

分类号
密级

UDC



学位论文

同域分布栎属两近缘种形态变异与种

群遗传研究

Morphological variation and population genetic research in two sympatric *Quercus*

刘媛

指 导 教 师	杜芳 副教授
申请学位级别	硕士
学科专业名称	生态学
研 究 方 向	恢复生态与生物多样性保护
论文提交日期	2018年4月
论文答辩日期	2018年6月
学位授予日期	

答辩委员会主席：

评阅人：

北京林业大学

本论文研究工作受北京市科技新星项目
(Z151100000315056)资助

独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得北京林业大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

签 名：_____ 日 期：_____

关于论文使用授权的说明

本人完全了解北京林业大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留送交论文的复印件，允许论文被查阅和借阅；学校可以公布论文的全部或部分内容，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。

(保密的论文在解密后应遵守此规定)

签 名：_____ 导师签名：_____ 日 期：_____

摘要

林木种质资源鉴定尤其是近源种的鉴定是种质资源研究中需首要解决的问题。壳斗科(Fagaceae)栎属(*Quercus*)植物是国内外研究杂交的热点植物,也是研究生态学物种概念的模式植物。两个近缘种槲树(*Q. dentata* Thunb.)和槲栎(*Q. aliena* Bl.),广泛分布于中国各省,具有重要的生态学意义和经济价值。

本论文首先利用 12 对简单重复序列(Simple sequence repeat, SSR)分别对 6 个同域分布的槲树和槲栎种群,共 451 个个体进行分析。Structure 的结果将 451 个个体分为两类并表明两个近缘种之间存在广泛且不对称的基因流。当以混合系数 $Q \geq 0.9$ 的个体被判定为纯种, $Q < 0.9$ 的被判定为杂交个体的分类标准时,结果得到槲栎个体 239 个,槲树个体 154 个,杂交个体 58 个。槲树和槲栎种群遗传多样性水平在林木中处于较高水平,平均观测杂合度(H_o)分别为 0.64 和 0.63,期望杂合度(H_e)的平均值均为 0.61。槲树和槲栎物种间的遗传分化系数(F_{ST})为 0.108,表明两个物种间的遗传分化处于中等水平。

其次本论文对分子标记鉴定的 367 个个体的 1835 片叶片进行了几何形态学分析。基于叶片层次的主成分分析(Principal Component Analysis, PCA)结果表明槲树和槲栎的叶片形态差异显著,杂交个体分散于整个散点图。基于个体层次的判别分析(Discriminant Analysis, DA)表明 95.90%的槲栎和 96.88%的槲树可以准确的区分。同时基于个体层次的典型变量分析(Canonical Variate Analysis, CVA),结果表明杂交个体的叶片形态,鉴于槲树和槲栎之间,更接近槲栎个体的叶片形态。基于个体层次的 2B-PLS 分析(Two Blocks Partial Least Squares)将对称结构和非对称结构分别与叶片大小进行分析,表明对称结构与叶片大小显著相关,而非对称结构与叶片大小相关性不显著。另外通过线性回归分析对叶片的形态(对称结构、非对称结构)和大小与环境因子的相关性分析,表明叶片的形态和大小受环境影响极显著。

综合分子标记方法与形态学标记方法的结果,二者都可以很好的区分槲树和槲栎两个近缘种。本研究发现同域分布的槲树和槲栎种群,在每个种群内都存在基因流,且每个种群内都存在槲树和槲栎的杂交个体。通过分子标记方法鉴定出的杂交个体,多数位于槲树和槲栎两个叶片形态之间,部分杂交个体从形态上无法区分。

关键词：榲栲；榲栎；分子标记；几何形态测量学；杂交

Morphological variation and population genetic research in two sympatric oaks

Master Candidate: Liu Yuan

(Ecology)

Directed by Professor Du Fang

ABSTRACT

The species determination especially for the closely related species is the first and foremost steps in forest resources study. *Quercus* (Fagaceae) is a phylogenetically complex genus, and also a model organisms in the development of ecological species concepts. Two closely related oaks *Q. dentata* Thunb. and *Q. aliena* Bl., are widely distributed in China, with great economic and the ecological value.

In the thesis, 451 trees of six sympatric *Q. dentata* and *Q. aliena* populations were analyzed based on 12 SSR markers. STRUCTURE analysis revealed that 451 individuals were clearly divided into two clusters with different genotype and there existed wide and asymmetric gene flow between the two species. 239 individuals were determined as *Q. aliena*, 154 individuals were determined as *Q. dentata*, and 58 individuals were determined as hybrids when $Q \geq 0.9$ were considered to be pure species and the others were considered to be hybrids. The observed heterozygosity was 0.64 and 0.63 within the *Q. dentata* and *Q. aliena* respectively and the expected heterozygosity was 0.61 within two species, which showed a high level of genetic diversity within the two species. The genetic diversity (F_{ST}) between the two species was 0.108, indicating a middle level of genetic differentiation.

Geometric morphometric analysis was conducted basing on 1835 leaves of 367 individuals. At leaf level, the Principal Component Analysis (PCA) results showed that significant leaf differences between *Q. dentata* and *Q. aliena*, and the hybrids were scattered. At individual level, 95.90 and 96.88% of *Q. aliena* and *Q. dentata* could be accurately distinguished according to Discriminant Analysis (DA); Canonical Variate Analysis (CVA) results showed that the leaf morphology of the hybrids were mainly located between the leaf shape of *Q. aliena* and *Q. dentata*, and were closer to the *Q. aliena*; Two Blocks Partial Least Squares (2B-PLS) was performed to analysis the symmetric and asymmetric components onto leaf size, results showed that significant allometric patterns of symmetric components variation were detected, however no significant allometry was detected on asymmetric components. Linear-regression Analysis were used to study the relationships between the relative leaf infactors (symmetric and asymmetric components, size) and environment variables. The result showed that there were significant effect of the environment variables to leaf shape and size.

Integrating molecular marker and morphological marker analysis, the *Q. aliena* and *Q. dentata* can be distinguished clearly in both methods. In addition, the thesis revealed there existed a wide range of gene flow and hybrids within sympatric population *Q. aliena* and *Q. dentata*. The hybridized individuals

were mostly located between the leaves of *Q. aliena* and *Q. dentata*, however some of the hybrids were indistinguishable from morphology.

Key Words: *Quercus dentata*; *Quercus aliena*; molecular marker; geometric morphometrics; hybrids

目 录

摘要.....	I
ABSTRACT.....	III
目 录.....	V
1 引言.....	1
1.1 林木种质资源鉴定研究的意义.....	1
1.1.1 种质资源遗传多样性与遗传结构概述.....	1
1.1.2 鉴定林木种质资源的研究方法.....	2
1.2 栎属研究概况.....	8
1.2.1 壳斗科栎属的研究概况.....	8
1.2.2 壳斗科栎属遗传资源保护现状.....	8
1.2.3 槲树和槲栎物种介绍.....	9
1.3 研究目的和意义.....	11
2 基于北京上方山槲树和槲栎的物候观测.....	12
2.1 上方山研究区域概况.....	12
2.2 槲树和槲栎物候观测方法.....	12
2.2.1 物候观测地点及植物选择.....	12
2.2.2 物候观测时间及要求.....	12
2.2.3 本研究所选物候期.....	12
2.3 物候观测结果.....	12
2.4 小结.....	13
3 基于 SSR 分子标记的种群遗传结构及遗传多样性分析.....	15
3.1 实验材料与实验方法.....	15
3.1.1 样本采集与处理.....	15
3.1.2 总 DNA 提取方法.....	17
3.1.3 DNA 样本检测及分装.....	17
3.1.4 引物筛选及 PCR 扩增实验.....	18
3.2 数据分析方法.....	19
3.2.1 原始数据处理及数据格式转换.....	19
3.2.2 遗传结构分析.....	19
3.2.4 遗传多样性分析.....	20
3.3 结果与分析.....	20
3.3.1 槲树和槲栎的遗传结构分析.....	20
3.3.2 遗传结构的地理分布.....	22
3.3.3 遗传多样性分析.....	24
3.4 总结.....	25

3.4.1 榲栲和榲栲种群遗传多样性.....	25
3.4.2 榲栲和榲栲种群遗传结构.....	26
4 基于几何形态测量学的研究.....	27
4.1 材料与方法.....	27
4.1.1 样本采集.....	27
4.1.2 样本判定.....	27
4.1.3 气候及地理因子获取.....	27
4.1.4 叶型数据获取.....	27
4.2 数据分析方法.....	29
4.2.1 广义 Procrustes 分析.....	29
4.2.2 排除离群值.....	29
4.2.3 区分叶片的对称、非对称结构和大小.....	30
4.2.4 叶片形态数据分层.....	30
4.2.5 输出叶片形态的可视化操作.....	30
4.2.6 叶片形态变化分析.....	30
4.2.7 异速生长分析.....	31
4.2.8 物种判定分析.....	31
4.2.9 叶片形态、叶片大小与气候因子、地理因子的回归分析.....	31
4.3 结果与分析.....	32
4.3.1 榲栲和榲栲叶片的原始数据处理.....	32
4.3.2 榲栲和榲栲叶片的形态差异分析.....	32
4.3.3 异速生长分析.....	35
4.3.4 榲栲和榲栲及杂交个体的判定分析.....	36
4.3.5 叶片形态和环境因子回归分析.....	38
4.4 讨论.....	38
4.4.1 榲栲、榲栲及杂交个体形态分化及物种判定.....	38
4.4.2 叶片形态与环境因素之间的相关性.....	39
4.4.3 异速生长.....	40
5 栎树种子传播.....	41
5.1 啮齿类动物对栎树种子传播的作用.....	41
5.2 实验方法.....	41
5.2.1 种子采集和测量.....	41
5.2.2 种子扩散实验设计.....	41
5.2.3 统计与分析.....	42
5.3 实验结果.....	42
5.3.1 种子传播途径.....	42
5.3.2 种子大小与种皮厚度.....	43

5.4 小结	44
6 结论与展望	45
6.1 结论	45
6.2 展望	46
导师简介	57
成果	59
致谢	61

1 引言

1.1 林木种质资源鉴定研究的意义

植物种质资源又被称为是植物遗传资源或者基因资源,是亲本可以遗传给子代的遗传物质总和。遗传资源是生物生存和发展的物质基础,对生态系统起到核心的作用。而林木种质资源是种质资源中的重要分支,又被称为是林木遗传资源,作为林木繁育的遗传材料,是林业发展的重要依托资源,包括古老的林木品种,重要的遗传资源材料以及野生的近缘种林木等都被列入林木种质资源的范畴(于雪, 2007)。当代林木品种的改良实践证明,育种工作成效是否显著,很大程度上取决于所掌握的林木遗传资源以及能否科学有效地选择与利用这些资源。研究林木种质资源最重要的一步是对林木种质资源的鉴定工作,尤其对野生近缘种木本植物的鉴定工作,是发现并挖掘其生态价值、经济价值、科研价值的重要步骤。鉴定主要通过对林木的形态特征及遗传信息的全面研究来完成,目的在于保存现有林木遗传资源的完整性,避免遗传信息的丢失。

1.1.1 种质资源遗传多样性与遗传结构概述

遗传多样性指种内遗传物质的变化,可以分为种群间遗传变异与种群内遗传变异。种群分布、遗传结构、遗传多样性等都会影响到物种与环境相互作用的方式,而遗传多样性就是这种方式的反映结果(马克平, 1993; Li *et al.*, 2014)。遗传多样性产生变化主要原因包括两种,一种是因为遗传漂变、杂交、基因流、瓶颈效应等造成的遗传物质的根本变化;另外一种是由于外界环境的影响使遗传多样性发生变化(王洪新和胡志昂, 1996)。

评估种质资源遗传多样性与遗传结构要以进化的思想去考虑物种的遗传结构模式,而进化生物学的一个核心问题是基因流动和自然选择形成基因型和表型的变异。基因流和自然选择是两个中心,通常是对立的,是两种进化的动力:基因流较分散,使遗传物质均匀化,并维持遗传变异,这些变异可以作为进化的遗传物质来源,而自然选择将遗传变异减少到有利于生存的变异和繁殖。对于木本植物来说,通常杂交后代的出现是因为具有高水平的基因流,在基因交流没有障碍的条件下,有效的基因流传播机制保持了种群间的连通性(Ellstrand & Elam, 1993)。尽管如此,基因流在物种内存在衰减率进而会造成遗传隔离,建立种群间新的遗传变异模式(遗传结构)(Hamrick & Godt, 1996)。如果在新的遗传模式中产生了基因流动,便出现了一个新的物种,它必须经得起周围环境的考验存活下来,生命周期较长的植物在这个生命周期中都将要经历强烈的自然选择(Campbell & Robert, 2005)。

基因流(Gene flow)指遗传物质在种群内或者种群间的流动(曲若竹等, 2004)。在木本植物中,基因流主要通过花粉传播,种子扩散等遗传物质的携带者的移动实现的。

基因流的强弱会直接与种群遗传多样性、有效种群大小相关,甚至会使种群遗传结构发生变动(Levin & Kerster, 1974)。而自然杂交的遗传本质为不同谱系之间的基因流。自然杂交(Natural hybridization)指在自然条件下,通过一个或者是多个可遗传的性状可以将两个或两个以上的种群中的个体准确区分开来的成功杂交(Arnold, 1997)。在植物中,这一过程通常是通过不同个体之间传粉、受精来实现。同域分布的近缘种间自然杂交是很常见的自然现象,杂交参与物种的进化和形成并且增加物种的遗传多样性,据研究至少有 25%植物物种存在杂交和潜在基因渐渗现象(Grant, 1981; Levin & Kerster, 1974)。通过对维管植物间的杂交渐渗研究已证实,许多近缘种的木本植物同样存在基因渐渗现象,比如柳树、桉树和杨树等都有研究表明存在渐渗杂交(阎毛毛等, 2011); 榲桲和蒙古栎两近缘种间存在种间杂交(王越, 2012)。裸子植物中松科植物, 马尾松与黄山松也存在渐渗杂交(阎毛毛, 2011)。有关渐渗杂交的研究表明, 同域分布的近缘种林木之间会经常发生渐渗杂交现象,但是基因渐渗的方向和强度存在差异(Whittemore & Schaal, 1991)。在全球变化的背景下,加之人类活动的影响,更加剧了物种栖息地的变化,这使得一些物种的空间格局和遗传结构发生了巨大的变动,一些物种间的基因流也更加频繁,杂交现象也逐渐增加(Bryant *et al.*, 1997)。研究种间渐渗杂交,尤其是同域分布的近缘种林木间的渐渗杂交,对于了解物种形成和进化机制以及更好的利用林木种质资源和制定科学的物种保护策略都具有非常重要的意义。

1.1.2 鉴定林木种质资源的研究方法

林木种质资源的鉴定方法随着科学技术的发展不断在改进,主要从形态学标记、细胞学标记、蛋白标记和分子标记方面进行研究。随着几何形态学方法的发展与 PCR 技术及高通量测序技术的发展,目前用到最多的是形态标记及分子标记。

1.1.2.1 形态标记方法研究进展

植物不能通过移动来逃离不利的栖息地以及环境扰动,表型可塑性和发育不稳定性是植物应对不同的环境和压力的重要对策。特别是叶片的表型可塑性对植物的适应性有重要的影响,因为叶片可以通过调节叶型来吸收充足的光能并且促进气体的交换(Tsukaya, 2004)。植物的形态对于植物物种鉴定具有重要的地位(Bell, 2008),因此形态学标记方法(Morphological Markers)也不断的发展完善,由传统的线性测量方法(Traditional linear morphological measurements)到几何形态学方法(Geometric morphometric)是科技进步的重要成果。

形态学标记,可以从植物表型性状上来区分不同物种,是种质资源研究中的重要方法。自 20 世纪早期,形态测量学开始从描述和定性学科逐渐向定量过渡,一些学术报道中出现了简单的形态测量(Whittall & Hodges, 2004); 60 年代随着统计方法的发展,种群内和种群间的形态变化也通过多变量统计学工具来描述,被称为传统的形态测量法,包括对线性测量、角度的测量、数量性状等,如通过刻度尺来测量叶长、叶

宽、叶柄长度等(厉广辉等, 2014; 尚帅斌等, 2015), 此外, 传统植物形态测量法也会通过计算间接的指标如叶片长宽乘积、叶片长宽比、叶片面积等(陈璋, 2008; 李梅等, 2005)。随着计算机技术的发展, 一些研究人员通过计算机软件辅助测量叶片形态特征, 其中得到广泛应用的是“扫描仪+ Image J 软件扫描法”(戴志聪等, 2009; 韩威等, 2014), 该方法较直尺等测量工具, 效率更高, 成本低, 精确度更高, 但依然属于传统的形态测量法。传统的形态测量法在一定程度上为植物物种鉴定提供了重要的依据, 但存在以下不足: (1)线性测量数值不具有同源性, 不同的叶片形态也可以测量出相同的线性距离(宋佳等, 2015); (2)不能排除不同发育期叶片大小的影响(Cottrell *et al.*, 2002; 白明和杨星科, 2007; 桂建芳, 1988); (3)一些叶形特征容易丢失, 不利于得到和分析结果(桂建芳, 1988); (4)耗时长、精确度不够、主观因素大、成本较高。90年代形态测量学的主要研究集中在几何形态结构数据的获得和数据的分析方法上, 被称为形态测量学的革命。

目前几何形态测量学常用的方法有两类: 标志点法(Landmark Methods)和轮廓法(Outline Methods) (Jensen & Miramontes, 2002)。标志点法主要是对同源点进行描述和分析, 数据的获得和处理相对容易, 也可以用来分析物体轮廓, 但是主要限制因素在于一些物体的同源点难以获得; 轮廓法通过傅里叶分析提取物体轮廓形态并进行统计分析, 但是该方法对于一些外形较复杂的物体, 以及部分轮廓缺失的物体较难分析。所以进行形态测量学研究时应该针对不同的植物形态选择适当的方法。几何形态测量学方法促进了生物分类及其系统发育学的发展, 使我们能够把一些生物的形态特征量化, 将生物的轮廓特征用数据的形式呈现出来, 输出结果更为直观, 因而成为形状分析的有力工具(Rodríguez *et al.*, 2007)。几何形态测量方法可以通过标志点揭示叶片的轮廓, 也可以将叶片的形状和大小区分量化(Jensen, 2003)。此外, 几何形态学方法可以区分叶片的对称结构(Symmetric components)和非对称结构(Asymmetric components)的变化模式, 进而总结可遗传的形态特征(对称结构)和主要由非遗传因素引起的(非对称结构) (Viscosi, 2015)。几何形态学方法对于形状的计算、数据分析及可视化方面都具有高度的有效性, 重复性好, 结果更加准确(Viscosi & Cardini, 2011)。形态测量学从简单的线性测量到几何形态测量, 经过了 30 多年的发展, 理论与分析方法不断改进和完善, 具有用时少, 重复性高, 可靠性强等优点, 能够更加细致、全面地评价形态上的差异, 而且能以定量、直观的方式输出结果, 在形态变异分析方面具有独特的优势(Mitteroecker & Gunz, 2009)。传统的形态标记方法常用于物种采样时的直接鉴定, 几何形态法更能反映形态变化的空间关系, 可以用来研究两性分化、异速生长、种群分化、物种进化以及复杂功能结构的形态集成等科学问题(闫宝荣和花保祯, 2010)。几何形态测量学方法与传统的形态测量学方法相比更适合近缘种鉴定。Jensen 用该方法发现了美国两种栎类的杂交种(Jensen, 1990; Jensen *et al.*, 1993); Peñalozaramírez 通

过该方法也发现了栎属叶片的中间形态，证明栎属近缘种间的杂交及回交(Peñalozaramírez *et al.*, 2010); Viscosi 同时用分子标记和几何形态测量学方法研究了欧洲三种栎树近缘种叶形分别受环境和遗传的影响(Viscosi *et al.*, 2012); Niet 通过三维几何形态测量学方法，定量分析了花的形状，精确可视化的解释了花的变异模式(Niet *et al.*, 2010)。

1.1.2.2 分子标记方法研究进展

分子标记(Molecular markers)技术具有稳定、可靠、快速等优点(Agarwal *et al.*, 2008), 相比较于形态学研究, 分子标记技术不会受到环境的影响, 在物种的鉴定中具有得天独厚的优势, 已广泛应用到属、种、品种间的鉴定(Rhymer & Simberloff, 1996; 黄映萍, 2010)。DNA 分子标记技术的本质是通过比较物种个体或种群间遗传物质的差异, 从而鉴定物种及其亲缘关系, 理论上来说是最直接有力的证据。而聚合酶链式反应(PCR)技术的出现使得人们逐渐通过 DNA 分子标记的方法来快速高效地揭示 DNA(细胞核 DNA、线粒体 DNA、叶绿体 DNA)多态性以解决物种的鉴定问题(Nei, 1987; 赵焕英和包金凤, 2007)。在植物中由于线粒体基因的多态性较低, 使得基于核基因和叶绿体基因的 DNA 分子标记技术应用更加广泛(Nei, 1987; 曹立荣等, 2013)。目前在植物中微卫星(Simple Sequence Repeats, SSR)分子标记被广泛应用于植物种质资源鉴定。SSR 分子标记指 2-5 个核苷酸单位的多次串联重复的 DNA 序列, 一般重复次数为 10-50 次(Amos *et al.*, 2007; Hamada *et al.*, 1982)。与其它分子标记技术相比具有以下优点: (1)SSR 的数量丰富, 涵盖了整个的基因组, 序列揭示了较高的多态性; (2)具有多等位基因的遗传特性, 可以提供的信息量较高; (3)SSR 为共显性遗传, 能够清晰鉴定杂合基因型; (4) SSR 分子标记对 DNA 质量的要求相对其它分子标记较低, 需求 DNA 量少并且可适用于部分降解的 DNA; (5)SSR 序列两端相对保守, 设计的引物具有特异性, 可以在近缘种、属间通用, 有利于不同研究人员的交流合作(Li, 1955; 唐荣华等, 2002)。因为 SSR 分子标记具有以上优势, 生物化学和分子技术测试指南中已将 SSR 标记作为 DNA 指纹数据库构建的推荐标记之一, 并且在种群遗传学中的应用也相当广泛: Sosa 通过 5 对 SSR 引物对加那利接骨木(*Sambucus palmensis*)的种群进行研究, 结果表明接骨木的种群具有较高的遗传变异水平(Sosa *et al.*, 2010); Soudabeh 基于 8 对 SSR 引物对地中海柏木(*Cupressus sempervirens* var. *horizontalis*)的种群遗传变异进行研究, 结果表明该种群的遗传分化水平较低(Soudabeh, 2012)。Antonecchia 基于 11 对 SSR 引物对同域分布的三种白栎的种群遗传多样性进行研究, 结果发现三个种间存在明显的基因流以及杂交现象(Antonecchia *et al.*, 2015)。

