

DOI: 10.5846/stxb201409011737

高文荣, 王政昆, 姜文秀, 朱万龙. 云南高山姬鼠头骨的几何形态学研究. 生态学报, 2016, 36(6): - .

Gao W R, Wang Z K, Jiang W X, Zhu W L. Geometric morphometric research of the skull of *Apodemus chevrieri* from Yunnan Province. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36(6): - .

云南高山姬鼠头骨的几何形态学研究

高文荣^{1, 2}, 王政昆², 姜文秀², 朱万龙^{2, *}

1 云南师范大学能源与环境科学学院, 昆明 650500

2 云南省高校西南山地生态系统动植物生态适应进化及保护重点实验室, 云南师范大学生命科学学院, 昆明 650500

摘要:表型可塑性是指同一基因型在不同环境条件下而产生多种不同表现型的反应能力。哺乳动物头骨形态的变化是在进化过程中出现的重要表型特征之一。云南省地势西高东低、海拔变化剧烈, 是古北界寒带物种南迁, 中南半岛热带物种北移的交汇地, 自然环境的地带性和非地带性变化明显, 栖息在该地区的动物为了适应多样的环境, 可能出现不同的表型分化。高山姬鼠(*Apodemus chevrieri*)为我国特有种, 主要分布在中国西南的横断山及其附近地区, 是研究表型与生态适应之间关系的理想物种。为研究在云南特殊生态环境下物种的微进化, 本研究采用几何形态学的方法测量云南不同地区高山姬鼠头骨形态的变异, 采用线粒体细胞色素 *b* (Cytochrome *b*, Cyt *b*) 基因和线粒体控制区 (Mitochondrial control region, D-loop) 探讨基因型的变化。结果显示: 昆明种群与横断山种群 (中甸、剑川、丽江) 间发生了明显的形态变异和遗传分化, 高山姬鼠头骨背面和腹面, 横断山种群和滇中昆明种群很少重叠, 这两个种群变异较大; 但头骨的侧面和下颌侧面变异不明显。因此, 分布于云南地区的高山姬鼠可能正处于生态物种形成的早期阶段。

关键词:高山姬鼠; 头骨形态; 几何形态测量; 遗传分化

Geometric morphometric research of the skull of *Apodemus chevrieri* from Yunnan Province

GAO Wenrong^{1, 2}, WANG Zhengkun², JIANG Wenxiu², ZHU Wanlong^{2, *}

1 School of Energy and Environmental Science, Yunnan Normal University, Kunming 650500, China

2 Key Laboratory of Ecological Adaptive Evolution and Conservation on Animals-Plants in Southwest Mountain Ecosystem of University in Yunnan Province, School of Life Science, Yunnan Normal University, Kunming 650500, China

Abstract: Phenotypic plasticity is the capacity of individuals to modify their phenotype in response to environmental changes. Fundamental to the way in which organisms cope with environmental variations, phenotypic plasticity is associated with all types of environmentally-induced variations, including changes to morphological, physiological, and behavioral processes. The skull morphology of mammals is the most important phenotypic trait, which changes during the evolutionary process. The Chevrier's field mouse, *Apodemus chevrieri* is a nocturnal and species endemic to China, and originated in the Palaearctic region. *A. chevrieri* is mainly distributed in the Hengduan Mountains and nearby regions of China, including Zhaotong, Kunming, Lijiang, Dali, and the land around the Lancang and Nu Rivers in Yunnan Province. *A. chevrieri* mainly inhabits farmland and its nearby shrubland, and is one of the main natural foci of plague in the Hengduan Mountains, which is a crossroads of species dispersal. The boreal species of the Palaearctic migrating southward, and tropical species from the Indochina Peninsula migrating northward, and thus is an area of interest for biologists studying mammal diversity. Meanwhile, the Hengduan Mountains are located in the west of the Yunnan province, where there are

基金项目:国家自然科学基金项目 (31360096); 云南省应用基础研究计划重点项目 (2013FA014); 获云南省博士研究生学术新人奖资助

收稿日期:2014-09-11; **网络出版日期:**2015- -

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zwl_8307@163.com

many mountains and canyons. From west to east, there are dramatic changes in environmental conditions with changes in altitude, and noticeable changes were observed in the zone and non-zone landscape. In order to adapt to the different environments, animals inhabiting the area may exhibit different phenotypic variations, so *A. chevrieri* was employed as an ideal model for examining the relationships between phenotypic and ecological adaptations. The analysis of morphology is a fundamental part of many biological studies. With the development of more sophisticated statistical techniques, the sophistication of analyses of these types of data also increased. Since the 1980s, there was a fundamental change in the nature of the data gathered and analyzed, as scientists began to focus on the coordinates of landmarks and the geometric information relating to their relative positions. Geometric morphometrics, was hailed as a "revolution" in morphometrics. Morphological divergence among taxa was estimated quantitatively by analyzing the outline of the mandible. This method treats the mandible shape globally, and provides continuous data which can be used to compute phenotypic distances. In order to study the microevolution of species in the Yunnan province, with its special ecological environment, we applied geometric morphometric methods to the study of skull shape changes in different areas of *A. chevrieri* distribution, and used mitochondrial cytochrome *b* (Cyt *b*) gene and control region (D-loop) to investigate the gene type. The results showed that the Kunming and Hengduan Mountain populations (Zhongdian, Jianchuan, and Lijiang) exhibited obvious morphological and genetic variations. In particular, the dorsal and ventral of skull in *A. chevrieri* rarely overlap between the Hengduan Mountain populations and the Kunming population, with large variations between two populations having been noted. However, the side and lower side of the skull showed no significant variation between populations. Therefore, this study indicates that *A. chevrieri* in the Yunnan Province might be in the process of undergoing ecological speciation.

