

色季拉山不同海拔高度的藏川杨种群遗传多样性研究

沈登锋¹, 薄文浩¹, 徐放¹, 姜立波¹, 毛柯¹, 韩玉霞², 邬荣领¹

(¹北京林业大学计算生物学中心/北京林业大学生物科学与技术学院/林木育种国家工程实验室/林木花卉遗传育种教育部重点实验室, 北京 100083; ²吉林省露水河林业局宏伟种子园, 白山 134506)

摘要:为研究青藏高原海拔变化与藏川杨遗传多样性和群体遗传结构的关系,以青藏高原东南部色季拉山分布的藏川杨群体为材料,用24对微卫星标记对其进行遗传分析。在469个个体中共检测到126个等位基因,每个位点的平均等位基因数(N_a)为5.25;多态性位点百分率(PPL)为100%,期望杂合度(H_e)在高、低海拔的群体中都处于较高水平,分别为0.48和0.49;分子方差分析(AMOVA)的结果表明,种群间分化占总变异的6.38%,遗传变异主要集中在群体内不同个体之间;基因分化系数(F_{ST})为0.02,也证实群体分化处于较低水平,而检测到群体间的基因流动(N_m)处于较高水平,为9.89。上述结果表明,海拔因素未对生长在色季拉山高低海拔的藏川杨群体造成地理隔离,从而产生种群分化;在此地区藏川杨遗传背景一致,藏川杨种质资源的保存无需考虑海拔的差异。本研究结果为研究高海拔适应机制材料的选择提供了很大的便利,并为藏川杨的可持续利用与保护提供了一定的理论依据。

关键词:藏川杨;遗传多样性;海拔高度;群体遗传结构;青藏高原

Study on Genetic Diversity among Populations in *Populus szechuanica* var. *tibetica* at Different Altitudes in Sejila Mountain

SHEN Deng-feng¹, BO Wen-hao¹, XU Fang¹, JIANG Li-bo¹,
MAO Ke¹, HAN Yu-xia², WU Rong-ling¹

(¹Center for Computational Biology, College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University / National Engineering Laboratory for Tree Breeding / Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants, Ministry of Education, Beijing 100083; ²Hongwei Seed Orchard of Department of Lushuihe Forestry in Jilin Province, Baishan 134506)

Abstract: In order to study the relationship between elevation and populations of *Populus szechuanica* var. *tibetica* located on the Qinghai-Tibet Plateau, 24 pairs of SSR primers were used to study genetic diversity and structure of populations in Sejila Mountain of the southeastern plateau. A total of 126 alleles was detected from 469 individuals, with an average of 5.25 alleles per locus, a PPL (polymorphism percentage level) of 100%, and a relatively high expected heterozygosity (H_e) for populations at high and low altitudes of 0.48 and 0.49, respectively. Analysis of molecular variance (AMOVA) showed that differentiation among populations accounted for 6.38% of the total and most variation existed among the individuals within a population. A differentiation coefficient (F_{ST}) of 0.02 and the value of gene flow (N_m) was 9.89 at a very high level also supported the conclusion that the differentiation among populations was at a low level. In conclusion, no geographical separation and differentiation of populations along the altitude of Sejila Mountain were observed. As a result, conservation and utilization of Tibetan poplar facilitated on the basis of understanding of differentiation and distribution patterns of the species and study on mechanism of adaptation to a high altitude could be proceed smoothly.

收稿日期: 2013-10-21 修回日期: 2013-12-06 网络出版日期: 2014-06-09

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20140609.1414.009.html>

基金项目: 国家千人计划基金(30900854); 长江学者基金(201404102)

第一作者研究方向为森林遗传学。E-mail: dengfeng028@163.com

通信作者: 邬荣领, 研究方向为统计遗传学。E-mail: rwu@phs.psu.edu

Key words: *Populus szechuanica* var. *tibetica*; genetic diversity; population structure; altitude; Qinghai-Tibet Plateau

藏川杨 (*Populus szechuanica* var. *tibetica*) 属杨柳科 (*Salicaceae*) 杨属 (*Populus*), 为川杨 (*Populus szechuanica*) 的变种, 主要分布于四川省和西藏自治区, 是我国特有的落叶阔叶乔木, 多生长于海拔 2000 ~ 4500 m 的河谷、沟边的冲积土或草甸土上^[1]。藏川杨是杨属中分布海拔最高的树种, 对于高原环境具有良好的适应性, 是我国杨属特有树种, 是高寒地区杨树育种工作所需的基因资源。生活在不同环境、不同地区的种群在遗传多样性以及群体遗传结构上都存在着很大的不同^[2-4]。因此, 在进行种质资源的收集保护之前, 需要对该物种的遗传背景进行有效评估。目前关于藏川杨的研究报道主要集中于生理^[5]、栽培技术^[6-7]、造林技术^[8-9]等方面, 遗传多样性方面的研究鲜有报道。为确保藏川杨资源保护和育种工作的顺利开展, 迫切需要开展藏川杨群体遗传多样性方面的研究。

