

基于分子标记的白蜡树属椒叶栲组系统发育及谱系地理格局形成

韦羿帆¹, 周明芹¹, WEN Jun²

(¹长江大学园艺园林学院, 湖北荆州 434023; ²史密森学会国家自然历史博物馆植物学部, 美国华盛顿特区 D. C. 20013-7012)

摘要:木犀科白蜡树属椒叶栲组(*Fraxinus* sect. *Sciadhanthus*)由自然分布于中国中部的对节白蜡(*Fraxinus hupehensis* S. Z. Qu, C. B. Shang & P. L. Su)、喜马拉雅西部的椒叶栲(*Fraxinus xanthoxyloides* (G. Don) DC.)和非洲北部的*Fraxinus dimorpha* 3个物种组成, 呈现出特殊的间断分布模式, 目前该组的起源和演化过程尚不清楚。利用ITS、*psbA-trnH*、*rpl32-trnL*和*matK* 4个标记对白蜡树属42个物种间的系统发育关系进行分析, 结果表明: (1)利用ITS序列构建的贝叶斯系统树支持Wallander的分类方法, 即属内再分成6个组, 对节白蜡、椒叶栲和*F. dimorpha*都属于椒叶栲组, 且该组与欧栲组(sect. *Fraxinus*)的亲缘关系最近, 形成姐妹组; (2)椒叶栲可能是*F. dimorpha*与欧亚种的杂交后代; (3)BEAST分化时间图显示, 白蜡树属最早起源于42.05 Ma, 椒叶栲组最早分化于21.86 Ma, 对节白蜡最早分化于11.87 Ma。青藏高原的快速隆起可能是导致椒叶组物种间断分布的重要原因, 对节白蜡和椒叶栲可能是其影响下的孑遗植物。

关键词:白蜡树属; 椒叶栲组; 对节白蜡; 谱系地理学; 华中—西喜马拉雅—北非间断分布

Molecular Phylogenetic Analysis of *Fraxinus* Section *Sciadhanthus* (Oleaceae) and Its Biogeographic Implications

WEI Yifan¹, ZHOU Mingqin¹, WEN Jun²

(¹College of Horticulture and Landscape Architecture, Yangtze University, Jingzhou 434023, Hubei; ²Department of Botany, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington D. C. 20013-7012, USA)

Abstract: *Fraxinus* section *Sciadhanthus* is known with three species: *Fraxinus hupehensis* from Central China, *F. xanthoxyloides* from Western Himalaya, and *F. dimorpha* from North Africa. These species exhibit an unusual biogeographic disjunction across Central China, Western Himalaya and North Africa, whereas their origin and evolutionary remain unclear. The phylogenetic relationships of this section was investigated using nuclear ribosomal ITS and chloroplast genes *psbA-trnH*, *rpl32-trnL* and *matK*. The Bayesian system tree constructed by ITS sequences supports the classification system proposed by Wallander, in which the species of *Fraxinus* were classified into six sections. *F. hupehensis*, *F. xanthoxyloides* and *F. dimorpha* were all resided to section *Sciadhanthus* and formed a sister group with section *Fraxinus*. We found that *F. xanthoxyloides* may have originated from hybridization between *F. dimorpha* and a Eurasian species. The divergence time suggested that *Fraxinus* first differentiated at 42.05 Ma, section *Sciadhanthus* initially diverged at 21.86 Ma, and *F. hupehensis* diverged at 11.87 Ma. The uplifts of the Tibetan Plateau in the Tertiary may be the driving force and main reason causing the disjunctive distribution in section *Sciadhanthus*. *F. hupehensis* and *F. xanthoxyloides* are proposed to be relict plants conferred by this process.

Key words: *Fraxinus*; section *Sciadhanthus*; *Fraxinus hupehensis*; biogeography; Central China—Western Himalaya—North African disjunction

收稿日期: 2023-09-18 网络出版日期: 2023-12-02

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230918002>

第一作者研究方向为园林植物种质资源利用与创新, Email: weiyfjdx@163.com

通信作者: 周明芹, 研究方向为园林植物种质资源利用与创新, Email: zhoumqzds@126.com

基金项目: 国家自然科学基金(31200528)

Foundation project: National Natural Science Foundation of China(31200528)

植物在北半球的洲际间断分布一直是生物地理学的研究热点之一,目前认为地质事件和气候变化是植物迁移和扩散的重要驱动因素之一^[1]。白垩纪晚期至始新世早期,古特提斯植物区系主要分布于古特提斯海沿岸一带(包括现今地中海区域、东北非、中东以及喜马拉雅-横断山区)^[2]。渐新世时期,欧亚大陆气候的干旱化导致古特提斯植物区系逐渐被早生古地中海植物区系取代^[3]。随着第三纪青藏高原的剧烈隆起以及气候的进一步早化,古地中海植物区系分化出了适应高山环境的中国-喜马拉雅成分,逐渐形成了现今青藏高原植物区系重要的分化中心^[2-3]。第四纪更新世的气候振荡强烈影响了北半球植被分布的收缩和扩张^[1],促使地中海植物区系的部分类群在非洲、欧亚地区形成一系列的间断分布模式^[2-3]。自新近纪以来,华中大部分地区经历的地壳运动相对稳定,并没有显著受到更新世大陆冰盖的影响,特殊的地质环境为古老残遗类群提供了适宜的微环境和冰期避难所,在一定程度上促进了这些区域植物的谱系地理格局形成^[4]。

白蜡树属(*Fraxinus* L.)隶属于木犀科(Oleaceae)木犀亚科(Oleoideae)栲族(Fraxineae),目前全球有48种植物,广泛分布于北半球的温带和亚热带地区,北美、东亚是本属的两个主要的多样性中心^[5]。自1753年白蜡树属被记载以来,植物学家根据其单翅果、羽状复叶和两性花等重要形态特征以及地理分布格局,报道了数种系统分类方法^[6-7]。2008年,Wallander^[5]在北美和中国采集记录了43种白蜡树属植物,基于形态学和分子生物学研究将该属的40种植物在属内再分为6个组:Sect. *Dipetalae* (Lingelsh.) E. Nikolaev、欧栲组(Sect. *Fraxinus*)、象蜡树组(Sect. *Melioides* (Endl.) Lingelsh)、苦枥木组(Sect. *Ornus* (Boehm.) DC.)、Sect. *Pauciflorae* (Lingelsh.) E. Wallander以及椒叶栲组(Sect. *Sciadhanthus* (Coss. et Dur.) Lingelsh.)。2012年,Wallander^[8]对本属48种植物的形态特征进行描述和修订,最终正式保留了45个物种名称,为白蜡树属的后续研究构建了较为完整的系统发育框架。

1855年,Cosson等^[9]在非洲北部发现白蜡树属新种*F. dimorpha* Coss. & Durieu及其变种*Fraxinus dimorpha* var. *dumosa* Carrière。1920年,Lingelsheim^[10]将两个北非种与椒叶栲(*Fraxinus xanthoxyloides* (G. Don) DC.)划分为小花亚组(Subsect. *Sciadhanthus*)。1979年,曲式曾等^[11]在中国湖北发现对节白蜡(*Fraxinus hupehensis* S. Z. Qu, C. B. Shang & P. L.

