

基于查尔酮合酶基因探讨鲜卑花的种群动态历史与遗传分化

付鹏程^{1,3} 高庆波¹ 张发起¹ 陈世龙^{1,2*}

(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. 青海省作物分子育种重点实验室, 西宁 810001; 3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要 以高山灌木鲜卑花为研究材料, 收集其在中国全部分布区域内的 13 个居群共 139 个个体, 以查尔酮合酶基因 (*CHS*) 的内含子区域为分子标记, 探讨鲜卑花的种群动态历史、遗传分化的时间与成因。在鲜卑花中 *CHS* 共鉴定了 29 种单倍型, 单倍型多样性和核苷酸多样性分别为 0.924 8 和 0.007 545, 遗传变异大; 贝叶斯分析说明鲜卑花种内遗传分化的时间始于 4.37 Ma 左右。中性检验与歧点分布分析一致表明鲜卑花在近期经历了明显的居群扩张, 估算的扩张时间在 55.8 ka 左右。研究结果表明鲜卑花在末次冰期间冰阶时期从冰期避难所向外经历了明显的居群扩张; 而青藏高原的整体隆升导致的环境剧变, 加剧了鲜卑花居群间的遗传分化。

关键词 鲜卑花; 种群动态历史; 遗传分化; 查尔酮合酶

中图分类号: S727.34 文献标志码: A doi:10.7525/j.issn.1673-5102.2014.05.018

Demography History and Genetic Divergence of *Sibiraea laevigata* (Rosaceae) Based on Chalcone Synthase Gene

FU Peng-Cheng^{1,3} GAO Qing-Bo¹ ZHANG Fa-Qi¹ CHEN Shi-Long^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001; 2. Qinghai Province Key Laboratory of Crop Molecular Breeding, Xining 810001; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract The demography history and genetic divergence of alpine shrub *Sibiraea laevigata* were studied with 13 populations (139 individuals) collected in the whole distribution area in China, using the intron of chalcone synthase (*CHS*) as molecular marker. A total of 29 haplotypes were identified in *S. laevigata*, indicating high haplotype diversity and nucleotide diversity which were 0.924 8 and 0.007 545, respectively. Bayesian calculation illustrated the genetic divergence in *S. laevigata* began at around 4.37 Ma, proved that the uplift of Qinghai-Tibetan Plateau triggered the genetic divergence. Neutrality test and mismatch distribution analysis consistently indicated the populations of *S. laevigata* had experienced recent population expansion at about 55.8 ka.

Key words *Sibiraea laevigata*; demography history; genetic divergence; chalcone synthase

鲜卑花 (*Sibiraea laevigata* (L.) Maxim.) 隶属蔷薇科 (Rosaceae) 绣线菊亚科 (Spiraeoideae) 鲜卑花属 (*Sibiraea*), 落叶灌木, 生于海拔 2 300 ~ 4 000 m 的山坡、灌丛或河滩, 主要分布在青藏高原, 是青藏高原灌丛的主要建群种之一, 在哈萨克斯坦、西伯利亚地区、克罗地亚也有分布^[1~2]。鲜卑花与其同属种窄叶鲜卑花以其叶和嫩枝入药, 称为柳茶, 为藏族民间常用药, 主要用于健脾胃、疏散风热^[3]。现代药理研究表明鲜卑花具有调节

脂质代谢、保肝的功效^[4~5]。对欧洲及西伯利亚地区鲜卑花叶绿体片段的限制酶切分析表明采自这些地方的居群在居群间和居群内都没有遗传差异, 核糖体 DNA 转录间隔区 (ITS) 的测序结果仅观测到很少的碱基突变^[6], 遗传多样性很低。目前, 对分布在我国的鲜卑花的研究尚未见报道。

以往在研究野生植物的遗传结构时所采用的分子标记大多是叶绿体小片段和 ITS, 其他的核基因运用很少。查尔酮合成酶 (Chalcone synthase,

基金项目: 国家自然科学基金 (31270270; 31110103911) 和中国科学院知识创新工程重要方向性项目资助 (KSCX2-EW-Z-1)

