



北京林业大学

硕士学位论文

论文题目：通过几何形态学方法研究川滇和刺叶高山栎的叶片形态变异

English Title: Study on the Variation in Leaf Morphology of *Quercus aquifolioides* Rehd. Et Wils. and *Quercus spinosa* David ex Franch. Using Geometric Morphometric Methods

一级学科：生态学

二级学科：生态学

研究方向：分子生态

论文编号：

提交日期：2020年7月1日

摘要

叶片是植物主要的光合器官，其形态影响一系列重要的生理过程，进而影响植物的适应性。本论文基于 SSR 分子标记通过几何形态学方法试图去量化两种高山栎物种（川滇高山栎和刺叶高山栎）种间和两物种种内（各遗传家系及其混合个体）叶片形态变异，并探索由遗传、地理和气候因素引起的叶形变异。具体如下：

- (1) 遗传结构分析和个体划分：我们基于 15 对 SSR 分子标记物对川滇高山栎和刺叶高山栎进行遗传结构分析，发现这两个高山栎物种间几乎不存在基因的流动。基于 25 对 SSR 分子标记物对川滇高山栎进行了遗传上的划分以 $Q = 0.8$ 为标准将 29 个种群中的 273 个川滇高山栎个体分到两个不同的遗传家系，WSP-HDM 和 Tibet 家系以及它们的混合个体。基于 15 对 SSR 分子标记物同样以 $Q = 0.8$ 为标准将 46 个刺叶高山栎种群中的 640 个个体在遗传上划分为两个不同的家系，East 和 West 家系以及它们的混合个体。
- (2) 叶片形状和大小变异：我们选用 13 个标志点对 1209 棵树上采集到 6045 片完整成熟的叶片（每棵树 5 个叶片）进行标记。其中包括 556 棵川滇高山栎树的 2780 个叶片，653 棵刺叶高山栎树的 3265 个叶片，用于研究川滇高山栎和刺叶高山栎的种间叶形变异；以 273 棵川滇高山栎树的 1435 个叶片进行川滇高山栎种内叶形变异研究；640 棵刺叶高山栎树的 3200 个叶片进行刺叶高山栎种内叶形变异研究。每个叶片的形态被数字化为 13 个标志点的二维坐标；通过遗传上个体划分的结果对每个叶片进行编号；通过普式叠印分析将叶片形态分为对称组分，非对称组分和叶片大小；通过主成分分析研究了叶形各组分的变异。研究发现，川滇高山栎和刺叶高山栎的叶形（包括对称组分、非对称组分和叶片大小）存在显著差异；两物种种内各家系间在叶片的对称组分和叶片大小上存在显著差异，而混合个体鉴于两家系之间；种内各家系间以及混合个体在叶片的非对称组分上没有显著差异。
- (3) 异速生长模式：我们通过最小偏二乘法分析研究了叶片形状（对称和非对称组分）与叶片大小的共变关系，即异速生长。研究发现，对于对称组分川滇高山栎存在显著的异速生长模式，而刺叶高山栎没有发现存在异速生长关系。对于非对称组分，在两个物种中异速生长模式都没有发现。

- (4) 物种判别：我们通过典型变量分析和判别分析在形态上进行了判别。研究发现在物种间 75%的川滇高山栎个体和 80%的刺叶高山栎个体可以被正确判别。在物种内，川滇高山栎的 WSP-HDM 家系和 Tibet 家系之间存在显著的叶形差异，分别有 80%和 87%的个体可以被正确判别，而混合个体只有 65%可以被正确分类；刺叶高山栎的 East 家系和 West 家系分别有 75%和 74%的个体可以被正确判别，它们的混合个体只有 49%-68%可以被正确分类。
- (5) 叶片形态与地理、遗传和气候因素之间的关系：最后，我们通过基于距离的冗余分析探索了叶片形态与地理、遗传和气候因素之间的关系。研究发现，叶片的对称组分和叶片大小主要与遗传因素有关，另外也受地理和气候因子的影响；而非对称组分只受地理因素的影响。

关键词：叶片形态变异，几何形态测量学，栎属，多位点基因型，异速生长

Study on the Variation in Leaf Morphology of *Quercus aquifolioides* Rehd. Et Wils. and *Quercus spinosa* David ex Franch. Using Geometric Morphometric Methods

Abstract

Leaves are the main photosynthetic organs of plants, and their morphology affects a series of important physiological processes and consequently plant fitness. Based on SSR molecular markers, this paper attempts to quantify leaf morphology variation between species and within species of two species (*Quercus aquifolioides* and *Q. spinosa*), and explore leaf morphology variation caused by genetic, geographical and climatic factors. The details are as follows:

(1) Genetic structure analysis and individual assignment: Based on 15 pairs of SSR molecular markers, we analyzed the genetic structure of *Q. aquifolioides* and *Q. spinosa*, and found that there was almost no gene flow between the two species. Based on 25 pairs of SSR molecular markers, with $Q = 0.8$ as the standard, 273 individuals from 29 *Q. aquifolioides* populations were divided into two different genetic lineages, WSP-HDM and Tibet lineages and their mixed individuals. Based on 15 pairs of SSR molecular markers, 640 individuals from 46 *Q. spinosa* populations were also genetically divided into two different lineages, East and West lineages and their mixed individuals using $Q = 0.8$ as the criterion.

(2) Variation in leaf shape and size: we collected 6045 fully mature leaves (5 leaves per tree) collected from 1209 trees (including 2780 leaves from 556 *Q. aquifolioides* individuals and 3265 leaves from 653 *Q. spinosa* individuals) and characterized them in terms of 13 landmarks to study leaf shape and size variation of *Q. aquifolioides* and *Q. spinose*. To study leaf morphology of intraspecific variation in the two species, we used 1435 leaves from 273 *Q. aquifolioides* trees and 3200 leaves from 640 *Q. spinosa* trees. These morphology was digitally captured in the two-dimensional coordinates of 13 landmarks, then divided into leaf size and asymmetric and symmetric components of leaf shape by generalized Procrustes analysis. Principal Component Analysis (PCA) was used to study the variation of each component. It was found that there were significant differences in leaf morphology (including symmetric component, asymmetric component and leaf size) between *Q. aquifolioides* and *Q. spinose*. There were significant differences in leaf symmetric

component and leaf size between different genetic lineages. There was no significant difference in the asymmetric component of leaves between lineages.

(3) Allometric patterns: We studied the covariational relationship between leaf shape (symmetric and asymmetric components) and leaf size using Two Blocks Partial Least Squares (2B-PLS) analysis. It was found that the symmetric component of had a significant allometric pattern within *Q. aquifolioides*, while *Q. spinose* had no allometric relationship. For asymmetrical components, allometric patterns were not found within the two species.

(4) Species discrimination: Canonical Variate Analysis (CVA) and Discriminant Analysis (DA) were used to discriminant individuals by their leaf morphology. It was found that 75% of the individuals of *Q. aquifolioides* and 80% of those of *Q. spinose* can be correctly identified. Within species, there are significant leaf shape differences between WSP-HDM and Tibet lineages of *Q. aquifolioides*. 80% and 87% of individuals can be correctly identified respectively, while only 65% of mixed individuals can be correctly classified. The East and West lineages of *Q. spinose* can be correctly identified in 75% and 74% of individuals, respectively, and only 49-68% of their mixed individuals can be correctly classified.

(5) Relationship between leaf morphology and geographic, genetic and climatic factors: we explore the relationship between leaf morphology and geographic, genetic and climatic factors by distance-based redundancy analysis (dbRDAs). It was found that the symmetric component and size of leaves were mainly related to genetic factors, and also influenced by geographic and climatic factors. The asymmetric component was only affected by geographic factors.

Key Words : Leaf morphological variation, geometric morphometrics, *Quercus*, multilocus genotypes, allometry

目录

| | |
|-----------------------------|----|
| 1 引言 | 1 |
| 1.1 植物叶片形态学 | 1 |
| 1.1.1 植物叶片形态学研究意义 | 1 |
| 1.1.2 叶片形态变异及其影响因素 | 1 |
| 1.1.3 植物叶片形态学研究进展 | 2 |
| 1.2 几何形态测量法 | 3 |
| 1.2.1 形态测量法的发展 | 3 |
| 1.2.2 常见的分析方法 | 4 |
| 1.2.3 几何形态测量法的应用 | 6 |
| 1.3 川滇高山栎和刺叶高山栎的研究概括 | 6 |
| 1.3.1 川滇高山栎和刺叶高山栎简介 | 6 |
| 1.3.2 川滇高山栎和刺叶高山栎叶片形态学研究进展 | 8 |
| 1.4 本研究的目、意义和技术流程 | 9 |
| 1.4.1 研究内容 | 9 |
| 1.4.2 研究目的和意义 | 9 |
| 1.4.3 技术流程 | 10 |
| 2 材料与方、法 | 11 |
| 2.1 实验材料与数据获取 | 11 |
| 2.1.1 样本采集与处理 | 11 |
| 2.1.2 引物筛选及 PCR 扩增 | 17 |
| 2.1.3 叶形数据获取 | 18 |
| 2.2 数据分析 | 19 |
| 2.2.1 遗传结构分析 | 19 |
| 2.2.2 叶形数据前期处理 | 20 |
| 2.2.3 叶形数据分析 | 21 |
| 2.2.4 地理、遗传和气候因子对叶形的影响 | 22 |
| 3 研究结果 | 25 |
| 3.1 川滇高山栎和刺叶高山栎的遗传结构分析和个体划分 | 25 |
| 3.1.1 川滇高山栎和刺叶高山栎的遗传结构分析 | 25 |
| 3.1.2 川滇高山栎的个体划分 | 25 |
| 3.1.3 刺叶高山栎的个体划分 | 26 |
| 3.2 川滇高山栎和刺叶高山栎的叶片形态变异 | 28 |
| 3.2.1 叶片形状差异分析 | 28 |
| 3.2.2 叶片大小与异速生长分析 | 31 |
| 3.2.3 叶形的判别分析 | 37 |
| 3.3 地理、遗传和气候因子对叶形变异的影响 | 41 |
| 4 讨论 | 45 |
| 4.1 川滇高山栎与刺叶高山栎的叶片形状和大小变异 | 45 |

| | |
|--------------------------------------|----|
| 4.2 川滇高山栎与刺叶高山栎的异速生长模式 | 46 |
| 4.3 川滇高山栎与刺叶高山栎的物种判别 | 46 |
| 4.4 遗传、地理和气候因子对叶形变异的影响 | 47 |
| 5 结论与展望 | 49 |
| 5.1 结论 | 49 |
| 5.2 展望 | 49 |
| 参考文献 | 51 |
| 附录 A 所有种群中有 SSR 数据与叶形数据的个体数统计表 | 59 |

1 引言

1.1 植物叶片形态学

1.1.1 植物叶片形态学研究意义

叶片形态是植物形态结构的重要组成部分，它们影响着一系列重要的生理过程，进而影响植物的适应性(乐通潮等, 2014)。叶片形态从简单到复合，从全缘到高度裂叶，再到叶基部、叶尖和叶缘等各个细节，呈现出惊人的多样性(王谢和张建华, 2016)。不仅在不同的分类群中有很大的差异，而且同一植物的不同叶片形态也有很大的差异(Dengler and Tsukaya, 2001)。叶片形态上的这种差异是植物适应特定环境以及物种鉴定和分类的重要依据(王谢和张建华, 2016)。

叶片形态对环境的响应直接影响着植物的基本行为和功能(Zhang and Luo, 2004)、植物的生存发展和变化方向(Schuepp, 1993; Vogel, 2009)以及植物与周围环境的物质能量交换(Geller and Smithg, 1980; Nobel, 2009; 于贵瑞和王秋凤, 2010)。由于它对环境变化有极强的敏感性和可塑性，并且植物能够通过调整叶片形态来调节自身对环境的适应能力，所以叶片形态学研究一直是植物生理学家和植物生态学家关注的热点话题(李永华等, 2012; 于贵瑞和王秋凤, 2010)。

1.1.2 叶片形态变异及其影响因素

叶片为植物和环境提供一个气体交换、光照和温度调节的接口(Nicotra *et al.*, 2011; Tsukaya, 2005)。叶片最终的几何形态是在植物最大程度地吸收能量和最小化环境压力造成的损害之间取得平衡，叶片与其周围环境之间的这种亲密关系导致了叶片形态多样化(Fritz *et al.*, 2018)。当受到不同环境条件的影响时，不同物种、种群、个体甚至同一基因型之间的叶片形态也会有所不同。Bruschi 等(2003)通过对生长在意大利的无梗花栎(*Quercus petraea*)五个自然种群的不同个体间和同一个体内的叶片形态进行分析，发现无梗花栎叶形存在显著的种内变异而且个体内的变异要高于个体间的变异。通常许多物种的叶片形状和大小都会随着海拔的升高而发生变化(Hovenden and Schoor, 2004; 刘梦颖和刘光立, 2018)，但这其中原因是及其复杂的，也可能是由于在高海拔下具有更低的温度(Royer *et al.*, 2008)，更强的太阳辐射(Hovenden and Schoor, 2004; 2006)，更少的水或养分的有效性(McDonald *et al.*, 2003; Roderick *et al.*, 2000)，更短的生长季节(Kouwenberg *et al.*, 2007)和更低的二氧化碳分压(McElwain, 2004)等所导致的变异。

除上述环境因素外，遗传也会影响叶片的形状和大小。Nagamitsu 等(2019)对日本北部的槲栎(*Q. dentata*)和蒙古栎变种(*Q. mongolica* var. *crispula*)的叶片形状进行了研究，发现它们的叶片形状不仅与沿海环境有关，而且与遗传背景有关。相似地，Porth 等(2016)也发现同域分布的无梗花栎和夏栎(*Q. robur*)的叶形态差异与一些特有的等

位基因显著相关。另外,在拟南芥(Pérez-Pérez *et al.*, 2002); 大豆(Yamanaka *et al.*, 2001)和小麦(Wu *et al.*, 2016)等模式物种中也已经发现某些基因或位点参与了叶片形态的发育过程。

1.1.3 植物叶片形态学研究进展

众所周知,植物叶片的排列、大小、形状和解剖结构在不同的环境下都存在着很大的差异。早期对叶片研究主要集中在叶位,叶序,叶龄以及叶色素含量等方面。近些年来,随着形态学日益活跃,有关叶片解剖结构(郭素娟和武燕奇, 2018; 江慧欣等, 2019; 邱芬等, 2017), 表观形态变化(Fritz *et al.*, 2018; 徐文铎等, 2006)和生理性状特征(黄跃宁等, 2019; 李永华, 2010; 王凯等, 2016)的研究越来越多。此外,还有部分研究是通过一些形态测量学方法分析叶片形态变化,从而达到物种分类的目的(李晓兰等, 2005; 刘牧, 2012; Wang *et al.*, 2019)。李晓兰等(2005)利用6种易测量的植物叶片特性,将科尔沁沙地22种菊科植物分为3个组群。这3个组群各自都具有各自的分化方向:A组的物种叶面积比较高、叶片组织密度较低、叶重比均 < 1 、叶片较厚; B组植物叶片体积较小、叶重比较低; C组叶片较薄,叶重比较高。Kremer等人通过5个最具判别能力的叶形特征(叶柄长度、翼宽度,叶背有无毛,叶脉数和比率)将无梗花栎和夏栎在形态上进行了区分(Kremer *et al.*, 2002)。Wei等(2015)研究了同域分布的辽东栎(*Q. liaotungensis*)和蒙古栎(*Q. mongolica*)的叶形态特征的差异,在形态上将它们分为不同的树种。刘牧通过测量叶片9个形态指标,并进行通过聚类和主成分分析研究了不同地理种群的辽东栎和蒙片栎做了叶片形态变异分析,发现其中8个形态特征对于揭示蒙古栎与辽东栎物种间的系统演化关系和分类学研究有很重要的意义(刘牧, 2012)。Stephan等(2018)通过对黎巴嫩现有的7种栎树物种(由于它们在种间和种内具有很大的形态变异性,分类学上表现很模糊)的24个叶片和6个果实性状记录和分析,从形态上进行了种间鉴别,确定杂交个体及其可能的亲本。以上这些研究都是通过一些传统的多变量统计学工具,利用线性距离、角度、数量性状等来描述叶片形态。如用直尺或游标卡尺来测量叶柄长、叶长、叶宽、叶厚度等,同时还会计算一些间接指标如叶片长宽比、叶片长宽乘积、叶片面积等(李晓兰等, 2005; 刘牧, 2012; Viscosi *et al.*, 2009)。虽然这些传统的形态学测量方法在一定程度上为植物物种鉴定提供了重要依据,但存在很多不足之处。如线性测量数值的同源性很难评估;不同的叶形也可能测量出相同的线性距离;一系列的线性距离很难捕获叶片的几何形态,因此一些叶形特征容易丢失;主观因素大、耗时长、成本较高、精确度不够等等(白明和杨星科, 2007; 宋佳等, 2015)。

几何形态测量法与传统方法相比,其最大的优势在于能够可视化不同个体之间形态的差异,因此该方法在形态测量中的应用也非常广泛。Viscosi等(2009)分别通过传统和几何形态学两种方法对4种白栎类物种,即无梗花栎,夏栎,柔毛栎(*Q. pubescens*)

和比利牛斯栎(*Q. pyrenaica*)做了叶片形态比较, 分析结果发现与传统的形态分析相比, 几何形态测量方法为栎树叶片形态分析提供了一个快速有效的工具。Viscosi 等(2010)结合了传统和几何形态测量方法对同域分布的匈牙利栎(*Q. frainetto*), 无梗花栎和柔毛栎的叶片形态与其他叶片性状进行分析。结果发现这三种栎树物种在叶形上具有高度显著的差异: 匈牙利栎是倒卵形叶片, 叶柄短, 叶片比其他两种栎树的大; 无梗花栎的叶尖和叶基较尖锐; 而柔毛栎有短柔毛而且叶片紧密度较高。Krieger 和 Jonathan (2014)专门针对叶片几何形态测量, 创建了一个新的形状度量指标, 其形式是一个圆和一条线之间的向量, 称为几何圆度。这促进了几何形态测量方法在叶形测量中的广泛应用。Huang 和 Liu (2014)使用拓扑描述和几何形态分析两种几何工具对慈姑属(*Sagittaria*)所有物种的叶片形状进行了分析, 为该属的物种分类提供了重要的参考依据。Liu 等(2018)利用几何形态测量法通过对同域分布的两种栎树物种的叶形进行分析, 在形态上很好的将这两个近缘物种做分类判别。Miljković 等(2019)对野生殷桃(*Prunus avium*)群体的叶片形态变化和发育不稳定性进行了研究。利用几何形态测量工具评估叶片形状和大小的变异性, 利用叶波动不对称(指微小的、随机的、无方向性的偏离原有对称性发育的表型偏差。它由非遗传的发育扰动引发, 可以衡量生物偏离原有的对称性发育的程度)指数来衡量叶片发育的不稳定性。所有研究的叶片性状(叶片形状、形心大小、叶波动不对称指数、叶面积、叶长宽、叶柄长)均表现出高的自然变异和群体间差异。这与以往的传统形态测量方法(叶面积、叶长、叶宽和叶柄长度)的结果一致, 表明几何形态测量学可以为物种内形态变异提供新的认识。

1.2 几何形态测量法

1.2.1 形态测量法的发展

形态测量学(Morphometrics)已经有很长的历史了, 这我们从该学科出现的最早时期开始讲起。弗朗西斯·高尔顿在 1888 年提出了相关系数, 随之相关系数就被用于各种结构的形态测量中。后来在 1907 年, 弗朗西斯·高尔顿又发明了一种叫两点形态坐标的方法, 该方法主要是用于量化人的面部形状特征。在 20 世纪 60 到 70 年代随着多变量统计学的理论越来越成熟, 多变量统计技术在形态上的应用基本发展起来, 这就出现了所谓的传统的形态测量法或多变量形态测量法。通常包括对线性距离、角度、比例以及数量性状的测量(Rohlf, 2000)。

大约 20 世纪 80 年代在经历了一次大革命之后, 基于坐标的方法, 形状的统计理论以及变形网格的算法在形态测量学中都随之出现(Adams *et al.*, 2004; Bookstein, 1998; O'Higgins, 2000)。20 世纪 80 年代到 90 年代, 随着计算机的快速发展及其普遍应用, 形态学测量开启了数据分析的新时代。不仅可以对大型高维数据集进行探索和可视化, 而且可以基于重采样过程进行精确统计测试。这种新的测量方法被称为几何形态测量法(Geometric Morphometrics Methods), 因为它在整个分析过程中保留了地标轮廓的几

何形态，从而允许将统计结果表示为实际的形状或形式。经过 10 余年的发展，更多的新方法产生出来，几何形态测量法进入一个更加成熟的阶段(Ashburner and Friston, 2000; Bookstein, 1996; Lele and Richtsmeier, 1991; Small, 1998)。

1.2.2 常见的分析方法

在众多的几何形态学方法中，它们的操作步骤都基本一致，首先是需要把样本的形态进行数字化处理，然后把大小和形状两个因素分别从形态数据中提取出来，通过比较这些样本的大小和形状数据来计算不同样本间的大小和形状差异。最后用统计学的方法分析类群内、类群间或不同形态单元间的共变现象(葛德燕等, 2012)。

(1) 标点法

大多数生物形态都包含特定的位点称为生物标志点。这些标志点(landmarks, 通常被称为同源点)是结构上具有一致性的位点。这些位点具有进化、个体发生或功能上的意义，并且必须一致地出现在所有被研究的生物体形态上(Lele and Richtsmeier, 1991)。标点位置通常包括以下几处：1)解剖学结构上代表不同组织、器官及它们的连接点处，如叶片与叶柄的连接处；2)解剖学结构的极值点，代表与其它标志点之间的距离最远或最近以及两端点的中心，如叶片的最宽(窄或凹)处等；3)解剖学结构的顶点，代表研究结构的几何特性，如叶片顶端、叶柄基部等(葛德燕等, 2012)。这些标志点不仅需要是所有研究样本上的同源位点，还需要满足以下几点：1)这些标志点相对于其它点的位置不会发生改变；2)它们能够很好的反映出生物体的形态结构信息；3)重复标记时能够直观、准确地标出(Zelditch *et al.*, 2004)。将选择好的标志点进行数字化处理，获得它们的笛卡尔坐标，通过这些点的坐标数据来表示样本的形态结构。

获得坐标数据后，将所有样本进行叠印(superimposition)，主要有以下几种方法：1)广义普氏分析法(generalized Procrustes analysis, GPA)：是以找出各个样本的坐标点之间的最小差距为基本原则，对所研究样本的整体形态结构进行比对(Rohlf and Slice, 1990)；2)广义耐受适应(generalized resistant Fit, GRF)：是通过计算样本的中值进行比对，特别是当形态结构的标志点较少时，常会遇到一些形态变异较大的点，使用 GRF 可以避免 GPA 中出现的问题，而当坐标点较多时，通常选用 GPA(Slice, 2001)；3)滑动基线法(sliding baseline registration, SBR)和布氏坐标法(Bookstein Shape Coordinates, BSC)：BSC 和 SBR 的原理相似，需要在坐标系统中定义两点作为比对的基准(Zelditch *et al.*, 2004)。叠印完成后，可以做一些统计学分析，如方差分析、判别分析等来判断类群之间形态变异的显著程度，也可以通过计算相对扭曲值来呈现形状和大小变异程度。最后通过薄板样条法(thin-plate spline)显示的变形网格可以直观地对形态变异进行可视化处理(Bookstein, 1991)。

(2) 轮廓线法

在实际的研究工作中，有些结构无法找到能够重复标记的坐标点或者选择的标志

点不能充分地反映研究结构的总体形态变化,例如贝壳的外形等。这就需要使用轮廓线法(Outline methods)进行分析。这种方法是在所测样本的结构边缘选取样点,用边缘曲线上的样点来表示物体的形态。所得到的样点轮廓可以通过一定的数学函数将其数字化,然后通过数据比对来对所测样本的形态进行分析。在轮廓线分析过程中的数据比对环节也有多种方法,如椭圆傅里叶分析(elliptic Fourier analysis)、中轴骨架法(median axis method)、判别形态分析(eigenshape analysis)等。其中椭圆傅里叶分析最为常用,该方法借鉴了18世纪法国数学家 Joseph Fourier 的理论,基本思路就是将一个复杂的轮廓结构转换成无穷个与真实结构近似的傅里叶谐波叙述元(Fourier harmonic descriptor)又称傅里叶波谱(Fourier spectrum),然后通过比较这些波谱之间的差异来计算不同形态间的差异(Rohlf and Bookstein, 1992; Younker and Ehrlich, 1977)。而中轴骨架法需先找出整个形态的中轴又称拓扑骨架(topological skeleton),再计算出轮廓线上的点到中轴的垂直距离,从而计算样本间的差异(Rohlf and Bookstein, 1992)。形态判别法的基本原理是将整个轮廓看成是由许多坐标点构成的结构,追踪每个坐标点与其临近点之间的角度变换,然后通过分析不同样本形态结构整体发生的角度变化来解释发生的形变大小(Rohlf and Bookstein, 1992)。它可分为标准形态判别法(主要用于分析闭合的形态结构)和扩展形态判别法(用于开放的形态结构) (Lohmann, 1983; Macleod, 1999)。

