

横断山区高山绣线菊的谱系地理学研究

张发起^{1,2}, 高庆波¹, 段义忠¹, 张得钧¹, 陈世龙^{1*}

(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,
青海 西宁 810001; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100039)

摘要: 横断山区作为青藏高原东南部主要的一个冰期避难所, 第四纪冰期气候的变化对该地区的植物地理分布和居群遗传结构都产生了重要的影响。为了揭示该地区物种分布的分子系统地理学结构, 选取在该地区广泛分布的一种高山灌木—高山绣线菊的叶绿体 *trnL-trnF* 序列进行研究。采集了 15 个居群 182 个个体进行测序, 共发现 7 个单倍型。总的遗传多样性较高($H_T=0.809$), 但居群内遗传多样性较低($H_S=0.236$)。分子变异分析(AMOVA)结果表明分布区内高山绣线菊的遗传变异主要存在于居群间(84.48%), 且居群间的遗传分化很高($G_{ST}=0.708$, $F_{ST}=0.84476$, $N_{ST}=0.863$), 有着显著的谱系地理学结构($N_{ST}>G_{ST}$, $P<0.01$)和较低的居群间平均基因流($N_m=0.09$)。单倍型的系统进化树和进化分支网络分析得到了相似的拓扑结构, 7 种单倍型都按照地理分布聚为三支: 横断山区西部、横断山区东部以及两者的交接地带。本研究推测该物种在横断山区存在多个冰期避难所, 而没有表现出大规模的种群集体扩张和迁移的现象。青藏高原隆升、第四纪气候的反复波动以及横断山区特殊的地理环境使得原来连续的居群片段化, 并发生范围扩张, 从而塑造了高山绣线菊的现代生物地理分布格局。

关键词: 高山绣线菊; 谱系地理学; 叶绿体 DNA; *trnL-trnF*; 横断山区

中图分类号: Q16, Q948 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2012)05-0617-07

Phylogeography of *Spiraea alpina* (Rosaceae) in Hengduan Mountains

ZHANG Fa-Qi^{1,2}, GAO Qing-Bo¹, DUAN Yi-Zhong¹,
ZHANG De-Jun¹, CHEN Shi-Long^{1*}

(1. Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biology, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: The Hengduan Mountains and adjacent regions have been suggested as the important refugia located in the southeast of Qinghai-Tibet Plateau. Climate change in the Quaternary Glacial Period has an important effect on spatial distribution and genetic structure of plant distributed there. In this study, the chloroplast *trnL-trnF* sequence variation of a perennial shrubby species were examined. Sequence data were obtained from 182 individuals of 15 groups covering the Hengduan Mountains. And 7 haplotypes were detected. The total diversity($H_T=0.809$) was high while the within-population diversity($H_S=0.236$) was low. Molecular variation analysis(AMOVA) results revealed a high level of genetic differentiation(84.48%) among populations. The estimates of interpopulation differentiation were very high($G_{ST}=0.708$, $F_{ST}=0.84476$, $N_{ST}=0.863$). Further, the higher N_{ST} than G_{ST} suggested a distinctly phylogeographical pattern whereas the value of average gene flow($N_m=0.09$) was low. Phylogenetic relationship of

* 收稿日期: 2012-03-18 修回日期: 2012-05-14

基金项目: 国家自然科学基金(30970204)[Supported by the National Natural Science Foundation of China(30970204)]

作者简介: 张发起(1983-), 男, 山东泰安人, 博士研究生, 主要研究方向为植物分子遗传多样性, (E-mail) zhangfaqi2010@126.com。

* 通讯作者: 陈世龙, 博士, 研究员, 主要研究方向为高山植物的进化与适应, (E-mail) slchen@nwpb.acs.cn。

the 7 haplotypes detected had similar topology with Maximum likelihood(ML) tree analyses. Phylogenetic analyses of haplotypes indentified 3 major clusters of the recovered haplotypes; east, west and the third one in between the first two. Our results indicated that there were multiple refugia for this species during the glacial stages. We failed to detect the large-scale interglacial or postglacial range expansion in this species. The special phylogeographic structure of *S. alpina* may have resulted from a combination of the uplift of the Qinghai-Tibet Plateau, Quaternary climatic oscillation and complex topology of the Hengduan Mountains.

