

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* 三个物种组成, 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。本文利用 ITS、*psbA-trnH*、*rpl32-trnL* 和 *matK* 4 个标记对白蜡树属 40 个物种间的系统发育关系进行了分析。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, 即属内再分成六个组, 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 Analyses 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

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

收稿日期: 修回日期: 网络出版日期:

URL:

第一作者研究方向为园林植物种质资源利用与创新, Email: weiyfcjdx@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: 国家自然科学基金项目 (31200528)

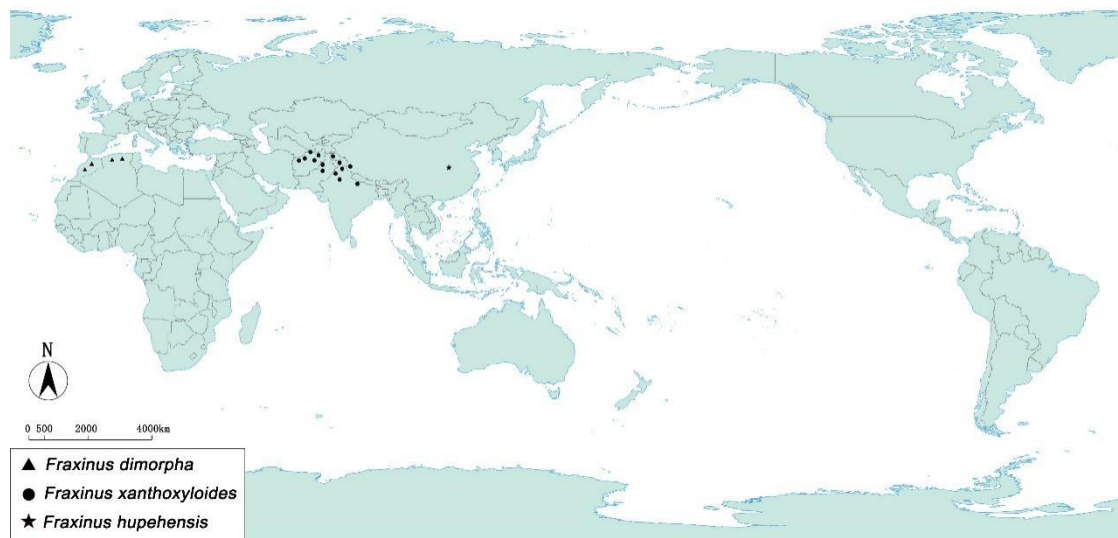
Foundation project: National Natural Science Foundation Project (31200528)

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旱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旱化,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)梣族(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、Sect. *Fraxinus*、Sect. *Melioides* (Endl.) Lingelsh、Sect. *Ornus* (Boehm.) DC.、Sect. *Pauciflorae* (Lingelsh.) E.Wallander 以及 Sect. *Sciadhanthus* (Coss. et Dur.) Lingelsh.。2012 年,Wallander 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^[8],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梣(*Fraxinus xanthoxyloides*(G. Don)DC.) 划分为小花亚组(Subsect. *Sciadhanthus*)。1979 年,曲式曾、苏丕林等人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^[11]。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* 作为椒叶梣的异名,与椒叶梣、对节白蜡归并为椒叶梣组(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^[13]通过分子生物学和系统发育研究,揭示了椒叶梣组与欧梣组(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];椒叶梣,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]。椒叶梣组物种在华中、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 个序列对椒叶梣组及白蜡树属其他 5 个组共 40 个物种的系统发育关系与分化时间进行分析,以此探讨椒叶梣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。



审图号: GS(2016)1666 号

Base drawing review No.: GS(2016)1666

图 1 白蜡树属椒叶栎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

1 材料和方法

1.1 样本收集

在本研究中, 两份对节白蜡样本采自中国湖北, 两份椒叶栎标本 (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。 *F. dimorpha* 及白蜡树属其余37个物种的45个样本序列来自GenBank数据库 (GenBank序列登记号详见表1)。 选取 *Osmanthus fragrans* Lour., *O. americanus* (L.) Benth. & Hook.f. ex A.Gray, *Chionanthus virginicus* L., *C. retusus* Paxton, *Olea paniculata* R.Br., *Forestiera acuminata* (Michx.) Poir. *Phillyrea latifolia* L. 等七个物种作为椒叶栎组的外类群。

