

热带亚洲北缘高山榕亲缘地理学初探*

黄竹增^{1,2}, 黄建峰¹, 彭艳琼^{1**}

(1. 中国科学院 西双版纳热带植物园, 云南 昆明 650223; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要:【目的】探讨热带亚洲地区乔木种的谱系地理分布格局及其演化历史。【方法】以热带雨林群落代表乔木种高山榕为研究对象, 采集了热带亚洲大陆北缘 25 个高山榕种群 177 个个体, 采用叶绿体 DNA (cpDNA) 片段 *psbA-trnH* 测序的方法, 对其遗传多样性、种群结构及种群历史动态进行分析。【结果】高山榕种群遗传多样性较低 ($H_T=0.378$), 只得到 3 个 *psbA-trnH* 单倍型, 然而其中 2 个祖先单倍型被高山榕与近缘种共享。两种种群间遗传分化值 F_{ST} 在 0.000~1.000 之间, 基因流水平低 ($N_m=0.260$), 97.8% 的遗传变异来自于种群间, 但不存在明显的亲缘地理结构 [G_{ST} (0.887) > N_{ST} (0.799)]。分子进化中性检验结果表明: 自然选择在分子进化过程中未发挥重要作用, 而失配分析显示为单峰分布。【结论】综合中性检验、失配分析以及物种分布模型结果, 显示高山榕经历了缓慢的种群扩张过程, 而有限的种子散播能力可能限制了种群间的基因流, 导致高山榕种群扩张缓慢。

关键词: 高山榕; 雌雄同株榕树; 亲缘地理学; *psbA-trnH*; 基因流

中图分类号: Q 949

文献标识码: A

文章编号: 1004-390X (2018) 04-0705-10

Phylogeography of *Ficus altissima* in the Northern Edge of Tropical Asia

HUANG Zhuzeng^{1,2}, HUANG Jianfeng¹, PENG Yanqiong¹

(1. Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the phylogeographic structure and its evolutionary history of the tree species distributed in tropical Asia. [Method] 177 *Ficus altissima* individuals from 25 populations were sampled in present study, mainly in the northern edge of tropical Asia. *F. altissima* is listed as one of the dominant species in Asian rainforest. The cpDNA fragment *psbA-trnH* was sequenced to explore the genetic diversity, population genetic structure and dynamics of *F. altissima*. [Result] A low level of genetic diversity ($H_T=0.378$) was revealed and only three *psbA-trnH* haplotypes were identified from the 25 populations totally. However, two ancestral haplotypes were shared by *F. altissima* and its related species. The population pairwise genetic differentiation (F_{ST}) ranges from 0.000 to 1.000. Low levels of gene flow ($N_m=0.260$) were found among populations and 97.8% of the total genetic variance was distributed among populations. The G_{ST} (0.887) was higher than N_{ST} (0.799), showing that there was no significant phylogeographical structure. Test of

收稿日期: 2018-01-31

修回日期: 2018-05-08

网络出版时间: 2018-07-26

*基金项目: 国家自然科学基金项目 (31372253, 31672373)。

作者简介: 黄竹增 (1993—), 女, 贵州安顺人, 在读硕士研究生, 主要从事进化生态学研究。

E-mail: huangzhuzeng@xtbg.ac.cn

**通信作者 Corresponding author: 彭艳琼 (1974—), 女, 云南宜良人, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事进化生态学研究。

E-mail: pengyq@xtbg.ac.cn

网络出版地址: [http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).201801050](http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).201801050)

neutral evolution revealed no deviation from mutation drift equilibrium, while mismatch analysis showed unimodal. [Conclusion] Combined results of neutrality test, mismatch analysis and species distribution modeling indicated that the populations of *F. altissima* could have undergone a slow expansion in its evolutionary process. The limited seed dispersal could have resulted in the low gene flow and slowed the population expansion.

Keywords: *Ficus altissima*; monoecious *Ficus*; phylogeography; *psbA-trnH*; gene flow

植物亲缘地理学主要聚焦经历第四纪冰期植物的种群动态,集中于受冰期气候波动影响严重的欧洲及北美地区^[1-3];中国亲缘地理学研究起步较晚,主要集中于青藏高原地区,研究不同生活型(草本、木本)植物种群动态对第四纪冰期气候变化和地质活动的响应机制^[4-6],然而对生物多样性更为丰富的热带雨林地区研究较少。东南亚为世界主要的热带雨林区之一,雨林的扩张及收缩受气候、海平面及陆地的变化等因素影响,使得该地区种群具有复杂的动态历史过程。而目前关于该地区物种的种群动态及地理分布格局演化机制的探讨还比较少,多数研究集中于草本、小乔木等^[7-9],缺少对优势大乔木树种的研究。榕属(*Ficus*)植物隶属于桑科(Moraceae),主要分布于热带和亚热带地区,部分种类延伸分布至温带地区,具有极高的物种多样性,是热带雨林区系中最大的木本属种之一^[10],其中很多种类为热带雨林群落中的优势种。榕树结实率高,大部分种类一年四季都能结果,为众多动物类群提供食物来源和栖息场所,占据食物链的关键环节,被公认为热带雨林中的关键类群^[11-14]。对亚洲榕属植物这一代表类群开展亲缘地理学研究,有助于揭示东南亚热带雨林区系树种的种群分布格局和动态变化历史,对认识亚洲热带雨林群落演化历史,以及其对全球变化的响应也有重要的参考价值^[15-16]。

榕树和其专性传粉榕小蜂相互依赖,互不可缺,是自然界动植物间关系最为密切、协同进化历史最悠久的物种对。因此,榕树的空间遗传结构和种群动态除了会受到非生物因素(地理隔离、气候变化、地质活动等)的影响之外,还强烈受到传粉榕小蜂种群动态的影响。例如:CORONADO等^[17]利用核基因及cpDNA片段对美洲热带雌雄同株榕树*F. insipida* subsp. *insipida*开展亲缘地理学研究,发现其具有明显的亲缘地理结构,安第斯山脉及南美北部的季节性干