Key Words: *Apodemus chevrieri*; skull shape; geometric morphometrics; genetic diversity

微进化(microevolution)是指生物为适应生存环境而在发生的适应性变化,是物种形成水平上宏观进化(macroevolution)的基础^[1]。近年来,生物由微进化形成生态上的物种是进化生物学家关注和研究的焦点^[2-5]。生物在微进化过程发生遗传变异,遗传变异又影响了表型变异^[6-7]。由于不同生物所处的经纬度、分布区域的地理特征和气候变化等因素的不同,可能导致生物遗传多样性分布格局及其演化规律的不同^[8]。形态学特征历来是分类学的基础,是探讨系统发育同源或异源的主要依据^[3-4]。地理分布和气候条件的不同,使得物种生活的环境可能不同,长期适应的结果最终使生活在其中的一些小型哺乳动物在种内或种间水平上表现出了形态的变异,这些形态学的差异在一定程度上反映在该物种的骨骼和身体大小的变化上^[9]。头骨和臼齿是生物和环境直接作用的契合点,其形态的变化和环境因子直接相关^[10]。头骨形态的研究不仅对动物的种间、种内关系和生态特征等方面的研究具有重要的参考价值^[10],而且在动物的地理演化和进化生态学的研究中也具有十分重要意义^[11]。

云南省,属青藏高原南延部分,地形一般以元江谷地和云岭山脉南段的宽谷为界,分为东西两大地形区。西部为横断山脉峡谷地区,东部为滇东滇中高原。中南半岛热带种类从山谷向北扩散,而北方耐寒种类则由山麓向南扩散,形成了古北界和东洋界动物相互交错分布的特点^[12]。由于环境温度等条件的地带性和非地带性变化,很可能导致生活于该地区的小型哺乳动物发生了微进化现象。

高山姬鼠(*Apodemus chevrieri*)属于鼠亚科,是典型的古北界种类^[13],起源于欧洲内或亚洲靠近欧洲的边缘,近代向西迁移^[14-15]。在我国分布在云南、四川、贵州、湖北、甘肃、陕西的一些地区;云南省主要分布于昭通、昆明、丽江、大理、澜沧江和怒江流域地区^[16-17]。因此,为了深入了解高山姬鼠这个物种在扩散过程中遗传和表型变化对物种进化的作用,本论文利用现在研究较为成熟的线粒体细胞色素 *b* (Cytochrome *b*, Cyt *b*) 基因和线粒体控制区(Mitochondrial control region, D-loop)系列对云南高山姬鼠的遗传分化进行初步研究,并结合几何形态测量技术对该区域高山姬鼠的头骨形态变异进行初步分析,探讨生态因素对表型的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验动物高山姬鼠捕捉于云南省中甸(3 296—3 305 m; N26°84'—27°83'; E99°68'—99°69'; 3 只)、剑川(2 556—2 590 m; N26°15'—26°45'; E99°40'—99°55'; 27 只)、丽江(2 556—2 590 m; N26°71'—26°96'; E100°20'—100°26'; 15 只)、昆明(2125—2139 m; N25°05'—25°15'; E102°31'—102°32'; 12 只)的农田和灌木丛,所有 57 个样本都用于头骨形态分析。用于遗传多样性的分析样本数为云南省中甸 3 只、剑川 2 只、丽江 5 只、昆明 8 只。

1.2 实验方法

野外采集到的实验动物,均根据高山姬鼠的鉴别特征,特别是臼齿的形态特征:第三上臼齿具有 2 内叶,第二上臼齿的第二横列齿突仅有 1 内齿突而无外齿突和中齿突,第一上臼齿外侧有 4 个齿突,进行高山姬鼠物种的鉴别^[16],在确认是高山姬鼠物种后进行实验。

1.2.1 高山姬鼠头骨形态处理

Cardini 等^[18]提出性别的二态性在考虑样本大小时有很大的影响,但在研究样本形态时可以被忽略。本研究仅涉及样本形态的差异,所以忽略了样本性别的统一计数。

