

文章编号: 1001-1498(2008)05-0741-06

# 印楝异交率和基因流的分析

吴疆翀, 彭兴民, 郑益兴, 张燕平\*

(中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 云南 昆明 650224)

**摘要:**利用 RAPD 分子标记, 对引种于云南省元谋县和红河县的印楝种群进行父本分析。用 12 个引物对 4 个种群共 7 株母本测定了异交率, 平均异交率为 96.27%, 异交率 95% 置信区间为 93.50% ~ 99.05%。对其中红河县勐龙乡大黑公种群的 2 株母本 E 和 F 及周围 96 株父本进行了基因流测定, 遗传排除法确定了各有 2 个父本向母本 E 和 F 传粉, 最大似然法分析得出有 3 个父本向母本 E 传粉, 有 10 个父本向母本 F 传粉。有 52.9% 的传粉集中在以母本为圆心, 半径 30 ~ 50 m 的范围内。来自主风方向和逆风方向的传粉在数量上无差异。

**关键词:**印楝; RAPD; 异交率; 基因流; 父本分析

**中图分类号:** S792.33 **文献标识码:** A

## Outcrossing Rate and Gene Flow Estimation of *Azadirachta indica*

WU Jiang-chong, PENG Xing-min, ZHENG Yi-xing, ZHANG Yan-ping

(Research Institute of Resource Insects, CAF, Kunming 650224, Yunnan, China)

**Abstract:** Random Amplified Polymorphic DNA was used to estimate the outcrossing rate and gene flow of *Azadirachta indica* introduced to Yuanmou County and Honghe County, Yunnan, China. Seven trees from four populations were chosen as the maternal parents, and each of their ripe seeds was collected. After germination, 23 seedlings of each maternal tree were randomly selected as sib code to estimate the outcrossing rate. Each primer identified outcrossed offspring, characterized by DNA fragments that maternal trees do not have. The cumulative outcrossing rate of each mother tree was calculated by a total of 12 primers. The average outcrossing rate of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) was 96.27%, with a high 95% confidence interval from 93.50% through 99.05%. The Daheigong population was also used for a gene flow test among the 4 populations. Two mother trees, E and F, were maternal parents, and 96 trees around them were paternal parents. Two methods, genetic exclusion and maximum likelihood, were used to estimate gene flow of the population. With 12 primers, each of 2 paternal trees was confirmed to have dispersed pollen to E and F by genetic exclusion. And maximum likelihood results indicated that 3 paternal trees had distributed pollen to maternal tree E, while 10 paternal trees had distributed pollen to maternal tree F. According to the map, 52.9% of pollen dispersal was as far as 30—50 m, and the amount of downwind distribution was not significantly distinct from the upwind.

**Key words:** *Azadirachta indica*; RAPD; outcrossing rate; gene flow; paternity analysis

植物交配系统的研究可以分为 2 个层次, 第 1 个层次是研究种群自交率与异交率, 第 2 个层次是研究以花粉和种子为媒介的基因流过程与式样。传

统研究方法是通过套袋等人工控制授粉方式研究自交与异交的结实率, 并观察传粉者的行为以及采用染料或同位素标记花粉来测定花粉的传播, 由于散

收稿日期: 2007-12-10

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2006BAD18B03) 和云南省科技计划项目 (2005YX20)

