

高山植物条纹狭蕊龙胆的分子亲缘地理学研究

^{1,3}陈生云* ²吴桂莉* ^{1,3}张得钧 ^{1,3}高庆波 ^{1,3}段义忠 ^{1,3}张发起 ¹陈世龙**

¹(中国科学院高原生物适应与进化重点实验室, 中国科学院西北高原生物研究所 西宁 810001)

²(兰州大学干旱与草地生态学重点实验室 兰州 730000)

³(中国科学院研究生院 北京 100049)

Molecular phylogeography of alpine plant *Metagentiana striata* (Gentianaceae)

^{1,3}Sheng-Yun CHEN* ²Gui-Li WU* ^{1,3}De-Jun ZHANG ^{1,3}Qing-Bo GAO
^{1,3}Yi-Zhong DUAN ^{1,3}Fa-Qi ZHANG ¹Shi-Long CHEN*

¹(Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China)

²(Key Laboratory of Arid and Grassland Ecology, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

³(Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Herbaceous plants have a short life cycle and are sensitive to environmental changes. Thus, they may serve as good models to elucidate historical processes of plant populations since Quaternary glaciations. Molecular phylogeographic analysis is a powerful tool to reveal the population history of plants and animals. To understand the geographic history of alpine plants in the Qinghai-Tibet Plateau, which is still poorly known, we surveyed sequence variation of the chloroplast DNA (cpDNA) noncoding fragment *trnH* (GUG)-*psbA* intergenic spacer throughout the range of *Metagentiana striata* (Maxim.) T. N. Ho, S. W. Liu & S. L. Chen, an annual and herbaceous alpine plant in the Qinghai-Tibet Plateau and adjacent areas. Seven haplotypes were detected by analyzing 155 individuals from 13 populations of this species. One haplotype (A) was common and widespread, and three haplotypes (E, F and G) were unique in their populations. The center of haplotype diversity is located in the Hengduan Mountains of southeastern Qinghai-Tibet Plateau, with 2-3 haplotypes present in each of four populations. In populations from the northeastern and eastern Qinghai-Tibet Plateau as well as from adjacent regions, however, only a single haplotype was found in each population, with different populations having different haplotypes. An analysis of molecular variance (AMOVA) for populations of *M. striata* showed that the genetic variation mainly resided among populations (73.05%), and the estimates of interpopulation differentiation were very high ($G_{ST}=0.805$, $F_{ST}=0.731$, $N_{ST}=0.859$). Further, a significant phylogeographic structure was present ($N_{ST} > G_{ST}$, $P < 0.05$) whereas the value of average gene flow was low ($N_m=0.184$) in the entire geographical range. Along with the nested clade analysis (NCA), our results suggested that the Hengduan Mountains of southeastern Qinghai-Tibet Plateau served as a possible refugium during the Quaternary glaciations, and the interglacial or post-glacial range expansion by plants from the refugium followed by allopatric and past fragmentation shaped the present distribution patterns of haplotypes and populations.

Key words alpine plant, cpDNA, Hengduan Mountains, *Metagentiana striata*, molecular phylogeography, refugium, *trnH* (GUG)-*psbA*.

摘要 草本植物由于较短的生活周期以及对环境变化的敏感性,可能会更好地揭示第四纪冰期以来植物居群变化的历史过程。分子亲缘地理学研究是揭示动植物居群历史的有力工具,但到目前为止对青藏高原草本植物的分子亲缘地理学研究几乎是空白。因此,本文选择在青藏高原及邻近地区生长的一年生高山草本植物条纹狭蕊龙胆为研究对象,进行了13个居群155个个体的叶绿体基因组(cpDNA)非编码片段*trnH* (GUG)-*psbA*基因间区序列变异检测,共发现7种单倍型,其中单倍型Hap A是分布最广的,而单倍型Hap E、Hap F和Hap G是拥有的居群所特有的。青藏高原东北部、东部及邻近地区的每个居群拥有的单倍型非常单一,而高原东南部横断山区的单倍型分布很集中,遗传多样性也相对较高。分子变异分析(AMOVA)结果表明

2007-07-16 收稿, 2007-12-10 收修改稿

* 两位作者对此工作贡献相同(These two authors contributed equally to this work)。

** 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: slchen@nwpib.ac.cn; Tel.: 86-971-6110067)。

整个分布区条纹狭蕊龙胆的遗传变异主要存在于居群间(73.05%),且居群间的遗传分化很高($G_{ST}=0.805$, $F_{ST}=0.731$, $N_{ST}=0.859$),有着显著的亲缘地理学结构($N_{ST}>G_{ST}$, $P<0.05$)和较低的居群间的平均基因流($N_m=0.184$)。结合巢式支系法分析(NCA),根据本文的研究结果推测青藏高原东南部横断山区是该植物第四纪冰期时可能的避难所,而且在间冰期或冰期后,伴随着异域片段化和过去片段化从避难所发生范围扩张而形成当前单倍型及居群的分布格局。

关键词 高山植物; 叶绿体DNA; 横断山区; 条纹狭蕊龙胆; 分子亲缘地理学; 避难所; *trnH* (GUG)-*psbA*

素有世界屋脊之称的青藏高原,平均海拔超过4000 m,是世界上最高、最大、最年轻的高原。这里有着独特的自然环境和生态系统,是我国乃至全球最珍贵的高山生物物种基因库,被称为地球第三极(施雅风等, 1998)。随着地形从东南向西北的渐次升高,气温和降水递减,在青藏高原上植被出现了森林、草原和荒漠水平地带特征,而高原上巨大的山体 and 断陷盆地形成的高差又使其植被的垂直分布带亦十分明显(孙鸿烈, 郑度, 1998)。无疑,青藏高原现代植物区系的特征和组成,不仅取决于植物在现代生态条件下的适应进化,而且也与晚第三纪以来高原隆升和第四纪冰期的地质与气候历史事件有着密切的联系(孔昭宸等, 1996)。我国及世界各国植物学家从20世纪30年代就开始对青藏高原植物区系的起源与演化进行研究,结果表明青藏高原植物区系中的大部分属于北温带分布型,该区系与中国—喜马拉雅植物区系密切,是在喜马拉雅山和青藏高原隆起的过程中逐步形成的一个年轻区系(Ward, 1927, 1935; 吴征镒, 1980, 1987; 武素功等, 1995);同时,吴征镒(1980, 1987)认为青藏高原东南部的横断山地区是第四纪冰期高原核心层面甚至北温带地区植物的避难所,冰期后成为这些地区植物的重要起源地和辐射地之一。然而,这些研究结论都是根据该地区的古植物学、孢粉学、古气候学和现代植物的区系特征分析得出的。由于能说明问题的孢粉或化石证据往往很难找到,不能明确某个地区的区系来源及是否为避难所,因此需要其他类型的证据、方法和技术以更好地研究这一问题。年来迅速发展起来的分子亲缘地理学(molecular phylogeography)为这方面的研究提供了十分有效的工具,目前主要通过直接检测物种不同居群DNA变异和系谱分析来探讨该物种曾经发生的种群扩散以及迁移路线,从而可进一步推测物种当前分布格局的历史成因,特别是能揭示出由于受第四纪冰期与间冰期反复交错的历史事件影响,使得许多植物物种在其历史分布上是动态的,在冰期退缩到避难所