用索尼 DSC-T20 数码相机距离头骨 10 cm 以微距拍摄头骨侧面、背面、腹面和下颌侧面。根据相关兽类头骨及下臼齿标记的方法并结合高山姬鼠头骨及下臼齿的实际形态,对相应照片进行打点标记(图 1)。用 TPSDIG2 软件对获得的图片进行数字化^[19]处理。界标点被数字化处理后获得相应的坐标数据。为避免数据重复,对高山姬鼠头骨形态的研究仅对样本一侧结构进行标记,对下臼齿的研究仅分析其咬合面的形态。为保证界标准确性,每个标记均由同一人重复标记 6 次以上,所得到的均值坐标数据用于后面的统计分析。采用的是 GPA (generalized procrustes analysis),即使用最小正方形估计平移和旋转参数,从而将界标点布局进行叠印。通过薄片样条法分析形变。

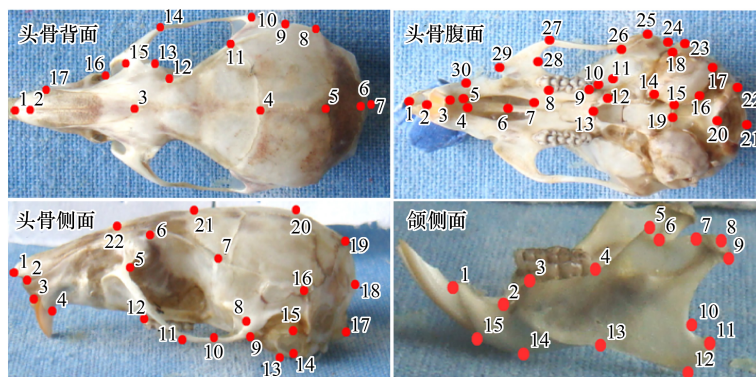


图 1 高山姬鼠头骨背面(a)、头骨腹面(b)、头骨侧面(c)及下颌侧面(d)标点标记图

Fig. 1 Landmark configurations on the dorsal cranium (a), ventral cranium (b), lateral cranium (c) and lateral mandible (d) of *A. chevrieri*

1.2.2 高山姬鼠分子材料的处理

以冷冻保存(-70 ℃)的肝脏标本中提取线粒体 DNA (Deoxyribonucleic acid),线粒体 DNA 的提取采用酚/氯仿^[20]的方法提取基因组 DNA。

Cytb 的 PCR (Polymerase chain reaction) 引物采用 Pääbo 等^[21]和 Irwin 等^[22]报道的哺乳动物 Cyt b 通用引物 L14724 和 H15915,引物覆盖长度为全基因序列 1 140 bp;扩增体系为 50 μL,其中含有 10×Buffer 5 μL、10 mmol/L dNTPs 1 μL、10 μmol/L 引物各 1 μL、25 mmol/L MgCl₂ 2 μL、2 U Taq 酶和 50 ng 左右的 DNA 模板。扩增条件:94 ℃预变性 3 min;94 ℃变性 30 s,51 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,30 个循环;72 ℃延伸 5 min;4

℃终止反应。实验过程中使用空白对照来检测 PCR 污染。

D-loop 基因的引物根据 Bellinvia 已报道姬鼠属的基因组序列设计^[23],利用 Primer Premier 5.0 软件来完成。引物覆盖长度为 905 bp。

D-L:5-TCTCAGGGCATCAAGAAGAAGGA-3

D-R:5-GAT AAATCCATCTAAGCATTT TCA-3

扩增体系为 50 μ L,其中含有 10 $\times$ Buffer 5 μ L、10 mmol/L dNTPs 1 μ L、10 μ mol/L 引物各 1 μ L、25 mmol/L MgCl₂ 2 μ L、2 U Taq 酶和 50 ng 左右的 DNA 模板。扩增条件:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 1 min,52 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,30 个循环;72 ℃延伸 5 min;4 ℃终止反应。

扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后,阳性结果使用 Glassmilk DNA 纯化回收试剂盒(博大泰克生物基因技术有限责任公司)进行割胶回收、纯化,回收产物直接作为测序的模板送大连宝生生物工程有限公司测序。

1.3 数据处理

不同个体的序列使用 ClustalX 软件进行比对,之后进行细胞色素系列和控制区系列拼接。在 MEGA 3.1 软件中,使用 Kimura 双参数距离模型,以邻接法(Neighbor-joining, NJ)重建系统发生关系,并应用 1 000 自举检验(Bootstrap test)估计系统树中节点处的置信度;通过 DnaSP 4.0 软件统计各种群的单倍型多样性、样本中所有单倍型的平均核苷酸差异数、核苷酸多样性;在 ARLEQUIN3.10 软件中进行基因分化系数(F-statistics, *F_{st}*)和种群间序列平均差异的分析。

用 Morphologika2v2.5 软件对所得数据进行薄片样条分析及主成分分析。用 SPSS15.0 将头骨背面、腹面、侧面及下颌侧面的数据信息的前两个主成分值各自做主成分分析。

2 结果

使用 MEGA 4 软件中邻接法(NJ)构建邻接树(图 2)。结果显示,本实验的样品全部聚为一支,并和已报道的黑线姬鼠(*Apodemus agrarius*)亲缘关系最近,且分支置信度较高,即自举检验值(Bootstrap)为 1 000 次自举检测得到的对该支的支持百分数较高,说明其亲缘关系较近,即可以看出本研究的物种是高山姬鼠。

