布在甘肃西南部、青海东部和川西北部,多生长于海拔2600–4000 m的地带(郑万钧,傅立国, 1978)。由于该物种大部分居群存在于青藏高原,并且在高原边缘和台面上均有分布,它在第四纪冰期气候变迁和冰期后的居群变化过程,应该比其余植物经历了更为显著的对气候变迁的响应趋势。

植物叶绿体DNA(cp DNA)在一些非编码区域存在相对较高的核苷酸置换率(Taberlet et al., 1991),从而使之在种间和种内都拥有较高的遗传变异 (Newton et al., 1999),是迄今用于分子系统学和谱系地理学研究最多的一类基因组。目前,针对叶绿体基因非编码区发展了一批应用广泛的通用引物(Taberlet et al., 1991; Hamilton, 1999)。通过这些cpDNA序列变异的研究,不仅可以建立物种之间的亲缘关系(王玉金,刘建全, 2004; 王玉金等,

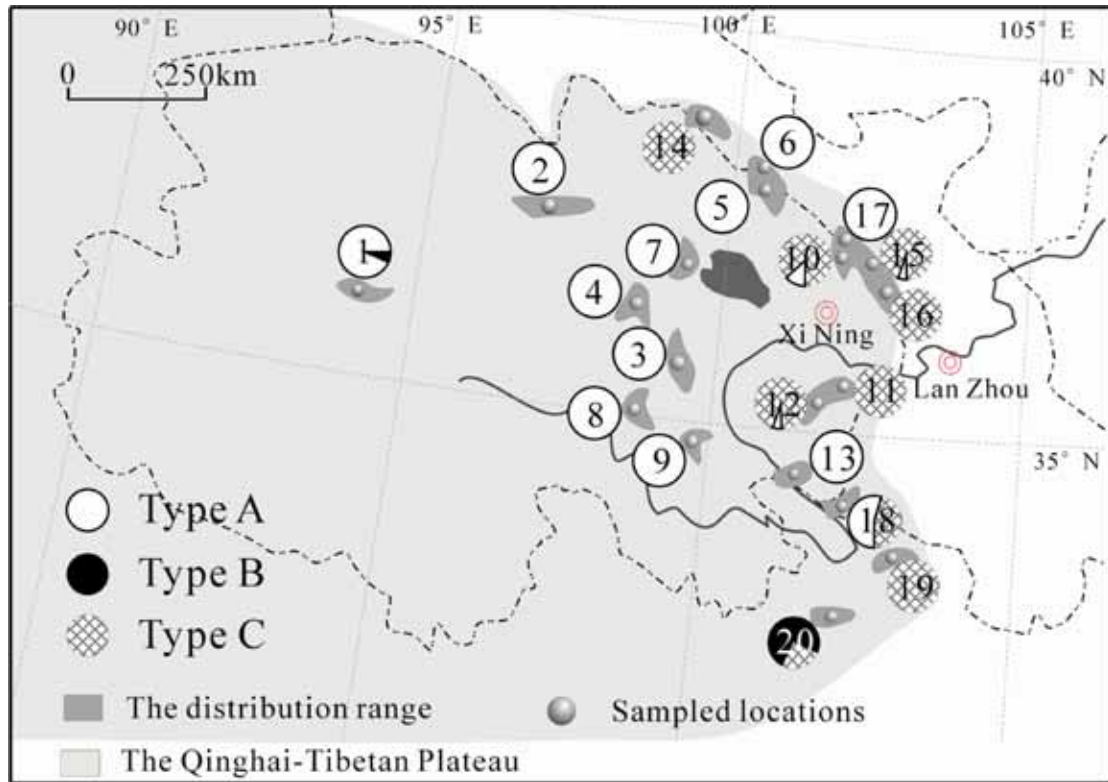


图1 祁连圆柏地理分布及其单倍型分布图  
 Fig. 1. The distributional range and haplotype distribution of *Juniperus przewalskii*.