Su),并根据形态学特征将其划入小花亚组。2001年,Govaerts^[12]对两个北非种群间的同义名进行了探讨,认为它们应当归为同一物种。2008年,为了厘清该亚组的物种组成关系,Wallander^[5]通过对标本广泛的观察和形态学性状的比较,将*Fraxinus dimorpha*作为椒叶栲的异名,与椒叶栲、对节白蜡归并为椒叶栲组(Sect. *Sciadhanthus*),并归纳出该组具有奇数羽状复叶、叶轴上具狭翅、短而密集的聚伞状圆锥花序以及单翅果等形态特征。2013年,Hinsinger等^[13]通过分子生物学和系统发育研究,揭示了椒叶栲组与欧栲组(Sect. *Fraxinus*)互为姐妹群关系。

对节白蜡,落叶大乔木,仅分布于中国湖北省大洪山及周边地区^[11];椒叶栲,落叶灌木或小乔木,集中分布于喜马拉雅西部、阿富汗、巴基斯坦,以及东起西藏西至摩洛哥和阿尔及利亚北部的地理范围内^[6]; *Fraxinus dimorpha* 仅分布于非洲东北部^[9]。椒叶栲组物种在华中、西喜马拉雅和北非地区呈现出特殊的间断分布模式(图1),对开展植物区系的系统发育和谱系地理学方面的研究具有重要意义。本研究利用ITS、*psbA-trnH*、*rpl32-trnL*及*matK*4个分子标记对椒叶栲组及白蜡树属其他5个组共42个物种的系统发育关系与分化时间进行分析,以此探讨椒叶栲组的起源与演化以及谱系地理格局形成的原因,并为开展白蜡树属物种的谱系地理学研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 样本收集

在本研究中,椒叶栲组的两份对节白蜡样本采自中国湖北,两份椒叶栲标本(G. L. Webster & E. Nasir E. 6503 (A)采自克什米尔,O. H. Volk 71.678 (A)采自阿富汗)保存于美国史密斯研究院的自然历史博物馆。椒叶栲组的另一物种*F. dimorpha*及白蜡树属其他5个组共40个物种的序列来自NCBI的GenBank数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)。选取木樨(*Osmanthus fragrans* Lour.)、美洲木樨(*O. americanus* (L.) Benth. & Hook. f. ex A. Gray)、流苏树(*Chionanthus virginicus* L.)、美国流苏树(*C. retusus* Paxton)、腺叶木樨榄(*Olea paniculata* R. Br.)、总序桂(*Phillyrea latifolia* L.)、*Forestiera acuminata* (Michx.) Poir.等7个物种作为椒叶栲组的外类群。除对节白蜡和椒叶栲2个物种4份样本外,其他47个物种共56个样本的GenBank序列登记号详见表1。

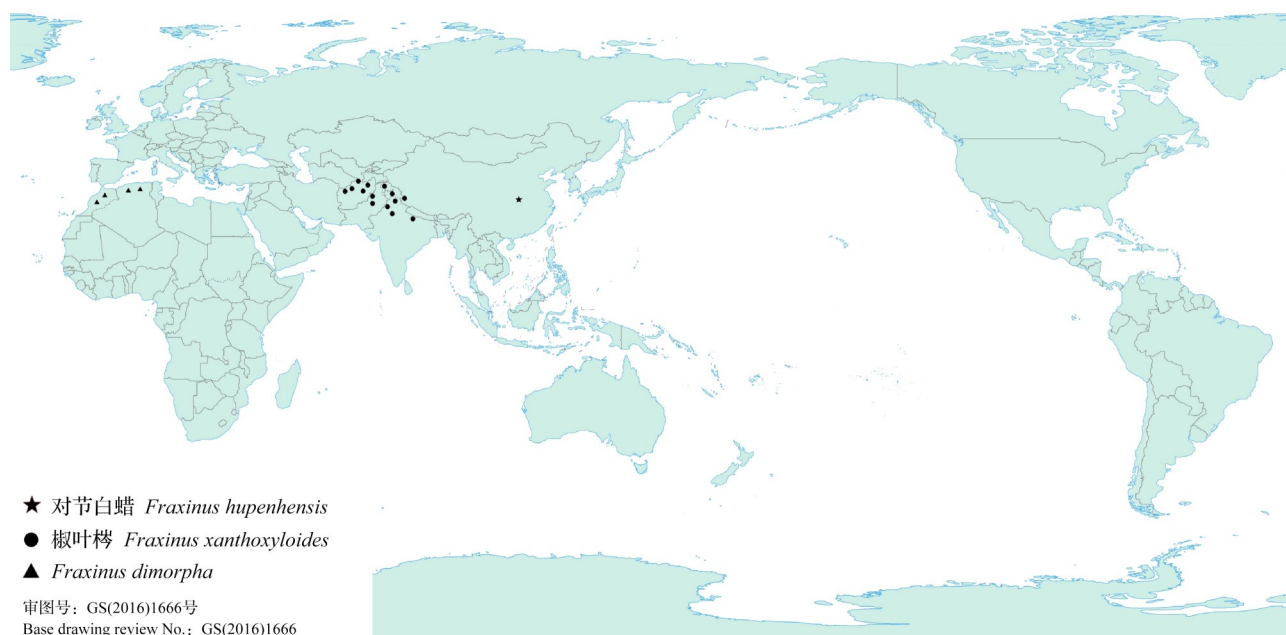


图1 白蜡树属椒叶栲组物种间断分布示意图

Fig. 1 A schematic map showing the unusually wide disjunct distribution of *Fraxinus* section *Sciadanthus*

表1 试验材料种名及其 GenBank 序列登记号

Table1 Species name and the GenBank accession number of *Fraxinus* included in this study

编号 No.	名称 Name	拉丁学名 Latin name	GenBank 序列登记号 The GenBank accession number			
			<i>matK</i>	<i>rpl32-trnL</i>	<i>psbA-trnH</i>	ITS
1	美国白蜡	<i>Fraxinus americana</i> L.	HM171496	HM222718	HM367363	HQ705201
2	尖果栲	<i>F. angustifolia</i> Vahl ssp. <i>oxycarpa</i> (Willd.) Franco & Rocha Afonso				HQ705262
3	叙利亚栲1	<i>F. angustifolia</i> spp. <i>syriaca</i> (Boiss.) Yalt.1				HQ705294
	叙利亚栲2	<i>F. angustifolia</i> spp. <i>syriaca</i> (Boiss.) Yalt.2				HQ705293
4	窄叶栲	<i>F. angustifolia</i> spp. <i>angustifolia</i>				HE602415
5	—	<i>F. anomala</i> Torr. ex S. Watson		HM222739	HM367380	HQ705209
6	—	<i>F. apertisquamifera</i> Hara		HM222746	HM367387	EU314824
7	—	<i>F. berlandieriana</i> DC.	HM171521	HM222750	HM367391	HQ705210
8	小叶栲	<i>F. bungeana</i> A.DC.	HM171516	HM222754	HM367394	HQ705212
9	卡罗莱纳栲	<i>F. caroliniana</i> Mill.		HM222758	HM367398	HQ705215
10	—	<i>F. chiisanensis</i> Nakai	HM171501	HM222760	HM367400	HQ705217
11	白蜡树1	<i>F. chinensis</i> Roxb.1	HM171503	HM222766	HM367406	HQ705220
	白蜡树2	<i>F. chinensis</i> Roxb.2		HM222765	HM367405	HQ705225
12	香栲	<i>F. cuspidata</i> Torr.		HM222772	HM367412	EU314838
13	加州栲	<i>F. dipetala</i> Hook. & Arn.		HM222778	HM367416	EU314841
14	—	<i>F. dubia</i> (Willd. ex Schult. & Schult.f.) P.S.Green & M.Nee				EU314843
15	欧栲1	<i>F. excelsior</i> L.1	HM171489	HM222783	HM367423	HQ705229
	欧栲2	<i>F. excelsior</i> L.2	HM171524	HM222784	HM367421	HQ705228
16	多花栲	<i>F. floribunda</i> Wall.	HM171492	HM222781	HM367424	HQ705247
17	—	<i>F. gooddingii</i> Little		HM222786	HM367427	EU314852
18	—	<i>F. greggii</i> Little		HM222787	HM367429	HQ705231
19	—	<i>F. holotricha</i> Koehne.1	HM171518	HM222796	HM367441	HQ705237
	—	<i>F. holotricha</i> Koehne.2	HM171517	HM222795	HM367440	HQ705236