旱区成为其种群间基因流的2个主要地理隔离障碍,并且对种子流的限制要大于花粉流。结合cpDNA片段及生态位模型方法对南美季节性干旱雨林雌雄同株榕树*F. bonijesulapensis*的亲缘地理学研究表明:中部、北部及南部不同的气候条件使其种群间具有明显的亲缘地理结构^[18]。对于从印度至澳大利亚区域大尺度分布的雌雄同株榕树聚果榕(*F. racemosa*)开展研究,其微卫星数据显示:由于传粉榕小蜂的长距离扩散,导致印度、中国—泰国、婆罗洲及澳大利亚4个地理分布单元内部种群之间具有强烈的基因流,但由于地理隔离导致4个地理单元之间具有明显的遗传分化^[19-20];对泰国南部—中国南部雌雄异株榕树粗叶榕(*F. hirta*)cpDNA片段及核基因微卫星的研究表明:种群间的地理隔离和生境片段化使其种子流受到限制,但由传粉榕小蜂介导的花粉流较强^[3, 11, 21];而对中国东南部雌雄异株榕树薜荔(*F. pumila* var. *pumila*)及其传粉榕小蜂的比较亲缘地理学研究发现:虽然两者经历共同的地质历史事件,但遗传格局并非一致,其中鸟类等动物对薜荔种子流的散播是导致这种不一致的重要原因^[22-23]。综上可知:榕属植物的种群遗传结构及扩散深受地理隔离、气候波动、榕树多样的生长型、种子传播以及传粉榕小蜂的影响。榕属植物多样性高、生长型多样化,是理解受冰期影响较小且物种丰富的热带地区植物地理分布格局及种群动态历史的理想材料。

高山榕(*F. altissima*)为雌雄同株高大乔木,高25~30m,主要分布于中国、尼泊尔、不丹、印度(安达曼群岛)、缅甸、越南、泰国、马来西亚、印度尼西亚、菲律宾等国家和地区^[24]。在中国自然分布于云南、广东、广西和海南等地,是中国热带雨林群落中的优势乔木种^[25-26]。因其四季常绿,树冠广阔、树形优美、具有独木成林和绞杀等独特现象,以及生长迅速、生命力强,容易繁

殖等特点, 常作为园艺和绿化树种在多地有栽培; 同时高山榕也是很多民族崇拜的神树, 极具宗教文化色彩。本研究选取高山榕为研究对象, 对中国和中南半岛自然分布区进行种群采样, 借助 cpDNA 分子标记, 研究其遗传多样性和空间分布格局, 揭示种子流的动态, 增进对东南亚大陆热带乔木种亲缘地理结构的理解。

1 材料与方法

1.1 研究材料

在中国云南、广西、海南以及缅甸、泰国和柬埔寨共采集高山榕 25 个种群 (图 1) 177 个个体。每个种群所采集的个体间距保证在 50 m 以上, 以避免采集植株为近亲繁殖或克隆体。对于每个个体采集其健康叶片, 立即用硅胶干燥, 带回实验室置于-20 ℃ 冰箱保存; 同时采集凭证标本。种群地理位置、海拔及样本数量等信息如表 1

所示。

1.2 研究方法

1.2.1 高山榕植物总 DNA 提取

每个个体取干燥叶片 30~50 mg, 使用天根生化科技 (北京) 有限公司 (Tiangen Biotech) 生产的植物基因组 DNA 提取试剂盒 (Plant Genomic DNA Kit) 提取高山榕植物总 DNA。

1.2.2 引物筛选

本研究选取 10 个 cpDNA 标记, 包括 *psbA-trnH*、*trnL-trnF*、*trnS-trnG*、*psbB-psbF*、*trnQ-rps16*、*ndhF-rpl32*、*trnF-trnV*、*trnD-trnT*、*psbC-trnS* 和 *psbJ-petA*^[27], 以期从中找到易扩增、变异丰富且适合用于高山榕亲缘地理学研究的分子标记。按照不同的地理分布区, 分别选取 5 个地理距离较远的种群, 每个种群随机挑选 2 个个体, 对挑选出的 10 个个体进行预试验, 检测变异位点。预试验结果显示: 仅在 *psbA-trnH* 中检测到

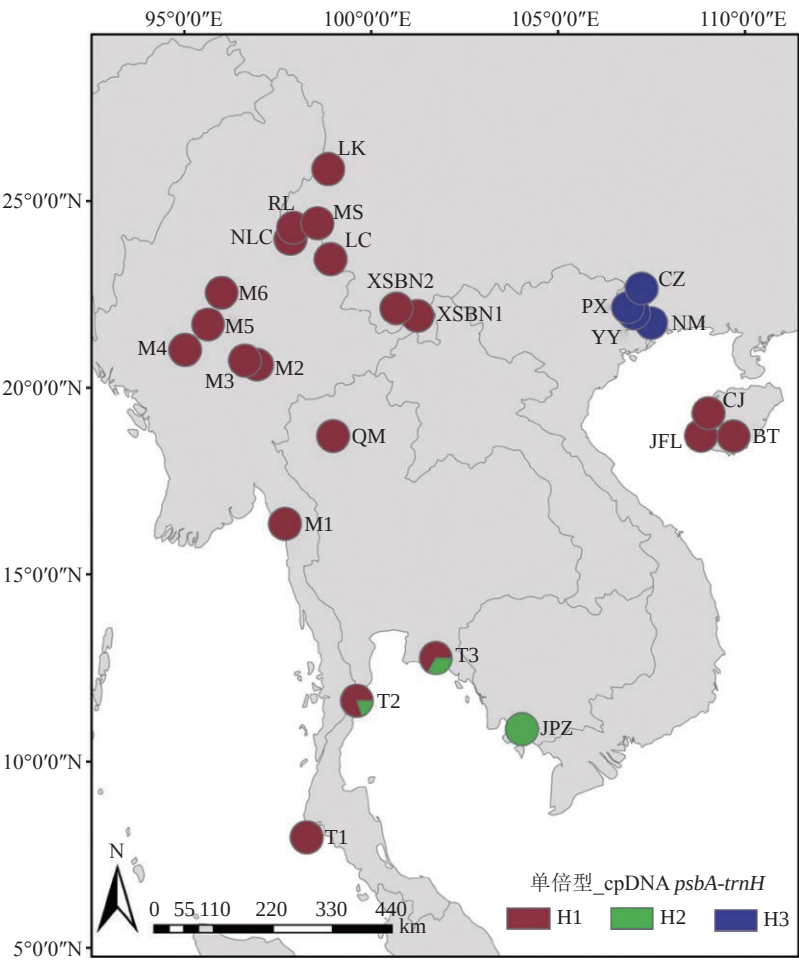


图 1 高山榕单倍型地理分布图

Fig. 1 Geographical distribution of haplotypes of *F. altissima*

变异位点，其余 9 个片段均能扩增成功，但未检测到变异位点。最后选择 *psbA-trnH* 为本研究对高山榕开展亲缘地理学研究的分子标记。对应引物序列为：
psbA 5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3';
trnH 5'-CGCGCATGGTGGATTACAAATC-3'^[28]。