2004);而且还能在一些种内鉴别出多种单倍型(haplotype)(Tremblay & Schoen, 1999)。种内叶绿体单倍型的地理分布式样与亲缘关系,已成功地用于多种植物的谱系地理学研究中,被广泛用来探讨物种居群的形成历史、居群间的基因流状况、气候变化所导致植物居群破碎化的时空模式和迁移路线(Newton et al., 1999; Caron et al., 2000; Petit et al., 2003)。

对于研究物种的谱系地理学,母系遗传的分子标记比其他标记具有更为明显的优势(Hewitt, 1996),这也是cpDNA广泛用于研究被子植物居群遗传结构的主要原因,因为在绝大多数被子植物中,多数植物的叶绿体为母系遗传(Mogensen, 1996)。但是,叶绿体和线粒体在柏科Cupressaceae中均为父系遗传(Neale et al., 1991; Mogensen, 1996)。尽管如此,叶绿体DNA的变异仍能较好反映柏科中物种居群在历史气候变迁中的居群遗传结构变化(Hwang et al., 2003)。我们最近对大果圆柏*Juniperus tibetica* Kom.的传粉观察发现,65%以上的花粉直接落在母树周围,只有不到10%的花粉能传播到100 m以外,传播到2 km以外的花粉不到2.5%;由于高原上强紫外线的照射,长距离传播后的花粉生活力下降了80%以上(Schlütz et al., 未发表)。因此,通过花粉传播产生的基因流在青藏高原的柏树中十分有限,cpDNA标记在居群中的变化能很好反映这些物种居群建立的历史过程。本文研究了祁连圆柏20个居群392个个体叶绿体DNA *trnT-trnF*区的序列变异,对单倍型的地理分布进行了初步分析,并发现它们的分布式样与过去气候变迁可能造成的居群动态具有一定的吻合性。

## 1 材料和方法

### 1.1 样品采集

青藏高原东北部地区的祁连圆柏 *Juniperus przewalskii* Kom. 原始林, 以居群方法对所有地理分布范围进行取样, 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: 包括高原台面的9个居群(居群1-9)和边缘的11个居群(居群10-20)(表1; 图1), 每一居群的样本量为12到24, 共392个。野外采集针叶, 硅胶迅速干燥后带回实验室。凭证标本存于中国科学院西北高原生物研究所标本馆(标本号见表1)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 DNA分析** 依据CTAB法(Doyle & Doyle, 1987)从硅胶干燥的针叶中提取总DNA。对cpDNA的 *trnT*(UGU)-*trnF*(GAA) 区段进行PCR扩增, 使用通用引物a (5'-CATTACAA-ATGCGATGCTCT)和f(5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG)(Taberlet *et al.*, 1991); PCR反应体系在25  $\mu$ L体积中进行, 包括植物DNA 10-40 ng, Tris-HCl 50 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mmol/L, BSA 250  $\mu$ g/mL, 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3 min, 接以94  $^{\circ}$ C 1 min, 50  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1.75 min的32个循环, 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; 用于序列测定的引物是可以测定整个扩增 *trnT*(UGU)-*trnF*(GAA) 区段的, 与扩增引物相同, 在中间又加了一个正链引物 *trnL*(UAA)c(5'-CGGAATTGGTAGACGCTACG); 用Amersham公司的DYEnamic Dye Terminator Cycle Sequencing Kit试剂盒进行测序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Autoseq 96 Plates纯化, 在MegaBACE 500 DNA Analysis System (Amersham Biosciences)上进行测序。我们的研究分两步: (1)首先在20个居群里选择10到15个个体进行序列测定, 即保证在每个居群至少有10个个体被完整测序; (2)通过序列排序后发现3种单倍型, 其中1种与另外2种具有明显的长度变异, 其余两种的长度无变化; 因此, 对于无长度变异两种单倍型都发现的居群及邻近居群, 对剩余的个体进行全部测序; 而对于居群中只有一种单倍型, 周围出现另外一种单倍型, 或者这两种单倍型共同出现在同一个居群中, 但具有明显的长度差异, 剩余的个体通过比较扩增产物在2%琼脂糖胶中的迁移率来确定应属于哪种单倍型。共对239棵树进行了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 W(Thompson *et al.*, 1994)软件对测定的序列进行对位排列, 并加以手工校对。