1.1.2.3 形态标记方法与分子标记方法相结合

形态标记方法与分子标记方法相结合的方法是植物种质资源鉴定的可靠依据。经典植物分类(Classical Plant Taxonomy),指依据植物的形态和解剖特征,同时结合地理分布对植物物种进行鉴定和分类(方伟和刘恩德, 2012)。然而经典植物分类法通过植物形态来鉴定物种时,无法准确揭示物种间的亲缘关系,存在以下局限性:(1)植物具有表型可塑性,通过识别可变的表型将有可能造成错误的结论;(2)一些形态分类单元容易被忽视(Knowlton, 2003);(3)部分植物不同的生长阶段表型变化较大,或者不同性别的表现差异较大,通过形态鉴定也容易造成区分错误;(4)虽然形态测量学的分类方法不断提出,但是植物近缘种分类鉴定仍需要具有高水平专业知识的研究人员(Hebert *et al.*, 2003)。

随着分子标记、基因测序等新技术和新方法的快速涌现,对植物物种鉴定的研究更加全面深入。DNA 分子标记与形态学标记相比具有不受环境影响、样本不受发育时期的影响等优点(Hamada *et al.*, 1982; 梁明山等, 2001)。而如果单纯依赖分子标记还存在各物种遗传信息数据库不完善,分子标记片段的选择标准不明确等问题(Degnan & Rosenberg, 2006)。利用分子标记的方法来鉴定物种的前提是根据基因树可以推测出物种树,并由此推断物种的进化历史(Brower *et al.*, 1996)。但是由于进化过程中存在网状进化(Reticulate evolution)即杂交后代与亲本在系统发育树上构成了与“二叉分枝”树不同的网状形式(Sang *et al.*, 1997),不完全谱系筛选和基因渐渗等现象,同一个物种的不同遗传物质可能有不同的进化历史,导致基因树和物种树之间有差异(Degnan & Rosenberg, 2006)。利用不同遗传背景分子标记构建系统发育树,得到的结果可能完全不同,例如通过核基因和叶绿体基因构建系统发育树,得到的基因树经常不完全一致(Tsitroni *et al.*, 2003)。由于形态测量与分子标记对植物鉴定的方法各有其优缺点,所以在植物物种鉴定时要综合两方面的分析,相互补充,才能更好的揭示物种的亲缘关系及表型变异的规律(Klingenberg, 2010)。笔者以分子标记和形态标记为关键词,通过中国知网、谷歌学术、Web of Science 等数据库检索相关文献,对每篇文章研究的物种、形态分析方法、分子标记技术和结论进行分析,结果显示目前通过两种方法相结合来研究探讨种间界线、杂交等案例报道非常少,而且多集中在壳斗科栎属近缘种间(表 1-1)。形态学研究方法使用较多的为传统的形态测量,分子标记方法多为 SSR 分子标记。研究结果显示形态学数据与遗传学数据显著相关,此外虽然传统的形态学方法对部分物种的区分效果显著,但是由于缺乏有效的形态结构分析,不能用直观的图形表示,也无法研究植物的异速生长。

在研究植物叶片形态与基因型关系时,可以通过线性回归的方法来确定叶片形态数据与遗传数据两个变量间相互依赖的定量关系,也可以利用分子标记数据和形态标记数据来构建系统发育树,然后分析比较两种系统发育树的差别。

通过叶片形态与遗传标记两种方法同时对物种进行鉴定时,得到的形态数据与遗传数据的结果不一定完全一致(表 1-1)。也就是说如果利用构建系统发育树的方法来比较叶片形态与基因型间关系,分子系统树有时支持形态系统树,但有时也会出现分歧(武耀廷等, 2001), 因为可能出现以下情况: (1)控制形态特征的基因与 DNA 分子标记的片段有可能位于不同的基因位点, 在进化的速率上不同(彭瑜等, 2008); (2)从实验方法上讲, 遗传方面因为选择不同的 DNA 序列得到的系统树存在差别, 形态方面传统的形态标记与几何形态标记方法得到数据也存在差别, 从而影响系统发育树; (3)所研究的物种中存在隐型种, 不同的物种在形态上相似无法区分, 但是 DNA 分子标记数据可以明确区分; (4)同一基因型的物种存在较强的表型可塑性和局部适应, 在不同环境的影响下, 形态标记数据将它鉴定为不同物种; (5)在遗传方面没有找到合适的标记片段用于区分出近缘种, 然而从形态上可以鉴定两个近缘种, 表明基因流不受限制, 或者两者之间的分化是近期的, 不容易被区分。如果单独利用形态标记方法或分子标记技术来对物种进行鉴定, 有可能将上述(3)、(4)、(5)三种情况进行错误鉴定; 所以植物物种鉴定要基于 DNA 分子标记的数据, 用形态标记的数据进行验证是必要的。

表 1-1 近缘种及杂交鉴定相关文献

Table 1-1 List of the related species and hybrid

物种 Species	科 Family	形态学标记 Morphological Markers	分子标记 Molecular Markers	结论 Conclusion	文献 Literature
北美红栎(<i>Q. rubra</i>), 椭圆果栎(<i>Q. ellipsoidalis</i>)	壳斗科	对叶片的长度、角度、叶柄、 叶脉等形态进行分析	nSSR EST-SSR	叶形数据和分子数据具有强的相关性, 叶形可以很好的将两个种区分开, 分子数据得出种间具有基因流	Gailing <i>et al.</i> , 2012
夏栎(<i>Q. robur</i>)、 <i>Q. pedunculiflora</i>	壳斗科	根据 Kremer <i>et al.</i> , 2002 对叶片 形态进行传统的线性测量方 法、叶片表皮毛	同工酶分 析、叶绿体 DNA	叶形和基因型数据共同支持 <i>Q. pedunculiflora</i> 是 <i>Q. robur</i> 的一个不完全的变种	Curtu <i>et al.</i> , 2011
蒙古栎(<i>Q. mongolica</i>), 辽东栎(<i>Q. liaotungensis</i>)	壳斗科	叶长、叶宽、叶基角度、叶柄 长、叶面积、叶宽性状等 11 个 指标	SSR、叶绿体 基因组	形态学和遗传学的两种方法都可以将 两个物种清晰的区分开, 表明蒙古栎 和辽东栎是分化较大的两个种	刘牧, 2012
↘ 无梗花栎(<i>Q. petraea</i>), 比利牛斯栎(<i>Q. pyrenaica</i>)	壳斗科	叶缘深度、叶柄长、叶最大宽 度等十个指标进行测量, 四个 测量指标的比值, 表皮毛密度	SSR	分子标记区分出两个物种及 5% 的杂 交种, 并且对两个种及杂交种的形态 特征进行分析	Heredia <i>et al.</i> , 2009
匈牙利栎树(<i>Q. frainetto</i>), 无梗花栎(<i>Q. petraea</i>), 柔毛栎(<i>Q. Pubescen</i>)	壳斗科	标志点法: 用 11 个标致点对一 半叶片进行标定	EST-SSRs	两种方法都可以将三个物种区分开, 遗传数据鉴定杂交的准确度高于形态 数据	Viscosi <i>et al.</i> , 2012
轮菊(<i>Dubautia arborea</i> , <i>D. ciliolate</i>)	菊科	叶长、叶宽、株高、冠幅等六 个形态指标	AFLP	分子数据揭示两个种间具有低水平的 遗传分化, 形态数据明确区分了两个 物种及杂交种	Friar <i>et al.</i> , 2007

1.2 栎属研究概况

1.2.1 壳斗科栎属的研究概况

栎属(*Quercus* L.)是壳斗科(Fagaceae)中最大的属, 大约有 450 种分布在北半球的温带地区, 栎属植物的适应能力极强, 是北半球分布最广(亚洲、欧洲、北美洲和非洲大陆), 种类最多的属之一 (Nixon & Muller, 1997; Huang *et al.*, 1999)。因为栎属的木材密度高, 耐磨损, 在世界的木材生产中占据重要地位, 因而被西方国家广泛栽种, 应用于建筑及家具制造等行业。同时栎属树木在欧洲的森林中起着重要的作用, 占整个森林立木蓄积的 9%, 阔叶林蓄积的 29% (Lefort *et al.*, 2000), 广泛用于不同立地造林, 是半干旱地区退化立地的重要造林树种, 也是重要的园林绿化和观赏树种, 是彩叶树的主要树种。中国是栎属植物的分布中心地之一, 广泛分布常见的栎属植物大约有 35 种 (Huang *et al.*, 1999), 是我国亚热带常绿阔叶林的主要建群种, 也是我国温带落叶阔叶林的优势种之一, 是重要的绿化植物, 对我国的生态环境起到重要的作用和影响。落叶栎在我国主要分布于中亚热带地区, 具有普遍的生态适应性, 可以在环境较为苛刻的条件下生存, 所以在一些林地内可以作为先锋树种。但是栎属植物的分类极其困难, 因为栎属植物属内物种庞大, 地理分布广泛, 具有高水平的表型可塑性, 而且具有较高水平的基因流和广泛的杂交 (Kress *et al.*, 2005; Bacilieri *et al.*, 1996; Manos *et al.*, 1999; Rushton, 1993)。所以对栎属近缘种植物的深入研究, 具有重要价值。

1.2.2 壳斗科栎属遗传资源保护现状

栎属植物作为我国重要的林木种质资源, 是林木优良品种进行培育的遗传基础, 也是我国林业在发展新品种及保护固有林木种质资源的重要树种。实践证明, 深入了解林木遗传资源, 是育种工作以及林木的品种改良的先决条件, 直接关系到现代林木培育的质量。栎类植物广泛的分布于我国各省, 种类繁多, 遗传资源十分丰富, 但是我国目前对栎类资源遗传学研究及利用还相对较少。目前对我国栎类资源的研究包括: 蒋焱等对收集于我国福建、广西等 5 个省的大叶栎的种质资源进行筛选 (蒋焱等, 2011)。李文文对我国 6 个省的蒙古栎种源进行了收集, 研究了蒙古栎(*Q. mongolica* Fisch. ex Ledeb)的表型分化, 并且进行了蒙古栎的扩繁实验 (李文文, 2010)。除了我国乡土栎类种质资源的收集外, 我国还开展了大量的栎类引种工作, 最早于 19 世纪中期便开始了栎类资源的引种工作, 早期仅有 3 种栎树被引种到国内, 且引种的数量较少; 中期约 20 世纪末期, 20 余种栎类分别从美国、爱尔兰等引入中国; 后期为 20 世纪末期至今, 是栎类引种的高峰期, 大约有 30 余种栎类引入中国, 培育出耐盐碱耐水湿等优良栎类林木资源, 应用于园林绿化等行业。除了保护且增加我国栎类种质资源, 同时也对其遗传多样性开展了更为深入的研究。杜芳等对川滇高山栎(*Q. aquifolioides*)

的谱系地理结构做了系统的研究,在川滇高山栎的整个分布范围内选取 58 个天然居群,基于 cpDNA 构建系统进化树将川滇高山栎划分成三个进化枝(藏东、川西、滇北),与地理上川滇高山栎的生长分布区一致,然后运用 nSSR 标记的方法,研究了川滇高山栎的遗传结构及遗传多样性(Du *et al.*, 2017); 恽锐等通过使用 DNA 多态性和 DNA 扩增指纹方法对北京东灵山地区的辽东栎(*Q. liaotungensis*)种群进行研究,表明辽东栎种群内存在高度的遗传变异(恽锐等, 1998); 徐小林等利用微卫星的分子标记方法,通过 16 对 SSR 对我国 4 个省的栓皮栎(*Q. variabilis*)种群遗传多样性进行研究,结果表明栓皮栎种群内具有较高的遗传多样性(徐小林等, 2004); 王淑霞等通过 AFLP 的分子标记方法对灰背栎(*Q. senescens*)的 8 个居群的遗传结构进行了研究,结果表明灰背栎居群的遗传变异水平会随着海拔梯度的升高呈降低的趋势(王淑霞等, 2005); 邸晓瑶通过 3 对叶绿体 DNA 片段,对 52 个槲栎(*Q. aliena*)居群的地理谱系结构、种群遗传多样性、遗传结构等进行研究,揭示了槲栎的历史种群动态以及在种水平上具有较高的遗传多样性(邸晓瑶, 2017)。虽然国内目前对栎类的遗传多样性的研究逐渐开展,但存在研究方法不够全面,缺乏对野生近缘种林木种间遗传资源与形态学方法相结合的研究。

过去的几十年一些研究通过形态特征来鉴定栎属植物的杂交(Bruschi *et al.*, 2000; Gugerli *et al.*, 2007; Viscosi *et al.*, 2009; Viscosi *et al.*, 2009), 分析种内和种间叶片表型可塑性的受控因子(Ponton *et al.*, 2004; Sisó *et al.*, 2001), 或者研究叶片形态与遗传的关系(Curtu *et al.*, 2007; Heredia *et al.*, 2009; Kelleher *et al.*, 2005; Saintagne *et al.*, 2004)。通常,叶片形态的研究方法基于传统形态学,叶片的形态通过测量、计算变量和一些定量的参数来表示叶片形态(Curtu *et al.*, 2007; Heredia *et al.*, 2009; Kelleher *et al.*, 2005; Saintagne *et al.*, 2004)。在一些研究中,通过使用几何形态学方法来分析同源点和叶片轮廓(Albarrán-Lara *et al.*, 2010; Peñalozaramírez *et al.*, 2010; Sisó *et al.*, 2001; Viscosi & Cardini, 2011; Viscosi *et al.*, 2009)。

1.2.3 槲树和槲栎物种介绍

1.2.3.1 形态特征

槲树(*Q. dentata* Thunb.)和槲栎(*Q. aliena* Bl.)为栎属的两个近缘种,都属于落叶栎(Hubert *et al.*, 2014)。槲树树高可达 25 米左右;小枝粗壮,具有深沟,具有密集的灰黄色星状绒毛;叶柄长 2-5mm,具有浓密的褐色绒毛;叶片接近倒卵形,叶片大小约为 10-30 × 6-30 cm,背面具有浓密的浅褐色星状绒毛,叶片正面为深绿色接近无绒毛,叶片基部接近圆形,叶缘成波浪状或不明显的锯齿状,叶尖较短;4-10 根二级静脉分布于主脉两侧;雌花絮腋生于新生枝条的顶端,1-3cm 长;壳斗成杯状,包括苞片大小约 1.2-2 × 2-5 cm,大约包围种子的 1/2-2/3;苞片红棕色,狭窄的披针形,长约 1cm,竖直或者翻卷,外被褐色丝状绒毛;坚果圆卵形,1.5-2.3 × 1.2-1.5 cm,

无毛(Huang *et al.*, 1999)。槲栎树高可达 30 米左右；小枝浅褐色，近光滑；叶柄长 1-1.3cm，近光滑；叶片接近倒卵形，叶片大小约为 (5-) 10-20 (-30) × 5-14 (-16) cm，基部楔状或接近圆形，顶端钝渐尖；10-15 根二级静脉分布于主脉两侧；雌花序同样腋生于新生枝条的顶端；单个壳斗或者 2 到 3 个生于一簇；壳斗成杯状，包括苞片大小约 1-1.5 × 1.2-2 cm，大约包围种子的 1/2；苞片倒卵形披针形，长约 2cm，密集的，浅灰色绒毛；果实椭圆形或卵形，大小约 1.7-2.5 × 1.3-1.8 cm (Huang *et al.*, 1999)。

1.2.3.2 生长习性及其分布

槲树与槲栎常生长于混交林内；海拔分布范围都在 100-2700m；在我国广泛分布，常见分布于北京、山东、陕西、河南、河北、安徽、辽宁、四川、云南、浙江等，两个近缘种的生活区域存在重叠，其分布地区环境多变，有着良好的适应性。

1.2.3.3 利用价值

槲树和槲栎是重要的绿化树种之一，2013 年被列入《北京市主要常规造林树种目录》，这对于丰富和更新首都园林绿化树种及林木种质资源，保障生态环境建设的可持续发展具有重要意义。此外，槲树和槲栎是我国重要的经济树种，资源利用开发具有悠久的历史，槲树和槲栎叶片都可以用来养蚕(Liang *et al.*, 2015)，槲树和槲栎的果实可以用于饲料添加和酿酒(Peng *et al.*, 2007)；槲树和槲栎的树皮可以用于提取烤漆。

1.2.3.4 遗传学及形态学研究进展

槲树和槲栎虽然在我国分布广泛，资源丰富，同时在日本和韩国也扮演着重要的生态角色，但是对槲树和槲栎的形态学及遗传学研究还相对较少。遗传学方面：吕佳等基于叶绿体 DNA(cpDNA)和 nSSR 标记对北京上方山小尺度范围内同域分布的槲树、槲栎和栓皮栎(*Q. variabilis*)进行研究，cpDNA 研究表明三个种间存在高度的遗传分化，nSSR 研究发现槲树和槲栎之间存在有限的基因流(Lyu *et al.*, 2018)；Kanno 等通过叶绿体 DNA(cpDNA)研究了槲栎、槲树、枹栎(*Q. serrata*)和蒙古栎变种(*Q. mongolica* var. *crispula*)四种栎类的遗传关系，研究结果表明杂交和基因流依然存在于四种栎类之间(Kanno *et al.*, 2004)；Hubert 等通过核基因重建了栎属植物的系统发育树，表明槲树与槲栎的亲缘关系较近(Hubert *et al.*, 2014)。形态学方面：有许多物种被命名为槲树与槲栎变种的杂交种，这些形态中间型根据形态学特征被推测出亲本，例如：有报道称房山栎(*Q. fangshanensis* Liou)(Contr. Inst. Bot. Natl. Acad. Peiping 4: 7. 1936)是槲栎的变种(*Q. aliena* var. *pekingensis*)与槲树杂交产生，发现于河北，河南和陕西(徐永椿和任宪威，1998)；黄山栎(*Q. stewardii* Rehder)和凤城栎 (*Q. fenchengensis*，是槲栎的变种(*Q. aliena* var. *acutiserrata*)与槲树的杂交种产生，被发现于安徽，河北，江西，山西和浙江(徐永椿和任宪威，1998)。然而房山栎，黄山栎和凤城栎在英文版中国植物志(Flora of China)中没有承认这三个种的分类地位，因为槲栎组种间存在的

复杂的杂交现象，种间界线不明确，所以将其归并为榲栂组(Huang *et al.*, 1999)。

1.3 研究目的和意义

林木种质资源的研究一直都受到生态学家、植物学家以及林木育种学家的高度重视。榲树和榲栂在我国分布广泛，资源十分丰富，不仅本身具有重要的生态价值，而且根据适地适树原则，可以广泛应用于我国各省的园林绿化中，同时又具有较高的经济价值。但是目前对榲树和榲栂的研究多集中于资源收集、单独一个种的形态研究及遗传研究，没有关于这两个种物种界线的研究。

根据已有的研究发现榲树和榲栂在遗传上亲缘关系较近，且存在形态中间型的个体，同时在野外观察经常发现榲树和榲栂存在同域分布的现象，形态上存在类似中间型的个体。因此，初步推断这两个近缘种存在基因交流或者杂交现象。本研究首先通过两个近缘种的物候期观测，目的在于确定它们的花期是否存在重叠。然后基于 SSR 分子标记技术和几何形态学标记技术解决以下问题：榲树和榲栂种群的遗传多样性与结构是怎样的？榲树与榲栂的物种界线是否明确？榲树和榲栂的叶片几何形态差异有哪些？几何形态学方法是否可以区别出杂交个体？两个近缘种的叶片形态对环境因子的响应机制？

本论文首次对栎属近缘种榲树和榲栂的遗传学及几何形态学进行研究，旨在为栎属林木的种质资源的鉴定、保护和合理开发利用提供重要的科学参考依据。

2 基于北京上方山槲树和槲栎的物候观测

2.1 上方山研究区域概况

北京上方山国家森林公园位于北京市房山区，北纬 39° 39' 42" — 39° 40' 50"，东经 115° 48' 02" — 115° 49' 50"，平均海拔 400m，最高峰 860m，总面积约为 353.3hm²，山脉纵横，山势陡峭，土壤以山地淋溶褐土为主。气候类型属于暖温带半湿润气候，年平均气温为 12℃，年平均降水约 650-760mm。属于太行山山脉，具有保存良好的天然次生林。根据已有研究，上方山共有野生维管束植物 81 科 213 属 303 种，主要森林类型为温带针叶林和暖温带落叶阔叶林，落叶阔叶林的优势种为：栎属(*Quercus*)、榆属(*Ulmus*)、椴属(*Fraxinus*)、朴属(*Celtis*)等，温性针叶林的优势种为：油松(*Pinus tabulaeformis*)、侧柏(*Platycladus orientalis*)。拥有 6 种在北京乃至北方稀有的植物：拐枣(*Hovenia dulcis*)、独角莲(*Typhonium giganteum*)、省沽油(*Staphylea bumalda*)、小叶中国蕨(*Sinopteris albofusca*)、房山翠雀(*Delphinium grandiflorum* var. *fangshanense*)、涝峪苔草(*Carex giraldiana*)(鲜冬娅, 2008)。

2.2 槲树和槲栎物候观测方法

2.2.1 物候观测地点及植物选择

本研究选择固定的物候观测地点，地点选择时参考了槲树和槲栎在上方山的分布情况，将每个小地点作为一个观测点，共选取了 7 个观测点：橡树林、钟楼、塔林、天坑、山后沟谷、云水洞、天柱峰；选取地势较平坦的区域，易于观测。选取的槲树和槲栎个体为健康的中龄林，每个小地点各选取 5 棵槲树和槲栎进行拍照记录，共记录 65 棵树的物候期，对这 65 棵树进行编号及喷漆标记。

2.2.2 物候观测时间及要求

物候观测是一项长期的工作，尤其在开花期要求连续观测，本研究于 2017 年 3 月 25 日至 2017 年 9 月 29 日，在萌芽期、展叶期、观果期每周观测一次，在开花期 2-3 天观察一次。

2.2.3 本研究所选物候期

- (1)萌芽期：包括芽膨大期和芽开放期。
- (2)展叶期：包括展叶开始期、展叶盛期和春色叶变期。
- (3)开花期：分别统计雄花和雌花的开花始期、开花盛期和开花末期。
- (4)观果期：包括幼果出现期、果实成熟期和果实脱落期。

2.3 物候观测结果

小尺度的野外物候观测结果表明，槲树雄花的花期为 4 月 8 号-5 月 6 号，雌花

的花期为4月15号-5月6号；槲栎雄花的花期为4月1号-4月29号，雌花的花期为4月7号-4月29号。槲树和槲栎的雄花要早于雌花一周左右，槲树和槲栎两个种之间的盛花期不重叠，开花始期和开花末期存在一周左右的重叠现象。根据物候观测结果(表2-1，图2-1)可知，槲树和槲栎的花期存在重叠现象，形成了不完全的合子前生殖隔离，为槲树和槲栎的基因交流提供了可能。



图 2-1 槲树和槲栎物候观测照片

Fig. 2-1 The phenology observation photos of *Q. dentata* and *Q. aliena*

a、b、c 分别为槲栎雄花初花期、雌花盛花期、雌花末期照片

d、e、f 分别为槲树雄花初花期、雌花盛花期、雌花末期照片

a, b, c represents the initial blossoming stage of male flower, female flowering stage, and flowering final stage of *Q. aliena* respectively. d, e, f represents the initial blossoming stage of male flower, female flowering stage, and flowering final stage of *Q. dentata* respectively.