表 1 高山榕种群样本采集信息表
Tab. 1 Sampling information of *F. altissima*

种群 population	采集点 locality	经度/(°) longitude	纬度/(°) latitude	海拔/m altitude	样本数 sample size
中国 China					
RL	云南瑞丽 Ruili, Yunnan	97.830	23.985	746±23	12
NLC	云南陇川 Longchuan, Yunnan	97.914	24.284	952±6	6
MS	云南芒市 Mangshi, Yunnan	98.565	24.411	903±14	14
LK	云南六库 Liuku, Yunnan	98.853	25.858	751±11	5
LC	云南临沧 Lincang, Yunnan	98.914	23.448	1 103±4	8
XSBN1	云南勐腊 Mengla, Xishuangbanna, Yunnan	101.240	21.927	518±4	11
XSBN2	云南景洪 Jinghong, Xishuangbanna, Yunnan	100.677	22.126	733±6	7
PX	广西凭祥 Pingxiang, Pingxiang, Guangxi	106.673	22.147	306±14	5
YY	广西友谊关 Youyiguan, Pingxiang, Guangxi	106.712	21.980	257±17	11
NM	广西宁明 Ningming, Chongzuo, Guangxi	107.174	21.768	344±10	3
CZ	广西太平 Taiping, Chongzuo, Guangxi	107.238	22.385	165±21	6
JFL	海南尖峰岭 Jianfengling, Hainan	108.825	18.716	320±22	4
CJ	海南昌江, Changjiang, Hainan	109.027	19.317	114±18	11
BT	海南保亭, Baoting, Hainan	109.692	18.702	237±33	6
缅甸 Myanmar					
M1	孟邦木冬 Mudon, Mon	97.690	16.357	127±16	8
M2	掸邦茵莱湖 Inle Lake, Shan	96.946	20.614	904±2	12
M3	掸邦宾德亚 Pindaya, Shan	96.618	20.725	1 339±6	11
M4	曼德勒良乌 Nyaungu, Mandalay	95.023	21.008	300±5	17
M5	曼德勒实皆 Sagaing, Mandalay	95.635	21.697	227±19	3
M6	曼德勒辛古 Singu, Mandalay	95.998	22.549	66±2	2
泰国 Thailand					
QM	清迈 Chiang Mai	98.982	18.706	1 090±7	2
T1	岗卡章国家公园 Kaeng Krachan National Park	98.279	7.970	52±5	3
T2	会扬瀑布国家公园 Huai Yang Waterfall National Park	99.615	11.625	72±9	5
T3	尖竹汶府 Chanthaburi Province	101.728	12.766	127±18	3
柬埔寨 Cambodia					
JPZ	贡布 Kampot	104.032	10.862	520±1	2

1.2.3 PCR 扩增及测序

利用引物 *psbA* 和 *trnH* 对高山榕 25 个种群 177 个个体样本进行 PCR 扩增，反应体系为 20 μL：DNA 模板 1 μL，正反引物各 0.5 μL (10 μmol/L)，1.6 μL dNTP (10 mmol/L)，2.0 μL *Taq* buffer，1.2 μL MgCl₂ (25 mmol/L)，0.2 μL *Taq* 聚合酶，13 μL ddH₂O。扩增程序为：94 ℃ 预变性 4 min，94 ℃ 变性 30 s，52 ℃ 退火 30 s，72 ℃ 延伸 1 min，变性至延伸共 30 个循环，循环完成后在 72 ℃ 下延伸 10 min。PCR 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上进

行电泳检测，成功扩增的 177 个个体的 PCR 产物送由华大基因公司进行测序。

1.2.4 高山榕物种分布模型

物种分布模型 (SDMs) 也称 MAXENT 最大熵模型，主要是基于最大熵理论，将物种现有的分布数据与不同时期的环境数据相结合，根据数学模型估计和分析物种潜在的分布区域。利用 MAXENT v3.3.3k 软件^[29]将得到的分布信息及环境因子投影到景观中，物种对生态环境的喜好程度用不同的概率呈现。本研究主要基于 MAXENT

v3.3.3k 软件, 预测高山榕当前及末次盛冰期 (last glacial maximum, LGM) 的潜在分布区。用于分析的高山榕物种分布数据, 主要包括野外调查及采集记录的数据, 或者从标本、相关文献中获得^[30]。中国西南部的高山榕分布数据大部分来自于野外调查采集, 另一部分来自中国数字植物标本馆 (<http://www.cvh.org.cn>)。另一方面, 从全球生物多样性信息机构 (global biodiversity information facility, <http://www.gbif.org/>) 获得高山榕国外的分布地理坐标信息。最后共得到 150 个高山榕分布数据。

1.2.5 数据处理和分析

使用 SeqMan (DNASar, Madison, WI) 软件对获得的正向和反向互补序列进行比对拼接, 而后导入 Geneious 6.1.8 (Biomatters Ltd.) 选择 Clustal-W 方法进行排序, 之后使用 BioEdit 7.0.9.0 软件^[31]对排序结果进行人工校对; 利用 DnaSP 5.10 软件^[32]对 DNA 序列变异位点、DNA 分子单倍型、核苷酸多样性 (h) 及单倍型多态性 (H_d) 进行统计及分析, 根据 Nei 的计算方法^[33], 依据在单倍体中 N_m 的计算公式 $N_m=(1-F_{ST})/2F_{ST}$ 计算基因流 (N_m), 并对种群进行 Tajima's D ^[34]、Fu & Li's D^* 、Fu's F_s ^[35] 中性检验及失配分析检验; 使用程序 PER-MUT 软件分别计算种群总的遗传多样性 (H_T) 和种群内平均遗传多样性 (H_S), 同时计算种群遗传分化系数 G_{ST} 和 N_{ST} , 进行 1 000 次置换检验, 通过比较 G_{ST} 和 N_{ST} 的大小, 分析种群间是否存在亲缘地理结构。若 $N_{ST}>G_{ST}$ ($P<0.05$), 表明遗传距离近的单倍型发生在相同或地理距离较近的种群中的概率大, 即存在亲缘地理结构^[36]; 利用 Arlequin 软件进行分子变异分析 (AMOVA), 检