(refugium),而在间冰期或冰期结束后又发生扩张形成现代物种分布格局(Cheng et al., 2005; Ikeda & Setoguchi, 2007; Meng et al., 2007)。在种群水平上直接检测时更多地使用细胞器基因组(主要包括叶绿体基因组(cpDNA)和线粒体基因组),这是因为核基因组结构过于复杂,影响因素过多。然而细胞器基因组具有单亲遗传的特点,在有性繁殖时不发生重组,而是进行无性传递,因而已被广泛运用于第四纪冰期以来物种种群历史和迁移路线的研究中(Avise, 2000; 沈浪等, 2002; Templeton, 2004; Qu et al., 2005; Yang et al., 2006; Afzal-Rafii & Dodd, 2007)。cpDNA在绝大多数被子植物中为母体遗传,不经受遗传重组,提供了一个描述种子专一基因流的遗传标记,能真实地反映由于种子扩散而引起的遗传结构差异,在许多植物的分子亲缘地理学研究中被成功应用。尤其是一些cpDNA的非编码区域,能区分出种内多种单倍型(haplotype) (Mogensen, 1996; Tremblay & Schoen, 1999; Petit & Griver, 2002),利用单倍型来构建网络关系树,并结合其地理分布格局用来探讨物种形成历史以及地质和气候等历史事件引起的物种扩散及其迁移路线(Petit et al., 2003; Alsos et al., 2005)。当前该领域对欧洲、北美部分木本植物以及北极地区的草本植物研究较多(Hewitt, 1996, 2000; Abbott et al., 2000; Stehlik et al., 2002; Abbott & Comes, 2004; Schönschwetter et al., 2006; Belaj et al., 2007; Naciri & Gaudeul, 2007),但以青藏高原地区特征性植物类群为代表的研究工作很少,仅对该地区分布的木本植物祁连圆柏 *Juniperus przewalskii* Kom.和青海云杉 *Picea crassifolia* Kom.进行了分子亲缘地理学研究(Zhang et al., 2005; 张茜等, 2005; Meng et al., 2007),而有关青藏高原地区草本植物的研究尚未见报道。

条纹狭蕊龙胆 *Metagentiana striata* (Maxim.) T. N. Ho, S. W. Liu & S. L. Chen 隶属于龙胆科 Gentianaceae 狭蕊龙胆属 *Metagentiana* (Ho et al., 2002), 它的前身是该科龙胆属 *Gentiana* (Tourn.) L. 狭蕊组

sect. *Stenogyne* Franch. 中的条纹龙胆 *Gentiana striata* Maxim. (Ho & Pringle, 1995)。该种植物主要分布于青藏高原东北部及邻近高山地区, 为一年生草本植物, 生长在海拔2200–4300 m的林缘、灌丛及高山草甸中。由于草本植物生活周期较短以及对环境变化的敏感性, 对该植物开展分子亲缘地理学研究可能会更好地揭示青藏高原地区第四纪冰期以来植物居群变化的历史过程。因此, 本研究通过检测覆盖条纹狭蕊龙胆整个地理分布范围的13个居群155个个体cpDNA非编码片段 *trnH* (GUG)-*psbA* 基因间区 (intergenic spacer) 的序列变异 (单倍型, haplotype), 来进行分子亲缘地理学研究, 从而揭示该植物单倍型的地理分布式样、居群遗传结构以及冰期时的避难所及冰期后的迁移路线。

1 材料和方法

1.1 样品采集

本研究共分析了条纹狭蕊龙胆13个居群共155个个体, 覆盖了其分布范围。材料采自青海、四川、甘肃和宁夏, 每个居群随机选择5–20个体 (表1; 图1), 居群内个体之间至少相隔5 m以上, 新鲜叶片被采集后, 迅速用硅胶干燥。凭证标本存于中国科学院西北高原生物研究所标本馆 (HNWP)。

1.2 实验方法

硅胶干燥的叶片采用改进的CTAB法 (Doyle & Doyle, 1987) 提取总DNA。在对所有居群个体进行大规模测序前, 首先选取在地理位置上相隔较远的5个居群共25个个体 (即每个居群5个个体) 的总DNA进行3个cpDNA非编码片段 (*psbB-psbF*、*rpl20-5' rps12*和 *trnH* (GUG)-*psbA* 基因间区) 的扩增和测序, 以求寻找能在居群水平上表现出差异的片段。这3个片段的引物序列依据Hamilton (1999) 所述, 分别为: *psbB* (5'-GTTTACTTTTGGGCATGCTTCG-3') 和 *psbF* (5'-CGCAGTTCGCTTGGACCAG-3')、*rpl20* (5'-TTTGTCTACGTCTCCGAGC-3') 和 5'*rps12* (5'-GTTCGAGGAACATGTACTAGC-3')、*trnH* (GUG) (5'-ACTGCCTTGATCCACTTGGC-3') 和 *psbA* (5'-CGAAGCTCCATCTACAAATGG-3')。研究结果发现, *trnH* (GUG)-*psbA* 片段表现出了最高的种内变异, 因此采用这对引物对条纹狭蕊龙胆的所有个体进行扩增和测序, 统计每个居群的单倍型。

扩增反应在 Biometra thermal cycler PCR (Tpersonal 48) 扩增仪上进行, 反应体系为25 μ L, 内含: 2.5 μ L的10 \times PCR缓冲液 (1.5 mmol/L MgCl₂), 0.5 μ L的10 mmol/L dNTPs, 引物 *trnH* (GUG) 和 *psbA* 各1.25 μ L (5 pmol/L), 0.5 μ L的Mg²⁺, *Taq* DNA聚合酶0.25 μ L (1.25 U), 总DNA模板1 μ L (10–20 ng) 以及双蒸水17.75 μ L。扩增反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 4 min, 接以38个循环的94 $^{\circ}$ C 50 s, 56 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 75 s, 最后以72 $^{\circ}$ C 7 min结束。扩增产物采用 CASpure PCR Purification Kit 试剂盒 (上海中科开瑞生物芯片科技股份有限公司) 纯化。纯化后的产物利用相同的引物 *trnH* (GUG) 和 *psbA* 及 Amersham 公司的 DYEnamic Dye Terminator Cycle Sequencing Kit 试剂盒进行测序PCR扩增, 反应体系为10 μ L, 包括: PCR纯化产物为1.0–2.0 μ L, 引物各1 μ L, 2.5 μ L ET, 4.5–5.5 μ L双蒸水; 程序为: 95 $^{\circ}$ C 8 s, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 50 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 90 s 循环31次, 然后60 $^{\circ}$ C 保温90 s。产物用 Autoseq 96 Plates (Amersham公司) 进行纯化, 并在 MegaBACE500 DNA Analysis System (Amersham Biosciences Corp.) 上进行测序。每条链均能完整读出约300 bp, 正反两条链重叠达90%以上。

1.3 数据分析

用 Clustal X 软件 (Thompson et al., 1997) 进行序列对位排列, 并加以手工适当校正。在所有序列校对正确后, 用 DnaSP4.0 (Rozas et al., 2003) 程序统计 cpDNA 单倍型。以每个居群不同单倍型的个体数目和总的个体数计算单倍型频率, 然后计算出每个居群的单倍型多样性 (遗传多样性, H_d) (Nei, 1987); 依据 Pons 和 Petit (1996) 所描述的方法, 基于相同的单倍型频率, cpDNA 的居群内平均遗传多样性 (H_S) 和总的遗传多样性 H_T , 居群间遗传分化系数 G_{ST} (Raymond & Rousset, 1995) 和 N_{ST} 值, 用程序 PERMUT2 (<http://www.pierroton.inra.fr/genetics/labo/software>; 2000次置换检验) 和 HAPLODIV 计算而得。使用 U 统计方法对 G_{ST} 和 N_{ST} 进行比较 (Pons & Petit, 1996), G_{ST} 值的计算过程只使用了单倍型频率, 而 N_{ST} 则把单倍型之间的差异也考虑在内。利用这些计算值可以检验单倍型变异在整个地理分布区的地理格局, 如果 N_{ST} 值显著大于 G_{ST} 值 ($P < 0.05$), 则表明亲缘关系相近的单倍型在相同居群中发生, 且有着明显的亲缘地理学结构出现 (Pons & Petit, 1996)。

表 1 条纹蕨慈龙胆 13 个居群的材料来源及叶绿体 DNA 单倍型(A-G)的遗传多样性(H_d)、组成和频率

Table 1 Origin of materials, measures of haplotypic diversity (H_d) and composition/frequency from cpDNA haplotypes (A-G) in 13 populations of *Metagentiana striata*