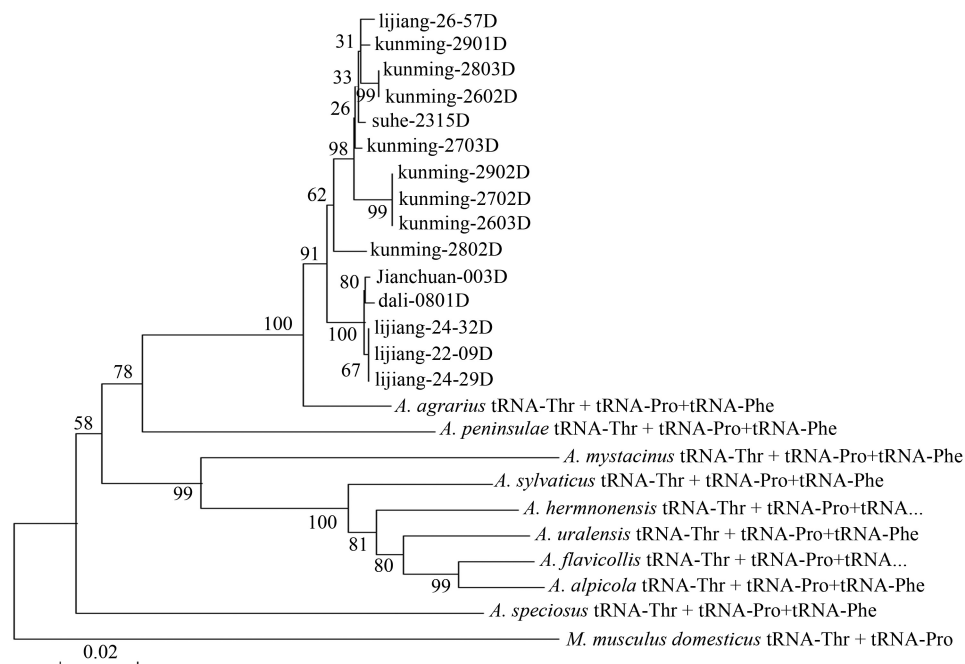


图 2 基于 Cyt *b* 基因和 D-loop 序列构建的 NJ 树

Fig. 2 NJ tree based on Cyt *b* gene and D-loop sequence of populations in *A. chevrieri*

(各分支上的数字为 Bootstrap 1 000 个循环的自举检验值;图中标尺表示分支长度;其他物种数据来自 GenBank 数据库)

2.1 头骨分析

以头骨背面、腹面、侧面和下颌侧面做主成分分析,对第一主成分和第二主成分作图,结果表明:高山姬鼠头骨背面(图3)和腹面(图4),横断山种群和滇中昆明种群很少重叠,变异较大;但对头骨的侧面和下颌侧面的分析发现变异不明显。

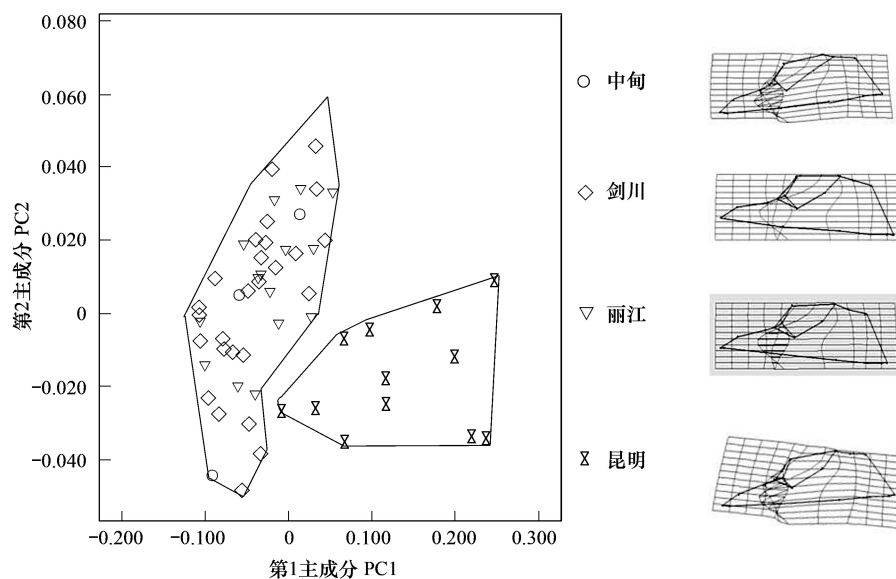


图3 高山姬鼠头骨背面第一主成份和第二主成份散点图

Fig. 3 Plots of principal component factors 1 and 2 for dorsal cranium of *A. chevrieri*

