

灰背栎遗传多样性和遗传结构的 AFLP 指纹分析*

王淑霞^{1,2}, 胡运乾¹, 周浙昆²

(1 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204; 2 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 用 AFLP 方法对灰背栎 (*Quercus senescens*) 8 个居群进行了遗传多样性、居群遗传结构研究。TFPGA 软件分析两组引物组合共产生 125 个位点, 其中 94 个为多态位点, 多态位点百分率为 75.2%, 发现灰背栎居群的遗传变异水平有随着海拔升高而遗传多样性下降的趋势。Arliquin 2.000 中的 AMOVA 分析表明灰背栎居群间分化大, 分化指数达 $\varphi_{st} = 0.2956$ 。用 PAUP 软件对所有个体间的遗传关系进行了聚类分析。

关键词: 灰背栎; AFLP; 遗传多样性; 遗传结构; 纵向岭谷区

中图分类号: Q 943 文献标识码: A 文章编号: 0253-2700(2005)01-0049-10

AFLP Analysis of Genetic Variation and Structure of Natural Populations of *Quercus senescens*

WANG Shu-Xia^{1,2}, HU Yun-Qian¹, ZHOU Zhe-Kun²

(1 *Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China*;

2 *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China*)

Abstract: The population variation and structure of 115 plants representing 8 populations of *Quercus senescens* Hand.-Mazz. were investigated by amplification fragment length polymorphism (AFLP) analysis. Using TFPGA software, 94 polymorphic phenotypic patterns (75.2%) was obtained using 2 AFLP primer combinations and it was found that genetic variation of different population was negatively correlated with altitudes. Analysis of the genetic structure of populations carried out using analysis of molecular variation (by Arliquin 2.000 software), It showed that there was a high significant population differentiation ($\varphi_{st} = 0.2956$). And neighbour-joining dendrogram also be constructed based on 2 primer combinations by PAUP software.

Key words: *Quercus senescens*; Amplified fragment length polymorphism (AFLP); Genetic variation; Genetic structure; Longitudinal Range-Gorge

周浙昆等 (1995) 认为高山栎组植物 (*Quercus* sect. *Heterobalanus* (Oerst.) Menits) 的繁盛和喜马拉雅山脉隆升、横断山脉形成关系密切, 这一推测目前已从地植物学、形态学和分子生物学方面得到了部分印证 (周浙昆等, 2003)。高山栎组植物对于研究地质变迁、植物区系演替方面具有重要地位 (周浙昆, 1999; 孙航, 2002)。高山栎组植物分布虽然

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (30170077, 40332021) 和国家重点基础研究发展计划 (973) 项目 (2003CB415102) 资助
收稿日期: 2004-05-08, 2004-07-19 接受发表
作者简介: 王淑霞 (1977-) 女, 硕士研究生, 主要从事居群遗传学研究。

广泛,但主要集中在横断山区,所有9个种在这一地区均有分布(周浙昆等,2003),是这一地区的优势种和建群种,在横断山地区生态系统中起着至关重要的作用。

目前国外从形态学、解剖学、细胞学、孢粉学、生理生化、生态学、遗传学、历史地理学、古植物学、生物地理学等角度对栎属进行了深入研究(Filippo Bussotti and Paolo Grossoni, 1997; Kvacek and Walther, 1989; Manos 等, 1999; Cerasoli 等, 2004; Dodd and Kashani, 2003),然而对主要分布在我国横断山区的高山栎组植物很少涉及。目前国内学者主要从细胞学,形态学,地植物学,地质历史等方面对高山栎组植物进行研究(李俊清,1996;张金谈和王萍莉,1986;梁红平等,1990;周浙昆,1993,1999),但应用分子生物学方法对高山栎组植物进行研究的例子很少。李进等(1997,1998)利用等位酶技术研究了川滇高山栎(*Quercus aquifolioides* Rehd. et Wils.)的遗传结构和遗传多样性。普春霞(2002)采用 AFLP 技术对刺叶栎复合群(*Quercus spinosa* David et Franch)进行了生物地理学研究。

遗传多样性和遗传结构是一个物种的重要特征,遗传多样性反映一个物种适应环境的能力和对环境变迁持续进化的潜力,遗传结构的分布与物种的繁育机制密切相关,同时反映生态适应进化、环境变迁与自然选择的效应(Sokal 等,1989)。鉴于李进等(1997,1998)和普春霞(2002)分别对高山栎组黄毛类(川滇高山栎)和无毛类(刺叶栎复合群)的不同侧面进行研究,所以本研究以高山栎组中水平与垂直方向上与“无毛类”和“黄毛类”重叠分布的灰毛类型——灰背栎(*Quercus senescens* Hand.-Mazz.)作为研究对象。采用 AFLP 的方法对灰背栎居群遗传多样性及遗传结构进行评价,为我国西南地区高山栎类植物的持续发展提供理论依据,并为更全面探讨高山栎组植物的分布扩散机制以及横断山三江流域纵向岭谷区喜马拉雅隆起和横断山抬升对植物分布的驱动因子提供线索。