第一作者简介: 付鹏程 (1988—) 男, 博士研究生, 主要从事植物分子遗传多样性研究。

* 通信作者: E-mail: slchen@nwipb.cas.cn

收稿日期: 2014-03-19

CHS) 是合成类黄酮色素生物次生代谢过程的关键酶, 而类黄酮物质与植物的颜色、抗病、防 UV 损伤、生长素的运输、花粉的育性等均有关^[7], 因此 *CHS* 的研究受到广泛的重视。*CHS* 基因在裸子植物和被子植物中均存在, 且在大多数物种中有两个外显子和一个内含子, 而且这个内含子的位置在已发现的序列中均相同, 即位于第 65 位(以欧洲赤松 *Pinus sylvestris* 的 PSCHS 为标准)的半胱氨酸密码子内第 1 和 2 位碱基之间(1 相), 其长度从几十碱基对到几千碱基对不等^[8]。*CHS* 基因在植物的分子进化与系统发育研究中也一直被不断利用, 但多用 *CHS* 的第二个外显子或全序列, 如被子植物的菊科^[9]、茄科^[10]、旋花科^[10]、十字花科^[11-12]、紫罗兰属^[13], 用 *CHS* 内含子为标记的研究目前仅花烛属^[14]一例。鉴于内含子的变异更大, 我们用

CHS 的内含子序列来分析鲜卑花种内的遗传变异和遗传结构, 探讨其种群动态历史与遗传分化的成因。

1 材料和方法

1.1 材料

本研究中的鲜卑花有 13 个居群共 139 个个体, 这些居群覆盖了鲜卑花在中国现今的所有分布范围。采样时沿一个切面进行, 每个个体间相距至少 30 m。对于个体数多于 100 个群体, 采样数在 15 个以上; 个体数小于 100 个的群体, 根据采样间距确定采样个体数, 但保证所采居群个体数不少于 4 个。采集的新鲜叶片用硅胶快速干燥, 密封保存在 -20°C 中。详细的采样信息见表 1。

表 1 鲜卑花采样信息与各居群的遗传多样性

Table 1 Sampling information of *S. laevigata* populations and their genetic diversity

居群编号 Population No.	采样点 Locality	凭证标本号 Voucher Ref.	海拔 Altitude(m)	个体数 No.	单倍型多样性 Haplotype diversity (<i>h</i>)	核苷酸多样性 Nucleotide diversity (π)
P1	玛沁县 Maqin, Qinghai	chensl2011006	3 660	6	0.8667 + / - 0.1291	0.003857 + / - 0.003149
P2	达日县 Dari, Qinghai	chensl1367	4 090	14	0.8571 + / - 0.0736	0.005903 + / - 0.003914
P3	祁连县 Qilian, Qinghai	chensl2011081	2 880	19	0.9006 + / - 0.0390	0.007024 + / - 0.004410
P4	门源县 Menyuan, Qinghai	chensl2011089	3 150	17	0.8750 + / - 0.0576	0.006158 + / - 0.003992
P5	互助县 Huzhu, Qinghai	chensl2011097	3 250	4	1.0000 + / - 0.1768	0.007805 + / - 0.006156
P6	平安县 Ping'an, Qinghai	chen2012006	3 160	16	0.8833 + / - 0.0612	0.007140 + / - 0.004518
鲜卑花 <i>S. laevigata</i>	P7	夏河县 Xiahe, Sichuan	3 210	17	0.8971 + / - 0.0421	0.005915 + / - 0.003866
	P8	若尔盖县 Ruergai, Sichuan	3 280	12	0.8939 + / - 0.0777	0.007889 + / - 0.005022
	P9	若尔盖县 Ruergai, Sichuan	3 150	4	1.0000 + / - 0.1768	0.007805 + / - 0.006156
	P10	若尔盖县 Ruergai, Sichuan	3 630	8	0.9286 + / - 0.0844	0.006002 + / - 0.004220
	P11	班玛县 Banma, Qinghai	chen2012322	3 630	4	0
P12	玉树县 Yushu, Qinghai	chen2012349	4 450	9	0.5556 + / - 0.1653	0.001684 + / - 0.001657
P13	渭源县 Weiyuan, Gansu	chen2013018	2 550	9	0.8889 + / - 0.0910	0.005357 + / - 0.003793
总计 Total				139	0.9248 + / - 0.0091	0.007545 + / - 0.004457
陕甘花楸 <i>Sorbus koehneana</i>	阿坝县 Aba, Sichuan	chen1193	2 970	2		
华北珍珠梅 <i>Sorbaria kirilowii</i>	若尔盖县 Ruergai, Sichuan	chen2034	3 150	2		