2.4 小结

生殖隔离可以有效的阻止基因交流以及杂交，可以很好的维持物种的完整性。生殖隔离的两种方式为合子前隔离和合子后隔离(Rieseberg & Willis, 2007)。合子前隔离可以由地理隔离、时间隔离、花部隔离、机械隔离等原因造成，主要原因是阻碍了花粉之间的交流。合子后隔离主要原因是遗传不兼容，形成的杂合体有可能出现杂种致死或者杂种不育现象，从而阻止杂交个体的产生(Rieseberg & Willis, 2007)。根据物候观察结果表明槲树槲栎具有不完全的合子前隔离，当然此需要进一步的人工授粉试验进行验证。如果将槲树(槲栎)的花粉人工授粉于槲栎(槲树)，出现花粉败育、不结实、F1代不能成活、F1代不育等现象则为合子后生殖隔离反之则为合子前生殖隔离。

表 2-1 物候观测信息

Table 2-1 The information of phenological observation

树种 Species	萌芽期 Stages in germination		展叶期 Leaf-expansion periods			花期 Flowers period					果期 Fruit period		
	芽膨大 期	芽开放 期	展叶 始期	展叶盛期		雌花			雄花		幼果期	盛果期	果落期
					始期	盛期	末期	始期	盛期	末期			
槲栎 <i>Q. dentata</i>	3/25- 4/1	4/1-4/8	4/8-4/22	4/22-4/29	4/15- 4/22	4/22- 4/29	4/29- 5/6	4/8- 4/22	4/22- 4/29	4/29- 5/6	8/14- 9/14	9/14- 9/24	9/24- 9/29
槲栎 <i>Q. aliena</i>	3/18- 3/25	3/25-4/1	4/1-4/15	4/15-4/22	4/7- 4/15	4/15- 4/22	4/22- 4/29	4/2- 4/15	4/15- 4/22	4/22- 4/29	8/14- 9/14	9/14- 9/24	9/24- 9/29

3 基于 SSR 分子标记的种群遗传结构及遗传多样性分析

3.1 实验材料与实验方法

3.1.1 样本采集与处理

经过查阅地方植物志及相关的文献，同时在中国数字标本馆、中国植物图像库，来确定槲树和槲栎两个近缘物种在中国北方的同域分布的情况，分别于 2015 年 8 月-10 月对北京上方山和雾灵山，河北雾灵山同域分布的槲树和槲栎种群进行采集，以及 2017 年 8 月对山东昆嵛山，陕西秦岭的子午峪，河南南阳桥端镇三个地区同域分布的槲树和槲栎种群进行采样。每个种群通过 GPS 记录仪(GRAMIN 621sc)详细的记录经纬度以及海拔信息，采集过程中每个种群至少相隔 5 公里，为了避免克隆每个种群内的个体至少相隔 10 米的距离，每个个体采集 2 片幼嫩的叶片，硅胶保存用于提取基因组 DNA，将采集的标本编号，期间硅胶颜色发生变化后要及时更换，以免叶片发霉影响 DNA 提取效果。最终经过两次采集获得了 452 棵树的 904 片幼嫩叶片。所有采集标本保存于北京林业大学林业楼分子生态实验室。采集的种群地点及名称代号见图 3-1，具体种群坐标信息见表 3-1，种群样本数见表 3-4。

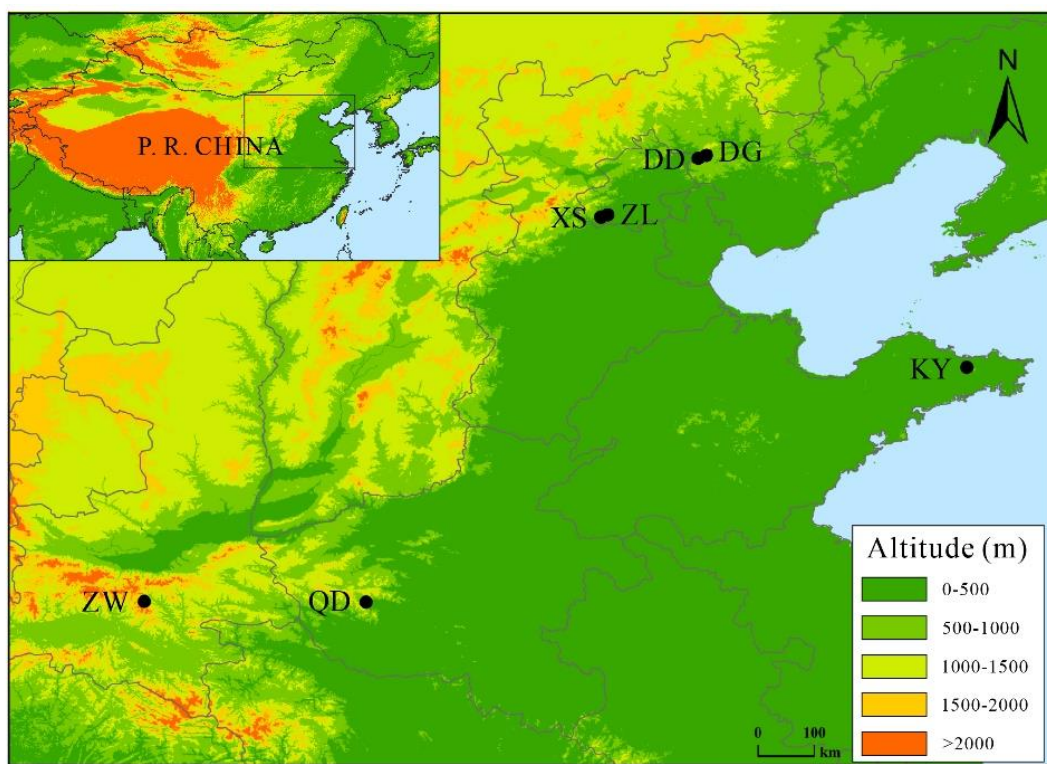


图 3-1 槲树和槲栎采样种群分布图

Fig. 3-1 Sampling populations distribution area of *Q. dentata* and *Q. aliena*

表 3-1 栲树和栲栎种群采集样品信息表

Table 3-1 Sample information of *Q. dentata* and *Q. aliena*

XS: XiangShulin; ZL: Zhonglou; DG: Donggou; DD: DaDianzi; QD: Qiaoduan; KY: Kunyushan; ZW: Ziwuyu

种群 population	纬度(N) Latitude	经度(E) Longitude	海 拔 (m) Altitude	等温性 (*100) Bio03	干 季 均 温 (°C) Bio09	暖 季 均 温 (°C) Bio10	降 水 量 (mm) Bio13	降 水 量 (mm) Bio14	栲 树 (<i>Q. dentata</i>)		栲栎(<i>Q. aliena</i>)		杂交(Hybrid)		
									株数 #trees	叶片 #leaves	株数 #trees	叶片 #leaves	株数 #trees	叶片 #leaves	
XS	39.67	115.49	659	27.94	-2.92	23.07	200	3	19	95	92	460	7	35	
ZL	39.41	115.50	580	28.04	-3.10	22.65	191	3	16	80	54	270	10	50	
DG	40.39	117.30	836	27.17	-7.68	21.52	170	2	6	30	10	50	4	20	
DD	40.36	117.22	692	26.38	-7.22	21.67	170	2	21	105	10	50	4	20	
QD	33.55	112.08	475	30.05	3	25.12	151	9	23	115	7	35	8	40	
KY	37.28	121.64	169	24.88	0.63	23.08	179	11	21	105	19	95	2	10	
ZW	33.56	108.55	1132	27.03	-0.57	20.53	126	7	23	115	2	10	9	45	
Total										129	645	194	970	44	220

3.1.2 总 DNA 提取方法

榲桲和榲栌的基因组 DNA 的提取是通过 TIANGEN 购买的植物基因组 DNA 试剂盒进行提取，具体操作步骤如下：

- (1)提前将叶片分装于 2ml 的离心管内，每个个体提取的叶片质量在 0.015-0.030 g 的范围内，同时每个离心管内放入钢珠。
- (2)将 GP1(使用前将 β -巯基乙醇加入 GP1 中， β -巯基乙醇浓度为 0.1%)，提前在 65°C 水浴锅中预热半小时。
- (3)将装好样的离心管放入研磨仪中进行研磨(注意研磨仪使用过程中要配平)，研磨仪的频率设定为 28(1/s)，研磨一分半钟。
- (4)样品研磨好后要及时加入 700 μ l 预热好的 GP1(在通风橱内加入)，然后颠倒混匀，放入 65°C 的水浴锅水浴 20 分钟，期间每隔 5 分钟摇匀一次。
- (5)水浴结束后再在通风橱内加入 700 μ l 的三氯甲烷，颠倒混匀数次，在高速离心机中 12 000 rpm 离心 5 分钟。
- (6)将离心后的上清液用移液枪转移到新的 2ml 的离心管中(离心管做好标记)，然后加入 700 μ l 的 GP2，颠倒混匀数次后在室温下静置 5min。
- (7)将混匀的液体分两次加入吸附柱 CB3 中，12 000 rpm 离心 30 秒，然后弃掉废液。
- (8)将 500 μ l 的缓冲液 GD 加入吸附柱 CB3 中(使用前要按要求加入无水乙醇)，在 12 000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液，将 CB3 放回到刚才的收集管内。
- (9)接着向吸附柱 CB3 中加入 600 μ l 的漂洗液 PW(使用前按照说明加入无水乙醇)，12 000 rpm 离心 30 秒，将 CB3 放回到刚才的收集管内。
- (10)接着再向吸附柱 CB3 中加入 600 μ l 的漂洗液 PW，12 000 rpm 离心 30 秒，将 CB3 放回到刚才的收集管内。
- (11)将收集管在 12 000 rpm 下离心 2 分钟，弃掉废液，然后将吸附柱 CB3 在室温下晾干数分钟(10 分钟左右)，也可以放入 37°C 的烘箱内烘干数分钟，保证完全去除吸附柱上的剩余的漂洗液。因为漂洗液中带有乙醇会影响后续的 DNA 保存及酶反应实验(PCR)。
- (12)将吸附柱 CB3 转入新的 1.5 ml 的离心管中(提前将序号标好)，将 100 μ l 的缓冲液 TE 悬空加入吸附膜的中间部位，室温下静置 5 分钟，最后 12 000 rpm 下离心 2 分钟，将溶液收集到 1.5 ml 的离心管中。得到的 DNA 临时保存在 4°C 的冰箱内，长期保存于 -20°C 的冰箱内。

3.1.3 DNA 样本检测及分装

DNA 提取完成后应用紫外光光度计检测 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 的比值，比值在 1.8 左右即表示 DNA 的纯度较高，若低于 1.8 则表示存在蛋白污染。DNA 提取完成后进行

电泳，使用 1%浓度的琼脂糖制胶，与 1kb 的 DNA Ladder Marker 对比片段长度。所有个体的总 DNA 检测完成后，分别将每个个体的 10 μ l DNA 按顺序分装于 PCR 板内，然后再分别加入 2 倍体积的 ddH₂O 对 DNA 原液进行稀释。

3.1.4 引物筛选及 PCR 扩增实验

本实验中所用到的引物来自于本实验室从榲桲、榲桲及栓皮栎中实验验证的具有多态性的 12 对引物(Lyu *et al.*, 2018) (表 3-2)。PCR 的反应体系包括共 15 μ l，包括：7.5 μ L 的 2 \times TSINGKETM Master MIX、1 μ L(30 ng)模板 DNA、0.06 μ L Primer-M13-F、0.24 μ L Primer-R、0.24 μ L M13 染料、5.96 μ L ddH₂O。

表 3-2 12 对 SSR 引物详细信息
Table 3-2 Description of primer in 12 SSR loci

引物位点 SSR Locus	退火温度 Ta(°C)	核心序列 Motif	序列 Sequence(5'-3')	等位基因 大小范围 Allele size rang(bp)	参考文献 Reference
GOT021	56	AT	AGAAAGTTCCAGGGAAAGCA CTTCGTCCCCAGTTGAATGT	111-128	Durand <i>et al.</i> , 2010
FIR026	56	TC	CTTCATGCACCAATTCCTCA GGCCATGTATGTGTGCAAAA	208-217	Durand <i>et al.</i> , 2010
QmC00716	56	TC	AAGAGAACCCATTCATCCCTGA GTTTCCCGAACAGTGGTTTCTTGA	261-287	Ueno <i>et al.</i> , 2008
POR017	54	CT	CCCATATCCCTCTACGAAAGAA CTGGAGATGACATAGTGTCTCAAA	140-169	Durand <i>et al.</i> , 2010
MSQ13	56	(TC) _n TTG CTGAA(T C) _n	TGGCTGCACCTATGGCTCTTAG ACACTCAGACCCAQmCCCATTTTT CC	216-224	Dow <i>et al.</i> , 1995
FIR015	56	AC	ACCCTAAAACCCCAATCACC CGGATCTTCGGCTATTCTTG	128-138	Durand <i>et al.</i> , 2010
PIE163	56	AG	GAGAGGCATGTGGAACCAAG CAAGCATAGGTGGTGGAACC	208-239	Durand <i>et al.</i> , 2010
DN950726	56	GAT	GCAAGAAGCATGCAGATGGAGAT GTTTGCATGGCCGTCATTAGCATT AAG	334-345	Ueno <i>et al.</i> , 2008
QmC00932	54	TC	AGGCTCAAACAAAACCAAACCG GTTTCCCCTTTCCATAATCAAAC CCT	247-260	Ueno <i>et al.</i> , 2008
DN950446	56	AG	TCTCTTTCTCCGTCCATTATCGC GTTTCTCCACAGACCCCATTTCC	155-185	Ueno <i>et al.</i> , 2008
WAG068	56	AG	TCTGCAACAAAACCAAACAC CGGAGGAGAGAGTCAGCAAC	165-195	Durand <i>et al.</i> , 2010
CcC00063	54	AGA	CAATTGTACTCTGATGTCCCCGC GTTTACCGGAGACTCAAAGAATCG ACC	381-395	Ueno <i>et al.</i> , 2009

PCR 反应程序为:

- | | | |
|---------------|----------|---------|
| 1、预变性 | 95°C | 8 min |
| 2、变性 | 95°C | 30 s |
| 3、退火 | 56(54)°C | 30 s |
| 4、延伸 | 72°C | 30 s |
| 5、步骤 2 到 4 循环 | 38 个循环 | |
| 6、延伸 | 72°C | 8 min |
| 7、保存 | 12°C | Forever |

PCR 反应后, 再进行电泳检测, 将扩增条带清晰的产物送到生工生物技术有限公司进行毛细管电泳检测。检测的结果使用 GeneMarker(SoftGenetics)软件进行读取毛细管电泳的峰图(Hulce *et al.*, 2011)。最终以 EXCEL 表格的形式输出分析结果, 并且对结果进行整理。

3.2 数据分析方法

3.2.1 原始数据处理及数据格式转换

本研究中北京上方山两个种群XS (XiangShulin), ZL (Zhonglou)分子实验数据来自于本实验室已经发表的研究(Lyu *et al.*, 2018)其余数据均为本论文产生的原始数据。首先将GeneMarker读取的原始数据利用Flexbin进行归一化处理, Flexbin是Excel的宏, 可以去除等位基因在读取过程中得到的片段长度的误差(Amos *et al.*, 2007)。将归一化的原始数据保存为 txt.文本格式(缺失数据用英文符号“?”代替, 文本开头要标明“npops =”, “nloci =”, 注意等号前后空格), 由于各个分析软件的输入格式不同, 但是可以通过CONVERT软件将归一化的数据转化成遗传学数据分析中常用软件所需的输入格式, 可以转化为 8 种格式(Glaubitz, 2004)。

3.2.2 遗传结构分析

根据榲栲和榲栌不同个体的等位基因频率的差异, 利用基于贝叶斯模型通过STRUCTURE 2.3.4 软件对榲栲和榲栌种群进行遗传结构分析(假定每类都遵守哈温平衡(Hardy-Weinberg)), 并且假定每个位点为独立位点(Evanno *et al.*, 2005)。在分析过程将种群数(K)值设置为1到10个分类进行分析, 每个K值重复运行20次。Length of Burnin Period 设置为 100 000, Number of MCMC Reps after Burnin设定为200 000。最佳K值的选择: 将所有结果压缩为压缩包, 通过Structure Harvester (Earl & Vonholdt, 2012)进行比对结果, 根据Delta K与K的关系, 找出K值最明显的峰值, 从而确定最有可能的模型(Shafiei-Astani *et al.*, 2015; Amos *et al.*, 2007)。最后通过 Distruct 1.1 (Rosenberg, 2004)得到柱状图。

同样通过R 3.4.3的“adegenet”软件包, 进行主成分分析(Principal component

analysis, PCA)(Jombart, 2008; Jombart & Ahmed, 2011; Team, 2016), 对榲栲和榲栲的遗传结构进行分析。

根据STRUCTURE的结果, 统计了混合系数(Q)值, 来分析样本的纯合或者杂交, 一般认为 Q 值接近0或者1的时候为纯合的个体, Q 值接近0.5的时候被认为是F1代杂合的个体。在栲类中通常 $Q \geq 0.9$ 或者 $Q \geq 0.8$ 被判定为纯合体, $Q < 0.9$ 或 $Q < 0.8$ 被判定为杂交个体(Lepais *et al.*, 2009; Labeyrie *et al.*, 2014), 本研究中分别统计了 Q 值大于0.9的个体和 Q 值小于0.9的个体, 及 Q 值大于0.8的个体和 Q 值小于0.8的个体, 并且计算了纯合与杂合个体的比例。然后通过Arcgis软件(Beyer, 2004)结合地理坐标, 绘制各种群遗传结构的地理分布图。

通过 Arlequin V3.5 软件包(Bittner *et al.*, 2010)进行分子方差分析(Analysis of molecular variance, AMOVA), 遗传分化系数(Genetic differentiation coefficient, F_{ST}), 用于解释种群间的遗传分化程度。当 F_{ST} 的值为 0 的时, 表示该种群内个体可以随机交配, 基因型完全相似, F_{ST} 的值为 1, 表示种群完全隔离, F_{ST} 的值大于 0.25 表示种群的遗传分化很大, 在 0.15~0.25 之间表示种群的遗传分化程度较大, 在 0.05~0.15 之间表示种群的遗传分化程度处于中等水平, 在 0~0.05 之间表示种群的遗传分化程度很弱。

3.2.4 遗传多样性分析

用 GenAlEx V6.5 计算了期望杂合度(Expected Heterozygosity, H_E), 观测杂合度(Observed Heterozygosity, H_O), 有效等位基因数(Effective number of alleles, N_E)和不同等位基因数目(No. of Different Alleles, N_A)。

杂合度可以反映种群的遗传变异的程度, 描述了种群的多态性, 代表不同等位基因遗传变异的状态(Miller & Tanksley, 1990)。期望杂合度是根据哈温平衡推算得到的理论上的杂合度。不同等位基因数(N_A): 在某一染色体的同一位置, 可以控制某个性状的不同基因。有效等位基因数(N_E): 代表了每个等位基因的重要性。