1 材料与方法

1.1 材料与方法

材料采自云南和贵州8个灰背栎居群,共115个个体(表1)。在不受居群大小限制情况下尽量采集成年个体,并且个体间距离在10m以上,以防止同一无性系的不同分株。每个居群采集10~20个个体的新鲜叶片带回实验室直接提取DNA,或用硅胶干燥后-20℃储存备用。

表1 灰背栎8个居群样品采集记录

Table 1 List of 8 *Quercus senescens* populations used in this study

居群代码 Population code	采集地 Source	海拔/m	样品数	凭证标本 Voucher
		Altitude/m	Number of sample	
德钦(茨中) dc	云南德钦茨中	2030	15	乐霁培,王淑霞 dc1 (dc1-15)
威宁(风海镇) dm	贵州威宁	2100	15	邓敏 dm1 (dm1-15)
巧家(大村瓦厂) dw	云南昭通巧家	2500	12	王淑霞,邓敏 dw1 (dw1-12)
嵩明(果东) ga	云南嵩明果东	2100	17	王淑霞 ga1 (ga1-17)
宣威(黑石头区) yx	云南宣威	2365	19	邓敏 yx1 (1-19)
武定(白路乡) wd	云南武定	2550	13	陈文允 wd1 (1-13)
昆明(西山) xs	云南昆明西山	2250	10	王淑霞,邓敏 xs1 (1-10)
沾益(花山) qj	云南沾益	2200	14	胡运乾 qj1 (qj1-14)

注:标本存放在昆明植物研究所标本馆(KUN)

1.1.1 总DNA提取 采用CTAB方法提取DNA(Doyle and Doyle, 1990)。根据实际操作略加修改。用1%琼脂糖凝胶(0.5×TBE缓冲液)检测DNA的质和量。

1.1.2 AFLP 反应与电泳 基因组总 DNA 用 EcoRI (NEB) 和 MseI (NEB) 37°C 双酶切 2.5 h, 70°C 灭活酶 10 min, 然后将酶切得到的片段和接头连接。AFLP 反应依据 Vos 等 (1995) 的两步扩增方法并略做修改。预扩增引物和选择性扩增引物序列见表 2。用于 PCR 反应的 Tag 聚合酶购买自 TaKaRa 公司。

表 2 引物和接头序列

Table 2 Primer and adapter sequences

引物 Primer	接头 Adaptor
预扩增引物 pre-amplification primer	EcoRI 接头 EcoRI adaptor
MseI + C 5' - GATGACTCTGAGTAAC - 3'	5' - CTCGTAGACTGCGTACC - 3'
EcoRI + A 5' - GACTGCGTACCAATCA - 3'	3' - CATCTGACGCATGG - 5'
选择性扩增引物 selective amplification primer combination	MseI 接头 MseI adaptor
EcoRI - ACA/MseI - CAC	5' - GACGATGAGTCCTGAG - 3'
EcoRI - AAC/MseI - CTA	3' - TACTCAGGACTC - 5'

预扩增程序为：94°C 变性 5 min；94°C 30 s；65°C 30 s；72°C 60 s，循环 26 次；72°C 延伸 5 min。选择性扩增程序为：94°C 变性 5 min；94°C 30 s，65°C 30 s (每个循环降低 0.7°C)，72°C 60 s，反应 12 次循环；94°C 30 s，56°C 30 s，72°C 60 s，进行 23 次循环；72°C 5 min。

1.2 数据分析

扩增条带用 Labworks 4.0 软件计数产生二态数据矩阵。由于 Lynch-Milligan 矫正删除了单态位点的数目会导致低估居群内的基因多样性 (钱韦和葛颂, 2001)，所以在不对数据进行 Lynch-Milligan 矫正的情况下用 TFPGA 软件计算每个居群的多态位点数，多态位点百分率和平均非偏差杂合度 (Unbiased mean heterozygosity)。用 Arlquin 2.0 软件计算每个居群的平均基因多样性，同时采用适合于显性标记的 ϕ 统计量的 AMOVA 分析方法 (钱韦和葛颂, 2001) 计算居群内、居群间的遗传变异。用 PAUP 软件的邻接法 (Neighbor-joining) 对所有个体进行聚类分析。

2 结果

两对引物组合共产生 125 个位点，94 个多态位点，多态百分率为 75.2%。图 1 作为一例子显示了扩增模式。两对引物组合在检测多态能力方面略有不同 (表 3)，ACA/CAC 产生多态位点 50 (79.0323%)，AAC/CTA 产生多态位点 44 (69.8413%)。不同的居群多态位点从 41 (32.8%) 到 69 (55.2%) 不等。其中遗传多样性最高的是嵩明 (ga) 居群 ($H_e = 0.1847$)，宣威 (yx) 居群遗传多样性最低 ($H_e = 0.1237$)。