表 1 (续)

编号 No.	名称 Name	拉丁学名 Latin name	GenBank 序列登记号 The GenBank accession number			
			<i>matK</i>	<i>rpl32-trnL</i>	<i>psbA-trnH</i>	ITS
20	日本小叶栲	<i>F. lanuginosa</i> Koidz.		HM222799	HM367445	EU314858
21	阔叶栲	<i>F. latifolia</i> Benth.	HM171515	HM222819	HM367468	HQ705240
22	长尖栲	<i>F. longicuspis</i> Siebold & Zucc.	HM171502	HM222827	HM367478	EU314862
23	水曲柳 1	<i>F. mandshurica</i> Rupr.1	HM171500	HM222835	HM367490	EU314864
	水曲柳 2	<i>F. mandshurica</i> Rupr.2	HM171499	HM222832	HM367487	HQ705249
24	—	<i>F. micrantha</i> Lingelsh.		HM222838	HM367496	EU314865
25	黑栲 1	<i>F. nigra</i> Marshall 1	HQ593300	HM222840	HM367498	EU314868
	黑栲 2	<i>F. nigra</i> Marshall 2		HM222839	HM367497	HQ705254
26	花栲 1	<i>F. ornus</i> L.1	HM171490	HM222843	HM367500	HQ705257
	花栲 2	<i>F. ornus</i> L.2	HM171495	HM222844	HM367501	HQ705258
27	秦岭栲	<i>F. paxiana</i> Lingelsh.		HM222850	HM367510	HQ705269
28	美国红栲	<i>F. pennsylvanica</i> Marshall	HQ593302	HM222851	HM367511	HQ705270
29	象蜡树 1	<i>F. platypoda</i> Oliv.1		HM222860	HM367524	HQ705274
	象蜡树 2	<i>F. platypoda</i> Oliv.2		HM222858	HM367516	EU314877
30	南瓜栲	<i>F. profunda</i> (Bush) Bush	HM171508	HM222862	HM367526	HQ705277
31	—	<i>F. purpusii</i> Brandegee				EU314879
32	蓝栲	<i>F. quadrangulata</i> Michx	HM171514	HM222867	HM367532	EU314881
33	—	<i>F. raibocarpa</i> Rege 1				EU314883
34	庐山栲 1	<i>F. sieboldiana</i> Blume 1	HM171494	HM222876	HM367546	HQ705285
	庐山栲 2	<i>F. sieboldiana</i> Blume 2		HM222872	HM367537	HQ705284
35	象蜡树(异名)	<i>F. spaethiana</i> Lingelsh.	HM171520	HM222882	HM367554	HQ705291
36	—	<i>F. texensis</i> Sarg.		HM222886	HM367558	EU314891
37	三叶栲	<i>F. trifoliolata</i> W.W.Sm.				EU314893
38	墨西哥栲	<i>F. uhdei</i> (Wenz.) Lingelsh.		HM222894	HM367568	HQ705304
39	绒毛栲	<i>F. velutina</i> Torr.	HM171525	HM222909	HM367578	HQ705308
40	—	<i>F. dimorpha</i> Coss. & Durieu	HM171526	HM222914	HM367583	HQ705319
41	木樨	<i>Osmanthus fragrans</i> Lour.	EU409428	GQ294677	FJ527890	EU314904
42	美洲木樨	<i>O. americanus</i> (L.) Benth. & Hook.f. ex A.Gray	JX863047	GU929894	HM999667	JX862659
43	总序桂	<i>Phillyrea latifolia</i> L.		GQ294688	GU120322	EU314905
44	流苏树	<i>Chionanthus retusus</i> Paxton		GU929896		JX862626
45	美国流苏树	<i>C. virginicus</i> L.			DQ006204	JX862622
46	—	<i>Forestiera acuminata</i> (Michx.) Poir.				EU314903
47	腺叶木樨榄	<i>Olea paniculata</i> R.Br.				JX862656

中文名和拉丁学名后的数字代表同一物种的两个不同样本; —代表该物种尚无对应中文名

The number after the Chinese name and the Latin name represents two different samples of the same species; — indicates that the species does not have a corresponding Chinese name

1.2 DNA 提取、PCR 扩增与测序

本研究采用改良的 CTAB 法^[14]分别从用硅胶干燥的对节白蜡与椒叶栲标本叶片中提取总基因组 DNA, 随后对提取的 DNA 样品进行 *psbA-trnH*、*rpl32-trnL*、*matK* 和 ITS 4 个标记的 PCR 扩增, 并对

扩增产物进行测序。这 4 个分子标记在前人的报道中表现出较好的多态性和稳定性, 被广泛应用于种间系统发育研究^[15]。其中 *psbA-trnH*、*rpl32-trnL* 与 *matK* 3 个分子标记属于叶绿体基因组, 引物设计分别参照文献 Sang 等^[16], Shaw 等^[17], Costion 等^[18]提

供的序列;ITS分子标记属于核基因组,正向引物序列 ITS1 为本研究设计,反向引物序列 ITS4 参照 Wojciechowski 等^[19](引物序列详见表2)。PCR 反应总体积为 25 μL ,其中 15.8 μL ddH₂O, 1 μL DNA 模板,正向和反向引物各 2 μL , 2 μL dNTPs, 2 μL 10 \times

buffer (Mg²⁺) 以及 0.2 μL Taq DNA 聚合酶。扩增产物采用 ExoSAP-IT 试剂纯化、琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和完整性后^[20],使用 10 μL 的 BigDye Terminator 循环测序试剂盒和 ABI 3730 自动测序仪(美国应用生物系统公司)进行测序。

表2 本研究的引物序列和PCR扩增条件

Table 2 Primer sequences and PCR amplification conditions for this study

分子标记 Molecular marker	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	反应条件 Reaction condition
<i>psbA-trnH</i>	psbAF	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min, 30 cycles; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min
	trnHR	CGCGCATGGTGGATTACAAAATC	
<i>rpl32-trnL</i>	trnL ^(UAG)	CTGCTTCTTAAGAGCAGCGT	94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 53 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 35 cycles; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min
	rpL32-F	CAGTTCCAA AA AAACGTACTTC	
<i>matK</i>	3F KIM	CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG	94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 35 cycles; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min
	1R KIM	ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC	
ITS	ITS1	TTCCGAACCACCGCGGG	94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 53 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 39 cycles; 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min
	ITS4	TCCTTCCGCTTATTGATATGC	