3.3 结果与分析

3.3.1 榲栲和榲栲的遗传结构分析

通过STRUCTURE以榲栲和榲栲两个物种和六个种群为分组单位分别进行运算, 根据STRUCTURE的分析结果并且结合Structure Harvester的计算结果, 通过分析Delta K与K的关系及K值与 $\ln P(D)$ 平均值(图3-1), 得出K值均为2时出现明显的峰值, 结合 $\ln P(D)$ 的最大幅度, 可以确定两个分组的结果相同, K值为2时是最优的划分结果。K=2时, 两个分组计算结果均将榲栲和榲栲划为了两组。从图3-2中可以看出两个物种间均存在一定程度的基因渗透现象, 从图3-2看出榲栲和榲栲间存在不对称的基因流动, 榲栲的基因流向榲栲的遗传结构中渗透较明显。

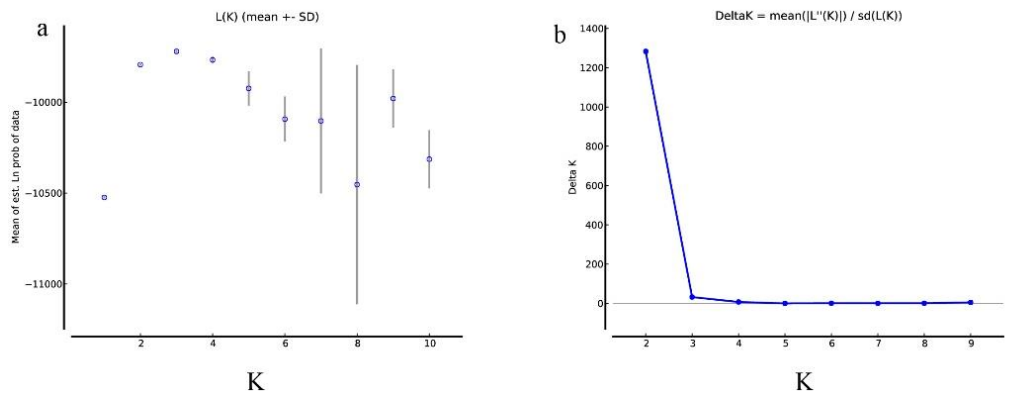


图 3-1 STRUCTURE 分析中K值与ln P(D)平均值、Delta K与K的关系图

Fig. 3-1 Relationship between K value and ln P(D), Delta K value and K value for STRUCTURE analysis

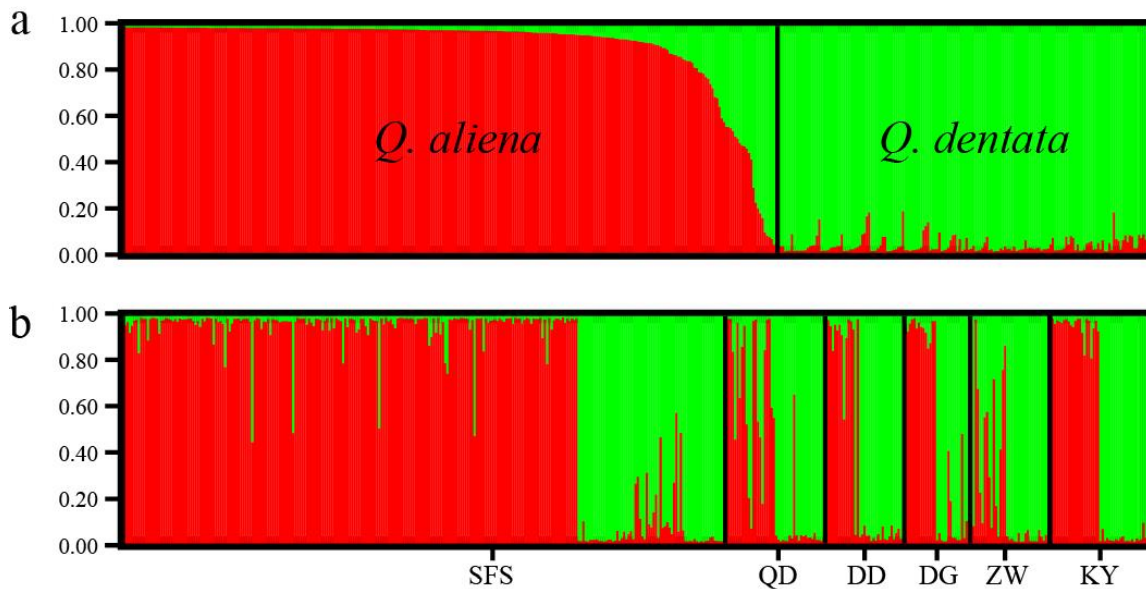


图 3-2 槲树和槲栎的遗传结构图(K=2)

Fig. 3-2 STRUCTURE analysis for *Q. dentata* and *Q. aliena* (K=2)

a: 将所有样本以槲树和槲栎两个物种为分类单位 b: 以6个种群为分类单位

a: Clustering of individuals into *Q. dentata* and *Q. aliena*

b: Clustering of individuals into six population

基于SSR分子标记的PCA结果可知，槲树和槲栎被分为两类，其中槲栎的种群ZW、DD和QD分布与槲树的种群存在重叠，槲树的SFS种群在遗传结构上与槲栎存在部分重叠(图3-3)，与基于6个种群的STRUCTURE结果一致(图3-2)。

AMOVA 的结果显示槲树和槲栎两个物种间的遗传分化系数(F_{ST})为 0.108，表明两个物种间的遗传分化处于中等水平(表 3-3)。槲栎各种群间的遗传分化系数为 0.030，表明槲栎种群间的遗传分化很弱，槲树各种群间的遗传分化系数为 0.027，表明槲树各种群间的遗传分化也很弱。根据变异分数(Percentage of variation (%))可知 89.21%

的变异主要来源于物种内，10.79%的变异来源于两个物种间；榲栌的变异 96.96%来源于种群内变异，3.04%的变异来源于种群间的变异；榲树的变异 97.34%来源于种群内变异，2.66%的变异来源于种群间的变异。

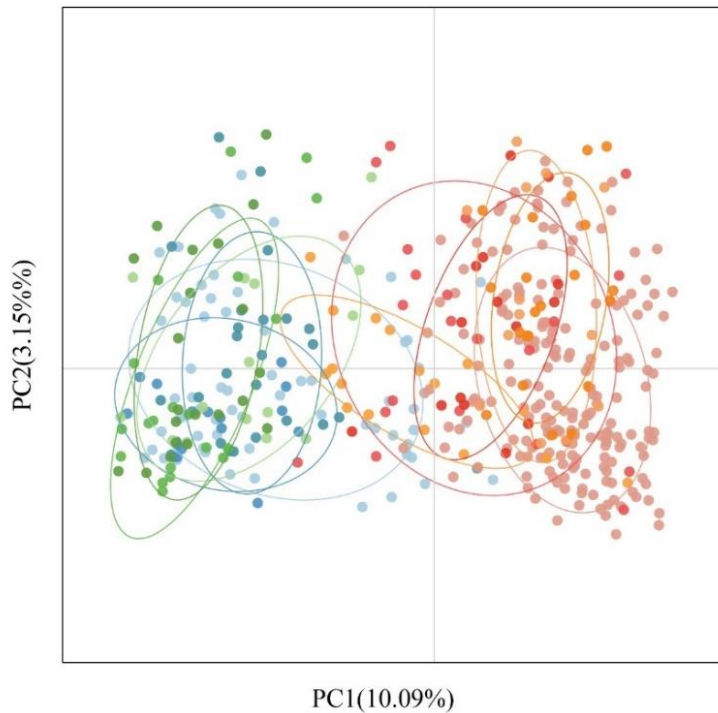


图3-3 基于SSR分子标记的榲树和榲栌主成分分析图

Fig. 3-3 PCA analysis for *Q. dentata* and *Q. aliena* based on SSR markers

表 3-3 基于 12 对 SSR 分子标记 6 个榲树和榲栌种群的 AMOVA 分析

Table 3-3 AMOVA results based on 12 SSR marker for six populations of *Q. aliena* and *Q. dentata*

差异来源	自由度	离均差平方和	方差分量	变异分数	F_{ST} 指数
Source of variation	df	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation (%)	Fixation indices
Between species	1	192.06	0.45	10.79	0.108
Within species	900	3366.09	3.74	89.21	-
<i>Q. aliena</i>					
Among pops	5	50.49	0.11	3.04	0.030
Within pops	570	2057.66	3.61	96.96	-
<i>Q. dentata</i>					
Among pops	5	44.87	0.10	2.66	0.027
Within pops	320	1213.06	3.78	97.34	-

3.3.2 遗传结构的地理分布

通过对榲树和榲栌每个个体的 Q 值进行统计，分别得出了 $Q \geq 0.9$ 的个体和 $Q < 0.9$ 的个体(表3-4)及 $Q \geq 0.8$ 的个体和 $Q < 0.8$ 的个体(表3-5)，结合遗传结构的地理分布图(图

3-4)可以看出, 在 $Q \geq 0.9$ (图3-4a)时, 榭树有154个个体, 榭栎有239个个体, 杂交个体有60个, 各种群均存在杂交个体, 其中种群QD、ZW、DG和SFS存在的杂交个体较多; 在 $Q \geq 0.8$ (图3-4b)时, 榭树有160个个体, 榭栎有253个个体, 杂交个体有38个, 种群KY均为纯合体, 种群QD、ZW、和SFS存在的杂交个体所占比例较大。

表 3-4 榭树、榭栎和杂交的个体数量(纯合: $Q \geq 0.9$)

Table 3-4 Number of *Q. aliena*, *Q. dentata* and Hybrids (pure genotype: $Q \geq 0.9$)

种群 Pop	榭栎 <i>Q. aliena</i>	榭树 <i>Q. dentata</i>	杂交 Hybrids
SFS	186	54	25
QD	9	22	13
DD	11	21	3
DG	12	12	5
ZW	2	24	10
KY	19	21	2
合计 Total	239	154	58

通过 Structure 的结果, $Q \geq 0.9$ 的个体被判定为纯合体, $Q < 0.9$ 的被判定为杂交个体
From the result of structure, assumed individuals with $Q \geq 0.9$ to be pure genotype, $Q < 0.9$ to be hybrids genotype

表 3-5 榭树、榭栎和杂交的个体数量(纯合: $Q \geq 0.8$)

Table 3-5 Number of *Q. aliena*, *Q. dentata* and Hybrids (pure genotype: $Q \geq 0.8$)

种群 Pop	榭栎 <i>Q. aliena</i>	榭树 <i>Q. dentata</i>	杂交 Hybrids
SFS	191	57	17
QD	12	23	9
DD	12	21	2
DG	14	13	2
ZW	3	25	8
KY	21	21	0
合计 Total	253	160	38

通过 Structure 的结果, $Q \geq 0.8$ 的个体被判定为纯种, $Q < 0.8$ 的被判定为杂交个体
From the result of structure, assumed individuals with $Q \geq 0.8$ to be pure genotype, $Q < 0.8$ to be hybrid genotype

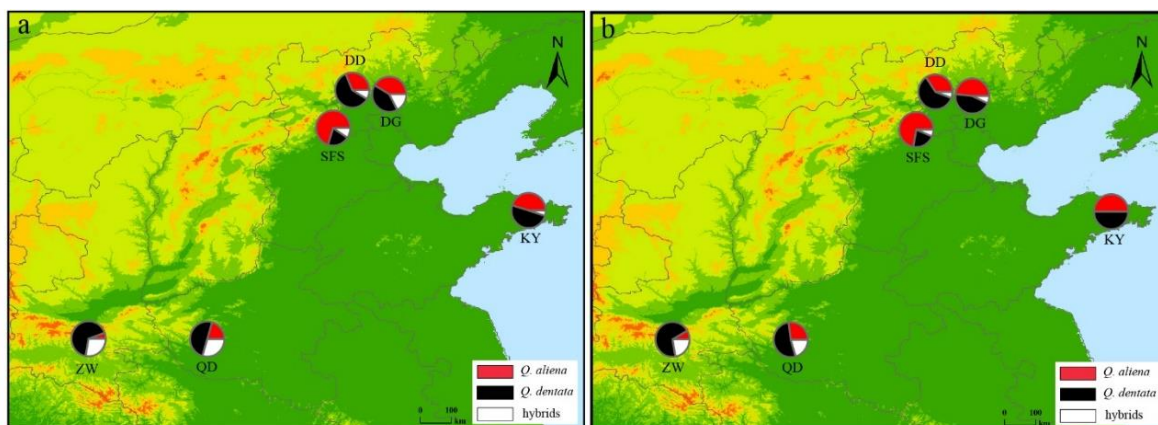


图3-4 基于SSR分子标记的槲树和槲栎遗传结构地理分布图

Fig. 3-4 Geographic distribution of combined SSR markers for *Q. dentata* and *Q. aliena*

a: $Q \geq 0.9$ 的个体被判定为纯合体, $Q < 0.9$ 的被判定为杂交个体; b: $Q \geq 0.8$ 的个体被判定为纯合体, $Q < 0.8$ 的被判定为杂交个体

a: assumed individuals with $Q \geq 0.9$ to be pure genotype, $Q < 0.9$ to be hybrids genotype; b: assumed individuals with $Q \geq 0.8$ to be pure genotype, $Q < 0.8$ to be hybrids genotype

3.3.3 遗传多样性分析

通过GenAlex软件对12个种群451个槲树和槲栎样本进行遗传多样性的分析,统计了槲树和槲栎的观测等位基因数(N_A)、有效等位基因数(N_E)、观测杂合度(H_O)、期望杂合度(H_E)四个指标。总体来说,槲树和槲栎两个物种(表3-6)的遗传多样性各指标系数差别不大,观测杂合度槲树为0.63,槲栎为0.64,槲树和槲栎的期望杂合度为均0.61。槲栎种群的平均有效等位基因数是4.18,槲树种群的平均有效等位基因数是4.34。槲树和槲栎不同种群间(表3-7)的观测等位基因数范围最小为槲栎种群DG-A是4.92,最大值也是槲栎种群SFS-A是12.33。槲栎种群的观测等位基因数是7.38,槲树种群的观测等位基因数是7.56。有效等位基因数范围最小为槲栎种群KY-A是3.32,最大值槲树种群SFS-D是5.42。通过各种种群的遗传学参数上来看,观测杂合度最大值为槲栎种群ZW-A和槲栎种群KY-A是0.69,最小值为槲树种群DG-D是0.56。期望杂合度最大值为槲树种群SFS-D是0.68,最小值为槲树种群DG-D是0.55。

表 3-6 槲树和槲栎物种的遗传多样性

Table 3-6 Genetic diversity estimates in the species of *Q. aliena* and *Q. dentata*

物种	不同等位基因数	有效等位基因数	观测杂合度	期望杂合度
Species	N_A	N_E	H_O	H_E
<i>Q. aliena</i>	7.38	4.18	0.64	0.61
<i>Q. dentata</i>	7.56	4.34	0.63	0.61
Average	7.47	4.26	0.635	0.61

N_A = No. of Different Alleles; N_E = No. of Effective Alleles = $1 / (\text{Sum } p_i^2)$; H_O = Observed Heterozygosity = No. of Hets / N; H_E = Expected Heterozygosity = $1 - \text{Sum } p_i^2$

表 3-7 槲树和槲栎种群的遗传多样性
Table 3-7 Genetic diversity estimates in the population of *Q. aliena* and *Q. dentata*

种群 Pop	不同等位基因数 N_A	有效等位基因数 N_E	观测杂合度 H_O	期望杂合度 H_E
<i>Q. aliena</i>				
SFS-A	12.33	4.51	0.65	0.61
QD-A	7.33	4.50	0.62	0.62
DD-A	6.67	4.49	0.59	0.60
DG-A	4.92	3.57	0.61	0.56
ZW-A	7.08	4.70	0.69	0.66
KY-A	5.92	3.32	0.69	0.59
<i>Q. dentata</i>				
SFS-D	10.58	5.42	0.67	0.68
QD-D	7.75	4.50	0.68	0.60
DD-D	6.67	4.13	0.62	0.59
DG-D	5.75	3.38	0.56	0.55
ZW-D	7.50	4.13	0.61	0.61
KY-D	7.08	4.46	0.65	0.61

3.4 总结

3.4.1 槲树和槲栎种群遗传多样性

本研究通过12对SSR引物对6个同域分布的槲树和槲栎种群的遗传多样性进行研究,结果表明,槲树各种群的不同等位基因数为5.75~10.58,有效等位基因为3.38~5.42,平均不同等位基因数为7.56,平均有效等位基因数为4.34;槲栎各种群的不同等位基因数为4.92~12.33,有效等位基因为3.32~4.70,平均不同等位基因数为7.38,平均有效等位基因数为4.18。高于邱晓瑶对槲栎种群基于10对SSR引物的研究结果,其平均等位基因数为4.6,平均有效等位基因数为2.74(邱晓瑶, 2017);略低于秦英英对辽东栎种群基于11对SSR引物研究的平均有效等位基因数5.18(秦英英等, 2012);以及王越基于对9对SSR引物对槲树和蒙古栎研究的平均等位基因数7.54(王越, 2012)。根据野外调查发现,槲树和槲栎的人为破坏较少,种群内存在较为古老的个体,也有幼苗的更新,种群的结构较为完整,因而,槲树和槲栎种群的遗传丰富度较高。这与Hamrick的研究结果一致,分布较广泛的物种其遗传多样性丰富度较高(Hamrick & Godt, 1990)。

本研究中槲树和槲栎的期望杂合度的平均值均为0.61,平均观测杂合度分别为0.64和0.63,所反映的遗传多样性水平处于林木遗传变异的较高水。Dayanandan对山杨(*Populus davidiana* Dode)种群的遗传多样性进行研究,期望杂合度的平均值均为0.46(Dayanandan *et al.*, 1998);孙亚光对鹅掌楸种源基于12对SSR引物的研究结果,期望杂合度平均值为0.61(孙亚光, 2007)。

3.4.2 槲树和槲栎种群遗传结构

研究两个物种的遗传结构可以更好的掌握种群的遗传多样性的动态变化,可以更好的致力于两个物种的保护及应用。遗传结构是遗传变异在种群内或者种群间的分布规律(Hamrick, 1989)。Structure的结果表明, $K=2$ 时为最佳的分类,可以将槲树和槲栎种群准确的划分,槲栎种群的基因流向槲树种群内渗透较少,而槲树种群基因流向槲栎种群内渗透更为广泛,为不对称基因流。

长寿的木本植物遗传分化水平要低于其他植物(Hamrick, 1989),主要原因是多数木本长寿植物依靠风媒传粉,种子传播主要依靠鸟类、松鼠等肉食传播,花粉可以进行长距离的传播,所以在一定程度上会增加种群间的基因交流,从而降低遗传分化。据研究表明多数栎属植物有很好的避免自交的机制(Ducousso *et al.*, 1993),因此本研究中槲树和槲栎两个物种间的遗传分化系数(F_{ST})为0.108,表明两个物种间的遗传分化处于中等水平。槲树的遗传分化系数为0.027,来自于种群间的遗传多样性占2.66%,来自于种群内的遗传多样性占97.34%。槲栎的遗传分化系数为0.03,来自于种群间的遗传多样性占3.04%,来自于种群内的遗传多样性占96.96%。本研究中槲树种群间的遗传分化水平和槲栎种群间的遗传分化水平都很弱主要原因有可能是这两个物种的物候期相近,存在不完全的合子前生殖隔离。物种内种群间存在广泛的基因流存,具有较弱的遗传分化。

4 基于几何形态测量学的研究

4.1 材料与方法

4.1.1 样本采集

2015年8月到10月期间对北京上方山和雾灵山,河北雾灵山同域分布的榭树和榭栎种群进行采集;以2017年8月对山东昆崙山,陕西秦岭的子午峪,河南南阳桥端镇三个地区同域分布的榭树和榭栎种群进行采样。每个种群通过GPS记录仪(GRAMIN 621sc)详细的记录经纬度以及海拔信息,采集过程中每个种群至少相隔5公里,为了避免克隆每个种群内的个体至少相隔10米的距离,每个个体采集5片完整且成熟的叶片,用标本夹压制用于后续几何形态学分析。将采集的标本编号,用于形态分析的叶片铺平,置于标本夹中保存。最终经过两次采集获得了367棵树的1835片完整成熟叶片。所有采集标本保存于北京林业大学林业楼分子生态实验室。采集的种群地点及名称代号见图3-1,种群信息(经纬度、海拔、种群标本数量)见表3-1。

4.1.2 样本判定

用于几何形态学研究的物种是依据SSR分子标记的研究结果来进行判定,根据STRUCTURE的结果, $Q \geq 0.9$ 被判定为是纯种, $Q < 0.9$ 被判定为杂交种(Lepais *et al.*, 2009; Lyu *et al.*, 2018)。根据 Q 值的判别结果,最终得到榭树个体129株,榭栎个体194株,杂交个体44株。

4.1.3 气候及地理因子获取

通过AcMAP根据种群的位置信息在WorldClim Global Climate database (<http://www.worldclim.org>)数据库中获取1970-2000年30年的气候因子的平均值,包括19个气候因子(Environmental Systems Research Institute, 2014)。然后通过R语言的函数包“usdm”中的方差膨胀因子分析(Variance Inflation Factor, VIF),将19个气候因子及经度、纬度和海拔信息导入,并去除部分相关性较强的数据,最终得到了5个最具代表性的气候因子:等温性(Bio03)、最湿润季节的平均温度(Bio09)、最温暖季度的平均温度(Bio10)、多雨季节的降水量(Bio13)和干旱季度的降水量(Bio14)。这五个最具代表性的气候因子及海拔数据用于后续的多元统计分析(表3-1)。