居群编号 Population code	采集地 Locality	凭证标本 ¹⁾ Voucher ¹⁾	纬度 (N)	经度 (E)	海拔 Altitude (m)	样本数 Sample size	单倍型数目 Number of haplotype	单倍型组成/频率 Haplotype composition / frequency								
								A	B	C	D	E	F	G		
1	青海平安 Ping'an, Qinghai	陈世龙 (S. L. Chen) 04001	36°20'32"	101°55'06"	2690	7	1	0	7/1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2	青海玛沁 Maqên, Qinghai	陈世龙 (S. L. Chen) 03012	34°47'88"	100°14'12"	3520	5	1	0	0.000	5/1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3	青海班玛 Baima, Qinghai	陈世龙 (S. L. Chen) 03019	32°47'00"	100°47'33"	3430	20	1	0	0.000	20/1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
4	青海门源 Menyuan, Qinghai	陈世龙 (S. L. Chen) 04021	37°17'04"	101°48'18"	2940	8	1	0	8/1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
5	青海门源 Menyuan, Qinghai	陈世龙 (S. L. Chen) 04024	37°13'57"	102°00'49"	2630	5	1	0	5/1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
6	青海互助 Huzhu, Qinghai	陈世龙 (S. L. Chen) 04029	37°13'03"	102°01'22"	2640	5	1	0	5/1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
7	四川阿坝 Aba, Sichuan	陈世龙 (S. L. Chen) 03034	32°36'59"	101°18'45"	3080	15	2	0.125	0.000	14/0.933	1/0.067	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
8	四川松潘 Songpan, Sichuan	陈世龙 (S. L. Chen) 03038	32°47'55"	103°34'40"	2990	20	2	0.375	0.000	0.000	0.000	0.000	15/0.750	5/0.250	0.000	0.000
9	四川松潘 Songpan, Sichuan	陈世龙 (S. L. Chen) 03043	32°23'27"	103°31'33"	2960	19	3	0.527	0.000	1/0.053	7/0.368	11/0.579	0.000	0.000	0.000	0.000
10	甘肃合作 Hezuo, Gansu	陈世龙 (S. L. Chen) 04047	34°54'14"	102°49'57"	3210	6	1	0	0.000	0.000	0.000	6/1.000	0.000	0.000	0.000	0.000
11	宁夏隆德 Longde, Ningxia	陈世龙 (S. L. Chen) 04053	35°40'02"	106°12'10"	2740	10	1	0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	10/1.000	0.000
12	四川红原 Hongyuan, Sichuan	陈世龙 (S. L. Chen) 03060	32°24'18"	102°36'09"	4300	20	3	0.585	11/0.550	6/0.300	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	3/0.150
13	四川道孚 Dawu, Sichuan	陈世龙 (S. L. Chen) 03381	30°49'55"	101°16'47"	3510	15	1	0	15/1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

1) 凭证标本存放在中国科学院西北高原生物研究所植物标本馆(HNWP).

1) All the vouchers are preserved in the herbarium of Northwest Institute of Plateau Biology, the Chinese Academy of Sciences (HNWP).

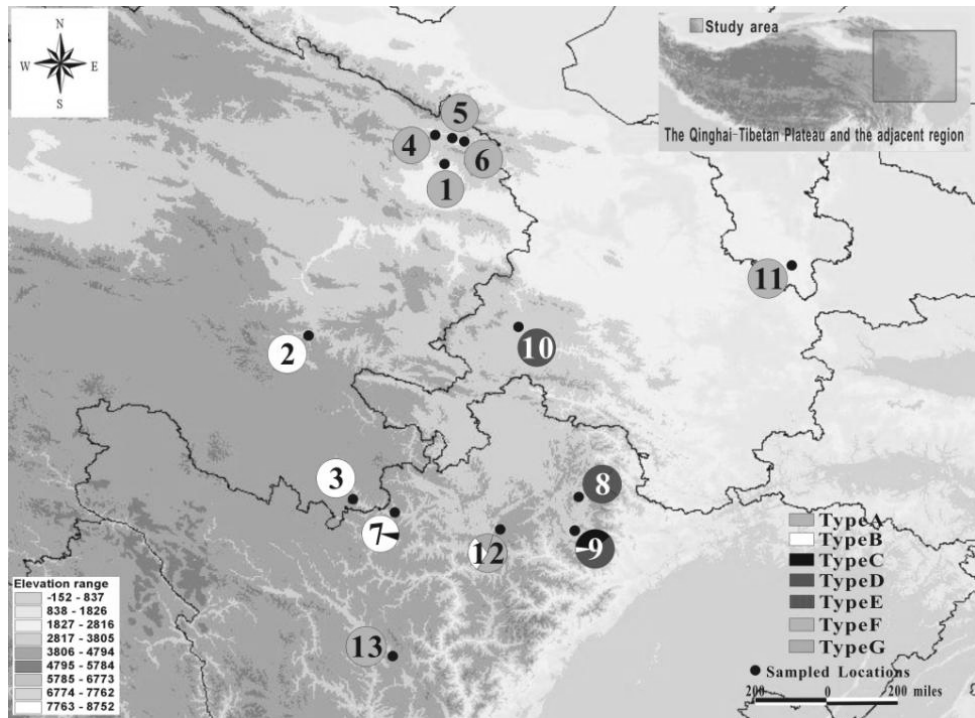


图1 条纹狭蕊龙胆居群采样点及叶绿体DNA单倍型分布图 居群编号(1-13)与表1的编号是一致的。

Fig. 1. The sampled locations of populations and distribution of cpDNA haplotypes within and among populations of *Metagentiana striata*. All of the population codes from 1 to 13 are accordant with Table 1.

应用ARLEQUIN软件包(version 3.01; Excoffier et al., 2006)中的分子变异分析AMOVA(Analysis of Molecular Variance)软件(Excoffier et al., 1992)检测居群间和居群内水平上的遗传变异组成以及单倍型分布的 F_{ST} 评价(Weir & Cockerham, 1984), 以进一步揭示群体的分化程度(1000次置换检验)。同时, 利用ARLEQUIN软件包中的Mantel统计学检验(Mantel, 1967), 分别比较条纹狭蕊龙胆居群平均遗传距离矩阵与地理距离矩阵(经纬度)之间的相关性(r 值表示这两个矩阵间的相关性系数), 并进行10000次重复的显著性检验(Smouse et al., 1986)。

物种水平上的居群间的平均基因流(N_m)和核苷酸多样性(π)(Nei, 1987)分别通过ARLEQUIN软件包和DnaSP4.0程序进行检测; Tajima's D (Tajima, 1989)以及Fu和Li's D^* (Fu & Li, 1993)两种无限突变位点模型的中性检验方法检测及歧点分布(Mismatch distribution)分析(Rogers & Harpending, 1992)也在DnaSP4.0程序中完成。

分别以毛脉狭蕊龙胆 *Metagentiana souliei*

(Franch.) T. N. Ho, S. W. Liu & S. L. Chen和翼萼狭蕊龙胆 *Metagentiana pterocalyx* (Franch.) T. N. Ho & S. W. Liu各1个个体作为外类群来进行单倍型系统发育分析(Chen et al., 2005)。利用PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2003)做最大简约性(maximum parsimony, MP)分析时, 采用树二组重新连接TBR分支交换、多重性选择MULPARS、ACCTRAN特征最优化, 空位(gap)始终作为缺失状态, 使用启发式搜索(heuristic search)最简约树, 采用1000次重复的随机加入(random addition of 1000 replicates)寻找最简约树的岛屿(islands)分布(Maddison, 1991); 同时利用靴带分析(bootstrap analysis, BS)进行1000次重复来检验单倍型各分支的支持率值(bootstrap values, BS)。利用MrBayes 3.1.1(Huelsenbeck & Ronquist, 2001; Ronquist & Huelsenbeck, 2003)进行贝叶斯分析(Bayesian analysis)时, 选用最适于拟合该数据集的DNA进化模型为GTR+ Γ +PINVAR模型, 以随机树(random tree)开始分析, 同时建立4条马尔可夫链(Markov chains), 马尔可夫链蒙特卡洛(MCMC)长