表 3 两组引物组合产生的条带总数，多态条带数及多态条带百分比

Table 3 Bands generated by two primer combination

引物组合 Primer combination	多态条带 Number of polymorphic loci	总位点数 Number of total loci	多态位点百分率 Polymorphism rate/%
ACA/CAC	50	62	79.0323
AAC/CTA	44	63	69.8413

AMOVA 分析结果 (表 5) 表明 29.56% 的变异存在于居群间，70.44% 的变异存在于居群内部，显著性检测 $P < 0.05$ ，可以看出灰背栎居群的遗传变异主要存在于居群内部，分化指数 $\phi_{st} = 0.2956$ 。

利用 PAUP 软件对 8 个居群所有个体遗传关系的邻接法聚类分析如图 3 所示。

3 讨论

栎属高山栎组植物受海拔和不同生境影响形态变异很大，灰背栎也不例外。灰背栎在高山栎组中海拔分布居中 (2 000 ~ 3 350 m) (周浙昆, 1993)，垂直分布介于黄毛类与无毛类之间，经常作为黄背栎的伴生种或者和光叶高山栎混生，观察发现自然状态下可能和这

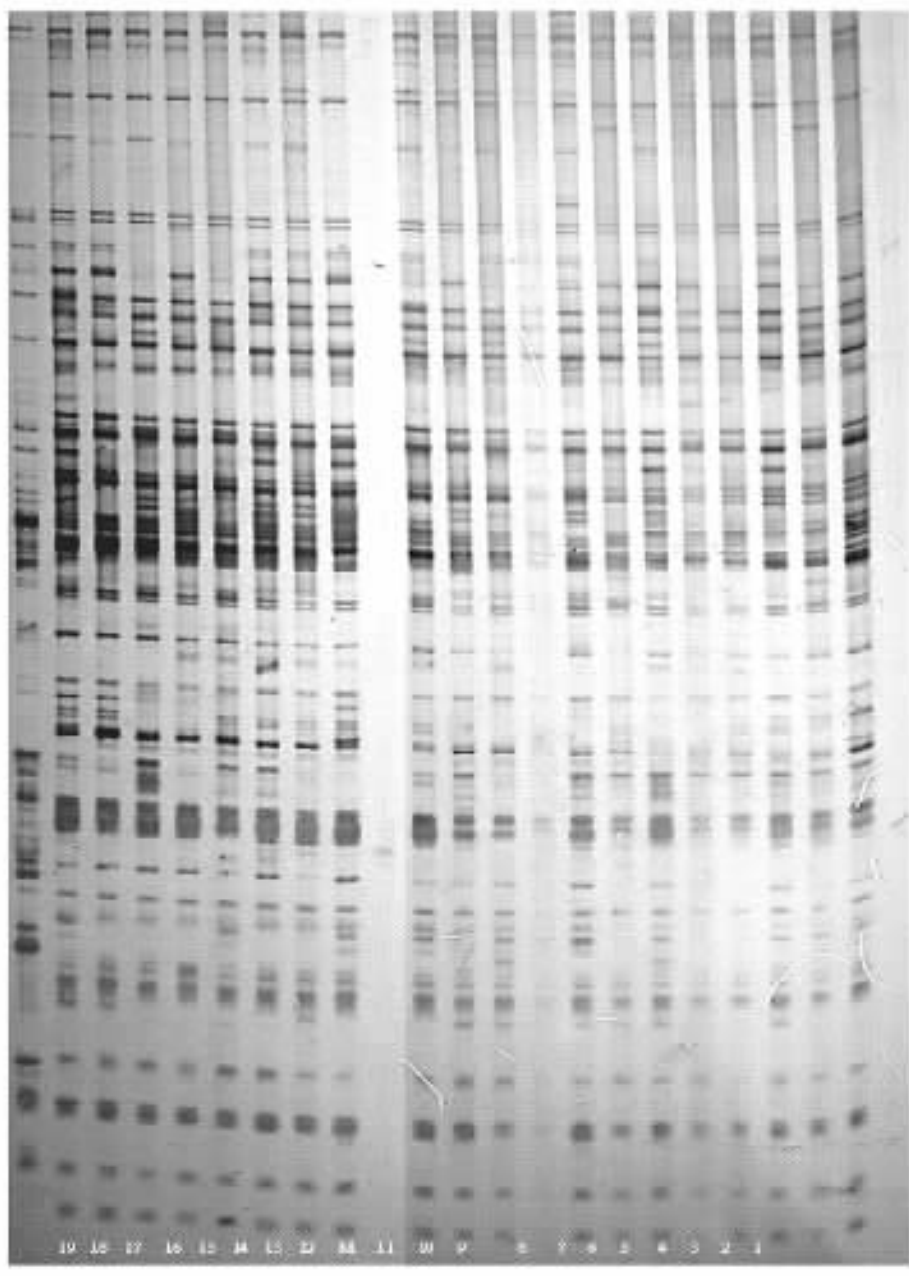


图 1 Qj 居群 EcoRI-ACA/MseI-CAC 引物组合获得的 AFLP 片段

Fig. 1 Amplification products obtained using EcoRI-ACA/MseI-CAC primer combination for genomic DNA of 19 individuals of QJ population