验种群内和种群间的遗传差异, 同时计算种群遗传分化值 F_{ST} ^[37]。最后, 重建单倍型系统发育关系, 运用 Modeltest 3.7^[38]筛选合适的进化模型, 采用 MrBayes 3.1.2^[39-40]程序构建贝叶斯树, 使用马尔科夫链的蒙特卡洛方法, 以随机树为起始树, 每隔 200 代保存 1 棵树, 弃去前 25% 预热树, 剩余的树用来计算一致树和各分支的后验概率 (posterior possibility, pp)。

对于物种分布模型, 从 WorldClim (<http://www.worldclim.org/>) 下载 19 个相互之间具有关联性的生物气候因子, 包括 Bio1~Bio19。最后, 将获得的 150 个高山榕分布数据及 19 个生物气候因子利用 MAXENT v3.3.3k 软件, 模拟其在当前及末次盛冰期的潜在分布区域。

2 结果与分析

2.1 高山榕 cpDNA 单倍型的分布及多态性

对 *psbA-trnH* 序列进行排序和人工矫正, 形成 *psbA-trnH* 单倍型矩阵, 矩阵全长 419 bp。通过 DnaSP 5.10 对 *psbA-trnH* 矩阵检测, 共发现 4 个变异位点, 包括 2 个单核苷酸突变位点和 2 个碱基插入/缺失位点 (表 2)。

利用 DnaSP 5.10 进行单倍型统计分析, 共得到 3 种单倍型类型, 即 H1、H2 和 H3, 其具体的地理分布格局见图 1。25 个高山榕种群中, 只有泰国的 T2 和 T3 两个种群存在 2 种单倍型, 其余 23 个种群只有 1 种单倍型。单倍型 H1 分布最广, 泰国种群 T1、缅甸及中国云南、海南 18 个种群中只有单倍型 H1; 泰国东南部种群 T2 和 T3 具有 H1 和 H2 两种单倍型, 且 H2 仅出现于泰国东南部 T2、T3 及柬埔寨南部 JPZ 的 3 个种

表 2 高山榕 cpDNA *psbA-trnH* 3 个单倍型间的变异
Tab. 2 Variable sites of aligned sequences of cpDNA *psbA-trnH* of three haplotypes of *F. altissima*

单倍型 haplotype	psbA-trnH																									
	9	9	9	9	9	9	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
							1	2	2	2	2	5	5	6	6	6	6	6	6	6	6	6	7	7	7	
	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2
H1	A	T	A	T	A	A	A	—	—	T	G	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	A
H2	T	T	A	T	T	A	A	T	A	T	G	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	A
H3	A	T	A	T	A	A	A	—	—	T	G	A	C	A	T	T	T	T	A	A	A	T	A	A	A	A

注: 表中数值代表 *psbA-trnH* 矩阵中的碱基位置; 4 个变异位点分别位于 93、97、220~221、259~271, 并加粗显示; “—”表示碱基缺失。
Note: The values in the table represent the base positions in the *psbA-trnH* matrix; the four variant sites are located at 93, 97, 220~221, 259~271 and are bolded; “—” represents base deletion.

群中；单倍型 H3 则仅出现于广西壮族自治区分布的种群。总体的核苷酸多样性 $h=0.000\ 22$ ，单倍型多态性 $H_d=0.282$ ，显示高山榕种群遗传多样性较低。

2.2 高山榕种群遗传分化及种群动态

对高山榕 25 个种群 177 个体的 cpDNA *psbA-trnH* 片段进行分析，PERMUT 分析显示：种群间总的遗传多样性 H_T (0.378) 高于种群内平均遗传多样性 H_S (0.043)，种群遗传分化 $G_{ST}=0.887$ ， $N_{ST}=0.799$ ， $N_{ST}<G_{ST}$ ，表明其种群间没有明显的亲缘地理结构，即亲缘关系较近的单倍型没有明显地出现在相同或者相近的种群中。经计算得出平均基因流 $N_m=0.260$ 。AMOVA 分析 (表 3)

表明：高山榕 97.80% 的遗传变异来源于种群间，只有 2.20% 的变异来源于种群内；变异主要发生在种群间，种群内变异很少，高山榕两两种群间的遗传分化 F_{ST} 值在 0.000~1.000 之间，表明种群间的遗传分化程度不同。例如：种群 JPZ 与其他多数种群间分化大，分化值 $F_{ST}=1.000$ 。中性检验显示高山榕 *psbA-trnH* 片段处于中性状态，Tajima's $D=-1.036$ ($P>0.10$)、Fu & Li's $D^*=0.645$ ($P>0.10$)、Fu's $F_s=-0.421$ ($P>0.10$) 的检验值均遵循零假设，表明高山榕 *psbA-trnH* 片段呈中性进化，未受到选择作用。然而，失配分布分析结果显示失配分析曲线呈现单峰形式 (图 2)，表明高山榕种群经历过种群扩张。

表 3 AMOVA 分析结果

Tab. 3 The result of molecular variation analysis of variance (AMOVA)

变异来源 source of variation	自由度 df	总方差 sum of squares	变异成分 variance components	变异比例/% percentage of variation	遗传分化值 Φ_{ST} -statistics
种群间 among populations	24	288.880	1.719	97.80	
种群内 within population	152	5.867	0.039	2.20	$\Phi_{ST}=0.978$ ($P<0.01$)
总和 total	176	294.740	1.758	100.00	

