

分类号

密级

UDC



北京林业大学

专业学位硕士学位论文

基于微卫星分子标记的川滇和刺叶高山栎的种群和景观遗传学研究

Population and Landscape Genetic Study of *Quercus aquifolioides* Rehd. Et
Wils. and *Quercus spinosa* David ex Franch. Based on Microsatellite
Molecular Markers

王天瑞

指导教师 杜芳

学 院 林学院

专业学位类型 林业

领 域 名 称 生态学

二〇二〇年 八 月 八 日

本论文研究工作受国家自然科学基金项目(项目编号:41671039;
项目名称:气候变化与物种进化历史持续性研究:以高山栎为例)
的资助,在此表示感谢!

独创性声明

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

签 名： 王天瑞 日 期： 2020年8月8日

关于学位论文使用授权的说明

本人完全了解北京林业大学有关保留、使用学位论文的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位属北京林业大学；学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的纸质版和电子版，允许学位论文被查阅、借阅和复印；学校可以将学位论文的全部或部分内容公开或编入有关数据库进行检索，可以允许采用影印、缩印或其他复制手段保存、汇编学位论文。

签 名： 王天瑞 导师签名： 栾 日 期： 2020年8月8日

摘要

川滇高山栎(*Quercus aquifoliodes* Rehd. Et Wils.)和刺叶高山栎(*Quercus spinosa* David ex Franch.)为壳斗科栎属常绿硬叶植物,广泛分布于我国西南地区的高海拔地区,对严酷的生态环境有着较强的适应能力,但关于其适应的遗传机制研究较少。本研究利用15对微卫星分子标记对川滇高山栎60个种群,共计996个个体和刺叶高山栎46个种群,共计661个个体进行了种群及景观遗传研究。首先,我们对川滇高山栎和刺叶高山栎的遗传结构和遗传多样性进行研究,结果表明川滇高山栎和刺叶高山栎在其各自的分布区内分化为两个明显的遗传谱系:川滇高山栎在其分布区内分化为位于西藏东部的Tibet谱系和位于喜马拉雅-横断山脉/川西高原的HDM-WSP谱系,刺叶高山栎在其分布范围内分化为位于中国西部横断山脉地区的West谱系和位于秦岭山脉及中国东部地区的East谱系。其次,基于GenAlEx的遗传多样性分析结果表明川滇高山栎种群的遗传多样性高于刺叶高山栎,且在川滇高山栎种群中,HDM-WSP谱系的遗传多样性高于Tibet谱系;在刺叶高山栎种群中,East谱系的遗传多样性高于West谱系。基于Arlequin的分层分子方差分析结果表明川滇高山栎和刺叶高山栎种群的遗传分化主要存在于种群内,且刺叶高山栎种群内的遗传分化水平要明显高于川滇高山栎种群内的遗传分化水平。基于Migrate-n的基因流分析结果表明基因流的方向是从川滇高山栎向刺叶高山栎。最后,通过多变量统计分析和非线性模型去探究川滇高山栎和刺叶高山栎种群的遗传变异对环境梯度的响应模式,结果表明川滇高山栎和刺叶高山栎两个谱系对环境梯度表现出不同的响应机制。对川滇高山栎Tibet谱系而言,地理变量是影响其遗传变异最主要的因素;而对HDM-WSP谱系而言,气候变量是影响其遗传变异最主要的因素,且季节性降水(bio15)是对该谱系遗传变异影响最重要的气候变量。对刺叶高山栎East谱系而言,地理变量是影响其遗传变异最主要的因素;而对West谱系而言,气候变量是影响其遗传变异最主要的因素,且季节性降水(bio15)和六月份降水量(prec06)是对该谱系遗传变异影响最重要的气候变量。本研究通过对川滇高山栎和刺叶高山栎种群的遗传特征(遗传结构、遗传多样性等)的研究,比较两个物种在其各自的分布范围内的遗传模式,为更加深入的挖掘两个物种的生态适应及制定相应的保护策略提供理论依据,为其他森林物种的种群及景观遗传方面的研究提供参考。

关键词: 川滇高山栎, 刺叶高山栎, 核微卫星, 种群遗传学, 景观基因组学

Population and Landscape Genetic Study of *Quercus aquifolioides* Rehd. Et Wils. and *Quercus spinosa* David ex Franch. Based on Microsatellite Molecular Markers

Master Candidate: Wang Tianrui

(Forestry)

Directed by Du Fang

Abstract

Quercus aquifolioides Rehd. Et Wils. and *Quercus spinosa* David ex Franch. are evergreen oak species belonging to *Quercus* section in Fagaceae, which are widely distributed in the high altitude range in southwestern China and adapt to harsh ecological environments. In this thesis, 15 pairs of microsatellite molecular markers were used to conduct a population and landscape genetic study on 996 individuals from 60 *Q. aquifolioides* populations and 661 individuals from 46 *Q. spinosa* populations. Firstly, we studied the genetic structure and genetic diversity of *Q. aquifolioides* and *Q. spinosa*. The results showed that *Q. aquifolioides* and *Q. spinosa* differentiated into two distinct genetic lineages in their respective distribution areas: *Q. aquifolioides* differentiated into the Tibet lineage distributed in the eastern of Tibet and HDM-WSP lineage distributed in Himalaya-Hengduan Mountains-Western Sichuan Plateau; *Q. spinosa* differentiated into the West lineage distributed in the Hengduan Mountains region in western China and the East lineage distributed in the Qinling Mountains and eastern China. Secondly, the results showed that the the genetic diversity of HDM-WSP lineage is higher than that of Tibet lineage in *Q. aquifolioides* populations, and in *Q. spinosa* populations, the genetic diversity of East lineage is higher than that of West lineage based on GenAlEx. In addition, the genetic differentiation of *Q. aquifolioides* and *Q. spinosa* populations mainly exists within populations, and the genetic differentiation level of *Q. spinosa* populations are significantly higher than that of *Q. aquifolioides*. The results of gene flow analysis indicated that the historical gene flow occurred predominantly from *Q. aquifolioides* into *Q. spinosa* based on Migrate-n. Finally, multivariate statistical analysis and non-linear models showed different response mechanisms to environmental gradients in two lineages of *Q. aquifolioides* and *Q. spinosa*, respectively. In the Tibet lineage, geographic variables are the most important factors affecting genetic variation, while in the HDM-WSP lineage, climatic variables are the most important factors affecting genetic variation, precipitation seasonality (bio15) is the most important climatic variable affecting the genetic variation in HDM-WSP lineage. In the East lineage, geographic variables are the most important factors affecting genetic variation; while in the West lineage, climate variables are the most important factors affecting genetic variation, seasonal precipitation seasonality (bio15) and precipitation during the wet season (prec06) are the most important climatic variables affecting the genetic variation in West lineage. In this study, we studied the genetic characteristics (genetic structure, genetic diversity, etc.) of the populations of *Q. aquifolioides* and *Q.*

spinosa, compared the genetic adaptation mechanisms of the two species within their respective distribution ranges. This study provides theoretical basic for a more in-depth study of the adaptation of two species and the formulation of corresponding conservation strategies, and provides a reference for the research on the population and landscape genetics of other forest species.

Key words: *Quercus aquifolioides*, *Quercus spinosa*, nuclear microsatellite, population genetics, landscape genomics

目录

1 引言	1
1.1 生态适应	1
1.1.1 生态适应研究概述	1
1.1.2 种群和景观遗传学概述	2
1.1.3 生态适应在树木中的应用	3
1.1.4 景观基因组学的数据分析方法	5
1.2 川滇高山栎和刺叶高山栎的研究概况	7
1.2.1 壳斗科栎属简介	7
1.2.2 川滇高山栎、刺叶高山栎简介	7
1.2.3 川滇高山栎和刺叶高山栎研究进展	8
1.3 本文的研究内容、研究目的及意义	9
1.3.1 研究内容	9
1.3.2 研究目的和意义	9
2 材料与方法	11
2.1 样品采集	11
2.2 实验方法	18
2.2.1 基因组总 DNA 的提取	18
2.2.2 基因组总 DNA 电泳、质量检测及稀释分装	19
2.2.3 核微卫星引物筛选	19
2.3 测序结果处理	21
2.4 种群遗传学分析	21
2.4.1 遗传结构分析	21
2.4.2 遗传多样性分析	22
2.4.3 分层分子方差分析	22
2.4.4 基因流分析	22
2.5 景观基因组学分析	23
2.5.1 气候因子提取	23
2.5.2 遗传变异对环境的响应模式	23
3 研究结果	25
3.1 川滇高山栎与刺叶高山栎的种群遗传学分析	25
3.1.1 遗传结构分析	25
3.1.2 遗传多样性及遗传分化分析	29
3.1.3 基因流分析	32
3.2 川滇高山栎与刺叶高山栎的景观基因组学分析	33
3.2.1 气候因子筛选	33
3.2.2 Mantel 检验	33
3.2.3 冗余分析	38
3.2.4 梯度森林分析	41

3.2.5 广义相异建模分析.....	43
4 讨论	47
4.1 川滇高山栎与刺叶高山栎的遗传结构与遗传多样性.....	47
4.1.1 遗传结构	47
4.1.2 遗传多样性.....	48
4.2 川滇高山栎与刺叶高山栎的遗传变异应对环境梯度响应机制.....	48
5 结论与展望	51
5.1 结论.....	51
5.2 展望.....	51
参考文献	53
个人简介	61
导师简介	63
获得成果目录清单	65
致谢	67

1 引言

1.1 生态适应

1.1.1 生态适应研究概述

快速的气候变化正在改变从基因到生态系统各个层次生物区系的命运,影响着生物区系的多样性和物种的可持续发展(de Lafontaine *et al.*, 2018; Reisinger, 2014)。应对变化的环境物种主要通过迁移到其他适宜生存的地区或者是对本地环境产生新的适应得以幸存(Davis *et al.*, 2001; Parmesan, 2006; Parry *et al.*, 2007),对变化的环境形成局部区域性适应(local adaptation)或生态适应(Ecological adaptation; Savolainen *et al.*, 2007; Sork *et al.*, 2010)。例如,冰期时期冰盖的不断扩大和恶劣的气候条件导致许多高纬度物种迁移到更合适的较低纬度的环境中,也就是这些物种在冰期的避难所;当气候回暖之后,这些物种又重新定殖到以前不宜居住的区域(de Lafontaine *et al.*, 2018)。一些化石的记录,包括花粉和化石遗骸,已经为物种过去的分布提供了直接的证据(Jackson *et al.*, 1997; Huntley and Birks, 1983; Ritchie, 1987),对现存种群遗传多样性空间模式的分析(Hewitt, 2004; 2000)以及利用生态位建模预测物种过去的分布模式(Svenning *et al.*, 2011; Nogués-Bravo, 2009)也为生物物种过去的迁移提供了间接的证据。但对于固着生长,生活史周期长的物种,例如树木而言,其基因型只能通过种子或者花粉进行有限的传播,因此这些物种的局地适应环境变化的能力显得尤为关键(Hughes *et al.*, 2008; Kremer *et al.*, 2012; Sork *et al.*, 2013)。

在分子水平上对自然选择进行探究是研究生态适应的基础,根据分子遗传变异对大多数进化历史学(demography)推论的一个关键假设是遗传标记是选择性中性的,在这样的研究中,自然选择被排除为当前进化模式的必然结果(de Lafontaine *et al.*, 2018)。之前的研究都是通过同质园和交互移植实验来评估表型可塑性的程度和表型性状的遗传变异(Shaw and Etterson, 2012; Leimu and Fischer, 2008; Savolainen *et al.*, 2007)。该方法依赖于在田间试验中量化的适应性表型性状,与生物体对当地环境的适应性有关,因此是研究生态适应最可靠、直接的信息,但不适用于过去气候变化的研究,因为过去的表型和环境不再可用于实验操作(Tiffin and Ross-Ibarra, 2014)。下一代测序技术的发展使仅依靠基因型而非表型的种群基因组学方法成为可能,从而去研究自然种群中局部适应的分子印记(Tiffin and Ross-Ibarra, 2014; Barrett and Hoekstra, 2011; Luikart *et al.*, 2003),此外,下一代测序技术可以以较低的成本发现物种的遗传变异(Andrews *et al.*, 2016; Davey *et al.*, 2011; Ellegren, 2014),这些方法正越来越多地用于扫描基因组以寻找可能包含功能变异的候选基因区域,而这些变异形成了对当地环境进行选择的性状(Haasl and Payseur, 2016)。

1.1.2 种群和景观遗传学概述

(1) 种群遗传学概述

种群遗传学(Population genetics)是研究植物种群中等位基因的分布和变化的科学,作为遗传学的一门分支学科,其宗旨是基于遗传学的基本理论,采用数学、统计学或者其他方法,对生物种群的遗传结构以及种群在世代间变化的规律进行研究(Wright, 1931)。

种群遗传学的科学研究始于达尔文提出的自然选择理论,该理论揭示了生物的进化规律,并从宏观的角度解释了生物物种间的相互作用关系,强调了微小变异的累积对物种进化的意义。上世纪是种群遗传学形成的时期。Haldane (1926)奠定了自然选择的数学基础,并首次研究了特定群体中等位基因频率变化的趋势和速率,突变、迁移与自然选择的联合作用。Fisher (1930)证明了生物种群中产生的遗传变异在一定程度上可能会使生物种群中个体的生存几率大大增加。但是这些理论研究,涉及复杂的数学理论推导,并且没有实验支持这些理论的成立。直到后来,研究人员以果蝇为实验材料,在理论上和实验上统一了自然选择学说和孟德尔遗传学,开创了应用种群遗传学基本理论解析有关种群遗传实验数据的方法(Theodosius, 1954)。之后种群遗传学理论的普及与应用研究又得到进一步深入,Mayr (1942)基于种群遗传学理论去对分类学进行研究,提出在地理变异和地理隔离的情况下新种产生的模型;Stebbins (1949)基于种群遗传学理论对植物的进化问题进行了解释。随着生物化学技术的不断进步,使得基于生物同源大分子序列变异研究种群遗传的变异规律成为可能, Kimura 等(1964)在此基础上提出无限等位基因突变模型; Kimura (1968)提出中性突变的随机漂移学说以及 Kimura 等(1971)提出的无限位点突变模型,这些理论把生物大分子的结构变化和种群遗传学理论有效地结合,使得初步形成分子种群遗传学理论体系。

我国种群遗传学的引进始于 20 世纪 60 年代,发展于 90 年代至今。研究内容涵盖种群的遗传平衡定律、种群的遗传结构、种群在世代演变中的各种进化力量(如突变、重组、连锁不平衡、选择等)对植物种群遗传结构的影响、种群内遗传进化的方式(中性或者适应性进化)、种群间的遗传分化和遗传变异模式、种群的基因流等。另外,植物种群遗传理论与方法在植物育种方面也取得了重要的进展。例如,植物驯化和林木种子园建立的“奠基者效应”,人工选择对植物种群中多态性的影响作用等(徐刚标, 2009)。

由于种群本身固有的生物学特性,种群遗传学的研究主要关注以下几个方面:

(1) 种群的遗传特征:包括等位基因的遗传平衡法则,单基因座上的复等位基因、性连锁基因以及多基因座的种群连锁不平衡等。(2) 影响植物种群遗传结构的进化因子:主要包括植物的交配体系、自然选择、遗传漂变、突变和迁移。植物的交配体系可以决定植物种群遗传变异的特点,交配体系的不同会致使植物种群的后代产生不同的种群遗传结构;而作为进化因子的自然选择和遗传漂变,则会影响植物种群中等位基因

的固定或者丢失；突变和迁移可为种群的基因库中引入新的等位基因，因此和选择以及遗传漂变一样，具有类似的种群遗传效应。(3) 植物适应性性状进化：植株的生存力、繁殖率、交配能力和寿命等，这些都是与植物进化密切相关的性状，这些性状可影响植物种群的直接进化潜力。(4) 分子进化与植物物种形成机制：研究生物的进化（微进化）规律是植物种群遗传学研究的根本目标。得益于现代分子生物学技术的快速提高和发展，使用分子数据遗传信息、构建分子进化树、探讨植物分子进化和物种形成是目前植物种群遗传学研究的主要内容之一(徐刚标, 2009)。

(2) 景观遗传学概述

植物学家和早期的生物地理学家认为，整个景观中生物（分类单元）的分布方式存在差异，这些差异受不同时间尺度驱动力的影响，研究人员将分子遗传学工具与生态生物地理学和景观生态学原理相结合，这种方法可以对一个或多个物种（或种群）的等位基因频率进行空间映射，并随后将这些模式与当前景观相关联，这代表了一种“景观遗传学方法”(Rissler, 2016; Manel *et al.*, 2003)。景观遗传学是研究物种微进化过程与景观特征之间相互作用的学科，分子遗传工具的改进以及与统计工具(统计学，最大似然法和贝叶斯方法等)的结合促进了景观遗传学领域的兴起(Storfer *et al.*, 2007; Holderegger *et al.*, 2006; Manel *et al.*, 2003)。

物种在长期的适应过程中由于受到来自环境梯度的选择压力，可能会发生一些适应性的遗传变异(Hoffmann *et al.*, 2008; Savolainen *et al.*, 2007)，而识别这些适应性的遗传变异能够加深对物种适应性遗传机制的认识，同时也能提高我们对物种适应潜力的理解(Manel *et al.*, 2003; Rellstab *et al.*, 2015)。景观遗传学研究的一个重要方向就是去鉴定景观中自然种群中的适应性遗传变异模式，从而发现驱动物种适应过程的环境因素(Manel *et al.*, 2003)。

传统的种群基因组学方法(Wright and Gaut, 2004)通过比较种群内或种群间的遗传分化(F_{ST})，旨在寻找超出中性预期（往往由平衡或多样性选择造成）的遗传分化特异性位点(Beaumont *et al.*, 2004; Beaumont *et al.*, 1996; Hohenlohe *et al.*, 2010; Excoffier *et al.*, 2009)。然而，这些方法需要大量的样本并且不考虑环境异质性，因此可能会产生许多假阳性(Eveno *et al.*, 2008)。新近发展的景观基因组学是景观遗传学一门独立的分支学科，利用基因型-环境互作关系(Genotype-Environment Associations, GEAs)从基因组的水平去研究物种的遗传变异与景观特征之间的相互作用(Holderegger *et al.*, 2006; Sork *et al.*, 2010)，从而去揭示物种生态适应的分子机理(de Lafontaine *et al.*, 2018; Fitzpatrick *et al.*, 2015; Sork, 2017)。景观基因组学通过遗传多样性与环境因子的关联分析可明确量化环境变化引起的遗传变异在基因组水平的响应，比经典的种群遗传学方法更进一步。

1.1.3 生态适应在树木中的应用

树木的世代时间长，具有丰富的生活史和基因组特征，此外，树木种群经常占据

高度异质的环境，导致种群内以及种群间的高遗传变异及独特的生态适应模式(Sork *et al.*, 2013)。国际上关于树木生态适应的研究在 2010 年前主要基于种群基因组学的方法，通过比较种群内或种群间的遗传分化(F_{ST})鉴定特异性位点，并认为这些位点受生态适应的影响。Wright 和 Gaut (2004)综述了植物种群基因组学和适应性进化的研究，作者聚焦植物种群重点讨论了选择检测的一些理论和统计问题，认为现有的关于植物种群遗传学研究并未考虑植物种群的进化历史，并表明之前研究中关于植物基因组中平衡选择和正选择的研究可能与真实情况不符，提出未来关于植物分子种群遗传学研究需要改进控制种群进化历史的理论方法。Hohenlohe 等(2010)在此基础上，从种群基因组学的关键概念和方法入手进一步研究了自然种群受选择的特征，研究表明自然选择塑造个体、种群和物种之间遗传变异的模式，并且在整个基因组中差异很大，不适当的实验或分析方法可能无法检测到选择或错误地识别选择的特征。作者概述了种群基因组学的概念框架，将基因组模式与进化过程相关联，并确定了选择研究中要考虑的主要生物学因素。

2010 年以后由种群基因组学发展而来的景观基因组学，其主要通过将环境数据与遗传位点相关联来鉴定环境变量与物种遗传变异的关系，以此来揭示物种生态适应的机制。例如，Sork 等(2016)对分布在加利福尼亚州的落叶栎树(*Quercus lobata*)局地适应的机制进行鉴定，发现 5 个单核苷酸多态性位点(single nucleotide polymorphisms, SNP)涉及与与芽/开花以及温度胁迫相关的基因，为加州栎自然种群中与气候相关参考基因的空间分化选择和适应性遗传变异的地理结构提供了有力的证据。Gugger 等(2017)对分布在夏威夷范围内的一种生态和经济上重要的树种金合欢(*Acacia koa*)，在改变的气候环境中的管理和保护进行探讨，研究利用基因分型测序(genotyping by sequencing, GBS)技术从 311 个个体中鉴定出超过 11,000 个 SNP，通过 GEAs 的方法鉴定出金合欢的空间遗传结构与年平均降雨量存在显著关联，表明了鉴定以及量化环境变量在塑造种群遗传变异中的重要作用。Martins 等(2018)对分布在墨西哥高海拔地区的栎树(*Quercus rugosa*)，使用基因分型测序(genotyping by sequencing, GBS)技术，研究鉴定出 97 个遗传分化特异性 SNP 与气候变量呈现显著的相关关系，基于贝叶斯方法和多元模型的研究发现该物种遗传变异的空间格局与季节性降水和地理距离相关，表明景观基因的方法为物种保护和资源管理策略提供了有力的工具。

我国对于树木的种群遗传学研究主要集中在谱系地理方面(Qiu *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012)。近两年来研究者逐渐开始重视环境因子对物种遗传变异的影响，开始了应用景观基因组学的方法去研究树木的生态适应的进程。Xia 等(2018)结合线粒体和核基因组分析研究环境和地理对油松(*Pinus tabulaeformis*)种群结构的影响，结果表明油松遗传分化特异性 SNP 具有显著的环境隔离的模式，研究丰富了我们对于影响中国北方植物分类群遗传变异分布的复杂进化进程的理解。王玉垚等(2018)研究了一种基于候选基因研究树木生态适应的方法，该方法通过数据库网站下载与研究目的相关基因，

接着进行引物及标签序列设计、聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)批量扩增、混样测序(pool-sequencing)等一系列操作,可极大节约建库成本,为研究物种的生态适应机理提供了重要的依据。Gao 等(2020)对亚热带分布的森林树种麻栎(*Quercus acutissima*)分布区的 27 个种群进行了简化基因组测序,GEAs 的结果表明麻栎的遗传分化特异性 SNP 与降水量显著相关,麻栎东部、西部种群之间的基因流受到自然选择和生态适应的限制,从而导致了部分遗传位点和表型的适应性分化,该研究对于理解森林树种遗传变异的产生和维持机理有重要意义。Du 等(2020)研究分布于中国西南高海拔地区的川滇高山栎(*Quercus aquifolioides*)物种的生态适应机制,GEAs 的结果揭示该物种横断山分支和西藏分支的遗传变异分别与环境(降水)和地理(经纬度)相关联,非适应性风险分析的预测表明横断山分支对横断山地区未来的降水变量有更好的适应潜力。该研究解析了气候变化背景下,地理、气候因子对川滇高山栎种群生态适应模式的影响。