**1.2.2 数据处理** 以总的单倍型数目和每个居群的单倍型数目, 计算出遗传多样性系数  $H_e$ (Nei, 1987); 叶绿体基因的遗传多样性  $H_s$ 和  $H_t$ (分别为居群内和居群间平均遗传多样性), 居群遗传分化  $G_{ST}$ (Raymond & Rousset, 1995)和  $N_{ST}$ 值, 依照Pons和Petit(1995)所描述的方法, 基于相同的单倍型频率, 用程序PERMUT和HAPLODIV计算而得。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值检验单倍型变异的地理分布模式。

表1 祁连圆柏材料来源及叶绿体 $trnL-trnF$ 单倍型在各居群中的频率、单倍型多样性( $H_e$ )Table 1 Origin of materials, frequency of cpDNA haplotypes and measures of haplotypic ( $H_e$ ) in the 20 populations of *Juniperus przewalskii*

居群号 Popula- tion code	采集地 Location	纬度 Latitude	经度 Longit- ude	海拔 Altitude	凭证标本 Voucher <sup>1)</sup>	样本数 Sample size <sup>2)</sup>	单倍型(频度) Haplotype (frequency)			单倍型 多样性 ( $H_e$ )
1	青海格尔木 Golmud, Qinghai	36 ° 13.228'	94 ° 17.166'	3760 m	刘建全 (J. Q. Liu) 1578	15 (15)	A(0.933)	B(0.067)	C(0)	0.125
2	青海德令哈 Delingha, Qinghai	37 ° 26.443'	97 ° 45.766'	3340 m	刘建全 (J. Q. Liu) 1540	14 (14)	A(1.000)	B(0)	C(0)	0
3	青海都兰 Dulan, Qinghai	36 ° 20.387'	98 ° 14.870'	3700 m	刘建全 (J. Q. Liu) 1587	21 (10)	A(1.000)	B(0)	C(0)	0
4	青海香日德 Xiangride, Qinghai	35 ° 55.123'	97 ° 46.087'	3750 m	刘建全 (J. Q. Liu) 1579	20 (10)	A(1.000)	B(0)	C(0)	0
5	青海祁连 Qilian, Qinghai	38 ° 13.685'	100 ° 15.279'	3200 m	刘建全 (J. Q. Liu) 0717	16 (10)	A(1.000)	B(0)	C(0)	0
6	青海祁连 Qilian, Qinghai	38 ° 09.010'	100 ° 55.482'	3040 m	刘建全 (J. Q. Liu) 1518	20 (10)	A(1.000)	B(0)	C(0)	0
7	青海共和 Gonghe, Qinghai	36 ° 54.939'	99 ° 36.209'	3210 m	刘建全 (J. Q. Liu) 1601	22 (10)	A(1.000)	B(0)	C(0)	0
8	青海兴海 Xinghai, Qinghai	35 ° 32.376'	99 ° 50.996'	3700 m	刘建全 (J. Q. Liu) 0801	17 (10)	A(1.000)	B(0)	C(0)	0
9	青海玛沁 Maqên, Qinghai	34 ° 47.888'	100 ° 14.123'	3520 m	刘建全 (J. Q. Liu) 1765	24 (10)	A(1.000)	B(0)	C(0)	0
10	青海互助 Huzhu, Qinghai	37 ° 01.877'	102 ° 15.027'	3010 m	刘建全 (J. Q. Liu) 1300	23 (14)	A(0.130)	B(0)	C(0.870)	0.226
11	青海同仁 Tongren, Qinghai	35 ° 31.884'	102 ° 14.600'	3100 m	刘建全 (J. Q. Liu) 0072	20 (10)	A(0)	B(0)	C(1.000)	0
12	青海同仁 Tongren, Qinghai	35 ° 16.107'	101 ° 53.775'	3120 m	刘建全 (J. Q. Liu) 1288	22 (12)	A(0.045)	B(0)	C(0.955)	0.096
13	青海河南 Henan, Qinghai	34 ° 31.274'	101 ° 11.337'	3400 m	刘建全 (J. Q. Liu) 0065	18 (10)	A(1.000)	B(0)	C(0)	0
14	甘肃肃南 Sunan, Gansu	38 ° 41.816'	99 ° 30.896'	3280 m	刘建全 (J. Q. Liu) 1499	20 (10)	A(0)	B(0)	C(1.000)	0
15	甘肃天祝 Tianzhu, Gansu	36 ° 53.161'	101 ° 41.269'	2500 m	刘建全 (J. Q. Liu) 1451	22 (15)	A(0.091)	B(0)	C(0.909)	0.165
16	甘肃永登 Yongdeng, Gansu	36 ° 41.075'	102 ° 45.620'	1900 m	刘建全 (J. Q. Liu) 1465	18 (10)	A(1.000)	B(0)	C(0)	0

