

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.03.008

冯源恒, 吴东山, 王德俊, 等. 拉雅松遗传多样性及同域分布种间亲缘关系分析[J]. 广西植物, 2014, 34(3): 320—325

Feng YH, Wu DS, Wang DJ, et al. Genetic diversity of *Pinus crassicornicea* and its genetic relationship with two sympatric pine species[J]. *Guihaia*, 2014, 34(3): 320—325

拉雅松遗传多样性及同域分布种间亲缘关系分析

冯源恒^{1,2}, 吴东山³, 王德俊¹, 杨章旗², 李火根^{1*}

(1. 南京林业大学 林木遗传与生物技术省部共建教育部重点实验室, 南京 210037; 2. 广西壮族自治区林业科学研究院, 南宁 530002; 3. 广西大学, 南宁 530001)

摘要: 拉雅松是广西西北部稀有的乡土用材、用脂树种, 具有较高的经济价值, 但其遗传多样性状况及种间进化关系未知。利用 SSR 分子标记检测拉雅松群体遗传多样性, 希望对该物种保护策略的制定提供参考依据。此外, 鉴于该地区自然分布的松属树种仅有拉雅松、细叶云南松与马尾松三个种, 试图利用 SSR 分子标记信息分析拉雅松与细叶云南松、马尾松的种间亲缘关系。结果表明: 7 对 SSR 引物在拉雅松群体共检测到 14 个等位基因。有效等位基因数为 1.653, 观测杂合度为 0.577, 期望杂合度为 0.374, Shannon 信息指数为 0.540, Nei 多样性指数为 0.367, 表明拉雅松具有较高的遗传多样性。拉雅松与马尾松遗传距离最近为 0.0175, 与 3 个细叶云南松群体距离较远, 平均为 0.0525。拉雅松与马尾松、细叶云南松平均共祖系数(Θ)分别为 0.094、0.066, 据此推测拉雅松可能与马尾松存在较近的亲缘关系。讨论了拉雅松的遗传多样性保护策略。

关键词: 拉雅松; SSR; 遗传多样性; 同域分布; 亲缘关系

中图分类号: Q347; S718.46 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2014)03-0320-06

Genetic diversity of *Pinus crassicornicea* and its genetic relationship with two sympatric pine species

FENG Yuan-Heng^{1,2}, WU Dong-Shan³, WANG De-Jun¹,
YANG Zhang-Qi², LI Huo-Gen^{1*}

(1. Key Lab of Forest Genetics and Biotechnology (Nanjing Forestry University), Ministry of Education, Nanjing 210037, China; 2. Guangxi Institute of Forestry Science, Nanning 530002, China; 3. Guangxi University, Nanning 530001, China)

Abstract: *Pinus crassicornicea* is a rare tree species has high economical value in northwestern Guangxi. As the habitat has been seriously damaged, *P. crassicornicea* is now regarded as an endangered species. To preserve the germplasm of this species, the genetic diversity of *P. crassicornicea* was quantified based on 7 SSR loci. The interspecies relationship between *P. crassicornicea* and two sympatric pine species, *P. yunnanensis* var. *tenuifolia* and *P. massoniana*, was further analyzed. The results showed that the mean number of effective alleles (N_e) per locus was 1.653, the average observed heterozygosity (H_o) was 0.577, the expected heterozygosity (H_e) was 0.374, Shannon's information index (I) was 0.540 and mean Nei's gene diversity (h) was 0.376, indicating that *P. crassicornicea* maintains high levels of genetic variation. The genetic identity (GD) was 0.0175 between *P. crassicornicea* and *P. massoniana*, while 0.0525 between *P. crassicornicea* and *P. yunnanensis* var. *tenuifolia*. The interspecies relationship coefficient was 0.094 within *P. crassicornicea* and *P. massoniana*, and 0.066 in *P. crassicornicea* and *P. yunnanensis* var. *tenuifolia*, respectively. Therefore, it was reasonable that *P. crassicornicea* was genetically closer to *P. massoniana* than *P. yunnanensis* var. *tenuifolia*. The

收稿日期: 2013-10-26 修回日期: 2013-12-11

基金项目: 广西八桂学者专项经费; 江苏省研究生创新基金(CXZZ12_0541)。

作者简介: 冯源恒(1981-), 男, 黑龙江牡丹江市人, 博士研究生, 工程师, 主要从事林木遗传育种研究, (E-mail)nanyuan05@163.com。

*通讯作者: 李火根, 博士, 教授, 主要从事林木遗传育种研究, (E-mail)hgli@njfu.edu.cn。

strategy for the genetic resource conservation of *P. crassicornicea* was also discussed in this paper.