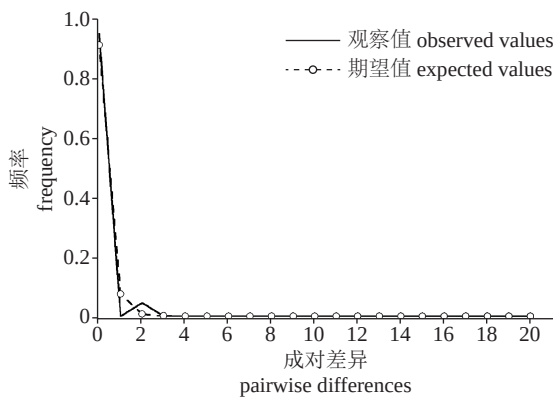


图 2 高山榕 cpDNA *psbA-trnH* 数据失配分布分析
Fig. 2 Mismatch distribution for sequences data of cpDNA *psbA-trnH* from all individuals of *F. altissima*

2.3 高山榕 *psbA-trnH* 单倍型系统发育分析

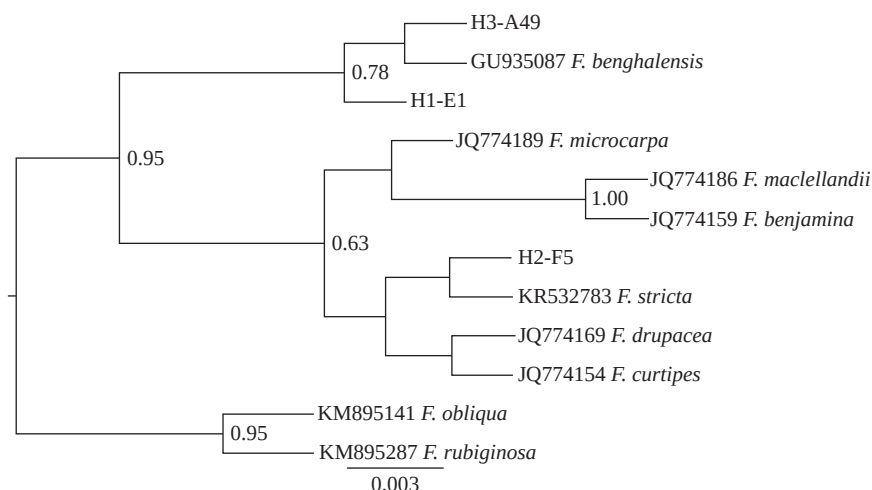
3 种单倍型分别选取 1 个样本作为代表，用于重建单倍型的系统发育关系。选取与高山榕同属于榕亚属 (subgenus *Urostigma*) 榕亚组 (section *Urostigma*) 环纹榕亚组 (subsection *Conosycea*) 的劲直榕 (*F. stricta*)、枕果榕 (*F. drupacea*)、小叶榕 (*F. microcarpa*)、瘤枝榕 (*F. maclellandii*)、钝叶榕 (*F. curtipes*)、垂叶榕 (*F. benjamina*)、孟加拉榕 (*F. benghalensis*)，以及 subsect. *Malvan-*

thera 亚组中的 *F. oblique*、*F. rubiginosa* 作为外类群，从 GenBank 数据库下载其 *psbA-trnH* 序列数据 (序列号显示在系统发育树上)，构建贝叶斯树。

结果显示 (图 3)：来自环纹榕亚组和 subsect. *Malvanthera* 的类群各自能够聚为单系，并得到较好支持 ($pp=0.95$)。然而，高山榕的不同单倍型之间未能形成单系，其中 H1、H3 两种单倍型与孟加拉榕聚为 1 支，但支持率较低 ($pp=0.78$)；H2 单倍型与除孟加拉榕之外的环纹榕亚组物种聚为 1 支，支持率同样较低 ($pp=0.63$)。虽然 H1、H2 和 H3 三种单倍型之间以及与近缘物种间的系统关系未得到较好的解决，但是 3 种单倍型很明显未能形成单系。

2.4 高山榕物种分布模型结果

利用最大熵模型方法模拟出高山榕当前的潜在分布区，该分布区与目前记载的高山榕分布区大致相同 (图 4)。利用获得的分布区数据与环境因子相结合，模拟结果显示：高山榕在末次盛冰期 (LGM) 存在 3 个主要的分布中心，两两之间并不连续，是高山榕的 3 个主要潜在分布区域；冰期后 3 个区域之间重新建立联系。



注: 大于 0.50 的后验概率标注在进化支上。

Note: Bayesian posterior probabilities (>0.50) are shown above the branches.

图3 基于 cpDNA *psbA-trnH* 序列矩阵构建的 50% 贝叶斯一致性树

Fig. 3 Fifty percent majority rule consensus tree from a Bayesian analysis of the cpDNA *psbA-trnH* sequence dataset

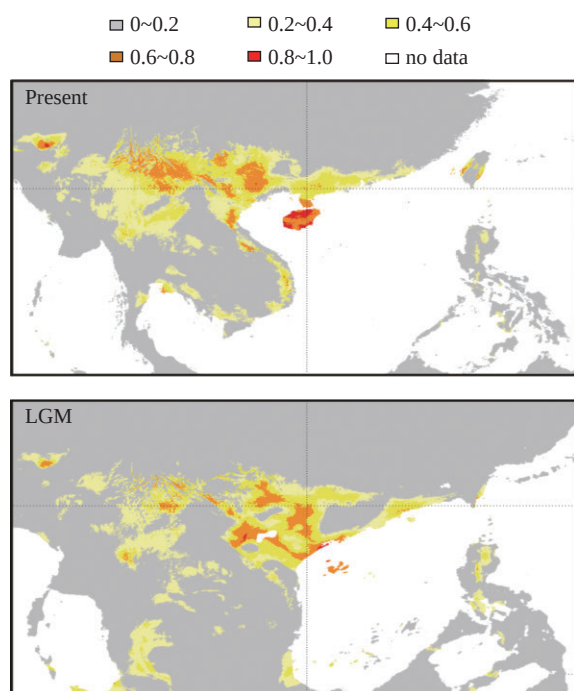


图4 高山榕当前和末次盛冰期潜在的潜在分布区域
(基准线: N 22°、E 110°)

Fig. 4 Potential distribution of *F. altissima* at present and LGM (reference lines: N 22°, E 110°)