1.3 数据分析

1.3.1 序列碱基组成和变异分析 椒叶栲和对节白蜡样本的 4 个分子标记扩增所得的序列使用 Geneous 6.1.2^[21]软件拼接。为了探究 42 个白蜡树属物种序列之间的同源性和变异关系,本研究使用 MAFFT 7.487^[21-22]软件,对椒叶栲、对节白蜡拼接后的序列和从 GenBank 数据库中获得的其余 40 个物种的 4 个分子标记进行多序列比对,得到的矩阵导入 Geneous Pro v4.8.5^[21]进行人工校正后,利用 MEGA^[22]软件统计序列的保守位点、变异位点、简约信息位点、序列长度及碱基组成等信息。

1.3.2 系统发育树构建 采用贝叶斯推论法(BI, Bayesian inference)^[23]和最大简约法(MP, maximum parsimony)^[24]分别对 ITS 和叶绿体基因组两个数据集进行系统发育分析。贝叶斯系统树的构建在 MrBayes 3.1.2 软件中执行:首先使用 Modeltest version 3.7 计算出最佳碱基替换模型及相关参数^[24],然后采用马尔科夫链蒙特卡洛方法(MCMC, Markov chain monte carlo),以随机树为起始树,4 条链同时迭代运算 20,000,000 代,每 1000 代抽样 1 次,重复 1 次^[21]。舍弃(Burn-in)前 10% 老化树后,通过 MrBayes 软件^[22]构建多数一致树(Majority-rule consensus tree)并计算贝叶斯后验概率(PP, posterior probability),当 PP \geq 95% 时认为该分支可靠。最大简约树的构建在 PAUP 4.10b 软件^[22]中执行:使用 1000 次启发式搜索和 100 次随机重复分支增加来获得自展值(Bootstraps values),并对各分支

的相应数据进行自展检验。

1.3.3 谱系分化时间估算 采用 BEAST 软件包^[25]中的宽松分子钟模型(Relaxed clock),利用 ITS 数据对白蜡树属的分化时间进行估算。选取 2 个校正位点对分化时间进行化石校正:(1)校正点 A—发现于加州 Chalk Bluffs 的始新世晚期地层中的白蜡树属最古老的物种 *F. yubaensis* MacGinitie (49~52 Ma) 的翅果化石^[26];(2)校正点 B—中新世时期欧栲组物种的花粉化石(12 Ma)^[27]。白蜡树属物种各节点的分化时间采用两个独立的 MCMC 分析,分别迭代运行 50,000,000 代,每 1000 代抽样一次,确保有效样本量(ESS, effective sample size)的值大于 200,然后通过 Tracer 1.5 检测各链是否达到收敛^[22]。舍弃前 10% 的老化树后,使用 BEAST 中的 LogCombiner 对两次独立运行的数据进行整合,最后使用 Fig tree 1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>)对其进行可视化及编辑^[25]。

2 结果与分析

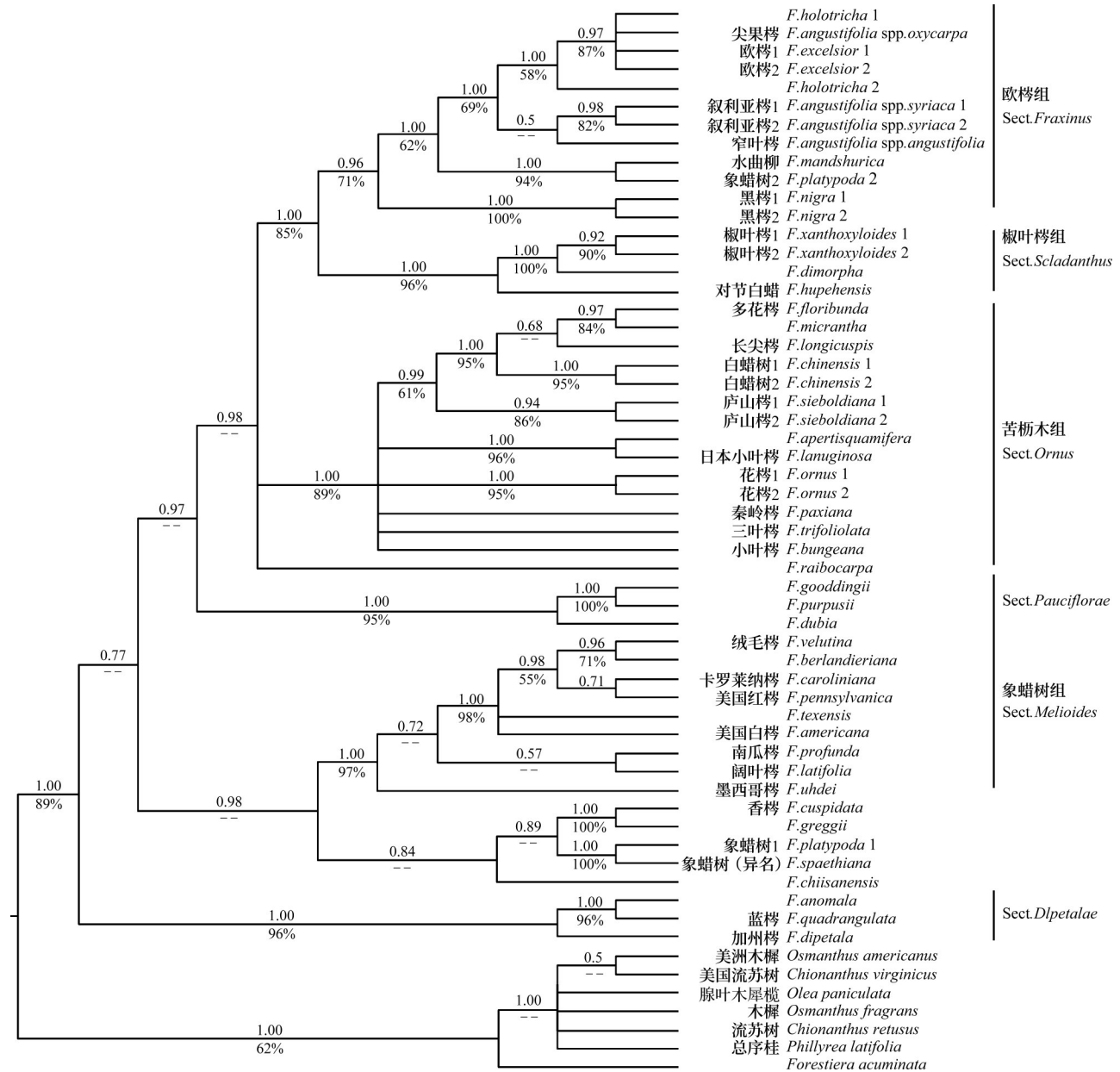
2.1 序列碱基组成和变异情况

在 60 个样品的 ITS 序列分析中,比对后的分析序列长 615 bp,含 239 个变异位点,其中 167 个位点为简约性信息位点;在叶绿体基因组的 3 个分子标记 *psbA-trnH*、*rpl32-trnL* 及 *matK* 的序列分析中,分析序列的总长度为 2232 bp,含 291 个变异位点,其中 136 个位点为简约性信息位点。

2.2 系统发育关系分析

ITS和叶绿体基因序列数据集的ILD (Incongruence length difference test) 检测值 $P = 0.01$, 表明两组数据集之间异质性较高不支持合并, 因此分别对其进行

