

线粒体 DNA *nad1* 序列在青海云杉青藏高原台面和周边地区种群中的变异

杨 瑞^{1,3}, 孟丽华^{1,3}, 张 茜^{1,3}, 刘建全^{1,2*}

(1. 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;
2. 兰州大学干旱与草地生态学重点实验室, 兰州 730000; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 青藏高原是气候变迁的敏感区。但第四纪以来全球气候的反复变化对该地区植物分布格局的影响至今未进行过仔细研究。线粒体 DNA 在松科植物中是母系遗传, 其变异被广泛用于研究该科植物历史上由于气候变迁造成的瓶颈作用以及冰期后扩张中形成的奠基者效应。对青海云杉位于青藏高原核心、其边缘甘肃和宁夏地区共 12 个种群 155 个个体的线粒体 *nad1* 片段的全序列进行测序, 研究该序列在各种种群中的变异状况。通过测序发现该片段在青海云杉中十分保守, 在所有个体中仅发现由于重复序列造成的 5 种单倍型 (Hap A, Hap B, Hap C, Hap D 和 Hap E)。高原核心的所有种群均只有 Hap A, 而所有的 4 种单倍型都在高原边缘的甘肃地区存在, 但这一地区仍然是 Hap A 占优势; 但是在远离高原的宁夏地区则存在 5 种单倍型; 多样性的变异趋势是宁夏地区高于高原边缘的甘肃地区, 而甘肃地区又显著高于高原核心地区。这一结果表明, 在过去气候变迁过程中, 不同地区的青海云杉种群经历了不同的气候影响, 这种影响造成的奠基者效应或者瓶颈作用是造成目前这种遗传多样性分布格局的主要原因。现有的单倍型分布格局, 特别是高原上所有间断分布种群拥有相同的单倍型表明, 森林回迁中的奠基者效应应是更为重要的因素。

关键词: 青海云杉; 线粒体 DNA *nad1*; 序列变异; 瓶颈作用; 奠基者效应

文章编号: 1000-0933(2005)12-3307-07 **中图分类号:** Q 948, S151 **文献标识码:** A

The mitochondrial DNA *nad1* sequence variation of *Picea crassifolia* (Pinaceae) in the Qinghai-Tibetan Plateau platform and adjacent populations

YANG Rui^{1,3}, MENG Lihua^{1,3}, ZHANG Qian^{1,3}, LIU Jianquan^{1,2*} (1. Qinghai-Tibet Plateau Biological Evolution and Adaptation Laboratory, Northwest Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China; 2. Key Laboratory of Arid and Grassland Ecology, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 3. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China). Acta Ecologica Sinica, 2005, 25(12): 3307~ 3313

Abstract The Qinghai-Tibetan (Q-T) Plateau is the highest and largest plateau in the world, with an average elevation of ~ 4.5 km and an area of 2.5×10^6 km². Its vegetation is considered to be highly sensitive and vulnerable to global climate change because plant growth and distribution in the region depend greatly on survivable temperatures. The climatic oscillations of the Quaternary since 2 million year ago resulted in several glacial and interglacial cycles during which glaciers developed, expanded and receded in circumpolar and mountainous regions. It remains unknown how the plants in the Q-T Plateau had responded to the Quaternary climatic oscillation. The vegetation of the northeast Q-T Plateau is dominated by alpine meadow and desert-steppe with sparse forests scattered within it. To obtain a better understanding of the historical biogeography of one

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目 (30430560); 中国科学院知识创新工程方向性资助项目 (KSCX-SW-106); 全国优秀博士论文作者专项基金资助项目

收稿日期: 2004-11-26; **修订日期:** 2005-04-10

作者简介: 杨瑞 (1977~), 男, 甘肃临夏人, 东乡族人, 硕士生, 主要从事树木分子遗传学研究。

* 通讯联系人 Author for correspondence E-mail: ljqdx@public.xn.qh.cn

Foundation item: Key Project of National Science Foundation of China (No. 30430560); Key Innovation Plan of Chinese Academy of Sciences (No. KSCX-SW-106); Special Fund of Outstanding Ph. D. Dissertation.