1.1.4 景观基因组学的数据分析方法

景观基因组方法通过分析环境与基因数据之间的相关关系来揭示物种生态适应的分子机理(de Lafontaine *et al.*, 2018; Fitzpatrick and Keller, 2015; Rellstab *et al.*, 2015; Sork, 2017)。通常利用广义线性混合模型(Coop *et al.*, 2010; Frichot *et al.*, 2013; Joost *et al.*, 2007); 多变量统计分析(Manthey *et al.*, 2015; van Strien *et al.*, 2014; Lasky *et al.*, 2012; Sork *et al.*, 2016)和非线性模型(Ellis *et al.*, 2012; Ferrier *et al.*, 2007)等多种方法探讨物种的遗传变异与环境梯度之间的关联关系。

(1) 广义线性混合模型

在研究物种的遗传变异时,通常需要考虑环境异质性的影响,等位基因频率与环境相关联的遗传位点鉴定方法基于广义线性混合模型,可通过鉴别与环境梯度相关联的遗传变异位点可潜在地揭示物种的适应模式,目前使用较广泛的方法是 BayEnv(Coop *et al.*, 2010)、潜在因素混合模型(Latent Factor Mixed Models, LFMM; Frichot *et al.*, 2013)以及空间分析算法(Spatial analysis method, SAM; Joost *et al.*, 2007)。

BayEnv 是一种贝叶斯方法,该方法估计种群间等位基因频率协方差的经验模型,然后将该模型用作检验个体遗传位点的零假设模型,以此来计算每个遗传位点的等位基因频率与环境变量的相关性(Coop *et al.*, 2010)。然而该方法在分析时也有一定的限制,即只能依次逐个地测试遗传位点和环境变量的关系(Sork *et al.*, 2013)。

LFMM 是一种基于贝叶斯马尔科夫链蒙特卡罗(Bayesian Markov chain Monte Carlo, MCMC)算法的潜在因素混合模型,可检测预测因子和等位基因频率之间的关联,同时估计由模型混杂效应(confounding effects)导致的潜在因素(latent factors),包括由于共同的进化历史或遗传变异背景导致的种群分化(Frichot *et al.*, 2013)。该方法的一大优势是通过潜在因素引入种群结构,可避免模型混杂效应导致的潜在因素对计算结果的干扰,有较低的假阳性(Frichot *et al.*, 2013)。

SAM 是在空间分析的基础上结合地理信息系统 (GIS), 环境变量和分子数据来检测自然选择特征的一种方法(Joost *et al.*, 2007; 2008)。这种方法的贡献不仅在于可识别受选择的位点, 而且还可以建立有关可能施加选择压力的生态因素的假设。SAM 提供了动态的分析表来对结果进行展示和处理, 同时使用似然比和 Wald 检验来评估由逻辑回归函数计算的回归系数的重要性。

(2) 多变量统计分析

多变量统计方法与基于环境关联的分析方法不同, 这类方法通常不鉴定基于特定位点适应性效应的分子印记, 而是通过将环境梯度与空间遗传结构结合在一起, 来测试环境梯度与整个种群遗传结构之间的多元关系, 以此来为物种适应提供新的见解。目前, 使用较多的是 Mantel 检验(van Strien *et al.*, 2014)和冗余分析(Redundancy Analyses, RDA; Legendre and Legendre, 2012)。

Mantel 检验即距离隔离(Isolation by Distance, IBD; van Strien *et al.*, 2014)和环境隔离(Isolation by Environment, IBE; Manthey *et al.*, 2015), 通过计算成对的遗传分化 (F_{ST})来进行遗传分化矩阵与地理/气候距离矩阵之间的比较(Diniz-Filho *et al.*, 2013), 该方法是评测驱动种群空间结构的地理/气候距离和遗传变异关系最常用的一种方法(Mantel, 1967)。然而 Mantel 检验仅限于分析的数据在分类单元中为成对距离的情况。此外, 与其他同类检测方法相比, Mantel 检验的效率不高, 可能会造成假阳性(Harmon *et al.*, 2010)。

RDA 是一种约束排列的方法, 该方法将遗传数据与特定的环境因子整合进行多元建模, 可在特定的环境梯度上讨论遗传变异的分布情况(Sork *et al.*, 2016; Lasky *et al.*, 2012; Sork *et al.*, 2010)。此外, RDA 作为简单线性回归的多元模拟, 可用于评估自变量矩阵(环境变量)的影响, 假阳性较低(Slatkin, 1993)。

(3) 非线性模型

上述分析方法都是基于线性或者单峰模型去分析环境梯度对物种遗传变异的影响, 而遗传变异应对环境梯度的线性分析可能存在一定的误差。这时一些环境梯度和遗传变异的非线性关联的分析方法应运而生, 使用最广泛的方法包括梯度森林(Gradient Forests, GF; Ellis *et al.*, 2012)和广义相异模型(Generalized Dissimilarity Modelling, GDM; Ferrier *et al.*, 2007)。

在物种和群落分布的生态分析中, 人们往往感兴趣于它们对所生存的环境梯度的回应, 随机森林(random forests)可以评估个体物种的预测重要性, 并指出梯度丰度变化的位置(Breiman, 2001)。GF 是一种非参数机器学习回归树方法, 作为随机森林的延伸, 通过整合多个物种随机森林的结果来分析大量潜在的预测变量, 并得到各个预测变量解释的遗传变异比例, 这些比例代表沿着环境梯度每一个预测变量组成的变化(Ellis *et al.*, 2012; Gugger *et al.*, 2017)。GF 直接模拟遗传变异的组成变化, 可探索空间、环境和等位基因变量的非线性关联(Ellis *et al.*, 2012)。

GDM 是基于距离矩阵回归的非线性延伸，用于对成对的地理位置之间生物多样性的空间变异进行建模((Ferrier *et al.*, 2007)，通过拟合样条来确定沿环境梯度的等位基因组成变化的比率，并基于重要性百分比来解释模型的拟合程度(Gugger *et al.*, 2017)。

另外，新近发展起来的非适应性风险分析方法(Risk of Non-Adaptedness, RONA; Rellstab *et al.*, 2016)可预测物种在局地未来气候状况下的“适应性”(即适应能力)。通过对种群的等位基因频率与现在环境梯度进行简单线性回归，基于此回归曲线预测种群在未来环境梯度下的等位基因频率，并挑选出和未来环境梯度最相关的遗传位点，比较现在和未来等位基因频率之间的差异并评估物种对未来环境梯度的适应潜力。最新的研究报道中，把物种在预测的未来环境梯度下的适应潜力的方法精确地定义为“future risk of nonadaptedness”即 f-RONA。但对于那些由于当前的气候改变而减少的物种来说，当前气候的非适应性风险可能比未来气候显得更为重要，基于此原理，研究人员通过对 RONA 的进一步扩展，开发了“current risk of nonadaptedness”即 c-RONA，来预测物种在当前环境梯度下的适应潜力(Borrell *et al.*, 2020)。

1.2 川滇高山栎和刺叶高山栎的研究概况

1.2.1 壳斗科栎属简介

壳斗科在整个北半球的亚热带森林和温带森林中是特别重要的成分之一，壳斗科的物种是森林生态系统中的关键物种，可以提供重要的林产品，例如木制品，纤维或食品等，具有重要的经济意义(Kremer *et al.*, 2012)。栎属(*Quercus* L.)是壳斗科中最大的属，具有较高的物种多样性，主要分布于北美、欧洲、亚洲和南美部分地区，是全球分布最为广泛的森林树种之一(Hubert *et al.*, 2014; Kremer *et al.*, 2012; Willis *et al.*, 1968)。根据不同的分类系统，栎属植物包含 300 - 600 种，在北半球亚热带森林和温带森林中是最具多样性和生态重要性的属之一，也是陆地生物多样性的主要驱动力之一(Denk *et al.*, 2018)。最新的栎属分子系统分为八个组，分别为中间栎组，本都栎组，活栎组，白栎组，红栎组，青冈栎组，冬青栎组，麻栎组，共 423 种(Denk *et al.*, 2018)。栎属由于其对不同的生境有广泛的适应能力，因此为物种局地适应的进化机制提供了有用的见解(Kremer, 2016; Petit *et al.*, 2013)。中国的栎类资源丰富，包含 120 多种，广泛分布的栎属植物大约有 35 种，是栎属植物的分布中心地之一(Denk *et al.*, 2018)。基于栎属系统发育树的推断得知高山栎组植物是栎亚属中最原始的类群，并且在栎亚属中也是分布最广泛的常绿硬叶栎属植物(周浙昆, 1992)。

1.2.2 川滇高山栎、刺叶高山栎简介

(1) 形态特性

川滇高山栎(*Quercus aquifolioides* Rehd. et Wils.)为壳斗科(Fagaceae)栎属(*Quercus* L.)高山栎组(Sect. *Heterobalanus* (Oerst.) Menits)植物，常绿乔木或灌木，生于干旱阳

坡或山顶(王国严和徐阿生, 2008)。叶片椭圆形或倒卵形, 幼叶两面被黄棕色腺毛, 老叶背面被黄棕色薄星状毛和单毛或粉状鳞秕; 坚果卵形或长卵形。花期 5-6 月, 果期 9-10 月(陈焕镛和黄成就, 1998)。刺叶高山栎(*Quercus spinosa* David ex Franch.)为壳斗科(Fagaceae)栎属(*Quercus* L.)植物, 常绿乔木或灌木。叶片倒卵形或椭圆形, 幼叶两面被腺状单毛和束毛; 老叶常为全缘, 在叶背中脉下段被灰黄色星状毛; 坚果卵形至椭圆形。花期 5-6 月, 果期翌年 9-10 月(陈焕镛和黄成就, 1998)。

(2) 地理分布及生长习性

川滇高山栎分布于中国西南地区, 常生长在海拔 2000-4900 米的山坡向阳处或高山松林下, 是高山栎组植物中海拔分布较高的种类(周浙昆等, 2003)。刺叶高山栎通常分布于中国中部和西南部的高海拔地区, 缅甸也有分布; 生长在海拔 900-3600 米的山坡和山谷森林中, 也常常分布于岩石裸露的峭壁上, 适应能力较强(徐永椿和任宪威, 1975)。

(3) 主要价值

川滇高山栎具有发达的根系和旺盛的萌蘖能力, 且由于其分布在高海拔地区, 对环境的抗干扰能力和生态适应能力较强(端木炘, 1994)。刺叶高山栎是常绿阔叶树种, 具有较强的萌芽性, 通过对其进行一定程度的整形修剪可作为园林绿化树种达到园林观赏的要求; 此外, 刺叶高山栎在园林绿化中可以和其他树种进行合理的搭配来进行绿化(吴义强, 2015)。

1.2.3 川滇高山栎和刺叶高山栎研究进展

2000 年以前, 关于川滇高山栎和刺叶高山栎的研究主要集中在生物量的研究上。近些年, 针对川滇高山栎和刺叶高山栎系统演化和生物地理方面进行了系统的研究。马长乐(2006)通过对栎属高山栎组的化石记录以及分子系统学的研究来探讨高山栎组的系统发育关系与生物地理学, 研究表明青海-西藏高原的持续隆升在很大程度上决定了高山栎组植物的现有分布模式。黄晓霞等(2015)针对川滇高山栎对海拔梯度的生理特征的响应进行研究, 结果表明川滇高山栎的叶片生理指标随着海拔梯度的升高而呈现出非线性的变化, 最适生长区域在海拔 3050 米左右, 海拔过高或者过低都不利于该物种的生长, 研究为更好地保护川滇高山栎提供了很好的理论基础。Meng 等(2017)基于叶绿体 DNA 片段和核微卫星的分子标记技术, 探讨高山栎物种对喜马拉雅-横断山脉抬升的回应, 研究表明高原环境受青藏高原的隆升过程的影响而发生了改变, 高山栎在这个过程中逐渐适应了改变的环境, 形成了冷热区分的两个谱系。Du 等(2017)对中国西南部横断山生物多样性热点地区的建群树种川滇高山栎进行研究, 表明该地区过去的环境变化可能已经导致了物种内部的辐射多样化, 为横断山生物多样性热点地区的地质历史提供了详细的见解。王玉垚(2018)基于 65 对干旱及缺氧候选基因对川滇高山栎进行了生态适应的研究, 在川滇高山栎物种分布范围内鉴别

出两个明显的谱系，并且研究表明两个谱系对环境梯度有着不同的生态适应机制。

Feng 等(2017)重建了刺叶高山栎的进化历史，表明刺叶高山栎的分化主要是对环境适应的结果，并发现该物种在冰期可能存在多重避难所，研究强调了地质构造以及气候改变对物种异域分化以及局地适应的影响。Ju 等(2019)基于特异长度扩增片段测序(Specific Length Amplified Fragment Sequencing, SLAF-seq)的分子标记对 38 个刺叶高山栎野生种群的遗传结构和进化历史进行研究，表明在中新世(Miocene)晚期，刺叶高山栎分化为西部谱系和东部谱系；在末次盛冰期(Last Glacial Maximum, LGM)，两个谱系受第四纪(Quaternary)冰期气候波动的影响在四川盆地又进行了持续不对称的基因交流，研究有助于更好地了解第四纪(Quaternary)气候波动在刺叶高山栎分布中发挥的作用。

1.3 本文的研究内容、研究目的及意义

1.3.1 研究内容

本研究在对中国川滇高山栎和刺叶高山栎现有种群大规模实地考察并采样的基础上，使用核微卫星分子标记评估川滇高山栎和刺叶高山栎种群的遗传结构、遗传分化以及遗传多样性，分析川滇高山栎和刺叶高山栎种群在其分布范围内的距离隔离以及环境隔离的模式，并鉴定川滇高山栎和刺叶高山栎的遗传变异对两个物种分布范围内环境梯度的适应机制。

1.3.2 研究目的和意义

本研究拟通过对在中国范围内分布的川滇高山栎和刺叶高山栎种群的遗传分化、多样性等种群遗传及景观方面的研究，以及鉴定物种在其分布范围内的遗传机制。旨在达到以下目的：

- (1) 分析川滇高山栎和刺叶高山栎种群的遗传结构和遗传多样性，探讨影响遗传结构和遗传多样性的原因。
- (2) 鉴定在川滇高山栎和刺叶高山栎分布范围内，和两个物种遗传变异最相关的环境变量。
- (3) 探讨川滇高山栎和刺叶高山栎种群的遗传变异对环境梯度的响应机制。

本研究为广泛分布在我国中部和西南高海拔地区的川滇高山栎和刺叶高山栎种群遗传机制的深入研究提供了理论基础，为探索植物对环境变化的适应机制，并制定相应的保护措施提供了参考。

2 材料与方法

2.1 样品采集

我们在中国数字植物标本馆(<http://www.cvh.ac.cn/>)、中国国家标本资源平台(<http://www.nsii.org.cn/>)、中国植物图像库(<http://www.plantphoto.cn/>)、中国植物志以及已发表的刺叶高山栎相关文献中整理出的刺叶高山栎野外分布地和标本采集记录,于2017年至2019年对刺叶高山栎的自然种群进行了样本采集。使用GPS定位系统对采集的刺叶高山栎的居群进行定位,居群之间间隔至少30公里以上,采集居群内的个体之间间隔至少100米以上,每个居群根据树木分布密度采集10-25个个体,新鲜、健康的叶片和幼嫩枝条擦拭干净后,采集后立即装入有硅胶干燥剂的信封袋中保存并编号供后续种群及景观遗传学研究使用。

本研究选择46个刺叶高山栎野生种群共计661个个体,同时结合本实验室于2013年至2015年采集、保存的60个川滇高山栎种群共计996个个体共同用于后续分析,该样品信息已经由本实验室发表(Du *et al.*, 2017)。采集到的叶片和枝条样本用变色硅胶干燥剂放置于通风处进行干燥保存。图2.1展示了川滇高山栎和刺叶高山栎种群在中国的分布情况以及采样情况,黑色和白色圆点分别代表川滇高山栎和刺叶高山栎两个物种,表2.1展示了采集的川滇高山栎和刺叶高山栎种群具体的信息。

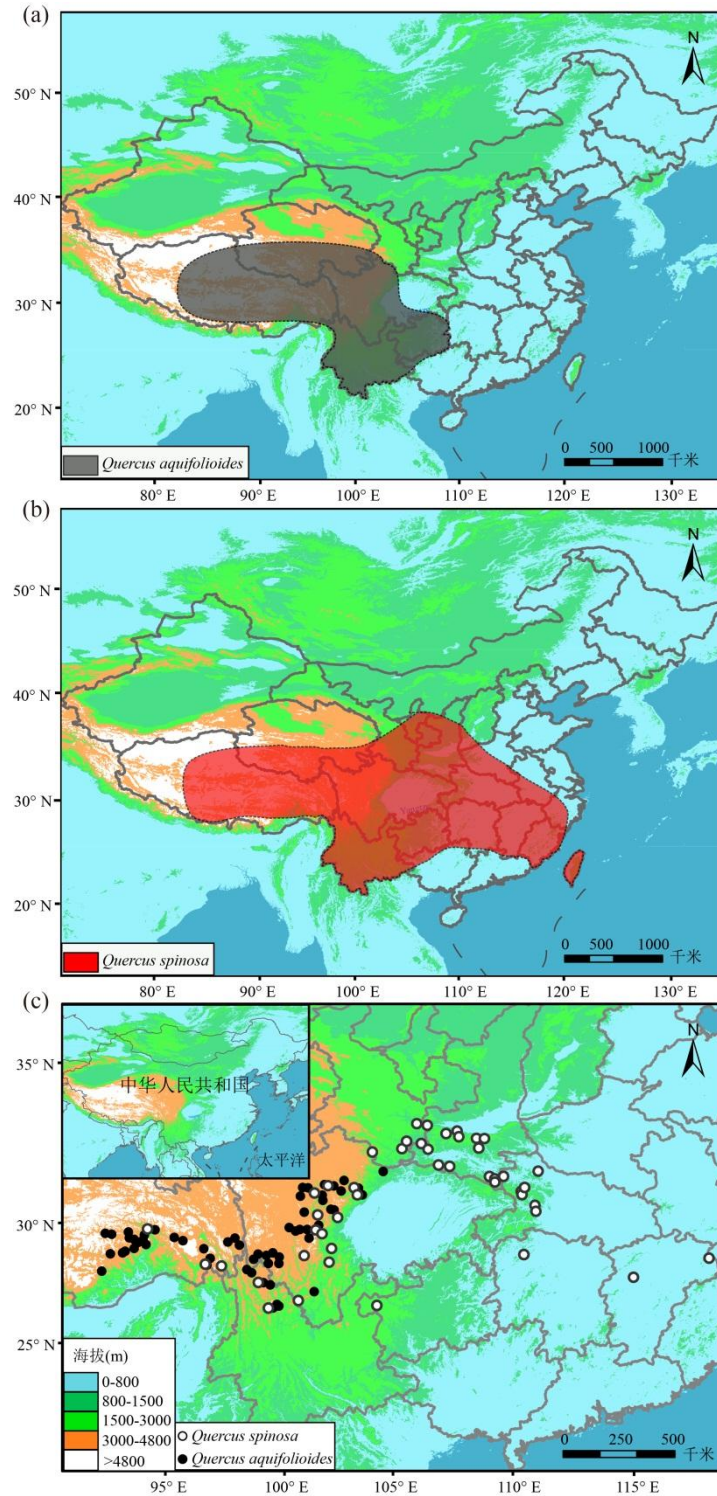


图 2.1 川滇高山栎和刺叶高山栎的(a, b)分布区域和(c)采样点

Figure 2.1 Distribution area (a, b) and (c) sampling of *Q. aquifolioides* and *Q. spinosa*

表 2.1 川滇高山栎和刺叶高山栎样品采集信息表

Table 2.1 Sample information of *Q. aquifolioides* and *Q. spinosa*

种群编号	分布地点	样本量	bio15	bio09	bio07	prec06
川滇高山栎						
LZD	西藏隆子县斗玉乡	21	99.36	0.77	27.60	97.00
GBX	西藏工布达江县江达乡	30	105.04	-2.47	29.20	93.00
MLJ	西藏米林县甲格村	20	103.30	1.53	27.70	90.00
GB	西藏工布达江县	13	102.48	-1.35	27.70	98.00
MLL	西藏米林县里龙乡	39	95.98	2.37	29.40	112.00
SJLS	西藏色季拉山	7	94.58	1.63	28.20	115.00
DZC	西藏大昭村	14	92.58	-5.22	28.40	113.00
KDG	西藏卡定沟	15	94.04	-1.18	27.00	110.00
LZA	西藏米林县林芝机场	26	91.27	2.17	28.00	127.00
BYZ	西藏八一镇	15	91.97	1.33	27.80	123.00
LZ	西藏林芝县	15	90.18	-3.42	27.70	115.00
BM	西藏波密县	16	89.75	-6.67	28.70	116.00
LL	西藏鲁朗县	15	90.94	-3.95	28.80	126.00
MLP	西藏米林县派镇	28	89.70	-1.22	28.00	136.00
BMS	西藏波密县索通村	23	91.03	3.40	28.20	173.00
BMR	西藏波密然乌镇	23	88.84	-1.10	28.50	147.00
BMZ	西藏波密中坝村	12	86.95	-3.88	29.10	127.00
CY	西藏察隅县古玉乡	12	82.45	-4.65	29.40	122.00
CYX	西藏察隅县雄久村	13	88.77	5.42	27.60	256.00
CBG	西藏察隅县慈巴沟	22	84.66	1.95	26.40	174.00
MKD	西藏芒康县登巴村	16	85.16	-8.00	29.10	93.00

基于微卫星分子标记的川滇和刺叶高山栎的种群和景观遗传学研究

MKR	西藏芒康县如美镇	22	88.11	-4.90	30.90	91.00
MKZ	西藏芒康县孜许村	19	83.34	-3.65	30.10	88.00
DQ	云南德钦县	17	68.21	-3.03	27.50	68.00
BZL	云南奔子栏乡	20	68.87	-1.43	25.60	77.00
DRR	四川得荣县日龙乡	38	78.43	-3.15	26.10	84.00
DRX	四川得荣县-乡城县	30	84.57	0.20	31.40	95.00
ZD	云南中甸	13	67.38	-0.47	27.80	85.00
XCD	四川乡城县-得荣县	20	87.79	-1.90	28.50	100.00
XCR	四川乡城县然乌温泉	21	84.65	-5.83	27.30	94.00
XG	云南香格里拉	12	70.55	-2.22	26.10	91.00
XCW	四川乡城县无名山	18	93.33	-7.72	30.20	103.00
LJX	云南丽江雄古景区	10	60.14	7.60	23.40	97.00
LJ	云南丽江高山植物园	16	67.40	2.58	25.40	96.00
LJB	云南丽江白沙村	21	66.14	4.40	24.90	97.00
DCK	四川稻城县卡龙	24	88.32	-4.35	28.20	111.00
DCE	四川稻城县俄洛村	21	93.10	-5.18	30.90	112.00
YJH	四川雅江红龙乡	22	104.73	-5.62	31.10	131.00
YJX	四川雅江	15	102.52	-0.95	28.60	146.00
DFL	四川道孚县龙灯乡	10	100.87	0.90	27.80	138.00
DFY	四川道孚县银恩乡	11	93.41	-3.38	30.30	138.00
RT	四川壤塘县	9	91.72	-4.38	30.30	134.00
DFG	四川道孚县葛卡乡	8	96.46	-6.10	31.20	142.00
KDD	四川康定县折多山	6	99.67	-3.02	31.30	153.00
MEKR	四川马尔康县松岗镇	7	90.78	-1.40	29.80	138.00
DMX	四川康定县明希乡	16	99.10	-1.45	29.50	158.00

