

中-日分布的槲树种群遗传多样性与遗传分化

祁敏¹, 张原野², 李嘉伟¹, 杜芳¹

1. 北京林业大学 生态与自然保护学院, 北京 100083

2. 厦门大学 环境与生态学院, 滨海湿地生态系统教育部重点实验室, 福建 厦门 361102

摘要: 为揭示中-日分布的槲树种群的遗传多样性以及遗传结构水平, 采用12个微卫星分子标记分析了中国和日本13个槲树种群的遗传分化、遗传多样性和基因流情况。结果表明, 槲树种群在其分布范围内分化形成3个支系, 即中国中东部支系、中国秦巴支系和日本支系。中国中东部支系和秦巴支系间存在着一定程度的基因流, 基因流方向主要是从中国中东部支系到秦巴支系, 日本支系和中国两个支系间的基因交流较少。槲树种群的遗传变异主要来自种群内部, 种群间的遗传分化系数为0.23, 在林木中处于中等水平。遗传多样性分析表明, 槲树种群的遗传多样性较高, 平均观测杂合度为0.52, 平均期望杂合度为0.57。与两个中国支系相比, 日本支系的遗传多样性水平较低。第四纪后的长期地理隔离可能是造成物种明显分化的主要原因。

关键词: 分子标记; 微卫星; 遗传多样性; 遗传分化; 基因流

中图分类号: Q37 **文献标识码:** A **文章编号:** 0455-2059(2021)05-0001-08

DOI: 10.13885/j.issn.0455-2059.2021.05.001

Genetic diversity and differentiation study of *Quercus dentata* with regards to its distribution in China and Japan

QI Min¹, ZHANG Yuan-ye², LI Jia-wei¹, DU Fang¹

1. College of Ecology and Nature Conservation, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

2. Key Laboratory of the Ministry of Education for Coastal and Wetland Ecosystems, College of the Environment and Ecology, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian, China

Abstract: To reveal the level of genetic diversity and genetic structure of *Quercus dentata* distributed in China and Japan, 12 microsatellite markers were used to analyze the genetic differentiation, diversity and gene flow of 13 *Q. dentata* populations across Japan and China. The results showed that the species was differentiated into three lineages: the Chinese Eastern lineage, the Chinese Qinba lineage and the Japanese lineage. Although moderate gene flow existed between the two Chinese lineages with the historical gene flow occurring predominantly from Chinese Eastern lineage into Qinba lineage, there was a limited gene flow between Japanese and Chinese lineages. The high genetic diversity had been mainly caused by the variations within population, and the genetic differentiation among populations was moderate for a tree species, with the coefficient of genetic differentiation estimated to be 0.23. Genetic diversity analysis also showed that the overall observed heterozygosity was 0.52 and the expected heterozygosity 0.57, indicating a high level of genetic diversity. Compared with the Chinese lineage, the genetic diversity

收稿日期: 2020-10-07 **修回日期:** 2020-10-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(42071060)

作者简介: 杜芳(1981-), 女, 甘肃甘南人, 教授, 博士, 博士研究生导师, e-mail: dufang325@bjfu.edu.cn, 研究方向为森林生态、修复生态、分子生态, 通信联系人。

of the Japanese lineage was low. The observed genetic diversity and differentiation of species was likely due to the long-term geographic isolation after Quaternary.

Key words: molecular marker; microsatellite; genetic diversity; genetic differentiation; gene flow

全球气候的波动,尤其是第四纪(Quaternary, 2 Ma)气候的剧烈变化显著影响着北半球物种的分布与遗传结构^[1-2]. 第四纪以来的气候变化中,对现存物种影响最为深刻的是距今约24~18 ka前的末次盛冰期. 与北美和欧洲相比,东亚大部分地区在末次盛冰期阶段未被大冰盖覆盖,但是气温骤降对该地区的物种种群间的基因交流仍造成了显著影响^[3]. 在冰期中国东海海平面下降,在冰后期或者间冰期海平面上升就会造成种群间的隔离. 伴随着气温变化,海平面的升降会造成物种不断地隔离、二次接触乃至物种形成.