Key words: *Pinus crassicornicea*; SSR; genetic diversity; sympatric; genetic relationship

拉雅松 (*Pinus crassicornicea*) 为松科 (Pinaceae) 松属 (*Pinus*) 植物, 因 1989 年首次在广西壮族自治区雅长林场拉雅分场发现而得名。分布于乐业县南盘江南岸的雅长林区腹地, 海拔 500~1 200 m 的丘陵山地。林木呈小片状分布于细叶云南松 (*P. yunnanensis* var. *tenuifolia*) 林中。其针叶、雌雄球花等形态特征均明显异于细叶云南松而与马尾松 (*P. massoniana*) 相近, 惟树皮厚度、针叶树脂道数目等特征易与马尾松区分 (钟聪业等, 1990)。拉雅松的木材品质优良, 陈金凤 (1993) 对广西松属 10 种木材的纤维测定发现, 拉雅松木材的纤维长度和长宽比最大, 是造纸和纤维工业的优质原料。拉雅松的松针精油在抑菌、抗氧化、杀虫等方面具有生物活性, 有望开发成无污染的抑菌剂、抗氧化剂及驱避剂 (李梓, 2012)。拉雅松被视为广西具有重要发展潜力的乡土树种, 但迄今为止, 对拉雅松的遗传信息知之甚少; 对其群体遗传多样性状况及与其它松树种间亲缘关系的了解仍较为欠缺。

随着分子生物学技术的发展, 利用分子标记检测松属树种遗传多样性的报道较多, 如油松 (*P. tabulaeformis*) (李明等, 2013)、马尾松 (谭小梅等, 2012)、黄山松 (*P. taiwanensis*) (唐娟娟等, 2003)、思茅松 (*P. kesiya* var. *langbianensis*) (Chen *et al.*, 2002) 等; 利用分子标记分析松属种间亲缘关系也有报道 (陈凤英等, 1997; 洪香香等, 2011)。简单重复序列 (Simple Sequence Repeats, SSR) 因其具有多态性高、共显性、中性突变及遍布于整个基因组等特点, 广泛应用于遗传连锁图谱构建 (Labbé *et al.*, 2008)、亲缘关系分析 (Dow *et al.*, 1996)、遗传结构分析 (Wyman, 2003)、种间杂种鉴定 (张红莲等, 2010) 以及基因流检测 (Dow *et al.*, 1998) 等领域。本研究利用 SSR 分子标记对拉雅松的遗传多样性及其与细叶云南松和马尾松的亲缘关系进行研究, 以为拉雅松的种质资源保护、种间杂交育种以及种间进化关系等领域研究提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

材料于 2011 年 11 月采自广西壮族自治区乐业

县境内的雅长林场拉雅分场。共采集拉雅松群体样本 29 株 (编号 LY1-LY29), 分布在海拔 800~1 050 m 范围内。为研究拉雅松与同域分布松属种间亲缘关系, 同时采集 3 个细叶云南松天然群体样本及马尾松 31 株样本。其中马尾松样本取自南宁市林业科学研究所马尾松基因库。细叶云南松天然群体分别为广西乐业群体含 30 个样本、广西隆林群体含 31 个样本、广西西林群体含 31 个样本。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取与纯化 松树针叶 DNA 提取采用 CTAB 裂解—硅珠吸附法 (Doyle *et al.*, 1990)。纯化后 DNA 经分光光度计检测纯度后置于 4 °C 冰箱保存备用。