作者简介: 吴疆翀 (1982—), 男, 云南昆明市人, 硕士生。

\* 通讯作者

布的花粉并不都与胚珠结合,不能有效地反映花粉为媒介的基因流。分子标记技术出现后,交配系统的研究方法发展为亲本分析<sup>[1]</sup>。目前异交率和基因流测定主要是通过分析每一个后代的亲本来实现。在已知母本的情况下,亲本分析主要是进行父本分析。早期多采用等位酶分子标记进行亲本分析,随着 DNA 分子标记如随机扩增多态 DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)、扩增片段长度多态 (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)、简单重复序列 (Simple Sequence Repeat, SSR)、单核苷酸多态 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) 等的发展,亲本分析有了很好的工具。到目前为止,已用分子标记分析了近 300 种植物的交配系统<sup>[2]</sup>。国外在此方面研究较多,且各种方法都有应用。如 Krauss<sup>[3-4]</sup>用等位酶和 AFLP 方法对山龙眼 (*Persea mollis*) 进行了父本分析, Fritsch 等<sup>[5]</sup>用 RAPD 方法估计了四数木科 (Datisceae) 北美假大麻 (*Datisca glomerata*) 的异交率, Dow 等<sup>[6]</sup>用 SSR 方法进行了大果栎 (*Quercus macrocarpa*) 的亲本分析, Chaix 等<sup>[7]</sup>用 SSR 方法研究了巨桉 (*Eucalyptus grandis*) 种子园的基因流。我国以往在此方面研究很少且多使用等位酶方法,代表有陈小勇等<sup>[8]</sup>利用等位酶对青冈 (*Cyclobalanopsis glauca*) 天然种群幼苗的亲本分析,张冬梅等<sup>[9]</sup>利用等位酶对油松 (*Pinus tabulaeformis*) 种子园的父本分析;而最近几年植物繁育系统研究受到重视, DNA 分子标记也得到更多应用,有董贞荣等<sup>[10]</sup>用 RAPD 方法对泽苔草 (*Caldesia pamasifolia*) 异交率的测定和艾畅等<sup>[11]</sup>用 SSR 方法对马尾松 (*Pinus massoniana*) 种子园的父本分析。

印楝 (*Azadirachta indica* A. Juss.) 是一种具有重要的生态价值和经济价值的多用途树种,其种子是制备生物农药的重要原料<sup>[12-15]</sup>。印楝交配系统方面的研究很少,仅 1999 年 Kundu<sup>[16]</sup>用等位酶方法估计了孟加拉天然印楝种群交配系统的异交率。该文首次报道了印楝的异交率,为育种策略的制定和种子园设置提供了依据,但是关于异交率研究的取样数目仅 15 株树,每株 8 粒种子,酶系统数也只有 3 个,取样数和酶系统数均偏少,结果的可靠性还需进一步证实。本文采用 RAPD 分子标记,对引种印楝种群的交配系统进行了进一步的研究,通过对异交率和基因流的更深入了解,可以为将来优良无性系和种子园的经营管理提供更可靠的依据,同时本文还进一步研究了 RAPD 方法进行父本分析的可行性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

从引种于云南省元谋县和红河县、树龄为 5~7 年生的 4 个缅甸种源印楝种群中共选取 7 株树体作为母本,并分别采其种子。种子萌发后,每个母本随机选择 23 个幼苗作为子代 (地点和编号见表 1)。以上材料供异交率测定用。取其中个体数量较少且相对地理隔离的红河县勐龙乡大黑公种群作基因流测定用,种群位于靠近山顶的弃耕台地,5 年生印楝纯林,林下散生草本,株行距 7 m × 7 m,主要风向为东风。母本 E 和 F 周围的 96 株树体作为父本,编号 1~96。成株取嫩叶,硅胶干燥保存,幼苗鲜叶备用。

表 1 样本采集地点及编号

种群	母本	子代	地点	海拔 /m
1	A	A01-A23	元谋县老城乡南门山 (25°32' N, 101°54' E)	1 200
	B	B01-B23		
2	C	C01-C23	元谋县苴林乡石灰村 (25°44' N, 101°47' E)	1 100
	D	D01-D23		
3	D	D01-D23	元谋县老城乡老凹塘 (25°29' N, 101°52' E)	1 250
	E	E01-E23		
4	F	F01-F23	红河县勐龙乡大黑公 (23°19' N, 102°37' E)	1 000
	G	G01-G23		

### 1.2 基因组 DNA 提取

DNA 提取步骤由 Clark<sup>[17]</sup>主编的《植物分子生物学实验手册》中“CTAB 法微量分离 DNA 稍加改良而成。纯化后的基因组 DNA 经电泳检测后,以 DNA (TakaRa, 50 ng · μL<sup>-1</sup>) 为对照,稀释成浓度为 10 ng · μL<sup>-1</sup> 的模板 DNA。