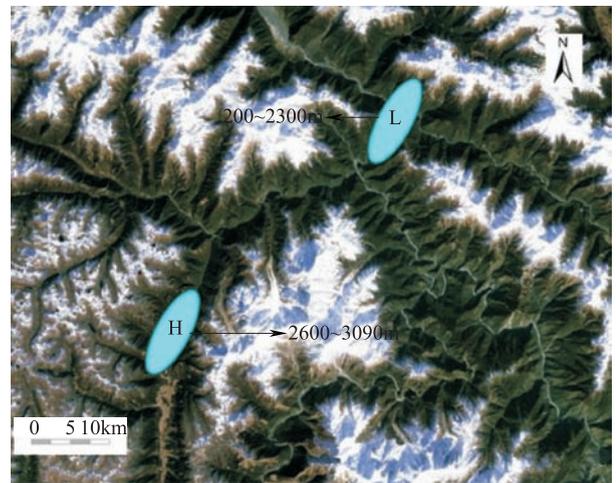
分子标记作为有效研究手段被广泛地应用于遗传多样性、遗传结构分析等研究^[10-12]。其中微卫星分子标记 (SSR) 具有重复性好、多态性高和共显性等特性, 在植物遗传多样性研究^[13-14]、品种鉴定^[15]、分子标记辅助育种^[16]等方面得到了广泛的应用。

为了解高山地区分布的藏川杨的遗传多样性及群体遗传结构是否受海拔因子的响应, 本研究使用 24 对基于胡杨 (*Populus euphratica*) EST 序列开发的 SSR 引物, 对生长在西藏林芝地区色季拉山低海拔和高海拔 2 个区域采集的藏川杨群体的 469 个个体进行了基因分型, 分析了 2 个不同海拔群体间的遗传多样性及群体遗传结构的差异, 为藏川杨资源的遗传研究奠定基础, 同时也为藏川杨的保护、合理开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品收集

2011 年 8 月和 2012 年 8 月在西藏自治区林芝地区的色季拉山采样, 采样区域海拔分别为 2600 ~ 3090 m 及 2000 ~ 2300 m。前者为高海拔区域, 共采样 238 个; 后者为低海拔区域, 采样 231 个 (图 1)。每个采样单株 GPS 定位, 采集 3 ~ 5 片叶片, 现场硅胶干燥保存, 用于后续 DNA 的提取。



H: 高海拔; L: 低海拔

H: High elevation, L: Low elevation

图 1 在西藏采样点示意图

Fig. 1 Sampling sites in Tibet autonomous region

1.2 DNA 提取

采用改良 CTAB^[17]法, 提取 469 个单株的基因组 DNA, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测 DNA 质量和浓度, 并稀释至终浓度 50 ng/ μ L, 于 -20 $^{\circ}$ C 贮存备用。

1.3 SSR 扩增

SSR-PCR 反应体系: 10 ng 模板 DNA, 2 \times *Taq* mix 5 μ L, 正向引物 (10 μ mol/L) 0.4 μ L, 反向引物 (10 μ mol/L) 1.6 μ L, 带有 4 种荧光标记 (FAM、HEX、TAMRA or ROX) 的 M13 引物 (10 μ mol/L) 1.6 μ L, 用 ddH₂O 补加至 10 μ L。PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 30 个循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 53 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 8 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

SSR 引物选自公布的 113 对基于胡杨 EST 文库开发的 EST-SSR 引物^[18], 并在正向引物的 5' 末端添加 18 bp 的 M13 通用序列 (5'-TCTAAAACCAC-CCCCACT-3')。随机选择 4 份藏川杨个体的基因组 DNA 对 SSR 引物进行筛选, 并对扩增产物中具有多态性的条带进行测序, 选择扩增产物中存在重复序列且重复数 ≥ 3 的引物用于遗传多样性分析。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

样品 DNA 扩增后在 DNA 分析仪 (ABI 3730XL) 上进行毛细管电泳分离检测, 结果用 GeneMarker 1.75 软件 (Soft Genetics LLC, USA) 读取, 记录每个位点的片段大小。

