



•研究报告•

红砂基因组大小变异及物种分化

范兴科^{1,2}, 燕霞³, 冯媛媛⁴, 冉进华⁴, 钱朝菊¹, 尹晓月^{1,2}, 周姗姗^{1,2}, 房庭舟^{1,2}, 马小飞^{1,3*}

1. 中国科学院西北生态环境资源研究院甘肃省寒区旱区逆境生理与生态重点实验室, 兰州 730000; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 南通大学生命科学学院, 江苏南通 226019; 4. 中国科学院植物研究所系统与进化植物学国家重点实验室, 北京 100093

摘要: 红砂(*Reaumuria soongarica*, 柽柳科)是广泛分布于亚洲内陆干旱区温带荒漠的建群灌木, 该物种内部经历过分化和杂交事件, 是研究荒漠植物多样性发生和杂交物种形成的理想模型。然而, 红砂不同群体的倍性水平尚不清楚, 制约了对物种形成机制的深入研究。为了确定红砂不同支系的倍性及基因组大小变异模式, 本研究以红砂幼苗根尖为实验材料, 以野生番茄(*Solanum pimpinellifolium*)作为内标物种, 利用流式细胞术对分别来自北疆支系及其可能的亲本支系(东部和西部支系)的共8个红砂群体进行了DNA 1C-值测定和分析。结果显示: 红砂东部支系的DNA 1C-值(1.149 ± 0.012 pg)略小于西部支系的1C-值(1.195 ± 0.031 pg)。北疆支系中阜康(FK)和沙湾(SW)群体的DNA 1C-值处于东、西支系的1C-值之间, 而火烧山(HSS)和五彩城(WCC)群体的1C-值接近东、西支系1C-值的2倍。结合之前的分子标记结果, 我们推测北疆支系中阜康和沙湾群体为东、西部支系的同倍体杂交种群, 而火烧山和五彩城群体属于异源四倍体杂交种群。不同倍性的北疆群体起源于不同的杂交事件, 可以划归为不同的物种。

关键词: *Reaumuria soongarica*; DNA C-值; 同倍体杂交物种形成; 异源多倍体杂交物种形成; 物种多样性

范兴科, 燕霞, 冯媛媛, 冉进华, 钱朝菊, 尹晓月, 周姗姗, 房庭舟, 马小飞 (2021) 红砂基因组大小变异及物种分化. 生物多样性, 29, 1308–1320. doi: 10.17520/biods.2021057.

Fan XK, Yan X, Feng YY, Ran JH, Qian CJ, Yin XY, Zhou SS, Fang TZ, Ma XF (2021) Genome size variations and species differentiation of *Reaumuria soongarica*. Biodiversity Science, 29, 1308–1320. doi: 10.17520/biods.2021057.

Genome size variations and species differentiation of *Reaumuria soongarica*Xingke Fan^{1,2}, Xia Yan³, Yuanyuan Feng⁴, Jinhua Ran⁴, Chaoju Qian¹, Xiaoyue Yin^{1,2}, Shanshan Zhou^{1,2}, Tingzhou Fang^{1,2}, Xiaofei Ma^{1,3*}

1 Key Laboratory of Stress Physiology and Ecology in Cold and Arid Regions, Gansu Province, Northwest Institute of Eco-Environment and Resources, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049

3 School of Life Sciences, Nantong University, Nantong, Jiangsu 226019

4 State Key Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093

ABSTRACT

Aims: As a constructive shrub species widely distributed across the temperate deserts of arid Central Asia, *Reaumuria soongarica* (Tamaricaceae) had undergone divergence and hybridization during its evolutionary history, which make it an ideal model for understanding the molecular basis of biodiversity of desert ecosystems and plant hybrid speciation. However, the ploidy level of different populations of *R. soongarica* is still unclear, which confines the further study on its speciation mechanism.

Methods: To clarify the ploidy level and variation patterns of genome size of different *R. soongarica* lineages, we investigated the DNA 1C-value of eight *R. soongarica* populations from the northern lineage (distributed in northern Xinjiang) and its putative parental lineages (the eastern and western lineages) by flow cytometry. The young roots of *R. soongarica* were selected as the experimental material, and *Solanum pimpinellifolium* was used as an internal standard

收稿日期: 2021-02-09; 接受日期: 2021-06-10

基金项目: 国家自然科学基金(31770416)、上海市绿化和市容管理局科技攻关项目(G202401)、国家科技基础资源调查专项(2017FY100200)和新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室开放课题(BRZD1809)

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: maxiaofei@lzb.ac.cn

species.

Results: Our data showed that the DNA 1C-value of the eastern lineage (1.149 ± 0.012 pg) was slightly smaller than that of the western lineage (1.195 ± 0.031 pg), and the DNA 1C-value of the Fukang (FW) and Shawan (SW) populations in the northern lineage was intermediate between that of its parental lineages. However, the DNA 1C-values of the Huoshaoshan (HSS) and Wucaicheng (WCC) populations from the northern lineage were closely twice as those from the eastern and western populations.

Conclusion: Considering to the previous results of molecular markers, we infer that the FW and SW populations belong to the homoploid hybrid populations from the eastern and western lineages, while the HSS and WCC populations are allopolyploid hybrid populations. The populations with different ploidy levels in the northern lineage could originate from different hybrid events, which could be classified into different species.

Key words: *Reaumuria soongarica*; DNA C-value; homoploid hybrid speciation; allopolyploid hybrid speciation; species diversity

自然杂交是生物演化和物种形成的主要动力之一, 在植物界中普遍存在(Barton, 2001; Mallet, 2007; Abbott et al, 2013)。Mallet (2005)曾对相关研究进行了统计, 发现存在种间杂交或基因渐渗的植物物种数量占整体的25%以上。虽然并非所有的杂交事件最终都能产生新的物种, 但健康且可育的杂交个体一旦与亲本物种之间产生生态位分化, 就可能摆脱“少数细胞型劣势”, 不断演化形成独立的物种(Husband, 2000; Mallet, 2007)。随着大量杂交物种被鉴定, 代表谱系融合的杂交物种形成在物种多样性发生中的重要作用已得到普遍认同(Mallet, 2007; 王玉国, 2017; Taylor & Larson, 2019)。

根据杂交物种的倍性是否增加, 可以将其成种过程分为异源多倍化杂交物种形成(allopolyploid hybrid speciation)和同倍体杂交物种形成(homoploid hybrid speciation)。异源多倍化杂交物种是指两个物种杂交产生的染色体数量加倍的新物种, 它的形成相对常见, 这是因为倍性差异不仅保证了杂交个体具有正常的育性, 还可以使其与亲本物种之间快速产生较强的生殖隔离, 加快物种形成(Soltis et al, 2004; Mallet, 2007)。与之相比, 同倍体杂交物种的形成条件较为苛刻。同倍体杂交物种是指染色体倍性相同的物种之间通过杂交产生染色体倍性未发生变化的新物种, 由于倍性相同, 新产生的杂交后代不能立即阻断来自亲本的基因流, 在处于少数细胞型劣势的情况下很可能在与亲本的不断回交中消失(Buerkle et al, 2000)。由此可见, 杂交后代与其亲本之间是否能够产生生殖隔离, 是同倍体杂交物种形成的关键。越来越多的研究表明生态分化可能是导致同倍体杂交物种形成中产生生殖隔离的主要原因(Gross & Rieseberg, 2005; Mallet, 2007;

Yakimowski & Rieseberg, 2014)。然而, 目前已经报道的同倍体杂交物种形成案例相对整个植物界而言非常少, 并且除向日葵属(*Helianthus*) (Rieseberg, 1991; Rieseberg et al, 2003)、高山松(*Pinus densata*) (Ma et al, 2006; Zhao et al, 2014)、居中虎榛子(*Ostryopsis intermedia*) (Wang et al, 2021)和峨眉锥栗(*Castanea henryi* var. *omeiensis*) (Sun et al, 2020)等少数研究以外, 大多数研究还处于描述性阶段, 缺乏对同倍体杂交物种形成机制的深入探讨。因此, 未来需要鉴定更多不同类型的杂交物种及种间杂交带, 这样才能更好地解释杂交对适应性产生及生殖隔离的影响, 更深入地探讨杂交物种形成不同阶段的遗传基础, 尤其是维持杂交物种表型变异相关的适应性位点(王玉国, 2017)。

红砂(*Reaumuria soongarica*)是怪柳科红砂属内无特殊分类地位的物种(Zhang et al, 2014a), 是起源于第三纪的超旱生灌木, 属于典型的地带性植物, 其分布区与亚洲中部干旱区基本重合(刘家琼等, 1982; Shi et al, 2013)。作为荒漠区重要的优势种和建群种, 红砂在维持温带荒漠生态系统的物种多样性和稳定性方面发挥着重要作用(刘家琼等, 1982; Ma et al, 2005)。红砂的遗传多样性较高, 其种内存在明显的遗传分化和杂交(Qian et al, 2008; Yang et al, 2015; Shi et al, 2020), 并且不同遗传支系(种内分化出来的具有不同遗传组分的谱系)的形态和生境已出现差异(Fan et al, 2020) (附录1)。目前, 红砂的西部支系(塔克拉玛干沙漠)与东部支系(巴丹吉林-腾格里沙漠)之间已完全分化, 该过程受到青藏高原东北部隆升以及东亚季风系统形成和演化的驱动(Li et al, 2012; Yin et al, 2015; Shi et al, 2020)。Shi等(2020)进一步指出红砂北疆支系(古尔班通古