探讨。由于两组序列构建的最大简约树和贝叶斯系统树的拓扑结构基本一致, 为了便于讨论, 本研究采用最大简约法计算后得到的贝叶斯系统树的拓扑结构进行系统发育分析(图2, 图3)。



各分支上、下的数值分别代表贝叶斯后验概率和最大简约自展值; --表示自展值小于50%; 下同

Numbers above branches are the Bayesian posterior probabilities (PP), and numbers below branches indicate bootstrap values (BS);

A dash indicates bootstrap values below 50%; The same as below

图2 利用ITS序列构建的白蜡树属椒叶梣组及相近种的贝叶斯系统树

Fig. 2 The Bayesian tree of *Fraxinus* section *Sciadanthus* and its relatives using ITS data

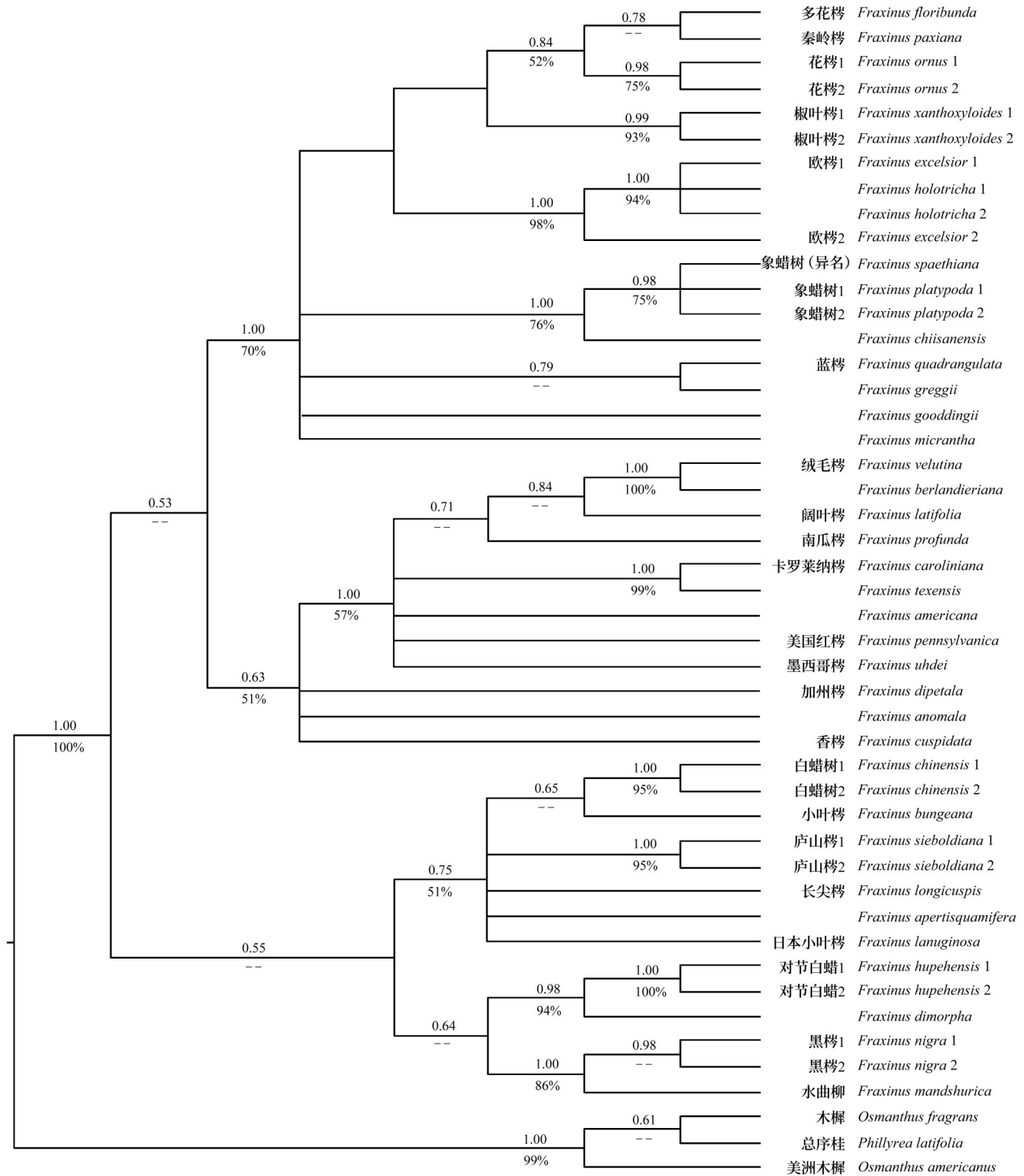


图3 利用3个叶绿体标记 $psbA-trnH$ 、 $rpl32-trnL$ 、 $matK$ 构建的白蜡树属椒叶栲组及相近种的贝叶斯系统树
 Fig. 3 The Bayesian tree of *Fraxinus* section *Sciadhanthus* and its relatives using the combined plastid dataset ($psbA-trnH$, $rpl32-trnL$, $matK$)

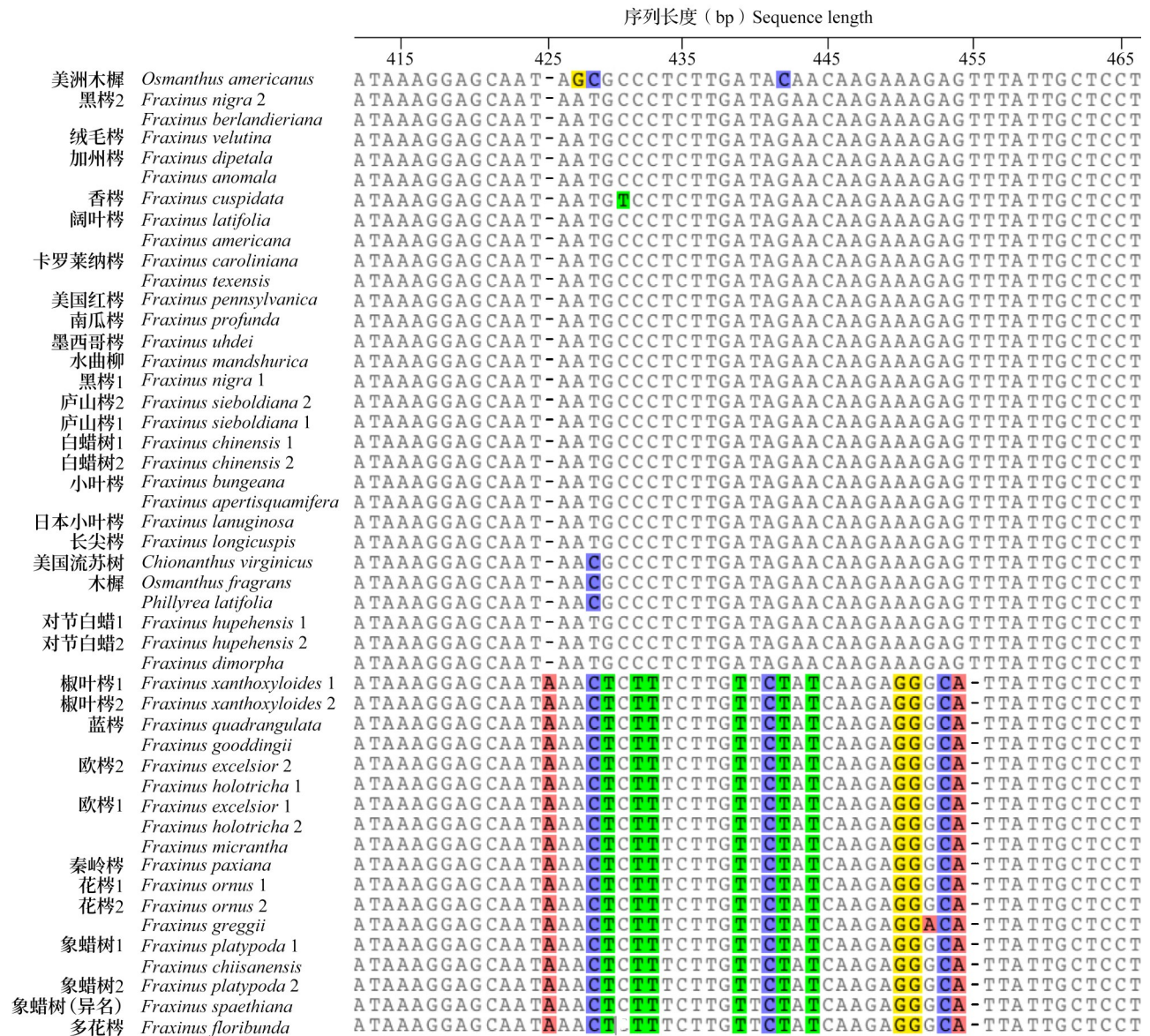
基于ITS序列构建的贝叶斯系统树(图2)支持Wallander^[5]的分类方法,即属内再分成6个组。椒叶栲与*F. dimorpha*先聚成一支(后验概率为1.00, bootstrap值为100%),然后与对节白蜡聚在一起(后验概率为1.00, bootstrap值为96%)。该组与欧栲组