4.1.4 叶型数据获取

用于形态分析的叶片带回实验室后用高分辨率扫描仪进行扫描。本实验用CanoScan 5600 F扫描仪(Canon Inc. Japan)对1835片叶片进行扫描,分辨率为4800*9600 dpi。扫描后获得的图像通过使用ImageJ, (下载地址<http://bigwww.epfl.ch/thevenaz/pointpicker/>)软件对叶片所选取的标志点进行标定(Abramoff *et al.*, 2004)。本论文中叶片标志点(图4-1,表4-1)的选取参考榭树和榭栎

的叶片主轴、对称结构以及同源点等信息，同时参考 Viscosi 对 3 种欧洲白栎(*Quercus frainetto* Ten., *Q. petraea* (Matt.) Liebl, *Q. pubescens* Willd.)的叶型标志点位置(Viscosi, 2015)，最终选取 13 个标志点。这 13 个标志点的位置稳定、交叉点清晰，都属于榲栂和榲栂的同源标志点，其中组成轮廓结构的三个标志点(LM1, LM2 和 LM3)构成了叶片的主轴，其余的九个标志点(LM4-LM13)成对的分布于主轴两侧。所有叶片的形态数据通过 13 个标志点坐标(x, y)的数据量化，最终叶型数据的输入格式为“LM=13 X0 Y0 X12 Y12 ID=z1_A01_101”(以空格为界竖排)，示例中 z1 为种群名称，A 表示物种，A01 表示树，101 表示叶片，存为“.txt”格式。

表 4-1 榲栂和榲栂叶片标志点位置描述

Table 4-1 Description of landmarks in leaves of *Quercus dentata* and *Q. aliena*

标志点 Landmark	描述 Description
LM1	叶柄起始点
LM2	叶片与叶柄的连接点
LM3	叶片的顶端
LM4	叶片右侧从顶端起第一个凹陷点
LM5	叶片右侧从顶端起第一片裂叶端点
LM6	叶片右侧离中脉最宽裂叶的端点
LM7	紧接标志点 6 下边的凹陷点
LM8	叶片右侧从叶柄起第一片裂叶端点
LM9	叶片左侧从顶端起第一个凹陷点
LM10	叶片左侧从顶端起第一片裂叶端点
LM11	叶片左侧离中脉最宽裂叶的端点
LM12	紧接标志点 11 下边的凹陷点
LM13	叶片左侧从叶柄起第一片裂叶端点

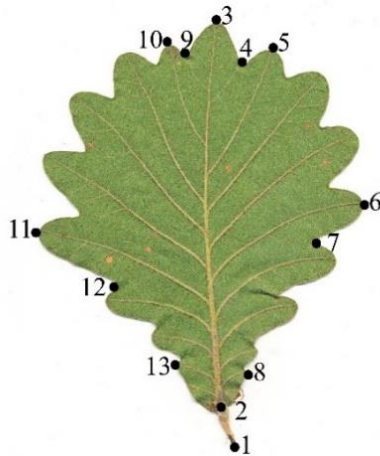


图 4-1 标志点位置

Fig. 4-1 Landmark configuration

数字 1~13 代表叶片的标志点位置

Numbers 1–13 represent the leaf landmarks

4.2 数据分析方法

4.2.1 广义 Procrustes 分析(Generalized Procrustes Analysis, GPA)

将整理好的叶型数据输入 MorphoJ 软件(Klingenberg, 2011), (下载地址 http://www.flywings.org.uk/MorphoJ_page.htm)。传统的形态学分析方法由于无法分离叶片大小与形态两个因素, 往往叶片形态的结果会受到叶片大小的影响, 因此, 将叶片的大小与形态分离是有效的叶片形态分析方法。广义 Procrustes 分析(Generalized Procrustes Analysis, GPA)(Rohlf & Slice, 1990), 通过对坐标数据进行傅里叶转换(Sanfilippo *et al.*, 2009), 可以将叶片的形态和大小成分分开进行分析。叶片形态结构是通过标准化计算得到每个叶片结构的质心大小, 通过最小二乘法对叶片结构进行平移、旋转、缩放得到。每个叶片的大小都是通过测量标志点结构的质心大小而得到, 质心大小(我们在文章里将其简称为大小)的测量是通过测量标志点到图心的距离来衡量, 较分散的叶片标志点结构它的叶片的质心较大, 较聚集的叶片标志点结构它的叶片的质心较小。以上的这一系列操作是将原始的笛卡尔坐标组成的叶片标志点结构区分为了形态和大小两个变量。相比其他方法, GPA 的统计学分析更加可信, 样本的计算更加精确(Rohlf, 2003)。

4.2.2 排除离群值

离群值(outliers)是平行测定获得的实验数据中出现的个别测定值与其它测定值的偏差较大的数据。在 MorphoJ 软件的菜单栏“Preliminaries”中通过“Find outliers”可以检验离群值, 基于多元变量分析的结果, 根据每个叶片偏离平均值的大小选择排除或者保留; 另外一种方法是通过主成分分析(Principal Component Analysis, PCA)排除离群值, 离群值的排除是基于叶片层次上进行的操作。

4.2.3 区分叶片的对称、非对称结构和大小

本研究所用的标志点结构以叶片主脉为轴两侧的标志点对称分布，因此，后续的 PCA 分析及 2B-PLS (Two Blocks Partial Least Squares) 分析可以将对称结构、非对称结构与叶片大小分离分别进行统计分析，具体操作如下：在 MorphoJ 软件的菜单栏“Preliminaries”中选择“Select landmarks”，将会出现对话框，为新建的数据命名，之后在“观测对称性(Object symmetry)”点击“Yes”，MorphoJ 软件会自动识别出对称结构，选中对称性分析的所有标志点，点击“Move Down”和“Accept”，便可以将对称结构、非对称结构与叶片大小分开。

4.2.4 叶片形态数据分层

为了从叶片、个体、种群、物种不同层次研究两个同域分布的近缘种的叶片形态，要对叶片数据进行分层分析。在 Morpho J 软件的菜单栏“Preliminaries”中找到“Extract New Classifier from ID String”选择“Name for new classifier”框中给新的分类命名，同样在“Preliminaries”中找到“Average observations by”便可以对命名之后的不同层次叶片形态数据做平均进而分层。分层后，便可以得到个体层次(每棵树的 5 片叶子的数据集平均为一棵树的叶型数据)、种群层次(种群内所有个体的数据平均为一个种群的数据)和物种层次(每个物种所有个体的叶型数据平均为每个物种的叶型数据)的叶片形态数据并进行后续分析。

4.2.5 输出叶片形态的可视化操作

几何形态学分析的一大优势便是输出结果的可视化，可更直观地识别形态差异。薄版样条(Thin-Plate Spline, TPS)分析便可以基于 PCA、CVA、DA 和 2B-PLS 结果的极值进行可视化操作。叶片的变化趋势与 PCA、CVA 等分析结果的坐标轴对应，通过 TPS 分析可以将坐标轴上的重要值如最大值和最小值转换为网格图、线框图等形式表现出来，可以更加直观地看出形态的变化趋势(Bookstein, 2002)。MorphoJ 软件有三种输出结果：变化网格图(Transformation Grid)、扭曲轮廓图(Warped Outline Drawing)、线框图(Wireframe Graph)，在本研究中，我们使用的是将变化网格图和线框图相互叠加的形式来更直观地表示形态的差异(Viscosi & Cardini, 2011)。线框图是通过手动的在 Morpho J 软件中将地标之间相互连接得到。

4.2.6 叶片形态变化分析

对排除离群值后的数据集进行分离处理，得到三个新的数据集包含对称结构、非对称结构和叶片大小，再将每个层次的叶片形态数据进行平均。获得的不同层次的数据通过 GPA 进行分析后，分别创建协方差矩阵(covariance matrix)，协方差矩阵是两个协方差矩阵的总体比较，用于后续的统计分析(Klingenberg & Nijhout, 1998)。MorphoJ 软件可以用来计算种内或者种间水平的矩阵。GPA 对形态坐标的分析是冗余的，意味着在叠印后出现的坐标会多余实际的形态变量数。所以我们使用 PCA 通

过降维产生的假想成分,尽可能多的解释原有变量。本研究利用 PCA 将 13 个标志点信息降维,找出主要的几个区别两个近缘种的成分,同时以 90%的置信区间将所有叶片形态进行分类,PCA 分析了叶片层次和个体层次的对称结构和不对称结构,可以从 PCA 结果的散点图区分形态差异。几何形态学分析中 PCA 基于形状变量的分析也被称为相对变形分析(relative warp analysis) (Rohlf, 1993)。

4.2.7 异速生长分析

异速生长指的是形状因为大小的变化从而影响而形态发生的变化(Klingenberg & McIntyre, 1998)。叶片的大小和形状是可以相互作用相互影响的,从统计学上可以通过测量叶片大小比例的变化衡量异速生长。每一个物种叶片形状的对称和非对称结构均可通过测量实验证明其在统计学上是否显著的形态学变异。本论文中我们利用回归分析通过 10 000 次迭代来检验其统计学意义。通过回归分析 2B-PLS 将形态性状映射到大小的性状上来确认不同的形态变异是否由叶片大小的变化引起。该分析同样可以通过 MorphoJ 软件计算,在菜单栏选中“Covariation”然后选择“Regression”,计算结果将给出 *P*-value 值以及 RV 值来确定结果是否显著。

4.2.8 物种判定分析

我们使用判别分析(Discriminant analysis, DA)和典型变量分析(Canonical Variate Analysis, CVA)用于个体层次的物种鉴定。CVA 和 DA 都可以在 MorphoJ 中运算:当分析的数据是两个类群时,DA 优先使用,因为 DA 分析是两两之间的比较,CVA 分析是用于检测两个以上变量之间的差异。DA 分析通过交叉交叉函数(Cross-validated scores)和判别函数(Discriminant scores)两种方法分别进行分析(T^2 *P*-value for tests with 1000 permutations < 0.0001),提供可靠的种群分类信息,输出的结果为条形图。CVA 产生的是散点图,输出的散点图可以通过 MorphoJ 软件添加相同频率椭圆(Equal frequency ellipses)或者椭圆置信区间(Confidence ellipses for means),椭圆置信区间,椭圆根据人工给定的一个概率由所有个体分类概率的平均值绘制而出,本文使用的是相同频率椭圆,这个椭圆包含了样本中与给定概率相对应的数据的一部分。所有个体的通过置换检测(T^2 statistics; 10 000 permutations per test)使用马氏距离(Mahalanobis distance)来进行评估运算。

4.2.9 叶片形态、叶片大小与气候因子、地理因子的回归分析

基于最小二乘法计算法则的回归分析通过线性函数在因变量(*y*)与自变量(*x*)之间寻找最佳的拟合直线(Seber & Lee, 2012)。本研究使用 R 语言分别对叶片形态(对称和非对称结构)、叶片大小与气候因子、地理因子做回归分析。MorphoJ 软件可以将基于叶片层次进行的 PCA 分析的主要 PC 成分导出,作为叶片形态数据,同时也可以将叶片大小数据导出,然后与方差膨胀因子分析筛选出主要的气候因子及地理因子做线性回归分析。

4.3 结果与分析

4.3.1 榲栂和榲栂叶片的原始数据处理

1835 片叶片标志点数据通过广义 Procrustes 分析, 去除非形态变异因素后, 散点集中分布在叶片 13 个标志点(图 4-2 中蓝色标志点)周围, 结果显示所有叶片最大限度地重合, 表明广义 Procrustes 分析很好地排除了叶片位置和大小差异。在 MorphoJ 软件中基于叶片层次排除异常值是根据标志点偏离平均标志点的偏离程度以及累积频率(Cumulative frequency)的偏离程度来做出去留, 最终从 1835 片叶片中挑选出 1815 片叶片用于后续统计分析。

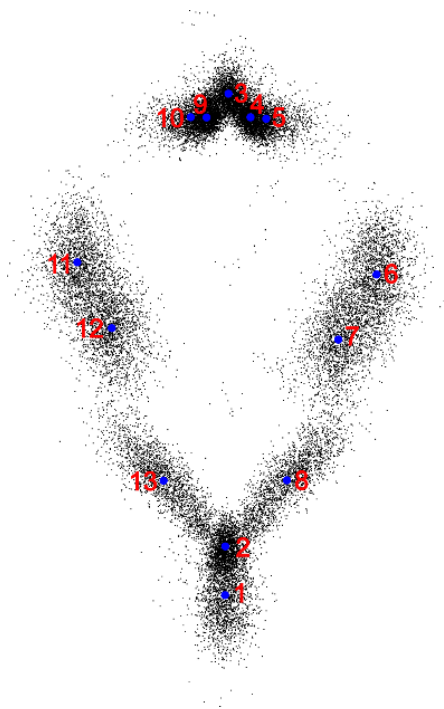


图 4-2 叶片广义 Procrustes 分析散点图

Fig. 4-2 Generalized procrustes analysis of the leaf shape

4.3.2 榲栂和榲栂叶片的形态差异分析(PCA)

首先在 MorphoJ 软件中将对称结构、非对称结构和叶片大小三个成分分开, 然后对对称结构及非对称结构做 GPA 分析, 结果如图 4-3 所示。

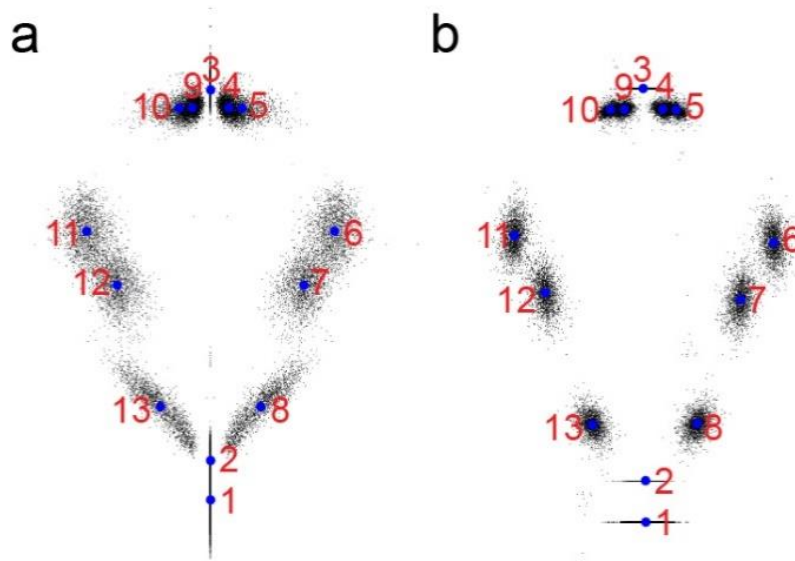


图 4-3 叶片广义 Procrustes 分析散点图

Fig. 4-3 Generalized procrustes analysis of the leaf shape

广义 Procrustes 分析散点图基于叶片非对称结构(a)和非对称结构(b)

Generalized procrustes analysis of the leaf shape of symmetric (a) and asymmetric (b)

为了分析叶片在对称结构和非对称结构上的不同变化,首先基于对称性在叶片层次做广义 Procrustes 分析(图 4-3)。然后基于叶片层次对对称结构和非对称结构的叶片形态进行 PCA 分析,PCA 分析基于对称结构得到了 11 个主成分(表 4-2),基于非对称结构同样得到 11 个主成分(表 4-3)。由 PCA 的结果基于对称结构的散点图(Fig. 4-4a)可以看出,榲桲和榲桲清楚的区分为两组,而杂交个体的叶片较分散的分布于两个物种的叶片分布范围内。

PCA 对称结构分析显示 PC1 占总的形态变异的 51.99%,通过 TPS 分析绘制的网格图看出,榲桲和榲桲的主要区别在于:榲桲的叶柄较长(LM1 和 LM2 两个标志点之间的距离),榲桲的叶柄较短;榲桲的叶片上半部分(叶片的最宽处 LM6 和 LM11 到叶片顶端 LM3)收缩明显,叶尖的形状为渐尖,而榲桲的叶片上半部分扩张明显,表明榲桲叶片的上半部分较宽,叶尖部收缩缓慢,叶尖形状为钝型;榲桲具有较宽的叶基部(LM8 和 LM13 之间的距离),榲桲的叶片基部收缩明显,表明榲桲的叶片基部较狭窄;LM7 和 LM12 移动的方向及移动的距离表示叶片的裂叶程度,由此得出榲桲的裂叶程度较榲桲小(Fig. 4-4a)。PC2 解释了总的叶片形态变异的 20.38%,PC2 的正负轴叶片的主要差异在于叶片的最大宽度处与相邻凹陷点(LM7 和 LM12)相对位置。从 PC2 的负值看出榲桲的叶片的最大宽度处与相邻凹陷点相离较远,而从 PC2 的正值看出榲桲的叶片的最大宽度处与相邻凹陷点距离较近。在 PC2 轴上,叶尖部和叶柄观察到的变化与 PC1 轴观察到的结果相似。

PCA 非对称结构结果表明 PC1 占总的形态变异的 57.49%,PC2 占总的形态变异

的 17.84%，前两个主成了解释了总变异的 75.33%，从非对称结构的 PCA 散点图结果看出，榲栌和榲栌以及杂交个体的分布是分散的(Fig. 4-4b)。通过薄版样条法得到两个转换网格图看出，PC1 主要解释了与不对称性相关的叶片最宽处 LM6 和 LM11 在叶片左右两侧分布的相对位置。PC1 轴的负值表明，以叶片的背部为正面时，叶片右侧的最大宽度处(LM6)较叶片左侧的最大宽度处(LM11)更为靠近叶片尖部，PC1 轴为正值时相反。PC2 解释了由于叶片弯曲所引起的非对称性结构差异，主要差异在于叶片基部到叶片顶端弯曲的方向，PC2 的负值由叶柄到叶尖向右侧弯曲，PC2 的正值则相反。

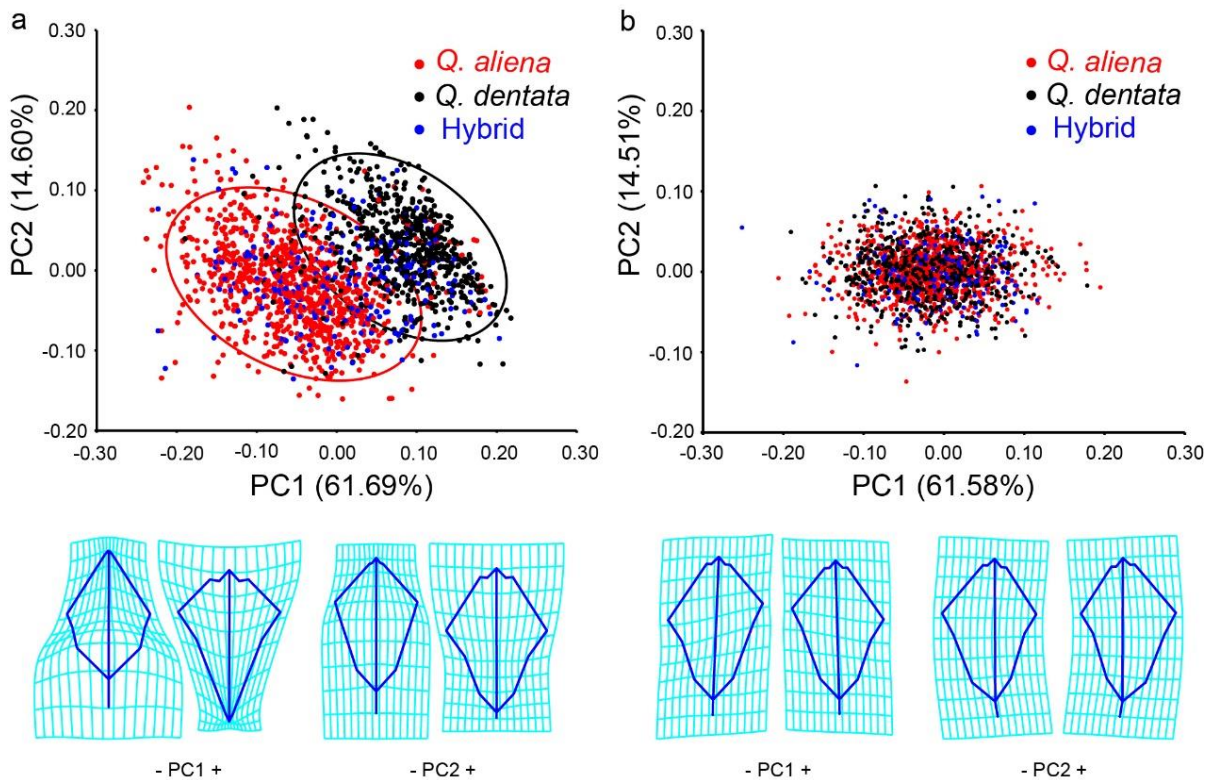


图 4-4 榲栌和榲栌及杂交个体 PCA 分析

Fig. 4-4 PCA analysis of *Q. dentata*, *Q. aliena* and hybrid

叶片层次的对称结构(a)和非对称结构(b) PCA 分析

只展示了前两个 PCs(PC1 和 PC2)的散点图；置信椭圆设置为 95%。网格图：PC 的值为正负极值(+、-)情况下相应的叶片的形态

PCs computed on leaves level, for symmetric (a) and asymmetric components (b); the scatter plots only shows the first two PCs (PC1 and PC2); confidence ellipse at 95%. Transformation Grid: the shapes for PC scores of negative and positive extremes (+, -)

表 4-2 基于叶片层次对叶片对称结构进行的主成分分析各成分信息

Table 4-2 The eigenvalues obtained from Principal Components Analysis (PCA) of leaves level for symmetric component