特沙漠)起源于东、西支系经两次杂交事件产生的同倍体杂交后代, 目前该支系与其亲本之间已出现明显的生态分化, 正处于物种形成的早期阶段。不同于那些已经和亲本产生有效生殖隔离的同倍体杂交物种, 如高山松(Zhao et al, 2014), 红砂北疆支系为研究杂交物种形成初期的生态适应性变化和生殖隔离的产生等关键过程提供了新的模型。此外, 相比于我国其他沙漠地区, 古尔班通古特沙漠植物区系形成时间较晚, 但物种多样性较高(刘嫫心, 1995; 张立运和陈昌笃, 2002), 红砂北疆支系与之相同的特点(后衍支系却具有较高的群体遗传分化程度)对于研究该地区物种多样性的发生机制具有重要价值。但令人困惑的是, 红砂北疆支系内不同群体的多个叶绿体基因和核基因的系统发育关系相互矛盾(Yin et al, 2015; Shi et al, 2020)。比如, 沙湾群体中, 母系遗传的叶绿体基因单倍型与东部支系聚为一支, 双亲遗传的ITS单倍型与西部支系相近; 而火烧山群体的叶绿体基因单倍型则与西部支系聚为一支, ITS单倍型与东部支系相近。目前红砂属中仅兰州地区红砂群体的倍性已被调查, 该群体为二倍体($2n = 2x = 22$), 与大多数已报道的怪柳科怪柳属(*Tamarix*)的物种的倍性相同, 同时在一些怪柳属物种中还存在多倍体植株(Wang et al, 2011; Samadi et al, 2013)。在环境恶劣的地区, 多倍化可

能是植物适应极端环境的重要机制(Van de Peer et al, 2021)。考虑到Shi等(2020)分别对来自北疆阜康群体及两个亲本支系的共3个个体进行了核型调查, 但群体水平的倍性变化尚不清楚, 在无明显地理隔离但存在环境差异的狭窄区域内, 同为杂交后代的北疆群体之间存在显著的遗传障碍(Fan et al, 未发表数据), 因此我们推测倍性差异是导致北疆群体间产生生殖隔离的主要原因之一。

基因组大小(DNA C-值)是指一个物种的配子核中(染色体数目为 n)未复制的DNA含量, 是重要的生物多样性参数, 在物种水平上较为固定, 而在物种间存在较大差异(Greilhuber et al, 2005; Smarda & Bures, 2010)。因此, 该值可用于判断倍性水平、辅助物种分类和鉴定杂交物种(Mahelka et al, 2005; Loureiro et al, 2010; 邹璇等, 2020; Urfusová et al, 2021), 如Zonneveld和Duncan (2010)利用DNA C-值数据发现了风信子科的一个新二倍体物种*Eucomis grimshawii*; Mahelka等(2005)利用DNA C-值区分了偃麦草属(*Elytrigia*)的*E. repens*和*E. intermedia*, 并发现了两个物种的同倍体杂交种。由于上述的成种特点, 同倍体杂交物种的DNA C-值一般介于两个亲本之间, 而异源多倍化杂交物种的DNA C-值接近两个亲本的DNA C-值之和(Loureiro et al, 2010)。此外, DNA C-值在植物种内和种间的变异对于研究

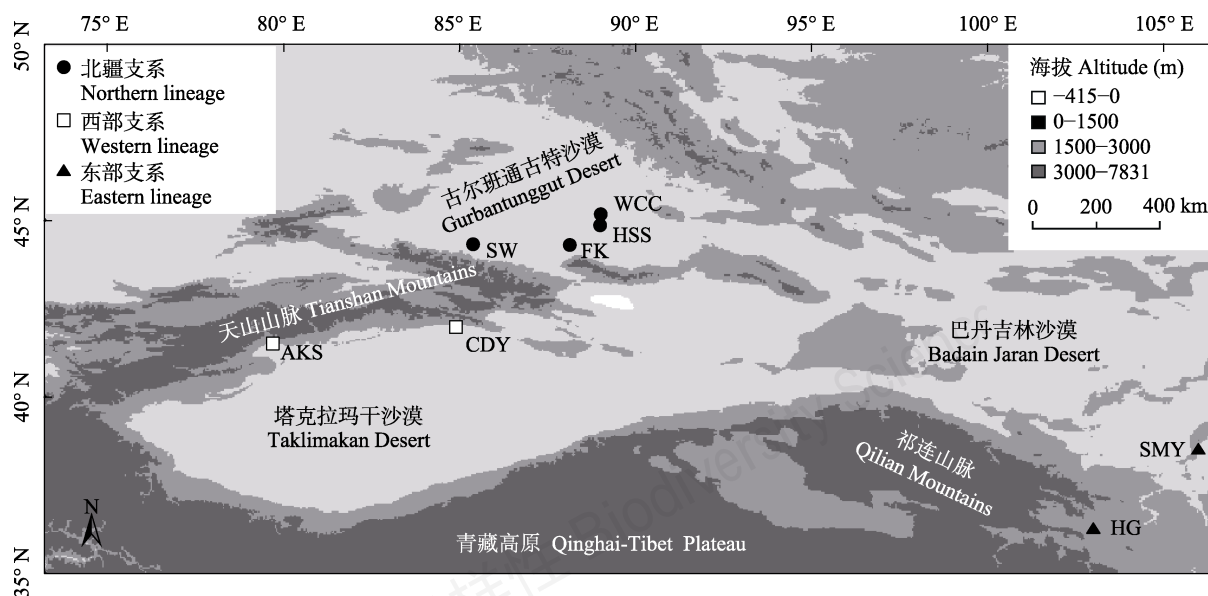


图1 本研究测量的8个红砂群体的地理分布图。群体的具体信息见表1。

Fig. 1 Geographic locations of the eight *Reaumuria soongarica* populations measured in this study. The specific information of the populations is shown in Table 1.

生态适应性、系统发育和基因组进化等有重要意义(郭水良等, 2011; Guignard et al, 2016; Pellicer et al, 2018)。

目前测定DNA C-值的标准方法是流式细胞术(flow cytometry), 该方法操作简单、效率高、成本低, 已在大量植物物种中成功应用(Doležel et al, 2007; Pellicer & Leitch, 2020)。为了验证我们的假设, 本研究采用流式细胞术对来自8个红砂种群的16个样本进行了DNA C-值测定。通过分析并比较不同群体的倍性水平以确定北疆支系的杂交物种形成类型, 为深入理解准噶尔盆地植物物种多样性的发生和杂交物种形成机制提供基础数据, 同时也为红砂后续的全基因组测序和组装及其种质资源的保护和利用提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 样品采集

根据前期有关红砂群体遗传学的研究结果(Yin et al, 2015; Shi et al, 2020), 并充分考虑野外采样工作的可操作性, 选择新疆阿克苏(AKS)和策达雅(CDY)作为红砂西部支系的代表样地, 甘肃红古(HG)和宁夏四马营(SMY)作为东部支系的代表样地, 新疆阜康(FK)、沙湾(SW)、火烧山(HSS)和五彩城(WCC)作为北疆支系的代表样地(表1, 图1)。2018年秋在上述每个样地内随机采集20株红砂的种子和叶片, 并保证单株之间至少相距30 m。此外, 我们还在青海德令哈(DLH)采集了五柱红砂(*R. kaschgarica*)的样本用于红砂属内基因组大小比较。采集到的植物样本立即用硅胶干燥, 带回甘肃省寒区旱区逆境生理与生态重点实验室后放入种子低

湿贮存柜中进行长期保存。经DNA条形码(叶绿体 *atpH-atpL* 和 *ndhA* 序列)鉴定技术分析(Yin et al, 2015), 所有样本的物种信息与野外采集时记录的信息一致。由于野生番茄(*Solanum pimpinellifolium*)的DNA C-值(739 Mb; The Tomato Genome Consortium, 2012)接近Wang等(2011)测量的兰州红砂群体的DNA C-值(778 Mb), 因此本研究选用野生番茄作为流式测定的内标物种, 其种子取自中国科学院植物研究所。

1.2 种子萌发

由于红砂叶片非常小(Fan et al, 2020), 并且其幼苗生长缓慢(杨海文和陈文莲, 2012), 因此短时间的培养难以获得足够的幼嫩叶片用于流式测定。一些研究表明根尖也可用于流式测定(Doležel et al, 2007; 于红梅等, 2012; 沈捷等, 2015), 而红砂根系发达(刘家琼等, 1982), 初生根生长迅速, 所以后续实验均选用其幼嫩的根作为试材。