表1 实验材料种名及其GenBank序列登记号

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

实验类群 Taxon	GenBank序列登记号 The GenBank accession number			
	<i>matK</i>	<i>rpl32-trnL</i>	<i>psbA-trnH</i>	ITS
<i>Fraxinus americana</i> L.	HM171496	HM222718	HM367363	HQ705201
<i>F. angustifolia</i> Vahl ssp. <i>oxycarpa</i> (Willd.) Franco & Rocha Afonso				HQ705262
<i>F. angustifolia</i> spp. <i>syriaca</i> (Boiss.) Yalt.1				HQ705294
<i>F. angustifolia</i> spp. <i>syriaca</i> 2				HQ705293
<i>F. angustifolia</i> spp. <i>angustifolia</i>				HE602415
<i>F. anomala</i> Torr. ex S.Watson		HM222739	HM367380	HQ705209
<i>F. apertisquamifera</i> Hara		HM222746	HM367387	EU314824
<i>F. berlandieriana</i> DC.	HM171521	HM222750	HM367391	HQ705210
<i>F. bungeana</i> A.DC.	HM171516	HM222754	HM367394	HQ705212
<i>F. caroliniana</i> Mill.		HM222758	HM367398	HQ705215
<i>F. chiisanensis</i> Nakai	HM171501	HM222760	HM367400	HQ705217
<i>F. chinensis</i> Roxb.1	HM171503	HM222766	HM367406	HQ705220
<i>F. chinensis</i> 2		HM222765	HM367405	HQ705225
<i>F. cuspidata</i> Torr.		HM222772	HM367412	EU314838
<i>F. dipetala</i> Hook. & Arn.		HM222778	HM367416	EU314841
<i>F. dubia</i> (Willd. ex Schult. & Schult.f.) P.S.Green & M.Nee				EU314843
<i>F. excelsior</i> L.1	HM171489	HM222783	HM367423	HQ705229
<i>F. excelsior</i> 2	HM171524	HM222784	HM367421	HQ705228
<i>F. floribunda</i> Wall.	HM171492	HM222781	HM367424	HQ705247
<i>F. gooddingii</i> Little		HM222786	HM367427	EU314852
<i>F. greggii</i> Little		HM222787	HM367429	HQ705231
<i>F. lanuginosa</i> Koidz.		HM222799	HM367445	EU314858

<i>F. latifolia</i> Benth.	HM171515	HM222819	HM367468	HQ705240
<i>F. longicuspis</i> Siebold & Zucc.	HM171502	HM222827	HM367478	EU314862
<i>F. mandshurica</i> Rupr.1	HM171500	HM222835	HM367490	EU314864
<i>F. mandshurica</i> 2	HM171499	HM222832	HM367487	HQ705249
<i>F. micrantha</i> Lingelsh.		HM222838	HM367496	EU314865
<i>F. nigra</i> Marshall1	HQ593300	HM222840	HM367498	EU314868
<i>F. nigra</i> 2		HM222839	HM367497	HQ705254
<i>F. ornus</i> L.1	HM171490	HM222843	HM367500	HQ705257
<i>F. ornus</i> 2	HM171495	HM222844	HM367501	HQ705258
<i>F. paxiana</i> Lingelsh.		HM222850	HM367510	HQ705269
<i>F. pennsylvanica</i> Marshall	HQ593302	HM222851	HM367511	HQ705270
<i>F. platypoda</i> Oliv.1		HM222860	HM367524	HQ705274
<i>F. platypoda</i> 2		HM222858	HM367516	EU314877
<i>F. profunda</i> (Bush) Bush	HM171508	HM222862	HM367526	HQ705277
<i>F. purpusii</i> Brandegees				EU314879
<i>F. quadrangulata</i> Michx	HM171514	HM222867	HM367532	EU314881
<i>F. raibocarpa</i> Regel				EU314883
<i>F. sieboldiana</i> Blume1	HM171494	HM222876	HM367546	HQ705285
<i>F. sieboldiana</i> 2		HM222872	HM367537	HQ705284
<i>F. spaethiana</i> Lingelsh.	HM171520	HM222882	HM367554	HQ705291
<i>F. texensis</i> Sarg.		HM222886	HM367558	EU314891
<i>F. trifoliolata</i> W.W.Sm.				EU314893
<i>F. uhdei</i> (Wenz.) Lingelsh.		HM222894	HM367568	HQ705304
<i>F. velutina</i> Torr.	HM171525	HM222909	HM367578	HQ705308
<i>F. dimorpha</i> Coss. & Durieu	HM171526	HM222914	HM367583	HQ705319
<i>Osmanthus fragrans</i> Lour.	EU409428	GQ294677	FJ527890	EU314904
<i>O. americanus</i> (L.) Benth. & Hook.f. ex A.Gray	JX863047	GU929894	HM999667	JX862659
<i>Phillyrea latifolia</i> L.		GQ294688	GU120322	EU314905
<i>Chionanthus retusus</i> Paxton		GU929896		JX862626
<i>C. virginicus</i> L.			DQ006204	JX862622
<i>Forestiera acuminata</i> (Michx.) Poir.				EU314903
<i>Olea paniculata</i> R.Br.				JX862656