气候波动最直接的影响是造成亲缘关系相近的物种或同一物种不同种群在地理区域间的非连续分布^[4]. 东亚东部大陆-岛屿之间的不连续分布为研究物种种内分化与环境变迁提供了理想材料,其中中国和日本之间由于东海阻隔了物种在种群的迁移与基因交流,造成许多物种的不连续分布,挖掘这些物种的进化历史、迁移路径以及基因流方向是近期东亚植物谱系地理学研究的热点. 例如QIU等^[5]通过叶绿体DNA片段测序和简单重复序列间扩增(ISSR)标记分析了黄山梅(*Kirengeshoma palmata*)8个种群共137个个体,发现黄山梅具有较高的遗传多样性水平,但种群间已经发生了较大程度的分化,推测黄山梅在冰川期可能通过连接中国和日本种群的陆桥进行基因交流,随后在间冰期中国东海海平面升高造成黄山梅群体中-日的不连续分布;李丽卡等^[6]通过3个叶绿体DNA片段对典型中-日不连续分布的双花木属(*Disanthus*)植物的系统发育关系进行研究,发现存在于日本的双花木原种(*D. cercidifolius*)和中国的长柄双花木(*D. cercidifolius* subsp. *Longipes*)为单系类群,无共享单倍型,反映了该属两个亚种间存在的地理隔离屏障造成其较高的遗传分化水平. 此外,对中-日不连续分布植物如胡桃楸(*Juglans mandshurica*)^[7]、蛛网萼(*Platycrater arguta*)^[8]、橐吾(*Ligularia hodgsonii*)^[9]、黄精叶钩吻(*Croomia japonica*)^[10]等物种的遗传结构与谱系地理学的研究结果都支持了大陆与岛屿之间的地理分割事件.

栎属(*Quercus*)植物主要分布于北美、欧洲、亚洲和南美部分地区,包含300~600个种,是全球分布最为广泛的森林树种之一^[11-13]. 中国栎类资源丰富,根据第八次全国森林资源清查报告,栎类占天然林总面积的13%,是中国天然林中分布面积最大和最广的树种^[14]. 槲树(*Quercus dentata*)为广泛分布于东亚的落叶栎,其树皮暗灰褐色呈现深纵裂;小枝粗壮,表面有沟槽状纹痕;叶片多呈现倒卵形或是长倒卵形,顶端一般呈现短钝尖,叶片边缘呈粗锯齿状,叶背面有灰褐色星状绒毛;叶柄长2~5 mm,密被棕色绒毛. 在中国槲树主要生长于海拔50~2 700 m的西北、华北等地区的杂木林或松林中,朝鲜、日本也有分布,其分布地区环境多变,对环境有着良好的适应性^[15-16]. 目前对槲树分布格局的研究侧重于区域范围内,例如李慧敏^[17]利用3个叶绿体基因片段和8对微卫星标记研究槲树种群的遗传历史,表明中国范围内的槲树存在一定的遗传分化,但基因流明显,秦巴地区是槲树最大的冰期避难所;LYU等^[16]通过微卫星分子标记和叶绿体DNA片段探究小尺度范围内的槲树与同域分布其他栎树之间的分化与基因流情况,表明尽管槲树与其他栎树之间基因交流频繁但仍然存在明显的种间界限;NAGAMITSU等^[18]对日本沿海生长的槲树进行了基于核微卫星的遗传聚类研究,探讨其生态型特征,结果表明由于环境异质性和对沿海生境的适应性选择导致沿海槲树叶片具有独特的生态型特征. 迄今为止没有对中-日分布的槲树种群遗传学的比较研究. 本研究以13个中国和日本槲树种群为例,使用12对微卫星分子标记进行基因分型,以研究不同地区槲树种群的遗传多样性水平,比较其差异并探究其原因;检测槲树种群之间的遗传结构,推测进化支系间的基因流方向,探讨其物种形成方式.