首先, 从每个群体内随机挑选2个单株的种子, 置于-20℃下贮藏一周以削弱种子休眠(石勇等, 2016), 而后在常温下用蒸馏水浸泡18 h, 再用75%酒精浸泡1 min, 蒸馏水冲洗后再用3% NaClO消毒30 s, 经无菌水反复冲洗3次后置于铺有双层滤纸的培养皿中, 并加入适量无菌水使滤纸完全浸湿。之后将培养皿放入25℃的恒温培养箱中, 黑暗条件下进行萌发, 48 h后在16 h/8 h的光周期下继续培养备用。在此期间, 每两天补水一次, 以保持滤纸浸湿。

1.3 流式细胞仪检测

红砂细胞核悬液的制备利用了CyStain UV Precise P试剂盒。具体步骤如下: 收集来自同一母本的幼苗, 剪取其幼嫩的根, 混匀后称取0.2 g; 将

表1 红砂采样群体的基本信息

Table 1 Sample information of *Reaumuria soongarica* populations

简称 Code	地理位置 Location	经纬度 Locality	海拔 Altitude (m)	年均降水量 Mean annual precipitation (mm)	遗传支系 Lineage
HG	甘肃红古 Honggu, Gansu	103.03° E, 36.26° N	1,775	369	东部支系 Eastern
SMY	宁夏四马营 Simaying, Ningxia	106.01° E, 38.50° N	1,175	193	东部支系 Eastern
AKS	新疆阿克苏 Akesu, Xinjiang	79.70° E, 41.57° N	1,491	164	西部支系 Western
CDY	新疆策达雅 Cedaya, Xinjiang	84.86° E, 42.01° N	1,078	80	西部支系 Western
SW	新疆沙湾 Shawan, Xinjiang	85.33° E, 44.32° N	519	150	北疆支系 Northern
FK	新疆阜康 Fukang, Xinjiang	88.13° E, 44.32° N	491	170	北疆支系 Northern
HSS	新疆火烧山 Huoshaoshan, Xinjiang	88.99° E, 44.86° N	478	155	北疆支系 Northern
WCC	新疆五彩城 Wucaicheng, Xinjiang	88.99° E, 45.16° N	773	176	北疆支系 Northern

材料放入加有250 μL 细胞核解离液(nuclei extraction buffer)的培养皿中,用锋利的刀片快速将根切碎,混匀后孵育30–90 s;混合液经孔径50 μm 的滤膜过滤至流式专用管中。在测定细胞核DNA含量之前,向上述细胞核悬液中加入500 μL 染液(495.5 μL Staining Buffer + 3 μL Propidium Iodide (PI, 碘化丙啉) + 1.5 μL RNaseA),并在避光条件下孵育15 min。五柱红砂和番茄细胞核悬液的制备也采用同样的方法。

本实验使用BD (美国)公司的LSRFortessa流式细胞仪对所有样品的细胞核DNA含量进行测定,采用的激发波长为488 nm,收集并分析样本中PI发射的荧光信号。首先,对所有样品的细胞核悬液进行单独检测,确定各自PI荧光强度的大致范围,以优化仪器的电压、阈值等检测参数。之后,将内标物种番茄的细胞核悬液分别与每个待测样品的细胞核悬液等比例混合,混匀后上机检测,每个样品重复检测3次,并使每次检测中低速收集到的细胞个数大于10,000个,变异系数小于5%。最终,红砂样品的检测电压全部为445 V;五柱红砂单独检测的电压为400 V,混合样品的测定电压为430 V。

利用流式细胞术检测植物样本的DNA倍性而非DNA绝对含量时,硅胶干燥的样品也可以得到理想的峰图(Suda & Trávníček, 2006; Wan et al, 2019)。由于红砂分布范围广,对于大多数红砂群体而言,难以在野外对样本进行保鲜处理并带回实验室保存。此外,红砂种子的收集也存在一定难度。红砂不同支系的花期差异显著(Fan et al, 2020);种子一旦成熟,会在其表面密布长柔毛的协助下随风传播(张元明等, 1998)。因此,要想获得更多红砂群体的倍性数据,最简单且经济的办法就是利用野外采集并干燥处理的红砂叶片进行流式测定。为了检测红砂干燥叶片替代新鲜材料用于倍性测定的可行性,本研究还制备了AKS红砂干燥叶片(采种期间收集)的细胞核悬液并上机检测,检测电压为445 V。

1.4 数据分析

使用软件BD FACSDiva 7.0对流式细胞仪检测数据进行分析 and 制图。由于本实验采用已知基因组大小为739 Mb的野生番茄(2x)作为内标,并且PI嵌入细胞核DNA双链中的量与DNA含量成正比,因此待测样品的细胞核DNA含量(2C, 单位为pg)按照以下公式计算(Doležel & Bartoš, 2005):

$$2C = R / L \times 739 \times 2 / 978 \quad (1)$$

其中, R 为待测红砂属植物样本G0/G1期细胞所形成的DNA含量峰(在所有图中标注为P2峰)的荧光强度, L 为内标番茄G0/G1期峰(标注为P1峰)的荧光强度, 1 pg DNA约等于978 Mb (Doležel et al, 2003)。

2 结果

2.1 红砂东、西支系的DNA C-值测定

利用流式细胞仪对红砂幼嫩根样品进行单独检测,发现不同群体的样品都同时检测到G0/G1期和G2/M期细胞的DNA含量峰(图2A, B),峰图清晰,并且这两个峰的变异系数均小于5%,说明红砂样品的解离效果较好,测定结果可靠。通过比对混合液和纯红砂样品在相同设置条件下的检测结果(图2),可见红砂样品与内标番茄的测定峰接近但不重叠,区分度好,表明选用番茄作为内标测定红砂基因组大小合理可行。

流式细胞仪检测到的PI发射荧光强度与所测样品的细胞核DNA含量成正比,因此根据红砂和番茄混合液中P1峰(番茄)和P2峰(红砂)荧光强度的倍数关系(图2C–F),可以计算出红砂样品的细胞核DNA含量。其中,红砂东部支系采样群体HG的DNA 1C-值为 1.143 ± 0.014 pg, SMY的1C-值为 1.156 ± 0.006 pg;西部支系代表群体CDY的DNA 1C-值为 1.170 ± 0.005 pg, AKS的1C-值为 1.219 ± 0.025 pg (表2)。四个红砂群体的DNA 1C-值非常接近,但西部支系各群体的1C-值略大。

2.2 红砂北疆支系的DNA C-值测定

采用内标法对红砂北疆支系不同样本进行流式测定,所得峰图如图3所示。经计算,SW和FK群体的DNA 1C-值与东西支系的1C-值相差不大,分别为 1.185 ± 0.009 pg和 1.172 ± 0.013 pg;而HSS和WCC群体的1C-值接近其余被测红砂群体1C-值的2倍,分别为 2.288 ± 0.015 pg和 2.316 ± 0.023 pg (表2)。以上结果表明,HSS和WCC群体的染色体数目已加倍。

2.3 红砂干燥叶片进行流式测定的可行性

在AKS红砂干燥叶片单独进行流式测定的结果中,虽然能检测到明显的G0/G1期峰,但峰图的变异系数大于10% (图4A)。不同于AKS新鲜幼嫩组织的峰图,当干燥叶片与内标番茄一同上机检测时,红砂叶片样品的G0/G1期峰与番茄的G2/M期峰重