Received date: 2004-11-26; **Accepted date:** 2005-04-10

Biography: YANG Rui, Master candidate, mainly engaged in molecular genetics of trees

constituent species of the forests in this region, we examined the mitochondrial DNA (mtDNA) variation of *Picea crassifolia* Kom. (Pinaceae), a key species in the sparse forest islands of the plateau. This fragment is paternally inherited according to the other researched members of Pinaceae and has been used to detect the bottleneck imprints and founder effects during the postglacial recolonizations of the conifers of this family in response to the past climatic oscillation. In the present study, mtDNA *nad1* was sequenced for 155 individuals of *P. crassifolia* from 12 populations located respectively in the Q-T Plateau platform (6 populations) and adjacent regions (Gansu region, plateau edge, 3 populations and Ningxia region, 3 populations). This DNA fragment is highly conserved in *P. crassifolia*, and only 5 haplotypes (Hap A, Hap B, Hap C, Hap D and Hap E) were recovered within all sampled individuals, and Hap A is the commonest. The plateau platform fixed only Hap A, but four haplotypes occurred in the edge populations with Hap A dominant. However, all of 5 haplotypes were found in the Ningxia region with even frequencies and the total diversity of this region is the highest. The diversity of Gansu region at the plateau edge is much higher than that of the plateau platform. These results indicate that both the plateau platform and plateau edge populations must have suffered intensive bottlenecks or founder effects during the postglacial recolonizations due to the past climatic oscillations, and the former region suffered more than the latter. The haplotype distribution pattern of the present investigation seems further to indicate that the common fixture of the same haplotype among the disjunct populations of the Q-T plateau platform was mainly caused by the founder effect during the forest recolonization in this region.

Key words: *Picea crassifolia*; mitochondrial DNA *nad1*; variation, bottlenecks; founder effects

第四纪冰期气候的反复变化对整个地球,特别是对北半球的生物分布格局产生了重要影响^[1]。在冰期,高纬度地区常形成冰原,相应在北温带的高海拔山区形成山地冰川,这一时期的生物向低海拔地区迁移,或者在原分布地域的小地点保存,但种群相应缩小;在间冰期或者冰期结束后存在于避难所的种群再回迁(re-colonization),而原地保留的小种群则再次扩张(expansion);这种气候的反复变迁造成植物群体遗传结构产生重大变化:回迁的种群由于受到奠基者效应(founder effect)、在极端生境原地保存的种群由于小种群效应而带来的遗传漂变(genetic drift)都使得遗传多样性降低;但是位于避难所的种群,则保留有较完整与较高的遗传多样性^[2,3]。这种遗传结构变化模型最近在欧洲、北美洲以及部分热带生物中都得到了检验和证实,并与古生物学等其它证据相吻合^[1]。但是,只有部分研究涉及到亚洲的生物类群,如对两种杉木(*Cunninghamia konishii* 和 *C. lanceolata*)的分子谱系地理学(molecular phylogeography)研究等^[4]。

等位酶、细胞器基因标记和核基因标记均能反映种子植物种群历史的变化过程^[5],但是由于细胞器基因是单亲遗传,具有更小的有效种群尺度(smaller effective population size),在反映种群群体遗传结构的变化比后者更为明显^[6],特别是那些母系遗传的细胞器DNA片段,它们在追溯现代种群建立过程中的种子来源方面更具有优势^[7]。松科多个属植物的人工杂交与分子标记结合表明线粒体在该科中为母系遗传^[8,9];尽管对部分DNA片段的测序表明,线粒体DNA(mtDNA)序列在该科种内的变异十分保守,但仍在种内检测出一定的变异,被广泛用于种群群体的遗传结构研究^[10]。*Nad1*基因编码线粒体呼吸传递链的复合体I——泛醌氧化还原酶(NADH: ubiquinone oxidoreductase)的*nad1*亚基,是一个结构较为稳定的线粒体基因,由5个外显子构成(*nad1/A-E*)^[11]。该基因片段外显子B和C之间的内含子区具有重复插入(repeated indel),可以区分出多种单倍型,这些单倍型的群体分布式样已成功地应用于松属(*Pinus*)及云杉属的部分种类(如挪威云杉 *Picea abies*, 欧洲云杉 *P. obovata*, 黑云杉 *P. mariana* 等)的分子谱系地理学和物种间基因流造成的渐渗研究^[12-17]。