### 1.3 PCR 扩增及产物检测

从 Invitrogen 公司的 36 个随机引物中筛选出 12 个 (BA01、BA03、BA04、BA05、BA07、BA08、BA10、BA11、BA12、BA13、BA14、BA15) 进行 PCR 反应。反应体系为 20 μL,其中含 10 × buffer (Promega) 2 μL, 25 mmol · L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> (Promega) 1.4 μL, 10 mmol · L<sup>-1</sup> dNTPs (Promega) 0.5 μL, 5 u · μL<sup>-1</sup> Taq 酶 (Promega) 0.4 μL, 66 ng · μL<sup>-1</sup> 引物 (Invitrogen) 2 μL, 10 ng · μL<sup>-1</sup> 模板 DNA 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 12.7 μL。加入 16 μL 矿物油 (Solarbio),防止水分蒸发。扩增在 MJ PTC-200 PCR 仪上进行,程序为:95 预变性 5 min; 94 变性 1 min, 36 退火 1 min, 72 延伸 2 min, 40 个循环; 72 后延伸 10 min; 4 保存。PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖 (OXO D) 凝胶上电泳,上样量 3.0 μL,电泳缓

冲液 1 ×1BE, 12 cm ×12 cm 电泳槽, B D-RAD Power Pac Basic 电泳仪 90 V 恒压电泳 90 min, 0.05% EB 染色 20 min, UVP GDS-8000 凝胶成像系统观察、分析和照相。

### 1.4 异交率的测定

根据 Fritsch<sup>[5]</sup>对显性条带的分析方法,将子代扩增出的 DNA 片段与母本的片段进行比较,含有母本所没有的片段子代个体为异交产生的子代,通过分析多个引物扩增出的片段,统计出累计的异交子代数量,从而得出异交率。

### 1.5 基因流的测定

1.5.1 遗传排除法 将父本扩增出的片段与母本及子代进行比较,若某个父本出现母本和其它父本都没有的特征带,而子代中具有此特征带,则确定该子代个体为此父本的后代,即此父本传粉给了母本。

1.5.2 最大似然法 对母本 E、F 和它们的子代,以及 96 株父本扩增出的片段进行读带,然后转换为 1/0 矩阵(分别表示特定位点上条带的有或无)。用 PHYLIP V3.65 软件中的 RESTML 程序进行最大似然法分析。最大似然法对每个个体的每个位点都进行互相比对,具有坚实的统计学基础,能有效的利用数据,其结果将 DNA 片段相似程度高的个体聚类。排除母本与子代以及子代之间聚类的类群,父本与子代聚成一类的类群中,子代与父本具最高相似性,则该子代可能为同类群父本的后代,即父本传粉给了子代对应的母本。

1.5.3 传粉距离的测定 通过遗传排除法和最大似然法确定传粉的父本后,测量父本与母本间的距离即为传粉距离。

## 2 结果与分析

### 2.1 异交率

12 个引物共扩增出 101 条谱带,其中多态性条带 100 条,多态位点百分率为 99.01% (表 2)。平均每个引物扩增出 8~9 个条带,片段大小在 100~3 000 bp 之间。引物对 7 个母本的异交率检测结果见表 3。母本 A 的 23 个子代中,通过前 5 个引物就检测出累计有 21 个子代是异交产生,异交率 91.30%; 12 个引物共检测出累计 22 个异交子代,异交率稳定在 95.65%。母本 B 通过前 6 个引物检测出累计有 21 个子代是异交产生,异交率 91.30%; 12 个引物共检测出累计 22 个异交子代,异交率稳定在 95.65%。母本 C 通过前 9 个引物检测出累计有 20 个子代是异交产生,异交率 86.96%; 12

个引物共检测出累计 21 个异交子代,异交率达到 91.30%。母本 D 和 E 通过前 6 个引物即检测出 23 个子代全是异交产生,异交率 100%。引物 BA01 扩增的母本 E 和 F 的子代不含有母本没有的片段,不能检测出异交子代。母本 F 通过前 8 个引物检测出累计有 21 个子代是异交产生,异交率 91.30%; 12 个引物共检测出累计 22 个异交子代,异交率稳定在 95.65%。母本 G 通过前 6 个引物检测出累计有 20 个子代是异交产生,异交率 86.96%; 12 个引物共检测出累计 22 个异交子代,异交率稳定在 95.65%。7 个母本的异交率经正态性检验, Shapiro-Wilk 统计量为 0.840, 显著度 P 值为 0.099 > 0.05, 服从正态分布, 偏度系数 -0.174, 峰度系数 0.336。异交率的平均值为 96.27%, 95% 置信区间为 93.50%~99.05%。