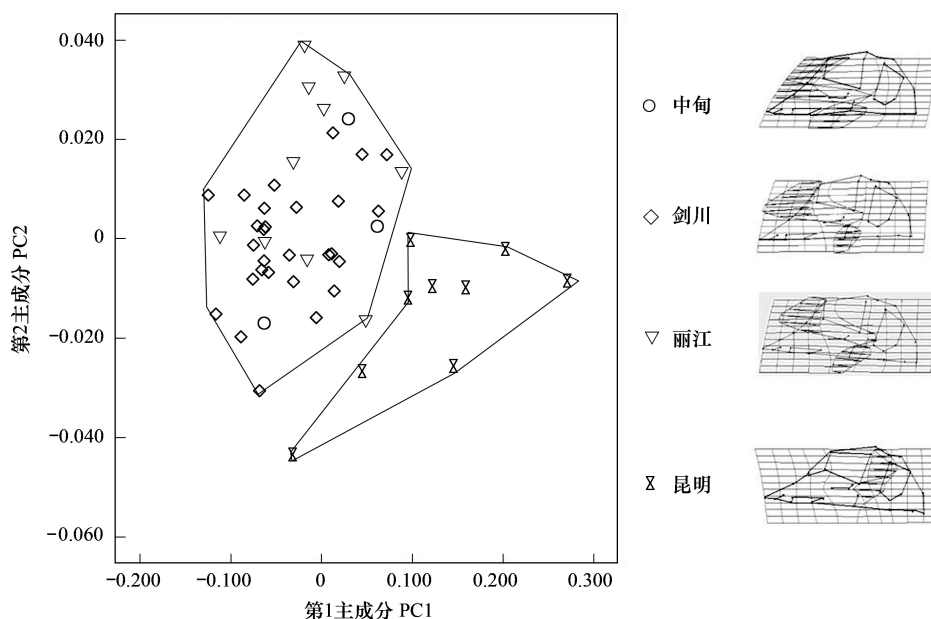


图4 高山姬鼠头骨腹面第一主成份和第二主成份散点图

Fig. 4 Plots of principal component factors 1 and 2 for ventral cranium of *A. chevrieri*

2.2 遗传多样性和种群间遗传差异

利用线粒体 Cyt *b* 全序列(1140 bp)和 D-loop(905 bp)序列对中甸、丽江、剑川和昆明 4 个地理种群进行遗传分析,结果表明,昆明种群的遗传多样性在 4 个种群中处于中间水平(表 1)。

表 1 基于 Cyt b 基因和 D-loop 序列种群的变异位点及遗传多样性

Table 1 Variable sites and genetic diversity based on Cyt b gene and D-loop sequence of populations in <i>A. chevrieri</i>					
种群 Population	个数 Number	单倍型个数 Number of haplotypes	单倍型多样性 Haplotype diversity	平均核苷酸变异数 Average number of differences	核苷酸多样性 Nucleotide diversity
中甸	3	3	1.00000	7.33333	0.00644
剑川	2	2	1.00000	1.00000	0.00088
丽江	5	4	0.90000	9.60000	0.00843
昆明	8	6	0.89286	7.21429	0.00633

在昆明种群与横断山种群(中甸、剑川、丽江)间,遗传差异(F_{st})显著($P < 0.05$),基因流较弱(表 2)。

表 2 不同种群之间遗传差异(F-statistics, F_{st})及其显著性(对角线下)和基因流(Number, N_m)

Table 2 F-statistics test for pairwise population (below the diagonal) and P value of F-statistics test and gene flow four populations in *A. chevrieri*

地区 Area	中甸	剑川	丽江	昆明
中甸		—	40.26316	0.68166
剑川	0.00000 ($P > 0.05$)		6.84573	0.48384
丽江	0.01227 ($P > 0.05$)	0.06807 ($P > 0.05$)		1.81438
昆明	0.42314 ($P < 0.01$)	0.50821 ($P < 0.05$)	0.21604 ($P < 0.01$)	

单倍型系统发生分析表明:15 个单倍型在 NJ 树中明显聚为两支(图 5)。其中来自横断山区(中甸、丽江、剑川)构成一支,昆明种群大部分个体聚为另外一支,但有部分混杂,分化不完全(图 5)。

2.3 高山姬鼠分子单倍型和头骨对应分析

将实验中用于 Cyt b 和 D-loop 进化分子分析和头骨表型分析的共用样本(表 3)和单倍型间的进化关系结合分析,结果表明单倍型的进化和表型的变异有一定的对应关系,中甸种群和昆明种群的高山姬鼠发生单倍型分化的个体,头骨形态也发生了一定的变异(图 6)。

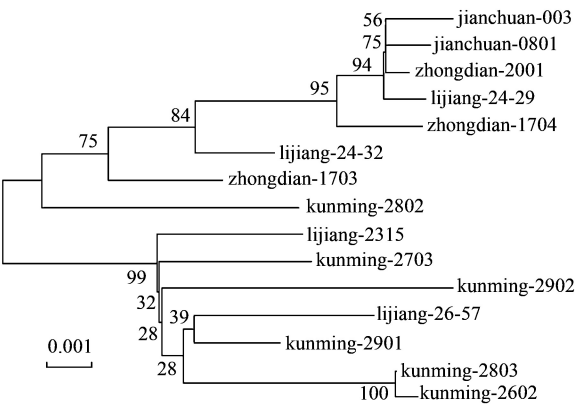


图 5 基于 Cyt b 基因和 D-loop 序列构建的单倍型 NJ 树

Fig. 5 NJ tree of haplotypes based on cyt b gene and D-loop sequence of populations in *A. chevrieri*

各分支上的数字为 Bootstrap 1 000 个循环的自举检验值;图中标尺表示分支长度

表 3 进化分子分析和头骨形态分析的共有样本

Table 3 Haplotypes based on complete of based on cyt b gene and D-loop sequence of populations and in Morphological variation in *A. chevrieri*.