1.2 DNA 提取、片段扩增与测序

采用改良的 CTAB 法^[15]提取总 DNA, 用 1% 琼脂糖检测, 并用 NanoDrop 2000 分光光度计 (Thermo Scientific) 测量每个样品的浓度, 随后均稀释到 $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 左右以便 PCR 扩增。用 GenBank 中蔷薇科的 *CHS* 序列, 设计 3 对特异性引物(表 2)。

用 24 个样检验 3 对引物, 得到扩增良好、多态性高的引物 CHS-S2, 随后用其对所有个体进行 PCR 扩增, 扩增体系与反应条件见表 3。PCR 扩增产物经纯化, 在中国科学院高原生物适应与进化重点实验室中用 BigDye v3.1 (Applied Biosystems, USA) 和测序仪 ABI 3730xl (Applied Biosystems, USA) 进行双向测序。

表 2 扩增 *CHS* 片段的引物序列Table 2 Primer sequences of *CHS* fragment amplification

nrDNA 区域 nrDNA region	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'-3')	参考文献 Reference
<i>CHS</i> -S1	<i>CHS</i> -S1F	TCAARGGAAAATTTCAGCGCATGT	本研究 This study
	<i>CHS</i> -S1R	CGYTTCTTGATCATWGAYTTGTCRC	
<i>CHS</i> -S2	<i>CHS</i> -S2F	GTYGAGGAAGTYCGCAAAGGCTCA	本研究 This study
	<i>CHS</i> -S2R	GCATCRAKTGAAGDGGCCATGTACTC	
<i>CHS</i> -S3	<i>CHS</i> -S3F	TNAARGAVAARTTYMAGCGMATGT	本研究 This study
	<i>CHS</i> -S3R	TTBYTDATCATNGAYTTKTCRC	

表 3 *CHS* 片段的 PCR 扩增体系与扩增程序Table 3 Reaction system and amplification procedure for *CHS* fragment amplification

反应体系 Reaction system		扩增程序 Amplification procedure	
反应成分 Ingredient	剂量 Dosage (μL)	反应温度 Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	反应时间 Time
ddH ₂ O	18.1	94	4min
10 × Buffer(+ Mg ²⁺)	2.5	94	45s
DMSO	1.5	57	40s
dNTP(10 mmol · L ⁻¹)	0.3	72	35s
<i>CHS</i> -S2F(10 mmol · L ⁻¹)	0.4	72	7min
<i>CHS</i> -S2R(10 mmol · L ⁻¹)	0.4	16	1h
Taq polymerase(5 U · μL^{-1})	0.3		
DNA template	1.5(15 ng)	35cycles	
总计 Total	25		

1.3 数据分析

所得到的的序列用 ClustalX 2.0.12^[16] 比对, 并加以手工校对, 随后用软件 DnaSP5.1^[17] 统计单倍型(haplotype)个数。在 ARLEQUIN 3.5.1.3^[18] 中计算鲜卑花的基因多态性(h)与核苷酸多态性(π)。用 PERMUTcPSSR^[19] 计算居群内平均遗传多样性(average within population diversity h_S)、总的遗传多样性(total haplotype diversity h_T)以及居群遗传分化系数 G_{ST} 和 N_{ST} ^[19], 并对算得的 G_{ST} 和 N_{ST} 做 1 000 次重复的置换检验, 以检测单倍型的分布是否具有显著的地理结构。运用 ARLEQUIN 软件包中的分子变异分析软件(analysis of molecular variance, AMOVA)^[20] 检测整个分布区内遗传变异在居群间和居群内的分布情况。中性检测的 Fu's F_s 和 Tajima's D 值, 以及歧点分布(mismatch distribution)分析也在 ARLEQUIN 中完成(1 000 次重复的置换检验)。根据公式 $t =$