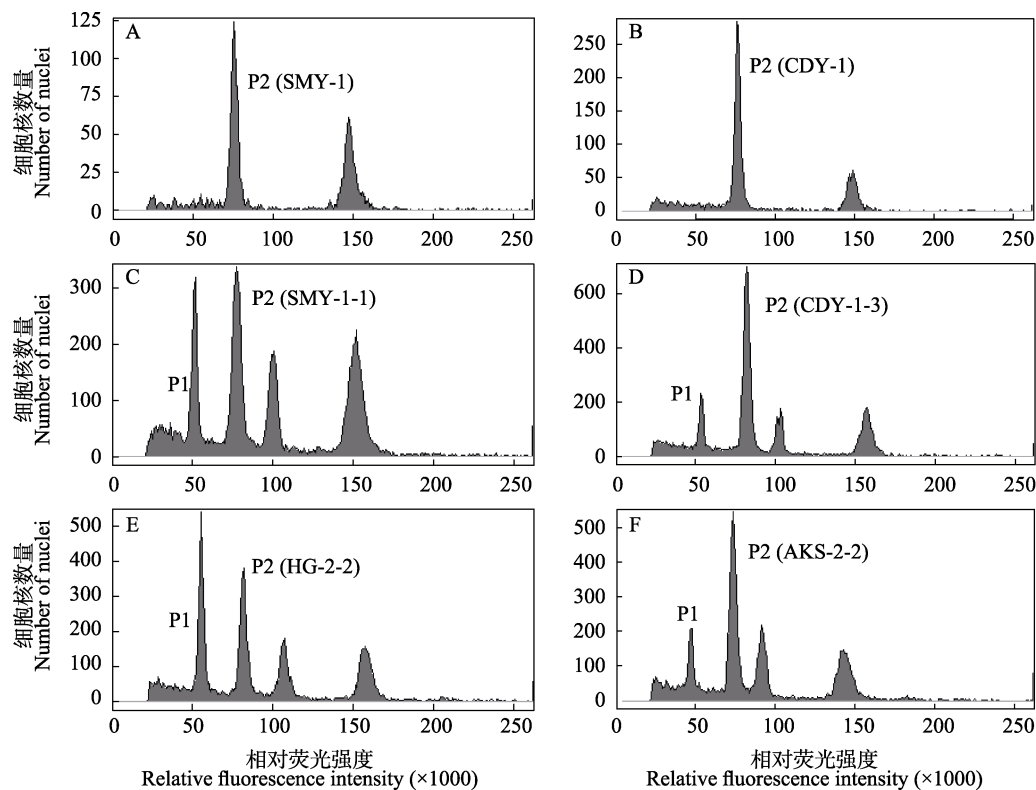


图2 红砂东西支系的流式测定结果。A, B: SMY和CDY群体的样品分别单独上机检测; C-F: 每个红砂群体与内标番茄的混合样品的检测结果, 包括SMY、CDY、HG和AKS群体。P1代表番茄的G0/G1峰, P2代表红砂的G0/G1峰。群体代号见表1。
Fig. 2 Test results of different populations of the eastern and western lineages of *Reaumuria soongarica* using flow cytometry. A, B, The samples of SMY and CDY populations were measured without the internal standard; C-F, the mixed samples of *Solanum pimpinellifolium* and each *Reaumuria soongarica* population were tested, including SMY, CDY, HG, and AKS populations. P1 represents the nuclear DNA content of *S. pimpinellifolium* in G0/G1 phase, and P2 represents that of *R. soongarica* samples in G0/G1 phase. The population codes see Table 1.

表2 红砂属植物样品的流式细胞仪测定结果(平均值 ± 标准差)

Table 2 Measurement results of *Reaumuria* samples using flow cytometry (Mean ± SD)

支系 Lineage	群体 Population	红砂属样品G0/G1峰值 Peak values of <i>Reaumuria</i> (G0/G1)	内标番茄G0/G1峰值 Peak values of <i>Solanum</i> <i>pimpinellifolium</i> (G0/G1)	DNA 1C-值 DNA 1C-values (pg)	倍性 Ploidy	一倍体基因组大小 Monoploid genome size (Mb)
西部支系 Western lineage of <i>R. soongarica</i>	AKS	74,192.667 ± 1,381.685	45,988.667 ± 1,264.577	1.219 ± 0.025	2n = 2x	1,192.639 ± 24.701
	CDY	76,255.167 ± 2,643.503	49,239.500 ± 1,725.806	1.170 ± 0.005	2n = 2x	1,144.481 ± 4.816
	平均值 Average	—	—	1.195 ± 0.031	2n = 2x	1,168.560 ± 30.338
东部支系 Eastern lineage of <i>R. soongarica</i>	HG	75,210.667 ± 7,241.285	49,762.333 ± 5,100.729	1.143 ± 0.014	2n = 2x	1,117.586 ± 13.338
	SMY	74,570.500 ± 2,960.292	48,737.333 ± 1,845.872	1.156 ± 0.006	2n = 2x	1,130.655 ± 5.787
	平均值 Average	—	—	1.149 ± 0.012	2n = 2x	1,124.120 ± 11.944
北疆支系 Northern lineage of <i>R. soongarica</i>	SW	77,156.167 ± 3,492.550	49,210.000 ± 1,972.505	1.185 ± 0.009	2n = 2x	1,158.498 ± 9.009
	FK	68,354.000 ± 4,150.933	44,074.167 ± 2,919.187	1.172 ± 0.013	2n = 2x	1,146.490 ± 12.237
	HSS	141,698.000 ± 8,912.053	46,786.333 ± 2,805.389	2.288 ± 0.015	2n = 4x	1,118.938 ± 7.437
	WCC	144,188.167 ± 5,140.113	47,052.500 ± 1,598.277	2.316 ± 0.023	2n = 4x	1,132.291 ± 11.403
五柱红砂 <i>R. kaschgarica</i>	DLH	200,628.333 ± 1,704.432	38,574.000 ± 351.629	3.930 ± 0.006	—	—
红砂干燥叶片 Dehydrated leaves of <i>R. soongarica</i>	AKS	72,426.000 ± 2,382.788	43,371.000 ± 1,417.229	1.262 ± 0.014	2n = 2x	1,234.122 ± 14.060

一倍体基因组大小对应DNA Cx值; 除标注采用干燥叶片的AKS群体以外, 其余群体均采用幼嫩的根为材料。群体简称同表1。
The monoploid genome size corresponds to the DNA Cx-value. Except for the AKS population labeled with dry leaves, the experimental material of all the other populations was young roots. The codes of the populations are the same as Table 1.

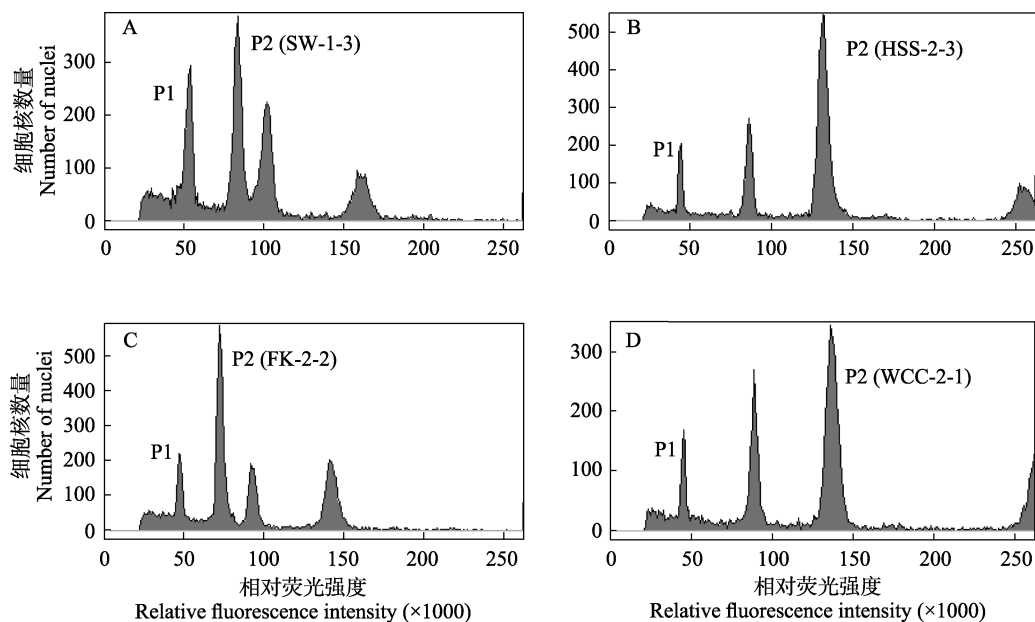


图3 番茄和不同北疆红砂群体混合样品的流式测定结果。(A) SW群体; (B) HSS群体; (C) FK群体; (D) WCC群体。P1代表番茄的G0/G1峰, P2代表红砂的G0/G1峰。

Fig. 3 Test results of the mixed sample of *Solanum pimpinellifolium* and different populations of the northern lineage of *Reaumuria soongarica* using flow cytometry. The populations of the northern lineage include SW (A), HSS (B), FK (C), and WCC (D). P1 represents the nuclear DNA content of *S. pimpinellifolium* in G0/G1 phase, and P2 represents that of *R. soongarica* samples in G0/G1 phase.

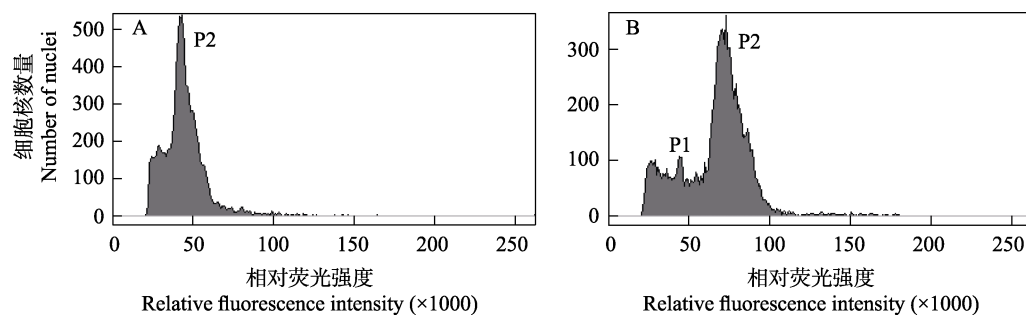


图4 红砂AKS群体干燥叶片样品的DNA含量直方图。(A)单独的红砂叶片样品; (B)红砂叶片(P2, G0/G1)和内标番茄(P1, G0/G1)的混合样品。

Fig. 4 Histograms of the nuclear DNA content of *Reaumuria soongarica* dry leaves (the AKS population). (A) *R. soongarica* sample alone; (B) the mixed sample of *R. soongarica* (P2, G0/G1) and *Solanum pimpinellifolium* (P1, G0/G1).