1. 2 DNA提取、PCR扩增与测序

本研究采用改良的CTAB法^[4]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。这类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]。叶绿体基因组 *psbA-trnH*、*rpl32-trnL* 与 *matK* 3个标记的引物设计分别参照文献Sang等^[16]，Shaw 等^[17]，Costion 等^[18]提供的序列。基于GenBank中白蜡树属物种的 ITS序列分析，本研究中设计的ITS正向引物序列 ITSF1：5'-TTCCGACCGCGGG-3'，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1 μL DNA模板，正向和反向引物各2 μL，2 μL dNTPs，2 μL 10×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(Applied Biosystems, Foster City, California, USA)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 Genes	引物名称 primer	引物序列 (5'-3') Primer sequence 5'-3'	反应条件 Reaction condition
<i>psbA-trnH</i>	psbAF trnHR	GTTATGCATGAACGTAATGCTC CGCGCATGGTGGATTACAAAATC	94℃ 5min
			94℃ 1min, 55℃ 1min, 72℃ 1.5min, 30cycles, 72℃ 10min
<i>rpl32-trnL</i>	trnL ^(UAG) rpl32-F	CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT CAGTTCCAA AA AAACGTACTTC	94℃ 5min
			94℃ 1min, 53℃ 1min, 72℃ 2min, 35cycles, 72℃ 10min
<i>matK</i>	3F KIM 1R KIM	CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC	94℃ 5min
			94℃ 30s, 53℃ 20s, 72℃ 50s, 35cycles, 72℃ 5min
ITS	ITSF1 ITS4	TTCCGAACCAACCGCGGG TCCTTCCGCTTATTGATATGC	94℃ 5min
			94℃ 1min, 53℃ 1min, 72℃ 1min, 39cycles, 72℃ 7min

1. 3 数据分析

1.3.1 序列碱基组成和变异分析 PCR扩增所得的序列使用Geneous 6.1.2软件拼接，之后联合从GenBank中获得的其余37个物种的4个标记序列，在MAFFT中进行同源性比对，得到的矩阵导入Geneous Pro v4.8.5进行人工校正后，利用MEGA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^[21,22]。

1.3.2 系统发育树构建 采用贝叶斯推论法(BI)^[23]和最大简约法(MP)^[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。BI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)，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。MP树的构建在PAUP 4.10b软件中执行：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^[22]。