主成分 PCs	特征值 Eigenvalues	变异 Variance%	累计 Cumulative %
PC1	0.006959	61.69	61.69
PC2	0.001648	14.61	76.30
PC3	0.00115	10.20	86.50
PC4	0.000856	7.59	94.09
PC5	0.000279	2.47	96.56
PC6	0.00014	1.24	97.80
PC7	0.000113	1.00	98.80
PC8	5.9E-05	0.52	99.32
PC9	5.13E-05	0.46	99.78
PC10	1.39E-05	0.12	99.90
PC11	1.15E-05	0.10	100

表 4-3 基于叶片层次对叶片非对称结构进行的主成分分析各成分信息

Table 4-3 The eigenvalues obtained from Principal Components Analysis (PCA) of leaves level for asymmetric component

主成分 PCs	特征值 Eigenvalues	变异 Variance%	累计 Cumulative %
PC1	0.000779	61.58	61.58
PC2	0.000184	14.51	76.09
PC3	0.000154	12.21	88.30
PC4	4.34E-05	3.43	91.73
PC5	3.5E-05	2.77	94.50
PC6	2.91E-05	2.30	96.80
PC7	1.35E-05	1.07	97.87
PC8	1.12E-05	0.89	98.75
PC9	9.35E-06	0.74	99.49
PC10	3.53E-06	0.28	99.77
PC11	2.89E-06	0.23	100

4.3.3 异速生长分析

异速生长分析通过基于个体层次的 2B-PLS 从对称性和非对称性两个结构来实现。叶片的对称结构与叶片大小的分析结果显示在叶片大小与叶片对称结构之间存在显著的共变模式(RV 系数为 0.1089, $p < 0.0001$)。叶片的非对称结构与叶片大小分析结果

显示叶片大小与叶片非对称结构之间共变模式不显著, RV 系数为 0.0068, $p=0.1673$ 。叶片的对称结构与叶片大小的分析结果显示沿着对称结构的负轴到正轴, 当叶片的大小逐渐变大, 叶片的形态(图 4-5a: +shape)特征为叶片的最宽处靠近叶片的上半部分, 且叶片上半部分扩张明显, 叶片基部收缩急剧, 叶柄短; 当叶片的大小逐渐变小, 叶片的形态(图 4-5a: -shape)特征为叶片的最宽处靠近叶片的中上部, 且叶片上半部分收缩, 叶片基部扩张, 叶柄较长; 总体来说槲树的叶片较槲栎的叶片大, 杂交个体的叶片大小与形态的关系散点分布于槲树和槲栎物种内。叶片的非对称结构与叶片大小的分析结果所有个体几乎位于水平线上(图 4-5b), 没有明显的线性关系。

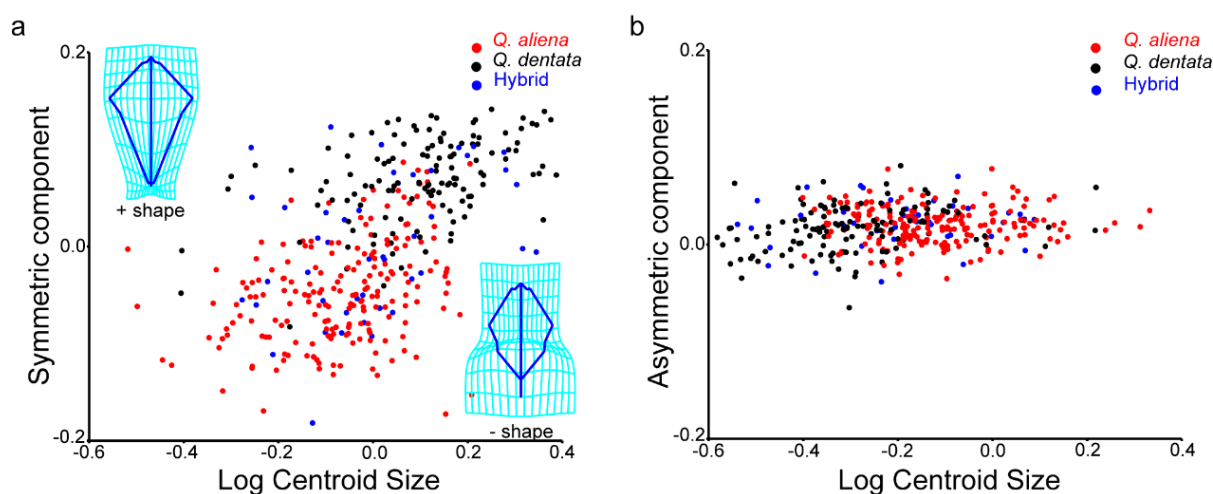


图 4-5 槲树和槲栎及杂交 2B-PLS 分析

Fig. 4-5 2B-PLS analysis of *Q. dentata*, *Q. aliena* and hybrid

a: 2B-PLS 结果的散点图基于叶片对称结构和叶片大小(Log Centroid Size)的回归分析得到, 网格图展示了对称结构的正(+shape)负(-shape)极值情况下的叶片形态; b: 2B-PLS 结果的散点图基于叶片非对称结构和叶片大小(Log Centroid Size)的回归分析得到

a: Scatter plot obtained by regression of symmetric component onto the size (Log Centroid Size), grids are shown the leaf shape changes for negative (-shape) and positive (+shape) extremes of the symmetric component regression scores; b: Scatter plot obtained by regression of asymmetric component onto the size (Log Centroid Size)

4.3.4 槲树和槲栎及杂交个体的判定分析

基于个体层次的物种判别分析将每棵树采集的 5 片叶子做了平均以减小误差更好的代表个体, CVA 和 DA 的结果都可以清晰的将槲树和槲栎两个物种区分开。物种间 Mahalanobis distance 为 4.63 (槲树和槲栎), 2.57 (槲树和杂交个体), 1.52 (槲栎和杂交个体)。Procrustes distances 为 0.155 (槲树和槲栎), 0.09 (槲树和杂交个体), 0.06 (槲栎和杂交个体)。所有的判别分析中叶片均显著存在差异(在 DA 分析中所有的 $P < 0.0001$)。

由 CVA 的结果显示 CV1 占总变异的 67.78%, 沿着 CV1 轴的负值到正值, 槲树

和槲栎单独的聚类到一起，其中杂交个体(蓝色的散点)多分布于槲树和槲栎的两个置信椭圆之间，此外杂交个体更靠近槲栎的相同频率椭圆(图 4-6)。CV2 占总变异的 16.3%，而在 CV2 轴上，槲树和槲栎以及杂交个体重叠分布在-4 到 4 之间。从 CV1 的两个极值分别对应的网格图可以看出，槲树和槲栎叶片的主要区别在于槲栎的叶片基部较宽，叶片上半部分较窄，叶柄较长，而槲树的叶片基部较窄，叶片上半部分较宽，叶柄较短。与 PC1 观察到的区别类似。

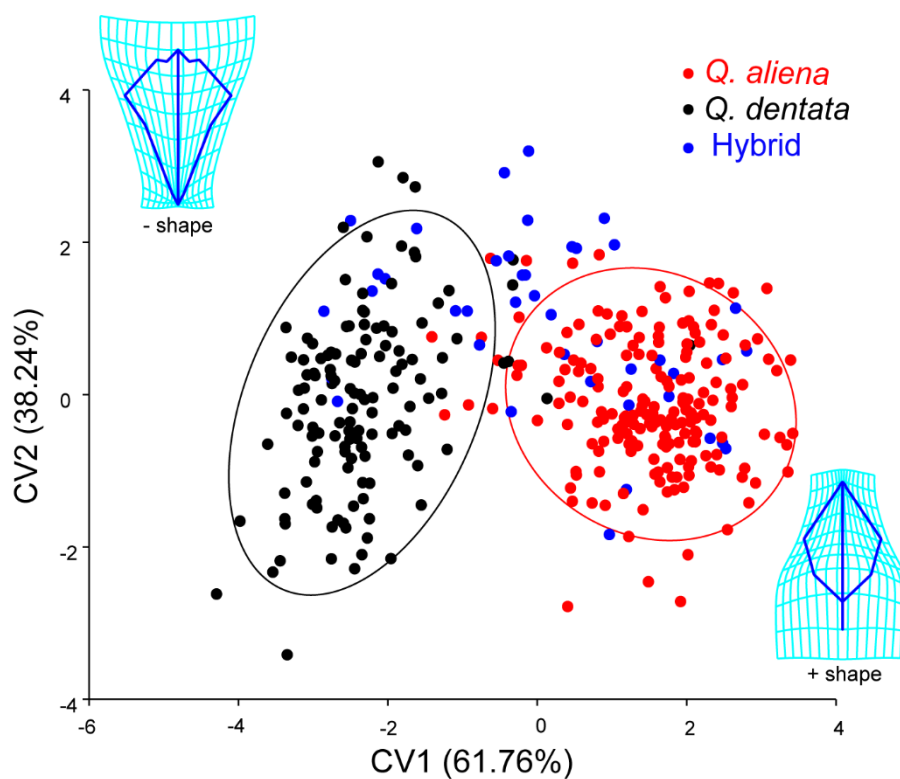


图 4-6 槲树和槲栎及杂交个体 CVA 分析

Fig. 4-6 CVA analysis of *Q. dentata*, *Q. aliena* and hybrid

散点图是基于个体层次，对叶片的对称结构进行 CVA 分析而得到，置信椭圆设置为 90%
CVA computed on trees level, for symmetric components, confidence ellipse at 90%.

DA 的结果将槲和槲栎，槲树和杂交个体，槲栎和杂交个体分别进行分析，得到三组判别分析图。DA 分析基于交叉验证函数和判别函数将槲树和槲栎清楚的区分开来，槲树与杂交个体重叠部分较少，区分良好，根据统计分析结果表明 95.90%的槲栎和 96.88%的槲树可以准确的区分开(图 4-7a)；槲栎与杂交个体的重叠部分较槲树多，64.44%的杂交个体及 81.54%的槲栎个体可以准确判别(图 4-7b)；槲树与杂交个体的重叠部分较少，可以将 71.11%的杂交个体和 97.66%的槲树准确的区分开(图 4-7c)。槲树与槲栎之间的 T^2 为 1658.93；槲树与杂交个体间的 T^2 为 220.05；槲栎与杂交个体间的 T^2 为 84.22，并且 T^2 总是显著($P < 0.0001$)。

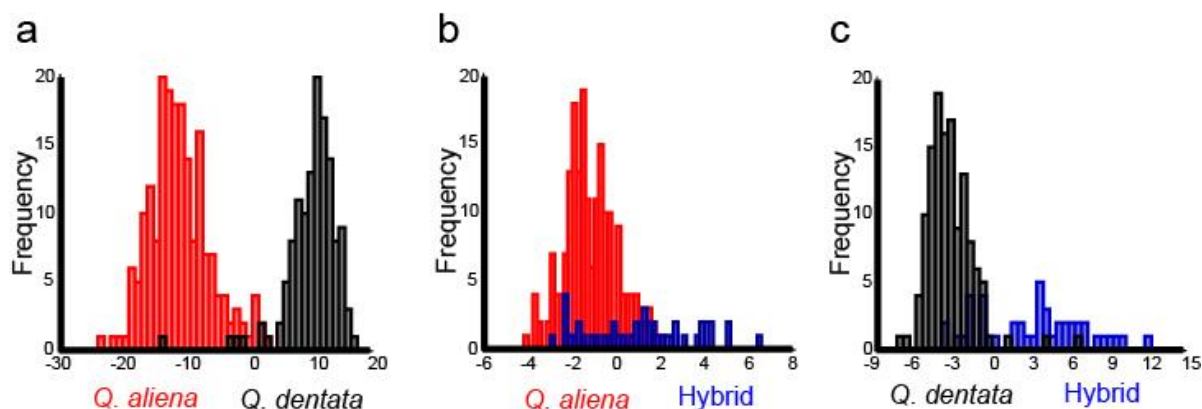


图 4-7 榲栲和榲栲及杂交个体 DA 分析

Fig. 4-7 DA analysis of *Q. dentata*, *Q. aliena* and hybrid

榲栲与榲栲(a), 榲栲与杂交个体(b), 榲栲与杂交个体(c)的 DA 结果; 红色条形代表榲栲, 黑色条形代表榲栲, 蓝色条形代表杂交个体

Results of discriminant analysis (DA) of the shapes of *Q. dentata* vs. *Q. aliena* (a), *Q. aliena* vs. hybrid (b) and *Q. aliena* vs. hybrid (c), respectively; Black bars: *Q. dentata*; red bars: *Q. aliena*; blue bars: Hybrid

4.3.5 叶片形态和环境因子回归分析

关于叶片形态数据的选取是通过 PCA 降维分析后得到的对称结构及非对称结构的数据来表示。对称结构的 PCA 的结果中前 5 个主成分的和占总方差变异的 96.56% (表 4-2), 非对称结构的 PCA 结果前 5 个主成分的和占总方差变异的 94.50% (表 4-3)。然后对称结构与非对称结构的前 5 个主成分及叶片大小分别与环境因子做回归分析。从线性回归结果可以得出: 叶片对称结构的前 5 个主成分中, PC1 与等温性、干季均温、多雨季节降水量、干旱季节降水量显著相关(表 4-4)。PC2 与最暖季节的均温相关。总体来说对称结构的前两个主成分与 5 个环境因子都存在相关性。叶片非对称结构的 PC1 与等温性、暖季节的均温显著相关, PC2 与海拔显著相关。叶片的大小与干季均温, 多雨季节降水量、干旱季节降水量显著相关。

4.4 讨论

4.4.1 榲栲、榲栲及杂交个体形态分化及物种判定

本研究中通过叶片层次的 PCA 分析显示基于叶片层次的叶型差异较大, 这与栎树叶片形态变异较大的直觉相符。通过对称结构与非对称结构的前两个 PCs 成分的极值绘制出的扭曲网格与线框图的重叠图来展示两个物种叶片形态差异, 因为对称结构的前两个主成分占叶片总的形态变异的 76.30% (PC1=61.69%, PC2=14.61%), 非对称结构的前两个主成分占叶片总的形态变异的 76.09% (PC1=61.58%, PC2=14.51%), 均占总变异的一半以上, 所以前两个主成分可以很好的用来解释两个物种对称结构的主要形态差异。

通过个体层次的 CVA 和 DA 分析, 可以更好的实现对物种的判别。CVA 分析很好的将槲树和槲栎区分开, 从 CVA 的置信椭圆(90%)可以得出杂交个体位于槲树和槲栎两个物种之间, 更接近槲栎的相同频率椭圆。DA 的结果显示 95.90%的槲栎和 96.88%的槲树可以准确的区分开; 64.44%的杂交个体及 81.54%的槲栎个体可以准确判别; 71.11%的杂交个体和 97.66%的槲树准确的区分开。说明槲树与槲栎叶片形态差异显著, 而槲树、槲栎分别与杂交个体区分不完全, 表明杂交个体的叶片形态与槲树槲栎都存在一定程度的相似之处。

表 4-4 线性回归分析

Table 4-4 Linear-regression analysis results

<i>p</i>	等温性 (*100) Bio03	干季均温 (°C) Bio09	暖季均温 (°C) Bio10	降水量 (mm) Bio13	降水量 (mm) Bio14	海拔(m) Altitude
对称结构						
Symmetric component						
pc1	**	**	0.2	**	**	0.6
pc2	0.91	0.12	*	0.31	0.03	0.01
pc3	0.32	0.28	**	**	0.77	**
pc4	0.69	**	**	0.59	*	*
pc5	0.28	**	**	*	*	0.99
非对称结构						
Asymmetric component						
Pc1	**	0.85	**	0.55	0.28	0.18
pc2	0.44	0.07	0.11	0.37	0.04	**
pc3	0.9	0.36	0.54	0.2	0.37	0.41
pc4	0.24	0.3	0.59	0.63	0.16	0.33
pc5	0.68	0.63	0.16	0.66	0.35	0.1
大小						
size	0.06	**	0.05	**	**	0.62

前 5 个对称结构和非对称结构的主成分、叶片大小与每个环境变量的线性回归分析(* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$)

Each environment variable correlation between Symmetric component, Asymmetric component and size on that vector (* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$)

4.4.2 叶片形态与环境因素之间的相关性

根据对称结构的 PCA 分析可知, PC1 揭示的是叶柄的长度, 叶上半部分的形状, 叶基部, 叶裂程度几个形态的差异, 线性回归分析结果表明 PC1 所揭示的形态特征与等温性、干季均温和降水显著相关; PC2 揭示的是叶片的最大宽度处与相邻凹陷点之间的距离, 与暖季均温相关(表 4-4)。根据非对称结构的 PCA 分析可知, PC1 揭示

的是叶片最大宽度处 LM6 和 LM11 的相对位置造成的形态差异，同样线性回归分析结果表明 PC1 与等温性和暖季均温显著相关；PC2 揭示的是由叶片的弯曲造成的形态差异，主要与海拔高度显著相关(表 4-4)。而叶片的大小主要与干季均温和降水量显著相关(表 4-4)。

4.4.3 异速生长

本研究的一个创新点是研究了榲栌和榲栌及杂交个体的叶片对称结构，对异速生长(对称结构和非对称结构)进行分析。关于分开分析叶片的对称结构和非对称结构的变异模式，好处在于可以总结主要由遗传(对称结构)引起的叶片形态变化，由环境压力(非对称结构)造成的叶片形态变化，此外，叶片的大小是影响叶片形态的重要因素，受遗传和环境的共同影响(Viscosi *et al.*, 2012)。传统的形态测量学方法不能区分对称性和不对称性，无法根据形态来判断叶型变化是由表现可塑性引起还是由于遗传分化造成，而本研究通过几何形态学方法可以研究榲栌、榲栌及杂交个体的异速生长模式。通过 2B-PLS 分析和线性回归分析表明，榲栌、榲栌及杂交个体的对称结构与叶片的大小显著相关，而非对称结构与叶片大小相关性不显著(表 4-4)。榲栌、榲栌及杂交个体的异速生长主要受遗传因素因素的影响，同时叶片大小也会引起对称结构的变化，所以异速生长同时受到干季均温及降水量的影响。

5 栎树种子传播

5.1 动物对栎树种子传播的作用

栎树种子富含油脂、氨基酸以及苹果酸、维生素和微量元素，许多动物都具有贮藏植物种子的行为，贮藏行为对于动物度过冬眠期、哺乳期、食物匮乏期等特殊时期具有决定性作用(张晶虹和刘丙万, 2014)。鼠类的贮藏行为可以分为集中贮藏和分散贮藏，其中分散贮藏行为对于植物的更新和分布具有重要作用。当少数分散贮藏的种子最终逃脱捕食后，就有可能萌发并建成幼苗，实现植物的自然更新(张博等, 2016)。森林鼠类往往是这些壳斗科植物种子的重要捕食者和主要扩散者(石子俊, 2013)。其次上方山国家森林公园内具有野生猕猴上百只，猕猴为杂食性动物，具有颊囊，活动范围可达几十公里，也有可能为栎树种子的传播产生影响。

种子的物理特征是影响鼠类对其取食和扩散的重要因素，已有研究表明种子大小(宽度、长度、直径等)、种皮厚度等种子特征对鼠类的取食和贮藏策略具有重要影响(雷晶洁等, 2012)。槲栎、栓皮栎和槲树均为北京地区广泛分布的壳斗科植物，在北京地区的生态系统中占据重要的地位。本研究拟通过野外释放 3 种同域分布的壳斗科种子，探讨种子的传播途径，研究三种栎树种子扩散的机理，为栎属植物的种质资源更新和保育提供一些理论资料。

5.2 实验方法

5.2.1 种子采集和测量

2017 年 9 月，于北京市鹫峰国家森林公园随机选取槲树、槲栎和栓皮栎每种树各 5 棵，在每棵样树的树冠下捡取种子 300 粒左右带回实验室。首先通过水伏法对种子进行初步筛选，去除被虫蛀的空壳种子。其次使用游标卡尺对随机挑选的 100 粒种子进行种皮厚度测量，使用游标卡尺对随机挑选的 200 粒种子进行种子长度和宽度测量，在 Excel 表格中记录数据。

5.2.2 种子扩散实验设计

2017 年 9 月底，在上方山国家森林公园的落叶阔叶林带，随机选取两个样点作为种子释放点，每个样点的面积约为 1m^2 ，两个样点距离超过 100 米，每个样点均放置 3 种种子各 50 粒(共 150 粒)，每个样点反复投放种子两次，在释放后的第 1, 2 天后进行调查种子的取食情况。实验设计了两种形式来摆放种子：一，将种子摆放在林内地面上，因为松鼠和老鼠的生活习性存在差异，通常白天投放的种子会被松鼠取食或贮藏，晚上投放的种子会被老鼠取食或贮藏；二，将种子放在距离地面 2 米以上的树干上，防止被啮齿类动物取食，供林内鸟类取食。并采用 LTL-6310 红外相机监测动物对种子的取食行为。

