

板栗和锥栗同域居群的空间遗传结构

朱蕾^{1,2}, 康明^{3*}

(1. 中国科学院武汉植物园, 武汉 430074; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049; 3. 中国科学院华南植物园, 中国科学院植物资源保护与可持续利用重点实验室, 广州 510650)

摘要: 采用微卫星技术研究了板栗(*Castanea mollissima*)和锥栗(*C. henryi*)同域分布居群的空间遗传结构, 探讨了它们的遗传变异空间分布特征及其形成机制。结果表明, 采用的 7 个微卫星在两物种中共扩增出 173 个等位基因, 两物种都具有较高的遗传多样性且种间遗传分化水平较低($F_{ST}=0.051$), 但空间自相关分析揭示板栗和锥栗在同域居群中具有不同的空间遗传结构, 锥栗在 100 m 内有空间遗传结构, 而板栗没有; 同时, 基于亲缘关系系数 F_{ij} 的 Sp 统计值也显示锥栗具有比板栗更强的空间遗传结构(板栗的 $Sp=0.002$; 锥栗的 $Sp=0.018$)。居群遗传变异的空间结构是其传粉和种子散播及生境共同作用的结果, 其中种子的近距离散播和居群密度可能是主要的因素。板栗和锥栗居群在小尺度上空间遗传结构的差异可能反映了它们种子的大小及扩散过程的差异。

关键词: 板栗; 锥栗; 微卫星; 空间遗传结构; 遗传多样性

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2012.01.001

Spatial Genetic Structure of A Sympatric Population of *Castanea mollissima* and *Castanea henryi*

ZHU Lei^{1,2}, KANG Ming^{3*}

(1. Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: The spatial genetic structure (SGS) is an important part of evolutionary ecological and ecological genetic processes in natural populations of plants. The spatial distribution patterns of genetic variation of two closely related sympatric *Castanea* species, *C. mollissima* and *C. henryi*, were investigated using seven microsatellite loci. A total of 173 alleles were detected in the two species. According to the isolation by distance model, Sp -statistics were calculated based on Moran's I spatial autocorrelation coefficient and F_{ij} kinship coefficient for the two species. The results showed that there were high polymorphism in each species with low genetic differentiation ($F_{ST}=0.051$). However, the two species displayed significant difference of SGS in this sympatric population. Spatial genetic structure was detected in *C. henryi* up to 100 m, while that was not observed in *C. mollissima*. Moreover, the Sp -statistic values based on F_{ij} , were 0.002 for *C. mollissima* and 0.018 for *C. henryi*. These results further supported that *C. henryi* had stronger spatial genetic structure than *C. mollissima*. The difference of SGS in *C. mollissima* and *C. henryi* can be explained by different seed characteristics, as *C. mollissima* was characterized by three nuts per cupule while there was only one nuts per cupule for *C. henryi*. Therefore, the long-distance seed dispersal via gravity and animals was much more favored for *C. mollissima* than *C. henryi*, which reduced different SGS between the two species.

Key words: *Castanea mollissima*; *Castanea henryi*; SSR; Spatial genetic structure; Genetic diversity

收稿日期: 2011-05-09 接受日期: 2011-06-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(30770219); 中国科学院重要方向性项目(KSCX2-YW-N-061)资助

作者简介: 朱蕾(1987~), 女, 硕士研究生, 从事栗属植物保育遗传学研究, email: zhuleiahds@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, email: mingkang@mail.scbg.ac.cn

栗属(*Castanea* Miller)是壳斗科(Fagaceae)中较小的属,全世界有 7 种,广泛分布于北半球温带地区^[1]。其中,亚洲分布有 4 种:板栗(*C. mollissima* Bl.)、茅栗(*C. seguinii* Dode)和锥栗(*C. henryi* Rehd. & Wils.)分布在中国大陆;日本栗(*C. crenata* Sieb. & Cuce)分布在日本和朝鲜半岛。板栗为落叶乔木,成熟叶片叶背密被灰白色星状毛,通常 1 个壳斗中含有 3 个坚果,雌雄异花同株,风媒异花传粉,在中国秦岭以南从汉水到长江中下游沿岸的丘陵山区有野生居群分布。中国板栗因其品质好、抗逆性强、遗传资源丰富而被广泛地作为经济植物栽培。锥栗为落叶大乔木,叶片有光泽,背面光滑,坚果单生,雌雄异花同株,风媒异花传粉,自然分布于秦岭、淮河以南地区。锥栗仅在福建、浙江等局部地区作为经济植物栽培^[2]。