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

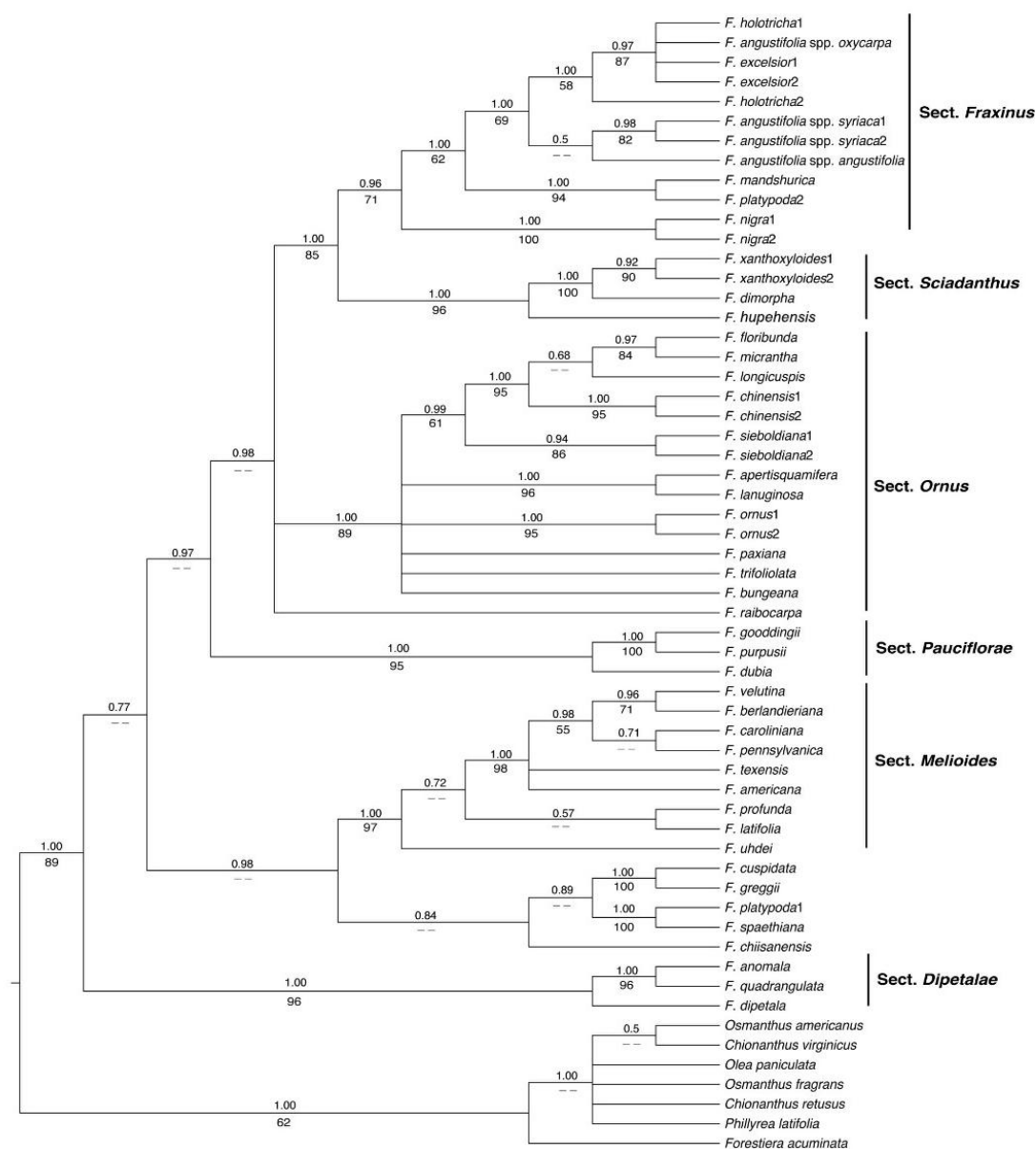
在59个样品的ITS序列分析中，比对后的分析序列长615 bp，含239个变异位点，其中167个位点为简约性信息位点；在三个叶绿体基因序列*psbA-trnH*、*rpl32-trnL*及*matK*的分析中，三个供分析序列的总长度为2232 bp，含291个变异位点，其中136个位点为简约性信息位点。

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MP树和BI树的拓扑结构基本一致，为了便于讨论，本研究采纳MP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)。

基于ITS序列构建的贝叶斯系统树(图2)支持Wallander的分类方法，即属内再分成六个组。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%)。

在由三个叶绿体标记*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，而是跟苦槠木组(*sect. Ornus*)的物种*F. floribunda*、*F. paxiana*和*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，椒叶栲与来自欧洲和北美的物种具有高度一致的变异位点(图4)。



各分支上、下的支持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 a probability below 50%;The same as below

图 2 利用 ITS 序列构建的白蜡树属椒叶栲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. Numbers above branches are the Bayesian posterior probabilities