(3)半标志点法

在许多应用中,可以选作标志点的位置并不是均匀地分布在一个生物有机体中。例如,脊椎动物的头骨在面部有大量的解剖标志,但在光滑的脑壳上只能明确地定义几个点。因此在标志点法和轮廓线法的基础上,出现了半标志点法(Semilandmarks)的概念,它最早是出现在“Orange Book”这本书的附录中,是为了将基于标志点的统计扩展到平滑的曲线和表面(Bookstein, 1991)。后来它被应用于二维轮廓(Bookstein, 1997)和三维曲面(Gunz, 2001)的形态变化研究中。

半标志点算法要求结构本身是同源的,尽管不能精确定位光滑曲线或表面上标志点之间的对应关系,标志点沿着曲率的位置可能无法识别,但可以得到其垂直于曲率的坐标。这些半标志点沿着它们的曲线或表面滑动,直到轮廓结构之间的某种形状差异达到最小。两种主要的半标志点算法在优化条件上存在差异:一种算法样本间平均形状的薄板样条曲线的弯曲能量最小,而另一种算法的 Procrustes 距离最小(Mitteroecker and Gunz, 2009)。注意:为了使最小化问题线性化,半标志点不会在实际的曲线或曲面上滑动,而是沿着曲线的切向量或曲面的切平面滑动。

(4)有限元分析

有限元分析(finite element analysis, FEA) (Rayfield, 2007)起源于上世纪60年代,主要用于机械工程领域,对建筑结构或机械所承受的压力、张力进行重建以及对可能发生的形变进行预测等将复杂问题离散化处理。在70年代,进一步扩展到了流体力

学、电磁学、传热学等领域。目前,在生物学领域和生物进化研究领域也得到了广泛应用,如医学上一些临床病例的生物力学分析及脊椎动物一些重要类群的进化研究(Dumont *et al.*, 2011; O'Higgins *et al.*, 2011)。

有限元分析首先是将标志点连接起来形成小的封闭区域(通常是二维的三角形和三维的四面体);然后通过映射转换将其中一个有机体映射到另一个有机体上,对他们的相应区域进行比较(Cheverud and Richtsmeier, 1986)。例如通过构建脊椎动物头部骨骼的有限元模型,对其头骨部位进行静态应力分析,从而重建头骨,识别头骨各部分的功能以及预测可能发生的形变,分析这些功能结构的系统进化意义等(Tseng and Stynder, 2011)。

1.2.3 几何形态测量法的应用

几何形态学是一门基于图论的应用数学分支,能够定量地分析和比较形态差异(白明等, 2014)。它作为一个较为成熟的形态定量比较的科学计算工具,主要应用于生物学领域,探讨生物的个体发育、种群分化、系统进化等多个方面,其研究对象涉及到植物、动物、微生物的多个类群(葛德燕等, 2012)。但由于其方法和原理的移植性,从 20 世纪 80 年代起源至今,几何形态学的测量方法和原理也从最早的生物学领域拓展到在其他众多领域。例如,考古研究中利用几何形态学测量方法进行化石骨骼断裂、变形或缺失部

;医学诊断中利用几何形态学方法进行病理诊断、畸形预测以及骨骼矫正等(Perez and King-Heiden, 2018);农产品筛选中利用几何形态学方法进行贝类、水果、茶叶等的抽样检验等(孙建桐等, 2019);甚至在人类生活中一些衣服、头盔、室内空间等的设计也利用到了几何形态学的方法和原理(曾双双, 2014)。

但在实际应用中,依然还有依然存在一些不足(葛德燕等, 2012)。首先,目前几何形态学研究的都是较为刚性的形态结构,对于一些生物体表面的纹路、刻点和细毛等结构的分析暂时还没有较好的方法;其次,三维数据的获取较为耗时,用于分析三维数据的软件也有待发展;第三,对于不完整的结构,其形态信息不够完善,但在几何形态学分析中大部分形态分析软件还不能处理缺失数据。

1.3 川滇高山栎和刺叶高山栎的研究概括

1.3.1 川滇高山栎和刺叶高山栎简介

(1) 形态特征

川滇高山栎(*Quercus aquifolioides* Rehd. et Wils.)属于壳斗科(Fagaceae)栎属(*Quercus* L.)高山栎组(Sect. *Heterobalanus* (Oerst.) Menits)植物,常绿乔木,树高可达 30m,胸径可达 1m 以上,在干旱阳坡和经常樵采的地方常形成灌木林(王国严和徐阿生, 2008)。叶片椭圆形或倒卵形,长约 2.5-7cm,宽约 1.5-3.5cm,全缘或有刺状锯齿,

背面被褐色鳞秕及星状毛，侧脉 6-8 对，叶柄长 2-5mm，有时近无柄(陈焕镛和黄成就, 1998)。壳斗碗形，包坚果 1/2 以下，坚果卵形或长卵形，直径通常为 1-1.5 cm，部分可达到 2cm(陈焕镛和黄成就, 1998)。根系发达，萌生能力强，适应范围广，具有良好的防寒保水的特性(杨玉坡等, 1992)。

刺叶高山栎(*Quercus spinosa* David ex Franch.)又名铁橡树，是壳斗科 (Fagaceae) 栎属(*Quercus*)高山栎组(Sect. *Heterobalanus* (Oerst.) Menits)常绿乔木或灌木，高达 15m。其叶片革质，叶面不平整多有皱褶，常为椭圆形或倒卵形，长约 2-6cm，宽约 1.5-4cm，顶端圆钝，基部圆形或心形，叶缘有刺状锯齿或全缘，幼叶两面被腺状单毛和束毛，老叶仅叶背中脉下段被灰黄色星状毛，其余无毛，侧脉 4-8 对，叶柄长 2-3mm，有时近无柄(陈焕镛和黄成就, 1998)。壳斗杯形，包坚果 1/4-1/3，坚果卵形到椭圆形，直径通常为 1-1.3 cm，高 1.6-2cm(陈焕镛和黄成就, 1998)。

(2)生长习性

川滇高山栎和刺叶高山栎是硬叶常绿阔叶林的主要物种，属于高山栎植物，一般分布在阳坡石灰岩基质上，水分条件相对较差。在其分布区内，气候受东南季风的影响，干湿季分明，同时由于高山峡谷的独特地貌，出现了严重的立体气候现象，河谷干热少雨(陈焕镛和黄成就, 1998; 贺金生和王勋陵, 1994; 梁红平等, 1990)。因此，高山栎物种喜光、耐寒、抗风且耐干旱瘠薄土壤，对生态环境有广泛的适应性，维持了高海拔地区脆弱生态系统的稳定性(杨玉坡等, 1992)。

(3)地理分布

川滇高山栎和刺叶高山栎主要分布在我国云南西北部、四川西部和西藏东南部，即东喜马拉雅和横断山地区，其生态适应性强，垂直分布范围广。川滇高山栎在海拔 1700m-4600m 地带均有分布，成林的主要分布范围为海拔 2400m-3400m，下限可到 1900m，上限达 4000m 左右，是该地区植物群落的优势种和建群种(杨青松, 2008)；而刺叶高山栎生长在低-中海拔(900-3800m)的山坡和悬崖上(Menitskii and Fedorov, 2005; Wu et al., 1999)。

(4)主要价值

①经济价值

高山栎类植物的树皮含有单宁，可提取用来制作拷胶、皮革；其木材既重又硬，强度和韧度都很高，干时易裂、耐腐，因产于高山地区，山高路远，运输不便，一般用来就地烧炭，炭质最优；木材坚硬，也用来制作热板、浩柄、机舱板、刨架、木楔、木锤、木钉、滑轮、车轮辐、浆桩、将军柱等(端木炘, 1994)；旺盛的萌蘖能力，经人为砍烧破坏，依然能靠萌枝恢复成林，常被用做薪柴；林下盛产多种食用菌，可用于制作菌干或鲜食(杨钦周, 1990)。

②药用价值

高山栎类植物的叶片入药具有清热解毒, 主治痢疾腹泻、肠炎、哮喘, 能减少局部疼痛, 减少受伤处的血浆渗出, 并有防止细菌感染(端木炘, 1994); 还可护肤、起到沉淀、收敛蛋白质作用, 能使皮肤变硬, 从而起到保护黏膜、制止过分分泌等作用(王国严和徐阿生, 2008)。

③环境价值

川滇高山栎广布于中国西部高山峡谷地区和江河上游源头的陡坡地带, 山高坡陡; 而刺叶高山栎常生长在石灰岩石山岭或峭壁上。它们在防风固沙, 保持水土, 改善气候, 提高物种多样性等方面起着重要作用, 具有良好的生态效益, 是高效的水土保持和水源涵养林(端木炘, 1994; 王国严和徐阿生, 2008)。

④科研价值

高山栎组植物因自身特有的硬叶、被厚毛等防寒耐旱的生理特点, 对其分布区的生态环境产生了更好的生长对策和更广的适应性。但是由于高山栎类植物其木材材质坚硬, 常被采伐用作薪材, 甚至用来就地烧炭(端木炘, 1994)。因而使其在部分地区遭到过度的人为影响, 破坏较为严重, 寻求更为有效的保护手段, 推动其可持续使用, 促进生态环境可持续发展, 是各研究领域不可推卸的责任(李俊清等, 1995)。通过研究川滇高山栎和刺叶高山栎对高寒、干旱环境的适应机理, 有利于防止高原水土流失、荒漠化, 促进高原环境生态的恢复与重建(贺金生和王勋陵, 1994; 梁红平等, 1990)。通过对其叶片形态解剖结构的环境响应(杨青松等, 2012)、光合作用适应性(郝晓东, 2006; 张晓飞, 2012)、萌生更新能力(黄亚洲, 2011)等进行研究, 利于探索植物对环境变化的适应机制并对其制定相应的保护措施, 为植被恢复, 生态重建以及生物多样性保护提供了理论依据。

1.3.2 川滇高山栎和刺叶高山栎叶片形态学研究进展

自从国内任宪威和徐永椿(1978)将高山栎独立分组以来, 川滇高山栎和刺叶高山栎就一直隶属于栎亚属的高山栎组(包括 12 个种和 1 个变种), 未曾存在任何争议。高山栎组植物的叶形态机构具有非肉质旱生植物和高山植物的性状: 在低海拔的干热环境下, 叶气孔小而多; 而高海拔的低温和辐射, 使高山栎叶表皮毛和鳞片的厚度增加(贺金生和王勋陵, 1994)。其中, 川滇高山栎在川滇西北部和青藏高原东南部广泛分布, 其生长状况随环境条件的变化明显, 也有很多研究者们从多个方面针对该物种对恶劣(高海拔, 高寒, 干旱)环境的适应性机理进行了研究, 如叶表皮形态特征(杨青松等, 2012)、受选择基因(王玉垚等, 2018)、叶型特征(刘兴良等, 2013)、叶片生理指标和功能特征(杜朋选, 2011)等。其基本生物学特征, 除了中国植物志(陈焕镛和黄成就, 1998)上的介绍, 在其他研究中还做了进一步描述: 川滇高山栎花粉大小 $33.6 (21\sim 29.4)\mu\text{m} \times 25.2 (21\sim 27.3)\mu\text{m}$ (张金谈和王萍莉, 1986); 叶表皮有腺毛, 其腺毛量介于川西栎和黄背栎之间, 厚度 $50\sim 100\text{m}$, 叶背大多呈黄色(梁红平等, 1990); 叶面革

质, 叶缘半锯齿, 叶先端圆钝, 基部圆形, 腺毛为分叉毛, 苞片鳞片状, 中脉弯曲、分叉, 脉序环结, 侧脉排列不整齐, 3 级脉为弱贯穿形, 盲脉不分叉, 上表皮细胞壁波状, 下表皮细胞壁平直(普春霞等, 2002)。而刺叶高山栎在叶片形态学方面的研究相对较少, 张晓飞(2012)通过对刺叶高山栎分布范围内不同海拔梯度上叶片形态结构(叶面积、周长、叶长、叶宽)、化学成分(碳、氮、磷含量)和生理生态特征(光合速率)等方面的多种性状进行调查, 探讨了其叶片性状沿海拔梯度的数量特征和变化规律。然而, 目前针对川滇高山栎和刺叶高山栎叶片整体的形态轮廓结构、具体的变化趋势及其形态变化与地理、遗传和气候因素之间关系的研究相对缺乏。

1.4 本研究的目、意义和技术流程

1.4.1 研究内容

本研究通过几何形态学方法量化了川滇高山栎和刺叶高山栎的叶片形态, 研究了川滇高山栎和刺叶高山栎种间以及种内各自家系间的叶形差异, 并探索了遗传、地理和气候因素对叶片形态变异的影响。首先利用 SSR 分子标记物对川滇高山栎和刺叶高山栎样品进行了遗传结构分析, 并基于贝叶斯聚类分析结果, 分别将川滇高山栎和刺叶高山栎样品分到不同的遗传家系。然后我们对它们的叶片进行扫描并选用 13 个标志点对所有的叶片进行标记, 每个叶片的形态被数字化为 13 个标志点的二维坐标; 通过遗传划分的结果对每个叶片进行编号; 通过普式叠印分析将叶片形态分为对称组分, 非对称组分和叶片大小; 通过主成分分析研究了川滇高山栎和刺叶高山栎种间以及种内各自家系间叶片形态各组分是否存在差异; 通过最小二乘法分析了叶片形状是否随着叶片大小的变化而变化; 通过典型变量分析和判别分析证实了是否可以只利用叶片形态特征来正确区分川滇高山栎和刺叶高山栎个体以及种内各自家系的个体。最后, 我们通过基于距离的冗余分析探索了叶片形态与地理、遗传和气候因素之间的关系。

1.4.2 研究目的和意义

基于以上的分析达到以下 4 个目的:

- (1) 分析川滇高山栎和刺叶高山栎种群的种间叶形差异;
- (2) 鉴定川滇高山栎和刺叶高山栎的种内各家系间叶形各组分和叶片大小是否存在显著变异;
- (3) 推断川滇高山栎和刺叶高山栎的遗传学变化与形态学的变化是否同步;
- (4) 探索叶片形态与地理、遗传和气候因素的关系。

该研究不仅对同属高山栎组的川滇高山栎和刺叶高山栎的种间叶片形态差异进行了研究, 而且对这两个物种各家系间的叶片几何形态学特征的变异进行了分析, 为川滇高山栎和刺叶高山栎以及高山栎组植物的分类提供支持; 同时为研究形态特征的

适应进化和全球气候变化下物种保护奠定基础，具有重要的理论和科研意义。

1.4.3 技术流程



图 1.1 叶形分析流程图

Figure 1.1 The flow chart of leaf morphological analyses

2 材料与方法

2.1 实验材料与数据获取

2.1.1 样本采集与处理

经过走访中国数字标本馆、植物图像库、地方植物志以及查阅相关文献,我们确定了川滇高山栎和刺叶高山栎在中国的分布情况(横跨四川西部、云南北部和西藏东部),于2013年11月-2020年1月实验室师生对这些分布区进行了多次实地考察及样本采集。本研究跨越了整个分布区共对60个川滇高山栎种群(包括996棵树),46个刺叶高山栎种群(包括661棵树)进行采集。采集过程中每个种群至少相隔30千米的距离,而且为了避免克隆风险每个种群内的所有取样个体之间的距离至少相隔5米。每个个体采集6-10个叶片,将采集到的叶片样本擦拭干净后放入样品袋中并按种群名对样本进行编号,其中幼嫩的叶片用于DNA提取,另外完好的成熟叶片进行形态学分析。用于DNA提取的叶片要用硅胶保存并及时更换硅胶,以免叶片发霉影响DNA提取效果。用于形态分析的叶片需铺平并压置于标本夹中保存,共从1209棵树上采集到6045片完整成熟的叶片。其中包括556棵川滇高山栎树2780个叶片,653棵刺叶高山栎树3265个叶片(注:于2017年-2020年对叶片进行扫描标记,部分种群的叶片由于存放年限过久,叶面褶皱或不完整,无法进行叶形扫描)。采集点的分布和种群名称缩写见图2.1,每个种群具体的地理信息及样本量见表2.1。

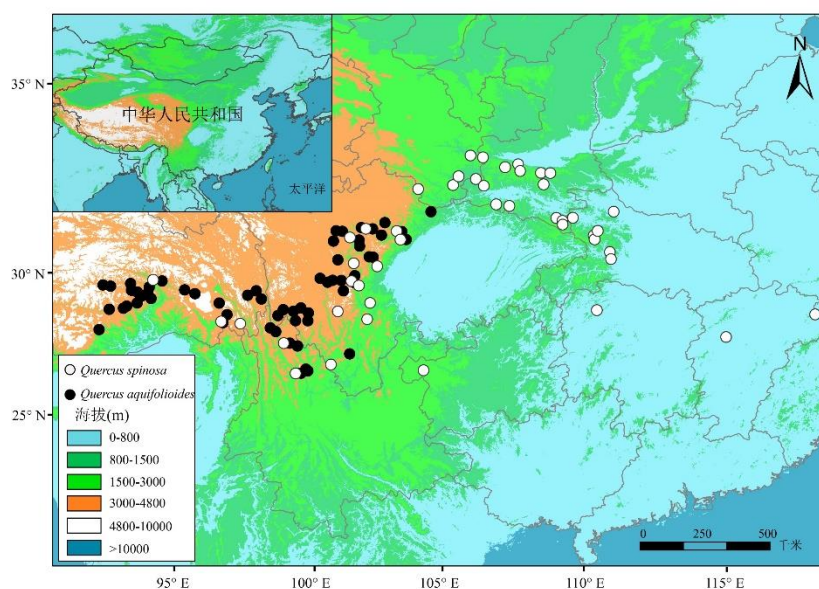


图 2.1 川滇高山栎和刺叶高山栎采样种群分布图

Figure 2.1 Sampling populations distribution area of *Quercus aquifolioides* and *Q. spinosa*

通过几何形态学方法研究川滇高山栎和刺叶高山栎的叶片形态变异

表 2.1 川滇高山栎和刺叶高山栎种群采样点信息表
Table 2.1 Sample information of *Quercus aquifolioides* and *Q. spinosa*

| 种群缩写 | 种群 | 纬度 | 经度 | 样本数 | 季节性降水 (mm) | 最干旱季 平均温度 (°C) | 气温年较差 (°C) | 6 月份降水 (mm) |
|---------------|------------|----------|-----------|-------------------|---------------|----------------------|---------------|----------------|
| Abbreviations | Population | Latitude | Longitude | Sample numbers | Bio15 | Bio09 | Bio07 | Prec06 |
| 川滇高山栎 | | | | | | | | |
| LZD | 西藏隆子县斗玉乡 | 93.02 | 28.37 | 21 | 99.36 | 0.77 | 27.6 | 97 |
| GBX | 西藏工布达江县江达乡 | 93.16 | 29.92 | 30 | 105.04 | -2.47 | 29.2 | 93 |
| MLJ | 西藏米林县甲格村 | 93.38 | 29.07 | 20 | 103.3 | 1.53 | 27.7 | 90 |
| GB | 西藏工布达江县 | 93.42 | 29.88 | 13 | 102.48 | -1.35 | 27.7 | 98 |
| MLL | 西藏米林县里龙乡 | 93.87 | 29.12 | 39 | 95.98 | 2.37 | 29.4 | 112 |
| SJLS | 西藏色季拉山 | 93.98 | 29.18 | 7 | 94.58 | 1.63 | 28.2 | 115 |
| DZC | 西藏大昭村 | 94.12 | 29.97 | 14 | 92.58 | -5.22 | 28.4 | 113 |
| KDG | 西藏卡定沟 | 94.15 | 29.73 | 15 | 94.04 | -1.18 | 27 | 110 |
| LZA | 西藏米林县林芝机场 | 94.34 | 29.3 | 26 | 91.27 | 2.17 | 28 | 127 |
| BYZ | 西藏八一镇 | 94.35 | 29.67 | 15 | 91.97 | 1.33 | 27.8 | 123 |
| LZ | 西藏林芝县 | 94.52 | 29.55 | 15 | 90.18 | -3.42 | 27.7 | 115 |
| BM | 西藏波密县 | 94.72 | 29.64 | 16 | 89.75 | -6.67 | 28.7 | 116 |
| LL | 西藏鲁朗县 | 94.77 | 29.85 | 15 | 90.94 | -3.95 | 28.8 | 126 |
| MLP | 西藏米林县派镇 | 94.83 | 29.46 | 28 | 89.7 | -1.22 | 28 | 136 |
| BMS | 西藏波密县索通村 | 95.21 | 30.06 | 23 | 91.03 | 3.4 | 28.2 | 173 |
| BMR | 西藏波密然乌镇 | 95.99 | 29.75 | 23 | 88.84 | -1.1 | 28.5 | 147 |
| BMZ | 西藏波密中坝村 | 96.35 | 29.62 | 12 | 86.95 | -3.88 | 29.1 | 127 |

材料与amp;方法

| | | | | | | | | |
|-----|-----------|--------|-------|----|--------|-------|------|-----|
| CY | 西藏察隅县古玉乡 | 97.19 | 29.29 | 12 | 82.45 | -4.65 | 29.4 | 122 |
| CYX | 西藏察隅县雄久村 | 97.32 | 28.61 | 13 | 88.77 | 5.42 | 27.6 | 256 |
| CBG | 西藏察隅县慈巴沟 | 97.46 | 28.89 | 22 | 84.66 | 1.95 | 26.4 | 174 |
| MKD | 西藏芒康县登巴村 | 98.18 | 29.57 | 16 | 85.16 | -8 | 29.1 | 93 |
| MKR | 西藏芒康县如美镇 | 98.47 | 29.72 | 22 | 88.11 | -4.9 | 30.9 | 91 |
| MKZ | 西藏芒康县孜许村 | 98.65 | 29.43 | 19 | 83.34 | -3.65 | 30.1 | 88 |
| DQ | 云南德钦县 | 98.96 | 28.44 | 17 | 68.21 | -3.03 | 27.5 | 68 |
| BZL | 云南奔子栏乡 | 99.15 | 28.31 | 20 | 68.87 | -1.43 | 25.6 | 77 |
| DRR | 四川得荣县日龙乡 | 99.23 | 28.86 | 38 | 78.43 | -3.15 | 26.1 | 84 |
| DRX | 四川得荣县-乡城县 | 99.41 | 29.06 | 30 | 84.57 | 0.2 | 31.4 | 95 |
| ZD | 云南中甸 | 99.64 | 27.9 | 13 | 67.38 | -0.47 | 27.8 | 85 |
| XCD | 四川乡城县-得荣县 | 99.76 | 29 | 20 | 87.79 | -1.9 | 28.5 | 100 |
| XCR | 四川乡城县然乌温泉 | 99.84 | 28.68 | 21 | 84.65 | -5.83 | 27.3 | 94 |
| XG | 云南香格里拉 | 99.91 | 27.8 | 12 | 70.55 | -2.22 | 26.1 | 91 |
| XCW | 四川乡城县无名山 | 100.02 | 29.12 | 18 | 93.33 | -7.72 | 30.2 | 103 |
| LJX | 云南丽江雄古景区 | 100.03 | 26.86 | 10 | 60.14 | 7.6 | 23.4 | 97 |
| LJ | 云南丽江高山植物园 | 100.19 | 27 | 16 | 67.4 | 2.58 | 25.4 | 96 |
| LJB | 云南丽江白沙村 | 100.26 | 26.94 | 21 | 66.14 | 4.4 | 24.9 | 97 |
| DCK | 四川稻城县卡龙 | 100.26 | 28.68 | 24 | 88.32 | -4.35 | 28.2 | 111 |
| DCE | 四川稻城县俄洛村 | 100.28 | 28.95 | 21 | 93.1 | -5.18 | 30.9 | 112 |
| YJH | 四川雅江红龙乡 | 100.69 | 30.15 | 22 | 104.73 | -5.62 | 31.1 | 131 |
| YJX | 四川雅江 | 100.95 | 30.01 | 15 | 102.52 | -0.95 | 28.6 | 146 |
| DFL | 四川道孚县龙灯乡 | 101.12 | 30.08 | 10 | 100.87 | 0.9 | 27.8 | 138 |
| DFY | 四川道孚县银恩乡 | 101.15 | 31.44 | 11 | 93.41 | -3.38 | 30.3 | 138 |
| RT | 四川壤塘县 | 101.24 | 31.79 | 9 | 91.72 | -4.38 | 30.3 | 134 |