Key words: *piraea alpina*; phylogeography; chloroplast DNA; *trnL-trnF*; Hengduan Mountains

青藏高原是全世界最高最大的高原,海拔高度平均在 4 000 m 以上,被喻为“世界屋脊”、“地球第三极”,其自然环境和生态系统在全球占有特殊地位,是全球气候与环境变化最为强烈的地区(李文华等,1998)。横断山区位于青藏高原的东南部,通常为四川、云南两省及西藏自治区东部一系列南北走向山脉的总称,其山岭海拔 2 000~6 000 m(施雅风等,1998)。该地区是我国东部太平洋区与西部古地中海区间的交接过渡地带,地质结构最为复杂(潘裕生,1989),多数地区存在纵向平行的山脉及被其分割而成的河谷,从而形成了强烈的片段化生境。该地区是全球公认的 25 个生物多样性的热点地区中的一个,包含了很多当地特有种(Myers 等,2000)。青藏高原的隆升伴随着强烈的第四纪冰川发育过程,尽管青藏高原地区的山地冰川(zheng & Rutter, 1998)不像欧洲、北极或者北美那样发生大规模的冰盖,但气候的反复波动及高原隆升使得该地区发生了多次植被类型的转换(唐领余等,1996),形成了年轻的植物区系,并分化出许多适应于高原独特环境的特有种和分化程度不是很高的特有属,如毛茛科(Ranunculaceae)的翠雀属(*Delphinium*)、乌头属(*Aconitum*),龙胆科(*Gentianaceae*)的龙胆属(*Gentiana*)和獐芽菜属(*Swertia*)等。吴征镒(1987)提出,青藏高原东南部的横断山区是第四纪冰期高原核心层面地区甚至北温带植物的避难所,冰期后成为现代北温带植物的重要起源地和辐射地之一。

叶绿体 DNA(cpDNA)是高等植物细胞核外的另一类遗传系统。cpDNA 在绝大多数被子植物中为母系遗传,不通过花粉遗传而只通过种子遗传,有性生殖时不发生重组(Mogensen 等,1996)。cpDNA 在植物中为单倍体基因组,分子量小,结构简单,但包含大量的 DNA 成分。cpDNA 进化速率较慢(Wolfe 等,1987),使得 cpDNA 可能保留经过长期变迁的植物的遗传结构(Ennos 等,1999)。cpDNA 由于这些优越性,成为目前植物分子系统地理学研究中最常用的分子遗传标记。尽管我国分子系

统地理学研究晚于欧美国家,但近几年来发展迅速,针对青藏高原物种的分子系统地理学研究正在陆续展开。Wang 等(2009)和 Gao 等(2009)分别对露蕊乌头(*Aconitum gymnantrum*)和西川红景天(*Rhodiola alsia*)的研究表明,青藏高原东南部边缘地区和高原台面存在多个避难所,冰期时高原台面的居群并没有退缩到高原东南部边缘的避难所内,而是在高原台面上几个相互隔离的避难所单独保存下来。而对祁连圆柏(*Junipersus przewalskii*)、青海云杉(*Picea crassifolia*)、狭蕊龙胆(*Metagentian striata*)等是在青藏高原东南部边缘地区是物种在第四纪冰期的避难所,高原台面的居群是间冰期或冰后期由东南部避难所扩散而来(Zhang 等,2005; Meng 等,2007; Chen 等,2008)。偏花报春(*Primula secundiflora*)的主要分布区都是在横断山区,研究表明横断山区是第四纪冰期的避难所,并且可能存在多个地理隔离的避难所,由于横断山区特殊、复杂的地理环境以及气候变迁,阻隔了种群的基因交流及迁移,从而形成了物种的现代分布(Wang 等,2008)。

高山绣线菊(*Spiraea alpina*)隶属于蔷薇科(Rosaceae)绣线菊属(*Spiraea*),落叶灌木,广布于青藏高原东部 2 900~4 600 m 的山地阴坡、半阳坡、潮湿滩地及高海拔的山地阳坡,另外在西藏,四川,甘肃,陕西,蒙古及俄罗斯等地也有分布(俞德浚,1974),在整个横断山区有着广泛的分布。蔷薇科中最古老的亚科绣线菊亚科共有 22 属 260 余种,我国有 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(陆玲娣,1996)。在本研究中,我们选取了 cpDNA 的非编码区 *trnL-trnF* 片段对高山绣线菊的 15 个居群 182 个个体测序,进行谱系地理学的研究,揭示遗传变异在居群内和居群间的分布式样,并探讨该物种的冰期避难所及冰期后的迁移路线,有助于更好地了解该地区植物区系格局的形成以及植物的进化历史。

1 材料和方法

1.1 实验材料

本研究材料采自西藏东部、四川西部及青海东南

部。每个居群随机采样 6~15 个个体,居群内采样个体之间至少相隔 100 m 以上,共取得高山绣线菊 15 个居群 182 个个体(表 1,图 1)。新鲜叶片被采集后,迅速用硅胶干燥。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)。