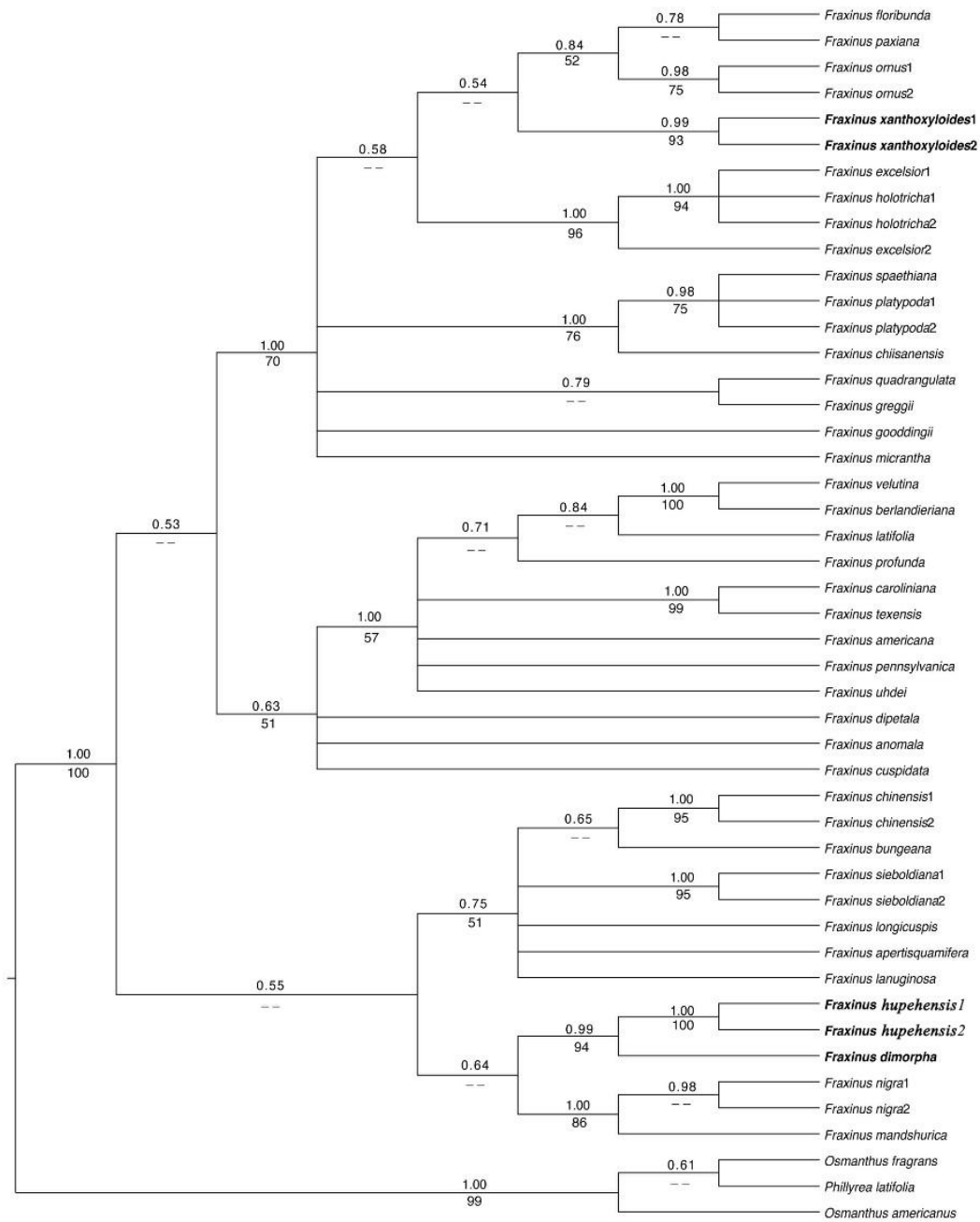


图 3 利用三个叶绿体标记 *psbA-trnH*、*rpl32-trnL*、*matK* 构建的白蜡树属椒叶栎组及相近种的贝叶斯系统树
Fig. 3 The Bayesian tree of *Fraxinus* section *Sciadanthus* and its relatives using the combined plastid dataset (*psbA-trnH*, *rpl32-trnL*, *matK*)