材料与amp;方法

YYP	四川盐源县至平川垭口	23	89.65	0.08	26.70	157.00
KDC	四川康定县中古村	11	94.09	-0.53	28.60	156.00
KDZ	四川康定县折多塘村	10	94.51	-1.52	28.70	161.00
JCD	四川金川县杜岗山	9	87.27	2.13	30.00	132.00
JCK	四川金川县卡撒乡	14	87.44	3.70	29.90	129.00
MEKD	四川马尔康县大郎脚沟	20	86.42	0.03	30.80	129.00
XJX	四川小金县下磨子村	10	88.57	-1.27	27.60	146.00
MEKS	四川马尔康县梭磨乡	10	83.92	-3.30	29.90	133.00
XJD	四川小金县达维乡	13	87.89	-8.05	29.80	152.00
LX	四川理县	10	81.45	-3.98	32.70	129.00
HS	四川黑水县	11	80.08	-1.22	32.60	124.00
MX	四川茂县	13	79.36	-2.87	32.40	123.00
WC	四川汶川县	11	77.11	-0.08	29.90	129.00
PW	四川平武县	10	94.55	4.80	29.30	105.00
刺叶高山栎						
TM	西藏波密县通麦	5	91.42	4.93	27.60	171.00
CYXC	西藏察隅县县城	20	86.88	4.38	27.20	220.00
BLLK	西藏察隅县白隆拉卡	15	73.39	-3.77	27.40	101.00
GZ	云南省香格里拉高山植物园	5	67.32	-0.82	27.50	87.00
XGJQ	云南省丽江雄谷景区	5	61.36	6.97	23.60	95.00
GSL	四川盐边县格萨拉	9	82.71	3.33	25.40	138.00
SS	四川九龙县顺山	9	99.08	2.87	27.30	191.00
SWJ	四川金川县撒瓦脚	11	88.81	1.00	29.30	134.00
GDS	四川康定县郭达山	11	92.90	1.37	27.40	157.00
KRC	四川丹巴县开绕村	10	89.03	3.70	28.40	137.00

基于微卫星分子标记的川滇和刺叶高山栎的种群和景观遗传学研究

ELM	四川泸定县二郎庙	8	91.36	5.38	27.40	162.00
SMX	四川马尔康县梭磨乡	9	83.68	-2.40	30.30	132.00
BQX	四川越西县板桥乡	14	92.53	4.62	27.70	177.00
LTS	四川汉源县龙塘山	13	89.59	4.12	27.80	168.00
FTZ	四川宝兴县蜂桶寨	14	79.67	2.15	29.70	151.00
SLX	四川茂县三龙乡	12	79.79	-1.62	33.50	121.00
LBZ	四川汶川县萝卜寨	10	79.98	2.17	29.10	124.00
JZG	四川九寨沟县	16	81.55	-1.88	33.30	93.00
ZGF	贵州威宁县最高峰	19	83.34	1.37	24.20	188.00
CBLC	四川康县长坝林场	13	81.22	0.07	29.80	90.00
JFS	甘肃鸡峰山	14	79.53	1.13	29.10	89.00
SMJQ	甘肃麦积区石门景区	10	79.22	-3.33	32.30	78.00
WLD	陕西略阳县五龙洞	20	77.44	-1.87	30.00	91.00
JJY	甘肃东岔镇九江峪	10	79.06	-0.58	30.50	72.00
ZJH	陕西勉县张家河林场	21	77.12	-0.98	30.10	99.00
XLS	四川南江县香炉山	15	73.62	-2.63	31.00	118.00
XHS	陕西太白县小华山	21	75.79	-4.12	32.30	83.00
LC	陕西西乡县龙池林场	21	70.72	-0.78	29.40	117.00
HHG	陕西眉县红河谷	15	75.12	-0.30	32.30	71.00
TJS	陕西周至县铁甲树	9	73.88	-3.07	32.10	85.00
ZQ	陕西户县朱雀森林公园	8	71.92	-1.80	31.00	83.00
MWS	陕西镇安县木王山	20	71.16	-3.08	30.20	104.00
NBL	陕西柞水县牛背梁	22	71.70	-2.62	31.90	87.00
NGS	陕西岚皋县南宫山	20	66.15	0.02	28.60	136.00
BDX	陕西平利县八道乡	11	65.88	-0.63	29.80	138.00

材料与amp;方法

TSX	陕西平利县天书峡	21	65.07	-3.07	29.80	148.00
PTS	湖北竹溪县偏头山	15	66.93	2.72	29.30	129.00
BSY	湖北神农架柏杉园	22	64.10	-1.60	29.40	163.00
DJP	湖北神农架断疆坪	22	62.87	-2.73	29.50	168.00
TMS	湖南张家界天门山	12	57.08	4.90	29.50	242.00
TDY	湖北神农架土地垭	20	64.46	-1.45	29.10	162.00
DLL	湖北秭归县大老岭	20	60.24	0.30	28.90	179.00
JLT	湖北秭归县九岭头	20	66.00	6.45	30.20	146.00
WDS	湖北十堰市武当山	20	65.77	4.17	33.40	113.00
WKS	江西武宁县钨矿山	15	55.64	8.78	32.10	255.00
SQS	江西玉山县三清山	9	53.84	3.48	26.70	365.00

2.2 实验方法

2.2.1 基因组总 DNA 的提取

本研究中对川滇高山栎以及刺叶高山栎种群的叶片材料首先使用 TIANGEN 植物基因组 DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取，提取产物不好的样品使用改良的 CTAB(Doyle, 1987)法进行 DNA 提取。两种方法的具体操作步骤如下：

(1) TIANGEN 植物基因组 DNA 提取试剂盒操作步骤：

- ① 打开水浴锅，65℃条件下预热 GP1 20min；
- ② 称取 0.015-0.02g 干燥健康的叶片样品，放入 2ml 的离心管中，加入小钢珠并对离心管做好标记，将标记好的离心管放入液氮中速冻十分钟；
- ③ 使用叶片研磨仪在 50r/s 条件下充分研磨 6min；
- ④ 立刻在通风橱中往研磨好的样品中加入 700 μ l 预热好的 GP1，并加入 0.7 μ l 的 β -巯基乙醇以及少量的 pvpp；
- ⑤ 将离心管放入 65℃水浴锅中水浴 30min，每 5min 翻转摇晃一次；
- ⑥ 在通风橱中加入 700 μ l 三氯甲烷，摇晃 10min 后将离心管放入高速离心机中在 4℃ 12000 rpm 条件下离心 5 min；
- ⑦ 用移液枪吸取上清液至新的 2ml 离心管中并加入 0.7 μ l RNase，将离心管在室温下放置 10min；
- ⑧ 在通风橱中加入 700 μ l 氯仿，摇晃 10min，之后将离心管放入高速离心机中在 4℃ 12000 rpm 的条件下离心 5 min；
- ⑨ 将上清液转移至新的 2ml 离心管中，加入 700 μ l GP2，摇晃 5min；
- ⑩ 将混合液体分两次转入吸附柱中后在高速离心机中 4℃ 12000 rpm 条件下离心 30s，倒掉废液；
- ⑪ 向吸附柱中加入 500 μ l 缓冲液 GD 并在高速离心机中 4℃ 12000 rpm 条件下离心 30s，倒掉废液，将吸附柱放回收集管；
- ⑫ 向吸附柱中加入 600 μ l 漂洗液 PW 并在高速离心机中 4℃ 12000 rpm 条件下离心 30s，倒掉废液，将吸附柱放回收集管；
- ⑬ 重复步骤 12，然后在高速离心机中 4℃ 12000 rpm 条件下空离吸附柱 2min，倒掉废液；
- ⑭ 将吸附柱在室温条件下放置 10min；
- ⑮ 将吸附柱转入 1.5ml 离心管中，使用移液枪往吸附柱的吸附膜上竖直悬空加入 80 μ l TE，在 37℃烘箱中放置 10min；
- ⑯ 在高速离心机中 4℃ 12000 rpm 条件下离心 2min，将提取完成的 DNA 产物在 -20℃ 冰箱中保存备用。

(2) 改良的 CTAB 法操作步骤:

- ① 打开水浴锅, 65℃条件下预热 GP1 20min;
- ② 称取 0.015-0.02g 干燥健康的叶片样品, 放入 2ml 的离心管中, 加入小钢珠并对离心管做好标记, 将离心管放入液氮中速冻十分钟;
- ③ 使用叶片研磨仪在 50r/s 条件下充分研磨 6min;
- ④ 立刻在通风橱中往研磨好的样品中加入 700μl 预热好的 GP1, 加入 0.7μl 的 β-巯基乙醇, 随后加入适量的 pvpp;
- ⑤ 将离心管放入 65℃水浴锅中水浴 40min, 每 5min 翻转摇晃一次;
- ⑥ 在通风橱中加入 700μl 氯仿, 摇晃 10min, 在高速离心机中 4 ℃ 12000 rpm 离心 5 min;
- ⑦ 用移液枪吸取上清液至新的 2ml 离心管, 加入 0.7μl RNase (10 μg/ml), 室温下放置 10min;
- ⑧ 在通风橱中加入 700μl 氯仿, 摇晃 10min, 在高速离心机中 4 ℃ 12000 rpm 离心 5 min;
- ⑨ 吸取上清液至 1.5ml 离心管, 加入与上清液等体积的异丙醇, 翻转混匀后-20℃下放置 30min;
- ⑩ 在高速离心机中 4 ℃ 12000 rpm 条件下离心 10min, 弃掉离心管中的液体, 保留沉淀;
- ⑪ 加入 1ml 的 70%乙醇, 在高速离心机中 4 ℃ 12000 rpm 条件下离心 2 min, 弃掉离心管中的液体, 保留沉淀;
- ⑫ 将离心管放至通风橱中吹 2min 左右, 将多余的酒精吹干后加入 80μl TE, 将提取完成的 DNA 产物在-20℃冰箱中保存备用。

2.2.2 基因组总 DNA 电泳、质量检测及稀释分装

提取的川滇高山栎和刺叶高山栎所有个体的 DNA 在 1%琼脂糖凝胶中进行电泳跑胶, 在 130V, 200mA 的条件下电泳 25min, 利用凝胶成像仪(TJY04S-3C)对 DNA 的质量进行鉴定。

接着使用超微量紫外分光光度计(NanoDrop 8000)基于在 260nm、280nm 和 230nm 处测得的吸光度(OD 值)的比值来对提取的 DNA 的浓度和纯度进行鉴定。检测完成后, 将合格的 DNA 样品统一放置在实验室高山栎 DNA 存放盒内, 并按照 PCR 实验要求对 96 孔板顺序进行排版, 排版完成后吸取对应排版顺序的 DNA 原液 20 μL, 并用 40 μL ddH₂O 进行稀释, 用作后续实验。

2.2.3 核微卫星引物筛选

通过仔细查找栎属植物中已报道的核微卫星通用引物, 来筛选川滇高山栎和刺叶高山栎中具有多态性的核微卫星位点。我们随机挑选几个不同种群的 6 个个体进行核

微卫星引物预扩增实验，之后经 2% 的琼脂糖凝胶电泳对扩增条带进行检测，最终我们选取到 15 对成功扩增的引物用于下一步实验，15 对引物的序列信息见表 2.2。

我们利用一种基于荧光测序的技术来检测核微卫星 (Nuclear microsatellites, nSSRs) 扩增产物，该技术包括 5'末端带有 M13 的 nSSRs 正向引物，nSSRs 反向引物和 5'末端带有 FAM、HEX、TAMRA 或 ROX 荧光标记的 M13 引物(Schuelke, 2000)。PCR 扩增体系和扩增程序如下所示。

扩增体系(15 μ L):

2 \times Taq PCR Master Mix	7.5 μ L
引物-F	0.06 μ L
引物-R	0.24 μ L
M13 染料	0.24 μ L
样本 DNA	1 μ L
ddH ₂ O	5.96 μ L

扩增程序:

95 $^{\circ}$ C 预变性 10mins

95 $^{\circ}$ C 变性 35s

T_m $^{\circ}$ C 退火 30s

72 $^{\circ}$ C 延伸 40s

72 $^{\circ}$ C 延伸 10min

15 $^{\circ}$ C 保存

} 35 次循环

PCR 反应后，我们再通过 2% 的琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行检测，将扩增条带清晰的 PCR 产物送往北京擎科生物科技有限公司进行毛细管电泳检测。

表 2.2 用于川滇高山栎和刺叶高山栎扩增的 SSR 引物序列信息

Table 2.2 Information of SSR primers used for PCR amplifying of *Q. aquifolioides* and *Q. spinosa*

基因座	引物序列	等位基因		基序	参考文献
		长度范围	T _m		
QrZAG30	TGCTCCGTCATAATCTTGCTCTGA GCAATCCTATCATGCACATGCACAT	160-208	56	GA	Kampfer <i>et al.</i> , 1998
PIE271	CACACTCACCAACCCTACCC GTGCGGTTGTAGACGGAGAT	197-247	56	AG	Durand <i>et al.</i> , 2010
QrZAG112	TTCTTGCTTTGGTGCGCG GTGGTCAGAGACTCGGTAAGTATTC	98-116	56	GA	Kampfer <i>et al.</i> , 1998
QpZAG9	GCAATTACAGGCTAGGCTGG GTCTGGACCTAGCCCTCATG	220-274	56	TG	Steinkellner <i>et al.</i> , 1997
GOT011	CCCCACCGTCTACTCTCAA GCGTTCACCACGTCCATAAT	197-225	56	GA	Durand <i>et al.</i> , 2010

GOT012	TGATGATCCCAAACCACAAA AAGGCTGCAGGACTTTTCAA	204-254	56	GT	Durand <i>et al.</i> , 2010
GOT021	AGAAAGTTCCAGGGAAAGCA CTTCGTCCCCAGTTGAATGT	110-150	56	AT	Durand <i>et al.</i> , 2010
GOT040	AAGGCACTCGTCGCTTTCTA ACCGATTTGAAGCTCGAGAA	242-298	56	TC	Durand <i>et al.</i> , 2010
PIE163	GAGAGGCATGTGGAACCAAG CAAGCATAGGTGGTGGAAACC	230-264	56	TC	Durand <i>et al.</i> , 2010
FIR026	CTTCATGCACCAATTCTCA GGCCATGTATGTGTGCAAAA	201-215	56	GT/GA	Durand <i>et al.</i> , 2010
FIR015	ACCCTAAAACCCCAATCACC CGGATCTTCGGCTATTCTTG	112-148	56	GT	Durand <i>et al.</i> , 2010
POR025	CACACAAACCCATATGATCTGAA TCTCTTTCGATCCCTTCTGC	105-145	56	AG	Durand <i>et al.</i> , 2010
QpZAG16	CTTCACTGGCTTTTCCTCCT TGAAGCCCTTGTCACATGC	131-189	56	TC	Steinkellner <i>et al.</i> , 1997
QpZAG110	GGAGGCTTCCTTCAACCTACT GATCTCTTGTGTGCTGTATTT	193-267	56	AG	Steinkellner <i>et al.</i> , 1997
QmC02241	TCAGTGACCACACGTCACCTCTC GTTTCTTGGCCATGTTTTGATGG	169-211	56	GA/TC	Ueno <i>et al.</i> , 2008

2.3 测序结果处理

对毛细管电泳检测得到的原始数据,需进行数据的归一化处理和数据格式的转换才能用于后续的分析。我们基于 GeneMarker (SoftGenetics)软件将毛细管电泳检测得到的数据读取峰图数据(Hulce *et al.*, 2011)。数据读取完成后,使用 FlexiBin2 对数据进行归一化处理, FlexiBin2 属于 Excel 中的宏,能够把利用 GeneMarker 读取的原始分子标记数据进行归一化格式的转换,剔除掉在读取过程中等位基因可能出现的片段读长误差(Amos *et al.*, 2007)。得到归一化数据后,由于后续一系列分析所需的输入(Input)格式都不同,因此通过 Convert 对归一化的数据格式进行转换,共可转换为 8 种不同的格式(Glaubitz, 2004)。

2.4 种群遗传学分析

2.4.1 遗传结构分析

为确定川滇高山栎和刺叶高山栎种群在其分布范围内的种群遗传结构,本研究使用一种 MCMC 聚类方法: STRUCTURE v.2.3.3 (Falush *et al.*, 2003; Hubisz *et al.*, 2009; Pritchard *et al.*, 2000)、主成分分析(Principal Components analysis, PCA; Jombart, 2008; Jombart *et al.*, 2011)以及主坐标分析(Principal Coordinate Analysis, PCoA; Gower, 1966)对种群的遗传结构进行鉴别。

(1) STRUCTURE

STRUCTURE 分析基于中性遗传数据集评估种群的遗传结构。使用 PGD spider 2.1.1.2 (Lischer *et al.*, 2012)将包含遗传信息的文件转换为 STRUCTURE 分析所需的 STR 格式,接着设置 100,000 迭代步数(Burn-in)和 200,000 MCMC 循环,将代表进化枝数目的参数 K 设置为 1-10,每个 K 值迭代 20 次独立的运算。程序运行完成后利用 Structure Harvester 在线工具(<http://ta-ylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester>, Earl *et al.*, 2012)根据 delta K (Evanno *et al.*, 2005)对 STRUCTURE 结果进行分析,选择 delta K 最大时对应的 K 值作为最优进化枝数,然后选择这一 K 值的 20 次迭代运算中 Mean value of Ln Likelihood 最高的值对应的结果在 distruct 1.1 (Rosenberg, 2004)程序中进行 Distruct 分析来绘制种群和个体的分组可能性柱状图。

(2) 主成分分析

主成分分析基于对数据的协方差矩阵和矩阵的特征向量进行计算,并通过正交变换将数据矩阵转换到新的空间当中,从而将一组可能存在关联性的数据转换为线性不相关的变量(王晓宇, 2015)。本研究利用 R 语言(Team, 2018)中的“adeget”函数包(Jombart and Ahmed, 2011)对川滇高山栎和刺叶高山栎种群的遗传结构进行研究。

(3) 主坐标分析

主坐标分析基于对一系列的特征值和特征向量进行排序并挑选矩阵中主要的坐标进行呈现,可用于研究样本群落组成的相似性或者差异性(Gower, 1966)。本研究使用 GenAlEx v.6.5 (Peakall and Smouse, 2012)对川滇高山栎和刺叶高山栎种群的相似性和相异性进行研究。

2.4.2 遗传多样性分析

本研究使用 GenAlEx v.6.5 (Peakall and Smouse, 2012)对川滇高山栎和刺叶高山栎种群的遗传多样性进行运算,计算研究种群各指标的平均值作为川滇高山栎和刺叶高山栎种群的遗传多样性,并选取以下指标对川滇高山栎和刺叶高山栎种群的遗传多样性进行评估: H_o : 观测杂合度; H_e : 期望杂合度; I : 香农指数; N_e : 有效种群大小。对于每个统计量,我们使用 T 检验来评估分析的显著性,假设检验显著性水平设为 0.05。

2.4.3 分层分子方差分析

本研究根据 PCA、PCoA 和 STRUCTURE 分析得到的结果,使用 Arlequin ver3.5 (Excoffier *et al.*, 2010)对川滇高山栎和刺叶高山栎种群进行分层分子方差分析(Analysis of molecular variance, AMOVA),从而比较这两个物种种间以及种内的遗传分化程度(Ana *et al.*, 2019)。

2.4.4 基因流分析

本研究基于 Migrate-n v3.6 (Beerli, 2001; Beerli, 2006)来估计川滇高山栎和刺叶高

山栎物种之间以及物种各自的谱系间历史基因流的程度和方向。首先，基于连续的布朗运动模型并利用默认遗传分化(F_{ST})生成初始 θ 和迁移值，接着设置 3 个独立的 MCMC 链，每个链设置 5,000,000 迭代(Iteration)。在恒定突变模型下每 100 步记录一次，将前 10,000 条记录作为 Burn-in。检查模型收敛性之后，计算模型的 mode 值和 95% 的后验概率。本研究假定两个高山栎物种间以及各自的谱系间具有方向和大小不同的三种基因流模型，使用热力学积分 (Bezier) 比较边际可能性来选择最佳模型 (Beerli *et al.*, 2010)。

2.5 景观基因组学分析

2.5.1 气候因子提取

从 WorldClim Version2 数据库 (Fick *et al.*, 2017) 下载全球气候因子数据，该气候因子数据为 1970-2000 年的平均值，分辨率达 30 seconds，包括全年每个月的降水、太阳辐射、平均温度、最高温度、最低温度、风速和水蒸汽压力在内的气候变量以及 19 个生物气候变量，共 103 个气候因子数据。使用 ArcMAP 基于川滇高山栎和刺叶高山栎采样点的经纬度信息对气候因子进行提取。为了避免气候因子之间的共线性对分析结果的干扰，我们使用 R 语言中的“usdm”函数包 (Naimi *et al.*, 2013) 删除共线性阈值大于 0.7 的气候因子，最终筛选出 4 个气候因子用于后续分析。

2.5.2 遗传变异对环境的响应模式

为检测川滇高山栎和刺叶高山栎种群的遗传变异与环境梯度之间的关系，本研究使用两种多变量统计分析方法：Mantel 检验、冗余分析以及两种非线性的分析方法：梯度森林和广义相异建模对川滇高山栎和刺叶高山栎种群的遗传变异对环境的响应模式进行鉴定。

(1) Mantel 检验

本研究使用 PGD spider 2.1.1.2 (Lischer and Excoffier, 2012) 把遗传数据文件进行转换并计算遗传分化(F_{ST})，通过线性的变换在 Excel 中计算 $F_{ST} / (1 - F_{ST})$ 从而使得遗传分化和成对的线性地理距离能以最短的距离进行回归 (Rousset, 1997; Slatkin, 1993)。根据川滇高山栎和刺叶高山栎采样点的经纬度数据使用 R 语言 (Team, 2018) 中的“geosphere”函数包 (Hijmans, 2014) 计算地理距离矩阵；然后根据提取的气候数据使用“ecodist”函数包 (Goslee *et al.*, 2007) 基于 Bray-Curtis 距离 (Bray *et al.*, 1957; Shyam *et al.*, 2015) 来计算环境距离矩阵。最后利用地理/环境距离矩阵和遗传分化矩阵进行 Mantel 检验来对检测种群的地理/环境隔离。

为了在分析 Mantel 检验时控制环境和地理距离的线性影响，同时为了检验遗传距离矩阵与环境距离矩阵之间的多元相关关系，本研究也同时进行偏 Mantel 检验 (Smouse *et al.*, 1986) 和距离矩阵多元回归分析 (Multiple Regression on distance Matrices, MRM; Lichstein, 2007)。

(2) 冗余分析

通过 R 语言(Team, 2018)中的“LEA”函数包(Frichot and François, 2015)计算每个位点在每个个体的等位基因频率作为遗传数据的输入(Input)文件, 将提取出的 4 个气候因子数据以及川滇高山栎和刺叶高山栎采样点的经纬度数据作为气候、地理数据的输入(Input)文件。使用 R 语言中的“vegan”函数包(Oksanen *et al.*, 2017)基于无约束矩阵(因变量, 遗传数据)和约束矩阵(自变量, 环境数据)来运行基本冗余分析。为了避免在分析气候变量时地理变量(经纬度)的线性影响, 以及在分析地理变量(经纬度)时气候变量的线性影响, 本研究也同时进行偏冗余分析。