居群遗传结构及其影响因子的研究是保护遗传学的重要内容,它不仅是探讨物种形成以及植物适应性进化机制的基础,也是制定物种有效保护策略和措施的依据^[3]。空间自相关分析(spatial autocorrelation analysis, SGS)是研究居群空间遗传结构的一种有效方法,尤其是在小尺度空间范围内,用来检测与量化从多个标定点中取值变异的空间依赖性,通过检测一个位置上的变异是否依赖于邻近位置的变异来判断该变异是否存在空间自相关性,即是否存在空间结构^[4-7]。近年来,居群空间遗传结构分析已经成为分子生态学和保育遗传学研究的重要手段。王英等^[8]用 9 对 SSR 引物对茅栗随机大居群以及其中各亚居群的遗传结构进行了空间自相关分析。Cottrell 等^[9]采用 SSR 标记技术对夏栎(*Quercus robur*)和无梗栎(*Q. petraea*)的两个不同干扰程度居群的小格局空间遗传结构进行了分析,结果表明这两种栎树在同一居群及同一树种在不同居群均表现出不同的空间遗传结构,可能与物种不同的种子扩散机制和人类活动对居群的空间遗传结构的影响有关。这些研究表明植物居群的空间遗传结构受基因流、微生境选择、居群聚集情况、生活史和人类活动等因素影响。

迄今为止,大多数空间遗传结构分析均是对单个物种的居群开展的,而对于多个物种同域居群的空间遗传结构分析则少有报道。在同域居群中,物种所处的生境特征基本一致,物种间空间遗传结构的差异更能反映物种的扩散特征,而排除环境因素的影响。本研究以湖北省秭归县境内一同域居群

中的板栗和锥栗为研究对象,采用微卫星分子标记技术及空间自相关分析方法,探讨同域居群中板栗和锥栗是否存在空间遗传结构及其形成原因,为研究它们的适应性进化机制和制定有效的保护策略和措施提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 样本采集和 DNA 提取

选取湖北省秭归县杨林桥镇境内的一个板栗(*C. mollissima*)和锥栗(*C. henryi*)的自然同域分布居群作为采样地(30°43' N, 110°48' E, 海拔 1100 ~ 1200 m)。样地面积约为 12 hm²;属亚热带季风性湿润气候,年平均降水量 990 ~ 1400 mm,雨热同季;年平均气温 13℃ ~ 18.5℃,1 月(最冷月)平均气温为 4.7℃,7 月(最热月)平均气温为 27.9℃,无霜期 273 d;≥10℃ 的年积温为 3000℃ ~ 6080℃;土壤类型为黄棕壤,呈弱酸性,土层较厚,自然肥力较高;植被类型为针阔混交林及山地灌丛,主要的伴生种为栓皮栎(*Q. variabilis*)和杉木(*Cunninghamia lanceolata*)。

野外对树形、树皮、叶片、胸径、开花情况等性状进行观察,对同域分布的板栗和锥栗的所有成年个体进行取样和定位。共采集和定位了 450 株个体,其中板栗 168 株,锥栗 282 株(图 1)。每个植株均选取树冠上部表层的 5 片无破损且完全展开的成熟叶片,采集的叶片立即用硅胶干燥保存。叶片的 DNA 提取采用改良的 CTAB 法^[10]。