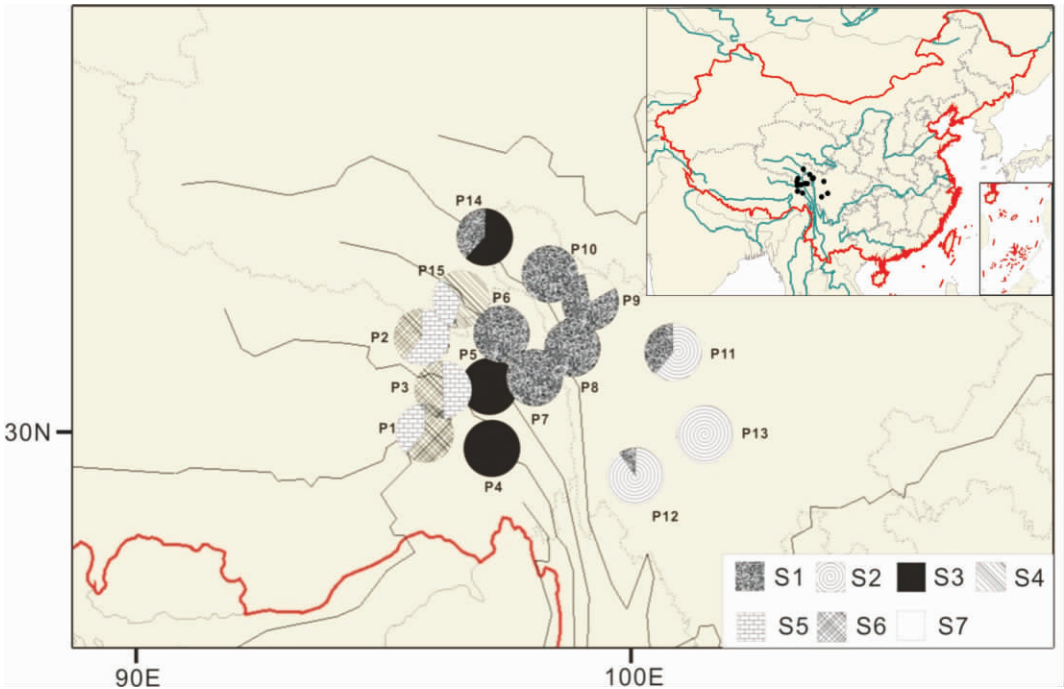


图 1 高山绣线菊居群采样点及叶绿体 DNA 单倍型分布图 (居群编号(P1-P15)与表 1 的编号一致)
Fig. 1 The sampled locations and distribution of cpDNA haplotypes within and among populations of *S. alpina* (All of the population codes from 1 to 13 are accordant with Table 1)

表 1 高山绣线菊 15 个居群材料来源及叶绿体 DNA 单倍型(S1-S7)的遗传多样性(H_d)组成和频率
Table 1 Origin of materials,measurements of haplotypes diversity(H_d)and composition/frequency from cpDNA haplotypes (S1-S7) in 15 populations of *S. alpina*

编号 No. (P.)	采集地 Locality	凭证标本 Voucher Ref.	经度 Latitude (E)	纬度 Longitude (N)	海拔 Altitude (m)	样本数 Sample size	单倍型 Haplotypes (频率 Frequencies, %)	单倍型多样性指数 Haplotype diversity, H_d	核苷酸多样性指数 Nucleotide diversity n
P1	西藏类乌齐	Chen2007035	30°21'	96°27'	4 290	12	S5(41.7),S6(58.3)	0.5303±0.0764	0.000573
P2	西藏类乌齐	Chen2007043	31°32'	96°22'	4 210	12	S5(58.3),S6(41.7)	0.5303±0.0764	0.000573
P3	西藏丁青	Chen2007054	31°05'	96°24'	4 410	12	S5(50),S6(50)	0.5455±0.0615	0.000590
P4	西藏八宿	Chen2007179	30°07'	97°17'	4 320	14	S3(100)	0	0
P5	西藏昌都	Chen2007205	31°11'	97°02'	3 380	9	S3(100)	0	0
P6	西藏江达	Chen2007210	31°21'	97°42'	4 490	6	S1(100)	0	0
P7	西藏江达	Chen2007218	31°20'	98°03'	4 360	10	S1(100)	0	0
P8	西藏德格	Chen2007239	31°57'	98°54'	4 410	7	S1(100)	0	0
P9	西藏德格	Chen2007244	32°03'	99°01'	4 570	12	S1(83.3),S7(16.7)	0.3030±0.1475	0.000328
P10	四川石渠	Chen2007251	32°30'	98°27'	4 380	13	S1(100)	0	0
P11	四川炉霍	Chen06318	31°37'	100°43'	3 460	15	S1(40),S2(60)	0.5143±0.0690	0.000556
P12	四川理塘	Chen06280	29°38'	100°21'	3 891	15	S1(6.7),S2(93.3)	0.1333±0.1123	0.000144
P13	四川雅江	Chen06307	30°04'	101°20'	4 280	15	S2(100)	0	0
P14	青海称多	Chen2007025	33°11'	97°24'	4 040	15	S1(40),S3(60)	0.5143±0.0690	0.001112
P15	青海囊谦	Chen06037	31°58'	96°30'	4 320	15	S4(66.7),S5(33.3)	0.4762±0.0920	0.001030
Total						182		0.7959±0.0138	0.002277