第四纪冰期,中国虽然没有直接被冰原覆盖,但温度急剧下降造成东部的森林南移^[18]。依据古花粉证据,最后一次大冰期(约18000~20000 a前)时中国的植被重建中也发现北部的针叶林、暖温带落叶阔叶林南移,而西北部无森林存在^[19]。中国西部的青藏高原在第四纪全球气候开始剧烈变化时已经接近目前的高度^[20]。由于其特殊的生存环境,青藏高原地区应该是对温度最为敏感的地区之一。古孢粉的证据表明,在冰期高原上不存在森林植被,这些森林退缩到高原东南部的横断山地区;而间冰期和冰期后的全新世森林植被在高原上的分布面积又进一步扩大^[21]。森林植被的变化是生物对冰期气候变迁响应的重要指示;但是,依据古孢粉证据建立的森林变迁途径不能确定具体植物种类(古孢粉极难确定到某个种)的避难所以及这些物种在某一地区的生长或者缩小过程。此外,由于古孢粉取样过于稀疏,不能完整反映一个物种现代种群的历史变化过程,而对现代种群密集取样的分子谱系地理学则能克服这些缺点,使其在研究物种种群的历史变化过程方面具有更为重要的优势^[22]。青海云杉(*Picea crassifolia* Kom.)是青藏高原东北部残存森林片段阴坡的主要建群种,分布在青海西部、东南部、北部、甘肃东南部以及宁夏的贺兰山地区^[23]。该树种是青藏高原东北部高原台面上森林间断分布的典型代表,可能反映了该地区森林与高寒草甸或者荒漠生态系统在第四纪以来气候反复变化中的交替过程。这些现代分布森林片段有2种可能存在的来源:(1)是在冰期气候变化早期开始片段化,并在冰期气候变化过程中一直在原地保留至今;(2)冰期后森林回迁(recolonization)入侵青藏高原造成

森林连续分布, 由于全新世以来的温度下降或者人为活动影响才造成现今的森林间断分布。如果是由于前者造成的森林片段分布, 这些在高原台面原地保留的各个群体, 由于遗传漂变遗传多样性减少; 后者同样造成遗传多样性减少, 但和前者不同的是, 这些间断的种群由于是共同的入侵而留下的后代, 都应该拥有相同的遗传结构(如单倍型或者其它分子标记产物); 但是无论如何, 在高原边缘的种群由于受瓶颈效应相对较弱或者处于奠基者效应的起始阶段, 应该保留比高原台面更为丰富的遗传多样性。本文主要目的是: (1) 通过对种群测序检验青海云杉 *nad1* 基因的 intron2 是否存在变异, 能否在所测个体中区别出多种单倍型? (2) 如果存在变异, 这些单倍型在高原台面和边缘种群中是否存在不同的地理分布式样? 而远离高原地区的宁夏贺兰山是否存在更高的遗传多样性?

1 材料和方法

1.1 实验材料

本研究所用青海云杉针叶采自间断分布森林片段的 12 个种群(表 1), 其中 6 个种群是分布在青藏高原台面上, 3 个种群来自甘肃的高原东北部边缘地区, 3 个种群来自宁夏贺兰山(图 1)。每个种群采 5~ 18 个个体, 个体之间间隔 100m 以上, 共采 155 个个体。针叶在野外使用硅胶迅速干燥。