通过几何形态学方法研究川滇高山栎和刺叶高山栎的叶片形态变异

| | | | | | | | | |
|-------|--------------|--------|-------|----|-------|-------|------|-----|
| DFG | 四川道孚县葛卡乡 | 101.3 | 30.79 | 8 | 96.46 | -6.1 | 31.2 | 142 |
| KDD | 四川康定县折多山 | 101.42 | 30.07 | 6 | 99.67 | -3.02 | 31.3 | 153 |
| MEKR | 四川马尔康县松岗镇 | 101.46 | 31.78 | 7 | 90.78 | -1.4 | 29.8 | 138 |
| DMX | 四川康定县明希乡 | 101.5 | 29.71 | 16 | 99.1 | -1.45 | 29.5 | 158 |
| YYP | 四川盐源县至平川垭口 | 101.71 | 27.53 | 23 | 89.65 | 0.08 | 26.7 | 157 |
| KDC | 四川康定县中古村 | 101.89 | 30.24 | 11 | 94.09 | -0.53 | 28.6 | 156 |
| KDZ | 四川康定县折多塘村 | 101.9 | 29.99 | 10 | 94.51 | -1.52 | 28.7 | 161 |
| JCD | 四川金川县杜岗山 | 102.04 | 31.48 | 9 | 87.27 | 2.13 | 30 | 132 |
| JCK | 四川金川县卡撒乡 | 102.06 | 31.27 | 14 | 87.44 | 3.7 | 29.9 | 129 |
| MEKD | 四川马尔康县大郎脚沟 | 102.12 | 31.91 | 20 | 86.42 | 0.03 | 30.8 | 129 |
| XJX | 四川小金县下磨子村 | 102.39 | 30.9 | 10 | 88.57 | -1.27 | 27.6 | 146 |
| MEKS | 四川马尔康县梭磨乡 | 102.51 | 31.86 | 10 | 83.92 | -3.3 | 29.9 | 133 |
| XJD | 四川小金县达维乡 | 102.52 | 30.88 | 13 | 87.89 | -8.05 | 29.8 | 152 |
| LX | 四川理县 | 102.82 | 31.65 | 10 | 81.45 | -3.98 | 32.7 | 129 |
| HS | 四川黑水县 | 102.93 | 32.08 | 11 | 80.08 | -1.22 | 32.6 | 124 |
| MX | 四川茂县 | 103.52 | 31.77 | 13 | 79.36 | -2.87 | 32.4 | 123 |
| WC | 四川汶川县 | 103.67 | 31.49 | 11 | 77.11 | -0.08 | 29.9 | 129 |
| PW | 四川平武县 | 104.53 | 32.46 | 10 | 94.55 | 4.8 | 29.3 | 105 |
| 刺叶高山栎 | | | | | | | | |
| TM | 西藏波密县通麦 | 95.1 | 30.1 | 5 | 91.42 | 4.93 | 27.6 | 171 |
| CYXC | 西藏察隅县县城 | 97.46 | 28.66 | 20 | 86.88 | 4.38 | 27.2 | 220 |
| BLLK | 西藏察隅县白隆拉卡 | 98.12 | 28.58 | 15 | 73.39 | -3.77 | 27.4 | 101 |
| GZ | 云南省香格里拉高山植物园 | 99.63 | 27.91 | 5 | 67.32 | -0.82 | 27.5 | 87 |
| XGJQ | 云南省丽江雄谷景区 | 100.04 | 26.86 | 5 | 61.36 | 6.97 | 23.6 | 95 |

材料与amp;方法

| | | | | | | | | |
|------|-----------|--------|-------|----|-------|-------|------|-----|
| GSL | 四川盐边县格萨拉 | 101.26 | 27.17 | 9 | 82.71 | 3.33 | 25.4 | 138 |
| SS | 四川九龙县顺山 | 101.51 | 29.01 | 9 | 99.08 | 2.87 | 27.3 | 191 |
| SWJ | 四川金川县撒瓦脚 | 101.92 | 31.57 | 11 | 88.81 | 1 | 29.3 | 134 |
| GDS | 四川康定县郭达山 | 101.98 | 30.06 | 11 | 92.9 | 1.37 | 27.4 | 157 |
| KRC | 四川丹巴县开绕村 | 102.05 | 30.67 | 10 | 89.03 | 3.7 | 28.4 | 137 |
| ELM | 四川泸定县二郎庙 | 102.23 | 29.9 | 8 | 91.36 | 5.38 | 27.4 | 162 |
| SMX | 四川马尔康县梭磨乡 | 102.48 | 31.87 | 9 | 83.68 | -2.4 | 30.3 | 132 |
| BQX | 四川越西县板桥乡 | 102.53 | 28.74 | 14 | 92.53 | 4.62 | 27.7 | 177 |
| LTS | 四川汉源县龙塘山 | 102.62 | 29.3 | 13 | 89.59 | 4.12 | 27.8 | 168 |
| FTZ | 四川宝兴县蜂桶寨 | 102.87 | 30.57 | 14 | 79.67 | 2.15 | 29.7 | 151 |
| SLX | 四川茂县三龙乡 | 103.54 | 31.79 | 12 | 79.79 | -1.62 | 33.5 | 121 |
| LBZ | 四川汶川县萝卜寨 | 103.68 | 31.5 | 10 | 79.98 | 2.17 | 29.1 | 124 |
| JZG | 四川九寨沟县 | 104.29 | 33.25 | 16 | 81.55 | -1.88 | 33.3 | 93 |
| ZGF | 贵州威宁县最高峰 | 104.48 | 26.97 | 19 | 83.34 | 1.37 | 24.2 | 188 |
| CBLC | 四川康县长坝林场 | 105.49 | 33.38 | 13 | 81.22 | 0.07 | 29.8 | 90 |
| JFS | 甘肃鸡峰山 | 105.68 | 33.69 | 14 | 79.53 | 1.13 | 29.1 | 89 |
| SMJQ | 甘肃麦积区石门景区 | 106.1 | 34.41 | 10 | 79.22 | -3.33 | 32.3 | 78 |
| WLD | 陕西略阳县五龙洞 | 106.29 | 33.6 | 20 | 77.44 | -1.87 | 30 | 91 |
| JJY | 甘肃东岔镇九江峪 | 106.54 | 34.35 | 10 | 79.06 | -0.58 | 30.5 | 72 |
| ZJH | 陕西勉县张家河林场 | 106.57 | 33.36 | 21 | 77.12 | -0.98 | 30.1 | 99 |
| XLS | 四川南江县香炉山 | 107 | 32.72 | 15 | 73.62 | -2.63 | 31 | 118 |
| XHS | 陕西太白县小华山 | 107.3 | 34.01 | 21 | 75.79 | -4.12 | 32.3 | 83 |
| LC | 陕西西乡县龙池林场 | 107.45 | 32.66 | 21 | 70.72 | -0.78 | 29.4 | 117 |
| HHG | 陕西眉县红河谷 | 107.75 | 34.11 | 15 | 75.12 | -0.3 | 32.3 | 71 |
| TJS | 陕西周至县铁甲树 | 107.83 | 33.88 | 9 | 73.88 | -3.07 | 32.1 | 85 |

通过几何形态学方法研究川滇高山栎和刺叶高山栎的叶片形态变异

| | | | | | | | | |
|-----|------------|--------|-------|----|-------|-------|------|-----|
| ZQ | 陕西户县朱雀森林公园 | 108.54 | 33.81 | 8 | 71.92 | -1.8 | 31 | 83 |
| MWS | 陕西镇安县木王山 | 108.63 | 33.41 | 20 | 71.16 | -3.08 | 30.2 | 104 |
| NBL | 陕西柞水县牛背梁 | 108.87 | 33.8 | 22 | 71.7 | -2.62 | 31.9 | 87 |
| NGS | 陕西岚皋县南宫山 | 109.08 | 32.25 | 20 | 66.15 | 0.02 | 28.6 | 136 |
| BDX | 陕西平利县八道乡 | 109.29 | 32.15 | 11 | 65.88 | -0.63 | 29.8 | 138 |
| TSX | 陕西平利县天书峡 | 109.3 | 32.02 | 21 | 65.07 | -3.07 | 29.8 | 148 |
| PTS | 湖北竹溪县偏头山 | 109.66 | 32.26 | 15 | 66.93 | 2.72 | 29.3 | 129 |
| BSY | 湖北神农架柏杉园 | 110.38 | 31.64 | 22 | 64.1 | -1.6 | 29.4 | 163 |
| DJP | 湖北神农架断疆坪 | 110.4 | 31.51 | 22 | 62.87 | -2.73 | 29.5 | 168 |
| TMS | 湖南张家界天门山 | 110.48 | 29.05 | 12 | 57.08 | 4.9 | 29.5 | 242 |
| TDY | 湖北神农架土地垭 | 110.51 | 31.8 | 20 | 64.46 | -1.45 | 29.1 | 162 |
| DLL | 湖北秭归县大老岭 | 110.94 | 31.07 | 20 | 60.24 | 0.3 | 28.9 | 179 |
| JLT | 湖北秭归县九岭头 | 110.98 | 30.82 | 20 | 66 | 6.45 | 30.2 | 146 |
| WDS | 湖北十堰市武当山 | 111.07 | 32.47 | 20 | 65.77 | 4.17 | 33.4 | 113 |
| WKS | 江西武宁县鹤矿山 | 114.96 | 28.12 | 15 | 55.64 | 8.78 | 32.1 | 255 |
| SQS | 江西玉山县三清山 | 118.06 | 28.91 | 9 | 53.84 | 3.48 | 26.7 | 365 |

2.1.2 引物筛选及 PCR 扩增

通过 Tiangen 植物基因组 DNA 试剂盒提取川滇高山栎和刺叶高山栎基因组 DNA, 然后利用 1%琼脂糖凝胶进行电泳跑胶来检测 DNA 质量。通过 85 个位点的初步检测后, 共选用 25 条引物(表 2.2)对部分的川滇高山栎样品(共选取了 29 个代表性种群, 包括 273 棵树, 用于研究川滇高山栎种内遗传结构)进行了基因分型。其中, 11 条引物(MSQ13, QpZAG9, QpZAG16, QpZAG110, QrZAG7, QrZAG11, QrZAG30, QrZAG87, QrZAG96, QrZAG112 和 PIE271)是选自 Du 等(2017)和剩余的 14 条引物是在这个研究中新生成: QmC02241, CN725667, CR627959, GOT011, GOT012, GOT021, GOT040, PIE163, FIR026, WAG066, WAG068, POR017, POR025 和 FIR015(Ueno *et al.*, 2008; Durand *et al.*, 2010; Ueno and Tsumura, 2008)。选用其中 15 个条引物(QrZAG30, PIE271, QrZAG112, QpZAG9, GOT011, GOT012, GOT040, GOT021, PIE163, FIR026, FIR015, POR025, QPZAG16, QPZAG110, QmC02241)对川滇高山栎和刺叶高山栎所有样品进行基因分型, 用于研究川滇高山栎和刺叶高山栎种间以及刺叶高山栎种内遗传结构。PCR 的扩增体系共 25 μ l, 包括: 12.5 μ L 2 \times Taq PCR Master MIX、1 μ L 样本 DNA、1 μ L 引物-F、1 μ L 引物-R、9.5 μ L ddH₂O。PCR 扩增后通过电泳检测扩增条带是否清晰, 若扩增条带清晰, 则进行毛细管电泳检测。然后使用 GeneMarker 软件读取峰图, 从而获得 SSR 数据(Hulce *et al.*,2011)。

表 2.2 25 对 SSR 引物详细信息

Table 2.2 Information on primers in 25 nuclear simple sequence repeats(nSSR) loci

| 引物位点 SSR Locus | 退火 温度 Ta(°C) | 核心序列 Motif | 序列 Sequence (5' to 3') | 等位基因 大小范围 Allele range (bp) |
|-------------------|------------------------|---------------|---|---|
| MSQ13 | 56 | TC | TGGCTGCACCTATGGCTCTTAG ACACTCAGACCCACCATTTTTCC | 188-226 |
| QpZAG16 | 56 | TC | CTTCACTGGCTTTTCCTCCT TGAAGCCCTTGTC AACATGC | 131-189 |
| QrZAG7 | 56 | AG | CAACTTGGTGTTCGGATCAA GTGCATTTCTTTTATAGCATTAC | 108-154 |
| QrZAG11 | 56 | AG | CCTTGA ACTCGAAGGTGTCCTT GTAGGTCAA AACCATTGGTTGACT | 241-283 |
| QrZAG30 | 56 | GA | TGCTCCGTCATAATCTTGCTCTGA GCAATCCTATCATGCACATGCACAT | 160-208 |
| QrZAG87 | 56 | TC | TCCCACCACTTTGGTCTCTCA GTTGTC AGCAGTGGGATGGGTA | 99-123 |
| QrZAG96 | 56 | AG | CCCAGTCACATCCACTACTGTCC GGTTGGGAAAAGGAGATCAGA | 160-238 |

| | | | | |
|-----------|----|-------------|--|---------|
| PIE271 | 56 | AG | CACACTCACCAACCCTACCC GTGCGGTTGTAGACGGAGAT | 197-247 |
| QpZAG9 | 56 | TG | GCAATTACAGGCTAGGCTGG GTCTGGACCTAGCCCTCATG | 220-274 |
| QpZAG110 | 56 | AG | GGAGGCTTCCTTCAACCTACT GATCTCTTGTGTGCTGTATTT | 193-267 |
| QrZAG 112 | 56 | GA | TTCTTGCTTTGGTGCGCG GTGGTCAGAG ACTCGGTAAGTATTC | 98-116 |
| QmC02241 | 56 | GA/TC | TCAGTGACCACACGTCACCTCTC GTTTCTTGCCATGTTTTGATGG | 169-211 |
| CN725667 | 56 | CCA/TT C | GCTAAGCTCCAAGCCATTTGTGA GTTTCCGATGACGTGGATGTAATCTCC | 194-272 |
| CR627959 | 56 | GA/TGC | GCTCCCTGGTAGTCGGCTAAAGA GTTTCAATTGGGACAACATGGAAGCAT | 232-296 |
| GOT011 | 56 | GA | CCCCACCGTCTACTCTCAAA GCGTTCACCACGTCCATAAT | 197-225 |
| GOT012 | 56 | GT | TGATGATCCCAAACCACAAA AAGGCTGCAGGACTTTTCAA | 204-254 |
| GOT021 | 56 | AT | AGAAAGTTCCAGGGAAAGCA CTTCGTCCCCAGTTGAATGT | 110-150 |
| GOT040 | 56 | TC | AAGGCACTCGTCGCTTTCTA ACCGATTTGAAGCTCGAGAA | 242-298 |
| PIE163 | 56 | TC | GAGAGGCATGTGGAACCAAG CAAGCATAGGTGGTGGAAACC | 230-264 |
| FIR026 | 56 | GT/GA | CTTCATGCACCAATTCCTCA GGCCATGTATGTGTGCAAAA | 201-215 |
| WAG066 | 56 | TC | AACCTGTTTGGCTTCGTGTG AACAAAAGATTGGGAGGTGC | 128-224 |
| WAG068 | 56 | TC/TG | TCTGCAACAAAACCAAAACAC CGGAGGAGAGAGTCAGCAAC | 154-210 |
| POR017 | 56 | GA | CCCATATCCCTCTACGAAAGAA CTGGAGATGACATAGTGTCTCAAA | 126-170 |
| POR025 | 56 | AG | CACACAAACCCATATGATCTGAA TCTCTTTCGATCCCTTCTGC | 105-145 |
| FIR015 | 56 | GT | ACCCTAAAACCCCAATCACC CGGATCTTCGGCTATTCTTG | 112-148 |

2.1.3 叶形数据获取

使用 CanoScan 5600F 扫描仪对用于形态分析的叶片进行扫描(背面朝上), 分辨率为 600 dpi。然后使用 Image J 软件(Abràmoff *et al.*, 2004)对扫描得到的叶片图像进行标志点(Landmarks)标定。标志点的选取主要参考川滇高山栎叶片主轴、对称结构以及同源点等信息, 同时参考 Viscosi (2015)和 Liu 等(2018)对几种栎树物种(*Q. dentate*, *Q. aliena*, *Q. frainetto*, *Q. petraea* 和 *Q. pubescens*)的叶型标点位置。本文共选择了 13 个

位置稳定、交叉点清晰的同源标志点,构成了川滇高山栎和刺叶高山栎的几何轮廓(图 2.2)。

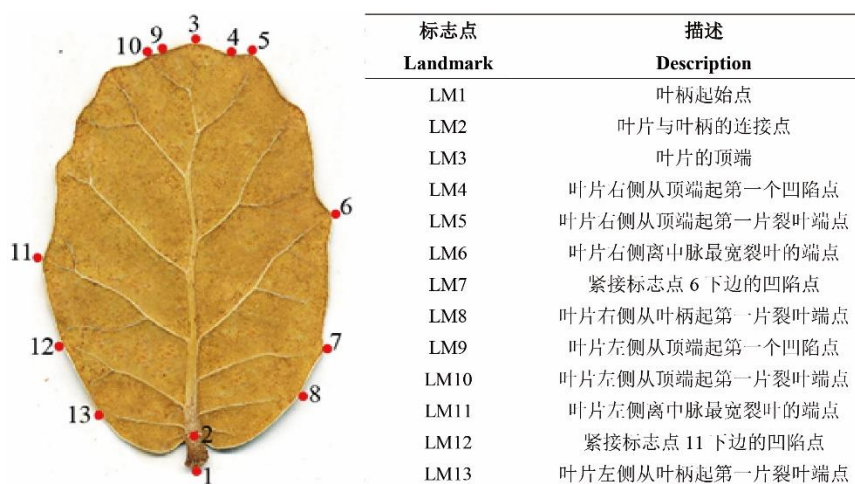


图 2.2 标志点位置

Figure 2.2 Landmark configuration and descriptions of the landmarks

其中 LM1, LM2 和 LM3 这三个点位于叶片的中轴,而 LM4, LM5, LM6, LM7, LM8, LM9, LM10, LM11, LM12 和 LM13 是成对的分布于叶片两侧边缘。所有叶片的形态通过这 13 个标志点的坐标数据(x, y)被量化,最终叶形数据的输入格式为

```

“LM=13
  X0 Y0
  X1 Y1
  ....
  X12 Y12
  ID=XJD_W_T01_L01”
    
```

其中, LM=13 代表每个叶片的识别号,共 13 个 landmark 点; X0 Y0 --- X12 Y12 表示 13 个点的二维坐标; 示例中 ID=XJD_W_T01_L01 为每个叶片的 ID 号, XJD 为种群名称, W 表示所属物种或家系(本实验中的某家系或它们的混合个体是通过 SSR 分子标记的研究结果来进行判定, $Q \geq 0.8$ 被判定为是纯合个体, $Q < 0.8$ 被判定为混合个体), T01 表示第一棵树, L01 表示第一个叶片,即该叶片为 XJD 种群中 W 物种或家系的第一棵树的第一个叶片。

2.2 数据分析

2.2.1 遗传结构分析

(1)原始数据处理及数据格式转换

将GeneMarker读取的分子标记数据通过Flexbin (Excel的宏)进行归一化处理,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)。归一化数据中缺失的数据用英文符号“?”代替, 另外在数据的开头需标明种群数(“npops =”)和位点数(“nloci =”), 然后保存为“txt.”格式。最后通过CONVERT软件(Glaubitz, 2004)将归一化的数据转化成后续分析所需的格式。

(2)遗传结构和个体划分

首先使用STRUCTURE V2.3软件(Pritchard, *et al.*, 2000)通过贝叶斯聚类分析对所有的川滇高山栎和刺叶高山栎样品进行遗传结构分析。然后分别对刺叶高山栎和部分川滇高山栎样品进行贝叶斯聚类分析, 根据刺叶高山栎和川滇高山栎不同个体等位基因频率的差异, 来检查其遗传结构和每个个体基于nSSR被分配到同源集群的概率。程序运行1到10个集群(K), 每个K重复运行20次, Markov Chain Monte Carlo cycles (MCMC)设置为200000, burn-in cycles设定为100000。然后通过计算 ΔK 和 $\ln P(K)$ 来确定最优的K值, 从而估计最可能的集群数(Evanno *et al.*, 2005; Janes, *et al.*, 2017)。最后通过在线软件Structure Harvester (Earl and Vonholdt, 2012)将所有结果压缩为压缩包, 并通过Distruct 1.1软件(Rosenberg, 2004)得到柱状图。另外我们通过STRUCTURE结果得到的混合系数(Q)值, 来统计样本中基因型纯合或者混合的个体数, Q值接近0或1的时候为纯合个体, Q值接近0.5的时候被认为是混合个体。本研究选择 $Q=0.8$ 作为分配川滇高山栎和刺叶高山栎个体到不同家系或混合个体的标准, 其中 $Q \geq 0.8$ 为纯合个体, $Q < 0.8$ 为混合个体(Vähä and Primmer, 2006)。

2.2.2 叶形数据前期处理

(1) 将整理好的叶形数据的“txt.”格式输入 MorphoJ 软件(Klingenberg, 2011)。为了避免其他因素(如方向, 位置等)对叶片形态的影响, 我们通过普式叠印法(Generalized Procrustes Analysis, GPA) (Rohlf and Slice, 1990; Rohlf, 2003), 对坐标数据进行傅里叶转换, 在去除其他因素影响的同时, 将输入的叶形数据分为叶片形状(后续称为普式坐标)与叶片大小数据(Sanfilippo *et al.*, 2009)。

(2) 鉴于在本研究中所选用的标志点结构是以叶片主脉为中轴两侧标志点对称分布, 因此, 我们又将叶片形状(即普式坐标)分为对称和非对称组分。在普式叠印过程中, 对于每棵树的叶片原始轮廓对应的创建了一个镜像轮廓(将原始标志点 x 坐标变成它们的相反数), 然后通过对原始轮廓进行叠加创建了一个平均轮廓(图 2.3A) (Mardia *et al.*, 2005)。并根据每个叶片偏离平均轮廓的大小来检验并排除离群值(异常值)。这里, 我们使用原始轮廓与平均轮廓的差异来表示对称组分的变异; 而非对称变异通过原始轮廓和其对应的镜像轮廓之间的差异被量化(图 2.3B, C) (Klingenberg *et al.*, 2002)。

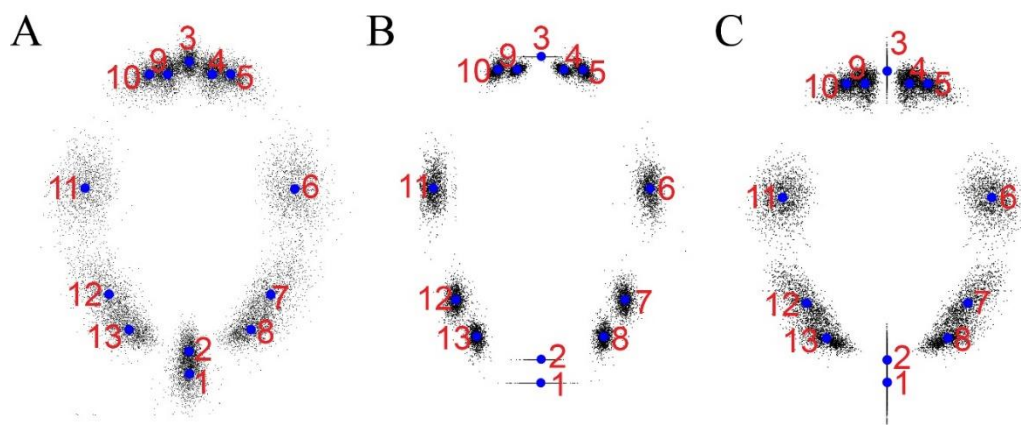


图 2.3 叶片普氏叠印分析散点图基于普氏坐标(A)、对称组分(B)和非对称组分(C)
Figure 2.3 Generalized procrustes analysis of the leaf shape of *Quercus aquifolioides* based on Procrustes coordinates (A), symmetric components (B) and asymmetric components(C)

(3) 对叶片数据(包括对称组分, 非对称组分以及叶片大小)进行分层, 然后对不同层次的数据做平均, 建立包括叶片、树、种群、家系、物种在内的各个层次的协方差矩阵(covariance matrix), 用于后续的多元统计分析。从叶片、树、种群、家系、物种不同层次来研究川滇高山栎和刺叶高山栎的叶形变异。

(4) 为了更直观的识别叶形差异, 我们对叶片形态进行了可视化操作。MorphoJ 软件有三种输出图形: 扭曲轮廓图(Warped Outline Drawing)、变化网格图(Transformation Grid)和线框图(Wireframe Graph)。其中, 变化网格图是通过薄版样条(Thin-Plate Spline)分析将坐标轴上的重要值如最大值和最小值等以转换网格的形式量化出来, 可以直观的看出形态的变化趋势; 而线框图是通过在成对的地标之间画线形成一个形似叶片的线框用来辅助可视化。在本研究中, 我们使用的是将变化网格图和线框图进行叠加, 更直观的进行表示叶形变异(Viscosi and Cardini, 2011); 并对各种分析结果的极值进行量化, 沿着坐标轴来分析叶片的变化趋势。

2.2.3 叶形数据分析

分离得到的三个新数据集(对称组分、非对称组分和叶片大小), 基于主成分分析、偏最小二乘法、典型变量分析和判别分析从叶片、树、种群、家系不同分层对这三个数据集进行分析, 进而研究川滇高山栎和刺叶高山栎的叶形变异。

(1) 主成分分析

主成分分析(Principal Component Analysis, PCA)是通过产生新的假想成分, 将原始的相关变量转化为另一组不相关的变量, 从而尽可能多的提取原始变量中解释变异的成分, 来体现样本间存在的差异。本研究我们将 13 个标志点构成的原始变量进行线性组合, 从中提取出对叶片形态变异贡献较大的组合变量, 设置置信区间为 95% 将所有叶片形态进行分类, 根据 PCA 散点图的结果来分析川滇高山栎和刺叶高山栎物种间以及它们各自种内不同家系间的叶片形状是否存在显著差异。两物种间以及物种