1.2 DNA 的提取和 PCR 扩增

基因组 DNA 的提取采用改进的 CTAB 法 (Doyle JJ & Doyle JL, 1987)。对 cpDNA 的 *trnL-trnF* 片段进行 PCR 扩增。PCR 扩增反应体系为 25 μL : 2.5 μL 的 10 $\times$ PCR 缓冲液 (含 1.5 mmol/L MgCl_2), 0.2 μL 10 mmol/L dNTP, 正反引物 (5 pmol/L) 各 0.8 μL , Taq DNA 聚合酶 1 个单位, 10~20 ng 的总 DNA 模板, 最后用双蒸水补足 25 μL 。扩增反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 接以 30 个循环的 94 $^{\circ}\text{C}$ 加热变性 1 min, 54 $^{\circ}\text{C}$ 低温退火 50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 适温延伸 45 s; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min 结束。PCR 产物用 0.7% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测。扩增产物采用 CASpure PCR Purification Kit 试剂盒 (上海中科开瑞生物芯片科技股份有限公司) 纯化。纯化后的产物由北京三博远志生物技术有限责任公司进行双链测序。

1.3 数据分析

植物叶绿体 *trnL-trnF* 序列采用 Clustal X 软件进行对位排序, 并加以手工校对 (Thompson 等, 1997)。运用 MEGA 4.0.1 软件统计序列的碱基组成 (Base composition), DnaSP4.0 (Rozas 等, 2003) 软件统计序列的变异位点 (polymorphic sites) 并确定单倍型 (haplotype)。利用 PERMUT 软件计算居群内平均遗传多样性 (average gene diversity within populations, H_S)、总的遗传多样性 (total gene diversity, H_T)、居群间遗传分化系数 G_{ST} (coefficient of gene differentiation; Raymond & Rousset, 1995) 和 N_{ST} (Grivet & Peit, 2002) 值。使用 U-统计方法对 G_{ST} 和 N_{ST} 进行比较 (1 000 次重复的置换检验)。

应用 ARLEQUIN 软件包 version 3.01 (Excoffier 等, 2006) 计算每个居群的单倍型多样性 (haplotype diversity, H_d)、核苷酸多样性 (nucleotide diversity, n) (Nei, 1987)。利用软件包中的 AMOVA (Analysis of Molecular Variance) 分析方法分别检测材料在分布区内居群内和居群间的遗传变异水平, 以及单倍型分布的 F_{ST} 评价 (Weir and Cockerham, 1984) 以进一步分析居群的分化程度 (1 000 次置换检验)。在本研究中, 我们假设 cpDNA 变异处于漂变—迁移平衡 (drift-migration equilibrium), 则物种水平上居群间的平均基因流 N_m (Nei, 1987) 通过 Arlequin 软件包检测得到的 F_{ST} 值进行计算, 在单倍体中 N_m 的计算公式为: $N_m = (1$

$-F_{ST}) / 2F_{ST}$ (Slatkin, 1995)。Tajima (1989) 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。

单倍型之间的网络关系通过软件 NETWORK VER. 4.2.0.1 构建。从 GenBank 中调取与高山绣线菊亲缘关系远近不同的三条序列 *Spiraea betulifolia* (AJ390368), *Rosa californica* (AF348567) 和 *Sorbaria sorbifolia* (AF348569; Richardson 等, 2000; Potter 等, 2002) 作为外类群, 利用 PAUP * 4.0 软件 (Swofford, 2003) 构建基因树。最大似然 (ML) 树的构建使用启发式搜索, 树二等分再连接分支交换 (TBR), 各种核苷酸替代同等加权。得到的一致性系统树分支的可靠性使用 “靴带” (Bootstrap) 分析, 用 1 000 次重复来检验单倍型各分支的支持率值。