1.2 微卫星荧光标记分析

在前期实验的基础上,本研究选用了 7 对多态性较好的 SSR 引物,其中 5 对来自欧洲栗(*C. sativa*)的引物(CsCAT3、CsCAT5、CsCAT8、CsCAT14、CsCAT41)^[10]和 2 对来自日本栗的引物(KT001b 和 KT008a)^[12],由宝生物工程公司合成。采用 FAM、TAMRA 和 HEX 等 3 种不同颜色的荧光染料对 SSR 正向引物的 5' 端分别进行标记。DNA 扩增中各引物的 PCR 反应条件和程序参照田华等^[13]的方法。扩增反应总体积为 15 μL,包括 1.5 μL 10 × buffer,1.5 mmol/L MgCl₂ 0.9 μL,0.5 μmol/L 的正反向引物各 0.75 μL,200 μmol/L dNTP 0.3 μL,0.5 U μL⁻¹ Taq DNA 聚合酶(生工生物工程有限公司合成)0.3 μL 和 50 ng 模板 DNA。PCR 扩增条件为:95℃ 预变性 5 min,然后 94℃ 50 s,每对引物的特定退火温度 30 s,72℃ 90 s,共 35 次循环,最后

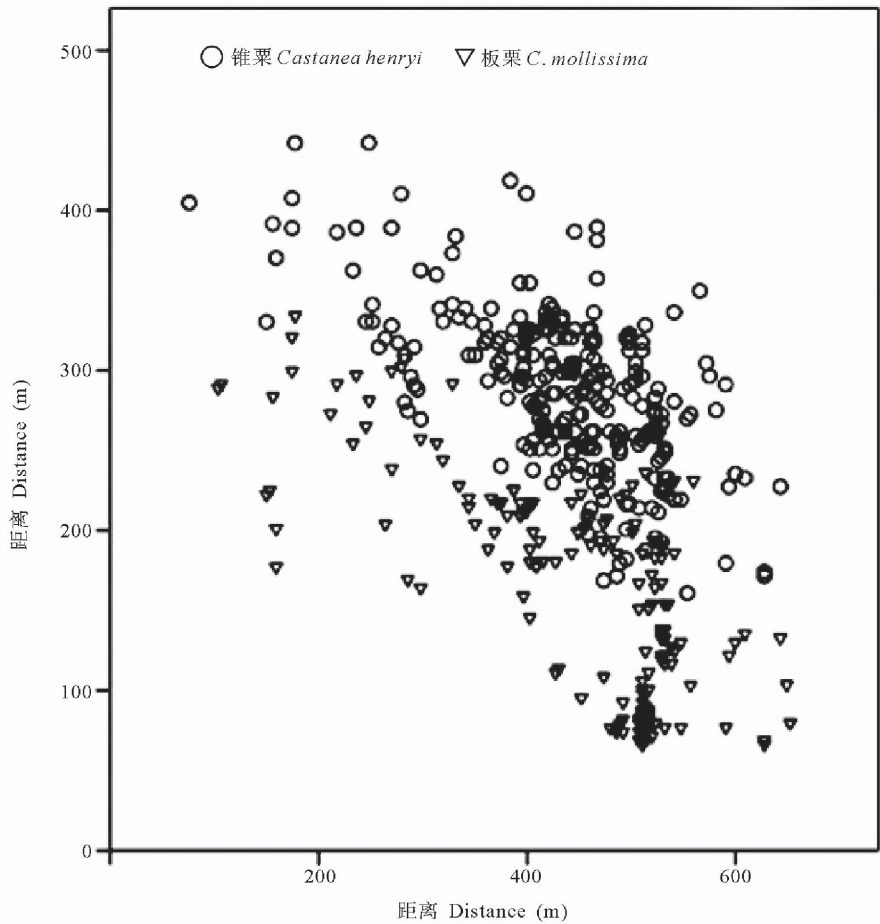


图 1 秭归板栗和锥栗同域居群的个体分布
Fig. 1 Individual distribution of *Castanea mollissima* and *C. henryi* sympatric population in Zigui

72℃ 7 min 延伸。扩增反应在 Master Gradient PCR 仪(Eppendorf, Germany)上进行。将不同颜色标记引物或目标片段至少隔50 bp相同颜色标记引物的 PCR 产物混合一起,通过毛细管电泳,在 ABI 3730 DNA 分析仪上进行区分。