表 2 引物序列及扩增结果

引物	碱基序列 (5' - 3')	位点数	多态位点数	多态位点百分率 / %
BA01	GTTTCGCTCC	8	8	100
BA03	CA TCCCCCTG	9	9	100
BA04	GGACTGGAGT	8	8	100
BA05	TGCGCCCTTC	10	10	100
BA07	GGTGACGCAG	11	11	100
BA08	GTCCACACGG	11	11	100
BA10	CTGCTGGGAC	10	10	100
BA11	GTAGACCCGT	11	11	100
BA12	CCTTGACGCA	7	7	100
BA13	TICCCCGCT	5	5	100
BA14	TCCGCTCTGG	6	6	100
BA15	GGAGGGTGT	5	4	80
总计		101	100	平均 99.01

表 3 引物对母本的异交率检测情况

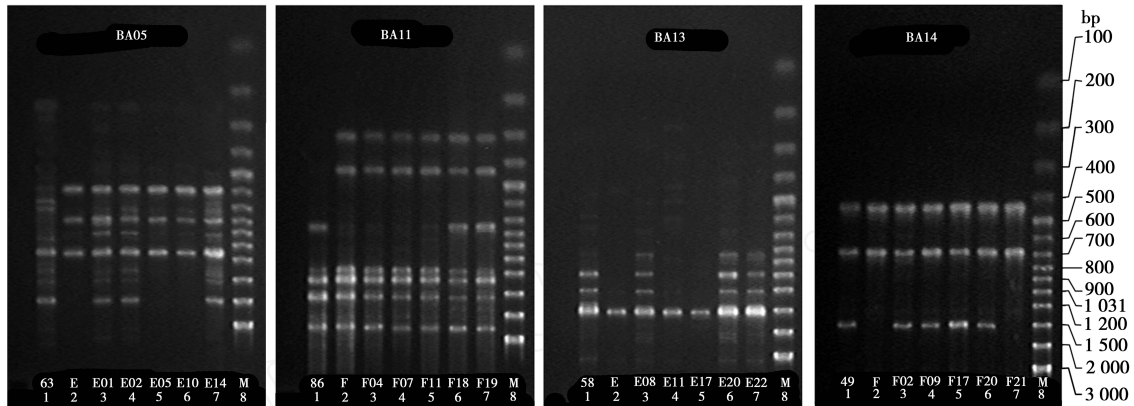
引物	累积异交率 / %						
	A	B	C	D	E	F	G
BA01	43.48	21.74	8.70	13.04	0.00	0.00	13.04
BA03	56.52	39.13	21.74	39.13	26.09	8.70	60.87
BA04	73.91	60.87	43.48	47.83	39.13	26.09	60.87
BA05	86.96	69.56	56.52	47.83	91.30	47.83	73.91
BA07	91.30	78.26	56.52	60.87	91.30	60.87	82.61
BA08	91.30	91.30	69.56	100.00	100.00	69.56	86.96
BA10	91.30	91.30	73.91	100.00	100.00	82.61	86.96
BA11	91.30	95.65	73.91	100.00	100.00	91.30	95.65
BA12	95.65	95.65	86.96	100.00	100.00	91.30	95.65
BA13	95.65	95.65	86.96	100.00	100.00	95.65	95.65
BA14	95.65	95.65	86.96	100.00	100.00	95.65	95.65
BA15	95.65	95.65	91.30	100.00	100.00	95.65	95.65
平均累积异交率 / %	96.27						
异交率 95% 置信区间 / %	93.50~99.05						

### 2.2 基因流

遗传排除法确定了各有 2 个父本向母本 E 和 F 传粉 (图 1)。引物 BA05 的扩增图谱中,父本 63 在

2 000 bp 处有一条特征带,子代 E01、E02和 E14具有相同的带,说明这几个子代为父本 63的后代,父本 63传粉给了母本 E。引物 BA11的扩增图谱中,父本 86在 750 bp 处有一条特征带,子代 F18和 F19具有相同的带,说明这 2个子代为父本 86的后代,父本 86传粉给了母本 F。引物 BA13的扩增图谱中,父本 58在 1 000 bp 和 1 200 bp 处有 2条特征带,子代 E08、E20和 E22具有这 2条相同的带,说明这几个子代为父本 58的后代,父本 58传粉给了