两种高山栎存在有杂交现象，形态性状不稳定。也很少有学者利用形态标记对栎属遗传多样性进行研究（Daubree and Kremer, 1993）。生化标记特别是 RAPD 等分子标记技术在栎属居群遗传多样性和遗传结构方面得到了广泛的应用（Kremer and Petit, 1993；李进等，

1998; Guttman and Weight, 1989; Dumolin-Lapegue, 1997; 恽锐等, 1998)。等位酶技术检测位点少, 并且受季节、生长阶段限制, RAPD 技术的重复性问题始终让人心存顾虑, 而 AFLP 技术以其迅速, 高效, 可靠性高, 重复性好的优势被广泛应用到居群遗传多样性和遗传结构研究中 (Carr 等, 2003; Kamiya 等, 2002; Kim 等, 2002)。本研究采用 AFLP 分子标记技术对灰背栎居群进行研究, 两对引物组合共产生 125 个位点, 其中 94 个为多态位点, 多态位点占 75.2%, 显示了在检测多态性方面的有效性。

3.1 居群内遗传多样性

两对引物组合共产生 94 个多态位点, 多态位点比率 75.2%。不同居群多态位点比率从 32.8% (西山 (xs)) 到 55.2% (嵩明 (ga)) 不等。8 个居群的平均基因多样性为 0.147021, 处于栎属树种 0.058~0.398 基因多样性变化范围, 低于栎属树种 0.186 的平均基因多样性值 (Kremer and Petit, 1993)。8 个居群平均非偏差杂合度从 $He = 0.1237$ (宣威 (yx) 居群) 到 $He = 0.1847$ (嵩明 (ga) 居群), 两项参数均显示灰背栎居群内遗传多样性水平不高。灰背栎居群一般比较小, 呈斑块状分布, 在群落中主要作为伴生种, 与其他高山栎组植物、云南松和杜鹃等混生, 极少形成纯林, 地理地貌上的复杂以及小居群导致遗传漂变、内杂交等原因而最终造成等位基因丢失和低水平的遗传多样性。另外灰背栎是高山栎组中山地类型 (杨钦周, 1990), 经常是处于村落周边或人畜活动频繁地区, 受人为影响多, 导致遗传多样性的下降。

表 4 中可以看出德钦 (dc) (2 030 m)、嵩明 (ga) (2 100 m)、曲靖 (qj) (2 200 m) 以及威宁 (dm) (2 100 m) 3 个居群遗传多样性水平较高, 而宣威 (yx) (2 365 m)、昭通 (dw) (2 500 m) 和武定 (wd) (2 550 m) 3 个居群遗传多样性水平较低。不难看出高海拔的居群遗传多样性偏高, 而低海拔的居群遗传多样性偏低 (图 2)。这一结果与李进等 (1998) 对西藏川滇高山栎随海拔升高遗传多样性的变化规律类似。川滇高山栎和灰背栎同属高山栎组植物, 由于具有特殊的防寒, 抗旱生理特性, 使得在第四纪青藏高原隆升过程中得以生存下来, 都有由低海拔向高海拔迁移的被动过程, 因此形成了这种遗传变异分布上类似的规律。但是由于灰背栎海拔差异不是很大, 并且居群大小亦有差异, 每个居群样品采集数有限, 也没有集中在同一山体, 加之高海拔的居群不多, 所采集居群海拔上也没有覆盖灰背栎的垂直分布范围, 所以这种遗传多样性水平和海拔之间相关关系难排除巧合之嫌疑。

表 4 遗传多样性参数

Table 4 Parameters of genetic variation detected with two primers pairs

居群 Population	样品数 Number of sample	海拔 Altitude	多态位点数 Polymorphic sites	多态位点百 分率 PPB	无偏差杂 合度 He	平均基因多样性 Average gene diversity over loci
dc	15	2030	56	44.8	0.1588	0.151162 ± 0.079601
dm	15	2100	55	44.0	0.1474	0.153448 ± 0.080761
dw	12	2500	50	40.0	0.1383	0.142667 ± 0.076797
ga	17	2100	69	55.2	0.1847	0.186706 ± 0.096749
yx	19	2365	45	36.0	0.1237	0.135485 ± 0.070496
wd	13	2550	47	37.6	0.1364	0.133333 ± 0.071413
xs	10	2250	41	32.8	0.1252	0.124978 ± 0.069032
qj	14	2200	53	42.4	0.1574	0.153231 ± 0.081104
Total	115	—	94	75.2	0.2112	0.147184 ± 0.078050

(注: He = unbiased heterozygosity; PPB = Percentage of polymorphic sites)