1.2.2 引物来源及 SSR-PCR 反应条件 本研究所用的 SSR 引物来源于马尾松核基因组 DNA 测序所得基因组序列设计开发, 共计 506 对。筛选 12 对在拉雅松、马尾松及细叶云南松中通用性好的 SSR 引物用于本研究。PCR 反应体系为 10 μ L: Tris-HCl 10 mmol/L pH 8.0, KCl 50 mmol/L, Mg²⁺ 2.5 mmol/L, dNTP (dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 0.2 mmol/L), 引物 2.5 pmol, Taq 聚合酶 0.08 U, DNA 10~20 ng。扩增反应程序采用 Touch-down PCR: 94 °C 15 s, 60 °C 15 s (Δ °C = -0.5), 72 °C 30 s, 16 cycles; 再进入 94 °C 15 s, 52 °C 15 s, 72 °C 30 s, 10 cycles; 最后 72 °C 延伸 15 min。SSR-PCR 产物在 8% 的聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 使用 50 bp DAN Ladder 为参照, 银染检测并照相记录。对所得的图片进行判读, 然后根据所读的数据用 A, B, C, D, E... 按条带长度大小从大到小进行编号。

1.2.3 天然群体的遗传多样性分析 采用 POP-GENE32 软件 (Yeh *et al.*, 1997) 计算各位点的观测等位基因数目 (N_a)、有效等位基因数目 (N_e)、Shannon 多样性指数 (I)、观测杂合度 (H_o) 和期望杂合度 (H_e)、Nei 基因多样性 (h)。并利用该软件对每个位点单独和所有位点的 Wright 固定指数 ($F_{IS} = 1 - H_o/H_e$) 进行了估计, Wright 固定指数用来指示取样种群是否偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 存在杂合子的过多或者缺乏。一般 F_{IS} 值越接近于零, 说明基因型分布越接近于平衡状态; F_{IS} 值越偏离零, 基因型分布越偏离平衡状态。 F_{IS} 值为正

说明杂合子缺失, F_{is} 值为负说明杂合子过剩。

1.2.4 种间亲缘关系分析 根据所获得的位点信息采用计算遗传距离与共祖系数两种方法分析拉雅松、细叶云南松及马尾松的种间亲缘关系。通过 POPGENE32 软件计算 3 种松树样本的 Nei's 标准遗传距离 (GD), 并采用软件 NTSYS 根据 Nei 氏遗传距离, 按非加权类平均法 (unweighted pair groupmethod with arithmetic averaging, UPGMA) 进行聚类, 绘制聚类图。采用 Coancestry Version 1.0 软件计算 3 种松树彼此间的共祖系数 Θ 以比较其亲缘关系 (Wang, 2011)。

1.2.5 种间杂交检测 根据 POPGENE32 软件分析得到 3 种松树各位点的等位基因频率, 研究种间杂交的可能性。采用 Elston(1971) 的最小二乘法估算杂种指数。通过对相同位点等位基因频率的回归分析 (采用 SAS 6.12 软件) 计算回归系数, 并将该回归系数定义为杂种指数 (Bennuah *et al.*, 2004)。

回归分析模型为 $Y_{ij} = aX_{1ij} + bX_{2ij} + c$, 式中 Y_{ij} 为拉雅松群体中第 i 个等位基因在第 j 个位点上的等位基因频率, X_{1ij} 表示细叶云南松群体中第 i 个等

位基因在第 j 个位点上的等位基因频率, X_{2ij} 表示马尾松群体中第 i 个等位基因在第 j 个位点上的等位基因频率, 回归系数 a 和 b 为杂种指数, c 为截距。杂种指数 a 反映了马尾松对杂交后代的贡献率, 杂种指数 b 反映了细叶云南松对杂交后代的贡献率。

2 结果与分析

2.1 拉雅松天然群体遗传多样性

12 对 SSR 引物中有 7 对在拉雅松群体扩增出多态性产物, 多态率为 58.3%。这 7 对引物共检测到 7 个位点 14 个等位基因, 每个位点平均观察等位基因数为 2; 平均有效等位基因数 1.653。

表 1 列出了拉雅松不同位点的遗传多样性参数。不同位点的多样性参数值差别很大, PF312 位点的 Shannon 信息指数最高为 0.691, PF390 位点的多样性指数最低为 0.168, 平均为 0.540。拉雅松群体的观测杂合度为 0.577, 期望杂合度为 0.374, Nei 多样性指数为 0.367。Wright 固定指数平均为 -0.466, 说明群体内杂合子过剩。