1.3 数据分析

1.3.1 遗传多样性

采用 GenALEx6 软件^[14]计算遗传多样性参数:每个位点的等位基因频率、每个位点的等位基因数(A_o)、每个位点的有效等位基因数(A_e)、观察杂合度(H_o)和预期杂合度(H_e)、居群分化系数 Wright's F_{ST} 。卡方检测 Wright's 近交系数 F_{IS} 可反映每个位点是否偏离 Hardy-Weinberg 平衡^[15]。

1.3.2 空间自相关分析

通过计算每个位点的 Moran's I 统计值和 Nason's 值(F_{ij})检测空间自相关程度^[4-5]。按照物种内单株间的距离,距离等级采用 50 m,每个物种划分 12 个等级。为保证分析的准确性,每个距离等级内

最少要有 30 个单株对。在多态性位点中选取基因频率在 10% ~ 90% 的位点,频率小于 10% 和大于 90% 的等位基因被排除,是因为它们仅代表非常少的个体,不能提供足够的信息^[16]。采用 SPAGEDI 1.3^[17]软件计算不同距离等级下的空间自相关系数 Moran's I 。同时,用基于多位点亲缘关系的方法计算每个采样点内两两个体间的空间自相关系数 Nason's 值(F_{ij})^[18],该参数描述了个体 I 和 J 之间相对于居群内随机取样个体间平均遗传相似性的遗传相似程度。

1.3.3 Sp 统计值分析

Sp 统计值可以用来检测物种空间遗传结构的强度,它的优点是对取样的尺度及居群是否满足漂变-扩散-突变平衡不敏感^[19-20],因而有利于物种间的比较。 $Sp = b/(F_1 - 1)$,其中 F_1 表示第一距离等级内个体间的亲缘系数, b 是亲缘关系对距离的自然对数的回归斜率。物种的空间遗传结构采用软件 SPAGEDI 1.3 进行分析。在本研究中,我们采用空间自相关系数 Nason's 值(F_{ij})计算 Sp 统计值,因为

与其它参数相比,Nason's 值(F_{ij})的统计偏差较小,具有较强的统计分析特性。

2 结果

2.1 遗传多样性分析

7 对荧光标记微卫星引物在同域居群两个物种中共扩增出 173 个等位基因,板栗和锥栗分别扩增出 69 和 104 个等位基因,有 52 个等位基因是两物种共有的。板栗和锥栗的平均等位基因数(A)分别是 9.9 和 14.9,平均有效等位基因数(A_E)分别是 4.0

和 2.9,观察杂合度(H_O)分别为 0.387 ~ 0.940 和 0.174 ~ 0.819,预期杂合度(H_E)分别为 0.573 ~ 0.843和 0.217 ~ 0.789。板栗的平均观察杂合度和平均预期杂合度(0.655 和 0.720)均高于锥栗的(0.561和 0.566)。两物种均有少数位点偏离 Hardy-Weinberg 平衡。板栗的平均近交系数(F_{IS})为 0.095,锥栗为0.024(表 1)。在多位点分析中,板栗和锥栗中都有轻微的杂合度不足。同时,两物种间的分化系数($F_{ST}=0.051$)较低。

表 1 同域居群的 SSR 位点多样性检测
Table 1 SSR locus diversity measures in sympatric population

引物 Primer	A		A_E		H_E		H_O		F_{IS}	
	CM	CH	CM	CH	CM	CH	CM	CH	CM	CH
CsCAT3	11	22	6.4	3.6	0.843	0.719	0.810	0.664	0.039	0.076
CsCAT5	19	20	5.4	4.7	0.816	0.789	0.647	0.680	0.207	0.139
CsCAT8	10	14	3.1	3.1	0.676	0.678	0.940	0.819	-0.390	-0.208
CsCAT14	10	12	5.0	4.0	0.801	0.752	0.749	0.772	0.066	-0.027
CsCAT41	5	16	2.8	1.3	0.646	0.240	0.506	0.174	0.217	0.273
KT001b	8	11	3.2	1.3	0.683	0.217	0.533	0.220	0.219	-0.015
KT008a	6	9	2.3	2.3	0.573	0.570	0.387	0.609	0.325	-0.069
平均 Mean	9.9	14.9	4.0	2.9	0.720	0.566	0.655	0.561	0.095	0.024

CM: 板栗; CH: 锥栗; A : 等位基因数; A_E : 有效等位基因数; H_E : 预期杂合度; H_O : 观察杂合度; F_{IS} : 近交系数。
CM: *Castanea mollissima*; CH: *Castanea henryi*; A : Number of alleles per locus; A_E : Effectine number of alleles per locus; H_E : Expected heterozygosity; H_O : Observed heterozygosity; F_{IS} : Inbreeding coefficient.