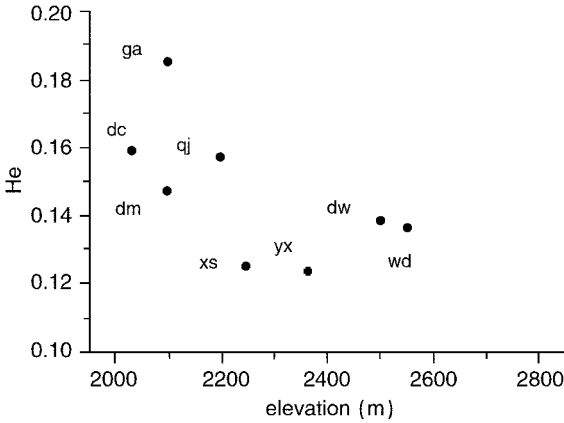


图2 不同居群海拔和遗传多样性关系图

Fig. 2 Correlation between elevation and genetic variation

布低外可能与这两个居群本身很大有关,也就是说高山栎组植物居群大小可能也是影响居群遗传多样性水平的一个重要原因。

3.2 居群遗传结构

以欧氏距离的 AMOVA 分析 (表 5) 显示 70.44% 的遗传变异存在于居群内部, 29.56% 的遗传变异存在于居群之间, 分化指数 $\varphi_{st} = 0.2956$, 远高于基于等位酶结果统计的 33 种栎属植物居群平均分化指数 0.01 ~ 0.17 这一范围的上限, 和大多数多年生、木本、风媒传粉、异交树种居群间分化小的结论也不同, 可与 Richard 和 Nasser (2003) 采用 AFLP 方法研究的 4 种红橡树结果比较, 但高于其平均值 (0.218)。其中 *Quercus agrifolia* 的 AFLP 研究结果 ($G_{st} = 0.247$) 和等位酶 (Millar 等, 1992) 结果 ($G_{st} = 0.07$) 相差悬殊, 这似乎暗示 AFLP 技术在检测更多多态位点的同时, 在检测遗传结构方面比等位酶技术更敏感。

表 5 AMOVA 分析结果 (基于 Euclidean 距离系数)

Table 5 The result of AMOVA analysis (based on Euclidean)

变异来源 Source of variation	自由度 d.f.	方差 SSD	变异成分 VC	变异百分率/% of total	分化指数 φ_{st}
居群间 Among Populations	7	457.543	3.91673Va	29.56	
居群内 Within populations	107	998.544	9.33218Vb	70.44	0.2956
总和 Total	114	1456.087	13.24891		

虽然普遍认为栎属植物居群间基因交流频繁, 遗传分化一般较小, 但是关于高山栎组植物这方面的资料很少。李进等 (1997) 曾采用同工酶方法对川滇高山栎的研究, 结果 G_{st} 为 0.167, 同样显示了大的分化, 普春霞 (2002) 采用 AFLP 方法在对高山栎组中刺叶栎复合群的研究中得出刺叶栎复合群居群之间分化极大的结果 ($G_{st} = 0.3154$)。一种植物的遗传结构受过去以及现在它们之间基因流的深刻影响, Park 等 (1994) 指出在遗传多样性决定及遗传多样性分布方面历史因素可能具有更加深远的影响。Coart 等 (2002) 对栎属植物的研究中发现 150 km 的范围内不能认为是一个随机交配的群体, 这和栎属花粉远距离的传播相悖, 分析可能是历史事件的影响, 而分子生物学方面的分析正揭示了历史事件如生境片断化和居群的瓶颈效应对遗传变异分布模式会有重要的影响 (Newton 等, 1999)。

高明 (ga) 居群具有最高的遗传多样性水平 ($He = 0.1847$), 而宣威 (yx) ($He = 0.1237$) 和昆明 (xs) ($He = 0.1252$) 居群遗传多样性水平最低, 从海拔角度来考虑, 宣威 (yx) 居群海拔分布接近 2 400 m, 遗传多样性低的原因可能是海拔分布高。昆明 (xs) 居群海拔分布不高, 从海拔角度考虑遗传多样性应比较高些才对, 但昆明 (xs) 居群非常小, 树龄老化, 整个居群 15 株不到, 所以遗传多样性偏低的原因之一可能是由于居群小, 由遗传漂变造成。由此推断高明 (ga)、德钦 (dc) 居群遗传多样性高的原因除了由于海拔分