地点 Location	头骨分析样本 Skull sample analysis	分子系列编号 Molecular series number	单倍型 Haplotypes
中甸	2008071703	ZD1703	Hap1
	2008071704	ZD1704	Hap2
	2008072001	ZD2001	Hap3
昆明	2009092802	KM2802	Hap12
	2009092803	KM2803	Hap11
	2009092901	KM2901	Hap9
	2009092902	KM2902	Hap8

3 讨论和分析

头骨是研究系统发生的常用材料,可能因其是多种器官和生理功能的组合体,如牙、腭、咽等器官,听觉区域,主要血管集中区域,嚼嚼肌肉的发源点等,每个结构单元是半独立的,但全部的结构又共同构成了几条相

对独立的研究进化的证据^[24]。头骨形状是由大量基因控制, 执行包括咀嚼、视听、支撑大脑和头颅等功能; 下颌的变化与其食性有关^[24-25]。本研究的结果表明横断山和滇中地区高山姬鼠的头骨形态, 在头骨的背面、腹面和侧面均有变异, 特别是头骨的背面、腹面变异较明显, 但是下颌侧面变异不明显。高山姬鼠头骨背面和腹面包括了较多的鼻腔、眼眶等用于感知外界的嗅觉、视觉和听觉器官, 环境的不同直接导致这些相应结构的形态发生了变化。高山姬鼠主要生活在农田的边缘, 以谷物的种子为食物, 横断山地区和滇中地区的农田种植主要都以玉米等谷物为主, 高山姬鼠食物的差异不大, 可能是高山姬鼠下颌侧面变异较小的原因。

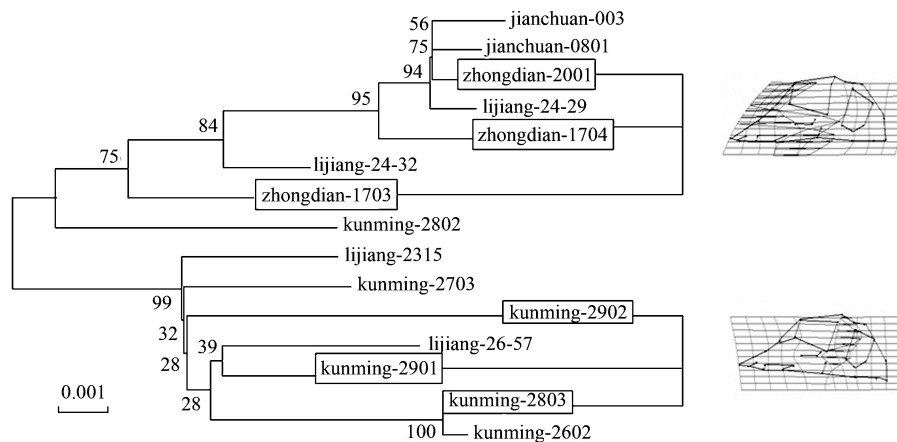


图 6 头骨样本在基于 *cyt b* 基因和 D-loop 序列构建的单倍型 NJ 树中 (图中画线部分表示的是形态对应的单倍型)

Fig. 6 The corresponding sample of skulls and based on *cyt b* gene and D-loop sequence of populations of NJ tree of haplotypes in *A. chevrieri*. (Draw a graph represents the form of the corresponding part of the haplotype)

结合对高山姬鼠头骨侧面、腹面、背面以及下颌侧面的研究, 形变多集中在鼻腔、眼眶和白齿处, 这可能与高山姬鼠栖息地的气候和地理环境相关。鼻腔形态变化可以有效缓解外界寒冷空气对肺部的影响, 同时也反映了水分的散失程度, 水分的散失又与环境温度相关^[26], 环境温度的不同可能导致高山姬鼠鼻腔的形态发生变化。此外, 鼻腔大小也可间接反映该物种栖息地的湿度条件。横断山地区属亚热带高寒气候, 而昆明滇中高原的北部, 属于北亚热带高原气候, 温度与湿度的双重作用可能导致昆明地区样本的鼻腔与其余地区的头骨产生了变异。昆明地区温度适宜, 降水量相对丰富, 高山姬鼠资源相对较好; 而横断山地区相对温差较大, 干湿季节分明, 植被资源相对较差, 这可能是导致高山姬鼠头骨形态发生改变的重要原因之一。本研究采用几何形态测量技术对分布于横断山地区 (中甸、剑川、丽江) 和昆明地区的高山姬鼠头骨形态进行了研究, 结果表明高山姬鼠的头骨形态已经在种群内产生了一定的变异, 结合线粒体遗传标记也得到证实。