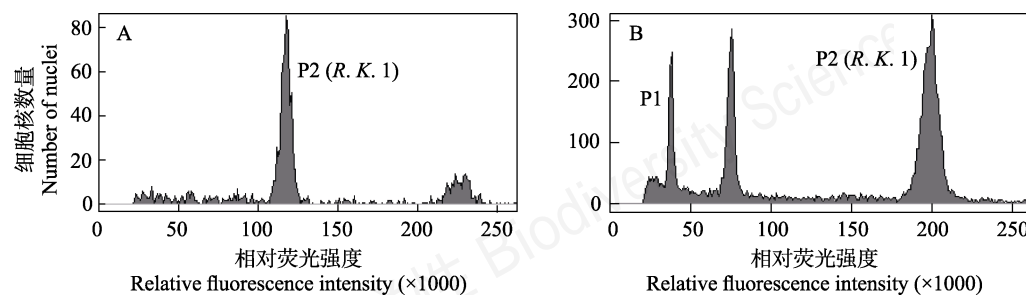


图5 五柱红砂样品的DNA含量直方图。(A)单独的五柱红砂样品(R. K. 1); (B)五柱红砂(P2, G0/G1)和内标番茄(P1, G0/G1)混合样品。

Fig. 5 Histograms of the nuclear DNA content of *Reaumuria kaschgarica*. (A) The pure sample of *R. kaschgarica*; (B) the mixed sample of *R. kaschgarica* (P2, G0/G1) and *Solanum pimpinellifolium* (P1, G0/G1).

叠在一起,二者不易区分,并且番茄的G0/G1期峰不明显(图4B),说明干燥叶片样本的细胞核悬液中DNA碎片或者杂质较多从而影响了信号峰的形成。虽然干燥叶片峰图的稳定性和准确性还需进一步提升,但是利用干燥叶片测定得到AKS红砂的DNA 1C-值(1.262 ± 0.014 pg)接近其新鲜样本的1C-值(1.219 ± 0.025 pg),该结果可以准确判断样本的倍性。可见利用红砂干燥叶片检测不同群体的倍性合理可行,但采样时最好收集嫩叶。

2.4 五柱红砂DNA C-值的测定结果

内标番茄的峰图与五柱红砂的峰图不重叠,主峰明显,并且峰图的变异系数均小于5% (图5),表明番茄可以作为内标用于测定五柱红砂的DNA C-值。根据P1峰和P2峰荧光强度的倍数关系,计算得到五柱红砂的DNA 1C-值为 3.930 ± 0.006 pg,远大于红砂的1C-值(表2)。

3 讨论

3.1 红砂与怪柳科植物DNA C-值比较

在一些物种中,不同群体的DNA C-值存在一定程度的差异,这种差异主要由重复序列(如转座子)拷贝数的不同引起的,可能是响应或适应不同环境的结果(Smarda & Bures, 2010; 郭水良等, 2011; Hidalgo et al, 2015; Čertnerová & Škaloud, 2020)。本研究测定的二倍体红砂的DNA 1C-值为1.143–1.219 pg,其中在发生明显遗传分化的东西支系之间存在4%左右的差异。这些差异可能与两个支系基因组对异质环境的局域适应性有关,同时也说明DNA 1C-值在不同红砂群体(二倍体)之间的变异程度较低。

然而,本研究测定的红砂DNA C-值与Wang等(2011)报道的数据相差较大。Wang等(2011)以红砂嫩叶为材料,选取水稻作为内标,通过流式细胞术测得采集自兰州的二倍体红砂样本的DNA 1C-值为0.796 pg (1 pg = 978 Mb),约为本研究结果的65%–70%。这两项研究相比,对测定结果有重要影响的细胞核解离液、植物材料和内标物种(汪艳等, 2015)都不同。由于不同植物组织的结构和内含物不同,当选用的解离液与植物材料不匹配时,会使细胞核悬液中存在较多碎片和杂质,从而影响流式测定结果的准确性(Doležal et al, 2007; 邹璇等, 2020)。本研究以幼嫩的根为材料,所得流式峰图清晰且主峰的变异系数均小于5%,该结果与Wang等

(2011)给出的峰图效果一致,表明两项研究中红砂幼嫩的叶片和根均有良好的裂解效果。此外,无论以番茄还是水稻作为内标,内标峰与红砂样品的DNA含量峰均不重叠,表明内标未影响到红砂DNA含量峰的形成。造成这两项研究的测定结果存在较大差异的原因可能有两点:(1)在Wang等(2011)测定的流式峰图中,红砂样品峰值对应的细胞核数量不足20个,远小于其他研究中的数量(Doležal et al, 2007; 林峰等, 2018; 邹璇等, 2020),细胞核较少可能会影响统计结果的准确性;(2)Wang等(2011)以水稻为内标,基因组更小(389 Mb),在估计远大于内参基因组的物种时,结果的误差更大。以Wang等(2011)的估计来看,如果红砂基因组大小接近水稻的两倍,就应当与本研究选取的番茄基因组大小相近(739 Mb);但是我们估计的多个群体的基因组都显著大于739 Mb,因此我们对红砂基因组大小的估计更为客观。当然,红砂DNA C-值的最终确定还需要选取与其更加相近的物种进一步验证。

DNA C-值在被子植物种间差异极大,最高可达2,400倍,分析这些差异对于理解植物的生态适应性、生长策略、群落组成和物种进化等具有重要意义(Guignard et al, 2016; Pellicer et al, 2018; Guignard et al, 2019; Qiu et al, 2019)。例如,Qiu等(2019)发现在向日葵属内,一年生二倍体物种具有更小的基因组和更快的进化速率,其基因组大小的演化可能与生长季节的长短有关。本文研究的红砂隶属于怪柳科,该科植物起源于特提斯海沿岸地区,目前间断分布于亚洲、欧洲和北非的草原和荒漠地区,对于研究荒漠植物的演化及耐盐、耐旱机理具有重要价值(张道远等, 2003; Zhang et al, 2014a, b)。然而,植物DNA C-值数据库(Pellicer & Leitch, 2020)中仅收录了3个怪柳科物种的信息,分别为*Tamarix canariensis* (DNA 1C-值为1.53 pg) (Garcia et al, 2010)、*T. tetrandra* (1.55 pg) (Zonneveld et al, 2005)和*T. africana* (1.65 pg) (Loureiro et al, 2007),这些1C-值约是二倍体红砂的1.3倍,远小于五柱红砂的1C-值。相较于怪柳科已知的约100种植物,该科物种DNA C-值的研究非常少,并且其基因组学研究也严重滞后。因此,测定更多怪柳科物种的DNA C-值十分必要,这将有助于加快对该科植物系统发育关系、抗旱机理和基因组学等方面的研究。

3.2 北疆红砂的复杂起源

同倍体和异源多倍化杂交物种形成的过程和条件明显不同(Mallet, 2007; 王玉国, 2017), 因此鉴定杂交物种与其亲本的倍性是深入解析杂交物种形成机制的必要前提。Shi等(2020)利用9个随机核基因片段模拟了红砂的群体动态历史, 结果表明北疆支系起源于两次杂交事件: 在古尔班通古特沙漠区域, 东西支系第一次杂交产生了ghost群体(统计分析推断出的未获得真实数据的群体), ghost群体再与东部支系杂交产生北疆红砂, 目前北疆支系处于物种形成的早期阶段。通过核型分析, Shi等(2020)发现来自北疆FK群体及东西支系的共3个个体都是二倍体; 虽然STRUCTURE分析结果显示HSS群体的遗传组分不同于FK等其他3个北疆群体, 但在分析群体动态历史时, Shi等将北疆支系当做一个整体, 并基于核型数据推测北疆支系都是二倍体且没有在杂交过程中发生染色体加倍。本研究中, 流式测定结果显示北疆支系中的FK (1.172 ± 0.013 pg)和SW群体(1.185 ± 0.009 pg)的DNA 1C-值介于东部支系(1.149 ± 0.012 pg)和西部支系(1.195 ± 0.031 pg) 1C-值之间, 而HSS和WCC群体的DNA 1C-值约等于东西支系1C-值的2倍。结合多个叶绿体基因片段(cpDNA)和核基因的遗传信息(Yin et al, 2015; Shi et al, 2020), 我们推测FK和SW群体属于同倍体杂交种群, 其倍性与东西支系相同, 都为二倍体; 而HSS和WCC群体属于异源四倍体杂交种群。此外, HSS群体的母本为西部支系, 但是FK和SW群体的母本为东部支系(Yin et al, 2015), 说明HSS群体并不是同倍体杂交种群(FK和SW)通过染色体加倍形成的。