表 1 (续) Table 1 (continued)

居群号 Popula- tion code	采集地 Location	纬度 Latitude	经度 Longit- ude	海拔 Altitude	凭证标本 Voucher <sup>1)</sup>	样本数 Sample size <sup>2)</sup>	单倍型(频度) Haplotype (frequency)			单倍型 多样性 ( <i>He</i> )
17	甘肃张掖 Zhangye, Gansu	37 ° 23.245'	102 ° 32.444'	3020 m	刘建全 (J. Q. Liu) 1495	21 (10)	A(1.000)	B(0)	C(0)	0
18	甘肃碌曲 Luqu, Gansu	34 ° 04.705'	102 ° 38.094'	3480 m	刘建全 (J. Q. Liu) LMS	24 (14)	A(0.542)	B(0)	C(0.458)	0.496
19	四川若尔盖 Zoigê, Sichuan	33 ° 37.820'	103 ° 14.720'	3100 m	刘建全 (J. Q. Liu) 1873	23 (23)	A(0)	B(0)	C(1.000)	0
20	四川松潘 Songpan, Sichuan	32 ° 23.383'	103 ° 31.438'	2990 m	刘建全 (J. Q. Liu) 1909	12 (12)	A(0)	B(.750)	C(0.250)	0.375

1)凭证标本存中国科学院西北高原生物研究所(HNWP)。2)括号内紧接的数目是在该居群中全部经过直接测序的个体数。

1) Vouchers are preserved in the herbarium of Northwest Plateau Institute of Biology, the Chinese Academy of Sciences (HNWP). 2) The following number denote the individuals being sequenced in each population.

应用ARLEQUIN软件包(version 2.0; Schneider et al., 2000)中的AMOVA (Analysis of Molecular Variance)软件(Ecoffier et al., 1992)分析方法对居群内和两区域(高原东北部台面/边缘)间单倍型分布做 $F_{ST}$ 评价(Weir & Cockerham, 1984),以进一步揭示群体的分化程度(1000次置换检验)。

## 2 结果

对20个居群220个个体(每个居群10–15个)进行了叶绿体非编码区DNA *trnT-trnF*片段的全序列测定;通过排序发现,所有个体的序列长703–728 bp;碱基序列分析结果显示,共存在3种单倍型(haplotype):Hap A、Hap B和Hap C(图2),这3种碱基序列被注册于EMBL GenBank数据库中,其注册号为AY730342、AY730343和AY730345。Hap A(728 bp)与Hap B和Hap C(703 bp)在长度上存在显著差异,且在第54位点处发生一个碱基的替换(T→G),在59到84位点处有一个25个碱基的插入或者缺失;Hap B和Hap C差异不大,仅仅在625位点处有一个碱基的替换(A→T)(图2)。由于对该物种整个分布区内的每个居群都测序了10个以上的个体,除已发现的3种单倍型,在片段区域内出现新的单倍型几率极小。Hap B只出现在居群1和20中,它和Hap C之间不存在长度差异。因为在其他居群10个以上的个体中均未检测到Hap B,它可能只在居群1和20及其邻近居群中存在。因此,我们又对居群1和20以及它们邻近的居群2和19进行了所有剩余个体的全序列测定,结果发现这一单倍型只存在于在居群1和20中。加上最初进行全序列测定的220个个体,进行全序列测定的总个体数为239个,在各居群中的分布见表1。对于其余居群剩余个体的单倍型,我们通过比较扩增产物琼脂糖凝胶电泳位置鉴定。在这些居群中,每个居群10个以上的个体全序列测定只发现有

		5	5		8	6
		4	9		4	2
Hap A		TTATAATA-----				A
Hap B		.....G.....AATTATAGCGAATCGAATTAGAATA				A
Hap C		.....G.....AATTATAGCGAATCGAATTAGAATA				T

图2 祁连圆柏 *trnT-trnF* 三种单倍型之间的序列区别Fig. 2. The *trnT-trnF* sequence difference of three haplotypes in *Juniperus przewalskii*.