(3) 梯度森林

在梯度森林分析中, 基于上一步得到的等位基因频率作为遗传数据的输入(Input)文件, 将筛选出的气候因子数据以及川滇高山栎和刺叶高山栎采样点的经纬度数据作为气候、地理数据的输入(Input)文件。基于 R 语言(Team, 2018)中的“gradientForest”和“extendedForest”函数包(Liaw and Wiener, 2002; Smith *et al.*, 2012)来检测气候和空间梯度对川滇高山栎和刺叶高山栎种群遗传变异的影响。

(4) 广义相异建模

在广义相异建模分析中, 基于 R 语言(Team, 2018) 中的“LEA”函数包(Frichot and François, 2015)计算每个位点在每个种群的等位基因频率数据, 作为遗传数据的输入(Input)文件, 将筛选出的气候因子数据以及川滇高山栎和刺叶高山栎采样点的经纬度数据作为气候、地理数据的输入(Input)文件。并基于 R 语言(Team, 2018) 中的“gdm”函数包(Manion *et al.*, 2018)来鉴定川滇高山栎和刺叶高山栎种群的遗传距离与气候和地理距离之间的非线性关系。

3 研究结果

3.1 川滇高山栎与刺叶高山栎的种群遗传学分析

3.1.1 遗传结构分析

STRUCTURE 分析基于 15 对微卫星数据将川滇高山栎和刺叶高山栎的个体很明显地聚类为两个谱系，而单独基于川滇高山栎和刺叶高山栎的分析也能很明显的将两个物种分别聚类为两个谱系（图 3.1，图 3.2），我们将川滇高山栎的两个谱系命名为 Tibet 谱系和 HDM-WSP 谱系，两个谱系在地理上分布于西藏东部地区和喜马拉雅 - 横断山脉/川西高原地区；刺叶高山栎的两个谱系命名为 West 谱系和 East 谱系，两个谱系在地理上分布于中国西部的横断山脉地区和秦岭山脉及中国东部地区。

基于 15 对微卫星数据的 PCoA 和 PCA 也得到了类似的结果，即 PCoA 和 PCA 都将川滇高山栎和刺叶高山栎在第一主成分坐标轴上很明显地区分（图 3.3, PC1 = 16.5%；图 3.4, PC1 = 57.7%）；此外，单独基于川滇高山栎的结果在第一主成分坐标轴上分为 Tibet 谱系和 HDM-WSP 谱系(图 3.3, PC1 = 4.9%；图 3.4, PC1 = 23.7%)，单独基于刺叶高山栎的结果也在第一主成分坐标轴上分为 West 谱系和 East 谱系(图 3.3, PC1 = 8.19%；图 3.4, PC1 = 40.78%)，并且刺叶高山栎两个谱系的分化趋势要大于川滇高山栎。

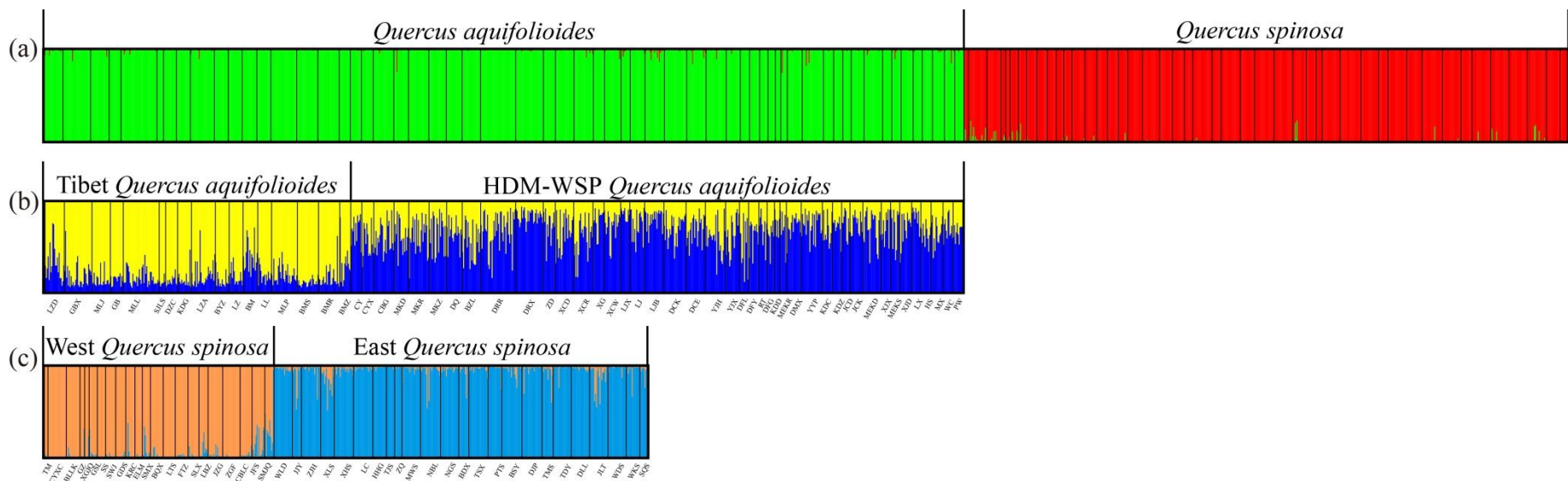


图 3.1 川滇高山栎和刺叶高山栎(a)物种间, (b)川滇高山栎物种内和(c)刺叶高山栎物种内基于 SSR 数据集的 STRUCTURE 聚类结果

Figure 3.1 Results of STRUCTURE based on SSR datasets for (a) between *Q. aquifolioides* and *Q. spinosa*, (b) within *Q. aquifolioides* and (c) within *Q. spinosa*

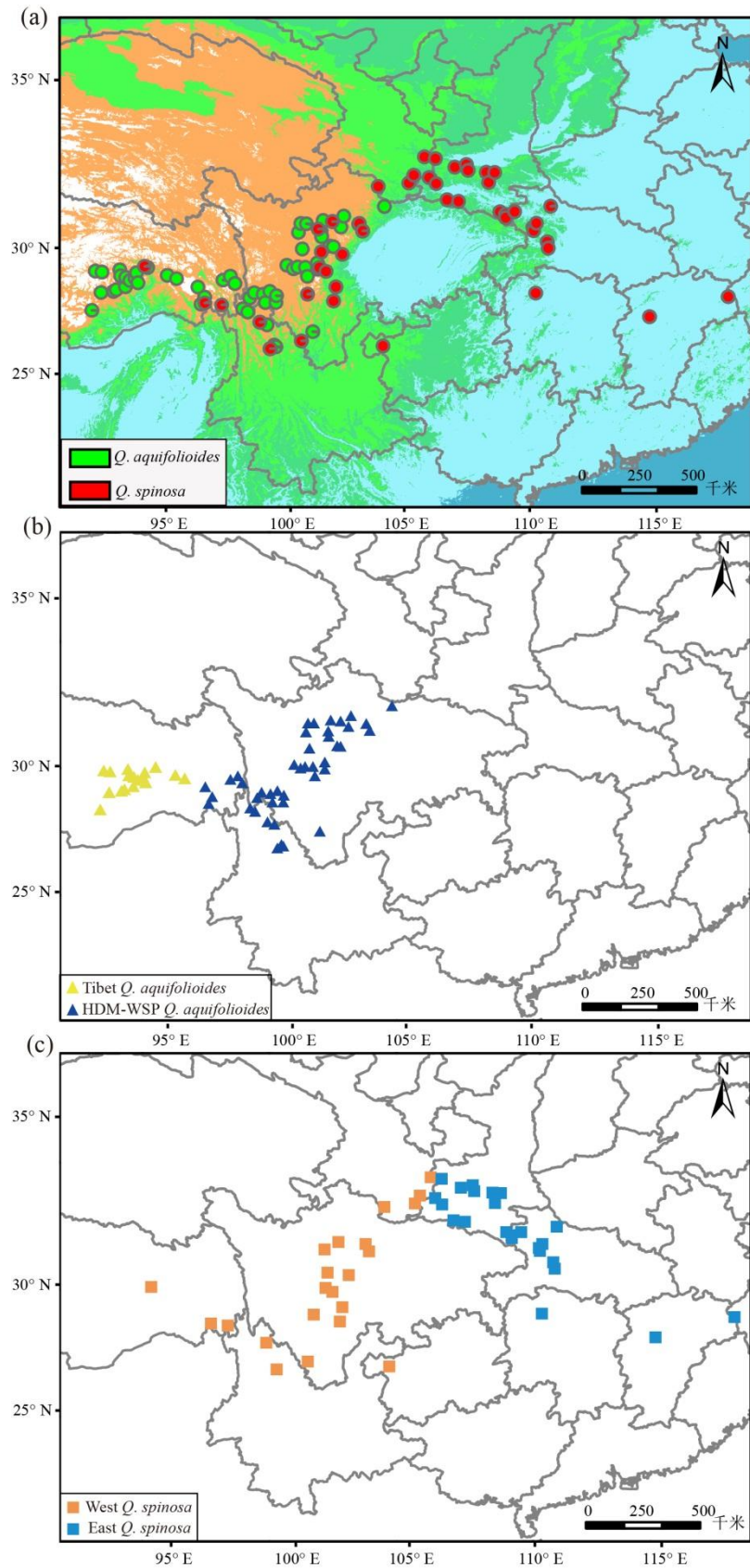


图 3.2 川滇高山栎和刺叶高山栎基于 SSR 数据集的贝叶斯聚类分析结果

Figure 3.2 Results of Bayesian cluster analysis of *Q. aquifolioides* and *Q. spinosa* populations based on SSR datasets

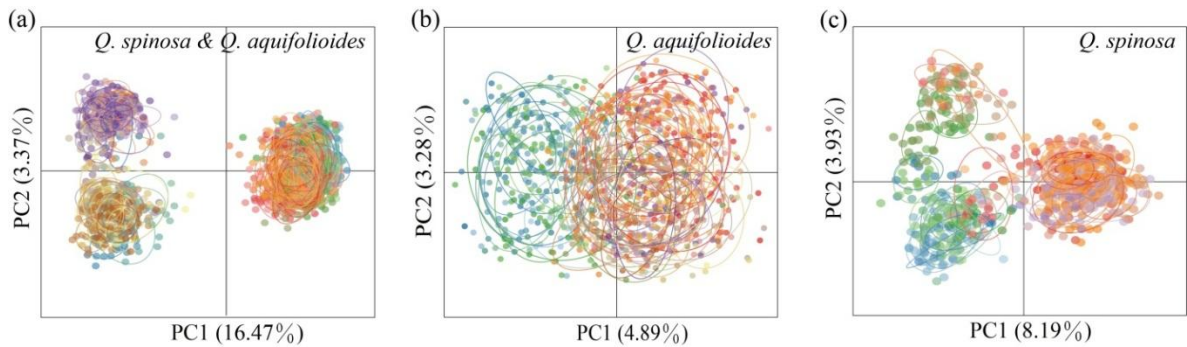


图 3.3 川滇高山栎和刺叶高山栎基于 SSR 数据集的主成分分析结果

Figure 3.3 Results of Principal Component Analysis (PCA) based on SSR datasets for *Q. aquifolioides* and *Q. spinosa*

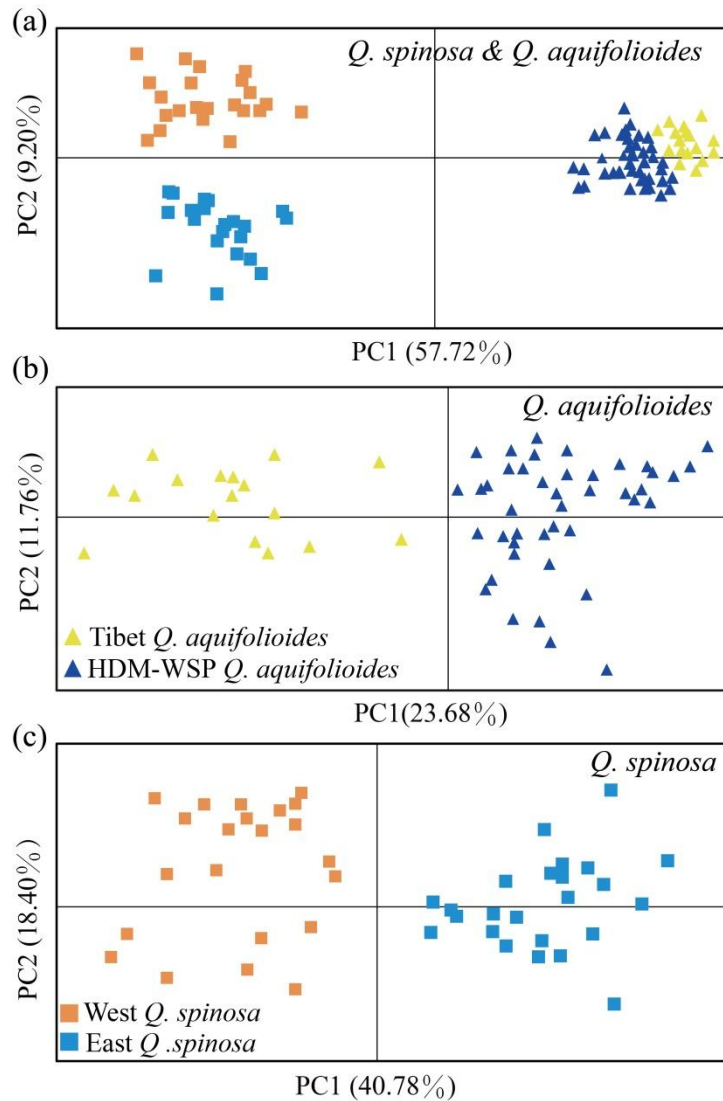


图 3.4 川滇高山栎和刺叶高山栎基于 SSR 数据集的主坐标分析结果

Figure 3.4 Results of Principal Coordinate Analysis (PCoA) based on SSR datasets for *Q. aquifolioides* and *Q. spinosa*

3.1.2 遗传多样性及遗传分化分析

(1) 遗传多样性分析结果

基于 15 对 SSR 数据的结果显示川滇高山栎种群的各项遗传多样性指数：观测杂合度 (H_O)、期望杂合度 (H_E)、有效种群大小 (N_E)、香农指数 (I) 的均值均高于刺叶高山栎的遗传多样性指数，表明川滇高山栎种群的遗传多样性水平高于刺叶高山栎种群的遗传多样性水平。此外，在川滇高山栎种群中，Tibet 谱系的遗传多样性低于 HDM-WSP 谱系，在刺叶高山栎种群中，West 谱系的遗传多样性低于 East 谱系。对多样性水平进行 T 检验的结果均显示差异显著(表 3.1)。

表 3.1 川滇高山栎和刺叶高山栎基于 SSR 数据集的遗传多样性分析结果

Table 3.1 Results of genetic diversity based on SSR datasets for *Q. aquifolioides* and *Q. spinosa*

种群编号	N_E	I	H_O	H_E
<i>Quercus aquifolioides</i>				
Tibet <i>Q. aquifolioides</i>				
LZD	2.91	1.07	0.53	0.53
GBX	3.09	1.11	0.50	0.54
MLJ	2.65	0.93	0.46	0.47
GB	2.81	1.05	0.54	0.53
MLL	2.87	1.11	0.54	0.53
SJLS	2.08	0.81	0.49	0.44
DZC	2.55	0.90	0.53	0.47
KDG	2.61	0.97	0.60	0.51
LZA	2.88	1.08	0.53	0.54
BYZ	2.68	1.03	0.59	0.52
LZ	2.96	1.02	0.58	0.54
BM	3.04	1.11	0.51	0.57
LL	2.66	1.01	0.53	0.52
MLP	3.07	1.13	0.55	0.57
BMS	2.83	0.97	0.50	0.49
BMR	2.83	1.02	0.52	0.52
BMZ	2.74	1.02	0.49	0.53
mean	2.78	1.02	0.53	0.52
HDM-WSP <i>Q. aquifolioides</i>				
CY	3.01	1.14	0.57	0.56
CYX	2.81	1.04	0.54	0.53
CBG	2.91	1.13	0.56	0.54
MKD	3.42	1.32	0.60	0.65
MKR	3.32	1.25	0.56	0.60
MKZ	3.44	1.29	0.60	0.63
DQ	3.53	1.29	0.56	0.62
BZL	3.02	1.22	0.59	0.60
DRR	3.52	1.29	0.55	0.61

DRX	3.32	1.25	0.57	0.60
ZD	3.46	1.29	0.64	0.63
XCD	3.40	1.24	0.53	0.59
XCR	3.24	1.29	0.63	0.62
XG	3.42	1.20	0.53	0.58
XCW	3.54	1.31	0.60	0.64
LJX	2.78	1.01	0.53	0.51
LJ	3.36	1.21	0.56	0.58
DCK	3.60	1.33	0.58	0.63
LJB	3.35	1.28	0.52	0.60
DCE	3.35	1.28	0.54	0.62
YJH	3.24	1.29	0.59	0.63
YJX	3.17	1.20	0.55	0.59
DFL	2.86	1.17	0.60	0.60
DFY	3.52	1.24	0.61	0.62
RT	3.10	1.25	0.64	0.64
DFG	3.27	1.24	0.68	0.63
KDD	2.95	1.14	0.66	0.59
MEKR	3.05	1.17	0.62	0.61
DMX	3.31	1.26	0.66	0.62
YYP	3.28	1.25	0.57	0.60
KDC	3.32	1.24	0.62	0.61
KDZ	3.54	1.35	0.67	0.65
JCD	3.30	1.27	0.70	0.65
JCK	3.52	1.28	0.64	0.63
MEKD	3.66	1.35	0.64	0.65
XJX	3.26	1.23	0.57	0.62
MEKS	3.66	1.32	0.66	0.64
XJD	3.53	1.30	0.64	0.64
LX	3.35	1.31	0.62	0.65
HS	3.23	1.25	0.64	0.63
MX	3.50	1.33	0.69	0.66
WC	3.58	1.31	0.63	0.63
PW	3.57	1.29	0.65	0.62
mean	3.31	1.25	0.60	0.61
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
mean total	3.16	1.18	0.59	0.58
<i>Quercus spinosa</i>				
West <i>Q. spinosa</i>				
TM	2.34	0.85	0.41	0.51
CYXC	2.39	0.81	0.26	0.41
BLLK	2.75	0.98	0.32	0.48
GZ	2.56	0.96	0.39	0.53
XGJQ	1.97	0.70	0.23	0.40
GSL	2.53	0.92	0.28	0.48

研究结果

SS	2.36	0.82	0.35	0.43
SWJ	3.07	1.05	0.50	0.51
GDS	2.82	1.05	0.47	0.52
KRC	2.86	1.09	0.51	0.54
ELM	2.12	0.78	0.46	0.43
SMX	2.56	0.96	0.50	0.52
BQX	2.16	0.83	0.35	0.44
LTS	2.33	0.79	0.37	0.40
FTZ	2.69	0.97	0.50	0.50
SLX	2.65	0.94	0.52	0.48
LBZ	2.82	1.07	0.51	0.55
JZG	2.16	0.80	0.35	0.41
ZGF	2.55	1.01	0.52	0.51
CBLC	2.43	0.84	0.43	0.44
JFS	2.15	0.81	0.31	0.43
SMJQ	2.37	0.91	0.41	0.47
mean	2.48	0.91	0.41	0.47
<i>East Q. spinosa</i>				
WLD	3.24	1.20	0.54	0.59
JJY	2.30	0.83	0.43	0.44
ZJH	3.16	1.18	0.51	0.60
XLS	2.30	0.92	0.42	0.47
XHS	3.15	1.19	0.52	0.59
LC	2.33	0.96	0.52	0.52
HHG	2.53	1.02	0.37	0.55
TJS	2.04	0.78	0.34	0.44
ZQ	2.61	0.96	0.41	0.51
MWS	3.28	1.20	0.48	0.60
NBL	2.84	1.08	0.50	0.55
NGS	2.77	1.06	0.48	0.54
BDX	2.56	1.04	0.61	0.56
TSX	2.89	1.11	0.46	0.57
PTS	2.03	0.76	0.30	0.40
BSY	2.57	1.06	0.42	0.54
DJP	2.59	0.97	0.36	0.49
TMS	2.61	1.01	0.56	0.53
TDY	2.32	0.84	0.29	0.42
DLL	2.98	1.08	0.31	0.55
JLT	2.60	0.93	0.32	0.47
WDS	2.22	0.89	0.34	0.48
WKS	2.41	0.94	0.28	0.51
SQS	2.16	0.76	0.34	0.42
mean	2.60	0.99	0.42	0.51
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Mean total	2.55	0.95	0.41	0.49

注: H_O : 观测杂合度; H_E : 期望杂合度; N_E : 有效种群大小; I : 香农指数

(2) 分层分子方差分析结果

基于 STRUCTURE, PCA 和 PCoA 的分组结果而进行的分层分子方差分析支持上述的结果 (表 3.2)。在川滇高山栎和刺叶高山栎所有种群中, 遗传分化主要存在于种群内 (90.7%, $F_{ST} = 0.09$; 77.5%, $F_{ST} = 0.22$)。而川滇高山栎两个谱系之间 (4.3%, $F_{CT}=0.04$) 和谱系内种群间 (5.0%, $F_{SC}=0.05$) 的分化程度都较低, 在 Tibet 谱系 ($F_{ST} = 0.04$) 和 HDM-WSP 谱系 ($F_{ST} = 0.05$) 中的遗传分化水平相差不多。刺叶高山栎两个谱系之间的分化程度最低 (9.6%, $F_{SC}=0.09$); 且西部谱系的遗传分化水平 ($F_{ST} = 0.18$) 大于东部谱系 ($F_{ST} = 0.12$)。此外, 对比川滇高山栎和刺叶高山栎种群的谱系之间、谱系内种群间以及种群内的固定指数结果表明, 刺叶高山栎种群内的遗传分化水平要明显高于川滇高山栎种群内的遗传分化水平。

表 3.2 川滇高山栎和刺叶高山栎基于 SSR 数据集的分层分子方差分析结果

Table 3.2 Results of Hierarchical analyses of molecular variance (AMOVA) of *Q. aquifolioides* and *Q. spinosa* populations based on SSR datasets

	Percentage of variation (%)	Fixation Indices
<i>Tibet Q. aquifolioides</i>		
Among populations	4.4	$F_{ST} = 0.04$
Within populations	95.6	
<i>HDM-WSP Q. aquifolioides</i>		
Among populations	5.4	$F_{ST} = 0.05$
Within populations	94.6	
<i>All Q. aquifolioides</i>		
Among lineages	4.3	$F_{CT} = 0.04$
Among populations within lineages	5.0	$F_{SC} = 0.05$
Within populations	90.7	$F_{ST} = 0.09$
<i>West Q. spinosa</i>		
Among populations	18.0	$F_{ST} = 0.18$
Within populations	82.0	
<i>East Q. spinosa</i>		
Among populations	12.0	$F_{ST} = 0.12$
Within populations	88.0	
<i>All Q. spinosa</i>		
Among lineages	9.6	$F_{CT} = 0.09$
Among populations within lineages	12.9	$F_{SC} = 0.14$
Within populations	77.5	$F_{ST} = 0.22$