度取值100万代(generations), 链的温度(temperature)等参数取默认值, 分析执行200万代(generations), 每100代选取一棵树保存, 共获得2万棵树, 根据可能性值(likelihood values)及经验估计, 忽略全部动态抽样2000次, 对剩余的18000次静态抽样计算50%多数一致性树, 以贝叶斯后验概率(Bayesian posterior probability, BPP)作为评估参数(Larget & Simon, 1999)。

cpDNA单倍型之间的网络关系用Network 4.1.1.2程序中的median-joining (Bandelt et al., 1999)进行分析。这样得到的网络关系树是一种无根的系统进化树, 各单倍型之间由突变连接。然后按照Templeton等(1987, 1992)组巢原则构建单倍型巢式支系图:处在网络关系树边缘、只与一个支系或单倍型连接的支系或单倍型称为末支(tip clade), 而与一个以上支系或单倍型连接的支系或单倍型称为内支(interior clade); 通常认为, 在同一支系内, 末支和内支分别代表了在进化上较晚和较早的支系或单倍型(Castelloe & Templeton, 1994)。组巢的基本原则是从单倍型水平开始, 将末支与其相连的内支组为一个一级支系; 之后再对一级支系对应的末支、内支组巢成为二级支系, 直到单倍型网络关系树组为一个大的完整支系为止。基于巢式支系图, 进行巢式支系法分析(nested clade analysis, NCA):首先利用Geodis 2.5 程序(Posada et al., 2000)计算不同支系(从一级支系到一个大的支系)内两种类型的距离, 巢内距离(Dc), 表示某支系或某单倍型所有个体与该支系该单倍型地理分布中心的平均距离, 即该支系的地理分布范围; 巢间距离(Dn)表示某支系或某单倍型所有个体与包含该支系的高一级水平地理分布中心的平均距离, 即该支系与进化上相近的支系间的地理分布关系; 另外, 在所有组巢水平各个支系内还要计算内支两种距离均值与末支两种距离均值之差(即各个支系内I-T的Dc和Dn)。同时, 通过10000次的随机选择来检验上述数值的显著性大小; 最后, 根据上述的两种距离结果, 参照Templeton (2004)给出的对巢式支系图不同水平支系距离格局的检索表(http://drawin.uvigo.es/download/geodisKey_11Nov05.pdf), 来推测单倍型地理分布格局的历史成因。

2 结果

2.1 条纹狭蕊龙胆的序列变异分析

对条纹狭蕊龙胆13个居群155个个体进行了cpDNA片段

2.2 条纹狭蕊龙胆的多样性指数、遗传结构与歧点分布分析

在条纹狭蕊龙胆13个居群155个个体中, 7种cpDNA单倍型的频率分别是: Hap A=0.329、Hap B=0.297、Hap C=0.052、Hap D=0.206、Hap E=0.032、Hap F=0.065和Hap G=0.019, 其中单倍型Hap A的

表2 条纹狭蕊龙胆叶绿体DNA trnH (GUG)-psbA片段7种单倍型间的序列变异位点

Table 2 Variable sites of the aligned sequences of the cpDNA fragments trnH (GUG)-psbA in seven haplotypes of *Metagentiana striata*

		trnH (GUG)-psbA							
变异位点 Variable sites		7	7	8	1	2	2	2	2
		5	8	7	6	1	8	5	5
单倍型 Haplotype	HapA	▲ ₁	▲ ₂	▲ ₃	C	A	-	T	-
	HapB	▲ ₁	▲ ₂	▲ ₃	C	A	▲ ₄	T	-
	HapC	-	-	-	T	A	-	T	-
	HapD	▲ ₁	-	▲ ₃	T	A	-	T	▲ ₅
	HapE	▲ ₁	-	▲ ₃	T	A	-	G	▲ ₅
	HapF	▲ ₁	-	▲ ₃	T	C	-	T	▲ ₅
	HapG	▲ ₁	-	▲ ₃	T	A	-	T	-

标记(▲₁、▲₂、▲₃、▲₄、▲₅和-)分别表示不同的碱基插入/缺失。
▲₁: TTT; ▲₂: TTCTCTTT; ▲₃: ATAACACAATTATTATTA-CAATATTGATAACTCA; ▲₄: CATATT; ▲₅: TATT。
The marks ▲₁, ▲₂, ▲₃, ▲₄, ▲₅ and - respectively indicate different inserts/deletions. ▲₁, TTT; ▲₂, TTCTCTTT; ▲₃, ATAACACAATTATTATTATTACAATATTGATAACTCA; ▲₄, CATATT; ▲₅, TATT.

频率最高, 有51个个体拥有此单倍型。条纹狭蕊龙胆每个居群的遗传多样性(H_d)、单倍型数量、单倍型组成及频率见表1, 单倍型的地理分布见图1。就各居群单倍型的地理分布而言, 单倍型Hap A是分布最广的, 其中在青藏高原东北部边缘的4个居群1、4、5和6和位于青藏高原东南部横断山区的居群13只拥有一种单倍型Hap A, 而横断山区的另一个居群12拥有3个单倍型Hap A、Hap B和特有单倍型Hap G, 频率依次为0.550、0.300和0.150 ($H_d=0.585$); 分布在高原东部的居群2和3中都仅有单倍型Hap B, 居群7中拥有单倍型Hap B和Hap C, 其频率分别是0.933和0.067 ($H_d=0.125$), 单倍型Hap B占绝对优势; 青藏高原东南部的居群8、9和10都拥有单倍型Hap D, 其中居群8拥有高频率(0.750)的单倍型Hap D和低频率(0.250)的特有单倍型Hap E ($H_d=0.375$), 居群9拥有单倍型Hap B、Hap C和Hap D, 频率依次为0.053、0.368和0.579 ($H_d=0.527$), 居群10仅有单倍型Hap D; 而分布在高原邻近地区的居群11固定了特有单倍型Hap F。由此可见, 在所研究的13个居群中, 高原东南部横断山区的居群拥有两种及以上的单倍型, 其中居群12在所有居群中的遗传多样性(H_d)最高, 而居群9的遗传多样性(H_d)次之。

通过PERMUT2和HAPLODIV程序计算得出, 条纹狭蕊龙胆居群内平均遗传多样性 H_s (se)值、总的遗传多样性 H_T (se)值、居群间遗传分化 G_{ST} (se)和 N_{ST} (se)值分别为: 0.140 (0.064)、0.715 (0.073)、0.805 (0.081)和0.859 (0.068)。使用U统计方法(2000次置换检验)对条纹狭蕊龙胆整个分布区单倍型变异的地理结构进行检验后发现 N_{ST} 显著大于 G_{ST} ($P<0.05$)。这些结果表明了在条纹狭蕊龙胆整个地理分布区内, 居群间遗传分化水平很高($G_{ST}=0.805$), 亲缘关系相近的单倍型在相同居群中发生, 并且有着明显的亲缘地理学结构出现。分子变异分析(AMOVA)的结果也表明, 居群间的遗传变异为73.05%, 而居群内的遗传变异为26.95%, $F_{ST}=0.731$ ($P<0.001$), 揭示了条纹狭蕊龙胆的遗传变异主要存在于居群间, 而且具有较高的居群分化水平。Mantel统计学检验表明, 尽管相关系数较低($r=0.22$), 但条纹狭蕊龙胆居群遗传距离与地理距离之间存在正相关关系($P<0.05$)。另外, 通过DnaSP4.0程序和ARLEQUIN软件包分别计算得出的核苷酸多样性(π)值和居群间的平均基因流(N_m)值分别为0.003和0.184。

两种中性检验值均为负值(Tajima's $D=-0.654$, Fu and Li's $D^*=-0.519$), 但不显著($P>0.10$); 同时, 条纹狭蕊龙胆居群所有个体cpDNA片段

2.3 条纹狭蕊龙胆的单倍型间系统发育和巢式支系法(NCA)分析

条纹狭蕊龙胆的7种cpDNA单倍型, 以毛脉狭蕊龙胆和翼萼狭蕊龙胆为外类群进行系统发育分析时, 序列长度范围在219–279 bp之间, 排序后长296 bp。最大简约性(MP)分析得到9个变异位点, 8个信息位点, 只产生1棵简约性树(length=17, CI=0.996, RI=0.991; 图2); 贝叶斯分析(Bayesian analysis)产生的50%多数一致性树与最大简约性树有着相同的拓扑结构(未标出)。两种方法分析得到的系统树中BPP和BS高于50%的值进行了标明。从图2中可以看出, 7种单倍型主要分成两大分支: 单倍型Hap A、Hap B、Hap C和Hap G聚为一支(支持率低于50%), 其中单倍型Hap A和Hap B组成的亚分支得到了较高的支持率(BPP=99%, BS=86%); 而单倍型Hap E、Hap F和Hap D聚为另一支, 支持率较低(BPP=66%, BS=58%)。单倍型Hap D和Hap G在进化上相对原始。