表 1 拉雅松遗传多样性参数

Table 1 Genetic diversity of *Pinus crassicornicea*

位点 Locus	观察等位基因数 N_a	有效等位基因数 N_e	Shannon 信息指数 I	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	Nei 多样性指数 h	固定指数 F_{is}
PF382	2	1.572	0.550	0.478	0.372	0.364	-0.314
PF303	2	1.938	0.677	0.821	0.493	0.484	-0.697
PF312	2	1.991	0.691	0.931	0.506	0.498	-0.871
PF319	2	1.963	0.684	0.862	0.499	0.491	-0.758
PF349	2	1.715	0.608	0.593	0.425	0.417	-0.421
PF390	2	1.083	0.168	0.080	0.078	0.077	-0.042
PF402	2	1.312	0.401	0.276	0.242	0.238	-0.160
Mean	2	1.653	0.540	0.577	0.374	0.367	-0.466

2.2 种间亲缘关系

采用 POPGENE32 软件分析得到 4 个天然群体与马尾松对照群体的遗传距离。拉雅松群体与马尾松对照群体距离最近为 0.0159, 与 3 个细叶云南松群体距离较远, 平均为 0.0525。采用 NTSYS 软件根据 POPGENE32 软件分析得到的遗传距离进行聚类分析, 获得聚类图 (图 1)。采用 Coancestry Version 1.0 软件计算得到拉雅松与马尾松个体间平均共祖系数 (Θ) 为 0.094, 而拉雅松与细叶云南松的共祖系数则为 0.066。两种分析方法的结论都说明拉雅松与马尾松具有较近亲缘关系。

2.3 种间杂交检测

从亲缘关系分析结果可知拉雅松与马尾松亲缘关系更近, 这与形态学上对二者针叶、雌雄球花的观察结论相一致, 且两个种的花期也接近 (钟聪业等, 1990)。但拉雅松呈片状分布于细叶云南松林中 (钟聪业等, 1990), 管胞分子尺度与细叶云南松极其相近, 且明显大于马尾松 (牟继平, 1993)。因此, 拉雅松也有可能是由于马尾松与细叶云南松长期渐杂交而形成的。

经 12 对 SSR 引物对 3 种松树 152 个样本进行扩增, 共得到 13 个位点 37 个等位基因。其中 18 个

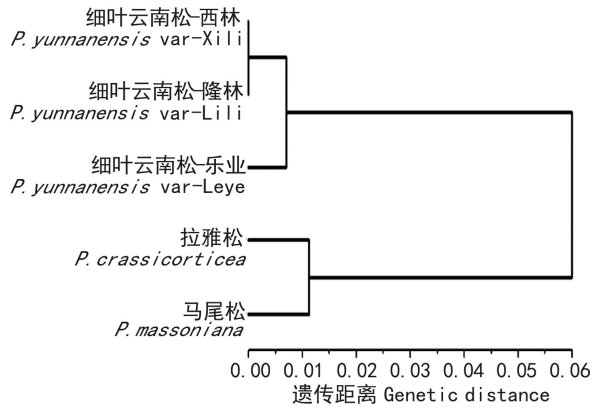


图 1 拉雅松、细叶云南松及马尾松遗传距离聚类图
Fig. 1 Dendrogram by genetic distance in *P. crassicornata*,
P. massoniana and *P. yunnanensis* var. *tenuifolia*

等位基因在 3 种松树中均可检测到；2 个等位基因只在拉雅松与细叶云南松中发现；4 个等位基因只在马尾松与细叶云南松中发现；13 个等位基因为细叶云南松所独有。

采用 SAS 6.12 软件 REG 程序对种间杂交进行定量分析，得到回归方程为 $Y = 0.021 + 0.893X_1 + 0.048X_2$ 。回归方程的方差分析结果为 $F = 267.57$, $P < 0.0001$ 。马尾松与细叶云南松估算的杂种指数分别为 0.893、0.048，说明马尾松对拉雅松遗传贡献更大。马尾松的杂种指数的假设检验 (t 检验) 结果为极显著水平 ($P < 0.0001$)，但细叶云南松的杂种指数则不显著。因此不能断定拉雅松是马尾松与细叶云南松的杂交种。结合亲缘关系分析结果，作者推测拉雅松可能与马尾松存在较近的亲缘关系。