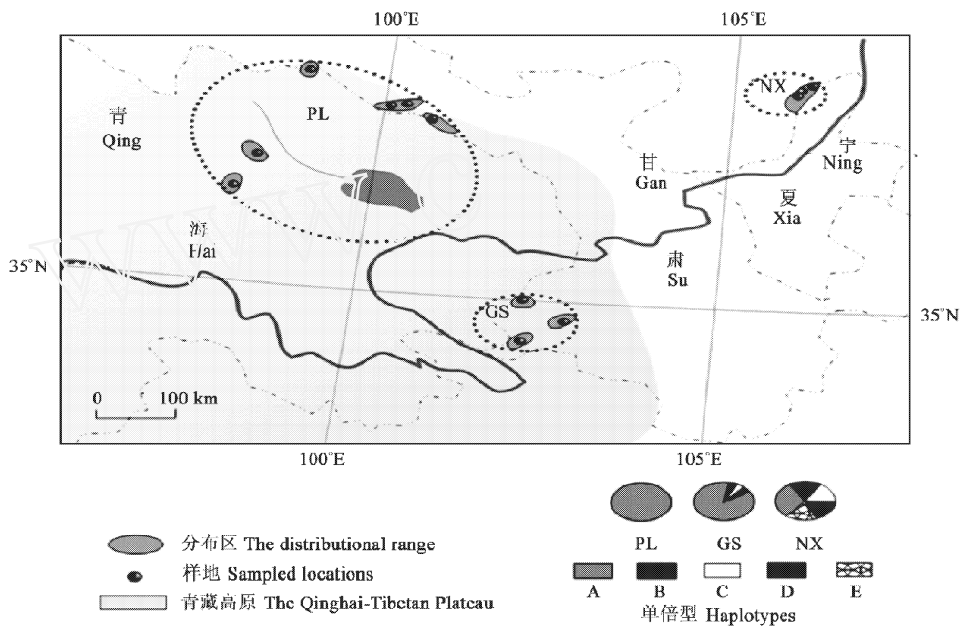


图 1 青海云杉研究种群及各单倍型分布图

Fig. 1 The distributional range and haplotype distribution of *P. crassifolia*

1.2 DNA 提取 PCR 扩增、纯化和测序

总 DNA 的提取采用改进后的 CTAB 法^[24]。每个个体取 8~ 10 片针叶, 提取总 DNA。使用 *nad1* F (GATC GGCCA TAAA TGTA CTCC) 和 *nad1* R (CCCCA TA TA TTCCCGGA GC) 引物来扩增 *nad1* 基因的全 DNA 片段。扩增反应体系为 25 μ l, 反应体系包括: 10~ 40ng 总 DNA, 50mmol/L Tris-HCl, 1.5mmol/L MgCl₂, 250 μ g/mL BSA, 0.5mmol/L dNTPs, 2 μ mol/L 引物和 0.75U Taq 酶。扩增反应在 Tpersonal PCR System (Biometra) 上进行, 程序为: 70 4min 94 1min, 52 20s, 72 2min, 4 个循环 94 20s, 52 20s, 72 2min, 36 个循环 72 7min。PCR 产物用纯化试剂盒纯化 (Casarray, Shanghai, China)。

测序引物根据 GenBank 中云杉属已经报道的 *nad1* 全序列设计, 使用的引物序列见表 2。使用 10 μ l 的反应体系, DYEnam ic Dye Terminator (Amersham), 2.5 μ l, 引物 5 μ mol, 模板 25~ 50ng。测序反应的条件如下: 95 8s 95 15s, 50 15s, 60 90s, 31 个循环, 60 90s, 4 5min。测序反应的产物按如下步骤进行纯化: 将测序反应的产物转入含有 22.85 μ l 无水乙醇和 1 μ l NH₄Ac 的溶液中, 室温放置 15min, 4 12000r/min 离心 22min, 弃上清液, 加入 150 μ l 70% 乙醇洗涤沉淀, 4 12000r/min 离心 10min, 弃上清液, 室温放置 30min 自然风干, 加入 10 μ l Loading solution, 用 Megabase 500 Automated DNA 测序仪收集数据。每段序列正反测序相互重合达 90% 以上。