母本 E。引物 BA14的扩增图谱中,父本 49在 1 500 bp 处有一条特征带,子代 F02、F09、F17和 F20具有相同的带,说明这几个子代为父本 49的后代,父本 49传粉给了母本 E。最大似然法分析得出有 3个父本向母本 E传粉,有 10个父本向母本 F传粉(表 4)。其中,父本 76既向母本 E传粉形成子代 E06,也向母本 F传粉形成子代 F10和 F22;而由于父本间似然值相同,子代 F16和 F21分别有 2个可能的父本;其余子代与父本都是一一对应。



1:父本 ; 2:母本; 3 - 7:子代 ; 8: GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus(Femantas)

图 1 遗传排除法确定的传粉父本

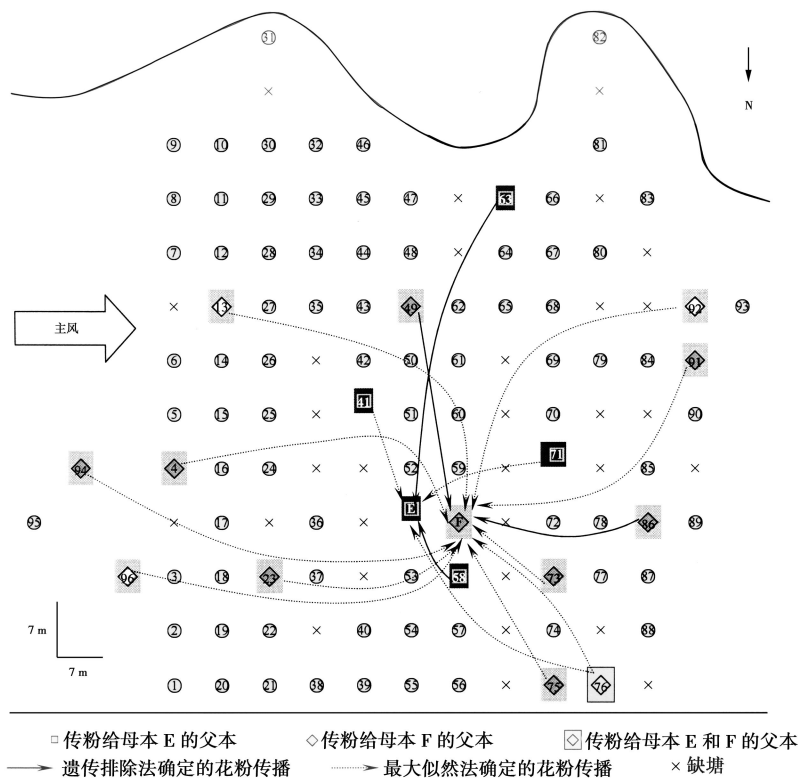


图 2 大黑公种群的花粉散布格局

表 4 最大似然法得出的传粉父本

子代	最可能的父本	子代	最可能的父本	子代	最可能的父本
E03	41	F04	73	F10, F22	76
E06	76	F05	94	F14	13
E09	71	F06	4	F16	91, 96
		F07	23	F21	75, 92

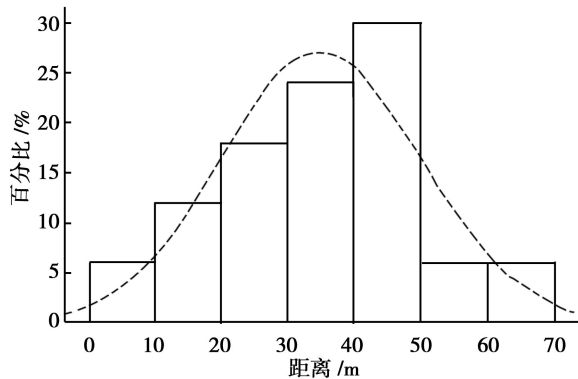


图 3 传粉距离分布

综合遗传排除法与最大似然法的结果,得出云南省红河县勐龙乡大黑公印楝种群的花粉散布格局(图 2),结果表明来自主风方向和逆风方向的传粉在数量上无差异。传粉距离的分布见图 3,最小值 9.9 m,最大值 61.2 m,平均值 34.2 m。经正态性检验,Shapiro-Wilk 统计量为 0.978,显著度  $P$  值为 0.939 > 0.05,传粉距离服从正态分布,偏度系数 0.086,峰度系数 0.632。距离小于 10 m 的传粉占 5.9%,10~20 m 的传粉占 11.8%,20~30 m 的传粉占 17.6%,30~40 m 的传粉占 23.5%,40~50 m 的传粉占 29.4%,50~60 m 的传粉占 5.9%,60 m 以上的传粉占 5.9%。有 52.9% 的传粉集中在以母本为圆心,半径 30~50 m 的范围内。