内不同家系间差异的显著性通过 R 语言“agricolae”函数包中的 Scheffe 事后比较来检验。另外,通过对前两个主成分轴(PCs)的最大值和最小值进行图形重构,从而可视化川滇高山栎和刺叶高山栎叶形的主要变化趋势。

(2) 偏最小二乘法分析

偏最小二乘法(Two Blocks Partial Least Squares, 2B-PLS)是将形状性状映射到大小的性状上,可以用来分析叶片大小与形状的共变关系(即异速生长)。异速生长指的是形状因为大小的影响而发生的变化。由于异速生长模式无处不在,形状的变化几乎都伴随着大小的变化(Klingenberg and McIntyre, 1998),因此,叶片的大小和形状紧密相连并相互影响。在统计学上,可以通过测量叶片大小比例的变化来衡量异速生长。本研究,我们通过 2B-PLS 来确认叶片大小的变化是否会引起叶片形状的变异。通过计算得到的 P -value 值以及 RV 值(皮尔逊相关系数的平方)来确定异速生长的结果是否显著,并用 10000 次迭代来检验 RV 系数的显著性。

(3) 典型变量分析和判别分析

典型变量分析(Canonical Variate Analysis, CVA)和判别分析(Discriminant Analysis, DA)都是通过检测组间差异来进行物种判别的常用方法。具体来说,CVA 是通过马氏距离(Mahalanobis distance)和普氏距离(Procrustes distance)的排序分析和置换测试(T^2 statistics; 10000 permutations per test),最大限度地分离了指定的组(这指物种或家系)。CVA 是主要用于检测三个或三个以上的组间差异。而 DA 是通过交叉交叉函数(cross-validated scores)和判别函数(discriminant scores)两种方法,使用 T^2 统计量交叉验证(10000 permutations per test),为组间差异提供了可靠的信息。DA 用于两两之间的比较,所以当我们分析的数据是两个类群时,优先使用 DA。本文同时使用了 CVA 和 DA 两种方法来判别川滇高山栎和刺叶高山栎,川滇高山栎不同家系和它们的混合个体,以及刺叶高山栎不同家系及它们的混合个体。其中 CVA 输出的结果为散点图,而 DA 为条形图。

2.2.4 地理、遗传和气候因子对叶形的影响

(1) 获取叶形、地理、遗传及气候因子

我们对川滇高山栎和刺叶高山栎种群的叶形与地理、遗传和气候因子进行相关性研究。首先从 MorphoJ 中导出了川滇高山栎和刺叶高山栎个体的叶片对称组分、非对称组分和叶片大小数据,作为叶形数据。然后对这些个体的 SSR 分子标记数据进行 PCA 分析,保留前三个主成分(PCs)作为中性遗传变量(解释了总变异的 60%以上)。为了获取气候变量,我们在 WorldClim 数据库(<http://www.worldclim.org>)中获取了 1970-2000 近 30 年的气候数据,共 103 个气候因子。并使用 ArcMAP (Environmental Systems Research Institute, 2014)将川滇高山栎和刺叶高山栎采样点的 GPS 坐标(经度和纬度)映射到 30 arc-second 的 ESRI®气候数据网格中,获得 19 个采样点的气候因

子。接着,我们通过 R 语言的“usdm”函数包(Naimi *et al.*, 2014)中的方差膨胀因子分析(Variance Inflation Factor, VIF),从这 19 个气候变量中去除部分相关性较强的因子,最终保留了 4 个气候因子。其中包括季节性降水(bio15)、最干旱季平均温度(bio09)、气温年较差(bio07)和 6 月份降水(prec06)。这 4 个气候因子、SSR 分子标记的前三个 PCs 和经纬度及海拔数据作为叶形的预测因子,被用于后续的冗余分析。这些种群的地理信息及主要气候数据记录在表 2.1。

(2)叶形与地理、遗传和气候因子的冗余分析

为了调查地理、遗传和气候因子是否解释了一些叶形变异(对称组分、非对称组分和叶片大小),我们使用 R 语言的函数包“usdm”(Oksanen *et al.*, 2017)进行了一系列基于距离的冗余分析(distance-based redundancy analyses, dbRDAs),包括边际测试(Marginal tests)和条件测试(Conditional tests) (Legendre and Anderson, 1999)。dbRDA 是多元多重回归的一种形式,可以直接在选择的距离或不同的响应矩阵上进行执行。虽然 Mantel test 分析(Smouse *et al.*, 1986)也已经被用于回归分析(e.g. Malhotra and Thorpe, 2000),但有关于这种方法在不同情况下的有效性存在争论(Raufaste and Rousset, 2001)。这个问题的出现是由于在一个距离矩阵中,各个距离之间缺乏独立性。虽然简单的 Mantel test 通过使用置换克服了这个问题,但在多个回归变量的情况下,置换的方法不一定能起到有效作用。因此,我们在这里没有使用 Mantel test,而是使用 dbRDA 的方法。其中重要的一点是,对于 dbRDA 来说,个体的距离不像 Mantel test 那样被当作单个的响应变量,而是以用于分析的个体为单位的。

我们首先使用方差划分运行了一个包括地理、遗传和气候解释变量的边际模型(地理+遗传+气候)。另外考虑到我们的一个主要目标是评估地理分布,中性遗传,和局部气候因素在塑造叶片形态变异方面的相对重要性。因此我们跑了三个不同的条件 dbRDAs 模型测试了纯的地理效应,纯的遗传效应,和纯的气候效应,分别通过控制另外两个因素来实现:(1)控制遗传和气候效应的有关地理变量的条件模型(地理+Condition(遗传+气候));(2)控制地理和气候效应的有关遗传变量的条件模型(遗传+Condition(地理+气候));(3)控制地理和遗传效应的有关气候变量的条件模型(气候+Condition(地理+遗传))。最后,通过方差分析函数(anova function)计算了 dbRDA 的 F 值、解释变异的百分比和 p 值来评估每个独立因素对叶形变异的影响(Oksanen *et al.*, 2017)。

3 研究结果

3.1 川滇高山栎和刺叶高山栎的遗传结构分析和个体划分

3.1.1 川滇高山栎和刺叶高山栎的遗传结构分析

通过STRUCTURE的分析结果，可以确定川滇高山栎(绿色)和刺叶高山栎(红色)明显分为两个组，而且从图中可以看出川滇高山栎和刺叶高山栎间几乎不存在基因的流动(图3.1A)。从图3.1B中可以看出川滇高山栎在遗传上被聚为两个截然不同的家系，第一组(红色)为Tibet家系，第二组(绿色)为WSP-HDM家系，其中有部分个体属于这两个家系的混合个体；而刺叶高山栎在遗传上也被聚为两个截然不同的家系，第一组(红色)为West家系，第二组(绿色)为East家系(图3.1C)，部分个体属于West和East家系的混合个体。

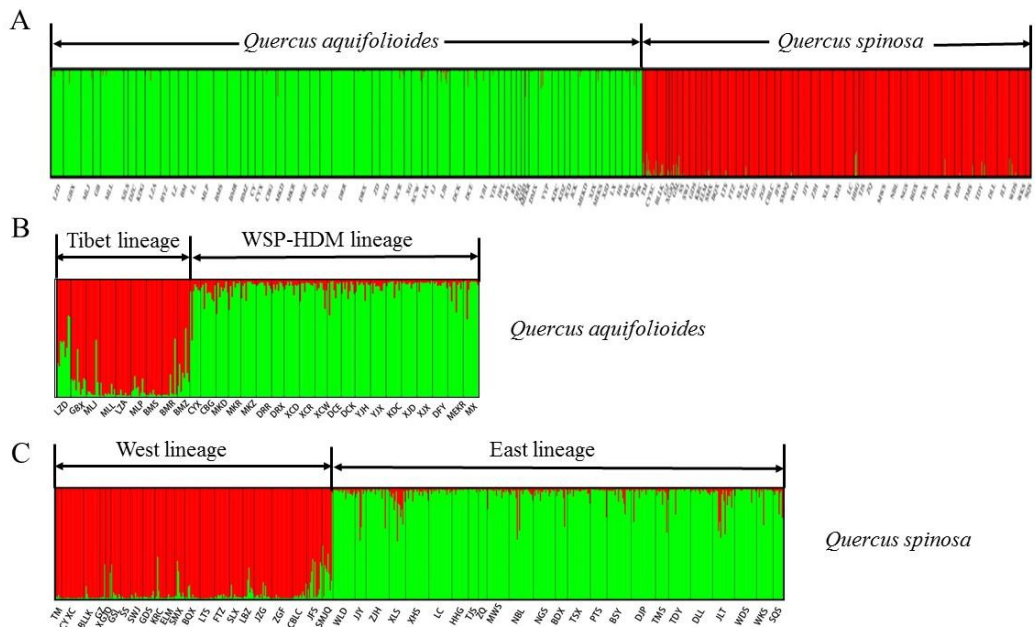


图 3-1 遗传结构图基于川滇高山栎和刺叶高山栎物种之间(A)、川滇高山栎物种内部(B)和刺叶高山栎物种内部(C)

Figure 3.1 Results of STRUCTURE analysis based on between *Quercus aquifolioides* and *Q. spinosa* (A), within *Q. aquifolioides* (B) and within *Q. spinosa* (C)

3.1.2 川滇高山栎的个体划分

我们通过对川滇高山栎物种内的STRUCTURE分析结果进行统计，根据 Q 值为0.8将所研究的这29个川滇高山栎种群中的273个个体进行划分，发现有179个个体被分到了WSP-HDM家系，70个个体被分到了Tibet家系，另外有24个个体在遗传上被归类为

混合个体(表3.1)。

表 3.1 基于 SSR 分子标记分配川滇高山栎到不同家系和混合个体的统计表
Table 3.1 The number of individuals of *Quercus aquifolioides* assigned to Tibet and WSP-HDM lineages or Mix individuals based on genetic assignment.

| 种群缩写 Abbreviations | Tibet 家系 | Mix 个体 | WSP-HDM 家系 | 总计 Total |
|-----------------------|-------------|-----------|---------------|-------------|
| MX | | 1 | 9 | 10 |
| XJD | | | 10 | 10 |
| XJX | | | 10 | 10 |
| MEKR | | 1 | 9 | 10 |
| DFY | | | 10 | 10 |
| KDC | | | 10 | 10 |
| YJX | | | 10 | 10 |
| YJH | | | 10 | 10 |
| DCE | | 1 | 8 | 9 |
| DCK | | | 9 | 9 |
| XCW | | 1 | 7 | 8 |
| XCR | | | 10 | 10 |
| XCD | | | 10 | 10 |
| DRX | | | 8 | 8 |
| DRR | | | 10 | 10 |
| MKZ | | | 10 | 10 |
| MKR | | 1 | 7 | 8 |
| MKD | | 1 | 7 | 8 |
| CBG | | 1 | 9 | 10 |
| CYX | | 1 | 6 | 7 |
| BMZ | 4 | 4 | | 8 |
| BMR | 9 | 1 | | 10 |
| BMS | 10 | | | 10 |
| MLP | 10 | | | 10 |
| LZA | 10 | | | 10 |
| MLL | 10 | | | 10 |
| MLJ | 8 | 1 | | 9 |
| GBX | 9 | 1 | | 10 |
| LZD | | 9 | | 9 |
| Total | 70 | 24 | 179 | 273 |

3.1.3 刺叶高山栎的个体划分

我们通过对刺叶高山栎物种内的STRUCTURE分析结果进行统计，同样按 Q 值为0.8将所研究的这46个刺叶高山栎种群中的640个个体进行划分，发现有233个个体被分到了West家系，370个个体被分到了East家系，另外有37个个体在遗传上被归类为混

合个体(表3.2)。

表 3.2 基于 SSR 分子标记分配刺叶高山栎到不同家系和混合个体的统计表
Table 3.2 The number of individuals of *Quercus spinosa* assigned to West and East lineages or Mix individuals based on genetic assignment.

| 种群缩写 Abbreviations | West 家系 | Mix 个体 | East 家系 | 总计 Total |
|-----------------------|---------|--------|---------|-------------|
| TM | 5 | | | 5 |
| CYXC | 20 | | | 20 |
| BLLK | 15 | | | 15 |
| GZ | 4 | 1 | | 5 |
| XGJQ | 4 | 1 | | 5 |
| GSL | 8 | 1 | | 9 |
| SS | 9 | | | 9 |
| SWJ | 11 | | | 11 |
| GDS | 11 | | | 11 |
| KRC | 9 | 1 | | 10 |
| ELM | 8 | | | 8 |
| SMX | 7 | 2 | | 9 |
| BQX | 14 | | | 14 |
| LTS | 13 | | | 13 |
| FTZ | 14 | | | 14 |
| SLX | 12 | | | 12 |
| LBZ | 9 | 1 | | 10 |
| JZG | 16 | | | 16 |
| ZGF | 19 | | | 19 |
| CBLC | 13 | | | 13 |
| JFS | 9 | 5 | | 14 |
| SMJQ | 3 | 6 | | 9 |
| WLD | | | 20 | 20 |
| JJY | | 2 | 8 | 10 |
| ZJH | | 1 | 20 | 21 |
| XLS | | 3 | 12 | 15 |
| XHS | | | 21 | 21 |
| LC | | | 21 | 21 |
| HHG | | | 15 | 15 |
| TJS | | | 9 | 9 |
| ZQ | | | 8 | 8 |
| MWS | | | 20 | 20 |
| NBL | | | 2 | 22 |
| NGS | | | 20 | 20 |
| BDX | | 1 | 10 | 11 |

| | | | | |
|-------|-----|----|-----|-----|
| TSX | | | 21 | 21 |
| PTS | 1 | | 14 | 15 |
| BSY | 1 | | 21 | 22 |
| DJP | 1 | | 21 | 22 |
| TMS | 1 | | 11 | 12 |
| TDY | 1 | | 19 | 20 |
| DLL | | | 20 | 20 |
| JLT | 4 | | 16 | 20 |
| WDS | | | 20 | 20 |
| WKS | 1 | | 14 | 15 |
| SQS | 2 | | 7 | 9 |
| Total | 233 | 37 | 370 | 640 |

3.2 川滇高山栎和刺叶高山栎的叶片形态变异

3.2.1 叶片形状差异分析

(1) 川滇高山栎和刺叶高山栎的种间叶片形状差异

我们在树水平分别基于对称组分和非对称组分利用 PCA 分析对川滇高山栎和刺叶高山栎的叶片形状变异进行了研究(图 3.2)。基于对称组分,我们发现川滇高山栎和刺叶高山栎之间存在明显的种间差异(图 3.2A)。其中, PC1 和 PC2 解释了总变异的 60%以上,尤其是沿着 PC1 轴,两物种出现了明显分离。因此我们绘制出了川滇高山栎和刺叶高山栎在 PC1 轴正负方向上极值处的网格变形图(图 3.2C)。从网格变形图可以看出两个物种的叶片形状呈现相似的变化趋势,叶形从卵形到近椭圆形变化(叶柄变短,叶基部和整体宽度变窄)。但是川滇高山栎从-0.1 到 0.2,而刺叶高山栎从-0.1 到 0.1;相比之下川滇高山栎的变异跨度更大。而对于非对称组分,前两个 PCs 分别占总变异的 38%和 28%。PCA 散点图显示,两物种的样本也存在差异,但相比对称组分差异较小(图 3.2B)。我们通过事后多重比较分析发现川滇高山栎和刺叶高山栎在对称组分和非对称组分上的差异都是显著的,被分到了不同的组(表 3.3)。

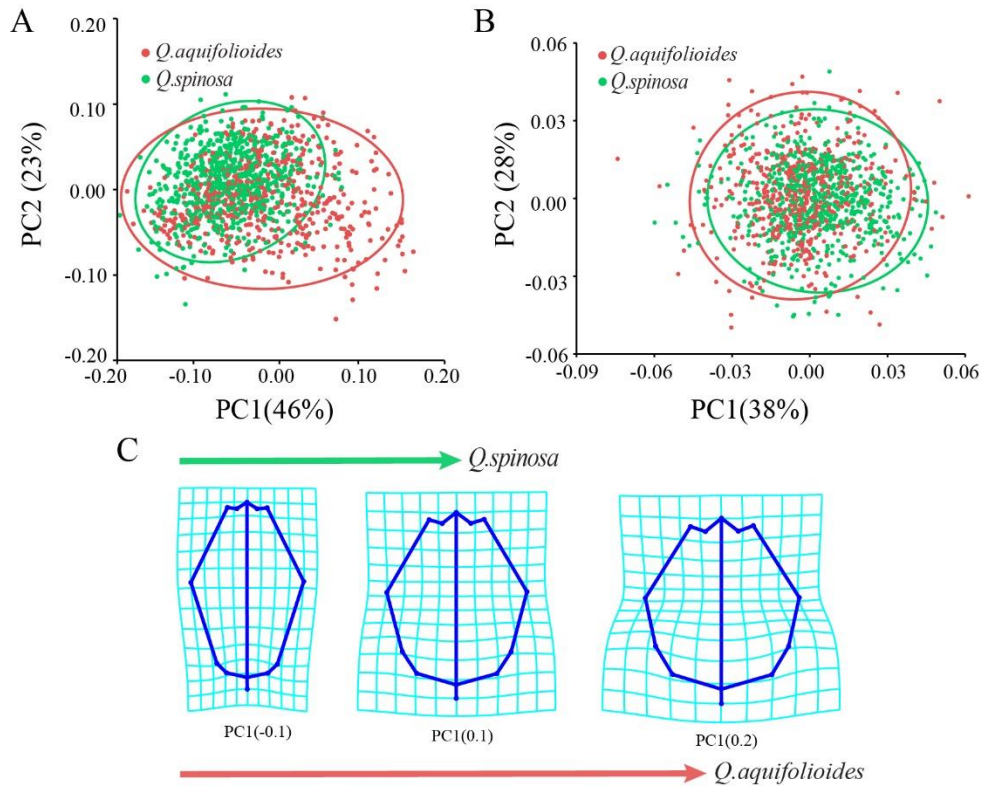


图 3.2 川滇高山栎和刺叶高山栎所有样本的 PCA 分析基于对称组分(A)和非对称组分(B), 置信椭圆设置为 95%; (C)川滇高山栎和刺叶高山栎的叶片形状变化网格图(PC 的值为正负极值情况下相应的叶片的形态)

Figure 3.2 PCA analysis of *Quercus aquifolioides* and *Q. spinosa* on the total sample based on symmetric components (A) and asymmetric components(B), confidence ellipse at 95%; (C) transformation grids for *Quercus aquifolioides* and *Q. spinosa* (the shapes for PC scores of negative and positive extremes)

(2)川滇高山栎物种内不同家系间的叶片形状差异

我们在叶片水平利用 PCA 分析对川滇高山栎各家系间的叶片形状变异进行了研究, 我们发现对于对称组分, WSP-HDM 家系和 Tibet 家系形成了不同的类群, 但是有部分重叠; 而混合个体则分散在两个类群之间(图 3.3A)。其中, PC1 解释了总变异的 42%, 沿着 PC1 轴由负值向正值, 叶形由近椭圆形(叶柄短, 顶端和基部窄)变为近圆形(叶柄长, 先端和顶部宽)。PC2 占总变异的 21%, 主要与叶片最大宽度(LM6, LM11)的位置有关。沿着 PC2 由负值向正值, 叶形由倒卵形(叶柄长, 基部窄)变为卵形(叶柄短和基部宽)。对于非对称组分, 前两个 PCs 分别占总变异的 39%和 28%。PCA 散点图显示, 所有样本几乎完全重叠, 没有组间差异可以识别(图 3.3B)。沿着 PC1 的形状变异主要是左右两边叶片最大宽度的相对位置的变化和左右两边叶片相对大小的差异; 而沿着 PC2 的变化主要集中在叶片的弯曲方向上(朝左或右)。事后比较分析发现川滇高山栎 WSP-HDM 和 Tibet 家系在对称组分上分为了不同组, 而混合个体被分到了一个中间组; 对于非对称组分, WSP-HDM, Tibet 家系和混合个体没有

组间差异，被分到了同一个组(表 3.3)。

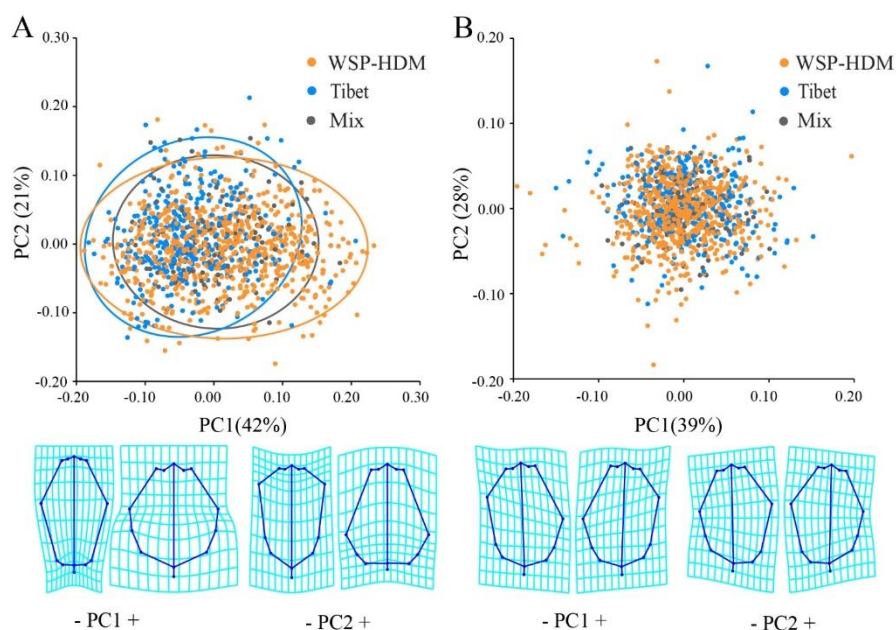


图 3.3 川滇高山栎各家系间的 PCA 分析分别基于叶片对称组分(A)和非对称组(B)

Figure 3.3 PCA analysis within *Quercus aquifolioides* based on symmetric (A) and asymmetric components (B)

(3)刺叶高山栎种内不同家系间的叶片形状差异

我们在叶片水平利用 PCA 分析对刺叶高山栎各家系间的叶片形状变异进行了研究，发现对于对称组分，East 和 West 家系间只存在微小的差异，大部分样本都重叠在一起；而混合个体则完全分散在两个家系内(图 3.4A)。其中，PC1 解释了总变异的 39%，沿着 PC1 轴由负值向正值，叶形由倒披针形(叶片整体呈收缩趋势，顶端和基部窄)变为近圆形(叶片整体呈收缩扩张趋势，顶端尖，基部钝，最宽处下移)。PC2 占总变异的 24%，主要与叶片最大宽度(LM6, LM11)的位置有关。沿着 PC2 由负值向正值，叶形由倒卵形(叶柄长，顶端和基部尖)变为卵形(叶柄短，顶端和基部钝)。对于非对称组分，前两个 PCs 分别占总变异的 37%和 28%。PCA 结果与川滇高山栎的结果一致，所有样本几乎完全重叠，没有组间差异可以识别(图 3.4B)。沿着 PC1 的形状变异主要是左右两边叶片最大宽处相对位置的变化和左右两边叶片相对大小的差异；而沿着 PC2 的变化主要集中在叶片朝左或右的弯曲方向上。事后比较分析的结果表明刺叶高山栎 East 和 West 家系在对称组分上分为了不同组，而混合个体被分到了一个中间组；对于非对称组分，East, West 家系和混合个体没有组间差异，被分到了同一个组(表 3.3)。

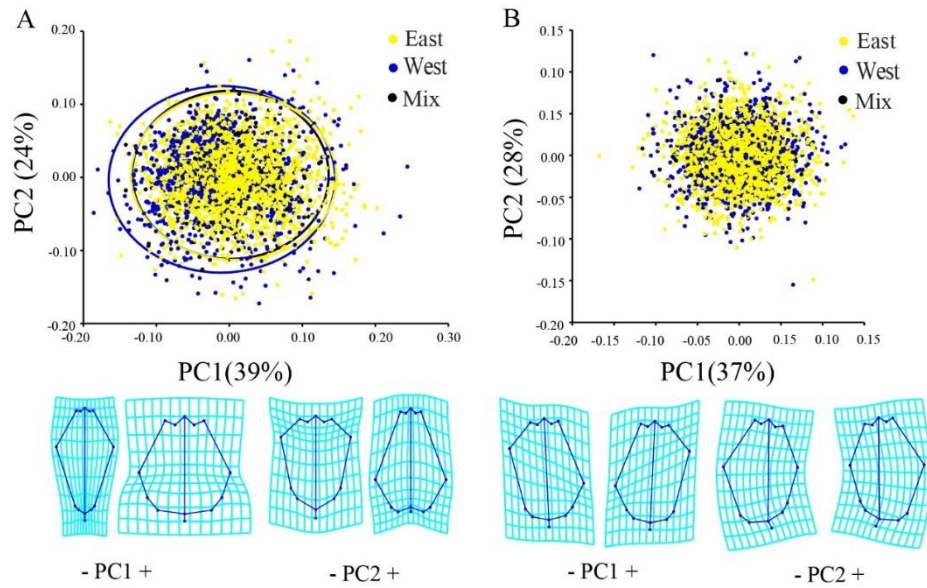


图 3.4 刺叶高山栎各家系间的 PCA 分析分别基于叶片对称组分(A)和非对称组(B)
Figure 3.4 PCA analysis within *Quercus spinosa* based on symmetric (A) and asymmetric components (B)