3.1.3 基因流分析

由 Migrate-n 根据贝叶斯因子值评估川滇高山栎和刺叶高山栎两个物种之间及其各自谱系之间的历史基因流, 分析结果表明川滇高山栎和刺叶高山栎历史基因流的方

向是从川滇高山栎到刺叶高山栎 ($Nm = 56.1$ vs $Nm = 47.5$), 川滇高山栎 Tibet 和 HDM-WSP 两个谱系历史基因流的方向从 Tibet 谱系到 HDM-WSP 谱系 ($Nm = 46.6$ vs $Nm = 34.5$); 刺叶高山栎 West 和 HDM-WSP 两个谱系历史基因流的方向从 West 谱系到 East 谱系 ($Nm = 65.6$ vs $Nm = 43.0$) (表 3.3)。

表 3.3 川滇高山栎和刺叶高山栎基于 Migrate-n 的历史基因流分析的结果

Table 3.3 Historical gene flow as estimated by Migrate-n among *Q. aquifolioides* and *Q. spinosa*

	Θ	Nem					
		<i>Q. aquifolioides</i>	Tibet	HDM-WSP	<i>Q. spinosa</i>	West	East
<i>Q. aquifolioides</i>	2.0 [1.5-2.3]				47.5 [34.3-58.1]		
Tibet	4.0 [3.3-4.6]			34.5 [31.7-36.6]			
HDM-WSP	7.7 [7.2-8.1]		46.6 [43.7-49.1]				
<i>Q. spinosa</i>	3.5 [2.4-4.5]	56.1 [33.6-78.2]					
West	8.4 [7.2-8.8]						43.0 [39.3-46.3]
East	8.9 [8.0-9.6]				65.6 [52.9-69.9]		

3.2 川滇高山栎与刺叶高山栎的景观基因组学分析

3.2.1 气候因子筛选

在进行川滇高山栎和刺叶高山栎的遗传变异与环境梯度相关性分析时, 需从 WorldClim Version2 数据库中提取对应的气候数据, 剔除共线性阈值大于 0.7 的气候因子后, 选取 4 个气候因子用于后续的遗传变异与环境梯度相关性分析。这 4 个气候因子分别是: 气温年较差(bio07), 最热月份的平均气温与最冷月份的平均气温的差值, 最干旱季节的平均温度(bio09), 季节性降水(bio15), 六月份降水量(prec06) (表 2.1)。

3.2.2 Mantel 检验

Mantel 检验的结果揭示了川滇高山栎种群的 Tibet 谱系(Mantel's $r = 0.15$, $P = 0.006$)、HDM-WSP 谱系(Mantel's $r = 0.39$, $P < 0.001$)和所有种群(Mantel's $r = 0.52$, $P < 0.001$)中存在显著的距离隔离的空间遗传结构。在 HDM-WSP 谱系(Mantel's $r = 0.30$, $P = 0.014$)和所有种群(Mantel's $r = 0.18$, $P = 0.025$)中检测到显著环境隔离的空间遗传结构, 但在 Tibet 谱系(Mantel's $r = -0.07$, $P = 0.675$)并未检测到显著环境隔离的空间遗传结构(图 3.5)。在刺叶高山栎种群的 West 谱系(Mantel's $r = 0.38$, $P < 0.001$; Mantel's $r = 0.25$, $P = 0.006$)、East 谱系(Mantel's $r = 0.49$, $P = 0.005$; Mantel's $r = 0.44$, $P = 0.005$)和

所有种群(Mantel's $r = 0.55$, $P < 0.001$; Mantel's $r = 0.28$, $P < 0.001$)中均存在显著的距离隔离和环境隔离的空间遗传结构 (图 3.5)。

偏 Mantel 检验发现了类似的结果: 当控制环境距离的影响时, 在川滇高山栎种群的 Tibet 谱系(Mantel's $r = 0.24$, $P = 0.007$)和所有种群(Mantel's $r = 0.52$, $P < 0.001$)中检测到了显著的距离隔离的空间遗传结构; 当控制地理距离的影响时, 在 HDM-WSP 谱系(Mantel's $r = 0.19$, $P < 0.001$)和所有种群(Mantel's $r = 0.18$, $P = 0.025$)中检测到了显著的环境隔离的空间遗传结构, 但在 Tibet 谱系(Mantel's $r = -0.20$, $P = 0.875$)中并未检测到显著的环境隔离的遗传结构(表 3.4)。而当控制环境距离的影响时, 在刺叶高山栎种群的 East 谱系(Mantel's $r = 0.25$, $P = 0.044$)和所有种群(Mantel's $r = 0.50$, $P < 0.001$)中检测到了显著的距离隔离的空间遗传结构; 当控制地理距离的影响时, 在 West 谱系(Mantel's $r = 0.32$, $P = 0.002$)和所有种群(Mantel's $r = 0.01$, $P = 0.048$)中检测到显著的环境隔离的遗传结构, 但在 East 谱系(Mantel's $r = -0.02$, $P = 0.566$)中未检测到显著的环境隔离(表 3.5)。

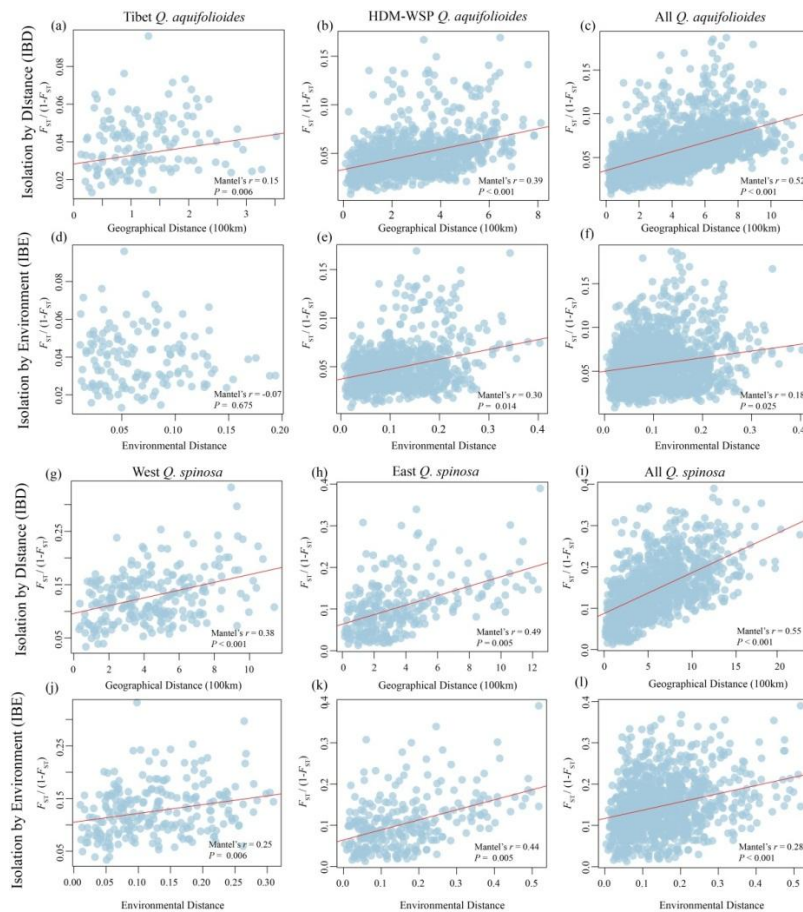


图 3.5 在川滇高山栎的(a, d) Tibet 谱系、(b, e) HDM-WSP 谱系和(c, f)所有种群以及刺叶高山栎的(g, j) Tibet 谱系、(h, k) HDM-WSP 谱系和(i, l)所有种群中, 对遗传距离和(a-c, g-i)地理距离、(d-f, j-l)环境距离和进行 Mantel 检验的结果

Figure 3.5 Results of Mantel tests of genetic distance against (a-c, g-i) geographic and (d-f, j-l)

environmental distances in (a, d) Tibet lineage, (b, e) HDM-WSP lineage and (c, f) all populations combined in *Q. aquifolioides* and (g, j) West lineage, (h, k) East lineage and (i, l) all populations combined in *Q. spinosa*

表3.4 川滇高山栎不同谱系和所有种群中偏Mantel检验结果

Table 3.4 Results of Partial Mantel test in different lineages and all populations of *Q. aquifolioides*

	Tibet		HDM-WSP		All populations	
	Mantel's <i>r</i>	<i>P</i>	Mantel's <i>r</i>	<i>P</i>	Mantel's <i>r</i>	<i>P</i>
IBD conditioned with environmental distance	0.24	0.007	0.31	0.059	0.52	<0.001
IBE conditioned with geographical distance	-0.20	0.875	0.19	<0.001	0.18	0.025

表 3.5 刺叶高山栎不同谱系和所有种群中偏 Mantel 检验结果

Table 3.5 Results of Partial Mantel test in different lineages and all populations of *Q. spinosa*

	West		East		All populations	
	Mantel's <i>r</i>	<i>P</i>	Mantel's <i>r</i>	<i>P</i>	Mantel's <i>r</i>	<i>P</i>
IBD conditioned with environmental distance	0.13	0.052	0.25	0.044	0.50	<0.001
IBE conditioned with geographical distance	0.32	0.002	-0.02	0.566	0.01	0.048

对遗传距离和四个气候因子距离进行 Mantel 检验和偏 Mantel 检验均发现：在川滇高山栎种群的 HDM-WSP 谱系中，遗传距离与气温年较差(bio07) (Mantel's $r = 0.49$, $P < 0.001$; Mantel's $r = 0.41$, $P < 0.001$)和季节性降水(bio15) (Mantel's $r = 0.33$, $P = 0.004$; Mantel's $r = 0.29$, $P = 0.010$)显著相关；在所有种群中，遗传距离同样与气温年较差(bio07) (Mantel's $r = 0.36$, $P < 0.001$; Mantel's $r = 0.32$, $P < 0.001$)和季节性降水(bio15) (Mantel's $r = 0.27$, $P = 0.003$; Mantel's $r = 0.26$, $P = 0.004$)显著相关；而在 Tibet 谱系中，Mantel 检验和偏 Mantel 检验均发现没有气候因子与遗传距离显著相关（表 3.6）。而 Mantel 检验发现在刺叶高山栎种群的 West 谱系中，遗传距离与气温年较差(bio07) (Mantel's $r = 0.23$, $P = 0.040$)和 prec6 (Mantel's $r = 0.20$, $P = 0.019$)显著相关；在 East 谱系中，遗传距离与季节性降水(bio15) (Mantel's $r = 0.42$, $P = 0.001$)和六月份降水量(prec06) (Mantel's $r = 0.42$, $P = 0.002$)显著相关；在所有种群中，遗传距离与气温年较差(bio07) (Mantel's $r = 0.21$, $P = 0.005$)，季节性降水(bio15) (Mantel's $r = 0.44$, $P < 0.001$)和六月份降水量(prec06) (Mantel's $r = 0.19$, $P = 0.003$)显著相关；偏 Mantel 检验发现在 West 谱系中，遗传距离与最干旱季节的平均温度(bio09) (Mantel's $r = 0.13$, $P = 0.002$)显著相关；在所有种群中，遗传距离与季节性降水(bio15) (Mantel's $r = 0.18$, $P = 0.003$)显著相关；而在 East 谱系中，偏 Mantel 检验未发现有气候因子与遗传距离显

著相关（表 3.7）。

表3.6 川滇高山栎不同谱系和所有种群中Mantel检验和偏Mantel检验结果

Table 3.6 Results of Mantel test and partial Mantel test in different lineages and all populations of *Q. aquifolioides*

	Tibet		HDM-WSP		All populations	
	Mantel's <i>r</i>	<i>P</i>	Mantel's <i>r</i>	<i>P</i>	Mantel's <i>r</i>	<i>P</i>
<i>Mantel test</i>						
bio07	-0.22	0.951	0.49	<0.001	0.36	<0.001
bio09	0.04	0.373	-0.02	0.781	-0.01	0.601
bio15	-0.05	0.609	0.33	0.004	0.27	0.003
prec06	-0.08	0.661	0.13	0.083	0.03	0.264
<i>partial Mantel test</i>						
bio07	-0.23	0.961	0.41	<0.001	0.32	<0.001
bio09	0.03	0.404	-0.01	0.606	0.01	0.554
bio15	-0.19	0.867	0.29	0.010	0.26	0.004
prec06	-0.19	0.854	-0.01	0.461	0.03	0.310

表 3.7 刺叶高山栎不同谱系和所有种群中 Mantel 检验和偏 Mantel 检验结果

Table 3.7 Results of Mantel test and partial Mantel test in different lineages and all populations of *Q. spinosa*

	West		East		All populations	
	Mantel's <i>r</i>	<i>P</i>	Mantel's <i>r</i>	<i>P</i>	Mantel's <i>r</i>	<i>P</i>
<i>Mantel test</i>						
bio07	0.23	0.040	0.15	0.155	0.21	0.005
bio09	0.08	0.109	0.04	0.268	0.02	0.274
bio15	0.21	0.063	0.42	0.001	0.44	<0.001
prec06	0.20	0.019	0.42	0.002	0.19	0.003
<i>partial Mantel test</i>						
bio07	0.08	0.247	-0.08	0.720	-0.01	0.533
bio09	0.13	0.002	0.06	0.188	0.02	0.225
bio15	0.18	0.092	-0.04	0.625	0.18	0.003
prec06	0.08	0.149	-0.01	0.506	-0.02	0.605

MRM 结果显示在川滇高山栎种群的 HDM-WSP 谱系和所有种群中的最优模型均显著 ($P < 0.001$)。在 HDM-WSP 谱系中, 遗传距离与地理距离 (Spearman's $\rho = 0.39$, $P < 0.001$), 气温年较差 (bio07) (Spearman's $\rho = 0.21$, $P = 0.001$) 和季节性降水 (bio15) (Spearman's $\rho = 0.04$, $P = 0.025$) 显著相关; 在所有种群中, 遗传距离同样与地理距离 (Spearman's $\rho = 0.57$, $P < 0.001$), 气温年较差 (bio07) (Spearman's $\rho = 0.13$, $P = 0.004$) 和季节性降水 (bio15) (Spearman's $\rho = 0.02$, $P = 0.006$) 显著相关, 而在 Tibet 谱系中, 模型检验得结果不显著 ($P = 0.213$) (表 3.8)。在刺叶高山栎种群的 West 谱系, East 谱

系和所有种群中的最优模型均显著($P < 0.001$)。在 West 谱系中, 遗传距离与最干旱季节的平均温度(bio09) (Spearman's $\rho = 0.17$, $P = 0.020$)显著相关; 在 East 谱系中, 遗传距离与地理距离(Spearman's $\rho = 0.54$, $P = 0.007$)显著相关; 在所有种群中, 遗传距离与地理距离(Spearman's $\rho = 0.49$, $P < 0.001$)和季节性降水(bio15) (Spearman's $\rho = 0.16$, $P = 0.002$)显著相关(表 3.9)。

表3.8 川滇高山栎不同谱系和所有种群中距离矩阵多元回归分析结果

Table 3.8 Results of MRM (Multiple Regression on distance Matrices) in different lineages and all populations of *Q. aquifolioides*

	Tibet		HDM-WSP		All populations	
	ρ	P	ρ	P	ρ	P
geographical distance	0.41	<0.001	0.39	0.053	0.57	<0.001
bio07	-0.21	0.082	0.21	0.001	0.13	0.004
bio09	0.06	0.602	0.12	0.602	0.09	0.623
bio15	-0.11	0.595	0.04	0.025	0.02	0.006
prec06	-0.24	0.202	-0.14	0.079	-0.06	0.160
ρ^2 and P of best model	0.14	0.213	0.24	<0.001	0.39	<0.001

表 3.9 刺叶高山栎不同谱系和所有种群中距离矩阵多元回归分析结果

Table 3.9 Results of MRM (Multiple Regression on distance Matrices) in different lineages and all populations of *Q. spinosa*

	West		East		All populations	
	ρ	P	ρ	P	ρ	P
geographical distance	0.24	0.035	0.54	0.007	0.49	<0.001
bio07	0.07	0.584	-0.08	0.496	-0.01	0.862
bio09	0.17	0.020	0.20	0.098	0.03	0.528
bio15	0.12	0.297	-0.23	0.223	0.16	0.002
prec06	0.03	0.689	0.12	0.460	-0.04	0.353
ρ^2 and P of best model	0.16	<0.001	0.29	<0.001	0.35	<0.001

综合上述分析结果, Mantel 检验表明在川滇高山栎分布区内存在显著的地理隔离, 川滇高山栎遗传分化主要受到地理隔离的影响; 在 HDM-WSP 谱系中检测到显著的环境隔离, HDM-WSP 谱系的遗传分化主要受到环境隔离的影响; 而在 Tibet 谱系中检测到显著的地理隔离, 因此 Tibet 谱系的遗传分化主要受到地理隔离的影响。气温年较差(bio07)和季节性降水(bio15)与遗传分化显著相关, 是影响川滇高山栎遗传分化最主要的气候变量。

而在刺叶高山栎分布区内存在显著的地理隔离,刺叶高山栎遗传分化同样主要受到地理隔离的影响;在 West 谱系中检测到显著的环境隔离,West 谱系的遗传分化主要受到环境隔离的影响;而在 East 谱系中检测到显著的地理隔离,因此 East 谱系的遗传分化主要受到地理隔离的影响。最干旱季节的平均温度(bio09)和季节性降水(bio15)与遗传分化显著相关,是影响刺叶高山栎遗传分化最主要的气候变量。

3.2.3 冗余分析

基于 15 对 SSR 数据对川滇高山栎和刺叶高山栎种群的遗传分化进行 RDA 分析和偏 RDA 分析(分别控制地理和气候变量的影响),以评估地理变量和气候变量在塑造这两个物种遗传变异的模型中所发挥的作用,表 3.10 展示了地理变量以及每个气候变量的解释度和显著性水平。

川滇高山栎偏 RDA 的结果表明在 Tibet 谱系中,遗传分化受到地理变量($PVE = 4.03, P = 0.001$)的影响要大于气候变量($PVE = 1.45, P = 0.001$);在所有种群中,遗传分化受到地理变量($PVE = 1.89, P = 0.001$)的影响要大于气候变量($PVE = 1.44, P = 0.001$);而在 HDM-WSP 谱系中,遗传分化受到气候变量($PVE = 2.70, P = 0.001$)的影响要大于地理变量($PVE = 1.38, P = 0.001$),其中 RDA 和偏 RDA 的结果都显示气温年较差(bio07),季节性降水(bio15)和六月份降水量(prec06)对 HDM-WSP 谱系遗传分化的影响较大(图 3.6;表 3.10)。

刺叶高山栎偏 RDA 结果表明在 East 谱系中,遗传分化受到地理变量($PVE = 5.19, P = 0.001$)的影响要大于气候变量($PVE = 2.98, P = 0.001$);在所有种群中,遗传分化受到地理变量($PVE = 4.13, P = 0.001$)的影响同样要大于气候变量($PVE = 2.67, P = 0.001$);而在 West 谱系中,遗传分化受到气候变量($PVE = 5.62, P = 0.001$)的影响要大于地理变量($PVE = 5.12, P = 0.001$),其中 RDA 和偏 RDA 的结果都显示最干旱季节的平均温度(bio09),季节性降水(bio15)和六月份降水量(prec06)对 West 谱系遗传分化的影响较大(图 3.6;表 3.10)。

结合 RDA 和偏 RDA 的结果表明无论是川滇高山栎还是刺叶高山栎,在这两个物种的地理分布范围内,地理变量都是对这两个物种的遗传变异影响最主要的因素。川滇高山栎 Tibet 谱系的遗传变异主要受到地理变量的影响,而 HDM-WSP 的谱系的遗传分化主要受到气候变量的影响;刺叶高山栎的 West 谱系的遗传分化主要受到气候变量的影响,而 East 谱系的遗传分化主要受到地理变量的影响。同时,在两个物种各自的谱系内,也就是川滇高山栎的 Tibet 谱系和 HDM-WSP 谱系以及刺叶高山栎的 West 谱系和 East 谱系内,对遗传变异影响最主要的因素存在差异。

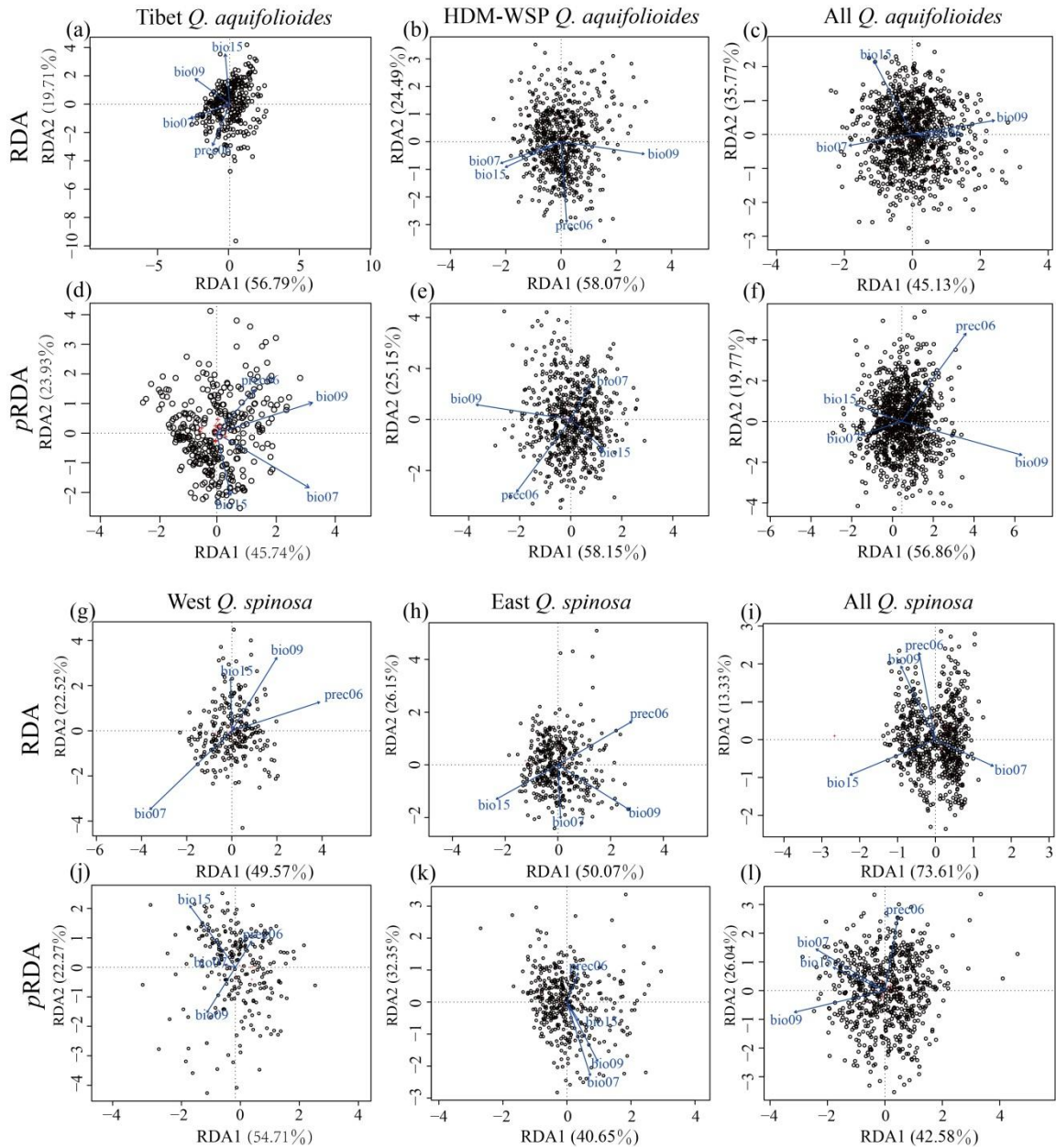


图 3.6 川滇高山栎的(a, d) Tibet 谱系、(b, e) HDM-WSP 谱系和(c, f)所有种群和刺叶高山栎的(g, j)