的亲缘关系最近,形成姐妹组(后验概率为1.00, bootstrap值为85%)。

在由3个叶绿体基因标记 $psbA-trnH$ 、 $rpl32-trnL$ 、 $matK$ 构建的贝叶斯系统树中(图3),椒叶栲没有与对节白蜡和*F. dimorpha*聚在一起,而是跟苦枞

木组 (sect. *Ornus*) 的物种多花栉 (*F. floribunda*)、秦岭栉 (*F. paxiana*) 和花栉 (*F. ornus*) 优先聚在了一起 (后验概率为 0.54, bootstrap 值 < 50%), 然后与来自欧洲和北美的物种聚成一支 (后验概率为

1.00, bootstrap 值为 70%)。通过序列分析, 发现在叶绿体 *psbA-trnH* 标记比对序列中, 椒叶栉与来自欧洲和北美的物种具有高度一致的变异位点 (图 4)。



图中彩色所示为椒叶栉与来自欧洲、北美部分物种的 14 个高度一致的变异位点

The colors in the figure show 14 highly consistent variables sites between *F. xanthoxyloides* and species from Eurasia and North America

图 4 叶绿体 *psbA-trnH* 标记的部分比对序列

Fig. 4 The plastid *psbA-trnH* sequence segment

2.3 谱系分化时间分析

白蜡树属内各节点的分化时间估计显示于 BEAST 最大置信树中 (图 5)。结果表明, 白蜡树属最早起源于始新世中期 42.05 Ma (95% HPD: 29.99~55.54 Ma) (节点 1), 在中新世早期 21.86 Ma (95% HPD: 16.00~29.59 Ma) 开始分化出椒叶栉组

和欧栉组两个主要支系 (节点 2)。在椒叶栉组分支中, 对节白蜡最早分化于中新世中期 11.87 Ma (95% HPD: 5.79~19.42 Ma) (节点 3), 椒叶栉和 *F. dimorpha* 分化于上新世晚期 4.23 Ma (95% HPD: 1.22~8.79 Ma) (节点 4)。

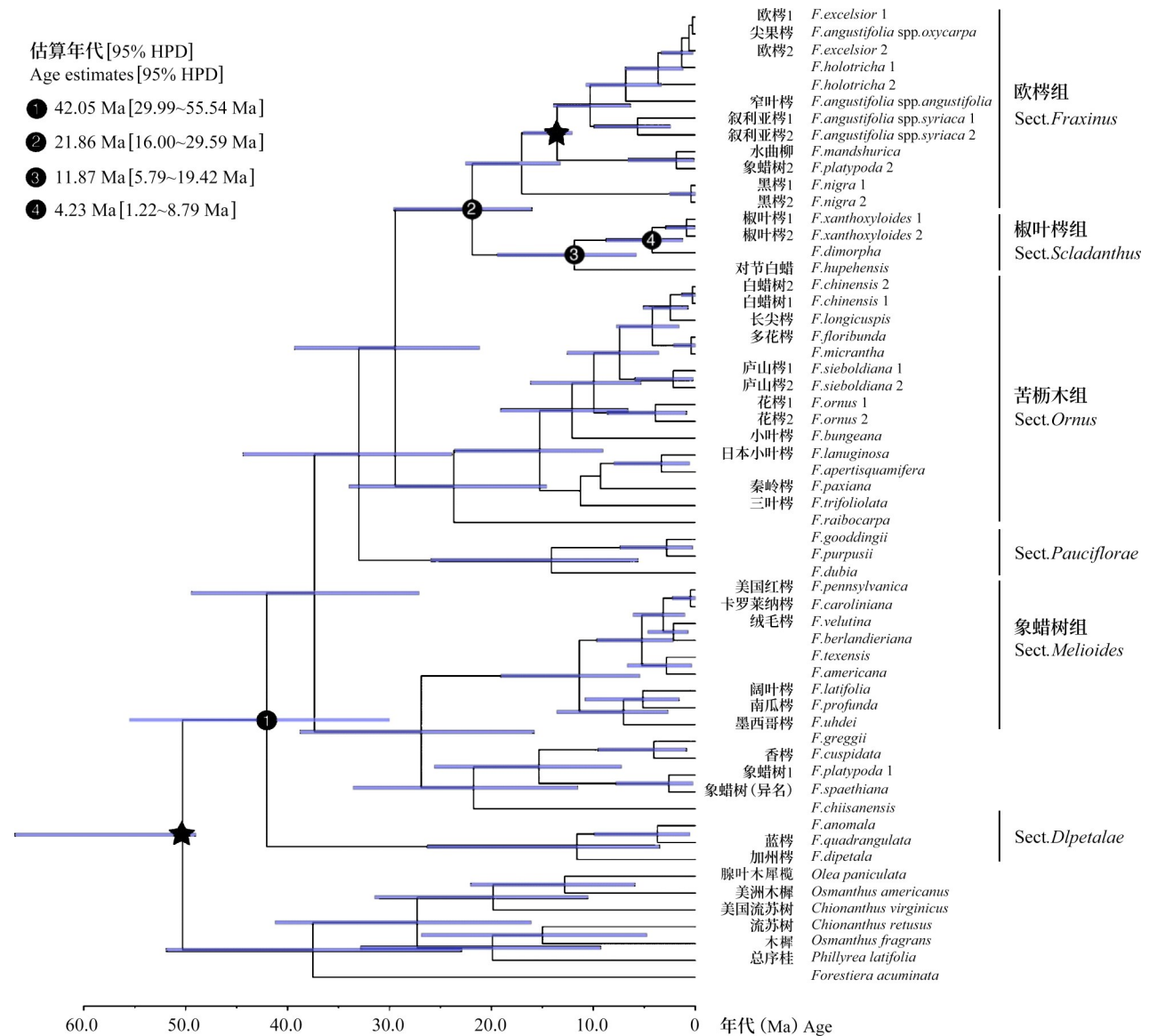


图5 基于ITS数据和化石校正的白蜡树属物种BEAST分化时间图
Fig. 5 The estimation of divergence times of *Fraxinus* based on nrDNA ITS using BEAST with two fossils as calibration points