$\tau/2\mu$ ^[21] 估算居群扩张的时间, 其中 τ 为用 Arlequin 软件进行歧点分布分析得到的 Tau 值, $\mu = uk/g$ 其中 u 为碱基替换速率, k 为核苷酸片段的长度, g 为物种的世代周期。由于本研究所用的主要为 *CHS* 的内含子, 且在 GenBank 上做蛋白比对发现与蔷薇科其他属相比没有氨基酸变异, 因此我们采用十字花科同义替换速率 $1.5 \times 10^{-8} \text{ ss}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ ^[22]; 根据野外观察, 确定鲜卑花的世代周期为 5 年。

以华北珍珠梅、陕甘花楸为外类群, 用软件 BEAST 1.7.5^[23], 基于贝叶斯马尔科夫链-蒙特卡洛链方法(Bayesian MCMC)同时估算鲜卑花各分支演化关系和各分支分化年龄。用 ModelTest 3.7^[24] 中基于 Akaike information criterion(AIC) 标准计算核苷酸替换模型, 分支模型选用 Yule process、严格分子钟模型进行计算。分歧时间的估算用绣线菊亚科的古老类群珍珠梅属的化石记录(65 million years ago, Ma)^[25] 来标定外类群的共同祖先时间。分析时做 3 次独立运算, 每次运算 10 000 000 代, 每隔 1 000 代取一棵树, 去掉前 20% 的预热树(Burn-in), 仅保留余下的 80% 为有效树。用 LogCombiner 1.7.5^[23] 把 3 次运行的日志文件和树文件分别合并成一个文件, 用 Tracer 1.5^[26] 查看有效采样规模(effective sample size, ESS), 保证所有指标均大于 200。用 TreeAnnotator 1.7.5^[23] 基于合并的有效树产生一棵分支分化时间树并计算相关参数和后验分布概率, 最后用 FigTree 1.4^[27] 查看各分支关系及分化时间等结果。

2 结果与分析

2.1 遗传多样性

将序列对位排列后, 得到 363 bp 序列, 包含 1 处单碱基缺失, 11 处碱基突变, 这些变异在鲜卑花的所有个体中共定义了 29 种单倍型(GenBank No. KJ161986-KJ162014)。各个居群的单倍型多样性(h)与核苷酸多样性(π)见表 1, 共有 84.6% 的居群的 h 大于 0.80, 76.9% 的居群的 π 大于 0.005, 仅有一个居群的遗传多样性为 0.0(P11), 表现出很高的居群内的遗传多样性。种内平均单倍型多样性和核苷酸多样性分别为 0.924 8 和 0.007 545, 体现了很高的种内遗传多样性。居群内平均遗传多样性 h_S 为 0.800, 总的遗传多样性 h_T 为 0.926, 遗传分化系数 N_{ST} 和 G_{ST} 分别为 0.291 和 0.136, 且 N_{ST} 显著大于 G_{ST} ($P < 0.01$), 说明鲜

卑花具有显著的谱系地理结构。AMOVA 结果表明,少量的遗传变异(21.99%)发生在居群间,而主要的变异(78.01%)则发生在居群内(表4)。

表4 鲜卑花 AMOVA 分析结果
Table 4 Result of AMOVA in *S. leavigata*

变异来源 Source of variation	自由度 d.f.	平方和 Sum of squares	方差分量 Variance components	变异比例 Percentage of variation
居群间 Among populations	12	51.563	0.30636Va	21.99
居群内 Within populations	126	136.969	1.08706Vb	78.01