1.4 数据分析

利用 LOSITAN 软件^[19]对位点是否存在选择压力进行检测,对通过中性检验的位点进行后续的分析;利用 POPGENE VISION 1.32^[20]估算以下遗传参数:每个位点的等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、Shannon 多样性指数(I)、群体内近交系数(F_{IS})、群体总近交系数(F_{IT})、基因分化系数(F_{ST})、基因流(N_m);Arlequin3.5(<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>)软件对藏川杨遗传变异进行分子方差分析,检测遗传变异分别在群体内和群体间所占比例;利用 STRUCTURE 2.3 软件^[21]对群体内的遗传结构进行分析,用于观察群体遗传结构与海拔高度变化之间的关系,根据 G. Evanno 等^[22]提出的方法来确定居

群的数量。比较等位基因数(N_a)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、Shannon 多样性指数(I)等指标在高低海拔 2 个群体中的变化,来衡量海拔梯度变化对群体遗传多样性的影响。

2 结果与分析

2.1 群体遗传多样性分析

经过筛选,24 对引物可以用于藏川杨的遗传研究,且 PCR 产物经测序后上传 GENE BANK(表 1)。24 对微卫星引物在色季拉山分布的 2 个藏川杨研究群体所有个体中进行扩增,共检测到 126 个等位基因,每个位点的等位基因数在 2~13 个之间,平均每个位点的等位基因数为 5.25。所有位点在藏川杨自然群体中

表 1 24 对可用于藏川杨遗传研究的 SSR 引物信息表

Table 1 24 SSR primer pairs applied in genetic study of *Populus szechuanica* var. *tibetica*

引物编号 ID	重复单元 Repeat unit	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer	产物长度(bp) Allele range	登录号 GenBank ID
U18679	(TGC)7	ACATCAGGTGGTCTTCCTCG	GCATGCTTAAGGCACGAGTT	401~413	KF501217
U21882	(GAT)6	GCGGACGGTCTFGATTACAT	TCTTTGACCCCTTTTAGCGGA	305~329	KF501218
U22153	(AC)13	TTCCACAAGCCATACCACAA	CCACCTTTCGTAACCTTGGA	269~281	
U61645	(TG)13	AATGGTATAGCCGGCCTCTT	ACAGGAGAAGGGGAGATGT	220~222	KF501226
U63239	(CTC)6	TTTGCTCTGTGAACGCAATC	AGCTTGTGGATTTGTCTGCG	202~205	KF501227
U78717	(GT)10	CTGGTATGGATGGATTGGG	ATTAAGCCCAAGCCTTCACC	237~239	KF501231
U7452	(AC)11	CCCCCTCCTTACATCTTATGG	CTGGAAAGTGCATCTCCGAT	265~287	KF501215
U64059	(AG)10	TGTGCAATTGTGAGGTC AAT	GCAACCTAAATGACCACCTTG	295~315	KF501228
U7459	(CT)12	TCCTTCCTTCACGAAGCACT	GTGGGCAAGCTCTTTGAAAC	325~337	KF501216
U60914	(AG)11	TTGACCCCAAGTTCAGATTC	GGCAAATTCGCCCTAGAATTA	226~238	KF501225
U78	(GAGCTG)3	TGTCAGCTCTTCACCACCTG	CAGAAAGGGAGAACCACAA	176~194	KF501212
U74541	(AC)10	GACCCACACCCACAAAAGAT	TCACATGAATTTGTCTCGAGTG	217~221	KF501230
U4192	(AAAAAT)3	GCAGTGGAGAAGAAGCATCC	CGTTGCTTTGCGAGACAATA	298~313	KF501213
U16390	(TGGGGA)3	TGGACTCCGAGGAAGAGAGA	TCGTCACTTTTGCAAGCATC	454~560	
U16	(GAG)9	GGAGGACCAGATAAGGGAGC	TGGGGTAAGCTGACTTGCTT	222~234	KF501211
U45275	(TTC)7	TGCAGTTTTAGGCCTCTTCC	CTGCAGAATTCACATCCAA	181~193	KF501224
U35013	(CT)16	TTTCCAGGGACAGAACTTCG	GATGGGGTGAGAGAGGAACA	110~134	
U65600	(AG)14	GTCTTTGGTGGCTACACCGT	CTCAATCCTTTCCTTGGTGG	229~240	KF501229
U37186	(CA)10	TAACATGGCGAGTAGGGACC	GCCAAACAGACCTCGATCAT	399~403	KF501221
U6496	(TTCTT)5	GTAACAAAGGGACCCCTCC	CCCAAATCCCAATTATTC	290~298	KF501214
U34847	(AG)14	TCTCCTCTCCTTTCCACCAA	AAAAAGCCCAAGGATCAGGT	182~199	KF501219
U38100	(GT)12	GCTGTGCTTGAGGATGATGA	CCCTAATCCCACCTCTTGAA	210~225	KF501223
U38010	(TTG)12	ACCACCTTCATGTTCTTGGC	CCGTTTCTTTCCTCCCAA	309~337	KF501222
U35536	(AGAAGT)3	TGAAATTTGGTGGTGCAGTA	CTCTTCACCAAAAACCTCCA	269~275	KF501220