3 讨论与结论

3.1 拉雅松的群体遗传多样性水平

松属树种是典型的以风媒传粉为主的裸子植物，具有丰富的遗传变异，遗传多样性普遍较高 (Hamrick *et al.*, 1992)。本文对拉雅松的研究发现，该树种的部分遗传多样性参数值处于较高水平。观测等位基因数是衡量 SSR 位点多态性和群体变异程度高低的重要指标。拉雅松在 7 个 SSR 位点上的平均观测等位基因数为 2，低于细叶云南松 ($N_a = 3$)，但高于马尾松 ($N_a = 1.857$)。Nei's 基因多样性指数和 Shannon's 信息指数是评价遗传多样性的重要指标。本文研究结果显示，拉雅松在其物种水平上 $h = 0.367$, $I = 0.540$ ，两者都高于细叶云

南松 ($h = 0.266$, $I = 0.472$) 及马尾松 ($h = 0.269$, $I = 0.408$)。杂合度 (H) 不仅是衡量群体遗传多样性最常用的指标，同时也反映群体中等位基因的丰富度和均匀程度。在杂合度指标上，拉雅松 ($H_e = 0.374$) 也高于细叶云南松 ($H_e = 0.267$) 及马尾松 ($H_e = 0.273$)，同样高于西南地区的云南松 (*P. yunnanensis*) ($H_e = 0.145$, 虞泓等, 2000)、高山松 (*P. densata*) ($H_e = 0.174$, 虞泓等, 2000) 和思茅松 ($H_e = 0.326$, Chen *et al.*, 2002)。上述与几个近缘物种的比较表明，拉雅松的群体的等位基因数不多，但基因多样性指数及杂合度较高。在物种水平上，与 100 多种裸子植物的平均水平相比 ($H_{es} = 0.169$)，拉雅松的杂合度也同样处于较高水平。濒危、特有植物的遗传多样性较低，但也有研究表明，有些稀有、濒危植物同样可以表现出较高的遗传多样性 (Gizendanner *et al.*, 2000)，如海南木莲 (*Manglietia hainanensis*) (魏小玲等, 2013)。海南木莲虽然分布范围窄，现存居群少，但生命力强，经过自然选择的作用，适应生存环境的基因被保留和积累下来，使得该物种的遗传多样性较高 (魏小玲等, 2013)。拉雅松同样处于小范围分布，数量稀少的状况，但其形态与生理特征较好的适应了南盘江流域的干热环境。虞泓等 (2000) 认为思茅松高水平的遗传变异和其居群分布于卡西亚松 (*P. kesiya*) 分布区的边缘并与云南松分布区重叠有关。而拉雅松的分布区恰与细叶云南松的分布区重叠且位于马尾松分布区的边缘。因此拉雅松遗传多样性较高也可能源于与近缘种的基因交流。

研究还发现拉雅松的 Wright 固定指数平均为 -0.466 ，说明群体内杂合子过剩。一般而言，造成杂合子过剩的原因主要有繁殖居群数量少、超显性、对纯合子的逐步选择、负选型交配及无性繁殖等 (Stoekel *et al.*, 2006; Rasmussen *et al.*, 2008)。拉雅松杂合子过剩的主要原因很可能是群体规模小，这与同样片断化分布的观光木 (*Tsoongiodendron odorum*) 情况类似 (王霞 *et al.*, 2012)。

此外，研究中检测到拉雅松存在等位基因频率低于 0.05 的稀有等位基因，表明群体中承载某些遗传变异的稀有等位基因很可能仅存于某一个或极少数个体上，这些遗传变异正面临流失。这与拉雅群体的当前濒危生境相吻合。由于长期得不到重视与保护，加之近年来当地毁林复耕状况日益严重，拉雅群体的数量已减少至 100 株左右，基本为成龄大树，

几乎没有更新幼苗。虽然本研究得出了拉雅松成年群体遗传多样性较高的结论,但实际上拉雅松正在面临种质资源枯竭的危险,对拉雅松种质资源保护工作刻不容缓。

3.2 拉雅松与同域分布松属种间的亲缘关系

拉雅松、细叶云南松和马尾松均属双维管束松亚属。拉雅松的分布区与细叶云南松重叠,其形态学特征与马尾松、细叶云南松相近但又存在诸多不同。拉雅松针叶2针一束偶有3针一束,针叶粗硬,边缘有细锯齿;树脂道8~13,边生,通常6~10位于背面,2~3位于腹面,间或其中1为内生,位于腹面紧靠维管束(钟聪业等,1990)。细叶云南松针叶3针一束,细柔下垂,长20~30 cm,径不及1 mm;树脂道4~6个,边生,稀角部1个中生。马尾松针叶2针一束偶有3针一束,长12~20 cm,质软,叶缘有细锯齿;树脂道4~8,边生。