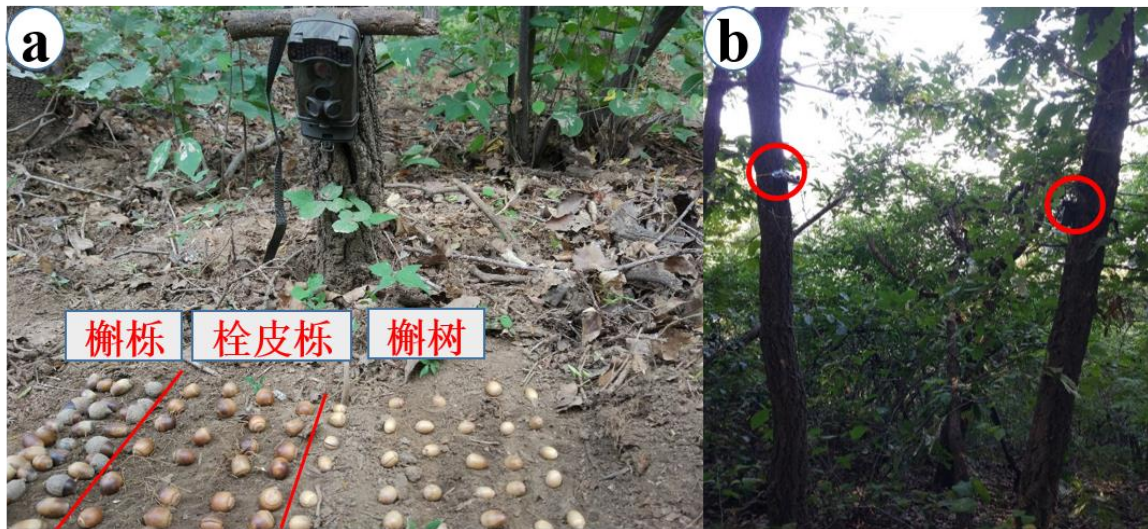


图 5-1 红外相机监测动物对种子的捕食

Fig. 5-1 Predation of *Quercus* species by animals from camera traps

5.2.3 统计与分析

根据红外相机记录下的照片及视频对取食动物做区分，分物种记录取食顺序。种子形态特征的测量数据通过 R 绘制出箱线图，实现数据可视化。

5.3 实验结果

5.3.1 种子大小与种皮厚度

根据对槲树、槲栎和栓皮栎种子长和种子宽度的测量，进一步计算了种子的长*宽，通过 R 语言分析得到图 5-3，从结果可知槲树种子长*宽的平均值 320mm 左右，槲栎种子长*宽的平均值 370mm 左右，栓皮栎种子长*宽的平均值 420mm 左右。三种栎树的种子大小依次是：栓皮栎>槲栎>槲树。

根据对槲树、槲栎和栓皮栎种子长和种皮厚度的测量，通过 R 语言分析得到图 5-4，从结果可知槲栎的种皮厚度的平均值在 0.7mm 左右，槲树的种皮厚度的平均值在 0.4mm 左右，栓皮栎的种皮厚度的平均值在 0.5mm 左右。槲栎的种皮厚度最大值超过 1.1mm，而槲树种皮厚度的最小值只有 0.1mm 左右。总体来说两个物种的种皮厚度差异较大，槲栎的种皮厚度要明显厚于槲树和栓皮栎。三种栎树的种皮厚度依次是：槲树>栓皮栎>槲栎。

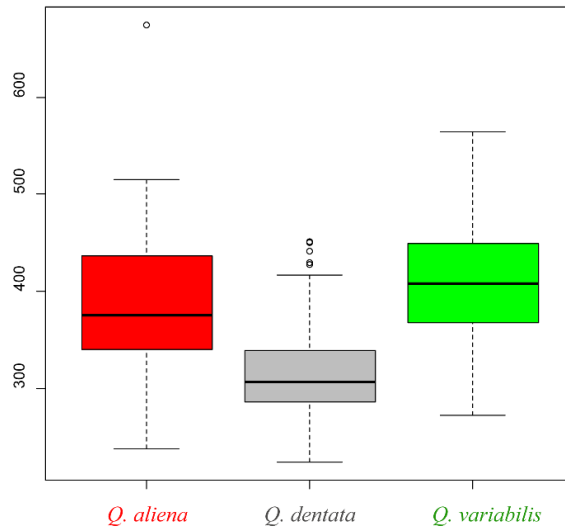


图 5-3 箱线图：槲树、槲栎及栓皮栎种子大小

Fig. 5-3 Boxplot: The seed size of *Q. dentata*, *Q. aliena* and *Q. variabilis*

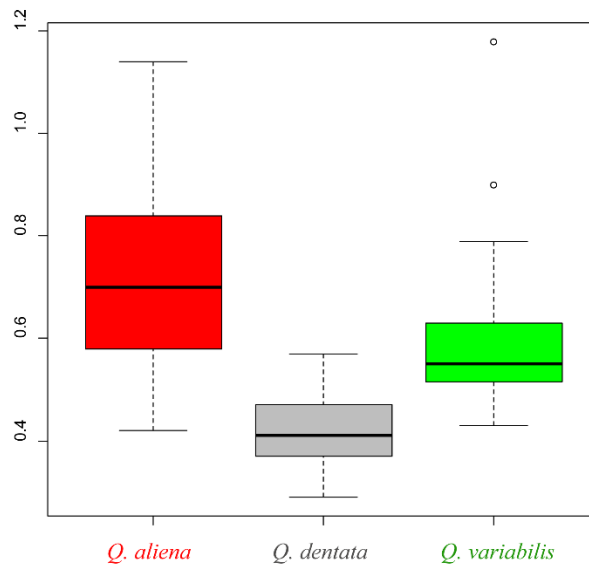


图 5-4 箱线图：槲树、槲栎及栓皮栎种皮厚度

Fig. 5-4 Boxplot: Seed coat thickness of *Q. dentata*, *Q. aliena* and *Q. variabilis*

5.3.2 种子传播

通过红外相机拍摄，发现对三种栎类种子的主要取食者是松鼠及老鼠。因为松鼠是昼行性动物，而且在实验地区的林内松鼠数量较多，而可取食的食物较少，所以白天释放的栎树种子在释放后的 3-5 小时便会将三种栎树种子取食或贮藏。上方山用红外相机拍到的鼠类属于夜行性动物，在傍晚释放的种子全部被鼠类取食。放在树干上的种子没有被鸟类或者猴子取食。

松鼠样点的四次实验表明松鼠对三种栎树种子的趋势存在偏好，首先取食的种子

是槲树的种子，其次取食的种子是槲栎的种子，最后取食的是栓皮栎种子。而对老鼠的取食观测未发现存在取食偏好。

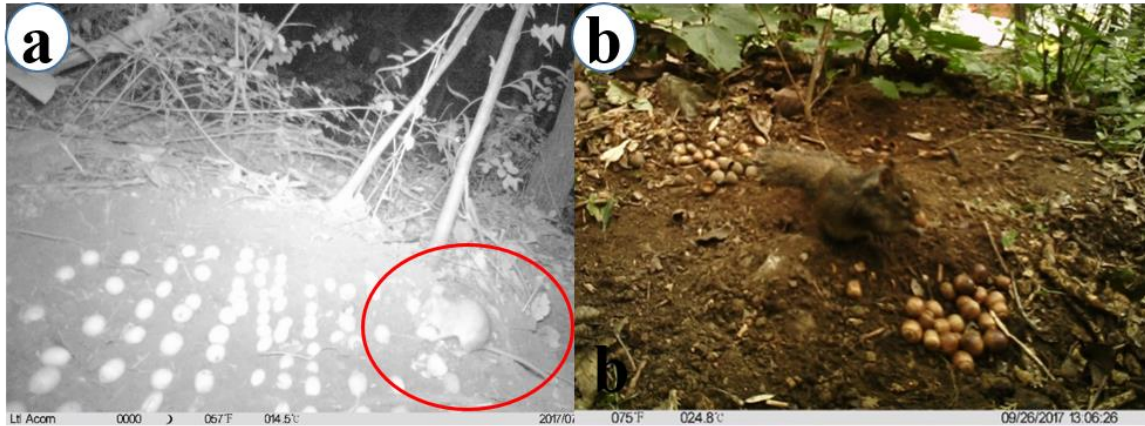


图 5-2 红外相机拍摄老鼠(a)和松鼠(b)取食种子照片

Fig. 5-2 Infrared camera took pictures of seed predation of mice (a) and squirrel (b)

5.4 小结

在上方山国家森林公园内，通过红外相机拍照及视频观测，发现当地三种同域分布的栎树种子主要依靠啮齿类动物(松鼠、老鼠)进行传播。松鼠对种子的取食偏好与种子大小成反比。松鼠优先取食种子小而且种皮薄的槲树种子，而栓皮栎种子的体积最大、种皮厚度中等但是较硬，实验结果发现松鼠最后取食栓皮栎种子，与先前全磊和路纪琪的研究结果类似，黄胸鼠(*Rattus flavipectus*)优先于种皮坚硬的截头石栎(*Lithocarpus truncatus*)种子而取食种皮薄而脆的假海桐(*Pittosporopsis kerrii*)种子，以在单位时间内获取更高的净收益，并可降低觅食过程中的捕食风险(Tong and Lu, 2010)。也有研究表明，鼠类倾向于贮藏营养价值高的种子，所以本研究应该继续对槲树、槲栎和栓皮栎的营养成分进行检测。此外根据种子扩散速度、取食量和贮藏量等在不同年份会有所差异，在食物匮乏的年份种子的消耗速度快，贮藏量低，传播距离远，表明种子的价值得到了提升(张博等, 2016)。未来应完善对种子扩散距离及贮藏量的研究。以及在食物匮乏的年份和食物丰富的年份观测种子传播的规律，并且加大实验重复次数。本次实验未发现猕猴和鸟类取食栎树种子，应继续观测。

6 结论与展望

6.1 结论

本研究通过分子标记(12对SSR位点)与形态学标记(几何形态学的标志点法)相结合的方法,对6个榲桲种群和6个榲栌种群进行分析,得到如下结论:

(1)通过SSR分子标记的方法,利用Bayesian聚类分析方法对收集到的榲桲、榲栌个体进行鉴定,结果以 $Q \geq 0.9$ 的个体被判定为纯种, $Q < 0.9$ 的被判定为杂交个体的判定标准时,得到榲栌个体239个,榲桲个体154个,杂交个体58个;以 $Q \geq 0.8$ 的个体被判定为纯种, $Q < 0.8$ 的被判定为杂交个体为判定标准时,得到253个榲栌个体,160个榲桲个体,38个杂交个体。此外,还发现在榲桲、榲栌种群间存在不对称的基因流,榲桲种群基因流向榲栌种群内渗透更为广泛。

(2)基于12对SSR位点的遗传多样性分析,表明榲桲和榲栌种群内的遗传变异水平相近,在林木遗传变异中处于较高水平。

(3)基于12对SSR位点的遗传结构分析,榲桲和榲栌种群间遗传分化水平很弱。

(4)基于几何形态学分析方法得出,榲桲和榲栌的主要区别在于:榲栌的叶柄较长,榲桲的叶柄较短;榲栌的叶片上半部渐窄,叶尖的形状为渐尖,而榲桲的叶片上半部分较宽,叶尖部收缩缓慢,叶尖形状为钝型;榲栌具有较宽的叶基部,榲桲的叶片基部较狭窄;榲栌的裂叶程度较榲桲小;榲栌的叶片的最大宽度处与相邻凹陷点相离较远,而榲桲的叶片的最大宽度处与相邻凹陷点距离较近。

(5)通过几何形态学分析,PCA在叶片层次不能很好的区分两个物种。PCA分析区分叶片的对称结构和非对称结构,结果找出榲桲和榲栌的主要形态差异,杂交个体分散于整个散点图。DA分析的结果表明在个体层次95.90%的榲栌和96.88%的榲桲可以准确的区分。CVA的分析结果表明杂交个体的叶片形态主要位于榲桲和榲栌叶片形态之间,更靠近榲栌的椭圆置信区间,此外,也有部分个体散布于榲桲和榲栌种群内,表明杂交个体的叶片表型趋向榲桲和榲栌的中间型,更趋向榲栌的叶片表型,同时,也有部分个体的叶型与榲桲和榲栌个体无法通过叶片表型区别。

(6)榲桲、榲栌及杂交个体的异速生长主要受遗传因素影响,而受环境的压力较小。

(7)本研究表明无论是利用分子标记方法还是形态学标记方法都可以很好的区分榲桲和榲栌两个近缘种。但是在两个物种同域分布的区域内每个种群内都存在榲桲和榲栌的杂交个体,通过分子标记方法鉴定出的杂交个体,叶片形态多数位于榲桲和榲栌之间,但也有部分杂交个体单纯从叶片形态上无法区分。

(8)榲桲、榲栌种子大小和种皮厚度存在明显差异,且松鼠对榲桲、榲栌和栓皮栌种子的取食存在偏好,更倾向取食榲桲其次是榲栌最后是栓皮栌,取食偏好与种子大小成反比。

6.2 展望

(1)本研究只集中于同域分布的榲栲和榲栲种群，未来研究中应该扩大采样范围，同时采集单独分布的榲栲和榲栲种群，做为对照。

(2) 木本植物的物候观测不仅对区域气候和林木引种具有重要意义，而且对林木种质资源的鉴定、评价和利用具有重要的参考价值。本论文对榲栲和榲栲的物候观测只进行了一年，未来研究中应该进行持续观测与记录因为长期的物候观测数据与气象数据的动态变化规律才更充分且更具科学性。

(3)为进一步研究榲栲和榲栲的生殖隔离方式，可以通过人工授粉实验进行研究，主要工作分两项：榲栲的花粉人工授粉于榲栲，榲栲的花粉人工授粉于榲栲，授粉后进行套袋，避免其它花粉干扰实验。后续对果实的成活率及遗传物质进行研究。

(4)本研究中分子标记只用了核基因组SSR估算了榲栲和榲栲之间的渐渗杂交状况，但由于SSR数据的缺点例如非直系同源，信息位点较少等特点不能很好的推测种群历史动态，未来研究中可以利用SNP数据对榲栲和榲栲的谱系地理结构及物种演化历史进行分析。

参考文献

1. 白明, 杨星科. 几何形态测量法在生物形态学研究中的应用[J]. 应用昆虫学报, 2007, 44(1): 143-147.
2. 曹立荣, 魏鑫, 黄娟, 等. 基于线粒体基因片段核苷酸多态性的亚洲栽培稻起源进化研究[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(1): 18-24.
3. 陈璋. 福建山樱花天然居群表型变异研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2008, 16(1): 61-68.
4. 戴志聪, 杜道林, 司春灿, 等. 用扫描仪及Image J软件精确测量叶片形态数量特征的方法[J]. 广西植物, 2009, 29(3): 342-347.
5. 邸晓瑶. 基于cpDNA和SSR标记的柃栎群体遗传学研究[D]: 西北大学, 2017.
6. 方伟, 刘恩德. 经典植物分类学的发展与iFlora[J]. 植物分类与资源学报, 2012, 34(6): 532-538.
7. 顾选, 张晓芹, 宋晓娜, 等. 基于DNA条形码-产地-形态联用的药材溯源新方法研究——以黑果枸杞1种伪品为例[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(24): 4759-4762.
8. 桂建芳. 物种概念的发展[J]. 生物学通报, 1988,(4): 22-23.
9. 韩威, 刘超, 樊艳文, 等. 长白山阔叶木本植物叶片形态性状沿海拔梯度的响应特征[J]. 北京林业大学学报, 2014, 36(4): 47-53.
10. 黄映萍. DNA分子标记研究进展[J]. 中山大学研究生学刊: 自然科学与医学版, 2010,(2): 27-36.
11. 蒋焱, 王以红, 邱凤英, 等. 大叶栎优良种源早期选择研究[J]. 西部林业科学, 2011, 40(1): 1-7.
12. 李梅, 韩海荣, 康峰峰, 等. 山西灵空山辽东栎种群叶性状表型变异研究[J]. 北京林业大学学报, 2005, 27(5): 10-16.
13. 李文文. 蒙古栎(*Quercus mongolica* Fisch.)种源变异及无性繁殖研究[D]: 中国林业科学研究院, 2010.
14. 雷晶洁, 申圳, 易现峰. 外果皮厚度和种子大小对五种栎属橡子扩散的影响[J]. 兽类学报, 2012, 32(2): 83-89.
15. 厉广辉, 张昆, 刘凤珍, 等. 不同抗旱性花生品种的叶片形态及生理特性[J]. 中国农业科学, 2014, 47(4): 644-654.
16. 梁明山, 曾宇, 周翔, 等. 遗传标记及其在作物品种鉴定中的应用[J]. 植物学报, 2001, 18(3): 257-265.
17. 刘牧. 蒙古栎和辽东栎的遗传进化关系研究[D]: 东北林业大学, 2012.
18. 马克平. 试论生物多样性的概念[J]. 生物多样性, 1993, 01(1): 20-22.
19. 彭瑜, 苏智先, 张素兰. 利用叶片形态学性状和ISSR标记检测柚类的遗传多样性[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2008, 36(4): 104-110.
20. 秦英英, 韩海荣, 康峰峰, 等. 基于SSR标记的山西省辽东栎自然居群遗传多样性分析[J]. 北京林业大学学报, 2012, 34(2): 61-65.
21. 曲若竹, 侯林, 吕红丽, 等. 群体遗传结构中的基因流[J]. 遗传, 2004, 26(3): 377-382.
22. 尚帅斌, 郭俊杰, 王春胜, 等. 海南岛青梅天然居群表型变异[J]. 林业科学, 2015, 51(2): 154-162.
23. 宋佳, 侯盟, 鲁四海, 等. 一种基于标志点的叶片几何形态分析方法[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 2015, 51(5): 705-710.
24. 孙亚光. 利用SSR分子标记检测鹅掌楸属树种交配格局与基因流[D]: 南京林业大学, 2007.
25. 石子俊. 秦岭南坡壳斗科植物种子雨及种子扩散的研究[D]: 陕西师范大学, 2013.
26. 唐荣华, 张君诚, 吴为人. SSR分子标记的开发技术研究进展[J]. 西南农业学报, 2002, 15(4):

- 106-109.
27. 王洪新, 胡志昂. 植物的繁育系统、遗传结构和遗传多样性保护[J]. 生物多样性, 1996, 04(2): 92-96.
 28. 王淑霞, 胡运乾, 周浙昆. 灰背栎遗传多样性和遗传结构的AFLP指纹分析[J]. 植物分类与资源学报, 2005, 27(1): 49-58.
 29. 王越. 基于SSR标记的槲栎、蒙古-辽东栎种间杂交研究[D]: 山东大学, 2012.
 30. 武耀廷, 张天真, 殷剑美. 利用分子标记和形态学性状检测的陆地棉栽培品种遗传多样性[J]. Journal of Genetics & Genomics, 2001, 28(11): 1040-1050.
 31. 鲜冬娅. 北京上方山植物多样性及保护研究[D]: 北京林业大学, 2008.
 32. 徐小林, 徐立安, 黄敏仁, 等. 栓皮栎天然群体SSR遗传多样性研究[J]. 遗传, 2004, 26(5): 683-688.
 33. 徐永椿, 任宪威. 中国植物志(第22卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 213-263.
 34. 闫宝荣, 花保祯. 几何形态测量学及其在昆虫分类学和系统发育中的应用[J]. 昆虫分类学报, 2010, 32(4): 313-320.
 35. 阎毛毛. 马尾松与黄山松种间基因渐渗研究[D]: 南京林业大学, 2011.
 36. 阎毛毛, 戴晓港, 李淑娴, 等. 松树、杨树及桉树表达基因序列微卫星比对分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2011, 30(1): 103-109.
 37. 于雪. 林木种质资源特性信息查询平台的研建[D]: 北京林业大学, 2007.
 38. 恽锐, 钟敏, 王洪新, 等. 北京东灵山辽东栎种群DNA多样性的研究[J]. 植物学报(英文版), 1998, (2): 169-175.
 39. 赵焕英, 包金凤. 实时荧光定量PCR技术的原理及其应用研究进展[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2007, 16(4): 492-497.
 40. 张晶虹, 刘丙万. 啮齿动物捕食和搬运蒙古栎种子对种群更新的影响[J]. 生态学报, 2014, 34(5): 1205-1211.
 41. 张博, 石子俊, 陈晓宁, 等. 森林鼠类对秦岭南坡3种壳斗科植物种子扩散的影响[J]. 生态学报, 2016b, 36(21): 6750-6757.
 42. Abramoff M, Magalhaes P, Ram S, *et al.*, Image processing with ImageJ. Biophotonics International[J], 2004.
 43. Agarwal M, Shrivastava N, Padh H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences[J]. Plant Cell Reports, 2008, 27(4): 617-631.
 44. Albarrán-Lara AL, Mendoza-Cuenca L, Valencia-Avalos S, *et al.*, Leaf fluctuating asymmetry increases with hybridization and introgression between *Quercus magnoliifolia* and *Quercus resinosa* (Fagaceae) through an altitudinal gradient in Mexico[J]. International Journal of Plant Sciences, 2010, 171(3): 310-322.
 45. Amos W, Hoffman JI, Frodsham A, *et al.*, Automated binning of microsatellite alleles: problems and solutions[J]. Molecular Ecology Notes, 2007a, 7(1): 10-14.
 46. Antonicchia G, Fortini P, Lepais O, *et al.*, Genetic structure of a natural oak community in central Italy: evidence of gene flow between three sympatric white oak species (*Quercus*, Fagaceae)[J]. Annals of Forest Research, 2015, 58(2): 205.
 47. Arnold ML. Natural hybridization and evolution[J]. Quarterly Review of Biology, 1997.
 48. Bacilieri R, Ducouso A, Petit RJ, *et al.*, Mating system and asymmetric hybridization in a mixed stand of European oaks[J]. Evolution, 1996, 50(2): 900-908.
 49. Bell AD. Plant form: an illustrated guide to flowering plant morphology[M]: Timber Press, 2008.
 50. Beyer HL. Hawth's analysis tools for ArcGIS[C], 2004.