3 讨论

3.1 椒叶栲组谱系系统发育关系

基于ITS序列构建的系统发育树(图2)显示,椒叶栲组和欧栲组呈姐妹关系,椒叶栲组的物种主要分成两个分支,对节白蜡位于单独的支系,椒叶栲与*F. dimorpha*位于另一支系,对节白蜡、椒叶栲和*F. dimorpha* 3个物种之间呈现明显的分化,且椒叶栲与*F. dimorpha*的亲缘关系更近。种间杂交、水平基因转移或谱系分选等因素通常会导致植物的核基因组和叶绿体基因组在系统发育中出现显著的差

异^[28]。在叶绿体基因组构建的系统发育树中(图3),椒叶栲并不与对节白蜡、*F. dimorpha*聚在一起,而是优先与苦枥木组的部分物种形成了支持率较低的分支,随后与欧栲组中来自欧洲和北美的几个物种聚成支持率相对较高的一支。此外,椒叶栲的叶绿体基因*psbA-trnH*标记序列与同组其他物种存在部分差异,其中14个变异位点与来自欧亚、北美大陆的几个物种高度一致(图4),这可能与地理分布差异导致的种群间遗传变异有关^[29]。综合上述结果,推测椒叶栲可能是*F. dimorpha*与欧栲组物种的杂交后代。已有研究表明,欧栲组物种之间的杂

交现象普遍存在^[5,8,13,30],如欧栲(*Fraxinus excelsior* Linn.)和尖果栲(*F. angustifolia* Vahl subsp. *oxycarpa* (Willd.) Franco et Alfonso)在地中海至法国一带以及伊比利亚半岛、意大利北部、阿尔卑斯山脉和巴尔干半岛等地区的冰期避难所中发生过大量杂交^[30]。对于椒叶栲杂交起源的深入探究,还需要获取其核糖体单拷贝基因数据,并结合椒叶栲组及欧亚近缘种的叶绿体基因组序列进一步分析。

3.2 椒叶栲组谱系地理格局的形成

青藏高原的快速隆起是新生代时期发生的重大地质事件之一,其造成的地理隔离和气候变化对该地区植物的种系分化具有显著影响^[1-2],例如川滇高山栎(*Quercus aquifolioides* Rehd. et Wils.)的异域分化和云杉属(*Picea* Dietr.)的种间分化^[31]。BEAST分化时间图显示(图5),对节白蜡最早分化于中新世中期11.87 Ma,椒叶栲和*F. dimorpha*最早分化于上新世晚期4.23 Ma,因此青藏高原在上新世中后期18~17 Ma、10.9~7.5 Ma和0.9 Ma的3次快速隆起^[31]可能在一定程度上导致了椒叶栲组物种的分化。

第四纪更新世周期性的冰期、间冰期的反复循环导致了气候振荡(Climatic oscillations),深刻影响了白蜡树属物种的迁徙、分化过程以及特有种分布格局的形成^[32]。王磊等^[32]在对云南临沧晚中新世地层中发现的白蜡树属翅果化石*Fraxinus* cf. *honshuensis*的研究中,发现白蜡树属物种与北半球大多数落叶植物一样在全球气候变冷期间从高纬度地区向低纬度地区迁徙。

青藏高原及其邻近山地是北半球植物在第四纪冰期重要的避难所,同时也是冰期后植物重要的扩散来源地之一,分布着许多古老的孑遗植物类群^[2-3,31]。椒叶栲通常分布于西喜马拉雅至阿富汗和巴基斯坦海拔1000~2800 m的山谷坡地,多呈片段化分布或零散分布,其斑块状的分布模式与乔松(*Pinus wallichiana* A. B. Jackson)、西藏长叶松(*Pinus roxburghii* Sarg.)等喜马拉雅山区特有的古老植物类群相似^[31],因此推测椒叶栲可能是椒叶栲组在喜马拉雅地区残存的孑遗物种,和该地区的古老类群一样在冰期进入青藏高原避难所,冰期后回迁到原本的生境形成残余分布^[33]。

华中地区不仅是我国第三纪植物区系重要的冰期避难所之一,也是亚热带植物区系扩散以及分化的核心地区,使得水杉(*Metasequoia glyptostroboides* Hu et Cheng)、珙桐(*Davidia involucrata* Baill.)、银

杏(*Ginkgo biloba* L.)等古老的濒危树种得以保存至今^[34]。多数学者认为,区域生态环境的稳定性是形成特有种分布的一个重要前提条件^[31]。对节白蜡的自然分布区位于亚热带常绿阔叶林北部地带,气候温暖湿润,受第四纪冰川的影响较小^[34],可能对对节白蜡在第四纪冰期的生存起到至关重要的作用。结合对节白蜡的分化时间和现今地理分布,推测该物种很可能是青藏高原快速隆起影响下的孑遗植物,中国湖北地区相对稳定的地质、气候等因素进一步促进了对节白蜡的分化与演替。

4 结论

本研究利用ITS和叶绿体基因组中*psbA-trnH*、*rpl32-trnL*和*matK*等分子标记探讨了白蜡树属椒叶栲组的系统发育及谱系地理格局的成因,结果表明对节白蜡、椒叶栲和*F. dimorpha*在椒叶栲组中表现出明显的谱系分化,并且与欧栲组形成姐妹组,椒叶栲可能起源于*F. dimorpha*和欧栲组物种的杂交。椒叶栲组的分化时期在11.87~4.23 Ma之间,恰逢青藏高原的三次隆起,因而推测青藏高原的快速隆起是椒叶栲组物种地理格局形成的重要原因;第四纪全球气候变冷等因素进一步影响了椒叶栲组物种的分布;在地质事件和气候环境改变等因素的影响下,椒叶栲组逐渐形成了华中—西喜马拉雅—北非的间断分布模式。

参考文献

- [1] 张华杰. 中国山莓草属植物物种界定及广义山莓草谱系地理学研究. 武汉: 中国科学院大学, 2019
Zhang H J. Species definition of the genus *Sibbaldia* in China and genealogical geography of *Sibbaldia* in broad sense. Wuhan: University of the Chinese Academy of Sciences, 2019
- [2] 沈超. 特提斯子遗洲际间断分布植物穗菝葜(*Smilax aspera* L.)的亲缘地理学研究. 杭州: 浙江理工大学, 2019
Shen C. Phylogeographical study on the intermittent distribution of the Tethys relict plant *Smilax aspera* L. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2019
- [3] 孙航, 李志敏. 古地中海植物区系在青藏高原隆起后的演变和发展. 地球科学进展, 2003(6): 852-862
Sun H, Li Z M. The evolution and development of the ancient Mediterranean flora after the uplift of the Qinghai Tibet Plateau. Progress in Earth Science, 2003(6): 852-862
- [4] Huang J H, Chen B, Liu C R, Lai J S, J Zhang J L, Ma K P. Identifying hotspots of endemic woody seed plant diversity in China. Diversity and Distributions, 2012, 18: 673-688
- [5] Wallander E. Systematics of *Fraxinus*(Oleaceae) and evolution of dioecy. Plant Systematics and Evolution, 2008, 273: 25-49