### 3 结论与讨论

RAPD 片段的遗传符合孟德尔定律,但由于是显性分子标记,只表达表型显性的带,不能鉴别杂合子,所以含有母本没有的条带的子代个体确定为异交产生的子代;而与母本扩增条带相同以及缺少母本有的条带且不同时具备母本没有的新条带的子代不确定是自交还是异交产生的。因此在引物数量少,多态位点少的情况下会低估异交率。所以用于遗传排除时要有足够数量的引物才能保证得到稳定的累计异交率;而 RAPD 引物数量多,扩增位点多,单个位点的信息不足可以通过大量的位点弥补<sup>[2]</sup>。本文所筛选的 12 个引物多态位点丰富,可以为 7 个

母本中的 6 个测得稳定的累积异交率。等位酶标记的优点是共显性,局限性是可供利用的多态位点少,受多态位点数目、每位点上的等位基因数目和每位点上等位基因分布频率限制<sup>[18-19]</sup>,但至今仍适合于父本分析,在植物交配系统研究中应用最广<sup>[20]</sup>。

SSR 也是共显性标记,检出等位基因的灵敏度高,多态性好,近几年在国外常用于异交率测定<sup>[6-7]</sup>,不可否认其是一种很好的亲本分析方法;但是费用较昂贵,寻找到合适的引物较难。近几年出现的 SNP 与 SSR 一样,适用范围广<sup>[21]</sup>,二者将成为今后主要的分子标记方法。综上所述,考虑到 RAPD 标记操作相对简便迅速,其不失为一种可行的父本分析方法。

遗传排除法只要父本含有特征带就可以为子代确定唯一的父本,分析简便快捷,只需通过简单的计数即可,结果也准确可靠;但由于特征带的数量很少,用此方法确定的父本不多。何田华等<sup>[1]</sup>认为对于排除研究来说,所研究的种群中的可能亲本最好不要超过 100 个。本文的实验 12 个引物只能从 96 个父本中确定 4 个。陈小勇<sup>[8]</sup>用等位酶标记进行的遗传排除只能为 1 株幼苗确定唯一的亲本对。最大似然法通过计算父本与子代的似然值,相似程度最高的父本和子代最可能存在亲子关系,这样可以在遗传排除的基础上更充分的利用数据,但仍然不能为所有子代找到可能的父本。艾畅等<sup>[11]</sup>用 SSR 标记对马尾松种子园进行的最大似然法分析可以为 286 粒种子中的 107 粒确定父本。除此之外,最大似然法不能提供结果的可信度<sup>[1]</sup>。所以,在进行父本分析时为得到较为准确而充分的数据,两种分析方法都要使用。

Kundu<sup>[14]</sup>对孟加拉的天然印楝种群母本与子代间进行等位酶分析,多位点确定的异交率为 89.76%~90.24%,平均为 90%。本文研究得出的引种的印楝种群平均异交率为 96.27%,结果基本一致,都显示了印楝以异交为主,某些个体甚至是专性异交。此外,传统的人工授粉、杂交指数和花粉-胚珠比等传粉生物学方面的研究也表明印楝是一种兼性异交植物,部分自交亲和,需要传粉者<sup>[22]</sup>。引种栽培种群异交率较高的原因可能是由于两试验点地理因素差异明显(孟加拉 Nawabganj 种群,23°25'N,89°15'E,海拔 15 m,年降水量 1540 mm;大黑公种群,23°19'N,102°37'E,海拔 1000 m,年降水量 840 mm),生境条件以及传粉昆虫种类、密度和传粉习性不同所致。此外,两地种群的密度和种群内个

体的年龄结构也会在一定程度上影响异交率。通常情况下,种群密度降低自交率会有所增加,这种现象在风媒传粉植物中表现得更加明显<sup>[1, 23]</sup>。本实验的结果还显示印楝的花粉传播不受风向影响,间接说明印楝花具虫媒传粉特性。