均表现出多态性,位点多态率(PPL)为 100%;期望杂合度(H_e)的分布为 0.077~0.717,平均为 0.407;Shannon 多样性指数(I)为 0.129~1.679,平均为 0.868。通

过比较可以看出,在 2 个群体中每个位点的有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、Shannon 多样性指数(I),均未表现出明显差异(表 2)。

表 2 经检验的中性位点在高低海拔群体中的遗传参数

Table 2 Genetic parameters of populations at different altitude at neutral loci

位点 Locus	高海拔群体 Population of high altitude				低海拔群体 Population of low altitude				总群体 All individuals			
	有效等位 基因数 N_e	Shannon 指数 I	观测 杂合度 H_o	期望 杂合度 H_e	有效等位 基因数 N_e	Shannon 指数 I	观测 杂合度 H_o	期望 杂合度 H_e	群体内近 交系数 F_{IS}	群体总近 交系数 F_{IT}	基因分化 系数 F_{ST}	基因流 N_m
	U18679	1.12	0.24	0.11	0.11	1.04	0.13	0.04	0.04	-0.04	-0.03	0.01
U21882	2.27	1.04	0.47	0.56	1.29	0.51	0.34	0.42	0.15	0.20	0.06	4.00
U22153	2.36	1.00	0.45	0.58	3.04	1.29	0.54	0.66	0.13	0.18	0.05	4.33
U61645	1.96	0.68	0.32	0.49	1.92	0.67	0.35	0.50	0.27	0.29	0.03	8.40
U63239	1.85	0.78	0.54	0.46	1.46	0.55	0.41	0.40	-0.04	-0.02	0.01	16.85
U78717	1.62	0.57	0.40	0.38	1.82	0.64	0.42	0.42	-0.02	-0.01	0.01	27.41
U7452	3.66	1.54	0.70	0.73	4.52	1.68	0.68	0.79	0.09	0.13	0.04	5.72
U64059	2.82	1.26	0.59	0.65	3.46	1.53	0.61	0.68	0.11	0.11	0.01	25.20
U7459	1.49	0.51	0.21	0.33	1.87	0.75	0.17	0.39	0.58	0.59	0.02	13.48
U60914	1.35	0.46	0.26	0.26	1.92	0.71	0.33	0.39	0.09	0.15	0.07	3.60
U78	2.76	1.18	0.46	0.64	2.23	1.01	0.46	0.64	0.23	0.29	0.07	3.29
U4192	2.62	1.14	0.63	0.62	2.28	1.04	0.57	0.59	0.03	0.03	0.00	51.07
U16390	1.81	0.64	0.46	0.45	1.98	0.69	0.47	0.48	0.01	0.02	0.01	17.83
U16	1.36	0.53	0.16	0.27	1.49	0.65	0.18	0.30	0.38	0.39	0.02	11.93
U45275	1.86	0.71	0.49	0.46	1.90	0.73	0.46	0.47	0.02	0.02	0.00	570.33
U35013	3.76	1.55	0.29	0.74	2.60	1.27	0.29	0.70	0.57	0.59	0.03	7.03
U37186	1.78	0.63	0.45	0.44	1.75	0.62	0.41	0.43	0.06	0.06	0.00	1000.00
U6496	1.78	0.63	0.45	0.44	1.75	0.62	0.41	0.43	0.06	0.06	0.00	1000.00
U34847	1.41	0.63	0.31	0.29	1.74	0.98	0.36	0.36	0.00	0.01	0.01	29.35
U38100	2.22	0.99	0.43	0.55	2.84	1.26	0.48	0.61	0.20	0.21	0.01	17.58
U38010	4.27	1.54	0.80	0.77	3.01	1.21	0.72	0.73	0.00	0.02	0.02	15.01
U35536	1.57	0.55	0.38	0.37	1.70	0.60	0.40	0.39	-0.03	-0.03	0.00	72.57
平均值 Mean	2.17	0.85	0.43	0.48	2.16	0.87	0.42	0.49	0.14	0.16	0.02	9.89