由于生态地理环境、生活习性的差别, 几乎所有生物的种群都会发生分化^[27-28], 由种群分化导致的种群间等位基因频率的差别称为种群的遗传分化 (Genetic differentiation)。种群间遗传分化的程度常用基因分化系数 (F_{st})、基因流 (Number, N_m) 等指标来衡量。基因分化系数表示不同种群之间遗传差异的程度^[29]。基因流表示不同种群之间由个体迁移所产生的基因流动, 它会增加种群内部的遗传变化, 影响种群间的相似性或特征^[30]。从 N_m 值来看, 基因流是一个群体迁移至另一个群体时将某基因带到新的群体产生的基因流动^[31-32]。通常 $N_m > 1$, 表明群体间的基因流的水平较高, 群体间遗传分化较小; 当 $N_m > 4$ 时, 种群间的基因交流就更为充分, 遗传分化更小; $N_m < 1$ 说明群体可能由于遗传漂变而发生了分化^[33]。两个种群之间的基因流越大, 则基因分化系数越大, 遗传距离也越大, 遗传分化的程度就越小^[34]。Wright^[35] 的距离隔离 (Isolation by distance) 理论认为自然界存在着距离隔离现象, 即物种遗传分化的程度会随着地理距离的增加而增加, 有许多研究证实了这一理论^[36-37]。本研究中, F_{st} 统计结果显示, 高山姬鼠昆明种群与其他 3 个种群间的基因流值相对较小, 且从这 4 个种群的地理位置来看, 昆明种群与其余 3 个种群之间的地理距离较远, 中甸、剑川、丽江 3 个地理距离之间较近, 地理距离的远近和基因流的大小间存在一定的负相关, 这可能表明地理距离是影响各种群间遗传分化的一个重要因素, 本研究的结果支持了 Wright 的研究。但细胞色素 *b* 和 D-loop 基因的

单倍型之间的进化关系树显示,云南的高山姬鼠主要分为两大部分:滇中种群和横断山种群,但是分化不完全,还有部分混杂。本研究中的线粒体系统树的研究结果与 Patrik Nosil 等^[5]对竹节虫属(*Timema*)的 *T. Cristinae* 和 *T. podura* 的研究结果类似,该研究认为 *T. Cristinae* 和 *T. podura* 正处于物种的未完全分化阶段,本研究中的高山姬鼠可能也正处于物种分化的种群分化阶段。

综上所述,用几何形态测量法研究高山姬鼠的头骨,发现横断山地理种群和昆明地理种群间发生了明显的形态变异,结合线粒体 DNA 中性基因系列研究表明高山姬鼠在横断山地理种群和昆明地理种群间发生了明显的遗传分化,但单倍型之间的进化还有部分混杂,可能是因为几个种群间还没有形成稳定的种群遗传分化,因此本研究推测中国西南地区的高山姬鼠可能正处于同域生态物种形成的早期阶段。

参考文献(References):