2.2 种群动态历史

在歧点分布分析中,单峰曲线说明种群在近期发生过种群扩张,而多峰曲线说明在较长时间内种群大小相对稳定,并处于个体平衡中^[21-28]。中性检验中若 Tajima's *D* 或 Fu's *F_s* 显著性地为负值,认为群体近期发生了居群扩张^[29-30]。鲜卑花的歧点分布分析的结果如图1,观测值与期望值为明显的单峰曲线。中性检验的 Fu's *F_s* 为 -15.93,且极显著($P=0.00$);Tajima's *D* 为 0.556,不显著($P=0.78$)。两种分析共同表明鲜卑花经历了近期的居群扩张,Tau 值为 3.04,并计算得到居群的扩张时间在 5.58 万年左右。

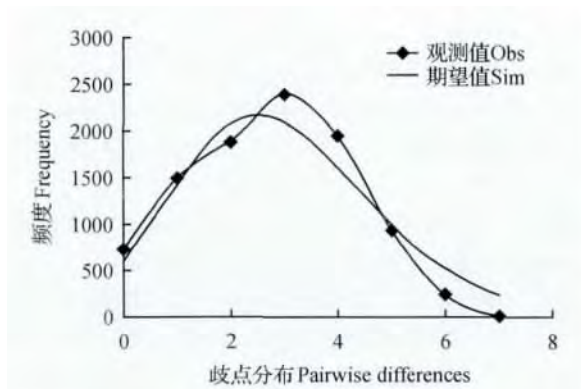


图1 基于 CHS 的鲜卑花歧点分布分析曲线图
Fig.1 Mismatch distribution analysis of *S. leavigata* based on CHS

2.3 遗传分化时间

用鲜卑花 CHS 序列的核苷酸替换模型 GTR + I + G,以珍珠梅的化石记录作时间校准,BEAST 的分析结果表明,鲜卑花 CHS 各大分支在 4.37 Ma (2.26 ~ 6.98 Ma) 左右开始分化,各个小分支随后出现分化(图2)。

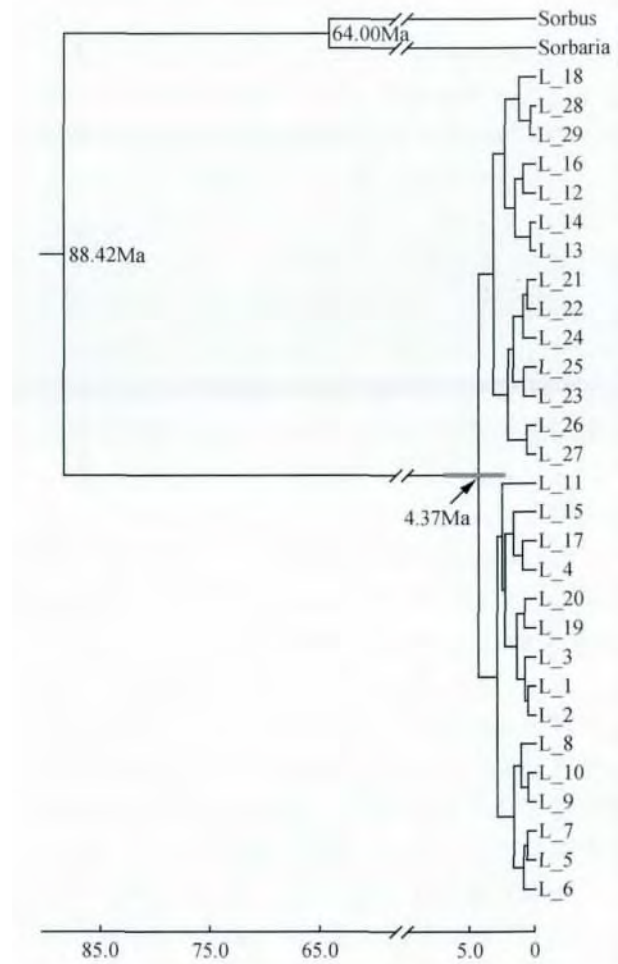


图2 以华北珍珠梅和陕甘花椒为外类群,用贝叶斯方法推测的鲜卑花 CHS 序列的系统发育关系与各谱系分支间的分化时间

Fig.2 Majority rule consensus phylogenetic tree of the CHS sequence types in *S. leavigata* based on the Bayesian inference and their divergence times with *Sorbaria kirilowii* and *Sorbus koehneana* as outgroup