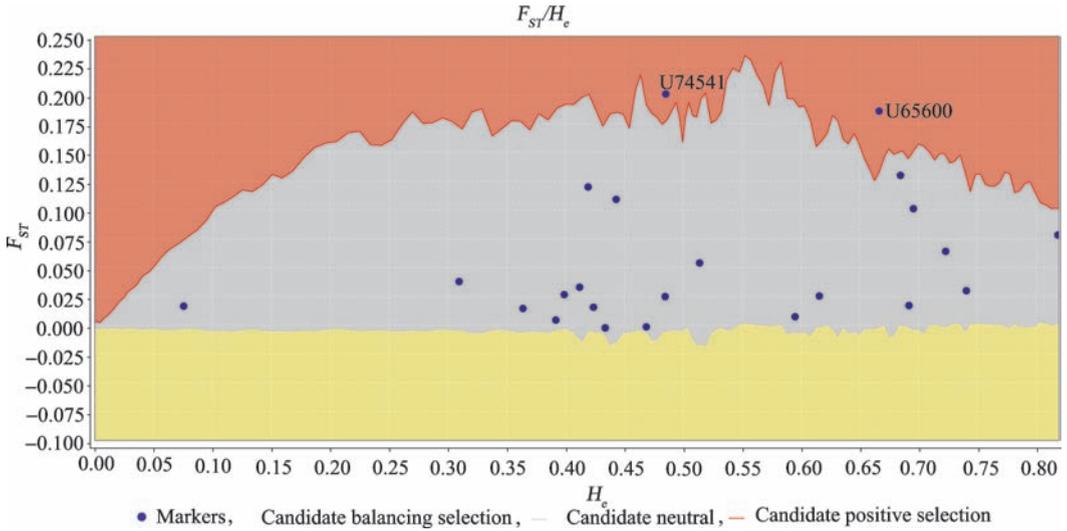
2.2 标记的中性检验

经 LOSITAN 软件检测,在 99% 置信区间内,其中 U74541、U65600 两个位点处于自然选择压力下(图 2),PCR 产物测序结果比对发现 U65600 PCR 产物中有 110 bp 的片段与毛果杨(*Populus trichocarpa* Torr. & Gray)预测蛋白 XM_002311699.1 的序列完全一致。对该预测蛋白进行 BLASTX 发现其与可可(*Theobroma cacao*)中的水解酶超家族密切相关。

2.3 群体遗传结构分析

在去除上述 2 个受到自然选择的位点之后对群体的遗传结构等进行了分析。用 Arlequin3.5 软件

对藏川杨群体进行 AMOVA 分析,发现 6.38% 的变异发生在种群之间,93.62% 的变异位于种群的内部个体之间(表 3)。利用 STRUCTURE 2.3 使用 non-admixture model 对群体结构进行了分析,利用 G. Evanno 等^[22]提出的方法最终确定 $K = 2$ (图 3),结果显示所有群体共分为 2 个亚群,其中高海拔和低海拔各自分为一个居群(图 4)。群体间的分化系数 F_{ST} 为 0.02 表明 2 个群体分化水平均很低,而检测到的基因流动(N_m)为 9.89,表明 2 个群体间存在广泛的基因交流。



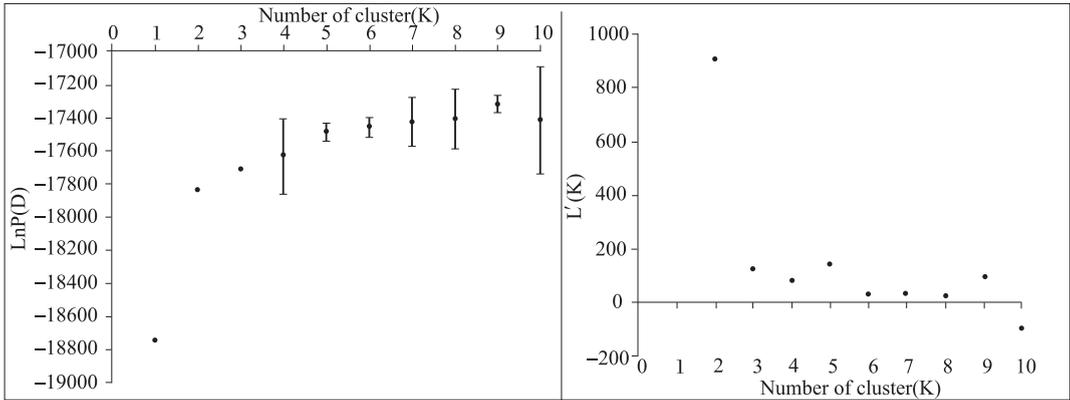
LOSITAN 基于 F_{ST} 和 H_e 的关系对位点是否处于选择压力下筛选,