综上所述, 本研究支持北疆红砂起源于多次杂交事件, 但该区域内不同倍性群体不属于单系类群。Fan等(未发表数据)基于简化基因组测序数据对红砂的群体遗传结构和种群动态历史进行了全面分析, 发现北疆红砂进一步分成两组, 其中一组(命名为GuD-S)的代表群体是FK和SW群体, 另一组(GuD-N)的代表群体正是HSS和WCC群体; 最优进化模型显示, 东西支系第一次杂交产生了GuD-S组(也就是Shi等研究中未找到的ghost群体), GuD-S组与东部支系进一步杂交产生GuD-N组。Shi等(2020)调查的北疆群体较少且集中于北疆的东南缘, 在分析种群动态历史时未考虑北疆支系内部的分化, 这

应该是该研究得到的物种进化模型中存在ghost群体的主要原因。然而, 在GuD-N组中, 只有HSS和WCC群体的cpDNA单倍型来自西部支系(Fan et al, 未发表数据), 因此GuD-N真实的演化过程可能比模型显示的更加复杂。HSS和WCC群体的多倍化起源可能与其所处的环境更加恶劣有关: 该地区为砾石戈壁区, 附近有大型露天煤矿, 并且几乎无地表水流(侯艳军, 2015)。倍性差异会使四倍体种群与二倍体种群之间产生较强的生殖隔离(Mallet, 2007), 这是导致北疆红砂群体在无明显地理隔离的情况下仍然保持各自遗传特性的原因之一。两个物种可以通过多次自然杂交事件形成一个或多个新的同倍体杂交物种, 这已在少数植物物种形成研究中得到证实, 如向日葵属(Rieseberg, 1991; Schwarzbach & Rieseberg, 2002)和高山松(Ma et al, 2006)等; 但是在相同或者相邻区域内, 两个亲本分别杂交形成同倍体杂交物种和异源多倍化杂交物种的案例较为罕见。因此, 北疆红砂的复杂起源为研究同倍体杂交物种形成机制提供了新的模型, 可以通过比较两类杂交物种形成方式之间的异同进而揭示物种形成的遗传基础, 如适应性性状的产生与维持、自然选择与生殖隔离的关系等。为了更准确地利用这一材料, 下一步拟全面调查北疆红砂群体的倍性。

3.3 红砂不同支系的分类地位

红砂的分类地位曾经存在极大争议, 有些学者认为红砂应单独成属(琵琶柴属, *Hololachna*) (Gaskin et al, 2004); 而有些学者将琵琶柴属处理为红砂属的亚属, 红砂是该亚属的唯一物种(郝晓莉等, 2014); 还有一些学者认为红砂在分类系统上并不特殊, 只是红砂属内的一个物种(Zhang et al, 2014a)。大多数有关红砂分类学的研究都是以植物标本的形态性状差异为分类依据, 而几乎没有统计群体水平的性状差异(尤其是数量性状), 因此参考的分类依据可能受到采集样品偏差的影响, 存在不确定性; 而Zhang等(2014a)根据18个红砂属物种(共21种)的ITS和3个cpDNA片段的遗传信息构建了所含红砂属物种最全的系统发育树, 其中红砂、五柱红砂和*R. fruticosa*聚为一支, 证明红砂不应归于单独的亚属。


通过多个cpDNA片段和低拷贝核基因序列变异分析, 红砂还应归于一个独立的分类群, 但是种内不同群体可显著分为东部支系、西部支系和北疆

支系(Yin et al, 2015; Shi et al, 2020), 民丰群体并未单独分化出来, 所以不建议将民丰红砂作为变种或种处理(崔大方等, 1999, 2000)。红砂的东西支系分布于不同的地理区域, cpDNA和核基因片段均支持它们各为单系类群; 北疆群体不仅占据了一个新的地理分布区和生态位, 而且在遗传组分上与其亲本存在明显的差异。Fan等(2020)发现东西支系的花期几乎不重叠, 北疆群体的花期物候处于亲本的花期之间, 表明三者之间已经出现了一定程度的合子前生殖隔离; 北疆群体中与生产力相关的叶长和叶宽更是显著大于亲本支系, 尤其是WCC群体具有最长的叶片。结合本文红砂群体间的基因组大小和倍性变化, 显然按照3个支系处理红砂不合理, 不利于对不同地区红砂抗旱机制等方面的进一步研究。

目前, 业界越来越认可“整合物种概念”, 这个概念强调物种的界定和分类应该考虑物种分化的多个方面: 稳定的形态学差异、可靠的分子证据、明显的生态位分化和一定程度的生殖隔离等; 由于物种始终处于分化路上, 处于分化早期阶段的物种之间可能只存在上述一两种区分特征, 而处于分化后期的物种则能表现出更多的特征(刘建全, 2016; 莫日根高娃等, 2019)。基于上述讨论, 我们认为红砂东西支系和北疆不同倍性杂交种群的分化和杂交历史清晰, 分布区及生态位相互不重叠, 叶片表型和花期物候也存在显著分化, 不同支系均符合“整合物种概念”的多个要素。虽然目前对红砂不同支系形态学上的描述和比较还很欠缺, 人工杂交实验和后代育性检测还未完成, 北疆两个杂种的分布区未全面调查, 但已有的证据表明这些支系可能是处于分化早中期阶段的年轻物种, 而不是难以区分的种复合体。因此本文建议将红砂不同地理种群按照4个物种处理: (1)主要分布于河西走廊、柴达木盆地、蒙古高原、阿拉善高原和噶顺戈壁的红砂东部支系为一个种; (2)分布于塔里木盆地的西部支系为一个种; (3)分布于天山以北准噶尔盆地南缘的红砂种群为二倍体杂交种; (4)分布于准噶尔盆地东部的红砂种群为异源四倍体杂交种。

ORCID

范兴科  <https://orcid.org/0000-0002-5986-1273>

马小飞  <https://orcid.org/0000-0002-9427-674X>

参考文献

- Abbott R, Albach D, Ansell S, Arntzen JW, Baird SJE, Bierne N, Boughman J, Brelsford A, Buerkle CA, Buggs R, Butlin RK, Dieckmann U, Eroukmanoff F, Grill A, Cahan SH, Hermansen JS, Hewitt G, Hudson AG, Jiggins C, Jones J, Keller B, Marczewski T, Mallet J, Martinez-Rodriguez P, Möst M, Mullen S, Nichols R, Nolte AW, Parisod C, Pfennig K, Rice AM, Ritchie MG, Seifert B, Smadja CM, Stelkens R, Szymura JM, Väinölä R, Wolf JBW, Zinner D (2013) Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, 26, 229–246.
- Barton NH (2001) The role of hybridization in evolution. *Molecular Ecology*, 10, 551–568.
- Buerkle CA, Morris RJ, Asmussen MA, Rieseberg LH (2000) The likelihood of homoploid hybrid speciation. *Heredity*, 84, 441–451.
- Čertnerová D, Škaloud P (2020) Substantial intraspecific genome size variation in golden-brown algae and its phenotypic consequences. *Annals of Botany*, 126, 1077–1087.
- Cui DF, Liao WB, Zhang B (2000) Determination of flavonoid compounds of *Reaumuria* L. (Tamaricaceae) and their taxonomical significance. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 20, 283–287. (in Chinese with English abstract) [崔大方, 廖文波, 张冰 (2000) 琵琶柴属植物黄酮类化合物的测定及分类学意义. *西北植物学报*, 20, 283–287.]
- Cui DF, Zhong MJ (1999) A new species of *Reaumuria* L. from Xinjiang. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 19, 552–554. (in Chinese) [崔大方, 仲铭锦 (1999) 新疆琵琶柴属一新种. *西北植物学报*, 19, 552–554.]
- Doležel J, Bartoš J (2005) Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, 95, 99–110.
- Doležel J, Bartoš J, Voglmayr H, Greilhuber J (2003) Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry Part A*, 51A, 127–128.
- Doležel J, Greilhuber J, Suda J (2007) Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols*, 2, 2233–2244.
- Fan XK, Yan X, Qian CJ, Bachir DG, Yin XY, Sun PP, Ma XF (2020) Leaf size variations in a dominant desert shrub, *Reaumuria soongarica*, adapted to heterogeneous environments. *Ecology and Evolution*, 10, 10076–10094.
- Garcia S, Garnatje T, Hidalgo O, de Xaxars GM, Pellicer J, Sánchez-Jiménez I, Viales D, Vallès J (2010) First genome size estimations for some eudicot families and genera. *Collectanea Botanica*, 29, 7–16.
- Gaskin JF, Ghahremani-nejad F, Zhang DY, Londo JP (2004) A systematic overview of Frankeniaceae and Tamaricaceae from nuclear rDNA and plastid sequence data. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 91, 401–409.
- Greilhuber J, Doležel J, Lysák MA, Bennett MD (2005) The

origin, evolution and proposed stabilization of the terms ‘genome size’ and ‘C-value’ to describe nuclear DNA contents. *Annals of Botany*, 95, 255–260.