- [1] Reznick D N, Ricklefs R E. Darwin's bridge between microevolution and macroevolution. *Nature*, 2009, 457(7231): 837-842.
- [2] Mallet J. Hybridization, ecological races and the nature of species: empirical evidence for the ease of speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Series B, Biological Sciences*, 2008, 363(1506): 2971-2986.
- [3] Butlin R K, Galindo J, Grahame J W. Sympatric, parapatric or allopatric: the most important way to classify speciation?. *Philosophical Transactions of the Royal Series B, Biological Sciences*, 2008, 363(1506): 2997-3007.
- [4] Fitzpatrick B M, Fordyce J A, Gavrilets S. Pattern, process and geographic modes of speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, 2009, 22(11): 2342-2347.
- [5] Patrik N, Funk D J, Ortiz-Barrios D. Divergent selection and heterogeneous genomic divergence. *Molecular Ecology*, 2009, 18(3): 1-28.
- [6] Frankham R. Conservation genetics. *Annual Review of Genetics*, 1995, 29(1): 305-327.
- [7] Ellegren H, Sheldon B C. Genetic basis of fitness differences in natural populations. *Nature*, 2008, 452(7184): 169-175.
- [8] Nichols R A, Hewitt G M. The genetic consequences of long distance dispersal during colonization. *Heredity*, 1994, 72(3): 312-317.
- [9] Yom-Tov Y, Yom-Tov Y. Climatic change and body size in two species of Japanese rodents. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2004, 82(2): 263-267.
- [10] Yom-Tov Y, Yom-Tov S, Moller H. Competition, coexistence, and adaptation amongst rodent invaders to Pacific and New Zealand islands. *Journal of Biogeography*, 1999, 26(5): 947-958.
- [11] 熊文华, 张知彬. 饶阳地区三种农田啮齿类头骨形态比较及性二型. *兽类学报*, 2007, 27(3): 280-283.
- [12] 陈灵芝. 中国的生物多样性现状及其保护对策. 北京: 科学出版社, 1993: 164-205.
- [13] Corbet G B. *The Mammals of the Palaearctic Region: A Taxonomic Review*. London: British Museum, 1978: 200-314.
- [14] Serizawa K, Suzuki H, Tsuchiya K. A phylogenetic view on species radiation in *Apodemus* inferred from variation of nuclear and mitochondrial genes. *Biochemical Genetics*, 2000, 38(1/2): 27-40.
- [15] Suzuki H, Sato J J, Tsuchiya K, Luo J, Zhang Y P, Wang Y X, Jiang X L. Molecular phylogeny of wood mice (*Apodemus*, Muridae) in East Asia. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2003, 80(3): 469-481.
- [16] 黄文儿, 陈延熹, 温业新. 中国啮齿类. 上海: 复旦大学出版社, 1995: 126-127.
- [17] Suzuki H, Filippucci M, Chelomina G N, Sato J J, Serizawa K, Nevo E. A Biogeographic View of *Apodemus* in Asia and Europe Inferred From Nuclear and Mitochondrial Gene Sequences. *Biochemical Genetics*, 2008, 46(5/6): 329-346.
- [18] 萨姆布鲁克, 弗里奇, 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南(第二版). 金冬雁, 黎孟枫 译. 北京: 科学出版社, 1992: 19-24.
- [19] Rohlf F J. Tpspline: A Program to Compare Two Shapes Using a Thin-Plate Spline, Department of Ecology and Evolution[M]. New York: State University of New York at Stony Brook, 1990: 11794-11794.
- [20] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd eds. Jin D Y, Li M F, Translation. Beijing: Science Press, 1992: 19-24.
- [21] Pääbo S, Higuchi R G, Wilson A C. Ancient DNA and the polymerase chain reaction. *The Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264(17): 9706-9712.
- [22] Irwin D M, Kocher T D, Wilson A C. Evolution of the Cytochrome *b* gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 1991, 32(2): 128-144.
- [23] Bellinva E. A phylogenetic study of the genus *Apodemus* by sequencing the mitochondrial DNA control region. *Journal of Zoological Systematics Evolutionary Research*, 2004, 42(4): 289-297.
- [24] Rychlik L, Ramalinho G, Polly P D. Response to environmental factors and competition: skull, mandible and tooth shapes in Polish water shrews (*Neomys*, Soricidae, Mammalia). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 2006, 44(4): 339-351.

- [25] 朱万龙, 贾婷, 黄春梅, 王政昆. 中缅树鼯头骨及下臼齿几何形态与环境的关系. 生态学报, 2013, 33(6): 1721-1730.
- [26] Zhu W L, Jia T, Lian X, Wang Z K. Evaporative water loss and energy metabolic in two small mammals, voles (*Eothenomys miletus*) and mice (*Apodemus chevrieri*), in Hengduan mountains region. Journal of Thermal Biology, 2008, 33 (6): 324-331.
- [27] Zhou W W, Yan F, Fu J Z, Wu S F, Murphy R W, Che J, Zhang Y P. River islands, refugia and genetic structuring in the endemic brown frog *Rana kukunoris* (Anura, Ranidae) of the Qinghai-Tibetan Plateau. Molecular Ecology, 2013, 22(1): 130-142.
- [28] Yan F, Zhou W W, Zhao H T, Yuan Z Y, Wang Y Y, Jiang K, Jin J Q, Murphy R W, Che J, Zhang Y P. Geological events play a larger role than Pleistocene climatic fluctuations in driving the genetic structure of *Quasipaa boulengeri* (Anura: Dicroglossidae). Molecular Ecology, 2013, 22 (4): 1120-1133.
- [29] Nei M. Molecular Evolutionary Genetics. New York; Columbia University Press, 1987.
- [30] Slatkin M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. Science, 1987, 236(4803): 787-792.
- [31] Rieseberg L H, Burke J M. The biological reality of species: gene flow, selection, and collective evolution. Taxon, 2001, 50(1): 47-67.
- [32] Morjan C L, Rieseberg L H. How species evolve collectively: implications of gene flow and selection for the spread of advantageous alleles. Molecular Ecology, 2004, 13(6): 1341-1356.
- [33] Petit R J, Excoffier L. Gene flow and species delimitation. Trends in Ecology and Evolution, 2009, 24(7): 386-393.
- [34] Millar C L, Libby W J. Strategies for conserving clinal, ecotypic, and disjunct population diversity in widespread species // Fald D A, Holsinger K E, eds. Genetics and Conservation of Rare Plants. New York: Oxford University Press, 1991: 149-170.
- [35] Wright S. Isolation by distance. Genetics, 1943, 28(2): 114-138.
- [36] Floyd C H, Van Vuren D H, May B. Marmots on great basin mountaintops: using genetics to test a biogeographic paradigm. Ecology, 2005, 86 (8): 2145-2153.
- [37] Selonen V, Painter J N, Hanski I K. Microsatellite variation in the Siberian flying squirrel in Finland. Annales Zoologici Fennici, 2005, 42(5): 505-511.