3 讨论

cpDNA 在绝大多数被子植物中为母系遗传, 通过种子进行传播, 能够真实地反应由于种子流而引起的遗传结构差异^[28]。本研究首次采用 cpDNA 标记探讨热带亚洲分布雌雄同株榕树高山

榕的遗传多样性和种群遗传结构, 并分析其种子流动态。总结前人学者对榕树植物开展的系统发育和种群遗传学研究, 主要根据分辨率大小和扩增的难易程度, 从中筛选了 10 个表现较好的 cpDNA 片段用于本研究对高山榕的分析, 结果只在 *psbA-trnH* 中检测到 4 个变异位点, 共 3 个单倍型, 从侧面反应高山榕遗传多样性较低。而基于对 *psbA-trnH* 的分析显示: 高山榕种群间总的平均遗传多样性为 $H_T=0.378$, 总核苷酸多态性和总单倍型多态性分别为 $h=0.000\ 22$ 和 $H_d=0.282$, 远低于具有相似分布区的粗叶榕 cpDNA 总的平均遗传多样性 ($H_T=0.777$) 及东亚地区乔木和灌木植物的 cpDNA 遗传多样性水平平均值 ($H_T=0.790$)^[11, 41-42]; 同时还具有很低的种群内平均遗传多样性 ($H_S=0.043$)。这显示虽然 cpDNA 片段对揭示雌雄异株榕树和美洲雌雄同株榕树的遗传多样性, 探讨其亲缘地理结构具有一定价值^[9, 17-18, 21, 23], 但在亚洲雌雄同株榕树上表现较差。

在 3 个 *psbA-trnH* 单倍型中, H1 分布最为广泛, 中国西南部、泰国、缅甸大部分地区的 20 个种群都有 H1 单倍型的分布, 其中中国西南部、泰国等地 18 个种群全部样本均为 H1 单倍型。广布的单倍型往往比较原始^[43], 根据分布区范围推测 H1 可能为最原始单倍型。系统发育分析表明: 3 种单倍型在贝叶斯树中未形成单系。进一步分析显示: H1 为高山榕和孟加拉榕共享单倍型, 而 H2 被高山榕与小叶榕、钝叶榕以及

枕果榕所共享。共享单倍型主要源于杂交渐渗或不完整的谱系筛选两种情况。榕树和其专性传粉榕小蜂之间在物种水平上高度专性的传粉关系,有效维持了榕树物种的遗传独立性,致使其种间杂交非常困难,关于榕树自然杂交的报道也很少。目前,我们未在高山榕中发现其他榕树的传粉榕小蜂为其传粉的现象,因此认为高山榕与其他榕树之间的杂交不太可能发生。高山榕与近缘种之间共享单倍型的情况更可能来源于不完整的谱系筛选,由于未在高山榕和近缘种间发现快速辐射成种过程,因此推测这种不完整的谱系筛选可能和高山榕有效种群大、分布范围广、世代周期长等特征密切相关,因为具有这些特征的乔木树种往往需要更长的时间来完成谱系分选过程^[2],这种情况也存在于其他榕树类群^[17]。3 种单倍型中只有 H3 为高山榕种群所独有,并从 H1 演化而来,分布区只限于广西。广西与云南、海南距离较近,但却具有特有的单倍型,这可能是由于种群间限制性的基因流或局部的遗传突变事件导致单倍型 H3 出现^[42]。

遗传分化系数 G_{ST} 显著大于 N_{ST} ,表明高山榕种群无明显的亲缘地理结构。而 AMOVA 分析显示:97.80% 的分子变异来源于种群间,基因流(种子流)水平较低。基因流主要包括花粉流和种子流两种形式,其中花粉扩散是自然植物种群最主要的基因流^[44],研究也显示亚洲大陆分布的雌雄同株榕树种群间具有强烈花粉流^[19]。虽然有学者对亚洲分布的雌雄异株榕树薜荔和粗叶榕开展了相关研究,显示种子流水平较低^[21, 23],但还未对雌雄同株榕树类群的种子流开展过类似研究。本研究只收集了 cpDNA 数据,难以对花粉流进行评价,但可以尝试对雌雄同株榕树的种子流进行探讨。榕树果实为众多动物提供了食物来源,并借助食果动物进行种子扩散,其中鸟类和蝙蝠可能是其长距离扩散的主要媒介^[13]。通过对雌雄异株和雌雄同株榕树榕果营养成分的比较分析,发现雌雄同株榕树的榕果含糖量更低,脂肪和不易于消化的粗纤维含量更高^[45-46],这减弱了其对食果动物的吸引力。本研究显示高山榕种群间遗传分化明显,种子流水平极低,暗示高山榕种子的长距离扩散受到明显限制。

Tajima's D 、Fu & Li's D^* 及 Fu's F_s 中性检验表明:高山榕种群符合中性进化理论,可推测其种群在进化过程中经历扩张或者自然选择作用的

可能性较小,而失配分析却显示高山榕在近期经历过种群扩张。这种中性检验和失配分析不一致的现象,在 YU 等^[9]对粗叶榕的研究中也有所体现,并认为这种不一致情况来源于粗叶榕种群的缓慢扩张。榕树和其专性传粉榕小蜂相互依赖,不可或缺,榕树的有性生殖依赖传粉榕小蜂的传粉服务。因此,榕树种群的建立和扩张同时受到种子扩散能力和传粉榕小蜂传播花粉能力的双重约束。本研究显示高山榕种子的散播受到明显限制,这可能是种群扩张缓慢的重要原因之一;对粗叶榕的研究也显示种子流是约束其种群扩张的重要因素^[9]。另一方面,物种分布模型显示:高山榕在冰期存在 3 个潜在分布中心,其中泰国的种群 T2、T3 遗传多样性高,可能是冰期避难所。冰期后气候变暖,潜在分布区扩大,支持高山榕种群扩张。这种冰期后的种群扩张在其他榕树物种中也有所体现^[47]。一般认为传粉榕小蜂个体小,生命短暂,飞行能力有限,特别是雌雄异株榕树的传粉榕小蜂^[48-49],例如研究认为无花果(*F. carica*)种群的扩张受到了传粉榕小蜂的限制^[50]。但研究认为雌雄同株榕树的传粉榕小蜂能够借助风力进行长距离的花粉传播^[19, 51],因此我们认为花粉流可能不是限制高山榕种群扩张的因素。