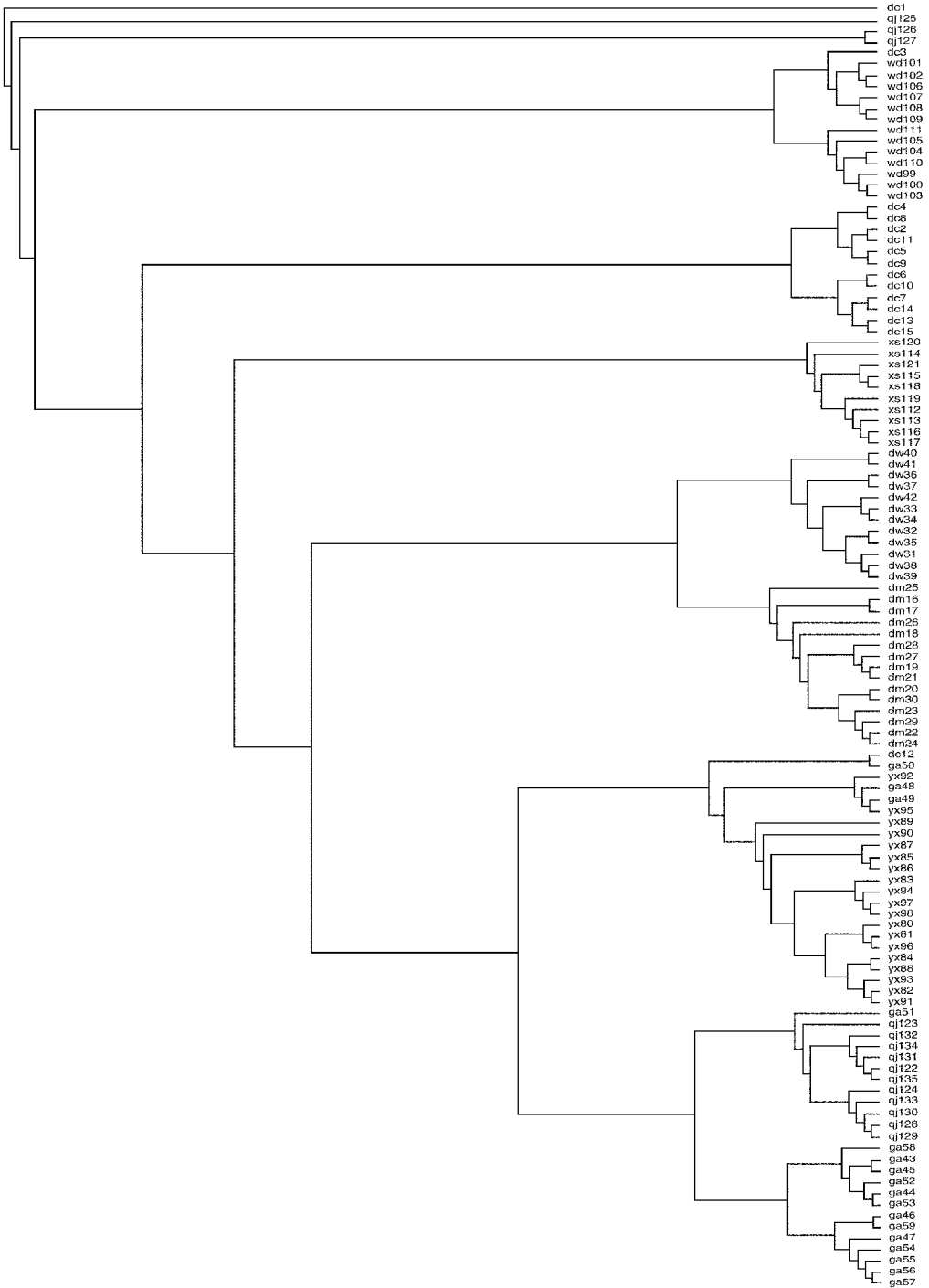


图 3 115 个个体邻接树 (德钦 = dc, 威宁 = dm, 昭通 = dw, 高明 = ga, 曲靖 = qj, 武定 = wd, 昆明 = xs, 宣威 = yx)

Fig. 3 Neighbour-joining dendrogram of AFLP for 115 individuals of *Quercus senescens*

(Deqin = dc, Weining = dw, Songming = ga, Qujing = qj, Wuding = wd, Kunming = xs, Xuanwei = yx)

在 Richard 和 Nasser (2003) 研究的 4 种红橡树中 *Quercus wislizeni* 和 *Quercus kelloggii* 分布广泛,但是和另外两个种比较并没有显示分化程度低,分析也认为这种高水平的居群分化是生境片段化的历史原因造成,并且和更新世冰川作用居群撤退到避难所有关。新近纪开始的喜马拉雅造山运动对高山栎组植物所处的喜马拉雅以及横断山地区的地理环境和气候环境产生了深刻影响,而且第四纪冰川同样波及这一地区。所以认为晚第三纪喜马拉雅山脉隆升、横断山脉形成及第四纪冰期间冰期交替的历史变迁对高山栎组植物的遗传结构也势必产生了重要影响。聚类分析(图 3)表明,嵩明(ga)、曲靖(qj)和宣威(yx)居群首先聚成一支,昭通(dw)和威宁(dm)居群聚成另外一支,然后两支结合,之后又和昆明(xs)、德钦(dc)和武定(wd)依次聚合,这一聚合结果可能和灰背栎分布格局的形成有关,需要进一步探讨。此外特别近几十年来我国西南地区森林破坏严重,生境片段化严重,尤其对于灰背栎分布海拔较低,多处于人畜活动频繁地带的树种。由于栎树可以烧炭,还可以作为饲料,所以遭破坏程度更大,致使大居群变小居群,乔木居群变矮林居群,纯林罕见。这和 *Q. wislizeni* 和 *Q. kelloggii* 两个种具有相似的历史历程,所以在遗传结构上也就相似的具有不同于一般栎属植物的遗传结构特征而显示了与一般栎属植物及异交植物种类相比高水平的居群间分化。