3 讨论

在青藏高原的第四季冰期历史中,随着冰盖的扩张与消退,青藏高原地区的物种在冰期居群收缩,退缩到一个或多个避难所,然后在间冰期从避难所回迁到高原台面,发生居群扩张^[31-36]。末次间冰期以来,青藏高原气候发生了剧烈变化,如末次盛冰期(LGM, Last Glacial Maximum),随之而来的环境剧变影响了诸多物种的分布格局^[31-36]。而在末次冰期早冰阶由于温度降低,冰川大面积发育^[37-39],致使有些植物分布区缩小,退缩至避难所。中性检验与歧点分布分析清晰的显示,鲜

卑花在 5.58 万年前左右经历了居群扩张,这个时间处于末次冰期间冰阶,而青藏高原的末次间冰阶的温度已达到间冰期程度,是青藏高原的一个暖期^[37,39]。因此我们推测,鲜卑花在青藏高原的冰期因气候变冷退缩到避难所,然后在 5.58 万年前左右随着气候回暖、适宜分布区扩大,发生居群扩张,逐步形成现在的分布格局。

利用 *CHS* 基因在鲜卑花种内鉴定出很高的遗传分化水平,单个居群的基因多样性普遍高于 0.80 (84.6%),居群内平均遗传多样性 hS 为 0.800,总的遗传多样性 hT 为 0.926。相比青藏高原地区其他灌木或木本植物,如青海云杉 (*Picea crassifolia* ρ . 247 vs 0.272)^[31]、窄叶鲜卑花 (*Sibiraea angustata* ρ . 204 vs 0.796)^[33]、高山绣线菊 (*Spiraea alpina* ρ . 238 vs 0.817)^[35]、祁连圆柏 (*Juniperus przewalskii* ρ . 130 vs 0.568)^[40]等,鲜卑花表现出较高的遗传变异。这种较高的遗传变异一方面说明鲜卑花在进化过程中产生了很多的基因突变,形成了众多的单倍型。另一方面 *CHS* 基因在鲜卑花中的高变异也说明,其在研究灌木或木本植物遗传变异时具有较大的优势。

青藏高原在上新世后期至第四纪初 (3.6 ~ 1.7 Ma) 发生大规模快速隆升,随后的昆(仑)黄(河)运动 (1.1 ~ 0.6 Ma) 又使青藏高原进一步抬升,加之冰川的发育、冰期与间冰期的交替,使青藏高原的气候环境发生剧烈变化^[39,41]。已有的研究表明,青藏高原的隆起导致种内遗传变异水平升高和新物种的形成,如菊科三个属(橐吾属、垂头菊属和蟹甲草属)^[42]、柏科柏木属^[43]以及高原鼯鼠^[44]均由于青藏高原的隆起而出现遗传分化与新物种的形成。本研究中依据 *CHS* 计算鲜卑花种内的遗传分化时间约开始于 4.37 Ma,这个时间正好与青藏高原整体隆升时间相吻合。由此说明,青藏高原整体隆升而导致的环境剧变,促使了鲜卑花种内的遗传分化,使其达到较高的遗传分化水平,也进一步证明了青藏高原的隆升在植物遗传分化以及物种形成中发挥的重要作用。

致谢 感谢中国科学院武汉植物园孙姗姗博士协助设计 *CHS* 引物。

参 考 文 献

1. 刘尚武. 青海植物志 [M]. 青海: 青海人民出版社, 1999 (2): 67.