印楝异交率很高,在优良无性系造林和种子园营建时须考虑相对的地理隔离,防止外源花粉进入后使母本的优良性状在子代丧失。另一方面,异交率高暗示物种遗传多样性丰富,开发潜力巨大。如果对不同种源间及相同种源内具有不同优良性状的个体进行杂交育种,使优良性状在子代集中和固定,将会比较容易地获得较高的遗传增益。对生物农药的原料林来说,可以进行人工辅助异株异花授粉,从而提高种子产量。

#### 参考文献:

- [1] 何华田,葛颂. 植物种群交配系统、亲本分析以及基因流动研究 [J]. 植物生态学报, 2001, 25 (2): 144 - 154
- [2] 张大勇. 植物生活史进化与繁殖生态学 [M]. 北京: 科学出版社, 2004: 384
- [3] Krauss S L. An evaluation of AFLP fingerprinting technique for the analysis of paternity in natural populations of *Persoonia mollis* [J]. Aust J Bot, 1998, 46 (3): 533 - 546
- [4] Krauss S L. Restricted gene flow within the morphologically complex species *Persoonia mollis* (Proteaceae): contrasting evidence from the mating system and pollen dispersal [J]. Heredity, 1994, 3: 142 - 154
- [5] Fritsch P, Rieseberg L H. High outcrossing rates maintain male and hemaphrodite individuals in population of the flowering plant *Datisca glomerata* [J]. Nature, 1992, 359: 633 - 636
- [6] Dow B D, Ashley M V. Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of saplings in Bur oak, *Quercus macrocarpa* [J]. Mol Eco, 1996, 5: 615 - 627
- [7] Chaix G, Gerber S, Razafimaharo, et al. Gene flow estimation with microsatellites in a Malagasy seed orchard of *Eucalyptus grandis* [J]. Theor Appl Genet, 2003, 107: 705 - 712
- [8] 陈小勇, 宋永昌. 自然定居青冈幼苗的亲本分析 [J]. 武汉植物学研究, 2000, 18 (3): 174 - 180
- [9] 张冬梅, 沈熙环, 何田华, 等. 利用同工酶对油松无性系种子进行父本分析 [J]. 植物生态学报, 2001, 25 (2): 165 - 173
- [10] 董贞荣, 陈进明, 王青锋. 泽苔草交配系统的 RAPD 分析 [J]. 武汉植物学研究, 2006, 24 (2): 167 - 170
- [11] 艾畅, 徐立安, 赖焕林, 等. 马尾松种子园的遗传多样性与父本分析 [J]. 林业科学, 2006, 42 (11): 146 - 150
- [12] Schmutterer H. The neem tree *Azadirachta indica* A. Juss and other Meliaceous plants: source of unique natural products for integrated pest management, medicine, industry and other purposes [M]. VCH, Weinheim, Germany, 1999: 696
- [13] 赖永祺. 印楝栽培 [M]. 昆明: 云南科技出版社, 2003: 21 - 23
- [14] 彭兴民, 张燕平, 赖永祺, 等. 印楝生物学特性及引种栽培 [J]. 林业科学研究, 2003, 16 (1): 75 - 80
- [15] 吴疆翀, 彭兴民, 郑益兴, 等. 印楝素含量与种子形态及成熟期关系的初步研究 [J]. 林业科学研究, 2006, 19 (5): 590 - 594
- [16] Kundu S K. The mating system and genetic significance of polycarpy in the neem tree (*Azadirachta indica*) [J]. Theor Appl Genet, 1999, 99: 1216 - 1220
- [17] Clark M S. 植物分子生物学实验手册 [M]. 顾红雅, 瞿礼嘉译. 北京: 高等教育出版社, 1998: 6
- [18] Snow A A, Lewis P O. Reproductive traits and male fertility in plants: empirical approaches [J]. Annu Rev Ecol Syst, 1993, 24: 331 - 351
- [19] Chakraborty R, Meagher T R, Snouse P E. Parentage analysis with genetic markers in natural populations. The expected proportion of offspring with unambiguous paternity [J]. Genetics, 1988, 118: 527 - 536
- [20] Cruzan M B. Genetic markers in plant evolutionary ecology [J]. Ecology, 1998, 79: 400 - 412
- [21] 邹喻苹, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2001: 6
- [22] 吴疆翀. 印楝繁育系统的研究 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2007: 15 - 29
- [23] 张冬梅, 张华新, 沈熙环, 等. 油松种子园交配系统的时空变化研究 [J]. 林业科学, 2004, 40 (1): 70 - 77