West 谱系、(h, k) East 谱系和(i, l)所有种群中的 RDA (a-c, g-i)和偏 RDA (d-f, j-l)的载荷结果
 Figure 3.6 Loading results of (a-c, g-i) redundancy analysis (RDA) and (d-f, j-l) partial RDA (*p*RDA) in
 (a, d) Tibet lineage, (b, e) HDM-WSP lineage and (c, f) all populations combined in *Q. aquifolioides*
 and (g, j) West lineage, (h, k) East lineage and (i, l) all populations combined in *Q. spinosa*

表 3.10 川滇高山栎和刺叶高山栎基于 SSR 的遗传变异与气候和地理变量之间 RDA 和偏 RDA 的
 结果

Figure 3.10 Results of Summary of thegenetic variations associated with climate and geographic
 variables based on RDA and *p*RDA in *Q. aquifolioides* and *Q. spinosa* for SSRs

	RDA			<i>p</i> RDA		
	PVE	Eigenvalue	<i>P</i>	PVE	Eigenvalue	<i>P</i>
<i>Quercus aquifolioides</i>						

<i>Tibet Q. aquifolioides</i>						
climate	3.16	2.67	0.001	1.45	3.43	0.001
geography				4.03	2.47	0.001
bio15	18.08	1.93	0.029	23.78	3.26	0.002
bio09	30.83	3.29	0.001	30.76	4.22	0.001
bio07	40.88	4.37	0.001	29.41	4.03	0.001
prec06	10.21	1.09	0.354	16.05	2.20	0.001
Whole model			0.001			0.001
<i>HDM-WSP Q. aquifolioides</i>						
climate	3.66	6.25	0.001	2.70	4.66	0.001
geography				1.38	4.75	0.001
bio15	27.17	6.79	0.001	17.27	2.73	0.001
bio09	14.53	9.30	0.001	14.64	8.30	0.001
bio07	37.19	3.63	0.001	44.57	3.22	0.001
prec06	21.11	5.28	0.001	23.52	4.38	0.001
Whole model			0.001			0.001
<i>All populations Q. aquifolioides</i>						
climate	3.30	8.46	0.001	1.44	4.90	0.001
geography				1.89	7.47	0.001
bio15	33.51	11.33	0.001	15.19	2.97	0.002
bio09	37.06	12.54	0.001	50.62	3.92	0.001
bio07	14.28	4.83	0.001	11.69	2.29	0.004
prec06	15.15	5.12	0.001	22.50	4.41	0.001
Whole model			0.001			0.001
<i>Quercus spinosa</i>						
<i>West Q. spinosa</i>						
climate	7.58	5.07	0.001	5.62	3.94	0.001
geography				5.12	7.18	0.001
bio15	25.67	3.20	0.002	20.31	3.20	0.001
bio09	23.41	4.74	0.001	16.87	2.65	0.003
bio07	15.76	5.20	0.001	10.78	2.66	0.004
prec06	35.16	7.12	0.001	46.04	7.26	0.001
Whole model			0.001			0.001
<i>East Q. spinosa</i>						
climate	6.04	6.48	0.001	2.98	5.74	0.001
geography				5.19	6.57	0.001
bio15	32.37	8.40	0.001	19.20	4.40	0.001
bio09	30.59	7.94	0.001	26.00	5.97	0.001
bio07	11.28	2.93	0.001	16.40	3.76	0.001
prec06	25.76	6.69	0.001	38.40	8.81	0.001
Whole model			0.001			0.001
<i>All Q. spinosa</i>						
climate	10.34	18.91	0.001	2.67	5.10	0.001
geography				4.13	15.79	0.001
bio15	60.79	45.99	0.001	27.11	5.53	0.001

研究结果

bio09	17.14	12.96	0.001	25.11	5.12	0.001
bio07	14.14	10.69	0.001	23.72	4.83	0.001
prec06	7.93	5.99	0.001	24.06	4.91	0.001
<i>Whole model</i>			0.001			0.001

PVE = percentage of explained variance

3.2.4 梯度森林分析

梯度森林的分析结果表明，在川滇高山栎 Tibet 谱系，HDM-WSP 谱系和所有种群中，季节性降水(bio15)都是对川滇高山栎遗传变异影响最主要的气候因素。而对刺叶高山栎而言，在 West 谱系、East 谱系和所有种群中，六月份降水量(prec06)和季节性降水(bio15)是对刺叶高山栎遗传变异影响最主要的气候因素(图 3.7；表 3.11)。

图 3.8 和图 3.9 分别展示了川滇高山栎 Tibet 谱系、HDM-WSP 谱系和所有种群以及刺叶高山栎 West 谱系、East 谱系和所有种群中的遗传变异沿环境梯度的累积重要性。从图 3.8 中我们可以看出，在川滇高山栎 HDM-WSP 谱系和所有种群中，季节性降水(bio15)在 60mm-70mm 之间的遗传组成变化剧烈，而在 Tibet 谱系中，季节性降水(bio15)影响的遗传组成变化较为平缓，这也印证了 Tibet 谱系的遗传变异受地理变量的影响较大，而环境对其遗传变异的影响较小；另外，在川滇高山栎所有种群中，经度梯度范围在东经 96 度至 98 度之间的遗传组成变化剧烈，此经度范围恰好是川滇高山栎 Tibet 谱系和 HDM-WSP 谱系的分界线（图 3.2），这也验证了川滇高山栎遗传结构的划分结果。从图 3.9 中我们分析出，在刺叶高山栎 West 谱系，East 谱系和所有种群中，季节性降水(bio15)在 60mm-80mm，六月份降水量(prec06)在 180mm-200mm 之间的遗传组成变化剧烈；另外，在刺叶高山栎所有种群中，经度梯度范围在东经 105 度至 110 度之间的遗传组成变化剧烈，此经度范围恰好是刺叶高山栎 West 谱系和 East 谱系的分界线（图 3.2），因此，该结果也验证了刺叶高山栎遗传结构的划分。

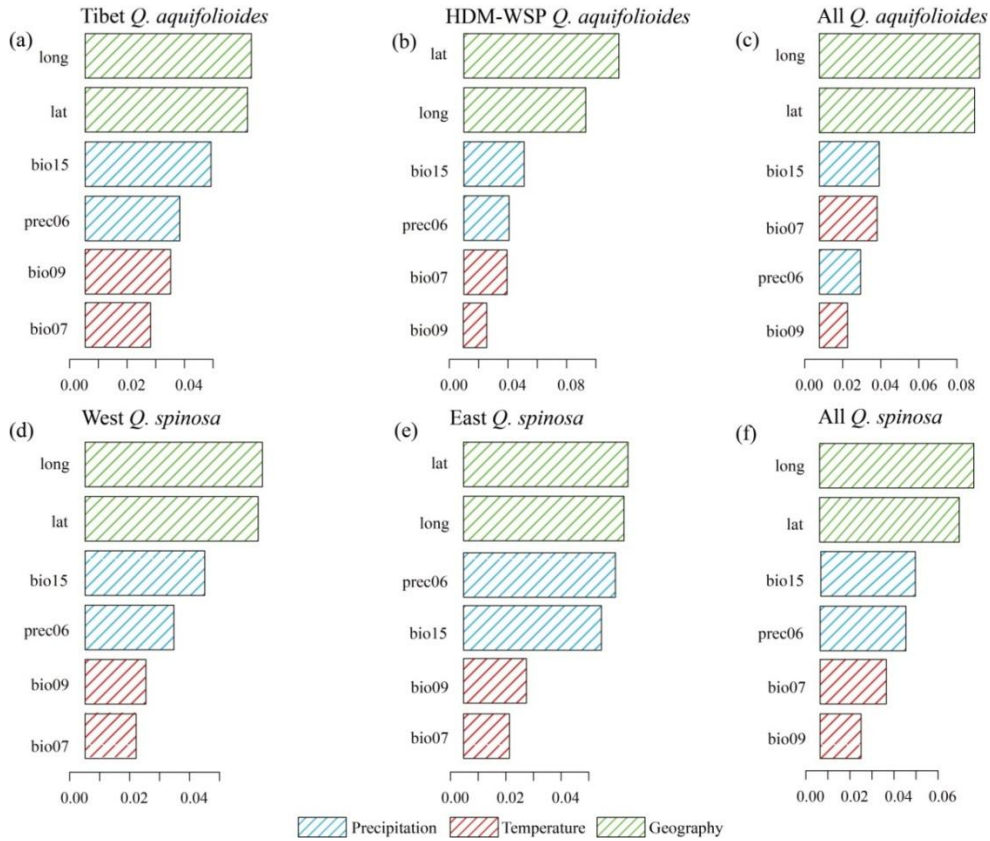


图 3.7 基于 SSR 数据，在(a, b, c)川滇高山栎和(d, e, f)刺叶高山栎每个谱系和所有种群中，对遗传变异和环境梯度进行 GF 模拟的结果

Figure 3.7 Results of GF modeling between genetic variants and environmental gradients in each lineage and all populations of (a, b, c) *Q. aquifolioides* and (d, e, f) *Q. spinosa* based on SSR datasets

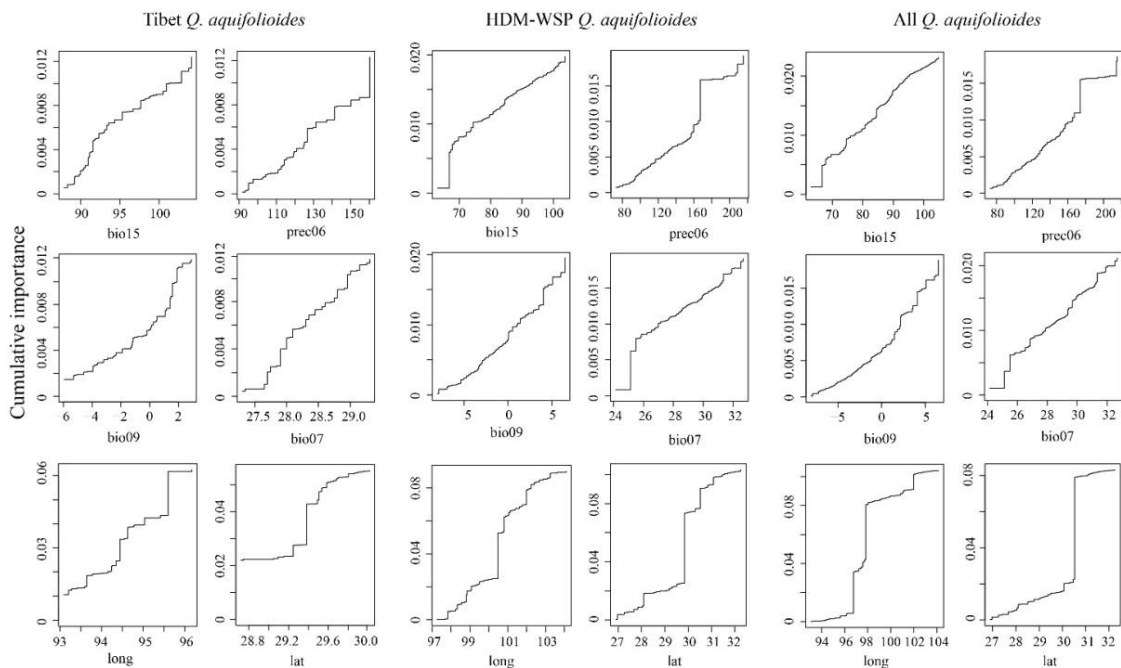


图 3.8 川滇高山栎每个谱系和所有种群中遗传变异沿环境梯度的累积重要性

Figure 3.8 Cumulative importance of genetic variation along environmental gradients in each lineage and all populations of *Q. aquifolioides*

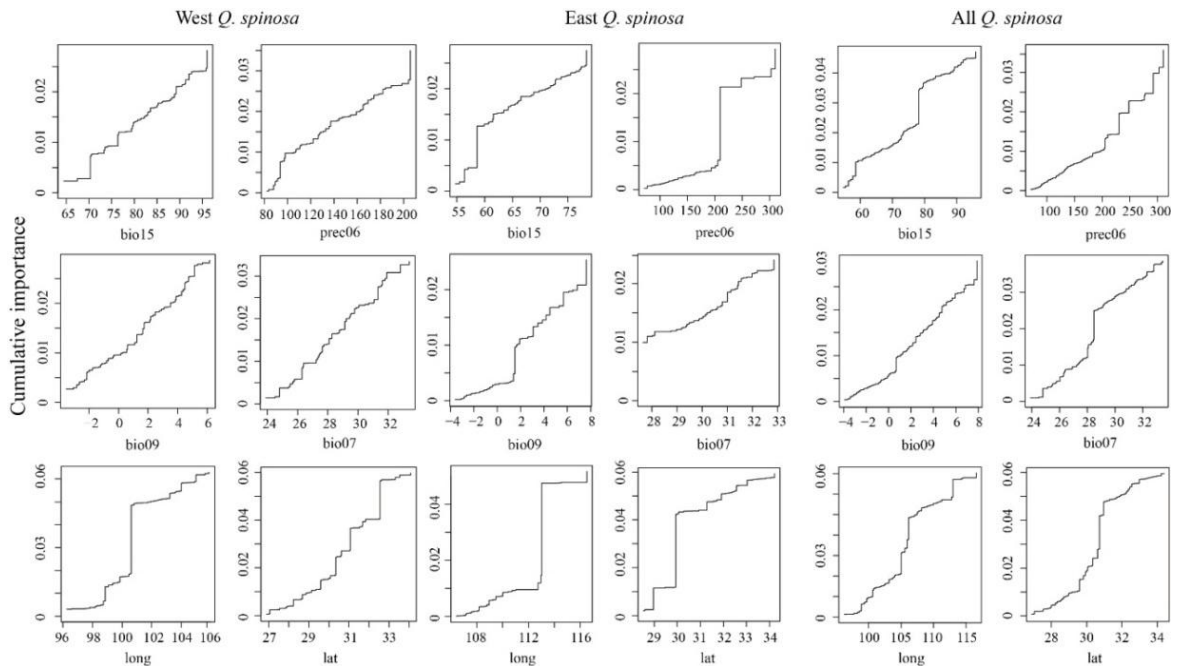


图 3.9 刺叶高山栎每个谱系和所有种群中遗传变异沿环境梯度的累积重要性

Figure 3.9 Cumulative importance of genetic variation along environmental gradients in each lineage and all populations of *Q. spinosa*

表3.11 在川滇高山栎不同谱系和所有种群以及刺叶高山栎不同谱系和所有种群中，对遗传变异和环境梯度进行GF建模的每个环境因子的 R^2 加权重要性结果

Table 3.11 Results of R^2 -weighted importance (%) of each environmental variables of GF modeling between genetic variants and environmental gradients in different lineages and all populations of *Q. aquifolioides* and different lineages and all populations of *Q. spinosa*

Variables	<i>Quercus aquifolioides</i>			<i>Quercus spinosa</i>		
	Tibet	HDM-WSP	All	West	East	All
Long	5.79	8.31	8.43	5.92	5.80	6.98
lat	5.66	10.58	8.16	5.78	5.95	6.32
bio07	2.28	2.95	3.04	1.70	1.66	3.01
bio09	2.98	1.60	1.48	2.03	2.28	1.86
bio15	4.39	4.11	3.15	3.99	4.98	4.36
prec06	3.30	3.08	2.17	2.96	5.49	3.90

3.2.5 广义相异建模分析

广义相异建模的分析结果表明，在川滇高山栎种群的 Tibet 谱系和所有种群中，地理距离分别解释了 62.89%和 59.29%的等位基因变异，是对 Tibet 谱系和所有种群的遗传变异贡献最重要的距离矩阵(图 3.10；表 3.12)，其他环境矩阵对 Tibet 谱系和所有种群的遗传变异的重要性都相对较小。而在 HDM-WSP 谱系中，季节性降水(bio15)环境矩阵解释了 36.22%的等位基因变异，是对 HDM-WSP 谱系的遗传变异最重要的

解释度，其他环境矩阵六月份降水量(prec06)，气温年较差(bio07)对等位基因变异的解释度也相对较高(prec06 = 24.43%, bio07 = 12.68%)。结合上述基于距离矩阵的 Mantel 检验和 RDA 冗余分析，我们得出在川滇高山栎种群的分布范围内，地理距离是影响该物种遗传分化的最主要形式，季节性降水(bio15)是对川滇高山栎物种的遗传变异影响最重要的气候因子。图 3.11 展示了川滇高山栎 Tibet 谱系、HDM-WSP 谱系和所有种群中遗传距离沿环境距离梯度变化的 I-样条曲线。重要性为零的气候因子的 I-样条曲线图未在图中展示。

而在刺叶高山栎种群的 East 谱系和所有种群中，地理距离分别解释了 8.88% 和 53.43% 的等位基因变异，是对 East 谱系和所有种群的遗传变异贡献最重要的距离矩阵(图 3.10; 表 3.12)，其他环境矩阵对 East 谱系和所有种群的遗传变异的重要性都相对较小；而在 West 谱系中，季节性降水(bio15)环境矩阵解释了 30.80% 的等位基因变异，是对 West 谱系的遗传变异最重要的解释度，六月份降水量(prec06)对等位基因变异的解释度也相对较高(prec06 = 27.82%)。结合上述基于距离矩阵的 Mantel 检验和 RDA 冗余分析，我们得出在刺叶高山栎种群的分布范围内，地理距离是影响该物种遗传分化的最主要形式，季节性降水(bio15)和六月份降水量(prec06)是对刺叶高山栎物种的遗传变异影响最重要的气候因子。图 3.12 展示了刺叶高山栎 West 谱系、East 谱系和所有种群中遗传距离沿环境距离梯度变化的 I-样条曲线。重要性为零的气候因子的 I-样条曲线图未在图中展示。

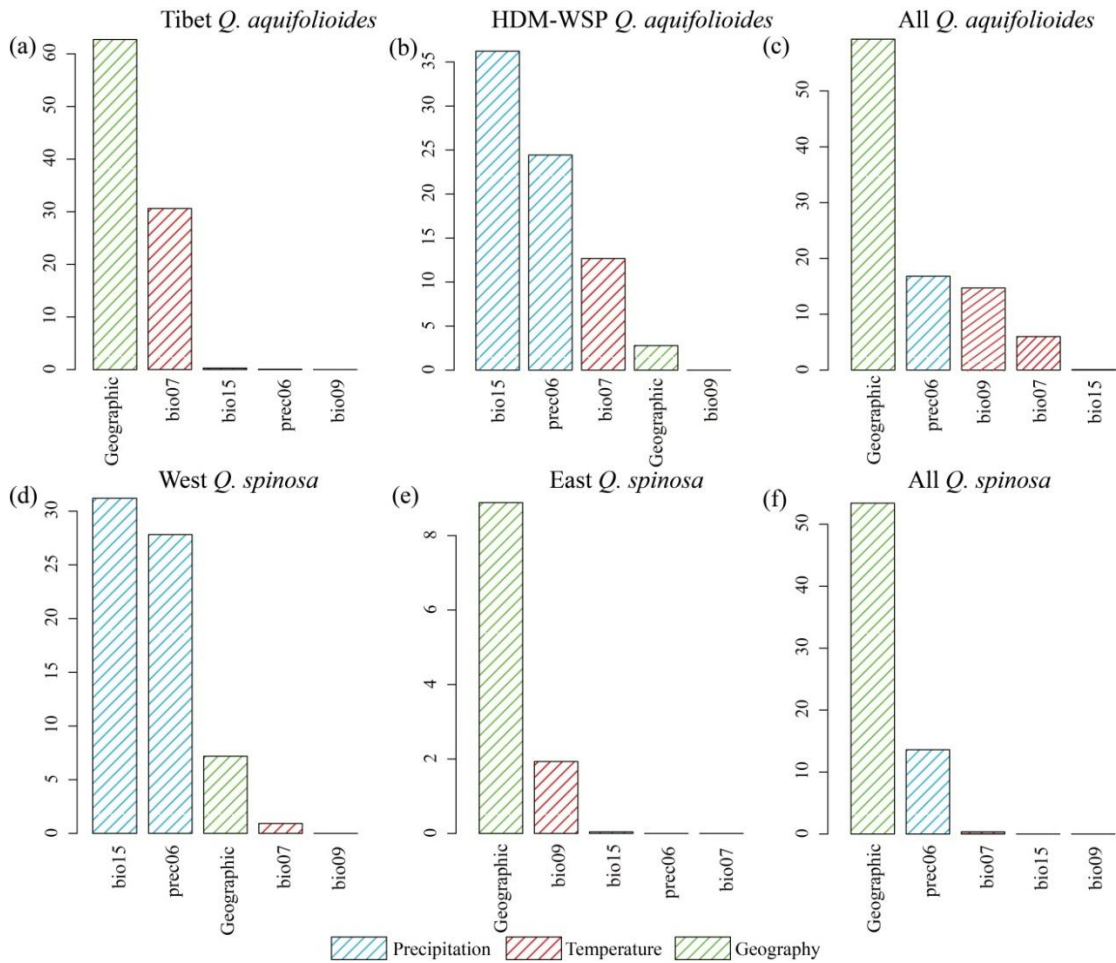


图 3.10 基于 SSR 数据，在(a, b, c)川滇高山栎和(d, e, f)刺叶高山栎每个谱系和所有种群中，对遗传变异和环境梯度进行 GDM 模拟的结果

Figure 3.10 Results of GDM modeling between genetic variants and environmental gradients in each lineage and all populations of (a, b, c) *Q. aquifolioides* and (d, e, f) *Q. spinosa* based on SSR datasets

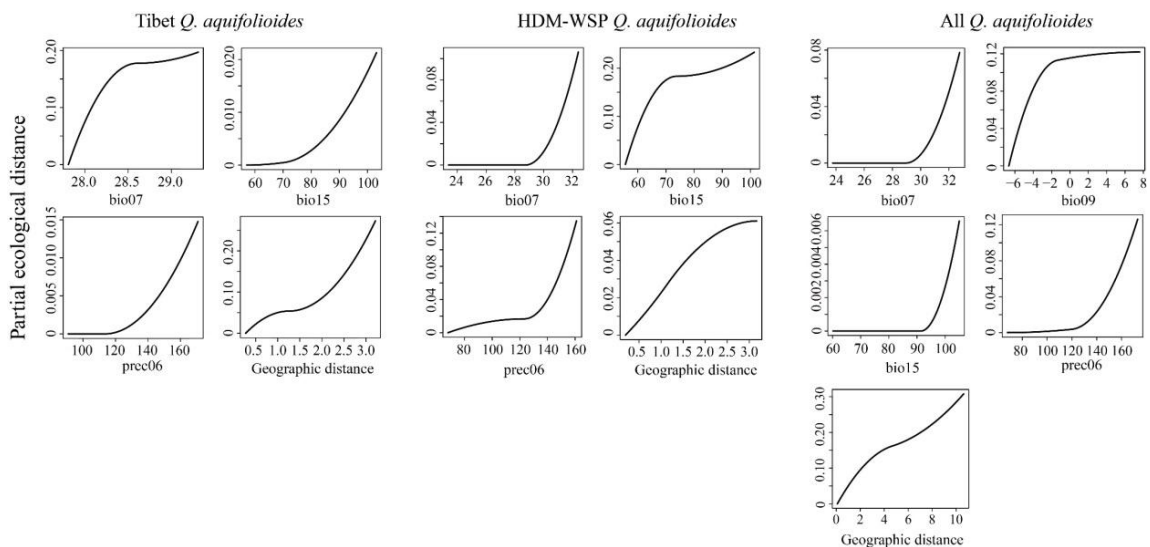


图 3.11 川滇高山栎不同谱系和所有种群中遗传距离沿环境距离梯度变化的 I-样条曲线
Figure 3.11 I-splines showing changes genetic distance along environmental distance gradients in different lineages and all populations of *Q. aquifolioides*