2.2 空间遗传结构

在板栗和锥栗的同域居群中划分 12 个距离等级,每个等级相隔 50 m,计算各个位点的 Moran's I

和 F_{ij} 值。结果表明,无论采用哪种统计值,板栗的基因型分布均呈随机分布模式,没有发现显著的空间遗传结构(图 2a,3a)。锥栗的基因型在 100 m 内

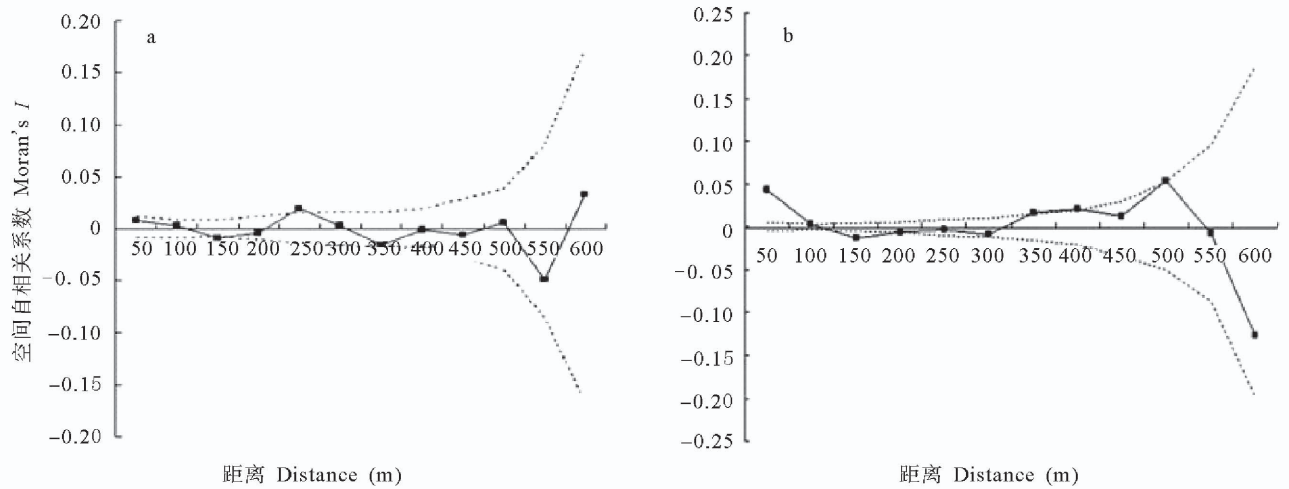


图 2 板栗(a)和锥栗(b)在不同距离上的 Moran's I 值。实线为观察数据,每个距离等级的 95% 的上下置信区间用虚线表示。下图同。
Fig. 2 Moran's I of *Castanea mollissima* (a) and *C. henryi* (b) at different distance. The solid lines indicate observed data, while dotted lines indicate about 95% confidence interval for each distance class. The same as following Figure.