4 结论

本研究显示 cpDNA 片段对揭示热带亚洲雌雄同株榕树的遗传多样性和亲缘地理格局作用有限,对其他学者的研究具有一定借鉴意义。*psbA-trnH* 证据显示:热带亚洲北缘高山榕种群间的种子流受到明显限制,没有明显的亲缘地理结构。综合分析中性检验、失配分析及物种分布模型的结果认为:高山榕种群经历了缓慢的种群扩张,有限的种子流可能是限制其种群扩张的重要原因之一。由于本研究只筛选到 1 个合适的 cpDNA 标记,并且单倍型数量过少,难以对高山榕种群的地理分布格局和演化历史进行更为深入的讨论,也无法追踪花粉流对高山榕遗传结构的塑造作用,未来有必要增加 cpDNA 证据和核基因数据,综合种子流和花粉流以揭示其亲缘地理分布格局的演化历史。

[参考文献]

- [1] NACIRI Y, GAUDEUL M. Phylogeography of the endangered *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae) in the European Alps[J]. Molecular Ecology, 2007, 16(13):

2721. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2007.03269.x.
- [2] AVISE J C. The history and purview of phylogeography: a personal reflection[J]. *Molecular Ecology*, 2010, 7(4): 371. DOI: 10.1046/j.1365-294x.1998.00391.x.
- [3] AVISE J C. *Phylogeography: the history and formation of species*[M]. London: Harvard University Press, 2000.
- [4] ZHOU W W, WEN Y, FU J, et al. Speciation in the *Rana chensinensis* species complex and its relationship to the uplift of the Qinghai-Tibetan Plateau[J]. *Molecular Ecology*, 2012, 21(4): 960. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2011.05411.x.
- [5] YANG F S, LI Y F, DING X, et al. Extensive population expansion of *Pedicularis longiflora* (Orobanchaceae) on the Qinghai-Tibetan Plateau and its correlation with the Quaternary climate change[J]. *Molecular Ecology*, 2008, 17(23): 5135. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2008.03976.x.
- [6] MENG L H, YANG R, ABBOTT R J, et al. Mitochondrial and chloroplast phylogeography of *Picea crassifolia* Kom (Pinaceae) in the Qinghai-Tibetan Plateau and adjacent highlands[J]. *Molecular Ecology*, 2007, 16(19): 4128. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2007.03459.x.
- [7] ZHAO Y M, ZHANG L. The phylogeographic history of the self-pollinated herb *Tacca chantrieri* (Dioscoreaceae) in the tropics of mainland Southeast Asia[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2015, 58: 139. DOI: 10.1016/j.bse.2014.11.011.
- [8] DICK C W. Phylogeography and population structure of tropical trees[J]. *Tropical Plant Biology*, 2010, 3(1): 1. DOI: 10.1007/s12042-009-9039-0.
- [9] YU H, NASON J D. Nuclear and chloroplast DNA phylogeography of *Ficus hirta*: obligate pollination mutualism and constraints on range expansion in response to climate change[J]. *New Phytologist*, 2013, 197(1): 276. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2012.04383.x.
- [10] JANZEN D H. How to be a fig[J]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1979, 10(10): 13. DOI: 10.1146/annurev.es.10.110179.000305.
- [11] BERG C C, WIEBES J T. African fig trees and fig wasps[M]. Amsterdam: Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen, 1992.
- [12] KORINE C, KALKO E K V, HERRE E A. Fruit characteristics and factors affecting fruit removal in a Panamanian community of strangler figs[J]. *Oecologia*, 2000, 123(4): 560. DOI: 10.1007/PL00008861.
- [13] SHANAHAN M, SAMSON S O, GOMPTON S G, et al. Fig-eating by vertebrate frugivores: a global review[J]. *Biological Reviews*, 2001, 76(4): 529. DOI: 10.1017/S1464793101005760.
- [14] HARRISON R D, SHANAHAN M. Seventy-seven ways to be a fig: overview of a diverse plant assemblage[M]// ROUBIK D W, SAKAI S, KARIM A A H. *Pollination ecology and the rain forest*. New York: Springer, 2005.
- [15] VORIS H K. Maps of Pleistocene sea levels in Southeast Asia: shorelines, river systems and time durations[J]. *Journal of Biogeography*, 2000, 27(5): 1153. DOI: 10.1046/j.1365-2699.2000.00489.x.
- [16] MORLEY R J. *Origin and evolution of tropical rain forests*[M]. Hoboken: John Wiley & Sons, 2000.
- [17] CORONADO E N H, DEXTER K G, POELCHAU M F, et al. *Ficus insipida* subsp. *insipida* (Moraceae) reveals the role of ecology in the phylogeography of widespread Neotropical rain forest tree species[J]. *Journal of Biogeography*, 2014, 41(9): 1697. DOI: 10.1111/jbi.12326.
- [18] VIEIRA F D A, NOVAES R M L, FAJARDO C G, et al. Holocene southward expansion in seasonally dry tropical forests in South America: phylogeography of *Ficus bonijesulapensis* (Moraceae)[J]. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2015, 177(2): 189. DOI: 10.1111/boj.12241.
- [19] BAIN A, BORGES R M, CHEVALLIER M H, et al. Geographic structuring into vicariant species-pairs in a wide-ranging, high-dispersal plant-insect mutualism: the case of *Ficus racemosa* and its pollinating wasps[J]. *Evolutionary Ecology*, 2016, 30(4): 663. DOI: 10.1111/boj.12241.
- [20] KOBMOO N, HOSSAERT-MCKEY M, RASPLUS J Y, et al. *Ficus racemosa* is pollinated by a single population of a single agaonid wasp species in continental South-East Asia[J]. *Molecular Ecology*, 2010, 19(13): 2700. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2010.04654.x.
- [21] YU H, NASON J D, GE X J, et al. Slatkin's Paradox: when direct observation and realized gene flow disagree. A case study in *Ficus*[J]. *Molecular Ecology*, 2010, 19(20): 4441. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2010.04777.x.
- [22] CHEN Y, COMPTON S G, LIU M, et al. Fig trees at the northern limit of their range: the distributions of cryptic pollinators indicate multiple glacial refugia[J]. *Molecular Ecology*, 2012, 21(7): 1687. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2012.05491.x.
- [23] LIU M, COMPTON S G, PENG F E, et al. Movements of genes between populations: are pollinators more effective at transferring their own or plant genetic markers?[J]. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 2015, 282(1808): 20150290. DOI: 10.1098/rspb.2015.0290.
- [24] BERG C C, CORNER E J H, NOOTEBOOM H P. *Moraceae (Ficus)*[M]// NOOTEBOOM H P. *Flora Malesiana*. Leiden: National Herbarium of the Netherlands, 2005.
- [25] 朱华, 王洪, 李保贵, 等. 西双版纳森林植被研究[J]. *植物科学学报*, 2015, 33(5): 641. DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.2015.50641-726.
- [26] 黄康有, 廖文波, 金建华, 等. 海南岛吊罗山植物群落特征和物种多样性分析[J]. *生态环境学报*, 2007, 16(3): 900. DOI: 10.16258/j.cnki.1674-5906.2007.03.040.
- [27] VIEIRA F D A, SANTANA J A D S, SANTOS R M D, et al. DNA extraction protocols and cpDNA primers to *Ficus bonijesulapensis* (Moraceae)[J]. *Revista Caatinga*, 2010, 23(4): 69.
- [28] TABERLET P, GIELLY L, PAUTOU G, et al. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA[J]. *Plant Molecular Biology*, 1991,