51. Bittner D, Excoffier L, Largiadèr CR, Bittner DL, Excoffier and Largiadèr CR. Patterns of morphological changes and hybridization between sympatric whitefish morphs between whitefish morphs (*Coregonus* spp.) in a Swiss lake: a role for eutrophication? *Molecular Ecology*[J]. *Molecular Ecology*, 2010, 19(10): 2152-2167.
52. Bookstein FL. Principal warps: thin-plate splines and the decomposition of deformations[J]. *IEEE Transactions on Pattern Analysis & Machine Intelligence*, 2002, 11(6): 567-585.
53. Brower AVZ, Desalle R, Vogler A. Gene trees, species trees, and systematics: a cladistic perspective[J]. *Annual Review of Ecology & Systematics*, 1996, 27(27): 423-450.
54. Bruschi P, Vendramin GG, Bussotti F, *et al.*, Morphological and molecular differentiation between *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus pubescens* Willd. (Fagaceae) in northern and central Italy[J]. *Annals of Botany*, 2000, 85(3): 325-333.
55. Bryant D, Nielsen D, Tangle L, *et al.*, The last frontier forests: ecosystems and economies on the edge. What is the status of the worlds remaining large natural forest ecosystems?[J]. *Washington D*, 1997, 14(2): 85-87.
56. Campbell R, Robert JS. The structure of evolution by natural selection[J]. *Biology & Philosophy*, 2005, 20(4): 673-696.
57. Cottrell J, Csaikl U, Finkeldey R, *et al.*, Morphological variation in mixed oak stands (*Quercus robur* and *Quercus petraea*) is stable across western European populations[J]. *Ann.for.sci*, 2002.
58. Curtu AL, Gailing O, Leinemann L, *et al.*, Genetic variation and differentiation within a natural community of five oak species (*Quercus* spp.)[J]. *Plant Biol*, 2007, 9(1): 116-126.
59. Curtu AL, Sofletea N, Toader AV, *et al.*, Leaf morphological and genetic differentiation between *Quercus robur* L. and its closest relative, the drought-tolerant *Quercus pedunculiflora* K. Koch[J]. *Annals of forest science*, 2011, 68(7): 1163-1172.
60. Dayanandan S, Rajora OP, Bawa KS. Isolation and characterization of microsatellites in trembling aspen (*Populus tremuloides*)[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 96(6-7): 950-956.
61. De Heredia UL, Valbuena-Carabaña M, Córdoba M, *et al.*, Variation components in leaf morphology of recruits of two hybridising oaks [*Q. petraea* (Matt.) Liebl. and *Q. pyrenaica* Willd.] at small spatial scale[J]. *European journal of forest research*, 2009, 128(6): 543-554.
62. Du FK, Hou M, Wang W, *et al.*, Phylogeography of *Quercus aquifolioides* provides novel insights into the Neogene history of a major global hotspot of plant diversity in south - west China[J]. *Journal of Biogeography*, 2017, 44(1-2).
63. Degnan JH, Rosenberg NA. Discordance of species trees with their most likely gene trees[J]. *Plos Genetics*, 2006, 2(5): 131-140.
64. Ducouso A, Michaud H, Lumaret R. Reproduction and gene flow in the genus *Quercus* L[C]: *EDP Sciences*, 1993.
65. Durand J, Bodénès C, Chancerel E, *et al.*, A fast and cost-effective approach to develop and map EST-SSR markers: oak as a case study[J]. *BMC genomics*, 2010, 11(1): 570.
66. Earl DA, Vonholdt BM. Structure harvester: a website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method[J]. *Conservation Genetics Resources*, 2012, 4(2): 359-361.
67. Ellstrand NC, Elam DR. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation[J]. *Annual Review of Ecology & Systematics*, 1993, 24(24): 217-242.
68. Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study[J]. *Molecular Ecology*, 2005, 14(8): 2611-2620.
69. Friar EA, Cruse Sanders JM, Mcglaughlin ME. Gene flow in *Dubautia arborea* and *D. ciliolata*: the roles of ecology and isolation by distance in maintaining species boundaries despite ongoing hybridization[J]. *Molecular Ecology*, 2007, 16(19): 4028-4038.

70. Gailing O, Lind J, Lilleskov E. Leaf morphological and genetic differentiation between *Quercus rubra* L. and *Q. ellipsoidalis* EJ Hill populations in contrasting environments[J]. Plant Systematics and Evolution, 2012, 298(8): 1533-1545.
71. Glaubitz JC. CONVERT: a user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages[J]. Molecular Ecology Resources, 2004, 4(2): 309-310.
72. Grant V. Plant speciation[M]: New York: Columbia University Press xii, 563p.-illus., maps, chrom. nos. En 2nd edition. Maps, Chromosome numbers. General (KR, 198300748), 1981.
73. Gugerli F, Walser JC, Dounavi K, *et al.*, Coincidence of small-scale spatial discontinuities in leaf morphology and nuclear microsatellite variation of *Quercus petraea* and *Q. robur* in a mixed forest[J]. Ann Bot, 2007, 99(4): 713-722.
74. Hamada H, Petrino MG, Kakunaga T. A novel repeated element with z-dna-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1982, 79(21): 6465-6469.
75. Hamrick JL. Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations: Springer, 1989: 87-105.
76. Hamrick JL, Godt MJW. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species[J]. Philosophical transactions of the royal society of london series b-biological sciences, 1996, 351(1345): 1291-1298.
77. Hamrick JL, Godt MW. Allozyme diversity in plant species[J]. Plant population genetics, breeding, and genetic resources, 1990: 43-63.
78. Huang CJ, Zhang YT, Bartholomew B. Fagaceae[A]. In: Wu ZY, Raven PH eds. Flora of China V0. 4 (in English) [M]. Beijing: Science Press, 1999. 370-380.
79. Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, *et al.*, Biological identification through DNA barcodes[J]. Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences, 2003, 270(1512): 313-321.
80. Heredia ULD, Valbuena-Carabaña M, Córdoba M, *et al.*, Variation components in leaf morphology of recruits of two hybridising oaks [*Q. petraea* (Matt.) Liebl. and *Q. pyrenaica* Willd.] at small spatial scale[J]. European Journal of Forest Research, 2009, 128(6): 543-554.
81. Hubert FO, Grimm GW, Joussetin E, *et al.*, Multiple nuclear genes stabilize the phylogenetic backbone of the genus *Quercus*[J]. Systematics & Biodiversity, 2014, 12(4): 405-423.
82. Hulce D, Li X, Snyderleiby T, *et al.*, GeneMarker® Genotyping Software: Tools to increase the statistical power of DNA fragment analysis[J]. Journal of Biomolecular Techniques Jbt, 2011, 22(Suppl): S35.
83. Jensen RJ. The conundrum of morphometrics[J]. Taxon, 2003, 52(4).
84. Jensen RJ. Detecting shape variation in oak leaf morphology: a comparison of rotational-fit methods[J]. American Journal of Botany, 1990, 77(10): 1279.
85. Jensen RJ, Hokanson SC, Isebrands JG, *et al.*, Morphometric variation in oaks of the Apostle Islands in Wisconsin: evidence of hybridization between *Quercus rubra* and *Q. ellipsoidalis* (Fagaceae)[J]. American Journal of Botany, 1993, 80(11): 1358-1366.
86. Jensen RJ, Miramontes LC. Lines, Outlines, and Landmarks: morphometric analyses of leaves of *Acer rubrum*, *Acer saccharinum* (Aceraceae) and their hybrid[J]. Taxon, 2002, 51(3): 475-492.
87. Jombart T. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers[J]. Bioinformatics, 2008, 24(11): 1403.
88. Jombart T, Ahmed I. adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data.[J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 3070-3071.
89. Kanno M, Yokoyama JY, Ohyama M, *et al.*, Geographical distribution of two haplotypes of chloroplast DNA in four oak species (*Quercus*) in Japan[J]. Journal of Plant Research, 2004, 117(4):

- 311-317.
90. Kelleher CT, Hodkinson TR, Douglas GC, *et al.*, Species distinction in Irish populations of *Quercus petraea* and *Q. robur*: morphological versus molecular analyses[J]. *Annals of Botany*, 2005, 96(7): 1237-1246.
 91. Klingenberg CP. Evolution and development of shape: integrating quantitative approaches[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2010, 11(9): 623-635.
 92. Klingenberg CP, McIntyre GS. Geometric morphometrics of developmental instability: analyzing patterns of fluctuating asymmetry with Procrustes methods[J]. *Evolution*, 1998, 52(5): 1363-1375.
 93. Klingenberg CP, Nijhout HF. Competition among growing organs and developmental control of morphological asymmetry[J]. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*, 1998, 265(1401): 1135.
 94. Knowlton N. Knowlton N. Sibling species in the sea[J]. *Annual Review of Ecology & Systematics*, 2003, 24(1): 189-216.
 95. Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, *et al.*, Use of DNA barcodes to identify flowering plants[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(23): 8369-8374.
 96. Labeyrie V, Deu M, Barnaud A, *et al.*, Influence of ethnolinguistic diversity on the sorghum genetic patterns in subsistence farming systems in eastern Kenya[J]. *Plos One*, 2014, 9(3): e92178.
 97. Lefort F, Douglas GC, Thompson D. Microsatellite DNA profiling of phenotypically selected clones of Irish oak (*Quercus* spp.) and ash (*Fraxinus excelsior* L.)[J]. *Silvae Genetica*, 2000, 49(1): 21-28.
 98. Lepais O, Petit RJ, Guichoux E, *et al.*, Species relative abundance and direction of introgression in oaks[J]. *Molecular Ecology*, 2009, 18(10): 2228-2242.
 99. Levin DA, Kerster HW. Gene flow in seed plants[J]. *Evolutionary Biology*, 1974a, 7: 139-220.
 100. Li CC. Population genetics[J]. *Population Genetics*, 1955.
 101. Li K, Chen L, Feng Y, *et al.*, High genetic diversity but limited gene flow among remnant and fragmented natural populations of *Liriodendron chinense* Sarg[J]. *Biochemical Systematics & Ecology*, 2014, 54(54): 230-236.
 102. Liang ZZ, Duan WP, Fu-De YU. Study on the feeding effects of different varieties of oak leaves on tussah[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2015.
 103. Lyu J, Song J, Liu Y, *et al.*, Species boundaries between three sympatric oak species: *Quercus aliena*, *Q. dentata* and *Q. variabilis* at the northern edge of their distribution in China[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 414.
 104. Manos PS, Doyle JJ, Nixon KC. Phylogeny, biogeography, and processes of molecular differentiation in *Quercus* subgenus *Quercus* (Fagaceae)[J]. *Molecular phylogenetics and evolution*, 1999, 12(3): 333-349.
 105. Miller JC, Tanksley SD. RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*[J]. *Theoretical and applied genetics*, 1990, 80(4): 437-448.
 106. Mitteroecker P, Gunz P. Advances in geometric morphometrics[J]. *Evolutionary Biology*, 2009, 36(2): 235-247.
 107. Nei M. *Molecular evolutionary genetics*[M]: Columbia university press, 1987.
 108. Niet TVD, Zollikofer CPE, León MSPD, *et al.*, Three-dimensional geometric morphometrics for studying floral shape variation[J]. *Trends in Plant Science*, 2010, 15(8): 423-426.
 109. Nixon KC. Infrageneric classification of *Quercus* (Fagaceae) and typification of sectional names[C]: EDP Sciences, 1993.
 110. Peñalozaramírez JM, Gonzálezrodríguez A, Mendozacuenca L, *et al.*, Interspecific gene flow in a multispecies oak hybrid zone in the *Sierra Tarahumara* of Mexico[J]. *Annals of Botany*, 2010,

- 105(3): 389-399.
111. Peng YS, Li C, Jian-Qiang LI. Study on numerical taxonomy of *Quercus* L. (Fagaceae) in China[J]. Journal of Wuhan Botanical Research, 2007, 25(2): 149-157.
112. Ponton S, Dupouey J, Dreyer E. Leaf morphology as species indicator in seedlings of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl: modulation by irradiance and growth flush[J]. Annals of Forest Science, 2004, 61(1): 73-80.
113. Rieseberg L H, Willis J H. Plant speciation[J]. Science, 2007, 317(5840): 910.
114. Rhymer JM, Simberloff D. Extinction by hybridization and introgression[J]. Annual review of ecology and systematics, 1996, 27(1): 83-109.
115. Rodríguez JP, Balch JK, Rodríguezclark KM. Assessing extinction risk in the absence of species-level data: quantitative criteria for terrestrial ecosystems[J]. Biodiversity & Conservation, 2007, 16(1): 183-209.
116. Rohlf FJ. Bias and error in estimates of mean shape in geometric morphometrics[J]. Journal of Human Evolution, 2003, 44(6): 665-683.
117. Rohlf FJ. Relative warp analysis and an example of its application to mosquito[J]. Contributions to morphometrics, 1993, 8: 131.
118. Rohlf FJ, Slice D. Extensions of the procrustes method for the optimal superimposition of landmarks[J]. Systematic Biology, 1990, 39(1): 40-59.
119. Rosenberg NA. Distruct: a program for the graphical display of population structure[J]. Molecular Ecology Notes, 2004, 4(1): 137-138.
120. Rushton BS. Natural hybridization within the genus *Quercus* L[C]: EDP Sciences, 1993.
121. Saintagne C, Bodénès C, Barreneche T, *et al.*, Distribution of genomic regions differentiating oak species assessed by QTL detection[J]. Heredity, 2004, 92(1): 20.
122. Sanfilippo PG, Cardini A, Hewitt AW, *et al.*, Optic disc morphology-Rethinking shape[J]. Progress in retinal and eye research, 2009, 28(4): 227-248.
123. Sang T, Crawford DJ, Stuessy TF. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae)[J]. American Journal of Botany, 1997, 84(8): 1120-1136.
124. Seber GA, Lee AJ. Linear regression analysis[M]: John Wiley & Sons, 2012.
125. Shafiei-Astani B, Ong AH, Valdiani A, *et al.*, Molecular genetic variation and structure of Southeast Asian crocodile (*Tomistoma schlegelii*): comparative potentials of SSRs versus ISSRs[J]. Gene, 2015, 571(1): 107.
126. Sisó S, Camarero J, Gil-Pelegrín E. Relationship between hydraulic resistance and leaf morphology in broadleaf *Quercus* species: a new interpretation of leaf lobation[J]. Trees, 2001, 15(6): 341-345.
127. Sosa PA, González-Pérez MA, Moreno C, *et al.*, Conservation genetics of the endangered endemic *Sambucus palmensis* Link (Sambucaceae) from the Canary Islands[J]. Conservation Genetics, 2010, 11(6): 2357-2368.
128. Soudabeh KAA. Assessment of genetic variability in long-lived *Cupressus sempervirens* var. *horizontalis* using SSR markers[J]. China Civil Aviation, 2012, 84(5A): 42-44.
129. Team RDC. R: a language and environment for statistical computing[J]. Computing, 2016, 1: 12-21.
130. Tong L, Lu J. Hoarding and consumption on seeds of *Pittosporopsis kerrii* and *Lithocarpus truncates* by buff-breasted rat (*Rattus flavipectus*)[J]. Acta Theriologica Sinica, 2010, 30(3): 270-277.
131. Tsitrone A, Kirkpatrick M, Levin DA. A model for chloroplast capture[J]. Evolution, 2003, 57(8): 1776-1782.
132. Tsukaya H. Leaf shape: genetic controls and environmental factors[J]. International Journal of Developmental Biology, 2004, 49(5-6): 547-555.
133. Ueno S, Aoki K, Tsumura Y. Generation of expressed sequence tags and development of

- microsatellite markers for *Castanopsis sieboldii* var. *sieboldii* (Fagaceae)[J]. *Annals of Forest Science*, 2009, 66(5): 1-21.
134. Ueno S, Taguchi Y, Tsumura Y. Microsatellite markers derived from *Quercus mongolica* var. *crispula* (Fagaceae) inner bark expressed sequence tags[J]. *Genes & Genetic Systems*, 2008, 83(2): 179-187.
135. Viscosi V. Geometric morphometrics and leaf phenotypic plasticity: assessing fluctuating asymmetry and allometry in European white oaks (*Quercus*)[J]. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2015, 179(2): 335-348.
136. Viscosi V, Antonecchia G, Lepais O, *et al.*, Leaf shape and size differentiation in white oaks: assessment of allometric relationships among three sympatric species and their hybrids[J]. *International Journal of Plant Sciences*, 2012, 173(8): 875-884.
137. Viscosi V, Cardini A. Leaf morphology, taxonomy and geometric morphometrics: a simplified protocol for beginners[J]. *Plos One*, 2011, 6(10): e25630.
138. Viscosi V, Fortini P, Slice DE, *et al.*, Geometric morphometric analyses of leaf variation in four oak species of the subgenus *Quercus* (Fagaceae)[J]. *Giornale Botanico Italiano*, 2009, 143(3): 575-587.
139. Viscosi V, Lepais O, Gerber S, *et al.*, Leaf morphological analyses in four European oak species (*Quercus*) and their hybrids: a comparison of traditional and geometric morphometric methods[J]. *Giornale botanico italiano*, 2009, 143(3): 564-574.
140. Whittall JB, Hodges SA. Cryptic species in an endangered pondweed community (*Potamogeton*, *Potamogetonaceae*) revealed by AFLP markers[J]. *American Journal of Botany*, 2004, 91(12): 2022.
141. Whittemore AT, Schaal BA. Interspecific gene flow in sympatric oaks[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1991, 88(6): 2540-2544.

个人简介

刘媛，女，1991年10月出身，内蒙古鄂尔多斯人，中共党员，2011-2015年就读于内蒙赤峰学院，生物技术专业；2015-2018年就读于北京林业大学，生态学专业。研究生期间担任15级研究生生态班团支书，连续两年获得北京林业大学校级优秀研究生干部奖，以及北京市优秀毕业生荣誉称号。以第一作者发表中文核心一篇，SCI二区论文在修改中，一篇三作二区SCI论文。

导师简介

杜芳，女，1981年11月生，甘肃兰州人，2004年9月、2010年6月分别获得兰州大学生物科学学士、生态学博士学位；2010年12月获法国波尔多第一大学环境科学博士学位。主要致力于森林树种遗传多样性及物种形成的机理研究。研究工作均发表在本领域高水平的专业期刊上，共发表SCI论文22篇。目前主持和参与国家、省部级等科研项目10项，累计科研经费300万元。2014年在北京林业大学林学院创建分子生态实验室，为从微观角度解决宏观森林生态学问题搭建了良好的平台。自工作以来为多个专业领域的期刊杂志审稿，并于2014年获选“分子生态(Molecular Ecology)”期刊(影响因子6.5)最佳审稿人。主要获奖情况：2009年获得法国农业科学学院三大科研进展奖励；2013年获高等学校科学研究成果奖自然科学奖一等奖：松柏类植物的生物地理学和进化研究(第四完成人)；2013年获北京林业大学青年科技奖(自然科学类)；2014年获选“分子生态(Molecular Ecology)”期刊(影响因子6.5)最佳审稿人。2014年获教育部高等学校科学研究优秀成果奖自然科学奖一等奖(排名第四)；2014年获梁希青年论文奖三等奖；2015年当选北京市科技新星；2018年获北京林业大学科技之星；2018年获北京林业大学第六届优秀青年科技论文二等奖。近年来主要从事以分子生物学方法和生态学理论为研究手段揭示我国森林物种的遗传多样性分布及其形成规律并预测在气候环境变迁下森林物种变迁规律的研究。

成果

研究生在读期间发表文章

刘媛, 吕佳, 宋佳, 等. 基于几何形态测量学的植物鉴定方法[J]. 植物科学学报, 2017(6):894-899.

Liu Y, Jialin S, Lyu J, Xiaojing W, Yan Y, Yuyao W, Geometric morphometric analyses of leaf shapes in two sympatric Chinese oaks: *Quercus dentata* and *Q. aliena* (Fagaceae). Annals of Forest Science(major revision).

Lyu J, Song J, **Liu Y**, *et al.*, Species boundaries between three sympatric oak species: *Quercus aliena*, *Q. dentata* and *Q. variabilis* at the northern edge of their distribution in China[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 414.

致谢

北林三年的研究生生活即将结束，从懵懂无知到如今可以独当一面，这中间离不开自己的努力，但更重要的是老师的提携与同学的鼓励，在此，郑重的说声感谢！

首先，把最诚挚的感谢献给我的导师杜芳副教授，感谢老师的知遇之恩，给与我深造的机会。其次，在三年的学习生活中，从文献阅读、论文的设计、采样、实验、数据分析、论文撰写的各个阶段，都在导师的悉心指导下完成，杜老师是一位学术严谨，思维开阔，敢于创新与挑战，对科研和生活极度热情的人，与导师三年的相处中，导师为我提供了很好的研究平台与工作环境，与导师的不断沟通使我不断在进步，感恩杜老师为我打开有趣的科研殿堂。同时，研究生期间，杜老师对我的个人生活方面照顾有加，在此，将最好的祝福献给杜老师。

特别感谢北京林业大学水土保持学院丁国栋老师和林学院李俊清老师对我学习和生活上的帮助，是我人生中值得铭记与感激的人！

感谢李俊清老师、吕佳老师、陕西师范大学康菊青老师对我采样过程中的帮助，感谢台湾师范大学廖培鈞老师，黄秉宏学长对我学习中的指导，感谢北京师范大学王红芳老师、中科院微生物所尹康权老师在我数据分析过程中的帮助。感谢沐先运老师在雾灵山，上方山采样过程中的帮助。

感谢实验室朝夕相处的同学，感谢我的师兄侯盟、鲁四海、宋佳，师姐吕岩对我实验的指导，以及为我解答学习中遇到的问题，感谢王玉垚对我实验及数据分析以及生活中的关心照顾，感谢师妹张悦、苏金源、李月娟、燕语、王肖静、崔亦凡，师弟王天瑞、王瑞、杨瑞对我的学习上帮助与关心，感谢张宇阳师兄对我外业的帮助。感谢我的同学母艳梅、李颖、于涛对我的帮助与关心。最后感谢我的父母对我学业的默默支持，感谢男朋友陶由金对我的支持与鼓励！