Hap A和Hap C,二者之间相差25 bp,根据它们的迁移率与这两种已知标记序列的比较,这些居群中剩余153个个体分别确定为Hap A或者Hap C。

每一居群单倍型的组成和频率见表1,其地理分布情况见图1。高原台面上居群(居群1-9)是Hap A;高原边缘的3个居群(居群13、16、17)也主要固定该单倍型,但其他几个居群(如居群10、12、15、18)也有该单倍型,但不占绝对优势。Hap C在高原台面上的任何一个居群中都没有发现,但是却高频率地出现在高原东部和北部边缘的居群中(居群10、14、15、11、12、19),并且以较低频率出现在另外两个东部边缘的居群中(居群18、20)。单倍型B仅仅出现在2个居群中,即以很低的频率(0.067)发生在高原台面上的居群1中,和以较高频率(0.750)固定在高原边缘居群20中。

在该物种所有分布区的居群,3种单倍型的频率分别是A=0.634、B=0.041和C=0.323。居群内平均遗传多样性 $H_S$  (se)是 0.078(0.034),居群间总的平均遗传多样性 $H_T$  (se)为 0.511(0.075),总的居群遗传变异 $G_{ST}$  (se)值为0.847(0.057), $N_{ST}$  (se)值0.864(0.053)。高原边缘居群(如图1,居群10-20) $H_S$  (se)是 0.130 (0.056), $H_T$  (se)为 0.574(0.083),  $G_{ST}$  (se)值为 0.774(0.097), $N_{ST}$  (se)值0.800(0.097)。9个高原台面上居群的Permut计算因分析过程中变异HT为100%,所以不能得出结果,因此用Haplodiv计算,居群内平均基因差异(图1,居群1-9) $H_S$  (Nei)为0.015,居群间总的平均遗传多样性 $H_T$  (Nei)为0.015,总的居群遗传变异比例 $G_{ST}$  (Nei)为0.012。

### 3 讨论

尽管叶绿体DNA在柏科中为花粉传播(Marshall & Neale, 1989; Mogensen, 1996),我们的研究表明祁连圆柏居群间的遗传分化十分大, $G_{ST}=0.847$ ,表明由于花粉传播带来的基因流较小。居群15和17都位于同一地点的不同峡谷,研究表明二者之间的遗传分化十分明显(图1)。这同我们观察到的高原上柏树 *Juniperus* sp. 花粉传播距离较近的现象十分吻合(Schlütz et al., 未发表)。高原上不同峡谷之间的高山可能也阻挡了不同居群之间花粉的交流。

叶绿体DNA *trnT-trnF* 鉴定出的3种单倍型在地理分布呈现两种地理区域:高原台面上的居群主要固定Hap A,而Hap A、Hap B和Hap C在高原边缘居群均有分布。Hap B在居群1和居群20中分布,这两个居群之间的距离超过400 km。无论是长距离的鸟类传播还是