3.2.2 叶片大小与异速生长分析

(1) 川滇高山栎和刺叶高山栎种间和种内不同家系的叶片大小

通过对川滇高山栎和刺叶高山栎的叶片进行比较,可以看出川滇高山栎的叶片明显要比刺叶高山栎的叶片小(图 3.5)。从图 3.6 可以看出,在川滇高山栎中, WSP-HDM 家系的叶片明显要比 Tibet 家系和混合个体的叶片小,而混合个体和 Tibet 家系的叶片大小接近。而刺叶高山栎的叶片,类似于川滇高山栎, East 家系明显要比 West 家系和混合个体的叶片小,而混合个体和 West 家系的叶片大小接近(图 3.7)。事后比较分析结果也显示(表 3.5),川滇高山栎和刺叶高山栎的叶片大小被分到了不同的组;在川滇高山栎中, WSP-HDM 与 Tibet 家系叶片大小被分到了不同的组,而混合个体的叶片大小和 Tibet 家系分为一组;在刺叶高山栎中, East 与 West 家系叶片大小被分到了不同的组,而混合个体的叶片大小和 West 家系分为一组。

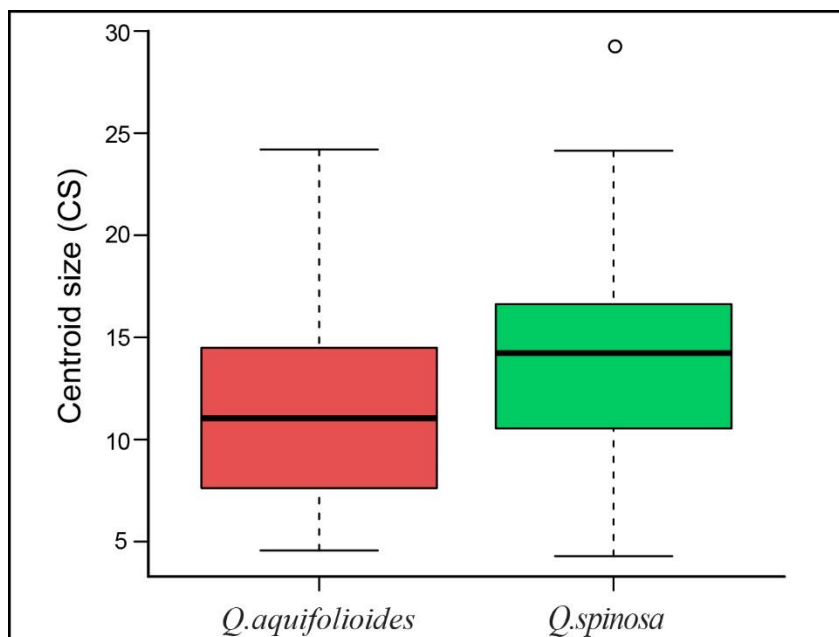


图 3.5 川滇高山栎和刺叶高山栎物种间叶片大小的比较

Figure 3.5 Leaf centroid size of *Quercus aquifolioides* and *Q. spinosa* (median, 25-75% quartiles, minimum and maximum)

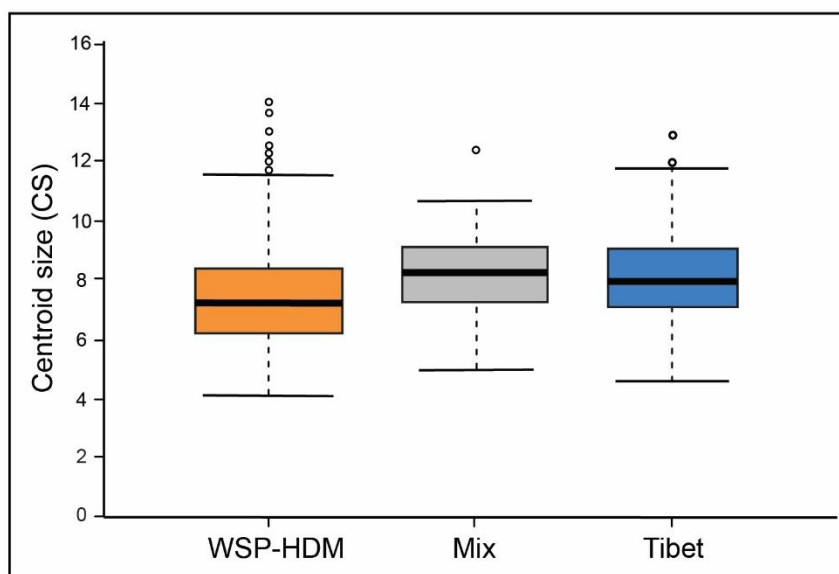


图 3.6 川滇高山栎不同家系间叶片大小的比较

Figure 3.6 Leaf centroid size of *Quercus aquifolioides* from WSP-HDM, Mix and Tibet lineages (median, 25-75% quartiles, minimum and maximum).

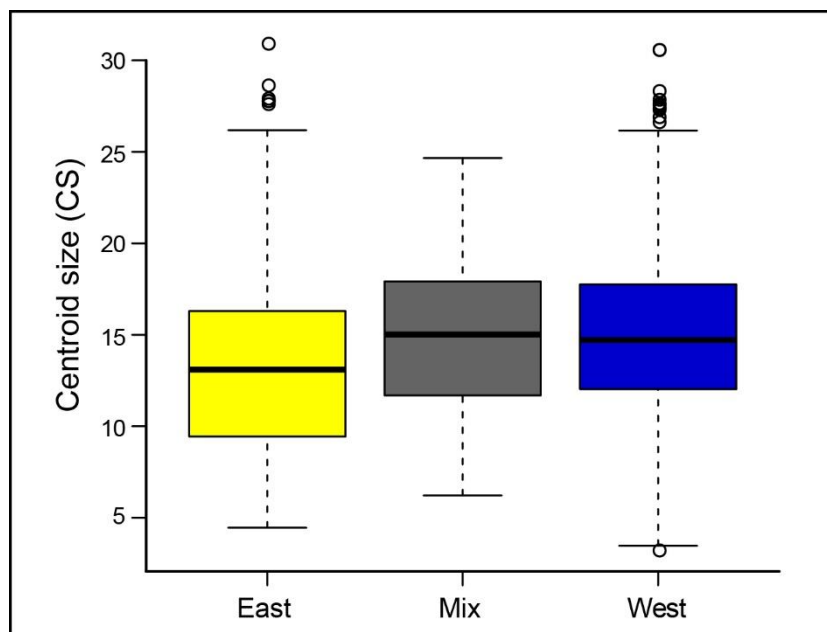


图 3.7 刺叶高山栎不同家系间叶片大小的比较

Figure 3.7 Leaf centroid size of *Quercus spinosa* from East, Mix and West lineages (median, 25-75% quartiles, minimum and maximum)

表 3.3 通过 Scheffe 事后比较试验确定川滇高山栎和刺叶高山栎各家系之间对称组分、非对称组分和叶大小的差异

Table 3.3 The differences of symmetric components, asymmetric components, and leaf size among lineages determined by the Scheffe *post hoc* comparison test ($P < 0.05$).

| | | Symmetric component | | Asymmetric component | | Leaf size | |
|---|-------------------------|---------------------|--------|----------------------|--------|------------------|--------|
| | | 对称组分 | | 非对称组分 | | 叶片大小 | |
| | | mean ± s. d. | groups | mean ± s. d. | groups | mean ± s. d. | groups |
| <i>Q. aquifolioides</i> 和 <i>Q. spinosa</i> 种间 | <i>Q. aquifolioides</i> | 0.02 ± 0.07 | A | 0 ± 0.02 | A | 1129.03 ± 413.82 | A |
| | <i>Q. spinosa</i> | 0.02 ± 0.06 | B | 0 ± 0.02 | B | 1393.82 ± 401.91 | B |
| <i>Q. aquifolioides</i> 种内 | WSP-HDM 家系 | 0.01 ± 0.07 | A | 0 ± 0.02 | A | 741.67 ± 145.52 | A |
| | Tibet 家系 | -0.03 ± 0.05 | B | 0 ± 0.02 | A | 814.74 ± 115.22 | B |
| | Mix 个体 | 0 ± 0.04 | AB | 0 ± 0.02 | A | 817.21 ± 84.84 | B |
| | East 家系 | 0 ± 0.04 | A | 0 ± 0.02 | A | 1328.44 ± 445.11 | A |
| <i>Q. spinosa</i> 种内 | West 家系 | 负 0.01 ± 0.05 | B | 0 ± 0.02 | A | 1497.92 ± 436.92 | B |
| | Mix 个体 | 0 ± 0.04 | AB | 0 ± 0.02 | A | 1473.84 ± 433.88 | B |

平均值±标准差；A 组与 B 组表示有显著差异。

Values are means + s.d.; the group 'A' is significantly different from the group 'B'.

(2) 川滇高山栎和刺叶高山栎种间和种内不同家系的异速生长分析

此外,我们还分别检测了川滇高山栎和刺叶高山栎种间和种内不同家系的叶片形状(包括对称和非对称组分)与叶片大小的共变关系(即异速生长)(图 3.8, 3.9 和 3.10)。对于川滇高山栎和刺叶高山栎种间异速生长(图 3.8), 结果表明川滇高山栎的对称组分和叶片大小存在显著的异速生长模式(RV 系数为 0.1211, $P < 0.0001$), 而对于刺叶高山栎没有发现异速生长模式(图 3.8A)。从转换网格图可以看出随着叶片越来越大, 从负值到正值, 叶片形状从近圆形到近椭圆形变化, 叶柄变短(图 3.8A)。另外非对称组分和叶片大小, 我们发现川滇高山栎和刺叶高山栎都不存在异速生长关系(RV 系数为 0.0027, $P = 0.1414$; 图 3.8B)。

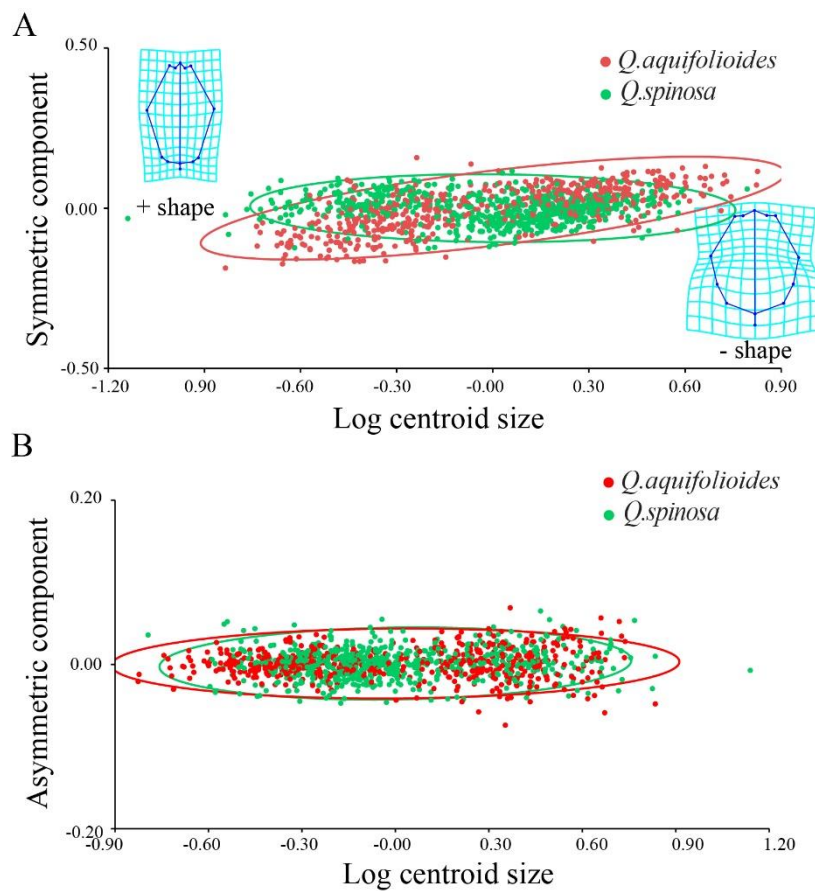


图 3.8 川滇高山栎和刺叶高山栎的 2B-PLS 分析

Figure 3.8 2B-PLS analysis of *Quercus aquifolioides* and *Q. spinosa*

对于川滇高山栎种内异速生长(图 3.9), 结果表明, WSP-HDM, Tibet 家系和混合个体异速生长的对称模式都是显著的(RV 系数 0.2941; $P < 0.0001$)。但对于非对称组分, 都未检测到显著的异速生长模式(RV 系数为 0.0093; $P = 0.2364$)。从图 3.9A 可以看出, 随着叶片越来越大, 从负值到正值, 叶片形状从近圆形到近椭圆形变化, 而且叶柄长度相对减小。

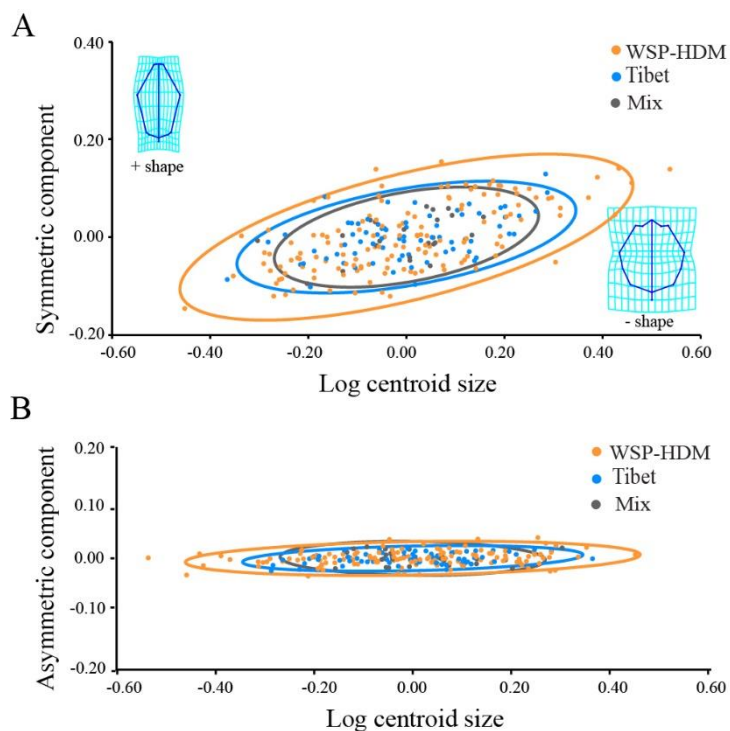


图 3.9 川滇高山栎的 2B-PLS 分析

Figure 3.9 2B-PLS analysis of *Quercus aquifolioides*

对于刺叶高山栎种内异速生长, 结果表明, 异速生长的对称模式和非对称模式都不显著(对称组分: RV 系数 0.0027, $P = 0.1414$; 非对称组分: RV 系数 0.0094, $P = 0.0179$, 图 3.10)。但对于对称组分, 可以看到 East 家系和混合个体有略微的异速生长模式。从图 3.10A 的网格图可以看出, 随着叶片越来越大, 从负值到正值, 叶片形状从近圆形到近椭圆形变化整体变宽, 叶顶端和基部变钝, 而且叶柄长度相对变长。

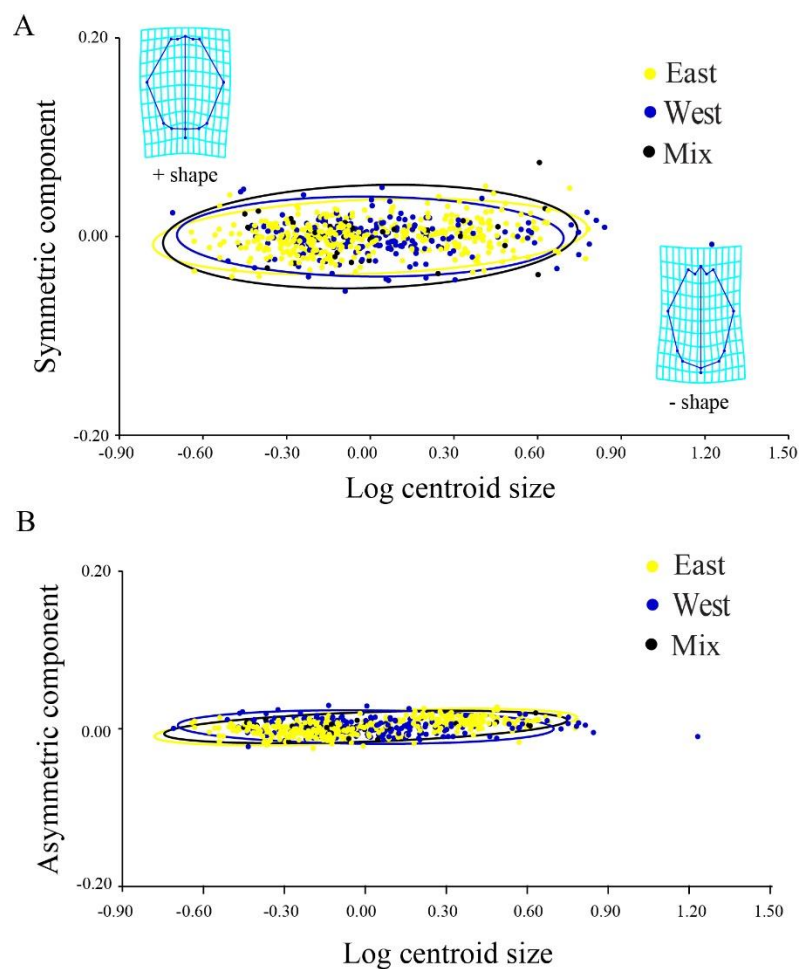


图 3.10 刺叶高山栎的 2B-PLS 分析

Figure 3.10 2B-PLS analysis of *Quercus spinosa*

3.2.3 叶形的判别分析

(1) 川滇高山栎和刺叶高山栎的种间判别分析

我们在树水平(为了减小误差,我们将每棵树采集的 5 个叶片做了平均,从而更好的代表个体)对川滇高山栎和刺叶高山栎进行了判别。DA 中交叉验证的结果(图 3.11)表明,川滇高山栎和刺叶高山栎之间存在显著的叶形差异($P < 0.0001$)。通过对 DA 判别结果进行统计发现,75%的川滇高山栎个体可以被正确判别,刺叶高山栎有 80%的个体可以被正确判别。

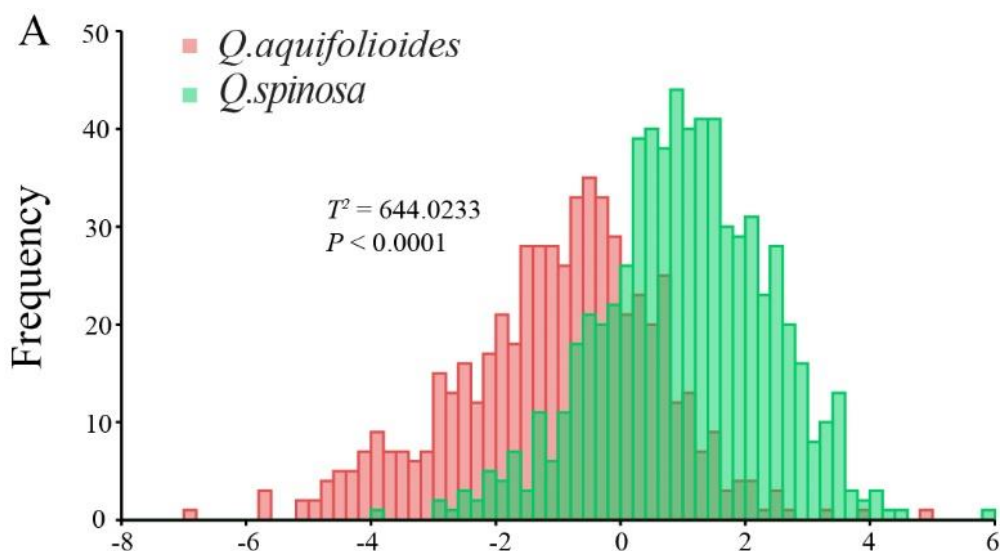


图 3.11 川滇高山栎和刺叶高山栎间的判别分析

Figure 3.11 DA analysis of *Quercus aquifolioides* and *Q. spinosa* on the total sample

(2) 川滇高山栎种内不同家系的判别分析

CVA 和 DA 的结果显示川滇高山栎两个家系间的叶形存在显著的差异。两两之间的马氏距离分别为 1.6791(WSP-HDM 家系和 Tibet 家系), 1.2185(混合个体与 WSP-HDM 家系), 1.2249(混合个体与 Tibet 家系); 普氏距离分别为 0.0498(WSP-HDM 家系和 Tibet 家系), 0.0221(混合个体与 WSP-HDM 家系), 0.0404(混合个体与 Tibet 家系)。从马氏和普氏距离都可以看出混合个体与 WSP-HDM 家系之间的距离更近, 表明混合个体的叶形与 WSP-HDM 家系的叶形更相似。

从 CVA 的散点图可以看出(图 3.12), 沿着 CV1 轴(占总变异的 89%), WSP-HDM 家系和 Tibet 家系部分分离, 而混合个体散布于两个家系之间。沿着 CV2 三个被分析的类群基本上都重叠(占总变异的 11%)。由变换网格图可以看出, WSP-HDM 家系和 Tibet 家系的区别在于 Tibet 家系的叶形呈近椭圆形, 叶柄较短, 顶端和基部较钝, 而混合个体的叶片形状介于这两个家系之间, 但更接近 WSP-HDM 家系的叶片形态(沿 CV1 方向)。

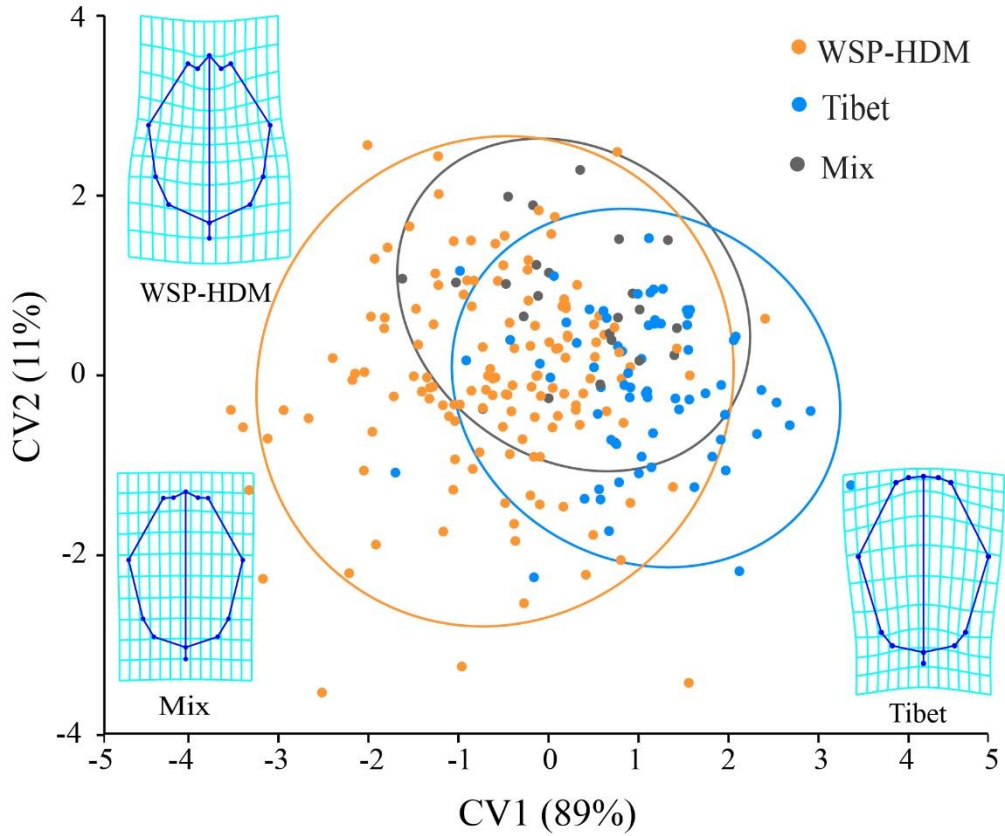


图 3.12 川滇高山栎的 CVA 分析
Figure 3.12 CVA analysis of *Quercus aquifolioides*

DA 中交叉验证的结果表明(图 3.13), 只有 WSP-HDM 家系和 Tibet 家系之间存在显著的叶形差异($T^2 = 126.7684$, $P < 0.0001$), 分别有 80% 和 87% 的个体可以被正确判别。然而当混合个体与这两个家系的个体分别进行分类时, T^2 值都不显著, 混合个体只有 65% 可以被正确分类。