- Gross BL, Rieseberg LH (2005) The ecological genetics of homoploid hybrid speciation. *Journal of Heredity*, 96, 241–252.
- Guignard MS, Crawley MJ, Kovalenko D, Nichols RA, Trimmer M, Leitch AR, Leitch IJ (2019) Interactions between plant genome size, nutrients and herbivory by rabbits, molluscs and insects on a temperate grassland. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286, 20182619.
- Guignard MS, Nichols RA, Knell RJ, Macdonald A, Romila CA, Trimmer M, Leitch IJ, Leitch AR (2016) Genome size and ploidy influence angiosperm species’ biomass under nitrogen and phosphorus limitation. *New Phytologist*, 210, 1195–1206.
- Guo SL, Zhou P, Yin LP, Lou YX (2011) Interspecific and intraspecific variations of plant DNA C-values and its biological significance. *Journal of Shanghai Normal University (Natural Sciences)*, 40, 102–110. (in Chinese with English abstract) [郭水良, 周平, 印丽萍, 娄玉霞 (2011) 植物DNA C-值在种间和种内的变异及其生物学意义. 上海师范大学学报(自然科学版), 40, 102–110.]
- Hao XL, Zhang ML, Wang SM, Zhang X (2014) Classification and distribution of the genus *Reaumuria* L. in Tamaricaceae. *Arid Zone Research*, 31, 838–843. (in Chinese with English abstract) [郝晓莉, 张明理, 王绍明, 张霞 (2014) 柽柳科红砂属(*Reaumuria* L.)的分类与分布. 干旱区研究, 31, 838–843.]
- Hidalgo O, Vallès J, Romo A, Canela MÁ, Garnatje T (2015) Genome size variation in gymnosperms under different growth conditions. *Caryologia*, 68, 92–96.
- Hou YJ (2015) Study on the Transport Processes and Ecological Effect of Heavy Metals in Dust-soil-plant in the East Junggar Region. PhD dissertation, Xinjiang University, Urumqi. (in Chinese with English abstract) [侯艳军 (2015) 准东地区降尘-土壤-植物重金属迁移过程及生态效应研究. 博士学位论文, 新疆大学, 乌鲁木齐.]
- Husband BC (2000) Constraints on polyploid evolution: A test of the minority cytotype exclusion principle. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 267, 217–223.
- Li ZH, Chen J, Zhao GF, Guo YP, Kou YX, Ma YZ, Wang G, Ma XF (2012) Response of a desert shrub to past geological and climatic change: A phylogeographic study of *Reaumuria soongarica* (Tamaricaceae) in western China. *Journal of Systematics and Evolution*, 50, 351–361.
- Lin F, Xiao YE, Zhou XY, Tang Y, Gao BH (2018) Estimation of genomic C value of 25 samples of *Iris* plants by flow cytometry. *Acta Agrestia Sinica*, 26, 985–990. (in Chinese with English abstract) [林峰, 肖月娥, 周翔宇, 唐颖, 高步红 (2018) 25份鸢尾属植物基因组DNA C值的流式测定. 草地学报, 26, 985–990.]
- Liu JQ (2016) “The integrative species concept” and “species on the speciation way”. *Biodiversity Science*, 24, 1004–1008. (in Chinese with English abstract) [刘建全 (2016) “整合物种概念”和“分化路上的物种”. 生物多样性, 24, 1004–1008.]
- Liu JQ, Qiu MX, Pu JC, Lu ZM (1982) The typical extreme xerophyte *Reaumuria soongorica* in the desert of China. *Acta Botanica Sinica*, 24, 485–488. (in Chinese) [刘家琼, 邱明新, 蒲锦春, 鲁作民 (1982) 我国荒漠典型超旱生植物—红砂. 植物学报, 24, 485–488.]
- Liu YX (1995) A study on origin and formation of the Chinese desert floras. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 33, 131–143. (in Chinese with English abstract) [刘嫄心 (1995) 试论我国沙漠地区植物区系的发生与形成. 植物分类学报, 33, 131–143.]
- Loureiro J, Rodriguez E, Doležal J, Santos C (2007) Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: A test with 37 species. *Annals of Botany*, 100, 875–888.
- Loureiro J, Trávníček P, Rauchová J, Urfus T, Vít P, Štech M, Castro S, Suda J (2010) The use of flow cytometry in the biosystematics, ecology and population biology of homoploid plants. *Preslia*, 82, 3–21.
- Ma JY, Chen T, Qiang WY, Wang G (2005) Correlations between foliar stable carbon isotope composition and environmental factors in desert plant *Reaumuria soongorica* (Pall.) Maxim. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47, 1065–1073.
- Ma XF, Szmidt AE, Wang XR (2006) Genetic structure and evolutionary history of a diploid hybrid pine *Pinus densata* inferred from the nucleotide variation at seven gene loci. *Molecular Biology and Evolution*, 23, 807–816.
- Mahelka V, Suda J, Jarolímová V, Trávníček P, Krahulec F (2005) Genome size discriminates between closely related taxa *Elytrigia repens* and *E. intermedia* (Poaceae: Triticeae) and their hybrid. *Folia Geobotanica*, 40, 367–384.
- Mallet J (2005) Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology & Evolution*, 20, 229–237.
- Mallet J (2007) Hybrid speciation. *Nature*, 446, 279–283.
- Morigengaowa, Shang H, Liu BD, Kang M, Yan YH (2019) One or more species? GBS sequencing and morphological traits evidence reveal species diversification of *Sphaeropteris brunoniana* in China. *Biodiversity Science*, 27, 1196–1204. (in Chinese with English abstract) [莫日根高娃, 商辉, 刘保东, 康明, 严岳鸿 (2019) 一个种还是多个种? 简化基因组及其形态学证据揭示中国白桫欏植物的物种多样性分化. 生物多样性, 27, 1196–1204.]
- Pellicer J, Hidalgo O, Dodsworth S, Leitch IJ (2018) Genome size diversity and its impact on the evolution of land plants. *Genes*, 9, 88.
- Pellicer J, Leitch IJ (2020) The Plant DNA C-values database (release 7.1): An updated online repository of plant genome size data for comparative studies. *New Phytologist*, 226, 301–305.