2 结果与分析

2.1 序列变异

对 15 个居群 182 个个体的 *trnL-F* 片段进行测序, 用 Clustal X 软件对位排列后的矩阵长度为 925 个位点。统计所有个体的 *trnL-trnF* 序列发现, (A+T) 含量为 68.7%, (G+C) 含量为 31.3%。用 DnaSP4.0 软件检测出 7 个单倍型, 这 7 个单倍型的变异位点都是由碱基置换引起的 (表 2)。

2.2 多样性指数和遗传结构分析

高山绣线菊的 15 个居群总的单倍型多样性指数 H_d 为 0.7959 ± 0.0138 , 核苷酸多样性指数 n 为 0.002277。在检测出的 7 个单倍型中, 单倍型 S1 出现的频率最高, 有 59 个个体拥有此单倍型。每个居群的遗传多样性 (H_d)、核苷酸多样性指数 (n)、单倍型组成及频率见表 1, 单倍型的地理分布情况见图 1。

通过 PERMUT 程序计算得出高山绣线菊居群内平均遗传多样性 H_S 值 (0.236)、总的遗传多样性 H_T 值 (0.809)、居群间遗传分化 G_{ST} (0.708) 和 N_{ST} 值 (0.863)。使用 U-统计方法对高山绣线菊横断山区单倍型变异的地理结构进行检验后发现 N_{ST} 极显著的大于 G_{ST} ($P < 0.01$), 表明高山绣线菊在横断山区亲缘关系相近的单倍型发生于同一居群中, 居群间的遗传分化水平较高 ($G_{ST} = 0.708$), 并且存在着明显的分子系统地理学关系 (Pons & Petit, 1996)。分子变异分析 (AMOVA) 的结果表明, 居群间的遗传变异为 84.48%, 而居群内遗传变异为 15.52%,

表 2 高山绣线菊叶绿体 *trnL-trnF* 片段 7 个单倍型的序列变异位点
Table 2 Variable nucleotide sites of the aligned sequences of the *trnL-trnF* genetic spacer in 7 chlorotypes of *S. alpina*

单倍型 Haplotype	变异位点 Variable Sites						
	<i>trnL</i> 348	487	730	743	751	797	<i>trnF</i> 859
S1	G	A	G	T	T	T	C
S2	G	A	G	A	T	T	C
S3	G	A	G	A	G	T	C
S4	T	A	A	A	G	T	A
S5	T	T	A	A	G	T	C
S6	T	A	A	A	G	T	C
S7	G	A	G	T	T	A	C

$F_{ST}=0.84476(P<0.001)$ (表 3),进一步揭示了高山绣线菊的遗传变异主要存在于居群间,而且具有较高的居群分化水平。假设该片段变异处于漂变—迁移平衡(drift-migration equilibrium),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 0.09。说明居群间基因交流不频繁。

表 3 高山绣线菊叶绿体 DNA 序列
分子变异分析(AMOVA)结果
Table 3 Results of analysis of molecular
variance(AMOVA)of cpDNA sequence
data from populations of *S. alpina*

变异来源 Source of variation	自由度 d. f.	方差 SS	变异成分 V_c	变异比 例(%)
居群间 Among populations	14	161.743	0.94168	84.48
居群内 Within populations	167	28.900	0.17305	15.52
总计 Total	181	190.643	0.11474	
固定指数 Fixation index	$F_{ST}=0.84476(P<0.001)$			

在种的水平上对叶绿体 DNA 进行的岐点分布分析,得到的曲线为多峰曲线(图 2),背离了对快速扩张模型的假设,这个结果在两种基于无限位点非重组模型的中性检验 Tajima's $D=1.56109(P>0.10)$ 、Fu and Li's $D=1.14807(P>0.10)$ 中得到了支持,中性检验结果均为正值显示我们所采样的高山绣线菊种群由于长期的地理隔离增加了居群间的分歧。

2.3 单倍型之间的系统发育分析

NETWORK 软件对高山绣线菊 cpDNA *trnL-trnF* 的 7 种单倍型(S1-S7)进行进化分支网络分析,构建出这 7 种单倍型的中央连接网络图,其拓扑结构如图 3 所示。