根据组巢原则得到的条纹狭蕊龙胆7种cpDNA单倍型巢式支系图如图4所示, 其分布格局与最大简约性树(图2)基本一致。7种单倍型组成了3个一级支系: 单倍型Hap A与Hap B组成支系1-1, 由一个突变数连接; 单倍型Hap C与Hap G组成支系1-2, 由两个突变数连接; 而单倍型Hap D、Hap E和Hap F之间分别由一个突变数连接, 组成支系1-3。这3个一级支系构成了一个大的完整支系(Total clade), 由两个和一个突变数分别连接。由此可见, 单倍型Hap D和Hap G可能是最原始的单倍型, 这与单倍型间系统发育分析的结果一致。NCA得到的所有组巢水平各个支系内的内支、末支和内外支的两种距离(巢内距离 D_c 和巢间距离 D_n), 以及显著性大小值(P)的结果见表3。检索表分析推测得到的各个支系单倍型地理分布格局的一系列历史成因见表4: 就整个支系和一级支系1-1而言, 由范围扩张(range expansion)

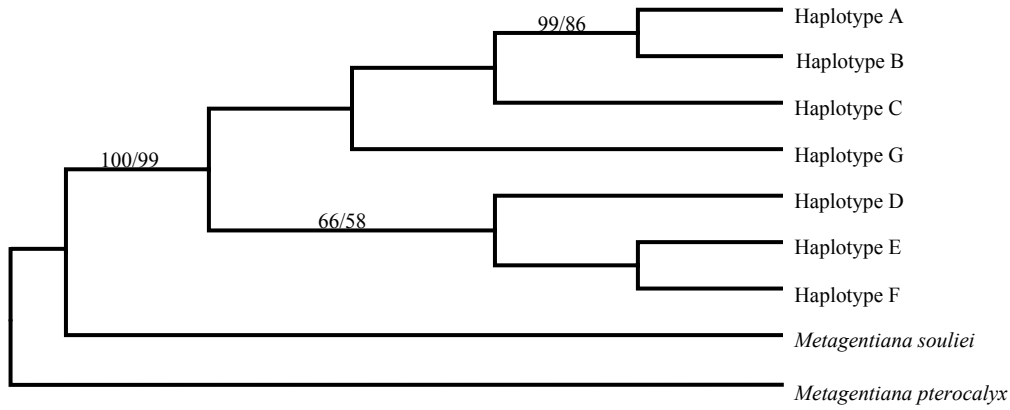


图2 条纹狭蕊龙胆叶绿体DNA 7种单倍型(A-G)的1棵最大简约(MP)树(length=17; CI=0.996; RI=0.991) 此树与贝叶斯50%多数一致性树有着相同的拓扑结构。分支上的数字分别表示贝叶斯后验概率(BPP)和简约性分析1000次重复得到的靴带分析支持率(BS)。
Fig. 2. The most parsimonious (MP) tree based on cpDNA seven haplotypes (A-G) of *Metagentiana striata* (length=17, CI=0.996, RI=0.991). This tree has the same topology as Bayesian 50% majority rule consensus tree. Numbers above the branches respectively indicate Bayesian posterior probability (BPP) and MP bootstrap values (BS) based on 1000 replicates.

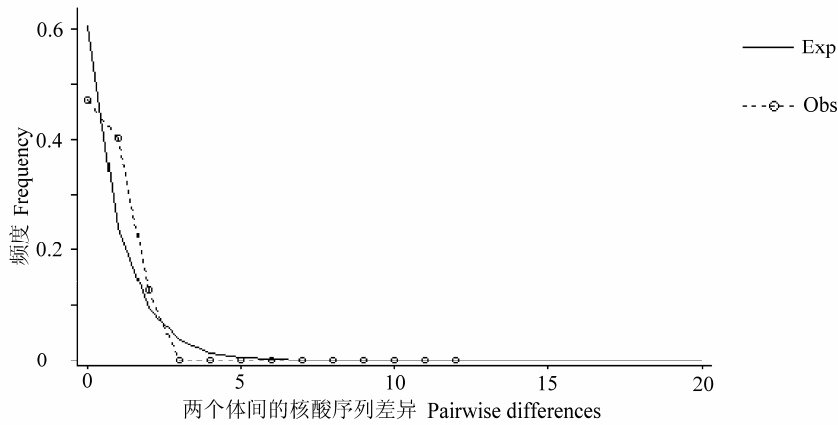


图3 条纹狭蕊龙胆所有个体叶绿体DNA片段trnH-psbA基因间区序列数据的歧点分布 Exp, 期望值; Obs: 观测值。
Fig. 3. Mismatch distribution for sequences data of the cpDNA fragment *trnH-psbA* intergenic spacer from all individuals of *Metagentiana striata*. The thin line represents the expectation; the dotted line represents the observed value.

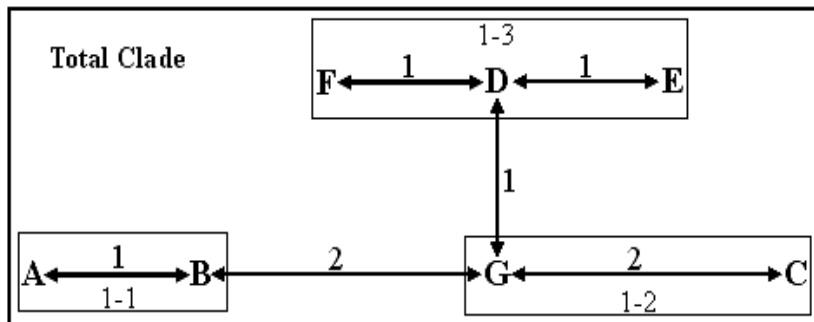


图4 条纹狭蕊龙胆叶绿体DNA单倍型(A-G)构建的巢式支系图 “1-#”表示一级支系(“#”表示一级支系水平上的支系数量); 在每个连接上面或右边的数字表示突变步数。
Fig. 4. The nested cladogram of cpDNA haplotypes (A-G) of *Metagentiana striata*. One-step clades are indicated by “1-#”, where # is the cladistic numbers at one-step clade level; The numbers above or at the right of each connections represent mutational steps.

表3 基于巢式支系图(图4), 应用程序Geodis 2.5对条纹狭蕊龙胆叶绿体DNA 7种单倍型(A-G)数据进行巢式支系分析(NCA)得到的两种距离*
Table 3 Two distances obtained with the nested cladistic analysis (NCA) of cpDNA seven haplotypic (A-G) data of *Metagentiana striata* based on the nested cladogram given in Fig. 4 and Geodis 2.5 program*

零步分支 Zero-Step clades						一步分支 1-Step clades					
Hap	Pos	Dc	P	Dn	P	Clade	Pos	Dc	P	Dn	P
A	T	253.082	0.389	294.448 ^L	0.000						
B	I	117.697 ^S	0.000	197.547 ^S	0.000	1-1	T	258.412	0.446	272.876 ^L	0.017
I-T		-135.386 ^S	0.000	-96.901 ^S	0.000						
C	T	54.224	0.276	63.902 ^L	0.005						
G	I	0.000	0.222	40.777 ^S	0.005	1-2	I	57.973 ^S	0.000	240.077	0.254
I-T		-54.224	0.222	-23.125 ^S	0.005						
D	I	128.674 ^S	0.000	161.445 ^S	0.000	1-3	T	187.830 ^S	0.000	226.612 ^S	0.007
E	T	0.000 ^S	0.010	154.663	0.064						
F	T	0.000 ^S	0.000	257.570 ^L	0.000	I-T		-177.402 ^S	0.000	-17.699	0.277
I-T		128.674 ^L	0.003	-61.823 ^S	0.000						

*1-# (支系)在图4中已指定; Hap, 单倍型; I, 内支; I-T, 内支两种距离与末支两种距离均值之差; Pos, 位置; T, 末支。对数据进行10000次随机选择以检测巢内距离(Dc)或巢间距离(Dn)是明显大或明显小, 明显性水平是 $P < 0.05$ (P 是一个随机产生的概率值, 它表示与观察值相等或更大(更小))。

*1-# (Clades) designated in Fig. 4; Hap, haplotypes; I, interior clade; I-T, the average difference between interior vs. tip clades for both distance measures; Pos, position; T, tip clade. Tests determine whether the within-clade distances (Dc) or nested clade distances (Dn) are significantly large (^L) or significantly small (^S) based on 10000 randomizations of the data, with their level of significance $P < 0.05$ where P is the probability of a randomly generated value being equal to or larger (smaller) than the observed value.