2. Gu C Z, Alexander C. *Sibiraea* [M]. // Wu Z Y, Raven P H et al. Flora of China. Beijing: Science Press, St. Louis: Miss Bot Gard Press, 2003: 73 - 74.
3. 甘肃省卫生局. 甘肃中草药手册: 第 3 册 [M]. 兰州: 甘肃人民出版社, 1973: 1554.
4. 王佳冰, 柴成奎, 陈平等. 藏药柳茶提取物对单纯性肥胖大鼠脂质代谢的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(2): 148 - 149.
5. 段博文, 李运, 刘昕等. 柳茶多糖对小鼠免疫功能的影响 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(11): 1466 - 1469.
6. Ballian D, Grebenc T, Božič G, et al. History, genetic differentiation and conservation strategies for disjunct populations of *Sibiraea* species from Southeastern Europe and Asia [J]. Conservation Genetics, 2006, 7(6): 895 - 907.
7. Martin C R. Structure, function, and regulation of the chalcone synthase [J]. International review of cytology, 1993, 147: 233 - 284.
8. 王金玲, 瞿礼嘉, 陈军等. *CHS* 基因外显子 2 的进化规律及其用于植物分子系统学研究的可行性 [J]. 科学通报, 2000, 45(9): 942 - 950.
9. 王彩云, 陈俊愉, Maarten A J. 菊花及其近缘种的分子进化与系统发育研究 [J]. 北京林业大学学报, 2004, 26(增刊): 91 - 96.
10. Huang J X, Qu L J, Yang J, et al. A preliminary study on the origin and evolution of chalcone synthase (*CHS*) gene in angiosperms [J]. Acta Botanica Sinica-English Edition, 2004, 46(1): 10 - 19.
11. Zhao B, Liu L, Tan D, et al. Analysis of phylogenetic relationships of Brassicaceae species based on *Chs* sequences [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2010, 38(4): 731 - 739.
12. Koch M A, Weisshaar B, Kroymann J, et al. Comparative genomics and regulatory evolution: conservation and function of the *Chs* and *Apetala3* promoters [J]. Molecular Biology and Evolution, 2001, 18(10): 1882 - 1891.
13. Caro S E, Stampfle J M, Greene M J, et al. Using a chalcone synthase gene to infer phylogenies in the genus *Saint-paulia* [J]. Bios, 2006, 77(3): 72 - 76.
14. Carlsen M M, Croat T B. A molecular phylogeny of the species-rich Neotropical genus *Anthurium* (Araceae) based on combined chloroplast and nuclear DNA [J]. Systematic Botany, 2013, 38(3): 576 - 588.
15. Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material [J]. Phytochemical Bulletin, 1987, 19: 11 - 15.
16. Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0 [J]. Bioinformatics, 2007, 23(21): 2947 - 2948.