趋同进化(在两个地点分别起源)都很难解释该单倍型的间断分布;此外,Hap C在边缘居群中也呈间隔分布式样(中间隔有Hap A)。因此,本研究鉴定的3种单倍型的每一种类型都应该是单系起源,它们在现有分布格局形成之前,已经存在于当时的居群中,是历史环境变迁的反复变化导致了它们目前的分布格局。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:这些连续的森林植被在冰期被分割成孤立的小居群,并且居群规模迅速减小;而在间冰期居群又迅速扩大;如此反复使得3种单倍型由于遗传漂泊而随机高频率固定在不同的居群中。高原边缘上3种单倍型在即使十分临近的居群中都随机固定(如居群15、16、17等),居群间的遗传分化大( $G_{ST} = 0.774$ ),即是这种历史过程的反映。而高原边缘居群18的遗传多样性高,两种单倍型频率都十分接近,则可能是由于该居群由两种单倍型个体在冰期后迁移融合而成,这种从多个避难所冰期后迁移融合形成高遗传多样性的现象在欧洲各树木的遗传群体结构中报道较多(Petit et al., 2003)。另一种可能性是该居群受到的瓶颈作用比高原边缘的其他居群小,可能是与居群数量大或者位于峡谷内,造成了较小的小气候环境有关。

高原台面上东部8个居群都拥有完全相同的Hap A,而不是像边缘居群随机固定不同的单倍型则是由于森林回迁(recolonization)过程中的奠基者效应造成的。已有的古孢粉证据表明,在全新世中期的冰期后青藏高原东北部森林面积进一步增加,而在全新世晚期森林再次锐减,并伴随高寒草甸与灌丛的发育替代(唐领余,沈才明,1996)。由于冰期时的地理温度效应,高原台面的温度比边缘低很多,即使在高原台面上的部分地区还存在具有不同于Hap A的其他少量单倍型(如Hap B和Hap C)个体,在回迁入侵过程中也被大量的Hap A个体在随后的几代中排挤。在回迁入侵过程中,奠基者效应使得所有的居群都拥有相同的单倍型。这次冰期后的森林回迁应该是连续的,而这些居群的现代间断分布则可能是更晚时候,由于温度下降或者人为活动影响造成的。高原台面上最西端的居群1由于距离远,没有经历这次回迁入侵和伴随的奠基者效应,因而还保留了不同的单倍型,但由于遗传漂泊和瓶颈作用,随机选择固定了Hap A,而Hap B只以很低的频率存在。高原边缘地区不存在规模性的回迁入侵过程和奠基者效应,则是因为:(1)边缘存在的高山峡谷阻隔了回迁个体的快速入侵;(2)边缘居群中在冰期原地保留相对较多的个体在冰期后温度上升过程中迅速占领了适合该树生长的生态位,而使外来的个体无立身之地。青藏高原台面上分布的高山松*Pinus densata* Mast.也发现有明显的可能由于森林回迁造成的分子奠基者效应(Song et al., 2003)。高原台面上单倍型的这种分布式样暗示青藏高原东北部高原台面上在冰期后经历了一次连续的森林回迁入侵、再间断的过程,这显然与古植物学全新世早中期森林花粉增加、而在中后期再次锐减的证据相吻合(唐领余,沈才明,1996),但是否能得到其他证据的支持仍然有待进一步研究。我们在这些森林岛屿之间的高寒草甸和荒漠地区进行了炭屑物(charcoal)的寻找,结果发现在绝大多数挖掘的地层均能找到大量的炭屑物,这些炭屑物经鉴定后与目前森林岛屿的种类一样,为圆柏属*Juniperus* L.和云杉属*Picea* A. Dietr.植物,年龄测定是在5000–8000年之间(Miehe et al., 未发表)。这些结果都共同暗示青藏高原东北部可能在全新世有一次连续的森林回迁入侵过程,从森林演变到如今以高寒草甸和荒漠为主的生态系统可能发生在全新世离现今非常近的一段时间内。



总之,通过对祁连圆柏所有居群cpDNA *trnT-trnF*序列变异研究的结果表明,该树种在冰期可能在青藏高原边缘存在多个避难所,瓶颈效应造成了不同单倍型在边缘居群中高频率的随机固定,而高原台面上经历了一次共同的回迁和随后的奠基者效应,从而使现代间断分布的居群拥有共同的单倍型。但是,由于本文鉴定的3种单倍型之间的亲缘关系不清楚,共同拥有单倍型Hap A的个体或者居群间的亲缘关系也不明朗。我们对另一套cpDNA *trnS-trnG*片段进行了相应测序,发现有更多的单倍型,并能建立起各种单倍型和居群之间的亲缘关系,这些后续的研究结果也支持本文的初步研究结论(未发表资料)。