以选取的 3 种与高山绣线菊亲缘关系远近不同的蔷薇科植物作为外类群,对叶绿体 DNA *trnL-F* 片段检测到的 7 种单倍型进行系统发育重建,得到最

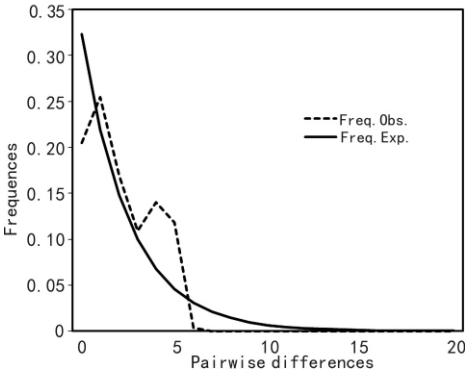


图 2 高山绣线菊 182 个个体 *trnL-F* 片段序列数据的岐点分布图 Exp:期望值; Obs:观测值。
Fig. 2 Mismatch distribution of sequences data of the *trnL-F* fragment from 459 individuals of *S. alpina*
The thin line represents the expectation; the dotted line represents the observed value.

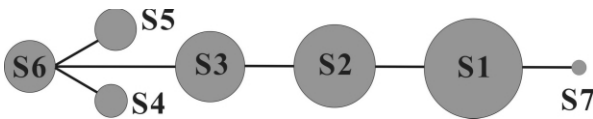


图 3 横断山区高山绣线菊的 7 种单倍型的进化分支网络图
Fig. 3 Phylogenetic relationships of the 7 haplotypes detected of *S. alpina* in Hengduan Mountains

大似然树(ML),其拓扑结构如图 4 所示。高山绣线菊 15 个居群的 7 个单倍型分化为三个主要的分支,分别是 S4、S5 及 S6(84%)聚为一支(Clade I),拥有这些单倍型的居群全部在整个采样范围中处于西部,东部地区居群中出现的单倍型 S1、S2 和 S7(52%)聚为另一支(Clade II),而单倍型 S3 单独成一支(Clade III),其出现的居群在前两个分支分布范围的交接处。

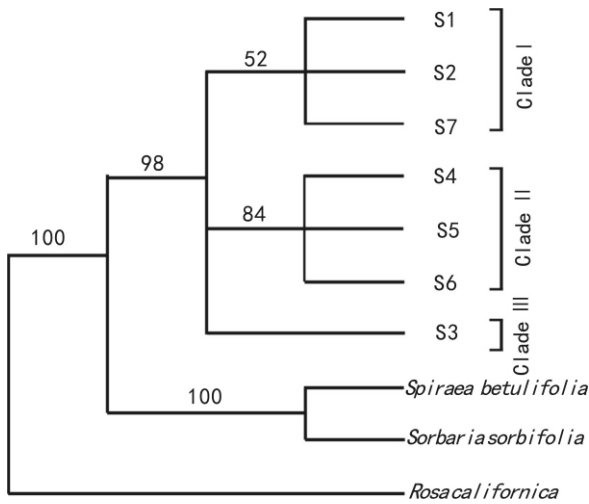


图 4 高山绣线菊 7 种单倍型 (S1-S7) 的最大似然 (ML) 树 分支上的数字表示 1 000 次重复得到的靴带分析支持率(BS)

Fig. 4 Maximum likelihood (ML) tree topology of 7 haplotypes of *S. alpina* Numbers above branch are maximum likelihood bootstrap support(BS)

3 结论与讨论

居群分化是由居群空间上的隔离,突变后环境因子的差异造成选择差异,随机的遗传漂变以及基因流的隔离从而导致居群遗传结构的空間异质性(Jacquemyn 等,2004)。基于 140 个物种的数据研究,获得了对叶绿体 DNA 标记的 averages 的居群间的遗传分化 (G_{ST}) 是 0.646 (Petit 等,2005) 在我们的研究结果中,居群间的遗传分化 ($G_{ST}=0.708$) 比这个平均值要高,可能是由于第四纪冰期时不同的避难所中发生了不同的遗传漂变所造成。同样的,分子变异分析 (AMOVA) 的结果表明,居群间的遗传变异为 84.48%, $F_{ST}=0.84476 (P<0.001)$ 。由此可以看出:高山绣线菊具有较高的居群间遗传多样性,而居群内的遗传多样性较低。这可能是由于居群的基因流受限造成。高山绣线菊的叶绿体 DNA 为种子传播,但是其居群间的平均基因流为 0.09,表明居群间的基因交流很少。这可能是由于横断山区特殊的地理环境造成种子传播距离有限,加之居群间的地理隔离从而阻碍居群间的基因流 (Ehrich 等,2007)。