<i>Osmanthus americanus</i>	A TAAAGGAGCAAT - A G C G C C C T C T T G A T A C A A C A A G A A A G A G T T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus nigra</i> 2	A TAAAGGAGCAAT - A A T G C C C T C T T G A T A G A A C A A G A A A G A G T T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus berlandieriana</i>	A TAAAGGAGCAAT - A A T G C C C T C T T G A T A G A A C A A G A A A G A G T T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus velutina</i>	A TAAAGGAGCAAT - A A T G C C C T C T T G A T A G A A C A A G A A A G A G T T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus dipetala</i>	A TAAAGGAGCAAT - A A T G C C C T C T T G A T A G A A C A A G A A A G A G T T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus anomala</i>	A TAAAGGAGCAAT - A A T G C C C T C T T G A T A G A A C A A G A A A G A G T T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus cuspidata</i>	A TAAAGGAGCAAT - A A T G C C C T C T T G A T A G A A C A A G A A A G A G T T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus latifolia</i>	A TAAAGGAGCAAT - A A T G C C C T C T T G A T A G A A C A A G A A A G A G T T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus americana</i>	A TAAAGGAGCAAT - A A T G C C C T C T T G A T A G A A C A A G A A A G A G T T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus caroliniana</i>	A TAAAGGAGCAAT - A A T G C C C T C T T G A T A G A A C A A G A A A G A G T T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus texensis</i>	A TAAAGGAGCAAT - A A T G C C C T C T T G A T A G A A C A A G A A A G A G T T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus pennsylvanica</i>	A TAAAGGAGCAAT - A A T G C C C T C T T G A T A G A A C A A G A A A G A G T T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus profunda</i>	A TAAAGGAGCAAT - A A T G C C C T C T T G A T A G A A C A A G A A A G A G T T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus uhdei</i>	A TAAAGGAGCAAT - A A T G C C C T C T T G A T A G A A C A A G A A A G A G T T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus mandshurica</i>	A TAAAGGAGCAAT - A A T G C C C T C T T G A T A G A A C A A G A A A G A G T T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus nigra</i> 1	A TAAAGGAGCAAT - A A T G C C C T C T T G A T A G A A C A A G A A A G A G T T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus sieboldiana</i> 2	A TAAAGGAGCAAT - A A T G C C C T C T T G A T A G A A C A A G A A A G A G T T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus sieboldiana</i> 1	A TAAAGGAGCAAT - A A T G C C C T C T T G A T A G A A C A A G A A A G A G T T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus chinensis</i> 1	A TAAAGGAGCAAT - A A T G C C C T C T T G A T A G A A C A A G A A A G A G T T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus chinensis</i> 2	A TAAAGGAGCAAT - A A T G C C C T C T T G A T A G A A C A A G A A A G A G T T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus bungeana</i>	A TAAAGGAGCAAT - A A T G C C C T C T T G A T A G A A C A A G A A A G A G T T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus apertisquamifera</i>	A TAAAGGAGCAAT - A A T G C C C T C T T G A T A G A A C A A G A A A G A G T T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus lanuginosa</i>	A TAAAGGAGCAAT - A A T G C C C T C T T G A T A G A A C A A G A A A G A G T T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus longicuspis</i>	A TAAAGGAGCAAT - A A T G C C C T C T T G A T A G A A C A A G A A A G A G T T T A T T G C T C C T
<i>Chionanthus virginicus</i>	A TAAAGGAGCAAT - A A G C C C C T C T T G A T A G A A C A A G A A A G A G T T T A T T G C T C C T
<i>Osmanthus fragrans</i>	A TAAAGGAGCAAT - A A G C C C C T C T T G A T A G A A C A A G A A A G A G T T T A T T G C T C C T
<i>Phillyrea latifolia</i>	A TAAAGGAGCAAT - A A G C C C C T C T T G A T A G A A C A A G A A A G A G T T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus hupehensis</i> 1	A TAAAGGAGCAAT - A A T G C C C T C T T G A T A G A A C A A G A A A G A G T T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus hupehensis</i> 2	A TAAAGGAGCAAT - A A T G C C C T C T T G A T A G A A C A A G A A A G A G T T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus dimorpha</i>	A TAAAGGAGCAAT - A A T G C C C T C T T G A T A G A A C A A G A A A G A G T T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus xanthoxyloides</i> 1	A TAAAGGAGCAAT A A A C T C T T T G T C T A A C A A G A G G G C A - T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus xanthoxyloides</i> 2	A TAAAGGAGCAAT A A A C T C T T T G T C T A A C A A G A G G G C A - T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus quadrangulata</i>	A TAAAGGAGCAAT A A A C T C T T T G T C T A A C A A G A G G G C A - T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus gooddingii</i>	A TAAAGGAGCAAT A A A C T C T T T G T C T A A C A A G A G G G C A - T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus holotricha</i> 1	A TAAAGGAGCAAT A A A C T C T T T G T C T A A C A A G A G G G C A - T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus excelsior</i> 1	A TAAAGGAGCAAT A A A C T C T T T G T C T A A C A A G A G G G C A - T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus holotricha</i> 2	A TAAAGGAGCAAT A A A C T C T T T G T C T A A C A A G A G G G C A - T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus micrantha</i>	A TAAAGGAGCAAT A A A C T C T T T G T C T A A C A A G A G G G C A - T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus paxiana</i>	A TAAAGGAGCAAT A A A C T C T T T G T C T A A C A A G A G G G C A - T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus omus</i> 1	A TAAAGGAGCAAT A A A C T C T T T G T C T A A C A A G A G G G C A - T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus omus</i> 2	A TAAAGGAGCAAT A A A C T C T T T G T C T A A C A A G A G G G C A - T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus greggii</i>	A TAAAGGAGCAAT A A A C T C T T T G T C T A A C A A G A G G A C A - T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus platypoda</i> 1	A TAAAGGAGCAAT A A A C T C T T T G T C T A A C A A G A G G G C A - T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus chiisanensis</i>	A TAAAGGAGCAAT A A A C T C T T T G T C T A A C A A G A G G G C A - T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus platypoda</i> 2	A TAAAGGAGCAAT A A A C T C T T T G T C T A A C A A G A G G G C A - T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus spathiana</i>	A TAAAGGAGCAAT A A A C T C T T T G T C T A A C A A G A G G G C A - T T A T T G C T C C T
<i>Fraxinus floribunda</i>	A TAAAGGAGCAAT A A A C T C T T T G T C T A A C A A G A G G G C A - T T A T T G C T C C T