17. Librado P ,Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. *Bioinformatics* , 2009 ,25(11) :1451 – 1452.
18. Excoffier L ,Lischer H E L. Arlequin suite ver 3. 5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows [J]. *Molecular ecology resources* 2010 ,10(3) :564 – 567.
19. Pons O ,Petit R J. Measuring and Testing Genetic Differentiation With Ordered Versus Unordered Alleles [J]. *Genetics* ,1996 ,144(3) :1237 – 1245.
20. Excoffier L ,Smouse P E ,Quattro J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data [J]. *Genetics* ,1992 ,131(2) :479 – 491.
21. Rogers A R ,Harpending H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences [J]. *Molecular biology and evolution* ,1992 ,9(3) :552 – 569.
22. Koch M A ,Haubold B ,Mitchell-Olds T. Comparative evolutionary analysis of chalcone synthase and alcohol dehydrogenase loci in *Arabidopsis* ,*Arabis* ,and related genera (Brassicaceae) [J]. *Molecular biology and evolution* , 2000 ,17(10) :1483 – 1498.
23. Drummond A J ,Suchard M A ,Xie D ,et al. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1. 7 [J]. *Molecular biology and evolution* 2012 ,29(8) :1969 – 1973.
24. Posada D ,Crandall K A. Modeltest: testing the model of DNA substitution [J]. *Bioinformatics* ,1998 ,14(9) :817 – 818.
25. 佟希达 杨秀娟 李珍 等. 晚白垩纪—新生代黑龙江植被发展概论 [J]. *植物研究* ,1995 ,15(2) :269 – 274.
26. Rambaut A ,Drummond A J. Tracer v1. 5. [CP]. Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
27. Rambaut A. FigTree v1. 4 [CP]. University of Edinburgh , Edinburgh ,UK. Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree> 2012.
28. Rogers A R. Genetic evidence for a Pleistocene population explosion [J]. *Evolution* ,1995 :608 – 615.
29. Fu Y X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth ,hitchhiking and background selection [J]. *Genetics* ,1997 ,147(2) :915 – 925.
30. Knowles L L ,Futuyma D J ,Eanes W F ,et al. Insight into speciation from historical demography in the phytophagous beetle genus *Ophraella* [J]. *Evolution* ,1999 :1846 – 1856.
31. Meng L ,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 – 4137.
32. Chen S ,Wu G ,Zhang D ,et al. Potential refugium on the Qinghai-Tibet Plateau revealed by the chloroplast DNA phylogeography of the alpine species *Metagentiana striata* (Gentianaceae) [J]. *Botanical Journal of the Linnean Society* 2008 ,157(1) :125 – 140.
33. Duan Y ,Gao Q ,Zhang F ,et al. Phylogeographic analysis of the endemic species *Sibiraea angustata* reveals a marginal refugium in the Qinghai-Tibet Plateau [J]. *Nordic Journal of Botany* 2011 ,29(5) :615 – 624.
34. Gao Q ,Zhang D ,Duan Y ,et al. Intraspecific divergences of *Rhodiola alsia* (Crassulaceae) based on plastid DNA and internal transcribed spacer fragments [J]. *Botanical Journal of the Linnean Society* 2012 ,168(2) :204 – 215.
35. Zhang F Q ,Gao Q B ,Zhang D J ,et al. Phylogeography of *Spiraea alpina* (Rosaceae) in the Qinghai-Tibetan Plateau inferred from chloroplast DNA sequence variations [J]. *Journal of Systematics and Evolution* 2012 ,50(4) :276 – 283.
36. Hewitt G. The genetic legacy of the Quaternary ice ages [J]. *Nature* 2000 ,405(6789) :907 – 913.
37. 姚檀栋 ,Thompson L G ,秦大河 等. 古里雅冰芯中末次间冰期以来气候变化记录研究 [J]. *科学通报* ,1996 ,27(5) :447 – 452.
38. Zheng B ,Xu Q ,Shen Y. The relationship between climate change and Quaternary glacial cycles on the Qinghai-Tibetan Plateau: review and speculation [J]. *Quaternary International* 2002 ,97:93 – 101.
39. 施雅风 李吉均 李炳元 等. 晚新生代青藏高原的隆升与东亚环境变化 [J]. *地理学报* ,1999 ,54(1) :10 – 20.
40. Zhang Q ,Chiang T Y ,George M ,et al. Phylogeography of the Qinghai-Tibetan Plateau endemic *Juniperus przewalskii* (Cupressaceae) inferred from chloroplast DNA sequence variation [J]. *Molecular Ecology* 2005 ,14:3513 – 3524.
41. 李吉均. 青藏高原的地貌演化与亚洲季风 [J]. *海洋地质与第四纪地质* ,1999 ,19(1) :1 – 11.
42. Liu J Q ,Wang Y J ,Wang A L ,et al. Radiation and diversification within the *Ligularia-Cremanthodium-Parasenecio* complex (Asteraceae) triggered by uplift of the Qinghai-Tibetan Plateau [J]. *Molecular phylogenetics and evolution* 2006 ,38(1) :31 – 49.
43. Xu T ,Abbott R ,Milne R ,et al. Phylogeography and allopatric divergence of cypress species (*Cupressus* L.) in the Qinghai-Tibetan Plateau and adjacent regions [J]. *BMC evolutionary biology* 2010 ,10(1) :194.
44. Tang L Z ,Wang L Y ,Cai Z Y ,et al. Allopatric divergence and phylogeographic structure of the plateau zokor (*Eospalax baileyi*) , a fossorial rodent endemic to the Qinghai-Tibetan Plateau [J]. *Journal of Biogeography* 2010 ,37(4) :657 – 668.