本研究得到的 7 种叶绿体 DNA 的单倍型在系统发育重建过程中分为地理分布范围各不相同的三支 (图 4),这一拓扑结构和单倍型的进化分支网络图结果相一致。S3 这一单倍型单独分为一支,其被处在

横断山区东西部中间地带的 3 个居群分享,而单倍型的进化分支网图支持其可能是进化上最为原始的单倍型。在横断山区东部和西部的居群中,各有 3 种互不共享的单倍型。Avice (2000) 认为新衍生出的单倍型应该是与原始单倍型组成一个“星状”结构,然而我们的结果中没有发现类似的结构。同时高山绣线菊在横断山区的居群分布存在着明显的分子系统地理学结构。这可能是因为第四纪冰期时,该物种在横断山区地区有着多个避难所。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 (Hewitt, 2000; Heuertz 等, 2004; Petit 等, 2005)。而我们的结果中,在东部地区和西部地区中,都有较高的居群遗传多样性和单倍型的多样性 (图 1; 表 1),这显然是与单避难所假说相反的,也支持我们关于该地区存在该物种的多个避难所的解释。这一解释也与歧点分布分析结果相一致,歧点分布分析得到的曲线为多峰曲线 (图 2),背离了对快速扩张模型的假设,中性检验结果显示我们所研究区域的高山绣线菊种群由于长期的地理隔离增加了居群间的分歧。由此我们推测,在第四纪时期受到冰期和间冰期的影响,植物种群随着气候的波动而反复缩小和扩张,高山绣线菊在冰期时候可能退缩到低海拔地区生存。然而喜马拉雅山系——青藏高原隆起造成的复杂横断山区附近的环境,多数平行走向的山脉及其因此而分割出来的河谷,使得不同的居群在退缩过程中不可能退回到同一个避难所中,而在反复扩张与退缩中由于遗传漂变而将单倍型随机固定在不同的居群中,从而形成了现在的生物地理分布格局。

高山绣线菊在横断山区的这种谱系地理结构与 Wang 等 (2008) 对偏花报春的研究结果相一致,都是在第四纪冰期时存在多个地理隔离的避难所,没有表现出种群的快速扩张和迁移现象。而在冰期/间冰期气候的反复波动和喜马拉雅山系——青藏高原隆升所造成的横断山区特殊的地理环境的共同作用下造成的地理隔离最终形成该地区现在的物种分布格局。这些物种的谱系地理学的研究,为了解第四纪冰期对横断山区植物区系的形成以及冰期后的迁移路线的影响提供了很好的模型,但是还需要更多类群的研究来丰富这一模型。

参考文献:

李文华,周兴民. 1998. 青藏高原生态系统及优化利用模式

- [M]. 广州:广东科技出版
- 吴征镒. 1987. 西藏植物区系的起源及其演化[M]//西藏植物志. 北京:科学出版社
- 俞德浚. 1974. 中国植物志(第 36 卷)[M]. 北京:科学出版社:1—102
- Avis JC. 2000. Phylogeography: the History and Formation of Species[M]. Cambridge: Harvard University Press
- Chen SY, Wu GL, Zhang DJ, *et al.* 2008. Molecular phylogeography of alpine plant *Metagentiana striata* (Gentianaceae) [J]. *J Syst Evol*, **46**(4): 573—585
- Downie SR, Katz Downie DS, *et al.* 2000. A phylogeny of the flowering plant family Apiaceae based on chloroplast DNA *rpl* 16 and *rpoC1* intron sequences: towards a supragenetic classification of subfamily, Apioidae[J]. *Am J Bot*, **87**(2): 273
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material[J]. *Phytochem Bull*, **19**(1): 11—15
- Ehrlich D, Gaudeul M, Assefa A, *et al.* 2007. Genetic consequences of Pleistocene range shifts: contrast between the Arctic, the Alps and the East African mountains[J]. *Mol Ecol*, **16**(12): 2 542—2 559
- Ennos RA, Sinclair WT, Hu XS, *et al.* 1999. Using organelle Markers to Elucidate the History, Ecology and Evolution of Plant Populations[M]. London: Taylor Francis Ltd., 1—19
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2006. *Arlequin* 3.01: An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis [M]. Switzerland: Institute of Zoology, University of Berne
- Gao QB, Zhang DJ, Chen SY, *et al.* 2009. Chloroplast DNA phylogeography of *Rhodiola alsia* (Crassulaceae) in the Qinghai-Tibetan Plateau[J]. *Botany*, **87**(11): 1 077—1 088
- Grivet D, Petit RJ. 2002. Phylogeography of the common ivy (*Hedera* sp.) in Europe: genetic differentiation through space and time[J]. *Mol Ecol*, **11**(8): 1 351—1 362
- Heuertz M, Fineschi S, Anzidei M. 2004. Chloroplast DNA variation and postglacial recolonization of common ash (*Fraxinus excelsior*) in Europe[J]. *Mol Ecol*, **13**(11): 3 437—3 452
- Hewitt G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages [J]. *Nature*, **405**(6789): 907—913
- Jacquemyn H, Honnay O, Galbusera P, *et al.* 2004. Genetic structure of the forest herb *Primula elatior* in a changing landscape [J]. *Mol Ecol*, **13**(1): 211—219
- Lu LT(陆玲娣). 1996. The evolution and distribution of Subfam. Spiraeoideae (Rosaceae) of China, with special reference to distribution of the subfamily the world(中国蔷薇科绣线菊亚科的演化分布——兼述世界绣线菊亚科植物的分布)[J]. *Acta Phytotax Sin*(植物分类学报), **34**(4): 361—3 751
- Meng LH, Yang R, Abbott RJ, *et al.* 2007. Mitochondrial and chloroplast phylogeography of *Picea crassifolia* (Pinaceae) in the Qinghai-Tibetan Plateau and adjacent highlands[J]. *Mol Ecol*, **16**(19): 4 128—4 137
- Mogensen HL. 1996. The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants[J]. *Am J Bot*, **83**(3): 383—404
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, *et al.* 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities[J]. *Nature*, **403**: 853—858
- Nei M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics[M]. New York: Columbia University Press
- Pan YS(潘裕生). 1989. Division of geologic structure in the Hengduan Mountainous region(横断山区地质构造分区)[J]. *Mount Res*(山地研究), **7**(1): 3—12
- Petit RJ, Duminil J, Fineschi S, *et al.* 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations[J]. *Mol Ecol*, **14**(3): 689—701
- Pons O, Petit RJ. 1996. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles[J]. *Genetics*, **144**(3): 1 237—1 245
- Potter D, Gao F, Bortiri PE, *et al.* 2002. Phylogenetic relationships in Rosaceae inferred from chloroplast *matK* and *trnL-trnF* nucleotide sequence data[J]. *Plant Syst Evol*, **231**(1—4): 77—89
- Raymond M, Rousset F. 1995. An exact test for population differentiation[J]. *Evolution*, **49**(6): 1 280—1 283
- Richardson JE, Fay MF, Cronk QCB, *et al.* 2000. A phylogenetic analysis of Rhamnaceae using *rbcL* and *trnL-F* plastid DNA sequences[J]. *Am J Bot*, **87**(9): 1 309—1 324
- Rogers AR, Harpending H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences[J]. *Mol Biol Evol*, **9**(3): 552—569
- Rozas J, Sánchez-Delbarrio JC, Messeguer X, *et al.* 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods[J]. *Bioinformatics*, **19**(18): 2 496—2 497
- Swofford DL. 2003. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony(* and other methods), version 4.0b10[M]. Sunderland, MA: Sinauer Associates
- Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism[J]. *Genetics*, **123**(3): 585—595
- Tang LY(唐领余), Shen CM(沈才明). 1996. Late Cenozoic vegetational history and climatic characteristics of Qinghai-Xizang Plateau(青藏高原晚新生代植被史及其气候特征)[J]. *Acta Micropaleontol Sin*(微体古生物学报), **13**(4): 321—337
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, *et al.* 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucl Acids Res*, **25**(24): 4 876—4 882
- Wang FY, Gong X, Hu CM, *et al.* 2008. Phylogeography of an alpine species *Primula secundiflora* inferred from the chloroplast DNA sequence variation[J]. *J Syst Evol*, **46**(1): 13—22
- Weir BS, Cockerham CC. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure[J]. *Evolution*, **38**(6): 1 358—1 370
- Wolfe KH, Li WH, Sharp PM. 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs[J]. *Proc Nat Acad Sci, USA*, **84**(24): 9 054—9 058
- Zhang Q, Chiang TY, George M, *et al.* 2005. Phylogeography of the Qinghai-Tibetan Plateau endemic *Juniperus przewalskii* (Cupressaceae) inferred from chloroplast DNA sequence variation [J]. *Mol Ecol*, **14**(11): 3 513—3 524
- Zheng BX, Rutter N. 1998. On the problem of Quaternary glaciations, and the extent and patterns of Pleistocene ice cover in the Qinghai-Xizang (Tibet) Plateau [J]. *Quaternary International*, **45/46**: 109—122