- [6] Nikolaev E V. The genus *Fraxinus* (Oleaceae) in the flora of the USSR. *Botanicheskii Zhurnal*, 1981, 66: 1419-1432
- [7] Miller G N. The genus *Fraxinus*, the ashes, in north America, North of Mexico. Cornell University Agricultural Experiment Station Memoir, 1955, 335: 1-64
- [8] Wallander E. Systematics and floral evolution in *Fraxinus* (Oleaceae). *Belgische Dendrologie*, 2012, 87: 39-58
- [9] Cosson E, Durieu M C. Notes sur quelques especes nouvelles D'Algerie. *Bulletin de la Société Botanique de France*, 1855, 2: 364-368
- [10] Lingelsheim A. Oleaceae-Oleoideae-Fraxineae. Germany: Das Pflanzenreich, 1920: 1-61
- [11] 曲式曾, 向其柏, 苏丕林. 白蜡树属一新种对节白蜡. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 1979(Z1): 146-148
Qu S Z, Xiang Q B, Su P L. A new species of *Fraxinus hupehensis*. *Journal of Nanjing Forestry University: Natural Science Edition*, 1979(Z1): 146-148
- [12] Govaerts R. World checklist of seed plants database in ACCESS E-F. Antwerp: Continental Publishing, 2001: 103-107
- [13] Hinsinger D D, Basak J, Gaudeul M, Cruaud C, Bertolino P, Frascaria-Lacoste N, Bousque J. The phylogeny and biogeographic history of ashes (*Fraxinus*, Oleaceae) highlight the roles of migration and vicariance in the diversification of temperate trees. *PLoS ONE*, 2013, 8: e80431
- [14] Doyle J J, Doyle J L. A rapid isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 1987, 19: 11-15
- [15] 石乃星, 文国松, 赵明富. 黄精属植物 DNA 分子鉴定技术应用研究进展. *植物遗传资源学报*, 2021, 22(5): 1209-1218
Shi N X, Wen G S, Zhao M F. Research progress on the application of DNA molecular identification technology in *Polygonatum* plants. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2021, 22(5): 1209-1218
- [16] Sang T, Crawford D J, Stuessy T F. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany*, 1997, 84: 1120-1136
- [17] Shaw J, Lickey E B, Schilling E E, Small R L. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare III. *American Journal of Botany*, 2007, 94: 275-288
- [18] Costion C, Ford A, Cross H, Crayn D, Harrington M, Lowe A. Plant DNA barcodes can accurately estimate species richness in poorly known floras. *PLoS ONE*, 2011, 6: e26841
- [19] Wojciechowski M F, Sanderson M J, Baldwin B G, Donoghue M J. Monophyly of Aneuploid *Astragalus* (Fabaceae): Evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *American Journal of Botany*, 1993, 80: 711-722
- [20] 王雪, 高暝, 吴立文, 汪阳东, 刘红彩, 陈益存. 峨眉山地区杨叶木姜子群体遗传多样性研究. *植物遗传资源学报*, 2019, 20(2): 359-369
Wang X, Gao M, Wu L W, Wang Y D, Liu H C, Chen Y C. A study on population genetic diversity among *Litsea populifolia* (Hemsl.) gamble in Mount Emei area. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20(2): 359-369
- [21] 祁哲晨. 世界菝葜科(百合目)的分子系统发育及其生物地理学研究. 杭州: 浙江大学, 2013
Qi Z C. Molecular phylogeny and biogeography of the worldwide Smilacaceae (Liliales). Hangzhou: Zhejiang University, 2013
- [22] 孙朝阳. 基于叶绿体基因组和核糖体 ITS 基因的水麻谱系地理学研究. 西安: 西北大学, 2022
Sun C Y. Phylogeography study of the species *Debregeasia orientalis* based on chloroplast genome and ribosomal ITS gene. Xi'an: Northwestern University, 2022
- [23] Fitch W M. Toward defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology*, 1971, 20: 406-416
- [24] Posada D, Buckley T R. Model selection and model averaging in phylogenetics: Advantages of akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology*, 2004, 53: 793-808
- [25] Drummond A J, Ho S Y W, Rawlence N, Rambaut A. A rough guide to BEAST 1.4. New Zealand: University of Auckland, 2007
- [26] MacGinitie H D. A Middle Eocene flora from the central Sierra Nevada. Carnegie Institution of Washington Publication, 1941, 534: 1-178
- [27] Muller J. Fossil pollen records of extant angiosperms. *The Botanical Review*, 1981, 47: 83-84
- [28] Meerow A W, Francisco-Ortega J, Kuhn D N, Schnell R J. Phylogenetic relationships and biogeography within the Eurasian clade of Amaryllidaceae based on plastid ndhF and nrDNA ITS sequences: Lineage sorting in a reticulate area? *Systematic Botany*, 2006, 31: 42-60
- [29] 刘硕, Decroocq Veronique, 张玉军, 刘宁, 马小雪, 章秋平, 徐铭, 张玉萍, 刘威生. 普通杏和西伯利亚杏野生居群遗传多样性与其地理分布关系研究. *植物遗传资源学报*, 2020, 21(6): 1527-1538
Liu S, Decroocq V, Zhang Y J, Liu N, Ma X X, Zhang Q P, Xu M, Zhang Y P, Liu W S. Study on the genetic diversity and geographical distribution relationship of wild populations of common apricot and Siberian apricot. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2020, 21(6): 1527-1538
- [30] Changkyun K, Dong-Kap K, Hang S, Joo-Hwan K. Phylogenetic relationship, biogeography, and conservation genetics of endangered *Fraxinus chisanensis* (Oleaceae), endemic to South Korea. *Plant Diversity*, 2022, 44(2): 170-180
- [31] 李景吉. 喜马拉雅地区种子植物分化及其对隆升过程的响应. 成都: 成都理工大学, 2014
Li J J. Differentiation of seed plants in the Himalayan Region

- and their response to uplift process. Chengdu: Chengdu University of Technology, 2014
- [32] 王磊, 解三平, 刘珂男. 云南临沧晚中新世栲属翅果化石及其古植物地理学意义. 吉林大学学报: 地球科学版, 2012, 42 (S2): 331-342
- Wang L, Xie S P, Liu K N. Late Miocene samara of *Fraxinus* (Oleaceae) from the Lincang in Yunnan province and its paleophytogeographical significance. Journal of Jilin University: Earth Science Edition, 2012, 42 (S2): 331-342
- [33] Ohsawa M, Shakya P R, Numata M. Distribution and succession of West Himalayan forest types in the eastern part of the Nepal Himalaya. Mountain Research and Development, 1986, 6: 143-157
- [34] 梁露尹. 第四纪冰期对我国植物区系与植被的影响. 中国地名, 2020, 324(7): 51, 53
- Liang L Y. The impact of the Quaternary glacial period on the flora and vegetation of China. Chinese Place Names, 2020, 324 (7): 51, 53