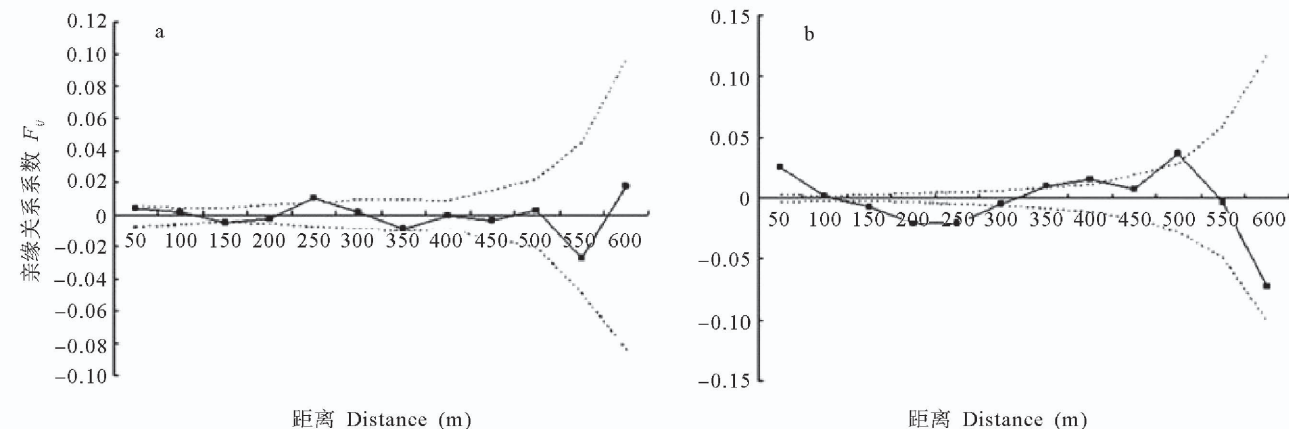


图 3 板栗(a)和锥栗(b)在不同距离上的 F_{ij} 值

Fig. 3 Kinship coefficient (F_{ij}) of *Castanea mollissima* (a) and *C. henryi* (b) at different distance

呈现非随机分布(图 2b,3b),随着距离的增加个体间的相关性逐渐降低,表明在 100 m 内的个体间亲缘关系相近,而 100 m 以外的植株遗传变异则越来越不相似。板栗和锥栗基于多位点亲缘关系个体空间自相关系数 F_{ij} 的 Sp 值分别为 0.002 和 0.018,也表明在同域居群中锥栗的空间遗传结构强于板栗。

3 讨论

3.1 同域居群板栗和锥栗的遗传多样性

本研究结果表明来自欧洲栗和日本栗的微卫星引物在板栗和锥栗中都具有很好的通用性,但扩增片段大小在物种间稍有差异。7 对微卫星引物在板栗中表现出了高于锥栗的多态性,预期杂合度和观察杂合度(板栗的 H_E 为 0.720, H_O 为 0.655; 锥栗的 H_E 为 0.566, H_O 为 0.561),均高于郎萍等^[21]用等位酶的研究结果(板栗的 H_E 为 0.311, H_O 为 0.284; 锥栗的 H_E 为 0.261, H_O 为 0.218)。同时,王英等^[8]报道茅栗居群的 A 为 10, H_O 为 0.355~0.817, H_E 为 0.637~0.879,田华等^[13]报道板栗居群的 A 为 7.4, H_O 为 0.590, H_E 为 0.678,本研究中板栗和锥栗的遗传多样性水平与他们的结果相差不大。这与栗属植物生活史特征相符合,栗属植物均为多年生长寿命植物,在我国广域分布,雌雄同株但却几乎不能自交,具有风媒异花授粉的繁育特性,花粉能够传播较远的距离^[22]。

本研究中,板栗和锥栗共享 52 个等位基因,且两物种的遗传分化程度较低但明显。由于板栗和锥栗在人工条件下可杂交,因此它们的低分化可能是因为种间的基因流低导致的。不过,我们先前对这个同域居群叶表型变异的研究表明,板栗和锥栗

之间几乎没有自然杂交^[23]。因此,板栗和锥栗居群之间较低的分化更可能反映了这两个物种保持了共有的祖先多态性(Shared ancestral polymorphisms)。这种情形在栎属(*Quercus*)自然杂交带的遗传分化研究中有报道^[24]。