表4 基于对条纹狭蕊龙胆叶绿体DNA单倍型数据的巢式支系分析结果(表3), 应用Templeton (2004)的检索表分析得到的一系列推论(P , 表示显著性检验值)。

Table 4 Chain of inference from the nested clade analysis of the cpDNA haplotypes data of *Metagentiana striata* (Table 3) using Templeton's (2004) inference key (P , the values of significant tests)

分支Clade	概率 P	检索Clade key	推论Inferences
1-1	0.000	1-2-11-Yes	范围扩张Range Expansion
1-2	0.005	1-19-No	异域片段化Allopatric Fragmentation
1-3	0.000	1-2-3-5-15-No	过去片段化Past Fragmentation
Total clade	0.000	1-2-11-Yes	范围扩张Range Expansion

形成; 而在一级支系1-2和1-3, 分别由异域片段化(allopatric fragmentation)和过去片段化(past fragmentation)所致。

3 讨论

与其他一些北极高山植物的cpDNA片段核苷酸多样性相比, 条纹狭蕊龙胆cpDNA非编码片段 *trnH* (GUG)-*psbA*基因间区的核苷酸多样性水平相对更低($\pi=0.003$), 如运用cpDNA非编码片段 *trnL-trnF*检测*Draba aizoides* L.时发现, π 为0.035 (Widmer & Baltisberger, 1999); 使用cpDNA非编码片段 *trnL-F*和*trnS-trnG*检测笃斯越桔 *Vaccinium uliginosum* L., 结果发现该植物的 π 为0.063 (Alsos et al., 2005)。叶绿体基因组进化的主要来源之一是小片段的碱基插入/缺失以及点突变, 而前者出现的

频率通常比后者要高(Clegg et al., 1994)。条纹狭蕊龙胆的cpDNA片段检测结果发现, 在单倍型序列的8个变异位点中, 小片段的插入/缺失占了5个, 而点突变仅占了3个(表2)。由此表明了条纹狭蕊龙胆单倍型序列间的分化水平较低, 种内遗传分化经历的时间较短。通过分子钟估测狭蕊龙胆属从龙胆属分化的时间大约是第三纪中新世时期11.4–21.4 Ma (Million years ago, 百万年以前), 而条纹狭蕊龙胆从狭蕊龙胆属分化的时间大概在3.3–6.2 Ma (Chen et al., 2005), 表明了条纹狭蕊龙胆起源较晚, 因此也就间接证明了该植物种内遗传分化经历的时间也较短。陶君容(1992)认为我国的草本植物繁盛时期大约是从第三纪中新世开始, 这与狭蕊龙胆属的分化时间相吻合。而到了中新世晚期, 由于我国西南部一系列山系继续抬升, 如喜马拉雅山、横断山等, 阻挡了来自印度洋的季风, 使得气候变凉、更

加干燥,一些木本植物向南迁移或绝灭,草本植物更加繁盛(Quade et al., 1989; 陶君容, 1992),一些在中国高山广泛分布的典型属如龙胆属、狭蕊龙胆属和报春花属 *Primula* L. 等发生强烈地辐射分化(Axelrod et al., 1996),产生了更多的新种。同时横断山地区也被许多学者认为是北温带一些大属(包括龙胆属)的分布和多样化中心(吴征镒, 1979; Wu, 1980, 1987; 王文采, 1992; 李锡文, 李捷, 1993)。由此推测条纹狭蕊龙胆可能是在第三纪晚期起源于中国西南的横断山地区后向北扩散至青藏高原东北部及邻近高山地区(陈生云, 2005)。

植物cpDNA遗传的形式和机制多种多样,多数植物具有单亲遗传特征,从严格的母系遗传到父系遗传都有,母系遗传是主要的形式,比较强的父系遗传只存在于几种裸子植物中。如Meng等(2007)对青海云杉 *Picea crassifolia* Kom. 研究发现cpDNA在这一植物中是父系遗传(通过花粉传播)的;而对许多被子植物的检测后发现, cpDNA是通过母系遗传(通过种子传播)的,从而使得居群间基因流都很低,遗传分化通常都较高(Fujii et al., 2002; Bittkau & Comes, 2005; Ikeda et al., 2006; Koch et al., 2006)。通过对一年生草本植物条纹狭蕊龙胆整个地理分布区的13个居群155个个体进行cpDNA非编码片段 *trnH* (GUG)-*psbA* 基因间区进行检测同样发现,居群间遗传分化程度很高($G_{ST}=0.805$, $N_{ST}=0.859$);而且AMOVA分析结果也表明条纹狭蕊龙胆中73.05%的遗传变异存在于居群间($F_{ST}=0.731$), Mantel统计学检验的地理距离与遗传距离之间的正相关关系也支持了这一结论($P<0.05$);同时,研究发现条纹狭蕊龙胆物种水平上居群间的平均基因流很低($N_m=0.184$)。由此可知, cpDNA在该植物中是以母系遗传为主的,而造成当前这种居群间很低的基因流和很高的遗传分化现象的主要原因可能是由于种子传播的距离相对有限,以及居群间的地理隔离(如高原东南部的岷山使得居群8和9与居群12发生隔离)和生境片段化(如高原邻近地区的居群11)阻碍了居群间的基因交流(Slatkin, 1985; Koch et al., 2006; Ehrich et al., 2007)。

从图1可以看出,在条纹狭蕊龙胆整个地理分布区所分析的13个居群中,单倍型的地理分布格局表现出在青藏高原东南部的横断山区分布最为集中,如居群7、8、9和12中拥有6种单倍型,而在青

藏高原东北部及邻近地区的居群中拥有的单倍型却非常单一。另外,从条纹狭蕊龙胆不同居群的遗传多样性分析表明,青藏高原东南部居群的遗传多样性较高,如居群12的遗传多样性最高($H_d=0.585$)、居群9次之($H_d=0.527$),而且有较多数量的特有单倍型,如居群12拥有特有单倍型Hap G。由此表明该地区的居群有着较高的遗传变异和单倍型特有性。许多研究表明一个物种的遗传多样性在冰期避难所与冰后期扩散的居群间存在差异,避难所的居群应具有更高的遗传多样性,而扩散地区的居群遗传多样性相对较低,这是因为当物种在间冰期或冰后期从避难所向外扩散时,可能伴随着奠基者效应,居群会受到一系列瓶颈作用影响,使得迁移后的居群遗传多样性降低(Ibrahim et al., 1996; Avise, 2000; Hewitt, 1996, 2000)。同时, Petit et al. (2003)认为在避难所地区的居群,不仅有高的遗传变异,而且有着单倍型的特有性。通过对条纹狭蕊龙胆cpDNA单倍型的系统发育和巢式支系图分析(图2、4),结果表明固定于高原东南部横断山区居群中的单倍型Hap D和Hap G可能是进化上最为原始的单倍型;而单倍型Hap A、Hap C、Hap E和Hap F位于支系图的最顶端,并且变异步骤数多数很低,表明这些单倍型应该是新近分化出来的。由此我们推测高原东南部横断山地区一带是条纹狭蕊龙胆在第四纪冰期时可能的避难所,而高原面上的居群可能是该植物在间冰期或冰后期从这些避难所发生扩张所形成的。这一推论与吴征镒(1979, 1987)提出的青藏高原东南部横断山地区是第四纪冰期青藏高原植物的避难所,以及高原上的植物是在间冰期或冰后期从这些避难所扩散而来的观点一致。

NCA的结果很好地支持了上述观点。首先,通过对亲缘关系相近的条纹狭蕊龙胆cpDNA单倍型Hap A和Hap B组巢式的支系1-1推测发现,当前单倍型地理分布格局的历史成因是由于范围扩张形成(表4)。同时,我们已证明亲缘关系相近的单倍型在相同居群中发生($N_{ST}>G_{ST}$, $P<0.05$),而单倍型Hap A和Hap B只在作为第四纪冰期可能避难所的青藏高原东南部横断山区居群12中同时出现,由此可以更进一步推测条纹狭蕊龙胆青藏高原东北部的居群(1、4、5和6)、高原东部的居群(2、3和7)和高原最南部的居群(13)是在间冰期或冰后期由居群8、9、10和12所在的避难所发生范围扩张形成的,而