其中位于红色区域的点为在检测的群体间该位点受到了自然选择的影响;灰色区域为中性进化位点

LOSITAN was applied to test whether the locus was under nature selection based on the ratio between F_{ST} and H_e , the locus in the red area meant that it was under the selection among different populations, the locus in the grey area meant that it was a neutral kind

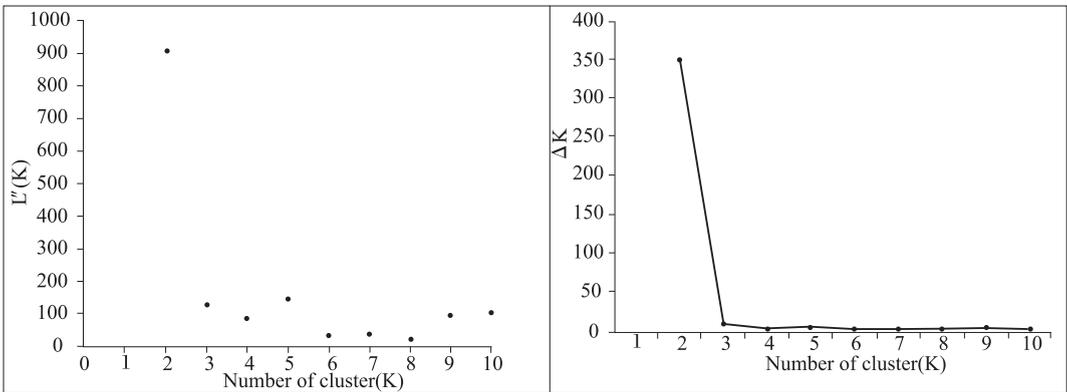
图 2 基于 F_{ST} 和 H_e 关系的中性位点筛选

Fig. 2 Neutrality test based on the ratio between F_{ST} and H_e



A

B



C

D

A: 最大似然值 $\ln P(D)$; B: $L'(K)$; C: $L''(K)$; D: ΔK

A: Maximum likelihood $\ln P(D)$, B: $L'(K)$, C: $L''(K)$, D: ΔK

图 3 利用 STRUCTURE 软件对所有个体内部亚居群的参数估算结果

Fig. 3 Results of parameters to identify the real clustering of all the samples (K) based on STRUCTURE

表 3 群体内和群体间的分子方差分析结果

Table 3 AMOVA analysis result among populations and within populations

方差来源	自由度	方差	均方差	变异组成	所占百分比(%)
Source	df	SS	MS	Est. Var.	Proportion
群体间 Amongpopulations	1	263.17	263.165	1.06	6.38
群体内部 Withinpopulations	467	7233.49	15.489	15.49	93.62
总体 Total	468	7496.66		16.55	100.00

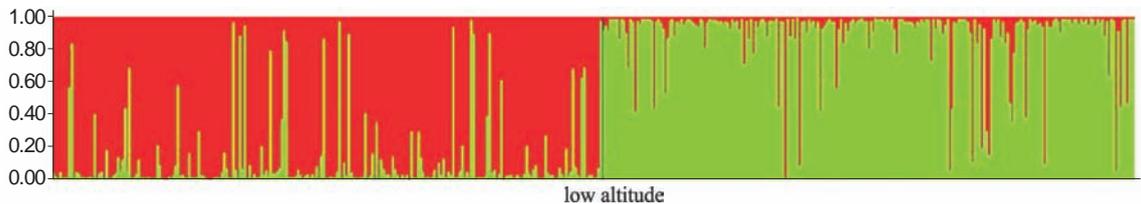


图 4 基于 STRUCTURE 分析的藏川杨群体划分

Fig. 4 Population clusters of *Populus szechuanica* var. *tibetica* based on STRUCTURE analysis

3 讨论

3.1 分子标记的中性检验

SSR 位点因为在基因组内分布均匀,被认为是评估遗传多样性和揭示群体结构理想的标记类型,但近年来越来越多的研究表明,SSR 位点有可能处于自然选择的压力下。本研究检测发现 2 个位点处于自然选择压力下,其中 U65600 序列与可可水解酶家族结构有着高度相关性,究其原因可能是在高海拔地区温度较低,植物适应低温胁迫的方式中包括提高体内次生代谢物质如脯氨酸^[23]、甜菜碱^[24-25]等积累,而当低温胁迫缓解时,这些物质的分解需要水解酶的参与,由于不同海拔分布的藏川杨群体中次生代谢物质积累的差异,造成该位点在高低海拔群体间由于受到自然选择的压力而造成了偏移。