图中颜色代表椒叶栲与来自欧洲、北美部分物种的 14 个高度一致的变异位点

The colors represent 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,白蜡树属最早分化于始新世中期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)开始分化出椒叶栲组和欧栲组两个主要支系(节点2)。在椒叶栲组分支中,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),椒叶栲和*F. dimorpha*分化于上新世晚期4.23 Ma(95% HPD: 1.22-8.79 Ma) (节点4)。

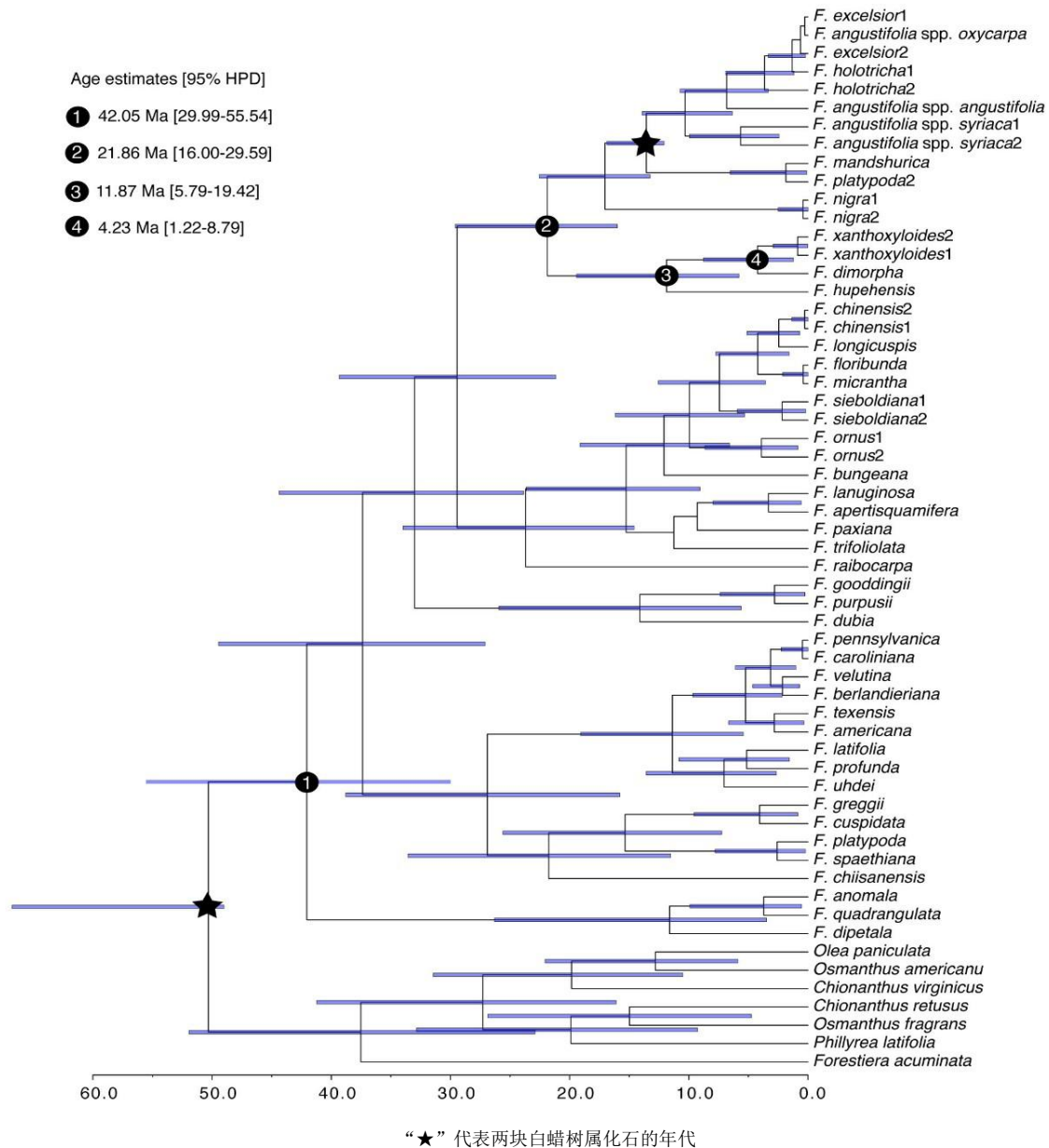


图5 基于ITS数据和化石校正的白蜡树属物种BEAST分化时间图

Fig. 5 The estimation of divergence times of Fraxinus section Sciadanthus based on nrDNA ITS using BEAST with two fossils as calibration points

3 讨论

3.1 椒叶梣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, 椒叶梣组和欧梣组呈姐妹关系, 椒叶梣组的物种主要分成两个分支, 对节白蜡位于单独的支系, 椒叶梣与*F. dimorpha*位于另一支系, 对节白蜡、椒叶梣和*F. dimorpha*三个物种之间呈现明显的分化, 且椒叶梣与*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), 椒叶梣并不与对节白蜡、*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, 随后与欧梣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 $psbA-trnH$ 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, 我们推测椒叶栲可能是*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—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18-17Ma、10.9-7.5Ma和0.9Ma的三次快速隆起^[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、解三平等人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^[32]。

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, 我们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11.87Ma-4.23Ma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. 中国科学院大学(中国科学院武汉植物园), 2019.