不是子遗类群。这些扩张后的居群缺乏原始单倍型(Hap D和Hap G)的原因可能是由于在扩张过程中伴随有严重的瓶颈效应或奠基者效应,同时原始的单倍型很有可能被新近分化出来的单倍型(Hap A或Hap B)所替代(Hewitt, 1996)。这一结论与青藏高原两种木本植物祁连圆柏和青海云杉的研究结果是一致的(Zhang et al., 2005; Meng et al., 2007);而单倍型Hap C和Hap G组巢而成的支系1-2和单倍型Hap D、Hap E和Hap F组成的支系1-3经NCA分析后,推测其历史成因分别是由于异域和过去片段化而造成的。这是因为包括居群12(固定原始单倍型Hap G)的高原东南部横断山区避难所与居群8和9所在的横断山东北部边缘地区,在第四纪冰期时可能各自成为避难所,间冰期或冰期后由于受地理隔离(岷山山系)的影响,使得横断山东北部边缘地区的居群发生异域片段化。至于过去片段化的历史成因,我们认为横断山东北部边缘地区的居群8和9(固定单倍型Hap D和Hap E)、高原东部边缘居群10(固定单倍型Hap D)与高原邻近高山(宁夏六盘山)地区居群11(固定特有单倍型Hap F)之间,可能由于晚第三纪时期高原迅速隆升事件造成的青藏高原和邻近黄土高原大的山脉形成(陶君容, 1992),使得条纹狭蕊龙胆在这一带扩散形成的居群发生生境片段化,以母系遗传(种子传播)为主的基因交流匮乏,从而形成当前格局,而居群11却已被新分化出来的特有单倍型Hap F所代替。就整个地理分布区的单倍型(整个支系)分布格局而言,范围扩张是主要的历史成因,而我们进行的两种中性检验值(Tajima's $D = -0.654$, Fu and Li's $D^* = -0.519$)和歧点分布分析结果(图3)也表明了条纹狭蕊龙胆可能经历居群近期扩张的过程,因此也对上述的推论给予了支持。总之,上述的结论也在青藏高原的两种木本植物中存在,对青藏高原祁连圆柏和青海云杉的分子亲缘地理学研究表明青藏高原东南部边缘地区是冰期时的避难所,这两种植物的居群是在冰后期从高原边缘的避难所重新扩散到青藏高原,而不是它们曾广布于当地后来由于生境片段化而隔离存在的子遗类群(杨瑞等, 2005; Zhang et al., 2005; 张茜等, 2005; Meng et al., 2007)。那么,是否青藏高原的植物类群都经历了上述的进化模式,还需检测更多的植物类群来得以证实。

致谢 国家自然科学基金(30170066, 30370284, 30670130)资助。

参考文献

- Abbott RJ, Comes HP. 2004. Evolution in the Arctic: a phylogeographic analysis of the circumarctic plant, *Saxifraga oppositifolia* (Purple saxifrage). *New Phytologist* 161: 211–224.
- Abbott RJ, Smith LC, Milne RI, Crawford RMM, Wolff K, Balfour J. 2000. Molecular analysis of plant migration and refugia in the Arctic. *Science* 289: 1343–1346.
- Alsos IG, Engelskjøn T, Gielly L, Taberlet P, Brochmann C. 2005. Impact of ice ages on circumpolar molecular diversity: insights from an ecological key species. *Molecular Ecology* 14: 2739–2753.
- Afzal-Rafii Z, Dodd RS. 2007. Chloroplast DNA supports a hypothesis of glacial refugia over postglacial recolonization in disjunct populations of black pine (*Pinus nigra*) in western Europe. *Molecular Ecology* 16: 723–736.
- Avise JC. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.
- Axelrod DI, Al-Shebaz I, Raven PH. 1996. History of the modern flora of China. In: Zhang A, Wu S-G eds. *Floristic characteristics and diversity of East Asian plants*. Beijing: China Higher Education Press. 43–45.
- Bandelt HJ, Forster P, Rohlf A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37–48.
- Belaj A, Munoz-Diez C, Baldoni L. 2007. Genetic diversity and population structure of wild olives from the North-western mediterranean assessed by SSR markers. *Annals of Botany* 100: 449–458.
- Bittkau C, Comes HP. 2005. Evolutionary processes in a continental island system: molecular phylogeography of the Aegean *Nigella arvensis* alliance (Ranunculaceae) inferred from chloroplast DNA. *Molecular Ecology* 14: 4065–4083.
- Castelloe J, Templeton AR. 1994. Root probabilities for intraspecific gene trees under neutral coalescent theory. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 3: 102–113.
- Chen S-Y (陈生云). 2005. Studies on molecular systematics of *Metagentiana* and related taxa (Gentianaceae). Thesis of Master Degree 23–24.
- Chen S-Y, Xia T, Wang Y-J, Liu J-Q, Chen S-L. 2005. Molecular systematics and biogeography of *Crawfordia*, *Metagentiana* and *Tripterospermum* (Gentianaceae) based on nuclear ribosomal and plastid DNA sequences. *Annals of Botany* 96: 413–424.
- Cheng Y-P, Hwang S-Y, Lin T-P. 2005. Potential refugia in Taiwan revealed by the phylogeographical study of *Castanopsis carlesii* Hayata (Fagaceae). *Molecular Ecology* 14: 2075–2085.
- Chiang TY, Chiang YC, Chen YJ, Chou CH, Havanond S, Hong TN, Huang S. 2001. Phylogeography of *Kandelia candel* in East Asiatic mangroves based on nucleotide