3.2 藏川杨遗传分化

许多研究表明,分布区域广、木本、多年生、异花授粉的植物,都具有较高的遗传多样性水平^[26-27]。藏川杨属杨属青杨组,为多年生木本乔木,异花授粉且风媒传粉,24 个 SSR 位点的分子标记检测表明有较高的遗传多样性,与其他杨树研究相比,在遗传参数上表现一致^[28]。种群间的遗传分化经 AMOVA 分析表明:不同海拔的种群间分化很小,仅为 6.38%,主要的遗传变异集中在群体内部的不同个体间。这也与 F_{ST} 分析的结果一致,S. Wright^[29]认为当 F_{ST} 为 0~0.05 时,群体间存在着较小的分化,而本研究的 F_{ST} 仅为 0.02。虽然 STRUCTURE 软件分析的结果认为整个研究对象应可划分为 2 个群

体,但基于 G. Evanno 等^[22]提出的方法无法对 $K=1$ 的情况进行估算,已有研究对其进行了讨论^[30],由于在 $K=1$ 处的 LR 最大,无法寻找 G. Evanno 提出的方法所依赖的 ΔK 峰值,且在其他 K 值处的 ΔK 接近为 0(图 3),在此情况下,无法对群体的亚群体进行划分。在此背景下可依据 F_{ST} 值对种群的分化程度进行评估。因此,本研究认为,色季拉山海拔因素未对生长在不同海拔环境的藏川杨造成地理隔离,研究中用到的 2 个群体没有表现出种群分化。一般认为,影响种群遗传分化的因素按效力依次为繁育系统(33%)、分布范围(28%)、物种习性(12%)等^[31],藏川杨的 2 个群体间未产生显著群体分化的可能原因为:(1)高低海拔藏川杨的花期有重叠,且杨树的雄花散粉量大、高原风速大,利于花粉的传播造成了广泛基因流动的存在^[32];(2)种子的传播距离长。种子发育成熟后以杨絮传播,种子随风传播使得高低海拔间的个体分布均匀同质化。采样过程中发现,藏川杨多沿河道周边分布,河水的流动对于扩大种子的传播范围有着很大的帮助。因此,在不同海拔高度生长的藏川杨种群间的遗传多样性水平可以维持在同一水平。

藏川杨作为杨属中分布海拔最高的种,必然存在着某些优质基因来适应高海拔特殊的生态条件,如低温、强紫外线、强风等,对于杨树育种发掘抗性基因资源有着重要意义。遗传背景的研究能够为今后相关研究材料的选择、种质资源收集等提供理论依据。本研究选择的研究区域为色季拉山,在此区域内分布的藏川杨生活环境的海拔跨度相差在

1000 m 以上,且连续分布。通过 SSR 标记的方法对沿海拔梯度分布的藏川杨群体进行分析,揭示出其遗传多样性水平、群体结构受海拔梯度的影响很小,海拔高度变化未造成不同分布的藏川杨产生群体分化。本研究有利于更好地评估藏川杨对于高海拔的适应性,由于遗传背景一致,2 个群体表现出的差异可以认为是通过长期适应过程获得,因此可作为高海拔适应性研究的理想材料。