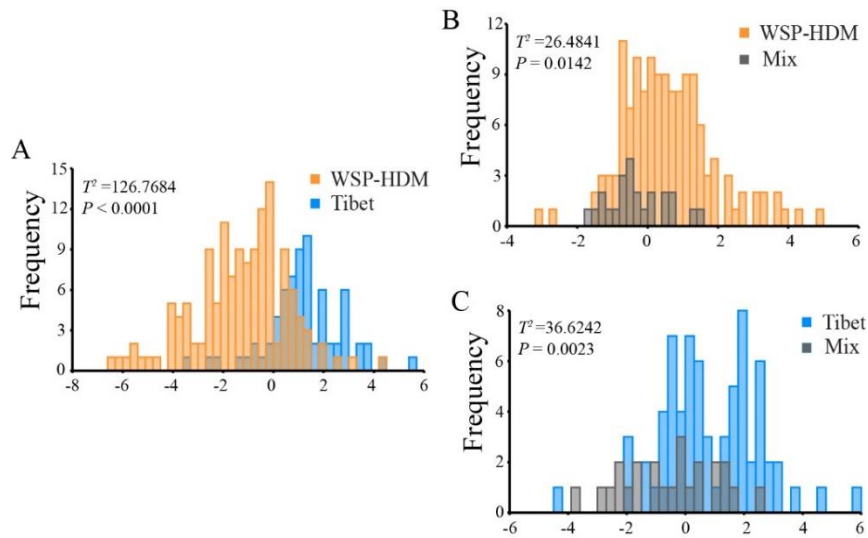


图 3.13 川滇高山栎不同家系间的判别分析

Figure 3.13 DA analysis of *Quercus aquifolioides*

注：WSP-HDM 与 Tibet 个体(A), Mix 与 Tibet 个体(B), Mix 与 WSP-HDM 个体(C)的 DA 结果；红色条形代表 WSP-HDM，黑色条形代表 Tibet，蓝色条形代表 Mix

Note: Discriminant analysis (DA) of leaf shapes from WSP-HDM vs. Tibet Lineage (A), Mix vs. Tibet Lineage (B) and Mix vs. WSP-HDM Lineage (C). Black bars, Tibet Lineage; Red bars, WSP-HDM Lineage; Blue bars, Mix Lineage

(3)刺叶高山栎种内不同家系的判别分析

CVA 和 DA 的结果显示刺叶高山栎两个家系间的叶形存在显著的差异。两两之间的马氏距离分别为 1.8233(East 家系和 West 家系), 0.4849(混合个体与 East 家系), 1.8536(混合个体与 West 家系); 普氏距离分别为 0.0352(East 家系和 West 家系), 0.0095(混合个体与 East 家系), 0.0395(混合个体与 West 家系)。从马氏和普氏距离都可以看出混合个体与 East 家系之间的距离更近, 表明混合个体的叶形与 East 家系的叶形更相似。

从 CVA 的散点图可以看出(图 3.14), 沿着 CV1 轴(占总变异的 98%), East 家系和 West 家系部分分离, 而混合个体散布于两个家系之间。沿着 CV2 三个被分析的类群基本上都重叠(占总变异的 2%)。由变换网格图可以看出, East, West 家系和混合个体的平均叶形都呈近椭圆形, 但相比之下 West 家系的叶形上 1/2 呈收缩趋势, 混合个体的叶片形状更接近 East 家系(沿 CV1 方向)。

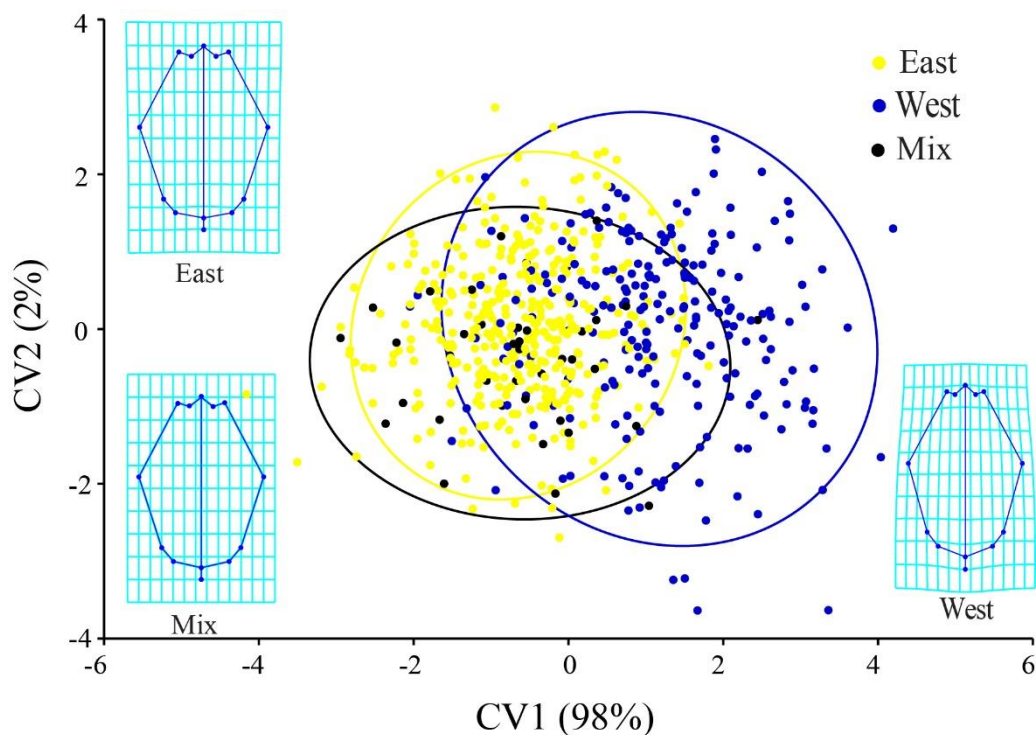


图 3.14 刺叶高山栎的 CVA 分析
Figure 3.14 CVA analysis of *Quercus spinosa*

DA 中交叉验证的结果表明(图 3.15), East 家系和 West 家系之间存在显著的叶形差异($T^2 = 1044.8249, P < 0.0001$), 分别有 75%和 74%的个体可以被正确判别。而且混合个体与 West 家系之间也存在显著的叶形差异($T^2 = 235.3018, P < 0.0001$), 分别有 68%和 74%的个体可以被正确判别。然而当混合个体和 East 家系的个体进行分类时, T^2 值不显著, 只有 49%的混合个体可以被正确分类。

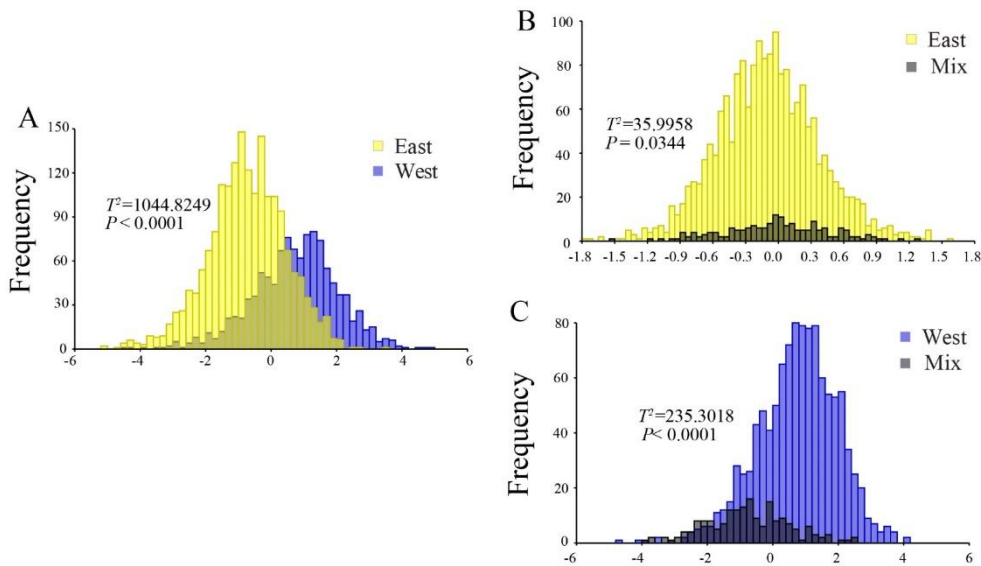


图 3.15 刺叶高山栎不同家系间的判别分析

Figure 3.15 DA analysis of *Quercus spinosa*

注: East 与 West 个体(A), Mix 与 East 个体(B), Mix 与 West 个体(C)的 DA 结果; 红色条形代表 East, 黑色条形代表 West, 蓝色条形代表 Mix

Note: Discriminant analysis (DA) of leaf shapes from East vs. West Lineage (A), Mix vs. East Lineage (B) and Mix vs. West Lineage (C). Black bars, West Lineage; Red bars, East Lineage; Blue bars, Mix Lineage

3.3 地理, 遗传和气候因子对叶形变异的影响

我们通过一系列的边际和条件dbRDA分析研究了地理, 遗传和气候因子对叶形的影响(表3.4)。边际dbRDA分析的结果显示: 对称组分和叶片大小与气候、地理和遗传因子都显著相关, 而非对称组分与地理和遗传显著相关。这些结果在条件dbRDA (即当检验一种预测因子对叶片形状和大小解释比例的显著性时, 控制其他两种预测因子的影响) 中得到了验证, 但是边际dbRDA与条件dbRDA结果的唯一区别在于, 在条件dbRDA中遗传对非对称组分的影响是不显著的。从表3.5中可以详细地看出, 在边际dbRDA分析中, 对称组分主要受气候变量(季节性降水(bio15)、最干旱季平均温度(bio09)和气温年较差(bio07))、遗传因子(PC1和PC2)以及地理因子(纬度和海拔)的影响。然而, 当我们控制了地理和遗传变量, 6月份降水(prec06)与对称组分也显著相关(条件

dbRDA)。对于非对称组分,在边际dbRDAs分析中主要受气候变量(季节性降水(bio15)、和气温年较差(bio07))、遗传因子(PC1和PC2)以及地理因子(纬度)的影响。但是在条件dbRDA中,只有地理因子中的纬度与非对称组分显著相关。叶片大小主要受气候变量(季节性降水(bio15)、气温年较差(bio07)和6月份降水(prec06))、遗传因子(PC1和PC2)以及地理因子(经度和纬度)的影响(边际dbRDAs)。但在我们控制地理和遗传变量后,最干旱季平均温度(bio09)也是显著的(条件dbRDA)。

表 3.4 利用基于距离的冗余分析测试非对称成分、对称成分和叶片大小与地理、气候和遗传变量之间的关系

Table 3.4 Tests of the association of symmetric components, asymmetric components and leaf size on the total sample with three individual sets of predictor variables using distance-based redundancy analysis (dbRDA). On the left are the marginal tests of individual sets, on the right are the partial (conditional) tests in which we tested the significance of single Variable set and the other two Variable set were conditioned.

| Marginal tests | | | | Conditional tests | | | |
|-----------------------|----------|----------|------|-------------------|----------|----------|------|
| Variable set | <i>F</i> | <i>P</i> | %VAR | Variable set | <i>F</i> | <i>P</i> | %VAR |
| Symmetric components | | | | | | | |
| Geography | 27.539 | 0.001*** | 8.2 | Geography | 5.928 | 0.001*** | 1.8 |
| Genetics | 1.997 | 0.001*** | 5.9 | Genetics | 1.919 | 0.001*** | 5.7 |
| Climate | 5.191 | 0.001*** | 2.0 | Climate | 5.191 | 0.001*** | 2.0 |
| Asymmetric components | | | | | | | |
| Geography | 3.528 | 0.001*** | 1.2 | Geography | 1.536 | 0.032* | 0.4 |
| Genetics | 1.151 | 0.035* | 3.8 | Genetics | 1.129 | 0.072 | 3.8 |
| Climate | 1.119 | 0.275 | 0.5 | Climate | 1.119 | 0.275 | 0.5 |
| Leaf size | | | | | | | |
| Geography | 210.761 | 0.001*** | 28.2 | Geography | 60.252 | 0.001*** | 8.1 |
| Genetics | 24.373 | 0.001*** | 32.7 | Genetics | 23.501 | 0.001*** | 31.5 |
| Climate | 6.457 | 0.001*** | 1.2 | Climate | 6.4574 | 0.001*** | 1.2 |

注: 边际测试包括所有变量, 而条件测试则只考虑所选变量的变化。

The marginal test includes all variables, while the conditional tests account for variation in the selected variables. *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$

研究结果

表 3.5 利用基于距离的冗余分析测试非对称成分、对称成分和叶片大小与地理、气候和遗传变量之间的关系

Table 3.5 Tests of the association of asymmetric components, symmetric components and leaf size with geographic, climate and genetic variables on the total sample using distance-based redundancy analysis (dbRDA)

| Test | Variable predictors | Symmetric components | | | Asymmetric components | | | Leaf size | | |
|-----------------------------------|---------------------|----------------------|----------|------------|-----------------------|----------|------------|-----------|----------|------------|
| | | <i>F</i> | <i>P</i> | % variance | <i>F</i> | <i>P</i> | % variance | <i>F</i> | <i>P</i> | % variance |
| Marginal (all variables) | bio15 | 142.386 | 0.001*** | 12.2 | 4.365 | 0.005** | 0.5 | 110.5 | 0.001*** | 5.4 |
| | bio09 | 68.246 | 0.001*** | 5.8 | 0.824 | 0.489 | 0.1 | 3.2 | 0.079 | 0.2 |
| | bio07 | 9.962 | 0.001*** | 0.9 | 2.544 | 0.048* | 0.3 | 60.9 | 0.001*** | 3.0 |
| | prec06 | 1.815 | 0.126 | 0.2 | 2.257 | 0.07 | 0.3 | 80.9 | 0.001*** | 4.0 |
| | PC1 | 44.446 | 0.001*** | 3.8 | 6.410 | 0.001*** | 0.7 | 715.6 | 0.001*** | 34.9 |
| | PC2 | 3.844 | 0.008** | 0.3 | 2.837 | 0.024* | 0.3 | 11.2 | 0.001*** | 0.5 |
| | PC3 | 2.013 | 0.103 | 0.2 | 0.807 | 0.509 | 0.1 | 0.7 | 0.411 | 0.03 |
| | Longitude | 1.989 | 0.098 | 0.2 | 1.455 | 0.181 | 0.2 | 80.9 | 0.001*** | 3.9 |
| | Latitude | 11.622 | 0.001*** | 1.0 | 4.046 | 0.011* | 0.4 | 106.7 | 0.001*** | 5.2 |
| | Altitude | 8.504 | 0.001*** | 0.7 | 0.333 | 0.873 | 0.04 | 0.3 | 0.596 | 0.01 |
| Conditional (Geography+ Genetics) | bio15 | 15.199 | 0.001*** | 1.3 | 1.528 | 0.183 | 0.2 | 8.5 | 0.003** | 0.4 |
| | bio09 | 5.787 | 0.001*** | 0.5 | 0.286 | 0.935 | 0.03 | 8.2 | 0.007** | 0.4 |
| | bio07 | 0.543 | 0.703 | 0.05 | 1.592 | 0.154 | 0.2 | 2.9 | 0.109 | 0.1 |
| | prec06 | 4.065 | 0.005** | 0.3 | 1.084 | 0.329 | 0.1 | 3.3 | 0.074 | 0.2 |
| Conditional (Geography+Climate) | PC1 | 27.975 | 0.001*** | 2.4 | 2.528 | 0.051 | 0.3 | 541.2 | 0.001*** | 26.4 |
| | PC2 | 3.026 | 0.021* | 0.3 | 1.971 | 0.085 | 0.2 | 3.7 | 0.056 | 0.2 |
| | PC3 | 1.522 | 0.176 | 0.1 | 0.589 | 0.699 | 0.1 | 0.1 | 0.731 | 0.006 |
| Conditional (Climate+ Genetics) | Longitude | 1.989 | 0.091 | 0.2 | 1.455 | 0.209 | 0.2 | 80.9 | 0.001*** | 3.9 |
| | Latitude | 11.622 | 0.001*** | 1.0 | 4.046 | 0.005** | 0.4 | 106.7 | 0.001*** | 5.2 |
| | Altitude | 8.504 | 0.001*** | 0.7 | 0.333 | 0.88 | 0.04 | 0.250 | 0.62 | 0.01 |

注：边际测试包括所有变量，而条件测试则只考虑所选变量的变化。

The marginal test includes all variables, while the conditional tests account for variation in the selected variables. *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$

4 讨论

4.1 川滇高山栎与刺叶高山栎的叶片形状和大小变异

我们通过在川滇高山栎和刺叶高山栎种间以及种内各自家系间进行 PCAs 分析(图 3.2, 3.3 和 3.4), 研究了它们叶片形状(对称组分和非对称组分)变异的整体趋势, 并通过事后比较分析检验变异的显著性(表 3.3)。对于川滇高山栎和刺叶高山栎的 PCA 分析(图 3.2A), 我们发现基于对称组分两物种间叶片形状变异主要体现在 PC1 轴上, 而且能被独立区分的个体主要是部分川滇高山栎。这说明川滇高山栎和刺叶高山栎的叶形及其相似, 而且川滇高山栎相比刺叶高山栎, 具有更大的叶形变异。而基于非对称组分, 两物种之间的种间差异较小但显著(图 3.2B 和表 3.3), 这与之前 Liu *et al.* (2018)和 Viscosi (2015)的研究结果相反, 表明非对称组分的变异是不显著的。非对称组分主要受环境的影响, 川滇高山栎广布于高山峡谷地区和江河上游源头的陡坡地带, 在海拔 1700m-4600m 地带均有分布, 而刺叶高山栎生长在低-中海拔(900-3800m)的山坡和悬崖上(Menitskii and Fedorov, 2005; Wu *et al.*, 1999)。因此非对称组分的显著变异可能与它们生长环境的差异有关。我们利用 PCA 分析的 PC1 极值所绘制的转换网格图(图 3.2C), 可以发现川滇高山栎和刺叶高山栎的叶片形状变化趋势相近, 主要体现在叶片基部和叶片的整体宽度上的变化。

对于川滇高山栎和刺叶高山栎种内各自家系间的 PCA 分析, 结果表明, 这两个物种内不同家系在对称组分上存在显著差异, 而在非对称组分上没有组间差异(图 3.3, 3.4 和表 3.3)。具体来说, 在对称组分中, WSP-HDM 和 Tibet 家系叶片分离但部分重叠, 混合个体的叶片则分散在两个家系中。事实上, 不同家系之间的叶形变异主要集中在叶片尖端和基部。对于川滇高山栎, WSP-HDM 家系的叶片绝大多数与 Tibet 家系和混合个体的叶片相似; 对于刺叶高山栎, East 家系的叶片绝大多数与 West 家系和混合个体的叶片相似。川滇高山栎的 WSP-HDM 家系和刺叶高山栎的 East 家系主要由叶柄短、尖端和基部窄的近椭圆形叶组成, 只有少数是叶柄长、尖端和基部宽的近圆形叶。在非对称组分中, 所有个体都不能被区分, PCA 没有提供任何分类信息, 这在之前的几项研究中已经有报道(Liu *et al.*, 2018; Viscosi, 2015)。

对于叶片大小(图3.5, 3.6, 3.7和表3.3), 我们的结果表明川滇高山栎与刺叶高山栎种间以及种内各家系间差异显著, 刺叶高山栎的叶片明显比川滇高山栎的大; 而种内各自的混合个体其叶片大小趋向于其中一个家系, 川滇高山栎的趋向于Tibet家系, 刺叶高山栎的趋向于West家系。叶片大小和形状的变异主要来源于不同的树之间和同一棵树内部, 在树内和树间存在高度的叶形变异, 这是一个非常普遍的现象(Blue and Jensen, 1988; Bruschi *et al.*, 2003)。比如叶片大小、叶脉和叶片轮廓等的变异(Peppe *et al.*, 2011; Viscosi, 2015), 这些变异可能是与植物响应环境异质性的表型可塑性有关,

因此环境的异质性可能是引起川滇高山栎和刺叶高山栎种间,种内叶形变异的一个外在因素。

4.2 川滇高山栎与刺叶高山栎的异速生长模式

异速生长(allometry)意味着大小和形状紧密相连,它可以促进植物有机体对异质环境的适应,占几何形态变异的很大一部分(Klingenberg, 1998)。然而,等距生长(isometry)意味着大小和形状的变化在统计上是独立的(Darroch and Mosimann, 1985)。我们研究发现(图3.8),川滇高山栎的对称组分中存在显著的异速生长关系(随着叶片越来越大,叶形由近圆形到近椭圆形变化);在非对称组分中存在显著的等距关系。刺叶高山栎,无论是在对称组分还是非对称组分中,都存在显著的等距关系。以往的研究指出,异速生长关系可能会随着地理位置的不同而改变(López-Serrano *et al.*, 2005)。然而,在我们的研究中,川滇高山栎的不同家系的叶片对称组分/大小表现出相似的异速生长模式(图3.9),这与其他落叶栎树的报道一致(Liu *et al.*, 2018; Viscosi, 2015)。另外,我们还发现了川滇高山栎中叶片不对称组分/大小的等距关系。在刺叶高山栎不同家系中(图3.10),我们发现不同家系的叶片对称组分/大小表现出相似的异速生长模式;叶片不对称组分/大小表现出与川滇高山栎相似的等速关系。但是在未来还需要在不同类型的树木栖息地中进行测试,来证实我们所测量的叶形/大小的异速和等速关系的保守程度。

4.3 川滇高山栎与刺叶高山栎的物种判别

对于川滇高山栎与刺叶高山栎的物种判别,DA 结果表明 70%以上的川滇高山栎个体可以被正确判别,而刺叶高山栎有 80%左右的个体可以被正确判别(图 3.11)。事实上我们在进行野外采样时,也主要是依靠叶片背面毛的分布情况进行辨别,刺叶高山栎仅叶背中脉 1/2-1/3 被灰黄色星状毛,而川滇高山栎叶背面密被棕黄色薄星状毛和单毛或粉状鳞秕。因此在通过叶片形态对川滇高山栎和刺叶高山栎进行物种辨别的同时,或许还应结合叶片是否有毛、毛的分布等其他特征进行辨别。

对于川滇高山栎和刺叶高山栎种内不同的遗传家系间的鉴别,通过两两比较(图 3.13 和 3.15),我们发现 DA 可以正确地对这两个物种内不同家系中大部分的遗传个体进行分类,其中川滇高山栎的分类比例> 80%,刺叶高山栎 75%左右。这比过去有关落叶栎的叶形判别结果要低, Liu *et al.* (2018)和 Viscosi (2015)的结果表明落叶栎> 95%的个体可以通过叶形特征判别出来。而混合个体的分类比例相对更低(49-68%),更加难以通过叶片形态特征从其遗传混合物中区分出来。这表明,尽管我们的方法在每次迭代都考虑了多个标志点,但仍然很难根据这些标志点将几个形态相似的分类单元区分开来。另外,通过比较川滇高山栎和刺叶高山栎种间和它们各自种内的判别结果,我们发现川滇高山栎种内(> 80%的个体)要比川滇高山栎和刺叶高山栎种间(75%-

80%的个体)的判别结果更好, 而刺叶高山栎种内判别结果相对更差(75%的个体)。这说明川滇高山栎种内叶形变异相对较大, 甚至要大于川滇高山栎和刺叶高山栎种间差异, 而刺叶高山栎种内变异相对较小。

CVA 的结果证实了川滇高山栎和刺叶高山栎各自种内不同的遗传家系间的叶形存在一定的变异, 但混合个体主要介于它们之间(图 3.12 和 3.14)。从转化网格图可以清晰的看出它们的叶形差异主要与叶片的尖端和基部区域有关, 混合个体受两种家系的影响, 其叶片形状介于两个家系之间, 但更趋向于其中一个家系的叶形(川滇高山栎混合个体的叶形更趋向于 WSP-HDM 家系, 而刺叶高山栎混合个体的叶形更趋近于 East 家系)。之前许多报道表明, 遗传上的杂交个体的叶片具有一个中间形态(相对于其亲本物种) (Stephan *et al.*, 2018; Viscosi *et al.*, 2009)。这说明混合个体的叶片形态与其遗传混合物(这指家系)之间存在明显的关系, 它可能是亲本物种形态特征的嵌合体。在本研究中混合个体的叶形更趋向于其中一个家系的叶形, 可能与川滇高山栎和刺叶栎种内不同家系间不对称的基因流有关。在川滇高山栎中 Tibet 家系的基因流向 WSP-HDM 家系的遗传结构; 在刺叶栎中 West 家系的基因流向 East 家系的遗传结构。