地理隔离(包括河流、山脉、冰川以及人为的公路和沟渠)阻碍居群间基因交流,因此对居群遗传结构具有重要的影响,通常导致高的居群分化水平(Corre 等, 1997; Bauert 等, 1998)。Andrew Schnabel 和 Hamrick (1990) 对北美广域分布的 *Quercus macrocarpa* 和相对狭域分布并且所处环境复杂的 *Quercus gambelii* 进行研究, G_{st} 分别为 0.076 和 0.119, 揭示了地理环境对遗传结构及基因流的阻碍作用。灰背栎分布虽然广泛,但主要集中在横断山区,所处环境异质度高、地理地形复杂,以此来看适应差别以及由地理隔离而导致的灰背栎居群间有限的基因交流可能是灰背栎居群间强的分化的原因之一。

另外种子的散布方式以及生活型的不同也是影响居群遗传结构的重要因素, Hamrick 和 Godt (1989) 发现靠风散布种子的植物通常具有低水平的遗传分化 ($G_{st} = 0.143$), 通常比靠重力散布的植物 ($G_{st} = 0.277$) 低了将近 1/2。灰背栎主要是以重力传播种子,一定程度上限制了基因交流。本研究中灰背栎 8 个居群由于受人为、海拔等因素的影响有的是萌生灌丛,有的是小乔木,有的是胸径达 60 cm 的大乔木,生活型上的不同可能是分化大的又一原因。

综合以上分析认为灰背栎居群遗传结构结果可能是小居群散生,斑块状分布,生活型不同、种子靠重力散布、横断山区复杂的地理地貌以及地质历史诸因素的综合结果,是我国受历史变迁深刻作用的栎属高山栎组植物在特定环境下所特有的遗传结构特征,特别是对于灰背栎这样的小居群、散生、生境片段化严重的物种。

[参 考 文 献]

- Andrew Schnabel, Hamrick JL, 1990. Comparative analysis of population genetic structure in *Quercus macrocarpa* and *Q. gambelii* (Fagaceae) [J]. *System Botany*, 15 (2): 240—251
- Bauert MR, Kalin M, Baltisberger M, et al, 1998. No genetic variation detected within isolated relict populations of *Saxifraga cernua*

- in the Alps using RAPD markers [J]. *Mol Ecol* , **7** : 1519—1527
- Carr J, XU M, Dudley JW, *et al*, 2003. AFLP analysis of genetic variability in New Guinea *impatiens* [J]. *Theor Appl Genet* , **106** : 1509—1516
- Cerasoli S, Scartazza A, Brugnoli E, *et al*, 2004. Effects of partial defoliation on carbon and nitrogen partitioning and photosynthetic carbon uptake by two-year-old cork oak (*Quercus suber*) samplings [J]. *Tree Physiol* , **24** (1): 83—90
- Coart E, Lamote V, De Loose M, *et al*, 2002. AFLP markers demonstrate local genetic differentiation between two indigenous oak species [*Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl.] in Flemish populations [J]. *Theor Appl Genet* , **105** (2—3): 431—439
- Corre Vle, Dumolin-Lapegue S, Kremer A, 1997. Genetic variation at allozyme and RAPD loci in sessile oak *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. : the role of history and geography [J]. *Mol Ecol* , **6** : 519—529
- Daubree JB, Kremer A, 1993. Genetic and phonological differentiation between introduced and natural populations of *Quercus rubra* L [J]. *Ann Sci For* , **50** (suppl 1): 271—280
- Dodd RS, Kashani N, 2003. Molecular differentiation and diversity among the California red oaks (Fagaceae ; *Quercus* section *Lobatae*) [J]. *Theor Appl Genet* , **107** (5): 884—92
- Doyle JJ, Doyle JL, 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue [J]. *Focus* , **12** (1): 13—15
- Dumolin-Lapegue S, Demesure B, Fineschi S, *et al*, 1997. Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent [J]. *Genetics* , **146** : 1475—1487
- Filippo Bussotti, Paolo Grossoni, 1997. European and Mediterranean oaks (*Quercus* L. ; Fagaceae) : SEM characterization of the micromorphology of the abaxial leaf surface [J]. *Botanical Journal of the Linnean Society* , **124** : 183—199
- Guttman SL, Weight LA, 1989. Electrophoretic evidence of eastern North America [J]. *Can J Bot* , **67** : 339—351
- Hamrick JL, Godt MJ, 1989. Allozyme diversity in plant species [A]. In : Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS (eds), *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources* [C]. Sunderland : Sinauer Associates, 43—63
- Kamiya K, Harada K, Clyde MM, *et al*, 2002. Genetic variation of *Trigonobalanus verticillata* , a primitive species of Fagaceae, in Malaysia revealed by chloroplast sequences and AFLP markers [J]. *Genes Genet Syst* , **77** : 177—186
- Kim MS, Moore PH, Zee F, *et al*, 2002. Genetic diversity of *Carica papaya* as revealed by AFLP markers [J]. *Genome* , **45** : 503—512
- Kremer A, Petit RJ, 1993. Gene diversity in nature population of oak species [J]. *Ann Sci For* , **50** (Suppl 1): 186—202
- Kvacek Z, Walther H, 1989. Paleobotanical studies in Fagaceae of the European Tertiary [J]. *Pl Syst Evol* , **162** : 213—229
- Li J (李进), Chen KY (陈可咏), Li BS (李渤生), 1998. The variation of genetic diversity of *Quercus aquifolioides* in different elevations [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), **40** (8): 761—767
- Li J (李进), Chen KY (陈可咏), Li BS (李渤生), 1997. Preliminary study on genetic structure of alpine oaks in Tibet [J]. *J Beijing Forest Univ* (北京林业大学学报), **19** (2): 93—98
- Li JQ (李俊清), 1996. Diversities and evolution of the sclerophyllous oaks in Tibet [J]. *Chin J Ecology* (生态学杂志), **15** (4): 55—58
- Liang HP (梁红平), Ren XW (任宪威), Liu YQ (刘一樵), 1990. A study on the morphology of foliar trichomes of evergreen oaks (*Quercus*) in China and ITS implication in taxonomy [J]. *Acta Phytotax Sin* (植物分类学报), **28** (2): 112—121
- Manos PS, Doyle JJ, Nixon KC, 1999. Phylogeny, biogeography, and processes of molecular differentiation in *Quercus* Subgenus *Quercus* (Fagaceae) [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution* , **12** (3): 333—349
- Millar Cl, Riggs LA, Delany DL, 1992. Genetic variability of coast oak (*Quercus agrifolia*), valley oak (*Q. lobata*), and blue oak (*Q. douglasii*) in California [J]. *Syst Bot* (in press)
- Newton AC, Allnut TR, Gillies ACM, *et al*, 1999. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species [J]. *Trends Ecol Evol* , **14** : 140—145
- Park CR, Wendel JF, Swell MM, *et al*, 1994. The significance of allozyme variation and introgression in the *Liriodendron tulifera* complex (Magnoliaceae) [J]. *Amer J Bot* , **81** : 878—889
- Pu CX (普春霞), 2002. Biogeography of *Quercus spinosa* complex [D]. Kunming : Kunming Institute of Botany, Chinese Academy