表 1 青海云杉研究种群的材料来源, 每个种群中各种单倍性的分布和频率

Table 1 Origin of materials, frequency of mtDNA haplotype of *Picea crassifolia*

地区 Region	居群 Population	样品采集地 Location	纬度 Latitude	经度 Longitude	海拔 Altitude	样本量 Total No.	D _h	单倍型分布(频率)Haplotype distribution(Frequency)				
								A	B	C	D	E
宁夏 Xingxia	1	Helan Mt., Ningxia 贺兰山, 宁夏	39°00.405'	106°05.010'	2120m	11	0.71	6(0.5455)	1(0.0909)	1(0.0909)	2(0.1818)	1(0.0909)
	2	Helan Mt., Ningxia 贺兰山, 宁夏	38°39.907'	105°53.341'	2230m	12	0.83	2(0.1667)	1(0.3333)	2(0.1667)	3(0.2500)	1(0.0833)
	3	Helan Mt., Ningxia 贺兰山, 宁夏	38°44.128'	105°54.672'	2310m	15	0.81	3(0.1875)	3(0.1875)	4(0.2500)	2(0.1250)	4(0.2500)
甘肃 Gansu	4	Kangle, Gansu 康乐, 甘肃	34°55.804'	103°43.993'	2810m	15	0.13	14(0.9333)				1(0.0667)
	5	Zhuoni, Gansu 卓尼, 甘肃	34°34.637'	103°30.053'	2900m	18	0.11	17(0.9444)	1(0.0556)			
高原面 Plateau platform	6	Xiahe, Gansu 夏河, 甘肃	35°07.948'	102°50.450'	2810m	10	0.20	9(0.9000)	1(0.1000)			
	7	Sunan, Gansu 肃南, 甘肃	38°28.184'	100°24.686'	2710m	17	0.00	17(1.00)				
9	Qilian, Qinghai 祁连, 青海	38°09.142'	100°16.513'	2750m	6	0.00	6(1.00)					
	Qilian, Qinghai 祁连, 青海	38°13.685'	100°15.279'	3230m	5	0.00	5(1.00)					
10	Sunan, Gansu 肃南, 甘肃	38°41.616'	99°30.896'	3230m	13	0.00	13(1.00)					
11	Wulan, Qinghai 乌兰, 青海	37°00.894'	98°46.070'	3310m	17	0.00	17(1.00)					
12	Dulan, Qinghai 都兰, 青海	36°20.387'	98°14.870'	3700m	17	0.00	17(1.00)					

* D 多样性指数 index of biodiversity

1.3 数据处理

序列用 CLUSTAL W^[25] 进行对位排列 (alignment), 寻找不同的序列。根据每个种群中每种单倍型的频率 (表 1), 用 ARLEQUIN 软件 计算 FCT、FST, 结果的可靠性用 1000 次重复的自展检验来完成。种群总的基因多样性 $H_t(N_{ei})$ 用 Haplodiv 计算。为检验海拔对两个地区单倍型多样性的影响, 计算每种单倍型在每个居群中的多样性指数 $D^{[26]}$, D 值越大, 多样性越高。

2 结果

通过对 12 个种群共 155 个个体的 *nad1* intron2 进行序列测

定, 共发现 5 种不同的序列, 可分为 5 种单倍型 (Haplotype): 单倍型 A (Hap A) 的序列长 991 bp, Hap B 序列长 1025 bp, Hap C 序列长 1059 bp, Hap D 序列长 1093bp, 和 Hap E 序列长 1127bp 它们之间的差异在于: Hap B、Hap C、Hap D 和 Hap E 4 种单倍型在离 5 端 466bp 开始分别有 1 至 4 个 34bp (CCCCCTCCGTTGTCA GGGGA GCGACTTCGTACCT) 的重复序列, 它们在 GenBank 中的序列号从 A Y786580 至 A Y786584。它们在所研究种群中的分布分别见表 1 和图 1: Hap A 是分布最广的单倍型, 存在于每一个居群中, 并占有绝对的优势; Hap B、Hap C、Hap D 分别发现于甘肃的 3 个种群中, 每个种群均只发现有 1 个个体。每个种群的多样性指数 D 值, 在甘肃的 3 个种群 D 值分别为 0.11, 0.13, 0.20, 在宁夏的 3 个种群 D 值分别为 0.71, 0.83 和 0.84, 而其余高原面上的种群 D 值均为 0 (表 1)。