钟业聪等(1990)将其作为一个新种进行报道时并未就其分类学地位进行深入讨论。从分布区域上考虑,其分布范围恰是细叶云南松与马尾松的分布区边缘,有可能是两个种的天然杂交种群,但本研究所做的种间杂交分析结果表明细叶云南松的杂种指数过小且假设检验不显著,尚不能断定拉雅松是马尾松与细叶云南松的杂交种。本研究发现相比于细叶云南松,拉雅松与马尾松的遗传距离更近,据此推测拉雅松可能与马尾松存在较近的亲缘关系。

3.3 拉雅松遗传资源保护策略

对于珍稀濒危物种保护,首先要回答两个问题:一是明确该物种面临的主要威胁来自何方?二是采取何种措施使物种得以繁衍?当前,物种的濒危往往是外界生态环境改变和物种内在因素综合作用的结果。其中,生境的破坏、丧失及资源的过度开发利用等人为因素是公认的导致物种灭绝的第一元凶。本文研究结果表明,拉雅松现存群体仍具有较高的遗传多样性;且实地调查结果也显示,现存的拉雅松成年个体开花结实能力正常,说明拉雅松的濒危并非物种本身的生物学因素所导致,而是由于其生存环境的恶化、生境的破坏所致。调查发现,由于受农业生产活动的严重干扰,拉雅松林下几乎难觅幼苗,自然更新状况极差。而且,现存的拉雅松成年大树也在“与林争地”的农业用地扩张过程中遭受破坏,个体数逐渐减少。因此,开展拉雅松种质资源保护工作刻不容缓。

鉴于该物种所处的现状,建议在当地建立自然

保护区,实施拉雅松天然群体的就地保护。同时,为了防止在自然保护区建成前拉雅松受到毁灭性破坏,还应进行有计划的迁地保存。目前,可行的迁地保护措施有二。一是采其种子营建人工林,二是采其穗条进行嫁接,建立种质资源保存圃。但在实施拉雅松迁地保存过程中,还需考虑以下两个生物学问题。其一,如何避免拉雅松的近交?众所周知,近交将导致子代生长势降低、生活力下降、适合度降低,表现出近交衰退,进而影响该物种的繁衍生存。建议在尽可能扩大种质保存规模基础上,利用DNA分子标记分析现存种群个体间的亲缘关系,为核心种质构建与保存圃内无性系的配置提供依据。其二,拉雅松是否存在遗传同化的风险?本研究发现拉雅松与马尾松有较近的亲缘关系。如果拉雅松与马尾松间杂交可育,则极有可能导致拉雅松与马尾松自然杂交,最终趋于遗传同化。建议接下来可以开展拉雅松与马尾松的人工杂交工作,以确认两个种间是否杂交可育。若种间杂交可育,则在拉雅松迁地保护区选址时,应远离马尾松林分。由于松树为风媒传粉,花粉传播距离大,建议拉雅松与马尾松隔离带范围至少2 km。

参考文献:

- Bennuash SY, Wang T, Aitken SN. 2004. Genetic analysis of the *Picea stichensis* × *glauca* introgression zone in British Columbia [J]. *For Ecol Manage*, **197**:65-77
- Chen FY(陈凤英), Zeng KW(曾科文), Xiao XH(肖向红), et al. 1997. Consanguineous relationship of three species of Sect. *centrosema* of *Pinus* from Daxing, am Mountiansin China—a comparative study on the POD isozyme zymogram(大兴安岭三类五针松亲缘关系—过氧化物酶同工酶谱比较)[J]. *J North-east For Univ*(东北林业大学学报), **25**(6):48-51
- Chen SY, Zhao WS, Wang J. 2002. Genetic diversity and genetic differentiation of natural populations of *Pinus kesiya* var. *langbianensis*[J]. *J For Res*, **13**(4):273-276
- Cheng JF(陈金凤). 1993. Deter Mination of the size of wood fibre (Tracheid) from 10 species of *Pinus* in Guangxi(广西松属10种木材纤维(管胞)的测定)[J]. *J Guangxi Agric Univ*(广西农业大学学报), **12**(1):78-81
- Dow BD, Ashley MV. 1996. Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of saplings in Bur oak, *Quercus macrocarpa*[J]. *Theor Appl Genet*, **91**(1):137-141
- Dow B D, Ashley MV. 1998. High levels of gene flow in Bur oak revealed by paternity analysis using microsatellites[J]. *J Hered*, **89**(1):62-70
- Doyle JJ, Doyle JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue [J]. *Focus*, **12**:13-15
- Elston RC. 1971. The estimation of admixture in racial hybrids[J]. *Annal Human Gen*, **35**:9-17
- Fu XX(洪香香), Zhao H(赵虎), Wang Y(王玉). 2011. Species identification and genetic relationship assessment of *Pinus* (sect. *Pinus*) related species based on morphological and molecular