1 材料与方法

1.1 实验材料

于2018~2019年对中国和日本的槲树野生分布区进行实地考察,采集实验所需的槲树样品. 所采集的槲树种群覆盖了槲树在中国的大部分

分布范围及代表日本南北分布的两个槲树种群. 为了保证采样的科学性和代表性, 采集的样品需满足: 1) 两个不同的槲树种群之间直线地理距离 >30 km; 2) 同一种群内不同个体之间至少相隔 10 m 以上; 3) 同一种群内应至少选择 5 个槲树个

体; 4) 每个个体采集 1~2 片健康、完整、无明显虫害病害幼嫩的叶片和新生枝条. 使用全球定位系统获取每个种群的经纬度、海拔等地理信息. 将采集的样本经硅胶迅速干燥后, 带回实验室保存备用. 最终共采集 13 个槲树种群, 225 个个体(表 1).

表 1 槲树种群样品采集信息
Table 1 Sample information of *Quercus dentata*

种群编号	地点	N/(°)	E/(°)	海拔/m	采样数/个
DSG	中国陕西省宝鸡市大散关	34.97	107.01	890	23
GS	中国陕西省太白县关山	34.34	107.84	1 470	21
SYB	中国陕西省留坝县桑园坝乡	33.07	107.14	1 020	21
MTZ	中国陕西省留坝县庙台子	33.09	106.35	1 220	23
JLP	中国河南省焦作市修武县金岭坡	35.71	113.33	590	24
ASS	中国山东省济宁市安山寺林场	35.56	117.38	240	21
SFS	中国北京市房山区上方山	39.68	115.83	660	20
ZLG	中国辽宁省铁岭市铁岭县钟楼沟	42.06	124.03	280	10
QHD	中国河北省秦皇岛国家地质公园	40.06	119.44	100	11
GSL	中国山西省吕梁市交口县古树林	37.09	111.32	1 450	8
LJ	中国安徽省淮北市龙脊山	33.09	116.97	180	15
JPN	日本冈山县津山市	35.07	134.01	20	19
JPS	日本北海道石狩市	43.22	141.32	10	9

1.2 DNA 提取和 PCR 扩增

使用 TIANGEN 植物基因组 DNA 提取试剂盒对干燥后的叶片或枝条进行基因组 DNA 的提取, 使用 1% 的琼脂糖凝胶进行质量检测. 通过查找栎属植物中已报道的核微卫星通用引物, 随机挑选 6 个不同种群, 每种群选取 6 个个体筛选槲树种群具有多态性的核微卫星位点. 最终选取 12 对成功扩增的引物用于实验, 引物信息见表 2. 采用直接在引物 5' 末端带有 4 种荧光标记(FAM, HEX, TAM-RA, ROX)修饰的方法进行扩增实验. PCR 的反应体系共 15 μ L, 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 8 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52~56 $^{\circ}$ C 退火 30 s(退火温度随引物而定), 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 8 个循环, 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min^[6]. 扩增产物使用 2% 的琼脂糖凝胶进行检测, 将扩增条带清晰的产物送到北京擎科生物科技有限公司利用 ABI3730 测序仪进行毛细管电泳检测, 采用 4 种荧光标记混合可同时检测 96 个样品, 共计 675 个毛细管电泳. 检测的结果使用 GeneMarker (SoftGenetics) 软件进行毛细管电泳峰图的读取.