- Qian ZQ, Xu L, Wang YL, Yang J, Zhao GF (2008) Ecological genetics of *Reaumuria soongorica* (Pall.) Maxim. population in the oasis-desert ecotone in Fukang, Xinjiang, and its implications for molecular evolution. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36, 593–601.
- Qiu F, Baack EJ, Whitney KD, Bock DG, Tetreault HM, Rieseberg LH, Ungerer MC (2019) Phylogenetic trends and environmental correlates of nuclear genome size variation in *Helianthus* sunflowers. *New Phytologist*, 221, 1609–1618.
- Rieseberg LH (1991) Homoploid reticulate evolution in *Helianthus* (Asteraceae): Evidence from ribosomal genes. *American Journal of Botany*, 78, 1218–1237.
- Rieseberg LH, Raymond O, Rosenthal DM, Lai Z, Livingstone K, Nakazato T, Durphy JL, Schwarzbach AE, Donovan LA, Lexer C (2003) Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. *Science*, 301, 1211–1216.
- Samadi N, Ghaffari SM, Akhani H (2013) Meiotic behaviour, karyotype analyses and pollen viability in species of *Tamarix* (Tamaricaceae). *Willdenowia*, 43, 195–203.
- Schwarzbach AE, Rieseberg LH (2002) Likely multiple origins of a diploid hybrid sunflower species. *Molecular Ecology*, 11, 1703–1715.
- Shen J, Xu J, Liu GX, Shi JS (2015) Effects of different isolation buffers on DNA resolution in nucleus suspension of root tip cell of *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook. *Molecular Plant Breeding*, 13, 190–196. (in Chinese with English abstract) [沈捷, 徐进, 刘光欣, 施季森 (2015) 不同分离缓冲液对杉木根尖细胞核悬液DNA分辨率的影响. *分子植物育种*, 13, 190–196.]
- Shi Y, Liu Y, Yin HX, Yan X, Ma XF (2016) Seed germination characteristics and local adaptation of *Reaumuria soongarica*. *Journal of Desert Research*, 36, 644–650. (in Chinese with English abstract) [石勇, 刘源, 殷恒霞, 燕霞, 马小飞 (2016) 红砂(*Reaumuria soongarica*)种子萌发特性及其局部适应性. *中国沙漠*, 36, 644–650.]
- Shi Y, Yan X, Yin HX, Qian CJ, Fan XK, Yin XY, Chang YX, Zhang CJ, Ma XF (2020) Divergence and hybridization in the desert plant *Reaumuria soongarica*. *Journal of Systematics and Evolution*, 58, 159–173.
- Shi Y, Yan X, Zhao PS, Yin HX, Zhao X, Xiao HL, Li XR, Chen GX, Ma XF (2013) Transcriptomic analysis of a tertiary relict plant, extreme xerophyte *Reaumuria soongorica* to identify genes related to drought adaptation. *PLoS ONE*, 8, e63993.
- Smarda P, Bures P (2010) Understanding intraspecific variation in genome size in plants. *Preslia*, 82, 41–61.
- Soltis DE, Soltis PS, Tate JA (2004) Advances in the study of polyploidy since plant speciation. *New Phytologist*, 161, 173–191.
- Suda J, Trávníček P (2006) Reliable DNA ploidy determination in dehydrated tissues of vascular plants by DAPI flow cytometry—New prospects for plant research. *Cytometry Part A*, 69A, 273–280.
- Sun YS, Lu ZQ, Zhu XF, Ma H (2020) Genomic basis of homoploid hybrid speciation within chestnut trees. *Nature Communications*, 11, 3375.
- Taylor SA, Larson EL (2019) Insights from genomes into the evolutionary importance and prevalence of hybridization in nature. *Nature Ecology & Evolution*, 3, 170–177.
- The Tomato Genome Consortium (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485, 635–641.
- Urfusová R, Mahelka V, Krahulec F, Urfus T (2021) Evidence of widespread hybridization among couch grasses (*Elymus*, Poaceae). *Journal of Systematics and Evolution*, 59, 113–124.
- Van de Peer Y, Ashman TL, Soltis PS, Soltis DE (2021) Polyploidy: An evolutionary and ecological force in stressful times. *The Plant Cell*, 33, 11–26.
- Wan JZ, Chen LX, Gao S, Song YB, Tang SL, Yu FH, Li JM, Dong M (2019) Ecological niche shift between diploid and tetraploid plants of *Fragaria* (Rosaceae) in China. *South African Journal of Botany*, 121, 68–75.
- Wang XH, Zhang T, Wen ZN, Xiao HL, Yang ZJ, Chen GX, Zhao X (2011) The chromosome number, karyotype and genome size of the desert plant diploid *Reaumuria soongorica* (Pall.) Maxim. *Plant Cell Reports*, 30, 955–964.
- Wang Y, Xiao Y, Liu W, Li TT, Hu R, Qiao ZX (2015) Operation skills of flow cytometer for detecting nuclear DNA contents in higher plant cells. *Plant Science Journal*, 33, 126–131. (in Chinese with English abstract) [汪艳, 肖媛, 刘伟, 李婷婷, 胡锐, 乔志仙 (2015) 流式细胞仪检测高等植物细胞核DNA含量的方法. *植物科学学报*, 33, 126–131.]
- Wang YG (2017) Natural hybridization and speciation. *Biodiversity Science*, 25, 565–576. (in Chinese with English abstract) [王玉国 (2017) 自然杂交与物种形成. *生物多样性*, 25, 565–576.]
- Wang ZF, Jiang YZ, Bi H, Lu ZQ, Ma YZ, Yang XY, Chen NN, Tian B, Liu BB, Mao XX, Ma T, DiFazio SP, Hu QJ, Abbott RJ, Liu JQ (2021) Hybrid speciation via inheritance of alternate alleles of parental isolating genes. *Molecular Plant*, 14, 208–222.
- Yakimowski SB, Rieseberg LH (2014) The role of homoploid hybridization in evolution: A century of studies synthesizing genetics and ecology. *American Journal of Botany*, 101, 1247–1258.
- Yang HW, Chen WL (2012) The effects of different growth regulators on the *Reaumuria soongorica* (Pall.) Maxim seedling emergence and growth. *Journal of Fujian Forestry Science and Technology*, 39, 71–73. (in Chinese with English abstract) [杨海文, 陈文莲 (2012) 植物生长调节剂对红砂出苗及苗期生长的影响. *福建林业科技*, 39, 71–73.]
- Yang JY, Cushman SA, Song XM, Yang J, Zhang PJ (2015)

Genetic diversity and drivers of genetic differentiation of *Reaumuria soongorica* of the Inner Mongolia Plateau in China. *Plant Ecology*, 216, 925–937.

Yin HX, Yan X, Shi Y, Qian CJ, Li ZH, Zhang W, Wang LR, Li Y, Li XZ, Chen GX, Li XR, Nevo E, Ma XF (2015) The role of East Asian monsoon system in shaping population divergence and dynamics of a constructive desert shrub *Reaumuria soongorica*. *Scientific Reports*, 5, 15823.

Yu HM, Wang J, Zhao MZ, Meng XF (2012) Optimization of strawberry ploidy identification method using flow cytometry. *Journal of Southern Agriculture*, 43, 1530–1533. (in Chinese with English abstract) [于红梅, 王静, 赵密珍, 孟宪凤 (2012) 利用流式细胞仪检测草莓倍性方法的优化. *南方农业学报*, 43, 1530–1533.]

Zhang DY, Pan BR, Yin LK (2003) The photogeographical studies of *Tamarix* (Tamaricaceae). *Acta Botanica Yunnanica*, 25, 415–427. (in Chinese with English abstract) [张道远, 潘伯荣, 尹林克 (2003) 柽柳科柽柳属的植物地理研究. *云南植物研究*, 25, 415–427.]

Zhang LY, Chen CD (2002) On the general characteristics of plant diversity of Gurbantunggut sandy desert. *Acta Ecologica Sinica*, 22, 1923–1932. (in Chinese with English abstract) [张立运, 陈昌笃 (2002) 论古尔班通古特沙漠植物多样性的一般特点. *生态学报*, 22, 1923–1932.]

Zhang ML, Hao XL, Sanderson SC, Vyacheslav BV, Sukhorukov AP, Zhang X (2014a) Spatiotemporal evolution of *Reaumuria* (Tamaricaceae) in Central Asia: Insights from molecular biogeography. *Phytotaxa*, 167, 89–103.

Zhang ML, Meng HH, Zhang HX, Vyacheslav BV, Sanderson

SC (2014b) Himalayan origin and evolution of *Myricaria* (Tamaricaceae) in the Neogene. *PLoS ONE*, 9, e97582.

Zhang YM, Pan BR, Yin LK (1998) Seed morphology of Tamaricaceae in China arid areas and its systematic evolution. *Journal of Plant Resources and Environment*, 7, 22–27. (in Chinese with English abstract) [张元明, 潘伯荣, 尹林克 (1998) 中国干旱区柽柳科植物种子形态特征及其系统学意义. *植物资源与环境*, 7, 22–27.]

Zhao W, Meng JX, Wang BS, Zhang LS, Xu YL, Zeng QY, Li Y, Mao JF, Wang XR (2014) Weak crossability barrier but strong juvenile selection supports ecological speciation of the hybrid pine *Pinus densata* on the Tibetan Plateau. *Evolution*, 68, 3120–3133.

Zonneveld BJM, Duncan GD (2010) Genome sizes of *Eucomis* L'Hér. (Hyacinthaceae) and a description of the new species *Eucomis grimshawii* G. D. Duncan & Zonneveld. *Plant Systematics and Evolution*, 284, 99–109.

Zonneveld BJM, Leitch IJ, Bennett MD (2005) First nuclear DNA amounts in more than 300 angiosperms. *Annals of Botany*, 96, 229–244.

Zou X, Sun LY, Wan XX, Chen Y, Lin F, Yin ZF (2020) Establishment of flow cytometry system for DNA C-value determination of polyploid species in subgenus *Yulania*. *Plant Science Journal*, 38, 369–377. (in Chinese with English abstract) [邹璇, 孙李勇, 万小霞, 陈瑶, 林峰, 尹增芳 (2020) 玉兰亚属多倍体植物DNA C-值流式细胞术测定体系的建立. *植物科学学报*, 38, 369–377.]

(责任编辑: 严岳鸿 责任编辑: 时意专)

附录 Supplementary Material

附录1 红砂不同支系及其生境

Appendix 1 Different genetic lineages of *Reaumuria soongorica* and their habitats
<https://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2021057-1.pdf>



附录 1 红砂不同支系及其生境。(A)西部支系阿克苏群体;(B)东部支系皋兰群体; C, D, 北疆支系阜康群体 (C)和五彩城群体(D)。每幅图左下角展示的是相应群体的叶片, 右下角展示的是种子, bar = 1 cm。
Appendix 1 Different genetic lineages of *Reaumuria soongarica* and their habitats. (A) The Akesu population of the western lineage. (B) The Gaolan population of the eastern lineage. (C, D) The Fukang (C) and Wucaicheng (D) populations of the northern lineage. The leaves (left) and seeds (right) of the corresponding population are shown in the bottom of each picture, bar = 1 cm.