4.4 遗传、地理和气候因子对叶形变异的影响

我们的研究表明, 叶片形态的变异受到遗传、地理和气候因素的影响, 但在叶片不同组分中它们扮演了不同的角色, 对叶形变异的重要性存在差异(表3.4和3.5)。对于对称组分, 遗传因素解释了最高比例的变异, PC1和PC2的显著基因型效应表明, 叶片形状可能受中性遗传的调控。在一些模式物种中已经通过QTL分析揭示了种内叶片形状的遗传机制。然而, 值得注意的是, 对于非模式物种, 叶片形状的中性遗传机制仍不清楚, 我们的研究可能在这一课题上提供了新的见解。相比之下, 地理因子解释的变异略低, 而气候对对称组分的解释率是最低的。这可能是由于低可塑性, 或低的环境异质性。环境异质性被认为是表型变异的一个外在来源, 叶片形状的某些变异可能是由于植物对环境的表型可塑性造成的。Abrams (1990)和Jackson (1967)发现, 栎树为了提高对高辐照度和干旱响应, 它的一些叶片形态特征会进行适当的调整。在我们的研究结果中, 一些气候因素, 如bio15和bio09, 显著地解释了叶片形状的一些变异(表3.5)。另外, 考虑到本研究使用的气候数据(来自过去30年)与树种的长世代时间相比, 相对较短, 在较短的时间尺度内, 形态变化可能主要反映了植物的表型可塑性。

对于非对称组分, 变异仅与地理相关(表3.4和3.5), 而遗传和气候效应较低(e.g. Iwata *et al.*, 2002)。强烈的地理效应暗示着地理隔离可能影响了叶片形状分化的过程(Krauze-Michalska and Boratyńska, 2013)。因此, 地理因素可能导致非对称组分的变异。在我们研究的川滇高山栎和刺叶高山栎的叶片中, 非对称组分可能是一个适应性特征, 非对称组分的变异使该物种能够对一系列的生境和海拔做出响应。这些变异对西南地区物种的生存至关重要。然而, 有研究表明, 一些响应环境的基因参与了叶片非对称

变异的遗传过程(Yoshioka *et al.*, 2004); 但是, 在我们的研究中并没有发现这种模式。因此在未来我们还需要进一步的研究, 比如在不同环境下叶片形状适应性的控制实验。

叶片大小作为影响叶片形态的一个重要因素(Gonzalez *et al.*, 2012; Peppe *et al.*, 2011)。我们发现, 无论是否控制其他两种预测因子的影响, 它都与地理, 中性遗传和气候显著相关(表3.4)。其中遗传因素解释了最高比例的叶片大小变异, 在模式物种拟南芥中也发现了这种模式, 表明遗传决定了叶片的二维生长(Kim *et al.*, 1998), 而且某些基因在叶片异位表达时对叶片的形状和大小有深远的影响(Kessler and Sinha, 2004)。此外, 我们还发现当控制了遗传和气候因素的影响后, 地理变量对叶片大小变化的影响显著降低。这表明, 气候对叶片大小的影响可能不仅仅反映了地理因素的单独影响, 而在很大程度上反映了它们与气候或遗传的相互作用。

5 结论与展望

5.1 结论

遗传控制和环境干扰对叶片形态变异的重要性已被广泛研究(Stephan *et al.*, 2018; Tsukaya, 2005), 而我们的研究结合了形态、地理、遗传和气候来实现对叶片形态变异的综合理解。基于多位点基因型进行分类, 利用 GMMs 我们观察到川滇高山栎和刺叶高山栎种间以及两物种内不同家系间叶片形状和大小存在显著的变异, 而且遗传上的混合个体其叶片形状和大小与它们的遗传混合物的叶形紧密相关。另外我们的研究表明, 叶形的变异与遗传和环境因素都有关, 但其主导因子在不同组分上存在差异。具体来说, 叶片的对称组分和叶片大小主要由遗传变异决定, 而叶片的非对称组分只受地理因素的调节。此外, 气候和地理对叶片对称组分和叶片大小的影响也很显著, 而这些与环境相关的形态变异可能是发育不稳定的结果。由于环境对叶形的影响不可忽略, 因此利用叶形作为物种判别的指标需谨慎。我们的研究为川滇高山栎的种植管理提供了必要的信息, 并为该分类单元的生态学和演化提供了新的见解。

5.2 展望

本研究结合了遗传、地理和气候对川滇高山栎和刺叶高山栎叶片形态结构的变异进行了深入的研究, 然而还有一些问题在今后的研究中依然需要解决, 列举如下:

(1) 本研究发现了川滇高山栎和刺叶高山栎叶片对称组分/大小的异速关系, 不对称组分/大小的等距关系。这种生长关系是否普遍存在于其它被子植物中, 未来需要进一步扩大研究, 在不同类型的物种中进行测试, 来证实我们所测量的叶形/大小的异速和等速关系的保守程度。

(2) 本研究使用几何形态学方法研究了叶片形态变异, 并进行物种判别。尽管该方法在分类判别方面的研究已经取得了很大的进步, 但是相比传统的形态学方法, 其优势主要在于对叶形的具体变异趋势进行可视化, 而在物种判别方面的效果与传统的形态学方法相比尚不可知。因此在日后的研究中需要进一步的验证。

(3) 另外, 近几年基于卷积神经网络的深度学习已成为图像识别领域的研究热点。作为一种有效的植物物种自动识别系统, 它主要是基于植物的形态、纹理、颜色等特征的图像分析对植物进行识别分类。它可以自主学习叶片特征减少人工干预, 对于复杂背景叶片图像能排除噪声干扰等, 提高图像识别效率。未来我们计划结合深度学习对多种栎树物种的叶片形态进行研究, 通过叶形特征更好地对近缘物种进行分类识别。但是考虑到近缘物种叶片形态非常相似, 可以使用基于多器官的植物判别方法, 结合其他判别器官进行物种识别, 比如花, 果。

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, 044(001): 143-147.
- [2] 白明, 杨星科, 李静, 王文成. 几何形态学:关于形态定量比较的科学计算工具[J]. 科学通报. 2014, 59(10): 887-894.
- [3] 曾双双. 几何形态在室内设计中的应用研究[D]. 中南林业科技大学, 2014.
- [4] 陈焕镛, 黄成就. 中国植物志 第22卷壳斗榆马尾树科[J]. 科学通报. 1998.
- [5] 程小毛, 李响, 姜永雷, 黄晓霞. 基于AFLP的滇西北玉龙雪山不同海拔川滇高山栎遗传多样性分析[J]. 华中农业大学学报. 2017(1): 28-33.
- [6] 崔西甜, 袁凤辉, 王安志, 关德新, 吴家兵, 金昌杰. 蒙古栎叶片光合作用随叶龄的变化及其与叶片功能性状的关系[J]. 生态学杂志. 2017, 36(11): 3160-3167.
- [7] 杜朋选. 川滇高山栎叶片生理指标和反射光谱对水分胁迫的响应[D]. 中国林业科学研究院, 2011.
- [8] 端木炘. 我国栎属资源的综合利用[J]. 河北林学院学报. 1994(2): 177-181.
- [9] 江慧欣, 王嘉琪, 黄春岩, 王秀伟. 8种绿化树种光合特性及叶片解剖结构比较[J]. 植物研究. 2019, 39(1): 10-16.
- [10] 葛德燕, 夏霖, 吕雪霏, 黄乘明, 杨奇森, 黄建华. 几何形态学方法及其在动物发育与系统进化研究中的应用[J]. 动物分类学报. 2012, 37(2): 46-54.
- [11] 郭素娟, 武燕奇. 板栗叶片解剖结构特征及其与抗旱性的关系[J]. 西北农林科技大学学报. 2018, 46(9): 51-59.
- [12] 郝晓东. 四川卧龙自然保护区川滇高山栎 (*Quercus aquifolioides*) 光合特性研究[D]. 北京林业大学, 2006.
- [13] 贺金生, 王勋陵. 高山栎叶的形态结构及其与生态环境的关系[J]. 植物生态学报. 1994, 18(3): 219-227.
- [14] 黄亚洲. 川滇高山栎组织碳氮代谢与萌生更新能力的关系研究[D]. 西南大学, 2011.
- [15] 黄跃宁, 倪妍妍, 刘建锋, 林永标, 张玉婷, 姚宁, 江泽平. 南移后不同种源栓皮栎幼苗光合生理性状的比较[J]. 林业科学研究. 2019, 32(5): 51-57.
- [16] 乐通潮, 张会儒, 谭芳林. 基于自动分类法的红树植物叶片信息测定[J]. 林业科学. 2014, 50(5): 37-43.
- [17] 李俊清, 郭玉实, 李青, 李渤生. 西藏高山栎类生活史多样性考察报告[J]. 北京林业大学学报. 1995, 18(1): 94-98.
- [18] 李晓兰, 李雪华, 蒋德明, 刘志民, 王红梅, 姬兰柱. 科尔沁沙地22种菊科草本植物叶片形态特征研究[J]. 生态学杂志. 2005(12): 25-29.
- [19] 李逸群. 基于人脸识别的安保系统的设计和实现[D]. 电子科技大学, 2014.
- [20] 李永华. 白刺叶片性状对人工增水的响应[D]. 中国林业科学研究院, 2010.
- [21] 李永华, 卢琦, 吴波, 朱雅娟, 刘殿君, 张金鑫, 靳占虎. 干旱区叶片形态特征与植物响应和适应的关系[J]. 植物生态学报. 2012, 36(1): 88-98.
- [22] 梁红平, 任宪威, 刘一樵. 中国常绿栎类叶表皮毛形态与分类的研究[J]. 植物分类学报. 1990, 28(2): 112-121.
- [23] 刘梦颖, 刘光立. 高山植物全缘叶绿绒蒿叶片形态及解剖结构对海拔的响应[J]. 生态学杂志.

- 2018, 37(1): 35-42.
- [24] 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.
- [25] 刘兴良, 何飞, 樊华, 潘红丽, 李迈和, 刘世荣. 卧龙巴郎山川滇高山栎群落植物叶特性海拔梯度特征[J]. 生态学报. 2013, 33(22): 7148-7156.
- [26] 普春霞, 周浙昆, 罗艳. 中国栎属 (壳斗科) 基于叶表皮及叶结构特征的分支分析[J]. 云南植物研究. 2002, 24(6): 689-698.
- [27] 邱芬, 辛亚龙, 唐军荣, 李斌, 何承忠, 许程, 辛培尧. 不同倍性滇杨叶片解剖结构差异分析[J]. 中南林业科技大学学报. 2017, 37(6): 56-59.
- [28] 任宪威, 徐永椿. 我国栎属 *Quercus* L. 分类与分布[J]. 西藏农牧学院院刊. 1978(1): 39-46.
- [29] 宋佳, 候盟, 鲁四海, 李俊清, 杜芳. 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. 2015, 51(5): 705-710.
- [30] 孙建桐, 孙意凡, 赵然, 季宇寒, 张漫, 李寒. 基于几何形态学与迭代随机圆的番茄识别方法[J]. 农业机械学报. 2019(B07): 22-26.
- [31] 王国严, 徐阿生. 川滇高山栎研究综述[J]. 四川林业科技. 2008, 29(2): 26-32, 37.
- [32] 王凯, 雷虹, 刘建华. 春季辽宁西北部主要绿化树种根叶抗旱生理性状评价[J]. 应用生态学报. 2016, 27(6): 1853-1860.
- [33] 王谢, 张建华. 植物叶片形态学特征全自动提取的难点[J]. 浙江农业科学. 2016, 57(4): 579-582.
- [34] 王玉垚, 张悦, 方剑火, 杜芳. 一种基于候选基因研究树木生态适应的方法——以川滇高山栎为例[J]. 兰州大学学报. 2018, 54(6): 811-816.
- [35] 徐文铎, 何兴元, 陈玮, 闻华. 沈阳城市森林主要树种叶片形态生态特征与生长规律[J]. 应用生态学报. 2006, 17(11): 1999-2005.
- [36] 杨钦周. 中国—喜马拉雅地区硬叶栎林的特点与分类[J]. 植物生态学与地植物学学报. 1990, 14(3): 197-211.
- [37] 杨青松. 栎属高山栎组植物分布区的形成演变及成因探讨[D]. 中国科学院昆明植物研究所. 2008.
- [38] 杨青松, 董有彦, 赵艳. 川滇高山栎不同生态环境叶表皮形态特征比较研究[J]. 云南民族大学学报. 2012, 21(2): 93-97.
- [39] 杨玉坡, 李承彪, 管中天. 四川森林[M]. 中国林业出版社. 1992.
- [40] 于贵瑞, 王秋凤. 植物光合、蒸腾与水分利用的生理生态学[J]. 核农学报. 2010(3): 579.
- [41] 张金谈, 王萍莉. 中国栎属花粉形态研究[J]. 中国科学院大学学报. 1986, 24(5): 362-369.
- [42] Abràmoff M D, Magalhães P J, Ram S J. Image Processing with ImageJ[J]. Biophotonics International. 2004, 11: 36-43.
- [43] Abrams M D. Adaptations and responses to drought in *Quercus* species of North America[J]. Tree Physiology. 1990, 7(1-2-3-4): 227-238.
- [44] Adams D C, Rohlf F J, Slice D E. Geometric morphometrics: Ten years of progress following the 'revolution'[J]. Italian Journal of Zoology. 2004, 71(1): 5-16.
- [45] Amos W, Hoffman J I, Frodsham A, et al. Automated binning of microsatellite alleles: problems and solutions[J]. Molecular Ecology Resources. 2007, 7(1): 10-14.
- [46] Ashburner J, Friston K J. Voxel-Based Morphometry—The Methods[J]. Neuroimage. 2000, 11(6): 805-821.
- [47] Benazzi S, Stansfield E, Kullmer O, Fiorenza L, Gruppioni G. Geometric Morphometric Methods

- for Bone Reconstruction: The Mandibular Condylar Process of Pico della Mirandola[J]. *Anatomical Record*. 2009, 292(8): 1088-1097.
- [48] Beyer H L. Hawth' s Analysis Tools for ArcGIS[Z]. 2004.
- [49] Bittner D, Excoffier L, Largiad è C R. Patterns of morphological changes and hybridization between sympatric whitefish morphs (*Coregonus* spp.) in a Swiss lake: a role for eutrophication?[J]. *Molecular Ecology*. 2010, 19(10): 2152-2167.
- [50] Blue M P, Jensen R J. Positional and seasonal variation in oak (*Quercus*: Fagaceae) leaf morphology[J]. *American Journal of Botany*. 1988, 75(7): 939-947.
- [51] Bookstein F L. Thin-Plate Splines and the Atlas Problem for Biomedical Images[C]. Springer Berlin Heidelberg, 1991.
- [52] Bookstein F L. Biometrics, biomathematics and the morphometric synthesis[J]. *Bulletin of Mathematical Biology*. 1996, 58(2): 313-365.
- [53] Bookstein F L. Landmark methods for forms without landmarks : morphometrics of group differences in outline shape[J]. *Medical Image Analysis*. 1997, 1(3): 225-243.
- [54] Bookstein F L. A hundred years of morphometrics[J]. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*. 1998, 44(1): 7-59.
- [55] Bruschi P, Grossoni P, Bussotti F. Within-and among-tree variation in leaf morphology of *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. natural populations[J]. *Trees*. 2003, 17(2): 164-172.
- [56] Cheverud J M, Richtsmeier J T. Finite-Element Scaling Applied to Sexual Dimorphism in Rhesus Macaque (*Macaca Mulatta*) Facial Growth[J]. *Systematic Zoology*. 1986, 35(3): 381-399.
- [57] Darroch J N, Mosimann J E. Canonical and principal components of shape[J]. *Biometrika*. 1985, 2(2): 241-252.
- [58] Dengler N G, Tsukaya H. Leaf Morphogenesis in Dicotyledons: Current Issues[J]. *International Journal of Plant Sciences*. 2001, 162(3): 459-464.
- [59] Du F K, Meng H, Wang W, Mao K, Hampe A. 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(2): 294-307.
- [60] Dumont E R, Davis J L, Grosse I R, Burrows A M. Finite element analysis of performance in the skulls of marmosets and tamarins[J]. *Journal of Anatomy*. 2011, 218(1): 151-162.
- [61] Durand J M, Bod é è C, Chancerel E, Frigerio J, Vendramin G, Sebastiani F, Buonamici A, Gailing O, Koelewijn H P, Villani F. A fast and cost-effective approach to develop and map EST-SSR markers: oak as a case study[J]. *Bmc Genomics*. 2010, 11(1): 1-13.
- [62] Earl D A, Vonholdt B M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method[J]. *Conservation Genetics Resources*. 2012, 4(2): 359-361.
- [63] Evanno G S, Regnaut S J, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study[J]. *Molecular Ecology*. 2005, 14(8): 2611-2620.
- [64] Fritz M A, Rosa S, Sicard A. Mechanisms Underlying the Environmentally Induced Plasticity of Leaf Morphology[J]. *Frontiers in Genetics*. 2018, 9.
- [65] Geller W K, Smithg N. Leaf and Environmental Parameters Influencing Transpiration: Theory and Field Measurements[J]. *Oecologia*. 1980, 46(3): 308-313.
- [66] Glaubitz J C. 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.
- [67] Gonzalez N, Vanhaeren H, Inz é D. Leaf size control: complex coordination of cell division and expansion[J]. *Trends in Plant Science*. 2012, 17(6): 0-0.

- [68] Graham J H, Raz S, Hel-Or H, Nevo E. Fluctuating asymmetry: methods, theory, and applications[J]. *Symmetry*. 2010, 2: 466-540.
- [69] Gunz P. Using semilandmarks in three dimensions to model human neurocranial shape[D]. Vienna: University of Vienna, 2001.
- [70] Hovenden M J, Schoor J K V. Nature vs nurture in the leaf morphology of Southern beech, *Nothofagus cunninghamii* (Nothofagaceae)[J]. *New Phytologist*. 2004, 161(2): 585-594.
- [71] Hovenden M J, Schoor J K V. The response of leaf morphology to irradiance depends upon altitude of origin in *Nothofagus cunninghamii*[J]. *New Phytologist*. 2006, 169(2): 291-297.
- [72] Huang L J, Liu Y C. Understanding diversity in leaf shape of Chinese *Sagittaria* (Alismataceae) by geometric tools[J]. *Pakistan journal of botany*. 2014, 46(6): 1927-1934.
- [73] Hulce D, Li X, Snyderleiby T, Johathan L C S. GeneMarker® Genotyping Software: Tools to Increase the Statistical Power of DNA Fragment Analysis[J]. *Journal of Biomolecular Techniques Jbt*. 2011, 22(Suppl): S35.
- [74] Iwata H, Nesumi H, Ninomiya S, Takano Y, Ukai Y. The Evaluation of Genotype × Environment Interactions of Citrus Leaf Morphology Using Image Analysis and Elliptic Fourier Descriptors[J]. *Japanese Journal of Breeding*. 2002, 52(4): 243-251.
- [75] Jackson L W. Effect of Shade on Leaf Structure of Deciduous Tree Species[J]. *Ecology*. 1967, 48(3): 498-499.
- [76] Janes J K, Miller J M, Dupuis J R, Malenfant R M, Gorrell J C, Cullingham C I, Andrew R L. The K=2 conundrum[J]. *Molecular Ecology*. 2017, 26(14): 3594-3602.
- [77] Kessler S, Sinha N. Shaping up: the genetic control of leaf shape[J]. *Current Opinion in Plant Biology*. 2004, 7(1): 65-72.
- [78] Kim G T, Tsukaya H, Uchimiya H. The ROTUNDIFOLIA3 gene of *Arabidopsis thaliana* encodes a new member of the cytochrome P-450 family that is required for the regulated polar elongation of leaf cells[J]. *Genes and Development*. 1998, 12: 2381-2391.
- [79] Kimmerle E H, Jantz R L. *Secular Trends in Craniofacial Asymmetry Studied by Geometric Morphometry and Generalized Procrustes Methods*[M]. Springer US, 2005.
- [80] Klingenberg C P. Heterochrony and allometry: the analysis of evolutionary change in ontogeny[J]. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 1998, 79: 123-173.
- [81] Klingenberg C P. Evolution and development of shape: integrating quantitative approaches[J]. *Nature Reviews Genetics*. 2010, 11(9): 540.
- [82] Klingenberg C P. MorphoJ: An Integrated Software Package for Geometric Morphometrics[J]. *Molecular Ecology Resources*. 2011, 11(2): 353-357.
- [83] Klingenberg C P, Barluenga M, Meyer A. Shape Analysis of Symmetric Structures: Quantifying Variation among Individuals and Asymmetry[J]. *Evolution*. 2002, 56(10): 1909-1920.
- [84] Klingenberg C P, McIntyre G S. Geometric morphometrics of developmental instability: analyzing patterns of fluctuating asymmetry with Procrustes methods[J]. *Evolution*. 1998, 52(5): 1363-1375.
- [85] Klingenberg C. Analyzing Fluctuating Asymmetry with Geometric Morphometrics: Concepts, Methods, and Applications[J]. *Symmetry*. 2015, 7(2): 843-934.
- [86] Ködliker-Ott U M, Blows M W, Hoffmann A A. Are wing size, wing shape and asymmetry related to field fitness of *Trichogramma* egg parasitoids [J]? *Oikos*. 2003, 100(3): 563-573.
- [87] Kouwenberg L L R, Kürschner W M, Mcelwain J C. Stomatal Frequency Change Over Altitudinal Gradients: Prospects for Paleoaltimetry[M]. 2007, 66: 215-241.
- [88] Krauze-Michalska E, Boratyńska K. European geography of *Alnus incana* leaf variation[J]. *Giornale Botanico Italiano*. 2013, 147(3): 601-610.

- [89] Kremer A, Dupouey J L, Deans J D, Munro R, Steinhoff S, Badeau V. Leaf morphological differentiation between *Quercus robur* and *Quercus petraea* is stable across western European mixed oak stands[J]. *Annals of Forest Science*. 2002, 59(7): 777-787.
- [90] Krieger, Jonathan D. A Protocol for the Creation of Useful Geometric Shape Metrics Illustrated with a Newly Derived Geometric Measure of Leaf Circularity[J]. *Applications in Plant Sciences*. 2014, 2(8): 1400009.
- [91] Legendre P, Anderson M J. Distance-based redundancy analysis: testing multi-species responses in multi-factorial ecological experiments[J]. *Ecological Monographs*. 1999, 69: 1-24.
- [92] Lele S, Richtsmeier J T. Euclidean distance matrix analysis: A coordinate-free approach for comparing biological shapes using landmark data[J]. *American Journal of Physical Anthropology*. 1991, 86(3): 415-427.
- [93] Li J Q, Guo Y S, Romane F. Environmental Heterogeneity and Population Variability of Sclerophyllous Oaks (*Quercus Sec. suber*) in East Himalayan Region[J]. *中国林学(英文版)*. 2000.
- [94] Liu Y, Li Y, Song J, Zhang R, Yan Y, Wang Y, Du F K. Geometric morphometric analyses of leaf shapes in two sympatric Chinese oaks: *Quercus dentata* Thunberg and *Quercus aliena* Blume (Fagaceae)[J]. *Annals of Forest Science*. 2018, 75(4): 90.
- [95] Lohmann G P. Eigenshape analysis of microfossils: A general morphometric procedure for describing changes in shape[J]. *Journal of the International Association for Mathematical Geology*. 1983, 15(6): 659-672.
- [96] López-Serrano F R, Garc á-Morote A, Andr és-Abell án M, Tendero A, Cerro DA. Site and weather effects in allometries: A simple approach to climate change effect on pines[J]. *Forest Ecology & Management*. 2005, 215(1-3): 270.
- [97] Macleod N. Generalizing and Extending the Eigenshape Method of Shape Space Visualization and Analysis[J]. *Paleobiology*. 1999, 25(1): 107-138.
- [98] Malhotra A, Thorpe R S. The dynamics of natural selection and vicariance in the Dominican anole: patterns of within-island molecular and morphological divergence[J]. *Evolution*. 2000, 54(1): 245.
- [99] Mardia K V, Bookstein F L, Moreton I J. Statistical Assessment of Bilateral Symmetry of Shapes[J]. *Biometrika*. 2005, 92(1): 249-250.
- [100] Mcdonald P G, Fonseca C R, Westoby J M O. Leaf-Size Divergence along Rainfall and Soil-Nutrient Gradients: Is the Method of Size Reduction Common among Clades[J]? *Functional Ecology*. 2003, 17(1): 50-57.
- [101] Mcelwain J C. Climate-independent paleoaltimetry using stomatal density in fossil leaves as a proxy for CO₂ partial pressure[J]. *Geology*. 2004, 32(12): 1017-1020.
- [102] Miljković D, Stefanović M, Orlović S, Neđić M S, Stojnić S. Wild cherry (*Prunus avium* (L.) L.) leaf shape and size variations in natural populations at different elevations[J]. *Alpine Botany*. 2019(3).
- [103] Miller J C, Tanksley S D. RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*[J]. *Theoretical & Applied Genetics*. 1990, 80(4): 437-448.
- [104] Mitteroecker P, Gunz P. Advances in Geometric Morphometrics[J]. *Evolutionary Biology*. 2009, 36(2): 235-247.
- [105] Nagamitsu T, Shimizu H, Aizawa M, Nakanishi A. An admixture of *Quercus dentata* in the coastal ecotype of *Q. mongolica* var. *crispula* in northern Hokkaido and genetic and environmental effects on their traits[J]. *Journal of Plant Research*. 2019.
- [106] Naimi B. 2013. Usdm: Uncertainty analysis for species distribution models. R package version, 1.
- [107] Nicotra A B, Leigh A, Boyce C K, Jones C S, Niklas K J, Royer D L, Tsukaya H. The evolution