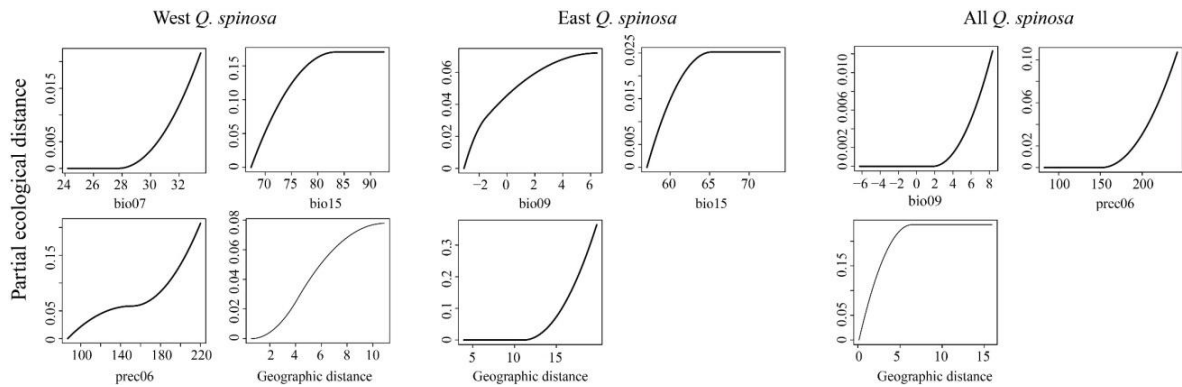


图3.12 刺叶高山栎不同谱系和所有种群中遗传距离沿环境距离梯度变化的I-样条曲线

Figure 3.12 I-splines showing changes genetic distance along environmental distance gradients in different lineages and all populations of *Q. spinosa*

表3.12 在川滇高山栎不同谱系和所有种群以及刺叶高山栎不同谱系和所有种群中,对遗传变异和环境梯度进行GDM建模的每个环境因子的变量重要性(%)结果

Table 3.12 Results of variable importance (%) of each environmental variables of GF modeling between genetic variants and environmental gradients in different lineages and all populations of *Q. aquifolioides* and different lineages and all populations of *Q. spinosa*

Variables	<i>Quercus aquifolioides</i>			<i>Quercus spinosa</i>		
	Tibet	HDM-WSP	All	West	East	All
Geographic	62.89	2.78	59.29	7.19	8.88	53.43
bio07	30.61	12.68	5.99	0.92	0.00	0.00
bio09	0.00	0.00	14.70	0.00	1.93	0.35
bio15	0.27	36.22	0.08	30.80	0.04	0.00
prec06	0.07	24.43	16.81	27.82	0.00	13.56

4 讨论

4.1 川滇高山栎与刺叶高山栎的遗传结构与遗传多样性

4.1.1 遗传结构

本研究基于 15 对 SSR 标记数据,对川滇高山栎 60 个种群,996 个个体以及刺叶高山栎 46 个种群,661 个个体进行了遗传结构的鉴定。对两个高山栎物种遗传结构的研究得到了一致的结果,川滇高山栎和刺叶高山栎在其各自的分布区内都存在明显的遗传结构:川滇高山栎在其分布区内分化出两个明显的遗传谱系,分别是分布于西藏东部的种群(Tibet 谱系)以及分布于喜马拉雅-横断山脉/川西高原的种群(HDM-WSP 谱系);刺叶高山栎在其分布区内也分化出两个明显的遗传谱系,分别是分布于中国西部横断山脉地区的种群(West 谱系)以及分布于秦岭山脉及中国东部地区的种群(East 谱系)。川滇高山栎遗传结构的分析结果与 Du 等(2017)基于 SSR 遗传标记的分析结果一致,而刺叶高山栎遗传结构的分析结果与 Ju 等(2019)基于 Specific Length Amplified Fragment(SLAF) 简化基因组数据的分析结果一致。

川滇高山栎和刺叶高山栎的分化结构可能是由物种的种群历史动态造成的(Ju *et al.*, 2019; Du *et al.*, 2017)。川滇高山栎在中新世(Miocene)晚期从青海-西藏高原中部进入西藏接着到达西藏东部区域,受第四纪(Quaternary)气候震荡的原因以及喜马拉雅山脉隆升过程造成的影响,西藏东部区域的气候条件变得不适宜川滇高山栎生存,该物种随即迁移到气候温暖适宜的横断山脉区域,该区域则成为了川滇高山栎物种在冰期的避难所,气候回暖后又回迁至西藏东部区域,对这两个分布区域差异明显的环境条件的适应造成了川滇高山栎的分化(Du *et al.*, 2017)。

青藏高原主要的抬升发生在距今 10Ma 年前(Meng *et al.*, 2017),由于受到青藏高原抬升的影响,在中新世(Miocene)晚期,刺叶高山栎经历了明显的分化(Ju *et al.*, 2019),在末次间冰期(Last Interglacial, LIG),刺叶高山栎适宜生存的区域在今横断山脉附近;随着末次盛冰期(Last Glacial Maximum, LGM)来临,刺叶高山栎生存区域的气候变得寒冷,该物种又经历了种群的扩张,到达秦岭山脉和中国东部附近;因此,横断山脉和秦岭山脉及中国东部成为刺叶高山栎分布的区域。由于横断山脉复杂的地质结构和气候带的垂直转变,构成了高山植被的自然地理屏障(Chen *et al.*, 2011),导致了刺叶高山栎的遗传分化。在其他的研究报道中,表明长时期的地理隔离和生态因素的变化会促进物种种内的高遗传分化(Xu *et al.*, 2015; Gong *et al.*, 2008)。刺叶高山栎具有世代时间长,风媒传粉,种子因重力和啮齿动物散布的特征(Austerlitz *et al.*, 2000)。大多数橡树种子只是由于重力而散落在母树周围,只有少数种子随山地地形散布或被小型啮齿动物(例如松鼠和老鼠)和松鸦携带有限的距离(Xiao *et al.*, 2009; Gómez, 2003; Gomez *et al.*, 2003)。由于横断山脉复杂的地形成为橡树播种或花粉散播的有效地理屏障(Liu *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013),为刺叶高山栎两个谱系的独立进化提供了潜

在条件。此外，川滇高山栎和刺叶高山栎的遗传分化主要存在于种群内，这都表明了川滇高山栎和刺叶高山栎种内高的遗传分化水平和明显的分化结构。

4.1.2 遗传多样性

对川滇高山栎遗传多样性的结果表明了 HDM-WSP 遗传多样性高于 Tibet 谱系，Du 等(2017)基于叶绿体 DNA 片段和 SSR 的证据表明，川滇高山栎在冰期为了躲避西藏区域寒冷干燥的环境条件而迁移至现 HDM-WSP 谱系所在的喜马拉雅 - 横断山脉/川西高原区域，因此 HDM-WSP 谱系所在的区域作为川滇高山栎物种在冰期的避难所，对于其遗传多样性的维持起到了很好地保护作用(Favre *et al.*, 2015; López-Pujol *et al.*, 2011); 而 Tibet 谱系低的遗传多样性反映了该地区川滇高山栎物种灭绝-重新移植的动态历史，当气候变暖之后，川滇高山栎回迁至 Tibet 谱系所在的区域，或者仅分布在 HDM-WSP 区域的部分川滇高山栎回迁至 Tibet 谱系所在的区域(Qiu *et al.*, 2011; Du *et al.*, 2017; Meng *et al.*, 2017)，而此过程可能造成了遗传多样性的丢失。而刺叶高山栎遗传多样性的结果可能是历史基因流导致的，East 谱系受到了来自 West 谱系更多的基因流。本结果也得到了 Ju 等(2019)的证明，在末次盛冰期(Last Glacial Maximum, LGM)，刺叶高山栎发生了从横断山脉向秦岭山脉和中国东部的种群扩张；在距今大约 0.11 Ma 年前，刺叶高山栎在分布区内又发生了从横断山脉向秦岭山脉的不对称基因交流。

4.2 川滇高山栎与刺叶高山栎的遗传变异应对环境梯度响应机制

Mante 检验，偏 Mantel 检验以及 MRM 对川滇高山栎和刺叶高山栎进行遗传变异应对环境梯度的响应机制分析均得到了一致的结果：在川滇高山栎 Tibet 谱系和刺叶高山栎 East 谱系中，检测到显著的地理隔离的模式，而在川滇高山栎 HDM-WSP 谱系和刺叶高山栎 West 谱系中，检测到显著的环境隔离的模式。上述检验结果也同时得到了 GDM, GF 和 RDA 的验证：在川滇高山栎 Tibet 谱系和刺叶高山栎 East 谱系中，地理距离解释了最高的变量重要性和百分比解释度。这些结果表明，川滇高山栎 Tibet 谱系以及刺叶高山栎 East 谱系的遗传特征主要反映了种群进化历史的演变，并未受到来自环境的强烈选择压力的驱动。相反的是，通过 GDM, GF 和 RDA 都表明了季节性降水(bio15)是驱动川滇高山栎 HDM-WSP 谱系遗传变异最主要的因素；六月份降水量(prec06)和季节性降水(bio15)是驱动刺叶高山栎 West 谱系遗传变异最主要的因素。

我们的发现表明了川滇高山栎 Tibet 谱系和 HDM-WSP 谱系，以及刺叶高山栎 West 谱系和 East 谱系展现了不同的遗传机制。在川滇高山栎 Tibet 谱系和刺叶高山栎 East 谱系中检测到的地理隔离的模式，反映了这两个谱系受到了进化历史驱动的影响；而在川滇高山栎 HDM-WSP 谱系和刺叶高山栎 West 谱系中，则很大程度上反映了受环境压力驱动的自然选择的影响。在其他研究报道中，如在欧洲山毛榉(Pluess *et al.*,

2016; Csilléry *et al.*, 2014)和栎树的研究中(Pina-Martins *et al.*, 2018; Gugger *et al.*, 2017; Sork *et al.*, 2016)都报道了与环境变量一致的遗传模式。我们在两个高山栎物种中鉴定出的适应模式，揭示了这两个物种在其分布范围内的进化动态。

5 结论与展望

5.1 结论

本研究使用 15 对 SSR 分子标记从种群遗传及景观方面对川滇高山栎和刺叶高山栎的遗传结构、遗传多样性及遗传变异对环境梯度的响应模式进行分析，得到以下主要结论：

(1) 川滇高山栎和刺叶高山栎种群结构分析表明：这两个物种在其各自的分布范围内呈现出明显的遗传谱系。这可能与这两个物种的进化历史相关，受青藏高原抬升的影响，川滇高山栎和刺叶高山栎在其分布范围内，形成了明显的遗传分化结构。

(2) 川滇高山栎和刺叶高山栎种群的遗传多样性和遗传分化的分析结果表明，川滇高山栎 HDM-WSP 谱系的遗传多样性高于 Tibet 谱系，刺叶高山栎 East 谱系的遗传多样性高于 West 谱系。川滇高山栎这一结果的原因可能与横断山脉作为川滇高山栎在冰期的避难所有关，HDM-WSP 谱系因此保留了更多的遗传多样性；这一结果也得到了基因流分析的证明，川滇高山栎历史基因流的方向是从 Tibet 谱系向 HDM-WSP 谱系方向；刺叶高山栎这一结果可能与 West 谱系和 East 谱系的历史基因流有关，East 谱系受到了来自 West 谱系更多的基因流。川滇高山栎和刺叶高山栎遗传分化都明显高于其他研究报告中栎树的遗传分化，这与川滇高山栎和刺叶高山栎种内明显的分化结构有关。

(3) 川滇高山栎和刺叶高山栎遗传变异对环境梯度的响应机制分析表明，川滇高山栎和刺叶高山栎遗传谱系对环境梯度呈现不同的响应机制。在川滇高山栎 Tibet 谱系和刺叶高山栎 East 谱系中，地理变量对遗传变异的影响最重要；而川滇高山栎 HDM-WSP 谱系的遗传变异主要受到季节性降水(bio15)的影响，刺叶高山栎 West 谱系的遗传变异主要受到季节性降水(bio15)和六月份降水量(prec06)的影响。

5.2 展望

(1) 本文基于 SSR 分子标记对川滇高山栎和刺叶高山栎进行了种群和景观遗传学方面的研究。随着测序技术的不断发展，测序的成本变得越来越低，未来可结合重测序、简化基因组测序等高通量测序手段获得的特异性位点信息进行整合，以期充分探讨川滇和刺叶高山栎的种群和景观遗传学特征。

(2) 物种的遗传多样性和种群结构在很大程度上取决于物种内在特征和外部生态环境（包括人为活动和历史事件），有效鉴别物种的遗传结构和相关因素可以促进对物种进化历史的理解。本研究分析了川滇高山栎和刺叶高山栎遗传结构和遗传多样性，并未探讨这两个物种的进化历史，未来的研究可从物种进化历史的角度入手，来更加深入地挖掘川滇高山栎和刺叶高山栎种群遗传学特征。

(3) 使用梯度森林(Gradient Forest, GF)和广义相异模型(Generalized Dissimilarity Modelling, GDM)探讨遗传变异对环境梯度的响应模式。未来的研究中，可结合梯度

森林 (Gradient Forest, GF)、广义相异模型 (Generalized Dissimilarity Modelling, GDM) 和非适应性风险分析 (Risk of Non-adaptedness, RONA) 的预测功能, 分析在未来的环境变量之下, 遗传变异对环境梯度的响应模式, 以此来探讨川滇高山栎和刺叶高山栎种群在未来环境状况下的适应潜力。

(4) 植物叶片的表型可塑性在植物对环境的适应方面发挥着重要的作用, 随着形态学标记方法的不断发展, 传统的线性测量方法和几何形态学方法都得到了极大的完善和提高, 未来可将川滇高山栎和刺叶高山栎叶型数据与遗传数据相结合, 在生态学层面对川滇高山栎和刺叶高山栎种群的遗传特征进行探讨。

(5) 本文选取的 15 对 SSR 分子标记, 其中的 8 对引物选自本实验室已发表的文献中, 且已经经过了中性位点的验证, 另外的 7 对引物并未经过中性验证, 在未来的研究中, 可使用如 BayeScan 等特异性位点软件来检测自然选择下的 SSR 基因位点。

参考文献

- [1] 陈焕镛, 黄成就. 中国植物志: 第二十二卷[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [2] 端木旸. 我国栎属资源的综合利用[J]. 河北林果研究, 1994, 9 (2): 177-181.
- [3] 黄晓霞, 冯程程, 姜永雷等. 云南玉龙雪山川滇高山栎生理生化特性对海拔梯度的响应[J]. 西部林业科学, 2015, 44 (04): 1-6.
- [4] 马长乐. 栎属高山栎组的系统学与生物地理学[D]: 中国科学院昆明植物研究所, 2006.
- [5] 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): 23-29.
- [6] 王晓宇. 模式分类中特征选择算法的研究[D]: 哈尔滨理工大学, 2015.
- [7] 王玉垚. 基于干旱及缺氧候选基因的生态适应研究: 以川滇高山栎为例[D]: 北京林业大学, 2018.
- [8] 王玉垚, 张悦, 方剑火等. 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(自然科学版), 2018, 054 (006): 811-816.
- [9] 吴义强. 刺叶高山栎苗木繁殖及园林绿化[J]. 中国农业信息, 2015, 182 (21): 13.
- [10] 徐刚标. 植物群体遗传学[M]: 科学出版社, 2009.
- [11] 徐永椿, 任宪威. 云南壳斗科的分类与分布(一)[J]. 中国科学院大学学报, 1975, 13 (4): 9-26.
- [12] 周浙昆. 中国栎属的起源演化及其扩散[J]. 植物分类与资源学报, 1992, 14 (3): 227-236.
- [13] 周浙昆, 普春霞, 陈文允. 青藏高原隆起和高山栎组(壳斗科)分布的关系[J]. 2003.
- [14] Amos W, Hoffman J I, Frodsham A, Zhang L, Best S, Hill A V S. Automated binning of microsatellite alleles: problems and solutions[J]. Molecular Ecology Resources, 2007, 7(1): 10-14.
- [15] Ana L, Albarran-Lara, Petit R J, Kremer A, Caron H, Oyama K. Low genetic differentiation between two morphologically and ecologically distinct giant-leaved Mexican oaks[J]. Plant Systematics & Evolution, 2019, 305(1): 89-101.
- [16] Andrews K R, Good J M, Miller M R, Luikart M, Hohenlohe P A. Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics[J]. Nature Reviews Genetics, 2016, 17(2): 81-92.
- [17] Austerlitz F, Mariette S, Machon N, Gouyon P H, Godelle B. Effects of colonization processes on genetic diversity: differences between annual plants and tree species[J]. Genetics, 2000, 154(3): 1309-1321.
- [18] Barrett R D H, Hoekstra H E. Molecular spandrels: test of adaptation at the genetic level[J]. Nature Reviews Genetics, 2011, 12(11): 767-780.
- [19] Beaumont M A, Balding D J. Identifying adaptive genetic divergence among populations from genome scans[J]. Molecular Ecology, 2004, 13(4): 969-980.
- [20] Beaumont M A, Nichols R A. Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure[J]. Proceedings B, 1996, 263(1377): 1619-1626.
- [21] Beerli P. Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach[J]. Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America, 2001, 98(8): 4563-4568.
- [22] Beerli P. Comparison of Bayesian and maximum-likelihood inference of population genetic parameters[J]. Bioinformatics, 2006, 22(3): 341-345.
- [23] Beerli P, Palczewski M. Unified framework to evaluate panmixia and migration direction among multiple sampling locations[J]. Genetics, 2010, 185(1): 313-326.

- [24] Borrell J S, Zohren J, Nichols R A, Buggs R J A. Genomic assessment of local adaptation in dwarf birch to inform assisted gene flow[J]. *Evolutionary Applications*, 2020, 13(1): 161-175.
- [25] Bray J R, Curtis J T. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin[J]. *Ecological Monographs*, 1957, 27(4): 325-349.
- [26] Breiman L. Statistical modeling: the two cultures[J]. *Statistica*, 2001, 16(3): 199-215.
- [27] Chen D, Kang H, Liu C. An overview on the potential quaternary glacial refugia of plants in China Mainland[J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2011, 31(5): 623-632.
- [28] Coop G, Witonsky D, Rienzo A D, Pritchard J K. Using environmental correlations to identify loci underlying local adaptation[J]. *Genetics*, 2010, 185(4): 1411-1423.
- [29] Csilléry K, Lalagüe H, Vendramin G G, González-Martínez S C, Fady B, Oddou-Muratorio S. Detecting short spatial scale local adaptation and epistatic selection in climate-related candidate genes in European beech (*Fagus sylvatica*) populations[J]. *Molecular Ecology*, 2014, 23(19): 4696-4708.
- [30] Davey J W, Hohenlohe P A, Etter P D, Boone J Q, Catchen J M, Blaxter M L. Genomewide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2011, 12(7): 499-510.
- [31] Davis M B, Shaw R G. Range shifts and adaptive responses to Quaternary climate change[J]. *Science*, 2001, 292(5517): 673-679.
- [32] de Lafontaine G, Napier J D, Petit R J, Hu F S. Invoking adaptation to decipher the genetic legacy of past climate change[J]. *Ecology*, 2018, 99(7): 1530-1546.
- [33] Denk T, Grimm G W, Manos P S, Deng M, Hipp A. An updated infrageneric classification of the oaks: review of previous taxonomic schemes and synthesis of evolutionary patterns[J]. *bioRxiv*, 2018, 13-38.
- [34] Diniz-Filho J A F, Soares T N, Lima J S, Dobrovolski R, Landeiro V L, de Campos Telles M P, Rangel T F, Bini L M. Mantel test in population genetics[J]. *Genetics & Molecular Biology*, 2013, 36(4): 475-485.
- [35] Doyle J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19(1): 11-15.
- [36] Du F K, Hou M, Wang W T, Mao K S, 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.
- [37] Du F K, Wang T R, Wang Y Y, Ueno S, de Lafontaine, G. Contrasted patterns of local adaptation to climate change across the range of an evergreen oak, *Quercus aquifolioides*[J]. *Evolutionary Applications*, 2020, 00: 1-15.
- [38] Durand J, Bodénès C, Chancerel E, de Daruvar A, Kremer A, Plomion C. A fast and cost-effective approach to develop and map EST-SSR markers: oak as a case study[J]. *BMC Genomics*, 2010, 11(1): 570.
- [39] 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.
- [40] Ellegren H. Genome sequencing and population genomics in non-model organisms[J]. *Trends in Ecology and Evolution*, 2014, 29(1): 51-63.
- [41] Ellis N, Smith S J, Pitcher C R. Gradient forests: calculating importance gradients on physical predictors[J]. *Ecology*, 2012, 93(1): 156-168.
- [42] 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.
- [43] Eveno E, Collada C, Guevara M A, Cervera M T, Plomion C, Garnier-Gué P H. Contrasting Patterns of selection at *Pinus pinaster* Ait. drought stress candidate genes as revealed by genetic differentiation analyses[J]. *Molecular Biology & Evolution*, 2008, 25(2): 417-437.
- [44] Excoffier L, Hofer T, Foll M. Detecting loci under selection in a hierarchically structured population[J]. *Heredity*, 2009, 103(4): 285-298.
- [45] Excoffier L, Lischer H E L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2010, 10(3): 564-567.
- [46] Falush D, Stephens M, Pritchard J K. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies[J]. *Genetics*, 2003, 164(4): 1567-1587.
- [47] Favre A, Paeckert M, Pauls S U, Jaehnic S C, Uhl D, Michalak I, Muellner-Riehl A N. The role of the uplift of the Qinghai-Tibetan Plateau for the evolution of Tibetan biotas[J]. *Biological Reviews*, 2015, 90(1): 236-253.
- [48] Feng L, Zhang Y P, Chen X D, Yang J, Zhou T, Bai G Q, Yang J, Li Z H, Peng C I, Zhao G F. Allopatric divergence, local adaptation, and multiple Quaternary refugia in a long-lived tree (*Quercus spinosa*) from subtropical China[J]. *bioRxiv*, 2017, 112375.
- [49] Ferrier S, Manion G, Elith J, Richardson K. Using generalized dissimilarity modelling to analyse and predict patterns of beta diversity in regional biodiversity assessment[J]. *Diversity & Distributions*, 2007, 13(3): 252-264.
- [50] Fick S E, Hijmans R J. WorldClim 2: new 1 - km spatial resolution climate surfaces for global land areas[J]. *International Journal of Climatology*, 2017, 37(12): 4302-4315.
- [51] Fisher R A. The Genetical theory of natural selection[J]. *Biological Reviews*, 1930, 1(4): 1419.
- [52] Fitzpatrick M C, Keller S R. Ecological genomics meets community-level modelling of biodiversity: mapping the genomic landscape of current and future environmental adaptation[J]. *Ecology Letters*, 2015, 18(1): 1-16.
- [53] Frichot E, Francois O. LEA: An R package for landscape and ecological association studies[J]. *Methods in Ecology & Evolution*, 2015, 6(8): 925-929.
- [54] Frichot E, Schoville S D, Bouchard G, François O. Testing for associations between loci and environmental gradients using latent factor mixed models[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(7): 1687-1699.
- [55] Gao J, Liu Z O, Zhao W, Tomlinson K W, Xia S W, Zeng Q Y, Wang X R, Chen J. Combined genotype and phenotype analyses reveal patterns of genomic adaptation to local environments in the subtropical oak *Quercus acutissima*[J]. *Journal of Systematics and Evolution*, 2020.
- [56] Geraldes A, Farzaneh N, Grassa C J, Mckown A D, Guy R D, Mansfield S D, Douglas C J, Cronk Q C B. Landscape genomics of *Populus trichocarpa*: the role of hybridization, limited gene flow, and natural selection in shaping patterns of population structure[J]. *Evolution*, 2014, 68(11): 3260-3280.
- [57] Glaubitz J C. 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.
- [58] Gómez J M. Spatial patterns in long-distance dispersal of *Quercus ilex* acorns by jays in a heterogeneous landscape[J]. *Ecography*, 2003, 26(5): 573-584.
- [59] Gómez J M, Garcia D, Zamora R. Impact of vertebrate acorn- and seedling-predators on a Mediterranean *Quercus pyrenaica* forest[J]. *Forest Ecology & Management*, 2003, 180(1-3): 125-134.