of Sciences

- Qian W (钱韦), Ge S (葛颂), 2001. Analyses of population genetic structure by using dominant markers [J]. *Acta Genet Sin* (遗传学报), **28**: 244—255
- Richard S. Dodd, Nasser Kashani, 2003. Molecular differentiation and diversity among the California red oaks (Fagaceae; *Quercus* section *Lobatae*) [J]. *Theor Appl Genet*, **107**: 884—892
- Sokal RR, Jacquez GM, Wooten M, 1989. Spatial autocorrelation analysis of migration and selection [J]. *Genetics*, **121**: 845—855
- Sun H (孙航), 2002. Tethys and Himalayas-Hengduanshan Mountains uplift and their significance on the origin and development of the Sino-Himalayan elements and Alpine flora [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **24** (3): 273—288
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al, 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucleic Acids Research*, **23**: 4407—4414
- Yang QZ (杨钦周), 1990. The characteristics and classification of oak durisilvae in the Himalayan of China [J]. *Acta Phytocool Geobot Sin* (植物生态学与地植物学学报), **14** (3): 197—211
- Yun R (恽锐), Zhong M (钟敏), Wang HX (王洪新), et al, 1998. Study on DNA diversity of Liaodong oak population at Dongling mountain region, Beijing [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), **40** (2): 169—175
- Zhang JT (张金谈), Wang PL (王萍莉), 1986. Pollen morphology of *Quercus* L. in China [J]. *Acta Phytotax Sin* (植物分类学报), **24** (5): 362—369
- Zhou ZK (周浙昆), 1993. Geographical distribution of *Quercus* from China [J]. *Journal of Graduate School, Academia Sinica* (中国科学院研究生院学报), **10** (1): 95—108
- Zhou ZK (周浙昆), 1999. Fossils of the Fagaceae and their implications in systematics and biogeography [J]. *Acta Phytotax Sin* (植物分类学报), **37** (4): 369—385
- Zhou ZK (周浙昆), Pu CX (普春霞), Chen WY (陈文允), 2003. Relationships between the distributions of *Quercus* sect. *Heterobalanus* (Fagaceae) and uplift of Himalayas [J]. *Adv Earth Sci* (地球科学进展), **18** (6): 884—890
- Zhou ZK, Wilkinson HP, Wu ZY, 1995. Taxonomical and evolutionary implication of the leaf anatomy and architecture of *Quercus* L. Subgenus *Quercus* from China [J]. *Cathaya*, **7**: 1—34