- markers(松属近缘种形态和分子鉴定及其亲缘关系探讨)[J]. *Sci Silv Sin*(林业科学), **47**(10):51-58
- Gizendanner MA, Soltis PS. 2000. Patterns of genetic variation in rKre and widespread plant congenem[J]. *Am J Bot*, **87**:783-792
- Hamrick JL, Loveless MD. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species[J]. *New For*, **6**:95-124
- Labbé J, Zhang XY, Yin TM, et al. 2008. A genetic linkage map for the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* and its alignment to the whole-genome sequence assemblies[J]. *New Phytol*, **180**:316-328
- Li M(李明), Wang SX(王树香), Gao BJ(高宝嘉). 2013. Analysis of genetic diversity of chinese pine(*Pinus tabulaeformis*) natural secondary forest populations and correlation with theirshabitat ecological factors(油松天然次生林居群遗传多样性及与产地地理气候因子的关联分析)[J]. *Acta Ecol Sin*(生态学报), **33**(12):3 602-3 610
- Li Z(李梓). 2012. Extraction technology and bioactivity research of volatile components from *Pinus crassicornicea* and *Pinus yunnanensis* Franch. var. *tenuiifolia*(拉雅松和细叶云南松挥发性成分的提取及生物活性研究)[D]. Liuzhou(广西柳州): Guangxi University Technology(广西工学院)
- Mou JP(牟继平). 1993. Study on the wood structure of *Pinus crassicornicea*(拉雅松木材构造的研究)[J]. *J Guangxi Agric Univ*(广西农业大学学报), **12**(2):56-59
- Rasmussen KK, Kollmann J. 2008. Low genetic diversity in small peripheral populations of a rare European tree(*Sorbus torminalis*) dominated by clonal reproduction[J]. *Conser Gen*, **9**:1 533-1 539
- Stoeckel S, Grange J, Fernandez-Manjarres JF, et al. 2006. Heterozygote excess in a self-incompatible and partially clonal forest tree species-*Prunus avium* L.[J]. *Molec Ecol*, **15**:2 109-2 118
- Tan XM(谭小梅), Zhou ZC(周志春), Jin GQ(金国庆), et al. 2012. Genetic diversity and mating system analysis of *Pinus massoniana* in a second-generation clonal seed orchard(马尾松二代无性系种子园遗传多样性和交配系统分析)[J]. *Sci Silv Sin*(林业科学), **48**(2):69-74
- Tang JJ(唐娟娟), Fan YR(范义荣), Zhu HY(朱睦元). 2003. Analysis of the genetic diversity of *Pinus taiwanensis* populations(黄山松群体遗传多样性分析)[J]. *J Zhejiang For Coll*(浙江林学院学报), **20**(1):23-26
- Wang JL. 2011. Coancestry: a program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients[J]. *Molec Ecol Resour*, **11**:141-145
- Wang X(王霞), Wang J(王静), Jiang JH(蒋敬虎), et al. 2012. Genetic diversity and the mating system in a fragmented population of *Tsoongiodendron odorum*(观光木片断化居群的遗传多样性和交配系统)[J]. *Biodiver Sci*(生物多样性), **20**(6):676-684
- Wei XL(魏小玲), Cao FX(曹福祥), Chen J(陈建). 2013. Studies on the genetic diversity and relationship of *Manglietia hainanensis* Dandy by ISSR(海南木莲遗传多样性的 ISSR 及亲缘关系的分析)[J]. *Biotechnol Bull*(生物技术通报), **8**:74-77
- Wyman J, Bruneau A, Tremblay MF. 2003. Microsatellite analysis of genetic diversity in four populations of *Populus tremuloides* in Quebec[J]. *Can J Bot*, **81**:360-367
- Yeh FC, Yang RC, Boyle TB, et al. 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis[J]. *Molec Biol Biotechnol Centre, Univ Alberta, Canada*, 10
- Yu H(虞泓), Ge S(葛颂), Huang RF(黄瑞复), et al. 2000. A Preliminary study on genetic variation and relationships of *Pinus yunnanensis* and its closely related species(云南松及其近缘种的遗传变异与亲缘关系)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), **42**(1):107-110
- Zhang HL(张红莲), Li HG(李火根), Xu M(胥猛), et al. 2010. Identification of *Liriodendron tulipifera*, *Liriodendron chinense* and hybrid *Liriodendron* using species-specific SSR markers[J]. *Sci Silv Sin*(林业科学), **46**(1):36-39
- Zhong YC(钟业聪), Huang KX(黄开响). 1990. A new species of *Pinus* in Guangxi(广西松属一新种)[J]. *Guihaia*(广西植物), **10**(4):287