参考文献

- [1] 唐宇丹, 普布次仁, 次旦卓嘎. 地域环境对青藏高原特有植物藏川杨生物学特性的影响[J]. 中国野生植物资源, 2012(2): 24-28
- [2] Selezska K, Kazmierczak M, Müsken M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited under environmental focus: impact of water quality and phage pressure[J]. *Environ Microbiol*, 2012, 14(8): 1952-1967
- [3] 赵罕, 郑勇奇, 李斌, 等. 白皮松天然群体遗传结构的地理变异分析[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(3): 395-401
- [4] 王克晶, 李向华. 中国野生大豆 (*Glycine soja*) 遗传资源主要形态、遗传变异和结构[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(6): 917-928
- [5] 王圣杰, 黄大庄, 闫海霞, 等. 4 种经验模型在藏川杨光响应研究中的适用性[J]. 北华大学学报: 自然科学版, 2011(2): 208-212
- [6] 张海武, 米玛次仁, 巫流民. 藏川杨硬枝扦插育苗技术[J]. 西藏科技, 2008(2): 72-73
- [7] 巫流民, 米玛, 张海武, 等. 藏青杨硬枝扦插育苗技术[J]. 林业实用技术, 2009(12): 28-29
- [8] 叶彦辉, 韩艳英, 赵垦田, 等. 不同造林技术措施对藏川杨林地土壤肥力的影响[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2012(12): 64-72
- [9] 韩艳英, 叶彦辉, 张昆林, 等. 不同造林技术措施对藏川杨生理生化特性的影响[J]. 西北林学院学报, 2012(6): 101-104
- [10] 黎裕, 贾继增, 王天宇. 分子标记的种类及其发展[J]. 生物技术通报, 1999(4): 21-24
- [11] 贾继增. 分子标记种质资源鉴定和分子标记育种[J]. 中国农业科学, 1996(4): 2-11
- [12] 罗霆, 杨海霞, 岑华飞, 等. SCoT 分子标记在割手密遗传图谱构建中的应用[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(4): 704-710
- [13] 张赤红, 张京, 赵会英, 等. 应用 SSR 标记对 61 个国家大麦遗传多样性的研究[J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9(1): 15-19
- [14] 朱彩梅, 张京. 应用 SSR 标记分析中国糯大麦种质的遗传多样性[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(1): 57-64
- [15] 冯锦霞, 张川红, 郑勇奇, 等. 利用荧光 SSR 标记鉴别杨树品种[J]. 林业科学, 2011(6): 167-174
- [16] 孙振久, 王亚娟, 张显. 黄瓜分子标记辅助育种研究进展[J]. 西北植物学报, 2006(6): 1290-1294
- [17] Porebski S, Bailey L G, Baum B R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components[J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1997, 15(1): 8-15
- [18] Du F K, Xu F, Qu H, et al. Exploiting the transcriptome of *Euphrates Poplar*, *Populus euphratica* (Salicaceae) to develop and characterize new EST-SSR markers and construct an EST-SSR database[J]. *PLoS one*, 2013, 8(4): e61337
- [19] Antao T, Lopes A, Lopes R, et al. LOSITAN: a workbench to detect molecular adaptation based on a Fst-outlier method[J]. *BMC Bioinformatics*, 2008, 9(1): 323
- [20] Yeh F C, Yang R C, Boyle T, et al. POPGENE, version 1.32: the user friendly software for population genetic analysis[M]. Edmonton: University of Alberta, 1999
- [21] Pritchard J K, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data[J]. *Genetics*, 2000, 155(2): 945-959
- [22] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study[J]. *Mol Ecol*, 2005, 14(8): 2611-2620
- [23] Kaur G, Kumar S, Thakur P, et al. Involvement of proline in response of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to chilling stress at reproductive stage[J]. *Sci Hortic*, 2011, 128(3): 174-181
- [24] Ahmad R, Lim C J, Kwon S. Glycine betaine: a versatile compound with great potential for gene pyramiding to improve crop plant performance against environmental stresses[J]. *Plant Biotechnol Rep*, 2013, 7(1): 49-57
- [25] Singh I, Kumar U, Singh S K, et al. Physiological and biochemical effect of 24-epibrassinolide on cold tolerance in maize seedlings[J]. *Physiol Mol Biol Plants*, 2012, 18(3): 229-236
- [26] 朱建华, 潘丽梅, 秦献泉, 等. 不同生态类型龙眼种质亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(1): 61-66
- [27] 邱显钦, 唐开学, 王其刚, 等. 云南长尖叶蔷薇自然居群遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(1): 85-90
- [28] Slavov G T, Zhelev P. Salient biological features, systematics, and genetic variation of *Populus* [M] // Jansson S, Bhalerao R, Groover A T, et al. Genetics and genomics of *Populus*. New York: Springer, 2010: 15-38
- [29] Wright S. Evolution and the genetics of populations; Vol. 2. The theory of gene frequencies [M]. Chicago: University of Chicago Press, 1984
- [30] Lepoittevin C, Harvengt L, Plomion C, et al. Association mapping for growth, straightness and wood chemistry traits in the *Pinus pinaster* Aquitaine breeding population[J]. *Tree Genet Genomes*, 2012, 8(1): 113-126
- [31] Hamrick J L, Godt M J W. Allozyme diversity in plant species [M] // Brown A H D, Clegg M T, Kahler A L. Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources. Sunderland: Sinauer Associates Inc, 1989: 44-64
- [32] 杨明博, 熊友才, 王红芳, 等. 黄土高原不同气象因子对中国沙棘亚居群遗传多样性的影响[J]. 应用生态学报, 2008(1): 1-7