1.3 数据分析

根据槲树种群不同个体等位基因频率的差

异, 用基于贝叶斯模型的 STRUCTURE V2.3.4 软件^[22]对槲树种群内部进行遗传结构分析, 该软件将个体分配给各支系, 假设每个支系都处于哈温平衡(Hardy-Weinberg, H-W)和连锁平衡状态. 设置老化长度为 100 000 次, 蒙特卡罗迭代数(Markov chain Monte Carlo iterations replications, MCMC)为 200 000 次, 将代表进化支数目的参数 K 值设置为 1~10, 对于每个 K 值, 迭代 20 次独立运算. 程序运行完成后利用 Structure Harvester 在线工具^[23]可视化 Delta K 值的概率分布, 选择 Delta K 最大时对应的 K 值作为最优进化枝数, 使用 Distruct V.1.1 软件^[24]绘制种群结构柱状图. 为进一步验证种群的遗传分化模式, 使用 GenAlEx V6.5^[25]软件基于遗传距离矩阵对槲树种群进行主坐标(principal component analysis, PC)分析. 通过 Arlequin V3.5 软件^[26]进行分子方差分析(analysis of molecular variance, AMOVA)来检测种群间和种群内的遗传分化水平, 遗传分化系数(F_{ST})用于解释种群间的遗传分化程度, 当 $F_{ST}=0$ 时, 该种群内个体可以随机交配, 当 $F_{ST}=1$ 时, 种群完全隔离, 无基因交流.

使用 GenAlEx V6.5 对各种群进行遗传参数分析, 选择期望杂合度(expected heterozygosity, H_E)、观测杂合度(observed heterozygosity, H_O)、有效等

表2 12对SSR引物详细信息
Table 2 Detailed information of 12 pairs of SSR primers

引物位点	退火温度/°C	重复单元	引物序列	等位基因/bp	参考文献
GOT021	56	AT	AGAAAGTTCAGGGAAAGCA CTTCGTCCCCAGTTGAATGT	111~128	[19]
FIR026	56	TC	CTTCATGCACCAATTCCTCA GGCCATGTATGTGTGCAAAA	208~217	[19]
QmC00716	56	TC	AAGAGAACCCATTCCATCCCTGA GTTTCCCGAACAGTGGTTTCTTGA	261~287	[20]
POR017	54	CT	CCCATATCCCTCTACGAAAGAA CTGGAGATGACATAGTGTCTCAA	140~169	[19]
FIR015	56	AC	ACCCTAAAACCCCAATCACC CGGATCTTCGGCTATTCTTG	128~138	[19]
QmC00932	54	TC	AGGCTCAAAAACAAAACCAACCG GTTTCCCCTTCCATAATCAAACCT	247~260	[20]
DN950446	56	AG	TCTCTTTCTCCGTCCATTATCGC GTTTCTCCACAGACCCCATTTCC	155~185	[21]
WAG068	56	AG	TCTGCAACAAAACAAAACAC CGGAGGAGAGAGTCAGCAAC	165~195	[19]
PIE271	56	TC	CACACTACCAACCCTACCC GTGCGGTTGTAGACGGAGAT	197~247	[19]
QmC02052	56	AG	CACACCCAGATCCACAAAACCTCC GTTTGCTCTACGGTCTCCCTCTT	250~300	[20]
GOT011	56	TC	CCCCACCGTCTACTCTCAA GCGTTCACCACGTCCATAAT	197~255	[19]
WAG066	56	AG	AACCTGTTTGGCTTCGTGTG AACAAAAGATTGGGAGGTGC	128~244	[19]

位基因数(effective number of alleles, N_E)和不同等位基因数目(number of different alleles, N_A) 评估榲树种群的遗传多样性水平. 使用 T 检验评估分析的显著性.

榲树作为风媒传播的物种, 主要依靠花粉进行基因间的物质交换. 本研究使用 Migrate-n V3.6^[27] 软件评估分布范围内不同谱系之间的历史基因流的大小和方向. 基于连续的布朗运动模型利用默认 F_{ST} 生成初始的有效种群大小在每个世代每个位点的突变率值和迁移值, 设置3个独立的MCMC链, 每个链设置5 000 000次迭代. 在恒定突变模型下每100步记录一次, 将前10 000条记录作为老化. 检查模型收敛性之后, 计算模型的中值和95%的后验概率.