宁夏贺兰山地区种群总的基因多样性 $H_t(N_{ei})$ 为 0.80634, 甘肃地区种群总的基因多样性 $H_t(N_{ei})$ 为 0.14435, 而高原面上所检测的所有种群均只有 1 种单倍型, $H_t(N_{ei})$ 为 0; 3 个地区总的基因多样性 $H_t(N_{ei})$ 为 0.34176。通过分子变异分析 (AMOVA), 3 个地区间的分化指数 F_{ct} 为 0.42261 ($p < 0.05$), F_{st} 为 0.42188 ($p < 0.001$), 表明 3 个地区之间存在显著的遗传分化。

3 讨论

在云杉中线粒体基因母系遗传, 仅通过种子传播, 在研究种群的历史变化过程中比其它分子标记具有更大的优势^[27-30], 但是线粒体基因 DNA 片段十分保守^[17,31]。欧洲广布的挪威云杉在 *nad1* intron 2 内含子含有两处重复序列: 一是 34 bp 的重复, 在研究的 940 棵树中, 共发现有 1~6 个插入的重复; 二是紧靠该重复区, 发生 32 bp 的重复, 在所有研究的树中共有 0~7 个重复^[15,16]; 这一重复区在欧洲云杉和黑云杉中可能也存在, 因为通过 PCR-RFLP 对这一区域进行多态检测时均发现了不同的多态片段^[17], 形成种内的多种单倍型。而在其它已经研究的云杉中, 如红云杉 *P. rubens* 未发现该位点 DNA 片段的重复^[17]。对青海云杉 *nad1* intron 2 进行全序列测定, 研究发现在 155 个个体中仅在挪威云杉的第 1 个重复位点发生 0~4 个 34 bp 的重复, 而在第 2 个重复位点未发现插入重复。这些重复将青海云杉所测的 155 个个体分为 5 种单倍型。

青海云杉 5 种单倍型在所研究群体中的分布呈现一定的规律: 高原台面的 6 个种群均只固定 Hap A; 而甘肃的 3 个种群也是 Hap A 占优势, 但在每一个种群发现有另一种不同的单倍型; 宁夏地区则发现所有的 5 种单倍型, 并且各种单倍型分布的频率相对较多, 总的遗传多样性 (H_t) 较高。对于这种单倍型分布最好的假设是, Hap A 是最原始的, 它广布于现在分布的各个种群中; Hap B、Hap C 和 Hap D 后来随机在甘肃和宁夏的种群中产生。但是, 这种插入突变在十分保守的线粒体 DNA 中需要很长的时间, 如成万上百万年以上才能产生如此一个突变^[17,31]。在这种情况下, 这些单倍型的地理分布模式只能是由于历史环境变迁和种群遗传结构改变造成的。5 种单倍型在环境变迁之前已经存在, 且在各种种群中以较为均衡的比例存在, 如本文发现的宁夏地区的种群遗传结构式样。

高原面上森林片段每个种群单一的遗传多样性有两种可能的原因: 冰期气候变化开始就片段化的森林种群由于气候反复变迁遗传漂造成遗传多样性减少, 或者冰期后森林回迁过程中奠基者效应所形成的。研究结果显然支持后者, 这是因为如果是前者, 在冰期连续的森林被分割成孤立的小种群, 并且种群规模迅速减小; 而在间冰期居群又迅速扩大; 如此反复应使得 5 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。但高原间断的森林片段拥有相同的单倍型, 则表明是由于森林回迁过程中奠基者效应所造成的。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^[21]。由于冰期时的地理温度效应, 高原面的温度比边缘低很多, 即使在高原面上的部分地区还存在具有不同于 Hap A 的其它少量单倍型 (如 Hap B 和 Hap C) 个体, 在回迁入过程中也被大量的

表 2 测序使用引物

Table 2 Primers for sequencing		
引物名称 Primer name	方向 Direction	引物序列 Primer sequence (5' ~ 3')
<i>Nad1</i> -F	Forward	GA TCGGCCA TAAA TGTA CTCC
<i>Nad1</i> -R	Reverse	CCCCA TA TA TTCCCGGA GC
<i>Nad1</i> -590F	Forward	CTCGGCA GA GGAA GGGGCTGT
<i>Nad1</i> -840F	Forward	CTCGGA GGGCGA GCGTTCGT
<i>Nad</i> F	Forward	CTCTCCCTCA CCA TA TGA TG
<i>Nad</i> R	Reverse	AGA TCCCA TA TA TTCCCGG