- [60] Gong W, Chen C, Christoph D, Fu C X, Koch M A. Phylogeography of a living fossil: Pleistocene glaciations forced *Ginkgo biloba* L. (Ginkgoaceae) into two refuge areas in China with limited subsequent postglacial expansion[J]. *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 2008, 48(3): 1094-1105.
- [61] Goslee S C, Urban D L. The ecodist package for dissimilarity-based analysis of ecological data[J]. *Journal of Statistical Software*, 2007, 22(7): 1-19.
- [62] Gower J C. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis[J]. *Biometrika*, 1966, 53(3-4): 325-338.
- [63] Gugger P F, Liang C T, Sork V L, Hodgskiss P, Wright J W. Applying landscape genomic tools to forest management and restoration of Hawaiian koa (*Acacia koa*) in a changing environment[J]. *Evolutionary Applications*, 2017, 11: 231-242.
- [64] Haasl R J, Payseur B A. Fifteen years of genomewide scans for selection: trends, lessons and unaddressed genetic sources of complication[J]. *Molecular Ecology*, 2016, 25(1): 5-23.
- [65] Haldane J B S. A mathematical theory of natural and artificial selection[J]. *Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society*, 1926, 1(5): 158-163.
- [66] Harmon L J, Posada R E G. Poor statistical performance of the mantel test in phylogenetic comparative analysis[J]. *Evolution*, 2010, 64(7): 2173-2178.
- [67] Hewitt G M. The genetic legacy of the Quaternary ice ages[J]. *Nature*, 2000, 405(6789): 907-913.
- [68] Hewitt G M. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 2004, 359(1442): 183-195.
- [69] Hijmans R J. Geosphere: spherical trigonometry. R package geosphere version 1.5-7[J], 2014, 1549-1553.
- [70] Hoffmann A A, Yvonne W. Detecting genetic responses to environmental change[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2008, 9(6): 421-432.
- [71] Hohenlohe P A, Phillips P C, Cresko W A. Using Population Genomics to Detect Selection in Natural Populations: Key Concepts and Methodological Considerations[J]. *International Journal of Plant Sciences*, 2010, 171(9): 1059-1071.
- [72] Holderegger R, Kamm U, Gugerli F. Adaptive vs. neutral genetic diversity: implications for landscape genetics[J]. *Landscape Ecology*, 2006, 21(6): 797-807.
- [73] Hubert F, Grimm G W, Jousset E, Berry V, Franc A, Kremer A. Multiple nuclear genes stabilize the phylogenetic backbone of the genus *Quercus*[J]. *Systematics & Biodiversity*, 2014, 12(4): 405-423.
- [74] Hubisz M J, Falush D, Stephens M, Pritchard J K. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2009, 9(5): 1322-1332.
- [75] Hughes A R, Inouye B D, Johnson M T J, Underwood N, Vellend M. Ecological consequences of genetic diversity[J]. *Ecology Letters*, 2008, 11(6): 609-623.
- [76] Hulce D, Li X, Snyderleiby T, Johathan Liu C S. GeneMarker® genotyping software: tools to increase the statistical power of DNA fragment analysis[J]. *Journal of Biomolecular Techniques*, 2011, 22: S35.
- [77] Huntley B, Birks H J B. An atlas of past and present pollen maps for Europe 0–13,000 years ago[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1983.
- [78] Jackson S T, Overpeck J T, Webb Iii T, Keatch S E, Anderson K H. Mapped plant-macrofossil and pollen records of late quaternary vegetation change in Eastern North America[J]. *Quaternary Science Reviews*, 1997, 16(1): 1-70.

- [79] Jombart T. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers[J]. *Bioinformatics*, 2008, 24(11): 1403-1405.
- [80] Jombart T, Ahmed I. adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 3070-3071.
- [81] Joost S, Bonin A, Bruford M W, Despres L, Conord C, Erhardt G, Taberlet P. A spatial analysis method (SAM) to detect candidate loci for selection: towards a landscape genomics approach to adaptation[J]. *Molecular Ecology*, 2007, 16(18): 3955-3969.
- [82] Joost S, Kalbermatten M, Bonin A. Spatial analysis method (SAM): A software tool combining molecular and environmental data to identify candidate loci for selection[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2008, 8(5): 957-960.
- [83] Ju M M, Feng L, Yang J, Yang Y C, Chen X D, Zhao G F. Evaluating population genetic structure and demographic history of *Quercus spinosa* (Fagaceae) based on specific length amplified fragment sequencing[J]. *Frontiers in Genetics*, 2019, 10: 965.
- [84] Kampf S, Lexer C, Glössl J, Steinkellner H. Characterization of (GA)_n microsatellite loci from *Quercus robur*[J]. *Hereditas*, 1998, 129(2): 183-186.
- [85] Kimura M. Evolutionary rate at the molecular level[J]. *Nature*, 1968, 217(5129): 624-626.
- [86] Kimura M, Crow J F. The number of alleles that can be maintained in a finite population[J]. *Genetics*, 1964, 49(4): 725-738.
- [87] Kimura M, Ohta T. Protein polymorphism as a phase of molecular evolution[J]. *Nature*, 1971, 229(5285): 467-469.
- [88] Kremer A. Microevolution of European temperate oaks in response to environmental changes[J]. *Comptes Rendus Biologies*, 2016, 339(7-8): 263-267.
- [89] Kremer A, Ronce O, Robledo-Arnuncio J J, Kuparinen A, Gerber S, Schueler S. Long-distance gene flow and adaptation of forest trees to rapid climate change[J]. *Ecology Letters*, 2012, 15(4): 378-392.
- [90] Lasky J R, Des Marais D L, McKay J K, Richards J H, Juenger T E, Keitt T H. Characterizing genomic variation of *Arabidopsis thaliana*: The roles of geography and climate[J]. *Molecular Ecology*, 2012, 21(22): 5512-5529.
- [91] Legendre P, Legendre L. *Complex ecological data sets*[M]: Elsevier, 2012.
- [92] Li L, Abbott R J, Liu B B, Sun Y S, Li L L, Zou J B, Wang X, Miede G, Liu J Q. Pliocene intraspecific divergence and Plio-Pleistocene range expansions within *Picea likiangensis* (Lijiang spruce), a dominant forest tree of the Qinghai-Tibet Plateau[J]. *Molecular Ecology*, 2013, 22(20): 5237-5255.
- [93] Liaw A, Wiener M. Classification and regression by random Forest[J]. *R News*, 2002, 23(23), 18-22.
- [94] Lichstein J W. Multiple regression on distance matrices: a multivariate spatial analysis tool[J]. *Plant Ecology*, 2007, 188(2): 117-131.
- [95] Lischer H E L, Excoffier L. PGDSpider: an automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs[J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(2): 298-299.
- [96] Liu J, Moller M, Provan J, Gao L M, Poudel R C, Li D Z. Geological and ecological factors drive cryptic speciation of yews in a biodiversity hotspot[J]. *New Phytologist*, 2013, 199(4): 1093-1108.
- [97] Liu J Q, Sun Y S, Ge X J, Gao L M, Qiu Y X. Phylogeographic studies of plants in China: Advances in the past and directions in the future[J]. *Journal of Systematics & Evolution*, 2012, 50(4): 267-275.

- [98] López-Pujol J, Zhang F M, Sun H Q, Ying T S, Ge S. Centres of plant endemism in China: places for survival or for speciation? [J]. *Journal of Biogeography*, 2011, 38(7): 1267-1280.
- [99] Luikart G, England P, Tallmon D, Jordan S, Taberlet P. The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2003, 4(12): 981-994.
- [100] Manel S, Joost S, Epperson B K, Holderegger R, Storer A, Rosenberg M S, Scribner K T, Bonin A, Fortin M J. Perspectives on the use of landscape genetics to detect genetic adaptive variation in the field[J]. *Molecular Ecology*, 2010, 19(17): 3760-3772.
- [101] Manel S, Schwartz M K, Luikart G, Taberlet P. Landscape genetics: Combining landscape ecology and population genetics[J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2003, 18(4): 189-197.
- [102] Manion G, Lisk M, Ferrier S. Package'gdm', A toolkit with functions to fit, plot, and summarize Generalized Dissimilarity Models: CRAN Repository, R[J], 2018.
- [103] Mantel N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach[J]. *Cancer Research*, 1967, 27(2): 209-220.
- [104] Manthey J D, Moyle R G. Isolation by environment in White-breasted Nuthatches (*Sitta carolinensis*) of the Madrean Archipelago sky islands: a landscape genomics approach[J]. *Molecular Ecology*, 2015, 24(14): 3628-3638.
- [105] Martins K, Gugger P F, Llanderal-Mendoza J, Gonzalez-Rodriguez A, Fitz-Gibbon S T, Zhao J L, Rodriguez-Correa H, Oyama K, Sork V L. Landscape genomics provides evidence of climate-associated genetic variation in Mexican populations of *Quercus rugosa*[J]. *Evolutionary Applications*, 2018, 11: 1842-1858.
- [106] Mayr E. Systematics and the Origin of Species[J]. *Annals of the Entomological Society of America*, 1942,(1): 1.
- [107] Meng H H, Su T, Gao X Y, Li J, Jiang X L, Sun H, Zhou Z K. Warm-cold colonization: response of oaks to uplift of the Himalaya-Hengduan Mountains[J]. *Molecular Ecology*, 2017, 26(12): 3276-3294.
- [108] Naimi B. Uncertainty analysis for species distribution models. R package version, 1[J]. 2013.
- [109] Nogués-Bravo D. Predicting the past distribution of species climatic niches[J]. *Global Ecology and Biogeography*, 2009, 18(5): 521-531.
- [110] Oksanen J, Blanchet F G, Kindt R, Legendre P, Minchin P R, O Hara R B, Simpson G L, Solymos P, Stevens M H H, Wagner H. vegan: Community ecology package[J]. R package version, 2017, 14(6), 927-930.
- [111] Parmesan C. Ecological and Evolutionary Responses to Recent Climate Change[J]. *Annual Review of Ecology Evolution & Systematics*, 2006, 37(1): 637-669.
- [112] Parry M, Canziani O, Palutikof J, van der Linden P, Hanson C. Climate change 2007: impacts, adaptation and vulnerability[J], 2007.
- [113] Peakall R, Smouse P E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update[J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(19): 2537-2539.
- [114] Petit R J, Carlson J, Curtu A L, Loustau M L, Plomion C, González-Rodríguez A, Sork V L, Ducousso A. Fagaceae trees as models to integrate ecology, evolution and genomics[J]. *New Phytologist*, 2013, 197(2): 369-371.
- [115] Pina-Martins F, Baptista J, Jr G P, Paulo O S. New insights into adaptation and population structure of cork oak using genotyping by-sequencing[J]. *Global Change Biology*, 2018, 25(1): 337-350.
- [116] Pluess A R, Frank A, Heiri C, Lalagüe H, Vendramin G G, Muratorio S O. Genome-environment

- association study suggests local adaptation to climate at the regional scale in *Fagus sylvatica*[J]. *New Phytologist*, 2016, 210(2): 589-601.
- [117] Pritchard J K, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data[J], 2000, 155(2): 945-959.
- [118] Qiu Y X, Fu C X, Comes H P. Plant molecular phylogeography in China and adjacent regions: tracing the genetic imprints of Quaternary climate and environmental change in the world's most diverse temperate flora[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2011, 59: 225-244.
- [119] Reisinger A. Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change[J]. *Journal of Romance Studies*, 2014, 4(2): 85-88.
- [120] Rellstab C, Gugerli F, Eckert A J, Hancock A M, Holderegger R. A practical guide to environmental association analysis in landscape genomics[J]. *Molecular Ecology*, 2015, 24(17): 4348-4370.
- [121] Rellstab C, Zoller S, Walthert L, Lesur I, Pluess A R, Graf R, Bodenes C, Sperisen C, Kremer A, Gugerli F. Signatures of local adaptation in candidate genes of oaks (*Quercus* spp.) in respect to present and future climatic conditions[J]. *Molecular Ecology*, 2016, 25(23): 5907-5924.
- [122] Rissler L J. Union of phylogeography and landscape genetics[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(29): 8079-8086.
- [123] Ritchie J C. Postglacial vegetation of Canada[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1987.
- [124] Rosenberg N A. Distruct: a program for the graphical display of population structure[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2004, 4(1): 137-138.
- [125] Rousset F. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance[J]. *Genetics*, 1997, 145(4): 1219-1228.
- [126] Savolainen O, Pyhajarvi T, Knürr T. Gene flow and local adaptation in trees[J]. *Annual Review of Ecology Evolution & Systematics*, 2007, 38(1): 595-619.
- [127] Schuelke M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments[J]. *Nature Biotechnology*, 2000, 18(2): 233-234.
- [128] Shaw R G, Etterson J R. Rapid climate change and the rate of adaptation: insight from experimental quantitative genetics[J]. *New Phytologist*, 2012, 195(4): 752-765.
- [129] Shyam R, Singh Y N. Evaluation of eigenfaces and fisherfaces using Bray Curtis dissimilarity metric[C], 2015.
- [130] Slatkin M. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations[J]. *Evolution*, 1993, 47(1): 264-279.
- [131] Smith S J, Ellis N, Pitcher C R. Conditional variable importance in R package extendedForest[J]. *R Vignette*, 2012.
- [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(4): 627-632.
- [133] Sork V L. Genomic studies of local adaptation in natural plant populations[J]. *Journal of Heredity*, 2017, 109(1): 3-15.
- [134] Sork V L, Aitken S N, Dyer R J, Eckert A J, Legendre P, Neale D B. Putting the landscape into the genomics of trees: approaches for understanding local adaptation and population responses to changing climate[J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2013, 9(4): 901-911.
- [135] Sork V L, Davis F W, Westfall R, Flint A, Ikegami M, Wang H F, Grivet D. Gene movement and genetic association with regional climate gradients in California valley oak (*Quercus lobata* Née) in the face of climate change[J]. *Molecular Ecology*, 2010, 19(17): 3806-3823.

- [136] Sork V L, Squire K, Gugger P F, Steele S E, Levy E D, Eckert A J. Landscape genomic analysis of candidate genes for climate adaptation in a California endemic oak, *Quercus lobata*[J]. American Journal of Botany, 2016, 103(1): 33-46.
- [137] Sork V L, Waits L. Contributions of landscape genetics—approaches, insights, and future potential[J]. Molecular Ecology, 2010, 19(17): 3489-3495.
- [138] Stebbins G L. Asexual reproduction in relation to plant evolution[J]. Evolution, 1949, 3(1): 98-101.
- [139] Steinkellner H, Fluch S, Turetschek E, Lexer C, Streiff R, Kremer A, Burg K, Glosl J. Identification and characterization of (GA/CT)_n-microsatellite loci from *Quercus petraea*[J]. Plant Molecular Biology, 1997, 33(6): 1093-1096.
- [140] Storfer A, Murphy M A, Evans J S, Delmelle E, Vierling L A, Waits L P. Putting the ‘landscape’ in landscape genetics[J]. Heredity, 2007, 98(3): 128-142.
- [141] Svenning J C, Fløjgaard C, Marske K A, Noguesbravo D, Normand S. Applications of species distribution modeling to paleobiology[J]. Quaternary Science Reviews, 2011, 30(21): 2930-2947.
- [142] Team R D C. R : A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria[J]. R Foundation for Statistical Computing, 2018, 14: 12-21.
- [143] Theodosius D. Genetics and the Origin of the Species[J]. Philosophy of Science, 1954.
- [144] Tiffin P, Ross-Ibarra J. Advances and limits of using population genetics to understand local adaptation[J]. Trends in Ecology and Evolution, 2014, 29(12): 673-680.
- [145] 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.
- [146] van Strien M, Holderegger R, Van Heck H. Isolation-by-distance in landscapes: Considerations for landscape genetics[J]. Heredity, 2014, 114(1): 27-37.
- [147] Willis J C, Shaw H K A. A dictionary of the flowering plants and ferns[J]. American Fern Journal, 1968, 58(3): 436.
- [148] Wright S I, Gaut B S. Molecular population genetics and the search for adaptive evolution in plants[J]. Molecular Biology & Evolution, 2004, 22(3): 509-515.
- [149] Wright S. Evolution in Mendelian Populations[J]. Bulletin of mathematical biology, 1931, 16(2): 97-159.
- [150] Xia H H, Wang B S, Zhao W, Pan J, Mao J F, Wang X R. Combining mitochondrial and nuclear genome analyses to dissect the effects of colonization, environment, and geography on population structure in *Pinus tabulaeformis*[J]. Evolutionary Applications, 2018, 11(10), 1931-1945.
- [151] Xiao Z, Gao X Y, Jiang M, Zhang Z. Behavioral adaptation of Pallas's squirrels to germination schedule and tannins in acorns[J]. Behavioral Ecology, 2009, 20: 1050-1055.
- [152] Xu J, Deng M, Jiang X L, Westwood M, Song Y G, Turkington R. Phylogeography of *Quercus glauca* (Fagaceae), a dominant tree of East Asian subtropical evergreen forests, based on three chloroplast DNA interspace sequences[J]. Tree Genetics & Genomes, 2015, 11(1): 801-805.

个人简历

王天瑞，男，1995年8月出生，山西省运城市河津市人。2013-2017年就读于山西农业大学森林保护专业，获农学学士学位；2017-2020年就读于北京林业大学林学院攻读林业硕士学位。研究生期间主要从事分子生态研究，在读期间参加清华大学第五届保护生物学论坛，北京大学“生态讲坛”等，研究生在读期间，发表SCI一区论文一篇。

导师简介

杜芳，女，1981年11月生，甘肃兰州人。2010年6月获得兰州大学生态学博士学位，2010年12月获得法国波尔多第一大学生态学博士学位，现任北京林业大学生态学教授。主要致力于森林树种遗传多样性及物种形成的机理研究。主持国家自然科学基金青年1项、面上项目1项，参与国家自然科学基金重点项目1项及国家重点研发计划等科研项目1项。以第一作者或通讯作者发表SCI论文19篇，累计影响因子达53，被引用676次。2014年在创建了北京林业大学首个分子生态实验室，为从微观角度解决宏观森林生态学问题搭建了良好的平台。在生态学科老教授的传、帮、带培养下开设并主讲《分子生态学：理论与方法》、《进化生态学》两门新课程，受到本科生、研究生的热烈欢迎，并参与编写了《森林生态》教材。正在培养研究生11名，已毕业研究生7名。2009年获法国农业科学学院三大科研进展奖励；2013年北京林业大学青年科技奖(自然科学领域)；2014年获得教育部高等学校科学研究优秀成果奖自然科学奖一等奖(排名第四)；2014、2018年获得梁希青年论文奖；2015年当选北京市科技新星；2016、2019年当选北京林业大学“三八红旗手”；2017年获北京林业大学科技之星；2018年获得北京林业大学第六届优秀青年科技论文二等奖等。2018年10月起担任国际栎树协会专业委员会成员，为中国大陆第一人并希望以此为契机推进中国栎类走向世界；2018年12月起担任北京生态修复协会理事，负责森林生态专委会的工作。2019年当选中国植物学会女科学家协会委员。

获得成果目录清单

[1] Du F K, **Wang T R**, Wang Y Y, Ueno S, de Lafontaine G. Contrasted patterns of local adaptation to climate change across the range of an evergreen oak, *Quercus aquifolioides*[J]. Evolutionary Applications (SCI 一区), 2020, 00: 1-15.

[2] 王天瑞, 冯力, 杜芳. 生态适应研究的新思路: 从种群到景观基因组学 (已投稿)。

致谢

2017年，我北上求学，转眼间在北京林业大学的生活已过去三年，我的硕士生涯也即将画上句号。此刻掩卷而思，终有一丝不舍，回首瞻顾，也不免一份忐忑。在感念、彷徨、劳顿、清苦与进取中度过了三载难忘的岁月；在林大经历的每个时刻似乎都历历在目，三年岁月悄悄溜走的同时，给予我的却是一生的财富。此刻我唯有感谢，感谢你们出现在我的生命里，让我今生拥有，倍感珍惜。

首先由衷感谢我的导师杜芳老师，感谢杜老师三年来对我的辛勤培养和教诲，感谢杜老师亲自带我进行野外考察并给予的悉心指导和启迪，感谢杜老师在生活上对我的无私关怀和勉励，使我能够心无旁骛地完成这三年的研究生生活。杜老师严谨的科研态度、渊博的理论知识、坦荡的做人品格和广博的远见卓识都在潜移默化的影响着我并使我终生受益。在我的论文研究中，从论文的选题、构思、写作直至最后修改定稿，杜老师都给予了悉心指导与大力帮助。感谢杜老师在成长的路上给我有力的支撑，让我得到了另一种层次的提高。

感谢我的校外导师—西南林业大学的田斌老师，在我数次去往云南的采样过程中给予的帮助。感谢中科院微生物研究所的尹康权老师在云南采样过程中给予的帮助以及在我进行分子实验时为我提供的技术指导。感谢加拿大魁北克大学的 Guillaume de Lafontaine 教授、日本森林综合研究所的 Saneyoshi Ueno 研究员以及西安交通大学的冯力老师在论文撰写过程中的帮助。

感谢同门师兄王玉垚，师姐刘媛、张悦、苏金源，同学李月娟、燕语、王瑞，师妹苏蔚、祁敏、康艺馨、杨霖、罗艳君，师弟许阳、刘可可。402分子生态实验室的科研团队是一群极富凝聚力、充满生机和活力、拼搏进取的集体。我感恩能够进入这个集体，我在学业上的收获，也得益于这个集体中每个成员的关心和帮助。感谢李俊清老师师门的师兄给予我的帮助，感谢陪伴我度过三年的同学的关心与帮助。

最后，感谢我的父母和家人多年来给予我的理解和支持，他们给我的温暖是我不断前进的动力，让我能够坚定信心，在人生道路上一路走下去。

衷心感谢所有关心和帮助我的人！

王天瑞
2020年8月