- and functional significance of leaf shape in the angiosperms[J]. *Functional Plant Biology*. 2011, 38(7): 535.
- [108] Nobel P S. *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*[J]. *Quarterly Review of Biology*. 2009, 54(4): 507-543.
- [109] O'Higgins P. The study of morphological variation in the hominid fossil record: biology, landmarks and geometry[J]. *Journal of Anatomy*. 2000, 197(1): 103-120.
- [110] O'Higgins P, Cobb S N, Fitton L C, Groning F, Phillips R, Liu J, Fagan M J. Combining geometric morphometrics and functional simulation: an emerging toolkit for virtual functional analyses[J]. *Journal of Anatomy*. 2011, 218(1): 3-15.
- [111] Oksanen J, Blanchet F G, Kindt R, Legendre P, Minchin P, O'Hara R B, Simpson G, Solymos P, Stevens M, Wagner H. *vegan: Community ecology package*[J]. R package version. 2017.
- [112] Peppe D J, Royer D L, Cariglino B, Rapson G, Wing S L, Wright I J. Sensitivity of leaf size and shape to climate: global patterns and paleoclimatic applications[J]. *New Phytologist*. 2011, 190(3): 724-739.
- [113] Perez K E, King-Heiden T C. *Geometric Morphometrics as a Tool to Evaluate Teratogenic Effects in Zebrafish (Danio rerio)*[M]. *Teratogenicity Testing*, 2018.
- [114] Pérez-Pérez J M, Serrano-Cartagena J, Micol J L. Genetic Analysis of Natural Variations in the Architecture of *Arabidopsis thaliana* Vegetative Leaves[J]. *Genetics*. 2002, 162(2): 893-915.
- [115] Porth I, Garnier-Géré P, Klápště J, Scotti-Saintagne C, El-Kassaby Y A, Burg K, Kremer A. Species-specific alleles at a beta-tubulin gene show significant associations with leaf morphological variation within *Quercus petraea* and *Q. robur* populations[J]. *Tree Genetics & Genomes*. 2016, 12(4): 81.1-81.13.
- [116] Pritchard J K, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data [J]. *Genetics*. 2000, 155(2): 945-959.
- [117] Radwan J, Watson P J, Farslow J. Procrustean analysis of fluctuating asymmetry in the bulb mite *Rhizoglyphus robini* Claparede (Astigmata: Acaridae)[J]. *Biological Journal of the Linnean Society*. 2003, 80(3): 499-505.
- [118] Raufaste N, Rousset F. Are partial Mantel tests adequate[J]? *Evolution*. 2001, 55(8): 1703-1705.
- [119] Rayfield E J. Finite element analysis and understanding the biomechanics and evolution of living and fossil organisms[J]. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*. 2007, 35(1): 541-576.
- [120] Roderick M L, Barry S L, Noble I R. A framework for understanding the relationship between environment and vegetation based on the surface to volume ratio of leaves[J]. *Functional Ecology*. 2000, 14(4): 423-437.
- [121] Rohlf F J. Bias and error in estimates of mean shape in geometric morphometrics[J]. *Journal of Human Evolution*. 2003, 44(6): 665-683.
- [122] Rohlf F J, Brookstein F L. *Proceedings of the Michigan Morphometrics Workshop*[J]. *Systematic Biology*. 1992, 41(3): 392-395.
- [123] Rohlf F J, Slice D. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks[J]. *Systematic Biology*. 1990, 39(1): 40-59.
- [124] Rohlf J F. Statistical power comparisons among alternative morphometric methods[J]. *American Journal of Physical Anthropology*. 2000, 111(4): 463-478.
- [125] Rosenberg N A. *distruct: a program for the graphical display of population structure*[J]. *Molecular Ecology Resources*. 2004, 4(1): 137-138.
- [126] Royer D L, McElwain J C, Wilf A P. Sensitivity of Leaf Size and Shape to Climate within *Acer Rubrum* and *Quercus Kelloggii*[J]. *New Phytologist*. 2008, 179(3): 808-817.

- [127] Sanfilippo P G, Cardini A, Hewitt A W, Crowston J, Mackey D A. Optic disc morphology - Rethinking shape[J]. *Progress in Retinal & Eye Research*. 2009, 28(4): 227-248.
- [128] Savriama Y, Klingenberg C P. Beyond bilateral symmetry: geometric morphometric methods for any type of symmetry[J]. *Bmc Evolutionary Biology*. 2011, 11(1): 280.
- [129] Schuepp P H. Tansley Review No. 59 Leaf boundary layers[J]. *New Phytologist*. 1993, 125(3): 477-507.
- [130] Slice D E. Landmark Coordinates Aligned by Procrustes Analysis Do Not Lie in Kendall's Shape Space [J]. *Systematic Biology*. 2001, 50(1): 141-149.
- [131] Small C G. The Statistical Theory of Shape[J]. *Journal of the American Statistical Association*. 1998, 93(441).
- [132] Smouse P E, Long J C, Sokal R R. Multiple Regression and Correlation Extensions of the Mantel Test of Matrix Correspondence[J]. *Systematic Zoology*. 1986, 35: 627-632.
- [133] Stephan J M, Teeny P W, Vessella F, Schirone B. Oak morphological traits: Between taxa and environmental variability[J]. *Flora*. 2018, 243: 32-44.
- [134] Tseng Z J, Stynder D. Mosaic functionality in a transitional ecomorphology: skull biomechanics in stem Hyaeninae compared to modern South African carnivorans[J]. *Biological Journal of the Linnean Society*. 2011, 102(3): 540-559.
- [135] Tsukaya H. Leaf shape: genetic controls and environmental factors[J]. *International Journal of Developmental Biology*. 2005, 49(5-6): 547-555.
- [136] Tucić B, Budečević S, Manitašević S J, Vuleta A, Klingenberg C P. Phenotypic plasticity in response to environmental heterogeneity contributes to fluctuating asymmetry in plants: first empirical evidence[J]. *Journal of Evolutionary Biology*. 2017, 31(2): 197-210.
- [137] 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.
- [138] Ueno S, Tsumura Y. Development of ten microsatellite markers for *Quercus mongolica* var. *crispula* by database mining[J]. *Conservation Genetics*. 2008, 9(4): 1083-1085.
- [139] Vähä J P, Primmer C R. Efficiency of model-based Bayesian methods for detecting hybrid individuals under different hybridization scenarios and with different numbers of loci[J]. *Molecular Ecology*. 2006, 15(1): 63-72.
- [140] 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.
- [141] Viscosi V, Cardini A. Leaf Morphology, Taxonomy and Geometric Morphometrics: A Simplified Protocol for Beginners[J]. *Plos One*. 2011, 6: e25630.
- [142] Viscosi V, Lepais O, Gerber S, Fortini P. Leaf morphological analyses in four European oak species (*Quercus*) and their hybrids: A comparison of traditional and geometric morphometric methods[J]. *Plant Biosystems*. 2009, 143(3): 564-574.
- [143] Viscosi V, Loy A, Fortini P. Geometric morphometric analysis as a tool to explore covariation between shape and other quantitative leaf traits in European white oaks. In: Nimis P.L., Vignes L.R. (Eds.) *Tools for identifying biodiversity: progress and problems*[J]. EUT Edizioni Università di Trieste. 2010: 257-261.
- [144] Vogel S. Leaves in the lowest and highest winds: temperature, force and shape[J]. *New Phytologist*. 2009, 183(1): 13-26.
- [145] Wang C, Guo J, Hein S, Wang H, Zhao Z, Zeng, J. Foliar morphology and spatial distribution in

- five-year-old plantations of *Betula alnoides*[J]. Forest Ecology and Management. 2019, 432: 514-521.
- [146] Wei L, Li Y F, Zhang H, Liao W J. Variation in morphological traits in a recent hybrid zone between closely related *Quercus liaotungensis* and *Q. mongolica* (Fagaceae)[J]. Journal of Plant Ecology. 2015, 8(2): 224-229.
- [147] Wu D, Chen Y, Fu L, You M, Han J, Liu Z. QTL mapping of flag leaf traits in common wheat using an integrated high-density SSR and SNP genetic linkage map[J]. Euphytica. 2016, 208(2): 337-351.
- [148] Yamanaka N, Ninomiya S, Hoshi M, Tsubokura Y, Yano M, Nagamura Y, Sasaki T, Harada K. An Informative Linkage Map of Soybean Reveals QTLs for Flowering Time, Leaflet Morphology and Regions of Segregation Distortion[J]. DNA Research. 2001, 8(2): 61-72.
- [149] Yoshioka Y, Iwata H, Ohsawa R, Ninomiya S. Analysis of Petal Shape Variation of *Primula sieboldii* by Elliptic Fourier Descriptors and Principal Component Analysis[J]. Annals of Botany. 2004, 94(5): 657-664.
- [150] Younker J L, Ehrlich R. Fourier Biometrics: Harmonic Amplitudes as Multivariate Shape Descriptors[J]. Systematic Zoology. 1977, 26(3): 336-342.
- [151] Zhang L, Luo T. Advances in ecological studies on leaf lifespan and associated leaf traits[J]. Acta Phytoecol Sinica. 2004, 28(6): 844-852.

附录 A 所有种群中有 SSR 数据与叶形数据的个体数统计表

| 物种 | 序号 | 种群 | 具体地点 | 个体数 | 现有数据 |
|-------|----|------|-------------------------|-----|------------|
| 川滇高山栎 | 1 | DFY | 四川道孚银恩乡县道两侧 | 11 | 叶形和 SSR 数据 |
| | 2 | DFL | 四川道孚龙灯乡 | 10 | 只有 SSR 数据 |
| | 3 | DFG | 四川道孚龙灯乡至葛卡乡途中, 303 省道右侧 | 8 | 只有 SSR 数据 |
| | 4 | HS | 四川黑水二咕噜村 | 11 | 只有 SSR 数据 |
| | 5 | JCD | 四川金川县杜岗山 | 9 | 只有 SSR 数据 |
| | 6 | JCK | 四川金川县卡撒乡东北安宁乡左拐 | 14 | 只有 SSR 数据 |
| | 7 | LX | 四川理县米亚罗 | 10 | 只有 SSR 数据 |
| | 8 | MEKS | 四川马尔康梭磨乡 | 10 | 只有 SSR 数据 |
| | 9 | MEKD | 四川马尔康二郎脚沟 | 20 | 只有 SSR 数据 |
| | 10 | MEKR | 四川马尔康松岗镇 | 7 | 叶形和 SSR 数据 |
| | 11 | MX | 四川茂县三龙乡杂木岭 | 13 | 叶形和 SSR 数据 |
| | 12 | PW | 四川平武县黄土梁 | 10 | 只有 SSR 数据 |
| | 13 | RT | 四川壤塘小伊里村 | 9 | 只有 SSR 数据 |
| | 14 | WC | 四川汶川雁门乡萝卜寨 | 11 | 只有 SSR 数据 |
| | 15 | XJX | 四川小金县东南 15km, 下磨子村 | 10 | 叶形和 SSR 数据 |

通过几何形态学方法研究川滇高山栎和刺叶高山栎的叶片形态变异

| | | | | |
|----|-----|--------------------------------------|----|------------|
| 16 | XJD | 四川小金县达维乡夹金山山坡 | 13 | 叶形和 SSR 数据 |
| 17 | KDC | 四川康定县城至中古村途 | 11 | 叶形和 SSR 数据 |
| 18 | KDZ | 四川康定县折多塘村 | 10 | 只有 SSR 数据 |
| 19 | KDD | 四川康定县折多山，距雅江 60-70km | 6 | 只有 SSR 数据 |
| 20 | YJH | G318 四川省理塘至雅江途，红龙乡附近，距剪子弯垭口直线距离 22km | 22 | 叶形和 SSR 数据 |
| 21 | YJX | G318 雅江西 10km 车程 | 15 | 叶形和 SSR 数据 |
| 22 | LJB | 云南丽江白沙村 | 21 | 只有 SSR 数据 |
| 23 | LJ | 云南丽江高山植物园 | 16 | 只有 SSR 数据 |
| 24 | LJX | 云南丽江雄古景区 | 10 | 只有 SSR 数据 |
| 25 | XG | 云南香格里拉普达岗，中甸弥里塘 | 12 | 只有 SSR 数据 |
| 26 | ZD | 云南香格里拉高山植物园 | 13 | 只有 SSR 数据 |
| 27 | DQ | 云南德钦县鱼归道班至县城一带 | 17 | 只有 SSR 数据 |
| 28 | DRR | 四川省得荣县去日龙乡山上山顶山坡 | 38 | 叶形和 SSR 数据 |
| 29 | DRX | 四川省得荣县至乡城县翻过第一个山口 | 30 | 叶形和 SSR 数据 |
| 30 | DCK | 四川省稻城县卡龙至赤土乡之间 | 24 | 叶形和 SSR 数据 |
| 31 | DCE | 四川省稻城县俄洛村至波瓦山之间 | 21 | 叶形和 SSR 数据 |
| 32 | XCD | 四川省乡城县，乡城至得荣方向，距乡城县城约 16km 车程 | 20 | 叶形和 SSR 数据 |

附录

| | | | | |
|----|------|--|----|------------|
| 33 | XCW | 四川省乡城县至稻城县途无名山朝阳沟至马熊够一带 | 18 | 叶形和 SSR 数据 |
| 34 | XCR | 四川省乡城县然乌温泉至小雪山道班之间，距小雪山道班约 3-5km | 21 | 叶形和 SSR 数据 |
| 35 | DMX | 沙德乡至明希乡途中（四川） | 16 | 只有 SSR 数据 |
| 36 | YYP | 盐源县至平川垭口附近（四川） | 23 | 只有 SSR 数据 |
| 37 | BYZ | 西藏 | 15 | 只有 SSR 数据 |
| 38 | DZC | 西藏 | 14 | 只有 SSR 数据 |
| 39 | GB | 西藏 | 13 | 只有 SSR 数据 |
| 40 | KDG | 西藏 | 15 | 只有 SSR 数据 |
| 41 | LL | 西藏 | 15 | 只有 SSR 数据 |
| 42 | LZ | 西藏 | 15 | 只有 SSR 数据 |
| 43 | MKD | G318 西藏芒康县登巴村 4km 处，左贡县至芒康县途中 | 16 | 叶形和 SSR 数据 |
| 44 | MKR | G318 西藏芒康县如美镇多美村多美组附近山坡(拉乌山) | 22 | 叶形和 SSR 数据 |
| 45 | MKZ | G214 西藏芒康县至云南德钦县，出芒康县 20km，孜许村 5km，红拉山山坡 | 19 | 叶形和 SSR 数据 |
| 46 | BZL | G214 过白茫雪山第二垭口，距奔子栏乡约 40km 车程 | 20 | 只有 SSR 数据 |
| 47 | SJLS | 西藏色季拉山东 | 7 | 只有 SSR 数据 |
| 48 | MLJ | 西藏米林县甲格村至日旭村一带 | 20 | 叶形和 SSR 数据 |
| 49 | MLL | 西藏米林县里龙乡对面河谷及 S306 两旁 | 39 | 叶形和 SSR 数据 |

通过几何形态学方法研究川滇高山栎和刺叶高山栎的叶片形态变异

| | | | | |
|----|-----|-----------------------------------|----|------------|
| 50 | MLP | 西藏米林县派镇雅鲁藏布江大峡谷景区西 3km | 28 | 叶形和 SSR 数据 |
| 51 | LZA | 西藏米林县林芝机场对面（米林县至派镇途） | 26 | 叶形和 SSR 数据 |
| 52 | BMS | 西藏波密县索通村附近 | 23 | 叶形和 SSR 数据 |
| 53 | BM | 西藏波密城西 | 16 | 叶形和 SSR 数据 |
| 54 | BMZ | G318 西藏波密县中坝村中坝兵站 | 12 | 叶形和 SSR 数据 |
| 55 | BMR | G318 西藏波密县至然乌镇方向出县城约 15km | 23 | 叶形和 SSR 数据 |
| 56 | GBX | G318 西藏工布江达县县城西约 10km，县城至江达乡之间 | 30 | 叶形和 SSR 数据 |
| 57 | LZD | 西藏隆子县斗玉乡至加玉乡陇站(兵站) | 21 | 叶形和 SSR 数据 |
| 58 | CYX | 西藏察隅县县城至下察隅方向出县城约 15km 雄久村西拖拉卡组附近 | 13 | 叶形和 SSR 数据 |
| 59 | CY | 西藏察隅古玉乡 | 12 | 只有 SSR 数据 |
| 60 | CBG | 西藏察隅县慈巴沟自然保护区对面山坡 | 22 | 叶形和 SSR 数据 |
| 61 | SLX | 四川省阿坝州茂县三龙乡 | 10 | 只有叶形数据 |
| 62 | TZW | 四川省阿坝州黑水县塔子窝 | 14 | 只有叶形数据 |
| 63 | LBZ | 四川省阿坝州汶川县萝卜寨 | 11 | 只有叶形数据 |
| 64 | LMS | 四川省阿坝州理县喇嘛寺 | 11 | 只有叶形数据 |
| 65 | SMX | 四川省阿坝州马尔康市梭磨乡 | 12 | 只有叶形数据 |
| 66 | GYQ | 四川省阿坝州马尔康市观音桥镇 | 17 | 只有叶形数据 |

附录

| | | | | |
|----|------|--------------------------------|----|--------|
| 67 | XYL | 四川省阿坝州壤塘县小伊里村 | 14 | 只有叶形数据 |
| 68 | SWJ | 四川省阿坝州金川县撒瓦脚乡 | 13 | 只有叶形数据 |
| 69 | LDX | 四川省阿坝州道孚县龙灯乡 | 15 | 只有叶形数据 |
| 70 | GJS | 四川省阿坝州小金县高家山 | 14 | 只有叶形数据 |
| 71 | JJS | 四川省阿坝州小金县达维镇夹金山 | 18 | 只有叶形数据 |
| 72 | WNXS | 四川省甘孜州康定县万年雪山观景台附近 | 9 | 只有叶形数据 |
| 73 | ND | 四川省凉山州木里县纳地 | 11 | 只有叶形数据 |
| 74 | GSL | 四川省攀枝花市盐边县格萨拉生态旅游区 | 4 | 只有叶形数据 |
| 75 | LZJC | 西藏自治区林芝市林芝机场 | | 只有叶形数据 |
| 76 | LLX | 西藏自治区林芝市米林县里龙乡 | 12 | 只有叶形数据 |
| 77 | BYZ | 西藏自治区林芝市八一镇（八一隧道口附近） | 15 | 只有叶形数据 |
| 78 | PZ | 西藏自治区林芝市米林县派镇（雅鲁藏布大峡谷国家级自然保护区） | 13 | 只有叶形数据 |
| 79 | KDG | 西藏自治区林芝市巴宜区卡定沟 | 15 | 只有叶形数据 |
| 80 | LLZ | 西藏自治区林芝市巴宜区鲁朗镇 | 21 | 只有叶形数据 |
| 81 | TM | 西藏自治区林芝市波密县通麦 | 4 | 只有叶形数据 |
| 82 | BMX | 西藏自治区林芝市波密县县城 | 12 | 只有叶形数据 |
| 83 | CY | 西藏自治区林芝市察隅县县城 | 10 | 只有叶形数据 |

通过几何形态学方法研究川滇高山栎和刺叶高山栎的叶片形态变异

| | | | | | |
|-------|----|------|---------------------|----|------------|
| | 84 | BLLK | 西藏自治区林芝市察隅县察瓦龙乡白隆拉卡 | 4 | 只有叶形数据 |
| | 85 | GZ | 云南省香格里拉市香格里拉高山中植物园 | 10 | 只有叶形数据 |
| | 86 | KFQ | 云南省香格里拉市香格里拉开发区 | 10 | 只有叶形数据 |
| | 87 | LZ | 云南省丽江市丽江高山植物园 | 13 | 只有叶形数据 |
| | 88 | GXJQ | 云南省丽江市雄古景区 | 10 | 只有叶形数据 |
| | 89 | HCZ | 云南省大理市鹤庆县火车站后山 | 10 | 只有叶形数据 |
| 刺叶高山栎 | 1 | SMX | 四川马尔康县梭磨乡 | 9 | 叶形和 SSR 数据 |
| | 2 | BQX | 四川越西县板桥乡 | 14 | 叶形和 SSR 数据 |
| | 3 | LTS | 四川汉源县龙塘山 | 13 | 叶形和 SSR 数据 |
| | 4 | FTZ | 四川宝兴县蜂桶寨 | 14 | 叶形和 SSR 数据 |
| | 5 | SLX | 四川茂县三龙乡 | 12 | 叶形和 SSR 数据 |
| | 6 | LBZ | 四川汶川县萝卜寨 | 10 | 叶形和 SSR 数据 |
| | 7 | JZG | 四川九寨沟县 | 16 | 叶形和 SSR 数据 |
| | 8 | ZGF | 贵州威宁县最高峰 | 19 | 叶形和 SSR 数据 |
| | 9 | CBLC | 四川康县长坝林场 | 13 | 叶形和 SSR 数据 |
| | 10 | JFS | 甘肃鸡峰山 | 14 | 叶形和 SSR 数据 |
| | 11 | SMJQ | 甘肃麦积区石门景区 | 10 | 叶形和 SSR 数据 |

附录

| | | | | |
|----|-----|------------|----|------------|
| 12 | WLD | 陕西略阳县五龙洞 | 20 | 叶形和 SSR 数据 |
| 13 | JJY | 甘肃东岔镇九江峪 | 10 | 叶形和 SSR 数据 |
| 14 | ZJH | 陕西勉县张家河林场 | 21 | 叶形和 SSR 数据 |
| 15 | XLS | 四川南江县香炉山 | 15 | 叶形和 SSR 数据 |
| 16 | XHS | 陕西太白县小华山 | 21 | 叶形和 SSR 数据 |
| 17 | LC | 陕西西乡县龙池林场 | 21 | 叶形和 SSR 数据 |
| 18 | HHG | 陕西眉县红河谷 | 15 | 叶形和 SSR 数据 |
| 19 | TJS | 陕西周至县铁甲树 | 9 | 叶形和 SSR 数据 |
| 20 | ZQ | 陕西户县朱雀森林公园 | 8 | 叶形和 SSR 数据 |
| 21 | MWS | 陕西镇安县木王山 | 20 | 叶形和 SSR 数据 |
| 22 | NBL | 陕西柞水县牛背梁 | 22 | 叶形和 SSR 数据 |
| 23 | NGS | 陕西岚皋县南宫山 | 20 | 叶形和 SSR 数据 |
| 24 | BDX | 陕西平利县八道乡 | 11 | 叶形和 SSR 数据 |
| 25 | TSX | 陕西平利县天书峡 | 21 | 叶形和 SSR 数据 |
| 26 | PTS | 湖北竹溪县偏头山 | 15 | 叶形和 SSR 数据 |
| 27 | BSY | 湖北神农架柏杉园 | 22 | 叶形和 SSR 数据 |
| 28 | DJP | 湖北神农架断疆坪 | 22 | 叶形和 SSR 数据 |

通过几何形态学方法研究川滇高山栎和刺叶高山栎的叶片形态变异

| | | | | |
|----|------|--------------|----|------------|
| 29 | TMS | 湖南张家界天门山 | 12 | 叶形和 SSR 数据 |
| 30 | TDY | 湖北神农架土地垭 | 20 | 叶形和 SSR 数据 |
| 31 | DLL | 湖北秭归县大老岭 | 20 | 叶形和 SSR 数据 |
| 32 | JLT | 湖北秭归县九岭头 | 20 | 叶形和 SSR 数据 |
| 33 | WDS | 湖北十堰市武当山 | 20 | 叶形和 SSR 数据 |
| 34 | WKS | 江西武宁县钨矿山 | 15 | 叶形和 SSR 数据 |
| 35 | SQS | 江西玉山县三清山 | 9 | 叶形和 SSR 数据 |
| 36 | TM | 西藏波密县通麦 | 5 | 叶形和 SSR 数据 |
| 37 | CYXC | 西藏察隅县县城 | 20 | 叶形和 SSR 数据 |
| 38 | BLLK | 西藏察隅县白隆拉卡 | 15 | 叶形和 SSR 数据 |
| 39 | GZ | 云南省香格里拉高山植物园 | 5 | 叶形和 SSR 数据 |
| 40 | XGJQ | 云南省丽江雄谷景区 | 5 | 叶形和 SSR 数据 |
| 41 | GSL | 四川盐边县格萨拉 | 9 | 叶形和 SSR 数据 |
| 42 | SS | 四川九龙县顺山 | 9 | 叶形和 SSR 数据 |
| 43 | SWJ | 四川金川县撒瓦脚 | 11 | 叶形和 SSR 数据 |
| 44 | GDS | 四川康定县郭达山 | 11 | 叶形和 SSR 数据 |
| 45 | KRC | 四川丹巴县开绕村 | 10 | 叶形和 SSR 数据 |

| | | | | |
|----|-----|----------|---|------------|
| 46 | ELM | 四川泸定县二郎庙 | 8 | 叶形和 SSR 数据 |
|----|-----|----------|---|------------|