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种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,而这些种群的现代间断分布则可能是更晚时候,由于全新世后期温度下降或者人为活动影响造成的。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^[32],但是否能得到其它证据的支持仍然有待进一步研究。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*)和云杉属(*Picea*)植物,年龄测定是在5000~8000 a 之间。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。

甘肃地区的种群,位于高原边缘,可能是青海云杉在冰期的避难所之一,但是,由于仍然处于青藏高原,不可避免遭受冰期由于高原带来的巨大气候影响,造成冰期和间冰期种群的反复缩减和扩增,瓶颈效应造成遗传多样性减少,Hap A 占优势,同时还局部保留其它的单倍型。冰期后,占优势的Hap A 向高原台面扩散,形成高原面上的种群均只拥有Hap A。但是我们的研究发现青海云杉在高原之外的贺兰山地区拥有更为丰富的遗传多样性,这一地区应是青海云杉最为主要的冰期避难所,冰期后从该山区向整个高原扩散,由于高原边缘的甘肃地区处于扩张的前沿,尽管存在奠基者效应,仍然比处于扩张后期的高原台面拥有更为丰富的遗传多样性。总之,研究结果表明,青海云杉 *nad1* 基因的 intron2 存在变异,能够将所测的个体分为5种单倍型,这些单倍型的地理分布式样初步表明,多样性的变异趋势是宁夏地区高于高原边缘的甘肃地区,而甘肃地区又显著高于高原核心地区;宁夏地区由于远离高原,因而保留了最为丰富的遗传多样性,冰期后森林从避难所回迁而造成的奠基者效应是目前这种遗传多样性分布格局的主要原因。

References

- [1] Hewitt GM. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 2000, **405**: 907~913
- [2] Hewitt GM. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biol. J. Linn. Soc.*, 1996, **58**: 247~276
- [3] Comes HP, Kadereit JW. The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends Pl. Sci.*, 1998, **3**: 432
- [4] Hwang SY, Lin TP, Ma CS, et al. Postglacial population growth of *Cunninghamia konishii* (Cupressaceae) inferred from phylogeographical and mismatch analysis of chloroplast DNA variation. *Mol. Ecol.*, 2003, **12**: 2689~2695
- [5] Avise JC ed. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. New York: Chapman & Hall, 1994
- [6] Wang XR, Smidt AE. Molecular markers in population genetics of forest trees. *Scan. J. For. Res.*, 2001, **16**: 199~220
- [7] Newton AC, Allnot TR, Gillies ACH, et al. Molecular phylogeography intraspecific variation and conservation of tree species. *Trends Ecol. Evol.*, 1999, **14**: 140~145
- [8] Neale DB, Marshall KA, Sederoff RR. Chloroplast and mitochondrial DNA are paternally inherited in *Sequoia sempervirens* D. Don. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, **86**: 9347~9349
- [9] Petit RJ, Port K, Vendramin GG. Plant phylogeography based on organelle genes: an introduction. In: Wiess S, Ferrand N, eds. *Phylogeography of Southern European Refugia*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, 2003. 1~12
- [10] Hipkins VD, Krutovskii KV, Strauss SH. Organelle genomes in conifers: structure, evolution, and diversity. *Forest Genet.*, 1994, **1**: 179~189
- [11] Gutierrez S, Combettes B, Paeppe RD, et al. In the *Nicotiana sylvestris* CMSII mutant, a recombination-mediated change 5' to the first exon of the mitochondrial *nad1* gene is associated with lack of the NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) NAD1 subunit. *Eur. J. Biochem.*, 1999, **261**: 361~370
- [12] Watano Y, Inazu M, Shimizu T. Spatial distribution of cpDNA and mtDNA haplotypes in a hybrid zone between *Pinus pumila* and *P. parviflora* var. *pentaphylla* (Pinaceae). *J. Pl. Res.*, 1996, **109**: 403~408
- [13] Senjo M, Kimura K, Watano Y, et al. Extensive mitochondrial introgression from *Pinus pumila* to *P. parviflora* var. *pentaphylla* (Pinaceae). *J. Pl. Res.*, 1999, **112**: 97~105
- [14] Isoda K, Shiraishi S, Watanabe W, et al. Molecular evidence of natural hybridization between *Abies veitchii* and *A. hololepis* (Pinaceae) revealed by chloroplast, mitochondrial and nuclear DNA markers. *Mol. Ecol.*, 2000, **9**: 1965~1974
- [15] Gugerli F, Sperisen C, Böhler U, et al. Haplotype variation in a mitochondrial tandem repeat of Norway spruce (*Picea abies*) populations suggests a serious founder effect during postglacial recolonization of the western Alps. *Mol. Ecol.*, 2001, **10**: 1255~1263
- [16] Sperisen C, Böhler U, Gugerli F, et al. Tandem repeats in plant mitochondrial genomes: application to the analysis of population