2 结果与分析

2.1 榲树的遗传分化

由图1a可见, 在 $K=3$ 时划分结果最优. 榲树种群被明显的划分为3个分支, 分别为主要分布于中国华北地区的中东部支系(ZLG、QHD、SFS、

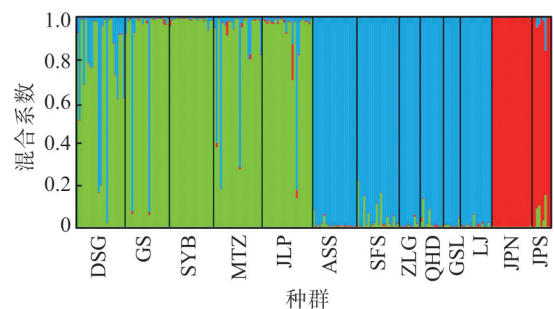
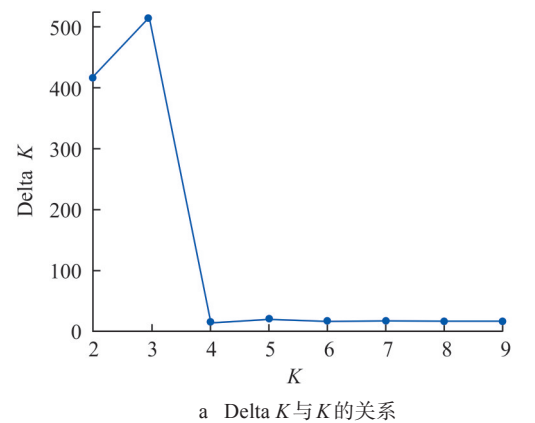


图1 榲树种群的贝叶斯聚类分析结果
Fig. 1 Results of Bayesian cluster analysis for *Quercus dentata*

GSL、ASS、LJ)、中国秦岭-巴山一带的秦巴支系(DSG、GS、SYB、MTZ、JLP)和日本支系(JPS、JPN),中国的两支系与日本支系结构划分明显,中国的两支系间存在着基因交流(图1b)。

由主坐标分析结果可知,槲树种群被明显分成了3个支系,与K=3时的遗传结构结果一致.这3个支系在PC1轴和PC2轴上被明显区分开来,两个主坐标轴共解释了约72.7%的遗传变异(图2)。

分子方差分析结果显示,槲树种群内的遗传分化处于中等水平(表3).分别针对槲树种群各分

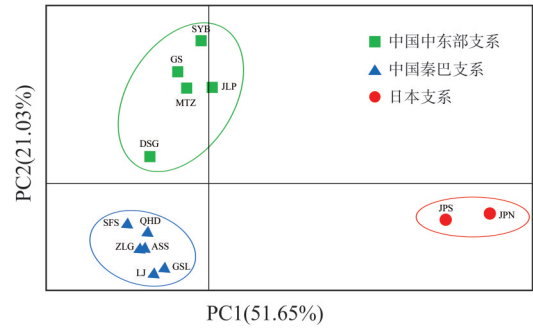


图2 基于12对微卫星位点的槲树种群主坐标分析
Fig. 2 Principal component analysis of *Quercus dentata* population based on 12 nSSRs

表3 槲树种群基于12对微卫星标记的分层分子方差分析
Table 3 AMOVA for *Quercus dentata* population based on 12 nSSRs

支系	变异来源	自由度	离均差平方和	方差分量	变异百分比/%	F统计量
所有种群	支系间	2	238.84	0.78	16.0	$F_{CT} = 0.16$
	支系内种群间	10	149.30	0.33	6.7	$F_{SC} = 0.08$
	种群内	437	1645.78	3.77	77.3	$F_{ST} = 0.23$
中国秦巴支系	种群间	4	85.90	0.39	8.7	$F_{ST} = 0.09$
	种群内	219	896.28	4.09	91.3	
中国中东部支系	种群间	5	54.55	0.26	6.3	$F_{ST} = 0.06$
	种群内	164	628.86	3.83	93.7	
日本支系	种群间	1	8.46	0.26	11.4	$F_{ST} = 0.11$
	种群内	54	110.25	2.04	88.6	