Zhang H J. Species definition of the genus *Rubus* in China and genealogical geography of *Rubus* in broad sense. University of the Chinese Academy of

Sciences (Chinese Academy of Sciences Wuhan Botanical Garden), 2019.

- [2] 沈超. 特提斯孑遗洲际间断分布植物穗菝葜 (*Smilax aspera* L.) 的亲缘地理学研究. 浙江理工大学, 2019.
Shen C. Phylogeographical study on the intermittent distribution of the Tethys relict plant *Smilax aspera* L. 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, (06): 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, (06): 852-862.
- [4] Huang J H, Chen B, Liu C R, Lai J S, 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 EV. 1981. The genus Fraxinus (Oleaceae) in the flora of the USSR. *Botanicheskii Zhurnal* 66: 1419-1432.
- [7] Miller GN. The genus Fraxinus, the ashes, in North America, north of Mexico. Cornell University Agricultural Experiment Station Memoir, 1955: 1-64.
- [8] Wallander E. Systematics and floral evolution in Fraxinus (Oleaceae). *Belgische Dendrologie Belge*, 2012, 39-58.
- [9] Cosson E, Durieu MC. 1855. Notes sur quelques especes nouvelles D'Algerie. *Bulletin de la Société Botanique de France* 2: 364-368.
- [10] Lingelsheim A. 1920. Oleaceae-Oleoideae-Fraxineae. In: Engler A ed. *Das Pflanzenreich* IV, 243: 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 Si Z, Xiang Q B, Su P L. A new species of Fraxinus chinensis. *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 DD, 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 JJ, Doyle JL. 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(05): 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 (05): 1209-1218.
- [16] Sang T, Crawford DJ, Stuessy TF. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of Paeonia (Paeoniaceae). *American Journal of Botany*, 1997, 84: 1120-1136.
- [17] Shaw J, Lickey EB, Schilling EE, Small RL. 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 MF, Sanderson MJ, Baldwin BG, Donoghue MJ. 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, 高暎, 吴立文等. 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(02): 359-369.
Wang X, Gao M, Wu L W, et al. Study on Genetic Diversity of Poplar Leaf Wood and Ginger Seed Population in the Emeishan Area. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20 (02): 359-36
- [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. 浙江大学, 2013.
Qi Z C. Molecular Phylogeny and Biogeography of the Smilax family (Liliaceae) in the World. 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. 西北大学, 2022.
Sun C Y. A Study on the Geography of Hydrohemp Genealogy Based on Chloroplast Genome and Ribosomal ITS Genes. Northwestern University, 2022.
- [23] Fitch WM. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology[J]. *Systematic Zoology*, 1971, 20: 406-416.
- [24] Posada D, Buckley TR. 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 SYW, Rawlence N, Rambaut A. A rough guide to BEAST 1.4. New Zealand: University of Auckland, 2007, <http://code.google.com/p/beast-mcmc/downloads/list>.
- [26] MacGinitie HD. A Middle Eocene flora from the central Sierra Nevada[J]. 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 AW, Francisco-Ortega J, Kuhn DN, Schnell RJ. 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(06): 1527-1538.
- Liu S, Decroocq Veronique, 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 (06): 1527-1538
- [30] Changkyun Kim, Dong-Kap Kim, Hang Sun, Joo-Hwan Kim, Phylogenetic relationship, biogeography, and conservation genetics of endangered *Fraxinus chiisanensis* (Oleaceae), endemic to South Korea, *Plant Diversity*. 44(2), 2022, 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. 成都理工大学, 2014.
- Li J J. Differentiation of Seed Plants in the Himalayan Region and Their Response to Uplift Process. 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. The Late Miocene *Elaeagnus* fossil from Lincang, Yunnan, and its palaeophytogeographical significance. *Journal of Jilin University: Earth Science Edition*, 2012, 42 (S2): 331-342.
- [33] Ohsawa M, Shakya PR, 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, No. 324(07): 51, 53.
- Liang L Y. The impact of the Quaternary glacial period on the flora and vegetation of China. *Chinese Place Names*, 2020, 324 (07): 51, 53.