- 17(5): 1105. DOI: 10.1007/BF00037152.
- [29] PHILLIPS S J, DUDIK M. Modeling of species distributions with maxent: new extensions and a comprehensive evaluation[J]. *Ecography*, 2008, 31(2): 161. DOI: 10.1111/j.0906-7590.2007.5203.x.
- [30] GRAHAM C H, FERRIER S, HUETTMAN F, et al. New developments in museum-based informatics and applications in biodiversity analysis[J]. *Trends in Ecology and Evolution*, 2004, 19(9): 497. DOI: 10.1016/j.tree.2004.07.006.
- [31] HALL T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[J]. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999, 41(41): 95. DOI: 10.1021/bk-1999-0734.ch008.
- [32] LIBRADO P, ROZAS R. DnaSP version 5: a software for comprehensive analyses of DNA polymorphism data[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp187.
- [33] NEI M. Analysis of gene diversity in subdivided populations[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1973, 70(12): 3322. DOI: 10.1073/pnas.70.12.3321.
- [34] TAJIMA F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism[J]. *Genetics*, 1989, 123(3): 585.
- [35] FU Y X, LI W H. Statistical tests of neutrality of mutations[J]. *Genetics*, 1993, 133(3): 693.
- [36] PONS O, PETIT R J. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles[J]. *Genetics*, 1996, 144(3): 1237.
- [37] EXCOFFIER L, LISCHER H. Arlequin suite version 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2010, 10(3): 564. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x.
- [38] POSADA D, BUCKLEY T R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests[J]. *Systematic Biology*, 2004, 53(5): 793. DOI: 10.1080/10635150490522304.
- [39] RONQUIST F, HUELSENBECK J P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models[J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(12): 1572. DOI: 10.1093/bioinformatics/btg180.
- [40] HUELSENBECK J P, RONQUIST F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees[J]. *Bioinformatics*, 2001, 17(8): 754. DOI: 10.1093/bioinformatics/17.8.754.
- [41] QIU Y X, FU C X, COMES H P. Plant molecular phylogeography in China and adjacent regions: tracing the genetic imprints of Quaternary climate and environmental change in the world's most diverse temperate flora[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2011, 59(1): 225. DOI: 10.1016/j.ympev.2011.01.012.
- [42] WERNECK F P. The diversification of eastern South American open vegetation biomes: historical biogeography and perspectives[J]. *Quaternary Science Reviews*, 2011, 30(13/14): 1630. DOI: 10.1016/j.quascirev.2011.03.009.
- [43] HOLDER K. A test of the glacial refugium hypothesis using patterns of mitochondrial and nuclear DNA sequence variation in rock ptarmigan (*Lagopus mutus*)[J]. *Evolution*, 1999, 53(6): 1936. DOI: 10.2307/2640452.
- [44] ELLSTRAND N C. Gene flow by pollen: implications for plant conservation genetics[J]. *Oikos*, 1992, 63(1): 77. DOI: 10.2307/3545517.
- [45] DEBUSSCHE M, CORTEZ J, RIMBAULT I. Variation in fleshy fruit composition in the Mediterranean region: the importance of ripening season, life-form, fruit type and geographical distribution[J]. *Oikos*, 1987, 49(3): 244. DOI: 10.2307/3565758.
- [46] IZHAKI I. The role of fruit traits in determining fruit removal in East Mediterranean ecosystem[M]//LEVEY D J, SILVA W R, GALETTI M. Seed Dispersal and Frugivory: ecology, evolution and conservation. London: Centre for Agriculture and Biosciences International, 2002.
- [47] COMPTON S G, BALL A D, COLLINSON M E, et al. Ancient fig wasps indicate at least 34 million years of stasis in their mutualism with fig trees[J]. *Biology Letters*, 2010, 6: 840. DOI: 10.1098/rsbl.2010.0389.
- [48] HARRISON R D, RASPLUS J Y. Dispersal of fig pollinators in Asian tropical rain forests[J]. *Journal of Tropical Ecology*, 2006, 22: 635. DOI: 10.1017/S0266467406003488.
- [49] ALVAREZ N, MCKEY D, KJELLBERG F, et al. Phylogeography and historical biogeography of obligate specific mutualisms[M]//MORAND S, KRASNOV B R. The biogeography of host-parasite interactions. Oxford: Oxford University Press, 2010.
- [50] KJELLBERG F, VALDEYRON G. Species-specific pollination: a help or a limitation to range extension[M]//DI CASTRI F, HANSEN A J, DEBUSSCHE M. Biological invasions in Europe and the Mediterranean Basin. Dordrecht: Springer, 1990.
- [51] AHMED S, COMPTON S G, BUTLIN R K, et al. Windborne insects mediate directional pollen transfer between desert fig trees 160 kilometers apart[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106: 20345. DOI: 10.1073/pnas.09022131106.

责任编辑: 何馨成