F_{CT} : 支系间的遗传分化系数; F_{SC} : 支系内种群间的遗传分化系数; F_{ST} : 种群内的遗传分化系数。

支进行独立的 AMOVA 分析,显示日本支系的遗传分化系数最高,在中国分布范围内,秦巴支系的遗传分化大于中东部支系;在所有种群,中国秦巴支系、中国中东部支系和日本支系的遗传变异都主要来自于种群内部。

2.2 槲树的遗传多样性

由表4可见,槲树种群遗传多样性处于较高水平.中国秦巴支系的多样性高于中国中东部支系,日本支系的多样性均低于两个中国支系。

2.3 槲树基因流分析

槲树种群内不同支系基因流分析表明3个支系间存在不对称的基因流(表5).基因流的方向主要是从中国中东部支系到中国秦巴支系,中国两支系与日本支系之间基因交流较少.从中国秦巴支系到日本支系方向上的基因流与反方向上的基因流相比有较大差异,为非对称基因流.从中国中东部支系到日本支系方向的基因流与反方向上的基因流相比差异较小,属于对称基因流。

表4 槲树种群基于12对微卫星标记的遗传多样性分析结果

Table 4 Results of genetic diversity based on 12 nSSRs for *Quercus dentata*

支系	种群	N_A	N_E	H_O	H_E
中国秦巴支系	DSG	7.75	4.54	0.68	0.69
	GS	5.58	3.35	0.63	0.64
	SYB	6.75	3.55	0.60	0.63
	MTZ	8.33	4.53	0.62	0.69
	JLP	7.08	4.50	0.59	0.68
	平均	7.10	4.09	0.62	0.67
中国中东部支系	ASS	6.75	4.14	0.62	0.65
	SFS	6.08	3.92	0.55	0.60
	ZLG	5.58	4.06	0.66	0.64
	QHD	6.83	4.68	0.62	0.68
	GSL	3.33	2.66	0.58	0.58
	LJ	5.58	2.66	0.60	0.57
平均	5.69	3.69	0.61	0.62	
日本支系	JPN	3.08	2.12	0.34	0.35
	JPS	3.58	2.68	0.34	0.47
	平均	3.33	2.40	0.34	0.41
总计平均		5.37	3.39	0.52	0.57

表5 槲树种群3个支系之间的基因流分析
Table 5 Gene flow as estimated by Migrate-n among the three lineages of *Quercus dentata*

支系	θ	$N_e m$		
		中国秦巴支系→	中国中东部支系→	日本支系→
中国秦巴支系	1.3 [0.6~2.7]		30.1 [21.6~33.5]	4.2 [2.9~8.8]
中国中东部支系	1.6 [0.7~2.9]	25.2 [16.6~28.1]		4.9 [3.2~8.9]
日本支系	1.1 [0.4~2.3]	13.1 [7.3~22.2]	8.2 [5.2~13.2]	

N_e : 有效种群大小; m : 迁移率; []里的数值代表置信区间; θ : 有效种群大小乘以每个世代每个位点的突变率。

3 讨论

3.1 槲树种群的遗传结构与遗传多样性

遗传结构可度量遗传变异在种群内或者种群间的分布规律。研究物种的遗传结构可以掌握种群遗传多样性的动态变化,更有效于物种的保护及应用^[28]。本研究结果表明槲树种群被很好地划分成3个支系。槲树种群的遗传结构受地形因素的影响,由于东海阻碍了中国槲树种群与日本槲树种群的交流,造成两个区域明显的地理隔离,基因渐渗减少。中国内部的槲树种群明显地分成了两个支系,分别是集中在秦巴地区的一支和东部平原的一支,与李慧敏^[17]的研究结果一致,同时其研究表明槲树种群内部基因交流较为频繁,尤其是秦巴地区。根据AMOVA分析结果可知,大部分的遗传变异主要来自于种群内部。各分支之间,两个中国支系遗传分化系数较低,中-日间的种群遗传分化系数较高,表明中日之间的槲树已经有较长时间的隔离,种群间的基因流受到限制。