- variation of chloroplast and mitochondrial DNAs. *Molecular Ecology* 10: 2697–2710.
- Clegg MT, Gaut BS, Learn GH, Morton RR. 1994. Rates and pattern of chloroplast DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91: 6795–6801.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material. *Phytochemical Bulletin* 19: 11–15.
- Ehrich D, Gaudeul M, Assefa A, Koch MA, Mummenhoff K, Nemomissa S, Consortium I, Brochmann C. 2007. Genetic consequences of Pleistocene range shifts: contrast between the Arctic, the Alps and the East African mountains. *Molecular Ecology* 16: 2542–2559.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2006. Arlequin 3.01: An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. Switzerland: Institute of Zoology, University of Berne.
- Excoffier LP, Smouse E, Quattro JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479–491.
- Fu Y-X, Li W-H. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133: 693–709.
- Fujii N, Tomaru N, Okuyama K, Koike T, Mikami T, Ueda K. 2002. Chloroplast DNA phylogeography of *Fagus crenata* (Fagaceae) in Japan. *Plant Systematics and Evolution* 232: 21–33.
- Hamilton MB. 1999. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology* 8: 521–523.
- Hewitt G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907–913.
- Hewitt G M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58: 247–276.
- Ho T-N, Chen S-L, Liu S-W. 2002. *Metagentiana*, a new genus of Gentianaceae. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 43: 83–91.
- Ho T-N, Pringle JS. 1995. Gentianaceae. In: Wu ZY, Raven PH eds. *Flora of China*. Beijing: Science Press; St. Louis: Missouri Botanical Garden. 16: 1–140.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754–755.
- Ibrahim KM, Nichols RA, Hewitt GM. 1996. Spatial patterns of genetic variation generated by different forms of dispersal during range expansion. *Heredity* 77: 282–291.
- Ikeda H, Senni KEI, Fujii N, Setoguchi H. 2006. Refugia of *Potentilla matsumurae* (Rosaceae) located at high mountains in the Japanese archipelago. *Molecular Ecology* 15: 3731–3740.
- Ikeda H, Setoguchi H. 2007. Phylogeography and refugia of the Japanese endemic alpine plant, *Phyllodoce nipponica* M. (Ericaceae). *Journal of Biogeography* 34: 169–176.
- Koch MA, Kiefer C, Ehrich D, Vogel J, Brochmann C, Mummenhoff K. 2006. Three times out of Asia Minor: the phylogeography of *Arabis alpina* L. (Brassicaceae). *Molecular Ecology* 15: 825–839.
- Kong Z-C (孔昭宸), Du N-Q (杜乃秋), Shan F-S (山发寿). 1996. A preliminary study of vegetational changes in space-time on Qinghai-Xizang plateau since late Cenozoic. *Acta Micropalaeontologica Sinica* (微体古生物学报) 13: 339–351.
- Larget B, Simon DL. 1999. Markov chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 16: 750–759.
- Li X-W (李锡文), Li J (李捷). 1993. A preliminary floristic study on the seed plants from the region of Hengduan Mountain. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究) 15: 217–231.
- Lu S-Y, Hong K-H, Liu S-L, Cheng Y-P, Wu W-L, Chiang T-Y. 2002. Genetic variation and population differentiation of *Michelia formosana* (Magnoliaceae) based on cpDNA variation and RAPD fingerprints: relevance to post-Pleistocene recolonization. *Journal of Plant Research* 115: 203–216.
- Maddison DR. 1991. The discovery and importance of multiple islands of most-parsimonious trees. *Systematic Zoology* 40: 315–318.
- Mantel N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209–220.
- Meng L-H, Yang R, Abbott RJ, Miede G, Hu T-H, Liu J-Q. 2007. Mitochondrial and chloroplast phylogeography of *Picea crassifolia* Kom. (Pinaceae) in the Qinghai-Tibetan Plateau and adjacent highlands. *Molecular Ecology* 16: 4128–4137.
- Mogensen HL. 1996. The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants. *American Journal of Botany* 83: 383–404.
- Naciri Y, Gaudeul M. 2007. Phylogeography of the endangered *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae) in the European Alps. *Molecular Ecology* 16: 2721–2733.
- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press.
- Petit RJ, Aguinalalde I, de Beaulieu JL, Bittkau C, Brewer S, Cheddadi R, Ennos R, Fineschi S, Grivet D, Lascoux M, Mohanty A, Muller-Starck GM, Demesure-Musch B, Palme A, Martin JP, Rendell S, Vendramin GG. 2003. Glacial refugia: Hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science* 300: 1563–1565.
- Petit RJ, Grivet D. 2002. Optimal randomization strategies when testing the existence of a phylogeographic structure. *Genetics* 161: 469–471.
- Pons O, Petit RJ. 1996. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics* 144: 1237–1245.
- Posada D, Crandall KA, Templeton AR. 2000. GEODIS: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology* 9: 487–488.
- Quade J, Cerling TE, Bowman JR. 1989. Development of Asian monsoon revealed by marked ecological shift during the latest Miocene in northern Pakistan. *Nature* 342: 163–165.
- Qu YH, Ericson PGP, Lei FM, Li SH. 2005. Postglacial colonization of the Tibetan plateau inferred from the matrilineal genetic structure of the endemic red-necked snow finch, *Pygilauda ruficollis*. *Molecular Ecology* 14: 1767–1781.
- Raymond M, Rousset F. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280–1283.
- Rogers AR, Harpending H. 1992. Population growth makes

- waves in the distribution of pairwise differences. *Molecular Biology and Evolution* 9: 552–569.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.
- Rozas J, Sanchez-DeI Barrie JC, Messeguer X, Rozas R. 2003. DNASP: DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496–2497.
- Schönswetter P, Popp M, Brochmann C. 2006. Rare arctic-alpine plants of the European Alps have different immigration histories: the snow bed species *Minuartia biflora* and *Ranunculus pygmaeus*. *Molecular Ecology* 15: 709–720.
- Shen L (沈浪), Chen X-Y (陈小勇), Li Y-Y (李媛媛). 2002. Glacial refugia and postglacial recolonization patterns of organisms. *Acta Ecologica Sinica (生态学报)* 22: 1983–1990.
- Shi Y-F (施雅风), Li J-J (李吉均), Li B-Y (李炳元). 1998. Uplift and Environmental Changes of Qinghai-Tibetan Plateau in the Late Cenozoic (青藏高原晚新生代隆升与环境变化). Guangzhou, China: Guangdong Science and Technology Press.
- Slatkin M. 1985. Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16: 393–430.
- Smouse PE, Long JC, Sokal. 1986. Multiple regression and correlation extensions of the Mantel test of matrix correspondence. *Systematic Zool* 35: 627–632.
- Stehlik I, Blattner FR, Holderegger R, Bachmann K. 2002. Nunatak survival of the high Alpine plant *Eritrichium nanum* (L.) Gaudin in the central Alps during the ice ages. *Molecular Ecology* 11: 2027–2036.
- Sun H-L (孙鸿烈), Zheng D (郑度). 1998. Formation, evolution and development of Qinghai-Xizang (Tibet) Plateau (青藏高原形成演化与发展). Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press.
- Swofford DL. 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods). Version 4.0b10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 7: 381–397.
- Tao J-R (陶君容). 1992. The Tertiary vegetation and flora and floristic regions in China. *Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报)* 30: 25–42.
- Templeton AR, Boerwinkle E, Sing CF. 1987. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of Alcohol Dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetic* 117: 343–351.
- Templeton AR, Crandall KA, Sing CF. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132: 619–633.
- Templeton AR. 2004. Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology* 13: 789–809.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876–4882.
- Tremblay NO, Schoen DJ. 1999. Molecular phylogeography of *Dryas integrifolia*: glacial refugia and postglacial recolonization. *Molecular Ecology* 8: 1187–1198.
- Wang W-T (王文采). 1992. On some distribution patterns and some migration routes found in the Eastern Asiatic region (cont.). *Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报)* 30: 97–117.
- Ward FK. 1927. The Sino-Himalaya Flora. *Proceedings of the Linnean Society of London* 136: 67–74.
- Ward FK. 1935. Sketch of the geography and botany of Tibet. *Proceedings of the Linnean Society of London* 148: 138–158.
- Weir BS, Cockerham CC. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358–1370.
- Widmer A, Baltisberger M. 1999. Extensive intraspecific chloroplast DNA (cpDNA) variation in the alpine *Draba aizoides* L. (Brassicaceae): haplotype relationships and population structure. *Molecular Ecology* 8: 1405–1415.
- Wu C Y. 1980. The vegetation of China. Beijing: Science Press.
- Wu C Y. 1987. Origin and Evolution of Flora of Xizang. In: Wu CY ed. *Flora Xizangica*. Beijing: Science Press. 874–902.
- Wu C-Y (吴征镒). 1979. The regionalization of Chinese flora. *Acta Botanica Yunnanica (云南植物研究)* 1: 1–22.
- Wu S-G (武素功), Yang Y-P (杨永平), Fei Y (费勇). 1995. On the flora of the alpine region in the Qinghai-Xizang (Tibet) Plateau. *Acta Botanica Yunnanica (云南植物研究)* 17: 233–250.
- Wu Z-Y. 1988. Hengduan mountain flora and her significance. *Journal Japanese Botany* 63: 297–311.
- Yang R (杨瑞), Meng L-H (孟丽华), Zhang Q (张茜), Liu J-Q (刘建全). 2005. The mitochondrial DNA *nad1* sequence variation of *Picea crassifolia* (Pinaceae) in the Qinghai-Tibetan plateau platform and adjacent populations. *Acta Ecologica Sinica (生态学报)* 25: 3307–3313.
- Yang S-J, Yin Z-H, Ma X-M, Lei F-M. 2006. Phylogeography of ground tit (*Pseudopodoces humilis*) based on mtDNA: Evidence of past fragmentation on the Tibetan Plateau. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41: 257–265.
- Zhang Q, Chiang TY, George M, Liu J-Q, Abbott RJ. 2005. Phylogeography of the Qinghai-Tibetan Plateau endemic *Juniperus przewalskii* (Cupressaceae) inferred from chloroplast DNA sequence variation. *Molecular Ecology* 14: 3513–3524.
- Zhang Q (张茜), Yang R (杨瑞), Wang Q (王钦), Liu J-Q (刘建全). 2005. Phylogeography of *Juniperus przewalskii* (Cupressaceae) inferred from the chloroplast DNA *trnT-trnF* sequence variation. *Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报)* 43: 503–512.