## 参 考 文 献

- Abbott R J, Smith L C, Milne R I, Crawford R M M, Wolff K, Balfour J. 2000. Molecular analysis of plant migration and refugia in the Arctic. *Science* 289: 1343–1346.
- Avice J C, Arnold J, Ball R M, Bermingham E, Lamb T, Neigel J E, Reeb C A, Saunders N C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489–522.
- Avice J C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. New York: Chapman & Hall.
- Burban C, Petit R J, Carcreff E, Jactel H. 1999. Rangewide 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.
- Caron H, Dumas S, Marque G, Messier C, Bandou E, Petit R J, Kremer A. 2000. Spatial and temporal distribution of chloroplast DNA polymorphism in a tropical tree species. *Molecular Ecology* 9: 1089–1098.
- Doyle J J, Doyle J L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material. *Phytochemical Bulletin* 19: 11–15.
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479–491.
- Hamilton M B. 1999. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology* 8: 521–522.
- Hewitt G M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58: 247–276.
- Hewitt G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907–913.
- Hwang S Y, Lin T P, Ma C S, Lin C L, Chung J D, Yang J C. 2003. Postglacial population growth of *Cunninghamia konishii* (Cupressaceae) inferred from phylogeographical and mismatch analysis of chloroplast DNA variation. *Molecular Ecology* 12: 2689–2695.
- Marshall K A, Neale D B. 1989. Paternal inheritance of organelle DNA in conifers. *Horticulture Biotechnology Symposium University of California, Davis*.
- Mogensen H L. 1996. The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants. *American Journal of Botany* 83: 383–404.
- Neale D B, Marshall K A, Harry D E. 1991. Paternal inheritance of chloroplast and mitochondrial DNA in incense-cedar (*Calocedrus decurrens* (Torr.) Florin.). *Canadian Journal of Forest Research* 21: 717–720.
- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press.
- Newton A C, Allnot T R, Gillies A C M, Lowe A J, Ennos R A. 1999. Molecular phylogeography, intraspecific variation and conservation of tree species. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 140–145.
- Petit R J, Aguinalde I, de Beaulieu J L, Bittkau C, Brewer S, Cheddadi R, Ennos R, Fineschi S, Grivet D, Lascoux M, Mohanty A, Muller-Starck G M, Demesure-Musch B, Palme A, Martin J P, Rendell S, Vendramin G G. 2003. Glacial refugia: Hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science* 300: 1563–1565.
- Pons O, Petit R J. 1995. Estimation, variance and optimal sampling of gene diversity I. Haploid locus. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 462–470.
- Raymond M, Rousset F. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280–1283.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L. 2000. Arlequin v. 2.000: a Software for Population Genetic Data Analysis. Switzerland: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva.
- 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.
- 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.
- Tang L-Y (唐领余), Shen C-M (沈才明). 1996. Late Cenozoic vegetational history and climatic characteristics of Qinghai-Xizang Plateau. *Acta Micropalaeontologica Sinica (微体古生物学报)* 13: 321–338.
- Tang L-Y (唐领余), Shen C-M (沈才明), Kong Z-Z (孔昭宸). 1998. Pollen evidence of climate during the Last Glacial Maximum in eastern Tibetan plateau. *Journal of Glaciology and Geocryology (冰川冻土)* 20: 133–140.
- Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nuclear Acids Research* 22: 4673–4680.
- Tremblay N O, Schoen D J. 1999. Molecular phylogeography of *Dryas integrifolia*: glacial refugia and postglacial recolonization. *Molecular Ecology* 8: 1187–1198.
- Wang Y-J (王玉金), Liu J-Q (刘建全). 2004. A preliminary investigation on the phylogeny of *Saussurea* (Asteraceae: Cardueae) based on chloroplast DNA *trnL-F* sequences. *Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报)* 42: 136–153.
- 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.
- Weir B S, Cockerham C C. 1984. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358–1370.
- Zheng W-J (郑万钧), Fu L-G (傅立国). 1978. *Sabina* Mill. In: *Flora Reipublicae Popularis Sinicae (中国植物志)*. Beijing: Science Press. 7: 347–376.