对中国和日本槲树种群的遗传多样性和遗传分化的研究表明,槲树种群在林木植物中遗传多样性较高。槲树具有风媒传粉、异花授粉的特点,有利于维持其较高的遗传多样性。李慧敏^[17]研究证明在末次盛冰期时,槲树种群受环境影响经历收缩和重新扩张,种群内存在大量瓶颈效应的现象。在本研究中日本支系的遗传多样性水平明显低于中国的两个支系。种群遗传多样性的高低与许多因素有关,包括采样的种群数量、个体数量、与其他植物之间的基因交流以及周边物种的丰富度等。本研究中日本种群的采样数量与大陆种群相比偏少。地理条件的限制不利于与其他地区的栎树种群进行基因交流,或者由于冰期隔离造成的奠基者效应或者瓶颈效应等可能是导致其遗传多样性低的主要原因。

3.2 植物不连续分布对遗传分化的影响

基因流是指遗传物质在种间或种内进行传递

的过程,一般认为基因流有利于维持物种的遗传多样性,抑制种群分化^[29]。地理隔离造成植物的不连续分布,限制了种群间的基因交流,导致遗传漂变增强,产生局部适应,影响物种的遗传多样性和遗传结构,增大种间遗传分化。长期的地理隔离和环境因素的变化会促进物种内的高遗传分化^[30-31]。一些扩散能力极强的物种有可能跨越山脉或海峡等地形的阻隔作用^[32]。东海作为中国和日本的大陆桥,在第四纪冰期由于东海海平面降低,为中日植物的二次接触提供通道,直至末次间冰期海平面上升,大陆桥消失。随后在漫长的进化历史过程中,随着突变和遗传漂变的积累,种群间遗传分化产生,是槲树物种形成中-日分布模式的最可能方式。

4 结论

中-日槲树在其各自的分布范围内呈现明显的遗传分化,槲树种群遗传多样性处于较高水平。与中国分布的槲树种群相比,日本槲树种群的遗传多样性水平较低。中国东部支系与秦巴支系之间存在着基因交流,方向是从中国东部支系向秦巴支系,日本支系与中国两支系之间的基因交流较少,可能主要与地形因素有关。

致谢: 感谢日本森林综合研究所 Saneyoshi Ueno 博士协助日本地区的采样。

参考文献

- [1] HEWITT G M. The genetic legacy of the Quaternary ice ages[J]. *Nature*, 2000, 405(6789): 907-913.
- [2] HEWITT G M. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary[J]. *Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences*, 2004, 359(1442): 183-195.
- [3] QIAN Hong, RICKLEFS R E. Large-scale processes and the Asian bias in species diversity of temperate plants[J]. *Nature*, 2000, 407(6801): 180-182.