- differentiation in the conifer Norway spruce *Mol. Ecol.*, 2001, **10**: 257~ 263
- [17] 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 *Mol. Ecol.*, 2003, **13**: 2735~ 2747.
- [18] Wu Z Y. *China Vegetation*. Beijing: Science Press, 1980
- [19] Harrison S P, Yu G, Takahara H, *et al*. Palaeovegetation Diversity of temperate plants in east Asia *Nature*, 2001, **413**: 129~ 130
- [20] Li J J, Wen S X, Zhang Q S. A discussion on the period, amplitude and type of the uplift of the Qinghai-Xizang Plateau. *Science in China (Series B)*, 1979, **6**: 608~ 616
- [21] Shi Y F, Li J J, Li B Y. *Uplift and Environmental Changes of Qinghai-Tibetan Plateau in the late Cenozoic*. Guangzhou: Guangdong Science & Technology Press, 1998
- [22] Abbott R J, Brochmann C. History and evolution of the arctic flora: in the footsteps of Eric Hult *Mol. Ecol.*, 2003, **12**: 299~ 313
- [23] Zheng W J, Fu L G. *Flora of China*. Vol 7. Beijing: Science Press, 1978. 375~ 376
- [24] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material *Phytochem. Bull.*, 1987, **19**: 11~ 15
- [25] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W -improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice *Nuc. Acid Res.*, 1994, **22**: 4673~ 4680
- [26] Simpson E H. Measurement of diversity. *Nature*, 1949, **163**: 688
- [27] Szmidt A E, Alden T, Hallgren J E. Paternal inheritance of chloroplast DNA in *Larix*. *Pl. Mol. Biol.*, 1987, **9**: 59~ 64
- [28] Gillham N W. *Organelle Genes and Genomes: Transmission and Compatibility of Organelle Genomes*. Oxford University Press, New York, 1994
- [29] Hopkins V D, Krutovskii K V, Strauss S H. Organelle genomes in conifers: structure, evolution, and diversity. *Forest Genet.*, 1994, **1**: 179~ 189
- [30] Mogensén H L. The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants *Amer. J. Bot.*, 1996, **83**: 383~ 404
- [31] Dumolin-Lapegue S, Demesure B, Fineschi S, *et al*. Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent *Genetics*, 1997, **146**: 1475~ 1487.
- [32] Tang L Y, Shen C M. Late Cenozoic vegetational history and climatic characteristics of Qinghai-Xizang Plateau. *Acta Micropalaeontologica Sinica*, 1996, **13**: 321~ 337.

参考文献:

- [18] 吴征镒. 中国植被. 北京: 科学出版社, 1980
- [20] 李吉均, 文世宣, 张青松. 青藏高原隆起的时代、幅度和形式的探讨. 中国科学(B 辑), 1979, (6): 608~ 616
- [21] 施雅风, 李吉均, 李炳元. 青藏高原晚新生代隆升与环境变化. 广东: 广东科技出版社, 1998
- [23] 郑万钧, 傅立国. 中国植物志(第7卷). 北京: 科学出版社, 1978. 375~ 376
- [32] 唐领余, 沈才明. 青藏高原晚新生代植被史及其气候特征. 微体古生物学报, 1996, **13**(4): 321~ 337.