(上接第 307 页 Continue from page 307)

- peach(桃垂枝性状生理特性及 SSR 分子标记研究)[D]. Tai An(泰安):Shandong Agricultural University(山东农业大学)
- Lü YM(吕英民), Chen JY(陈俊愉). 2003. Preliminary report on the genetics of pendulous characteristics of *Prunus mume*(梅花垂枝性状遗传研究初报)[J]. *J Beijing For Univ*(北京林业大学学报), (S2):43-45
- Mellerowicz EJ, Baucher M, Sundberg B, et al. 2001. Unravelling cell wall formation in the woody dicot stem[M]//Plant Cell Walls. Springer:239-274
- Nakamura T, Saotome M, Ishiguro Y, et al. 1994a. The effects of GA3 on weeping of growing shoots of the Japanese cherry, *Prunus spachiana*[J]. *Plant Cell Physiol*, **35**(3):523-527
- Nakamura T, Saotome M, Tanaka H. 1994b. Weeping habit and gibberellin in *Prunus*[J]. *Plant Bioregul Hortic*, **39**(4):273-280
- Pallardy GS. 2010. *Physiol of woody plants*[M]. 3rd ed. London: Academic Press:73-75
- Plomion C, Leprovost G, Stokes A. 2001. Wood formation in trees [J]. *Plant Physiol*, **127**(4):1 513-1 523
- Sachs RM. 1965. Stem elongation[J]. *Am Rev Plant Physiol*, **16**(1):73-96
- Shen X(沈向), Li YM(李亚蒙), Kang L(康鸾), et al. 2008. Relationship between morphology and hormones during weeping peach shoot development(垂枝桃枝条发育形态和内源激素的关系)[J]. *Acta Hortic Sin*(园艺学报), **35**(3):395-402
- Shi LX(时留新), Jin RR(金融融), Liang CC(梁丛丛), et al. 2013. Changing laws of fiber morphology and chemical component of *Liriodendron hybrids* along tree longitudinal direction(杂交鹅掌楸纤维形态和化学组成的纵向变化规律)[J]. *J Central South Univ For & Technol*(中南林业科技大学学报), **33**(08):6-9
- Spurr SH, Hyvärinen MJ. 1954. Wood fiber length as related to position in tree and growth[J]. *Bot Rev*, **20**(9):561-575
- Sun TX(孙同兴), Jiang XS(江幸山). 2009. H₂O₂-CH₂COOH maceration-a simple and perfect method for leaf epidermis(简便有效的叶表皮离析方法-过氧化氢-醋酸法)[J]. *Guihaia*(广西植物), **29**(1):44-47
- Valster AH, Blancaflor EB. 2008. Mechanisms of gravity perception in higher plants[J]. *Plant Tropisms*:3-19
- Yang PF(杨佩芳), Liu H(刘和), Gao JP(高建平), et al. 1995. Studies on the cell separation of the secondary xylem of the outgrowth of the peach and apple(桃、苹果枝条次生木质部细胞的解离研究)[J]. *J Fruit Sci*(果树科学), **12**(03):146-150
- Yang PF(杨佩芳), Liu H(刘和), Gao MY(高美英), et al. 1996. Comparative study on the cell separation of the secondary xylem of the annual branch of pear and peach tree(梨树和桃树新梢次生木质部细胞解离的比较研究)[J]. *Acta Hortic Sin*(园艺学报), **23**(1):19-22