- [4] QIU Ying-xiong, FU Cheng-xing, 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[C]//2011年全国系统与进化植物学暨第十届青年学术研讨会论文集. 昆明: 中国植物学会, 2011.
- [5] QIU Ying-xiong, SUN Yi, ZHANG Xiao-ping, et al. Molecular phylogeography of East Asian Kirengeshoma (Hydrangeaceae) in relation to Quaternary climate change and landbridge configurations[J]. *New Phytologist*, 2009, 51(2): 281-293.
- [6] 李丽卡, 李象钦, 谢国文, 等. 基于 cpDNA 片段探讨中-日间断分布双花木属植物的系统发育学[J]. *生物技术通报*, 2016, 32(1): 80-87.
- [7] BAI Wei-ning, LIAO Wan-jin, ZHANG Da-yong. Nuclear and chloroplast DNA phylogeography reveal two refuge areas with asymmetrical gene flow in a temperate walnut tree from East Asia[J]. *New Phytologist*, 2010, 188(3): 892-901.
- [8] QI Xin-shuai, YUAN Na, COMES H P, et al. A strong 'filter' effect of the East China Sea land bridge for East Asia's temperate plant species: inferences from molecular phylogeography and ecological niche modelling of *Platycrater arguta* (Hydrangeaceae) [J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2014, 14(1): 41-56.
- [9] WANG Jin-feng, GONG Xun, CHIANG Yu-chung, et al. Phylogenetic patterns and disjunct distribution in *Ligularia hodgsonii* Hook. (Asteraceae)[J]. *Journal of Biogeography*, 2013, 40(9): 1741-1754.
- [10] LI En-xiang, SUN Yi, QIU Ying-xiong, et al. Phylogeography of two East Asian species in *Croomia* (Stemonaceae) inferred from chloroplast DNA and ISSR fingerprinting variation[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2008, 49(3): 702-714.
- [11] KREMER A, ABBOTT A G, CARLSON J E, et al. Genomics of Fagaceae[J]. *Tree Genetics and Genomes*, 2012, 8(3): 583-610.
- [12] HUBERT F, GRIMM G W, JOUSSELIN E, et al. Multiple nuclear genes stabilize the phylogenetic backbone of the genus *Quercus*[J]. *Systematics and Biodiversity*, 2014, 12(4): 405-423.
- [13] DENK T, GRIMM G W, MANOS P S, et al. *Tree physiology*[M]. Switzerland: Springer, 2017: 13-38.
- [14] 侯元兆, 陈幸良, 孙国吉. 栎类经营[M]. 北京: 中国林业出版社, 2017.
- [15] LIU Yuan, LI Yue-juan, SONG Jia-lin, et al. 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: 90.
- [16] LYU Jia, SONG Jia, LIU Yuan, et al. Species boundaries between three sympatric oak species: *Quercus aliena*, *Q. dentata*, and *Q. variabilis* at the northern edge of their distribution in China[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9(1): 414-425.
- [17] 李慧敏. 基于叶绿体 DNA 片段和核微卫星标记的槲树群体历史和遗传多样性研究[D]. 西安: 西北大学, 2018.
- [18] NAGAMITSU T, SHIMIZU H, AIZAWA M, et al. 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, 132(2): 211-222.
- [19] DURAND J, BODÉNÈS C, CHANCEREL E, et al. A fast and costeffective approach to develop and map EST-SSR markers: oak as a case study[J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 570.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] ROSENBERG N A. Distruct: a program for the graphical display of population structure[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2004, 4(1): 137-138.
- [25] PEAKALL R, SMOUSE P E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update[J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(19): 2537-2539.
- [26] EXCOFFIER L, LISCHER H E. 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.
- [27] BEERLI P. Comparison of Bayesian and maximum-likelihood inference of population genetic parameters[J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(3): 341-345.
- [28] 孙坤, 陈纹, 马瑞君, 等. 子午岭中国沙棘亚居群的遗

- 传多样性研究[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 2004, 40(3): 72-75.
- [29] ABBOTT R, ALBACH D, ANSELL S, et al. Hybridization and speciation[J]. *Journal of Evolutionary Biology*, 2013, 26(2): 229-246.
- [30] GONG Wei, CHEN Chuan, CHEISTOPH D, et al. 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 and Evolution*, 2008, 48(3): 1094-1105.
- [31] XU Jin, DENG Min, JIANG Xiao-long, et al. Phylogeography of *Quercus glauca* (Fagaceae), a dominant tree of East Asian subtropical evergreen forests, based on three chloroplast DNA interspace sequences[J]. *Tree Genetics and Genomes*, 2015, 11(1): 801-805.
- [32] AIZAWA M, YOSHIMARU H, SAITO H, et al. Phylogeography of a northeast Asian spruce, *Picea jezoensis*, inferred from genetic variation observed in organelle DNA markers[J]. *Molecular Ecology*, 2007, 16(16): 3393-3405.

(责任编辑:蔡红霞)