3.2 空间遗传结构

遗传变异的空间分布过程中基因型的选择是一种距离隔离作用,个体间的亲缘关系随距离的增加而降低。基因型的非随机分布是形成居群内空间遗传结构的主要因素。本研究结果表明锥栗在 100 m 的范围内有着明显的空间遗传结构,但板栗则没有显著的空间遗传结构(图 2,3)。同域居群近缘物种表现出不同的空间遗传结构的现象在其他一些物种中也有报道,Soto 等^[25]采用微卫星标记对冬青栎(*Q. ilex*)和栓皮栎(*Q. suber*)的空间遗传结构进行了分析,结果表明冬青栎在 75 m 的范围内有显著的空间结构,而栓皮栎则没有。然而,呈现显著空间遗传结构的距离大小很大程度上依赖于取样尺度的变化,因此,该参数并不能有效地反映物种的空间遗传结构^[17,26]。相反, Sp 统计值反映的居群空间遗传结构强度并不依赖于取样的策略,可以用于不同居群或不同物种的比较^[17-18]。Vekemans 等^[17]分析了 47 种植物的 Sp 统计值,结果表明风媒及重力/动物扩散的树种其空间遗传结构强度约为 0.003~0.123。可以看出,中国栗属植物的空间遗传结构与已报道的具有类似生活史特征物种的空间遗传结构相吻合,不过,板栗的空间遗传结构属于较低水平。

值得注意的是,尽管该同域分布居群中栗属两种植物的空间遗传结构均较低,但锥栗的空间遗传

结构水平($Sp=0.018$)却远远高于板栗($Sp=0.002$)。同样, Valbuena-Carabana 等^[27]利用9个高多态性的SSR分子标记对3个不同分布密度和生境的无梗栎(*Q. petraea*)和比利牛斯栎(*Q. pyrenaica*)的混合居群进行了小尺度空间结构的研究,结果表明在相同居群内无梗栎具有比比利牛斯栎更强的空间遗传结构。在小尺度空间水平上,有限的基因扩散是居群空间遗传结构形成的最主要原因^[17]。基因扩散包括种子和花粉的传播,但多数研究结果表明,种子的传播比花粉传播更容易影响植物的空间遗传结构^[3,28]。因此种子扩散差异可能是导致板栗和锥栗空间遗传结构差异的主要原因。栗属植物种子主要依靠重力或附着传播,有报道认为啮齿类动物是栎子、山毛榉坚果或榛子的主要扩散者,它们在种子的次级扩散中扮演重要的角色^[29]。啮齿动物通常取食较大的植物种子或果实,一方面因为较大的种子或果实内富含营养物质,如淀粉、脂肪、蛋白质以及其它营养物质,是啮齿动物等的重要食物资源;另一方面,比较大的种子或果实自然界中能很好贮藏,通常不易腐烂变质^[30]。板栗1个壳斗中含3个坚果,果实较大,因此板栗的种子或果实被动物扩散的机会较大,使得远离母树贮藏的种子比在树冠下萌发的坚果受到较小的竞争,有利于生长;而锥栗种子坚果单生果实较小,被动物散播的可能较少,大部分种子易在母树附近形成家系结构,这种聚集分布导致了锥栗具有一定的空间遗传结构。此外,板栗和锥栗具有类似的生活史特征,即都是风媒传粉,花粉可以远距离扩散。一般来讲,花粉扩散的距离与居群密度成负相关,这一现象在很多风媒森林树种中都有报道^[31-33]。在该同域分布居群内,锥栗的高密度分布可能也一定程度上限制了花粉的扩散距离,进一步增加了其空间遗传结构强度。

空间遗传结构分析极大地拓展了遗传学在保护生物学研究中的应用范围,是将居群遗传学理论、种群统计学方法与景观生态学研究相结合的重要一环^[34]。本研究揭示了在板栗和锥栗的同域居群中,锥栗比板栗具有更明显的空间遗传结构,这可能反映了两个物种在种子扩散和花粉散布能力上的差异,不过我们还不能完全定量地估测这些影响因素在物种遗传结构中所起作用的大小及其后果。后续研究可以采用亲本分析的方法揭示花粉和种子在居群中的实际扩散距离,并考察其对空间

遗传结构的影响。

参考文献

- [1] Johnson G P. Revision of *Castanea* sect. *Balanocastanon* (Fagaceae) [J]. J Arn Arb, 1988, 69(1): 25-49.
- [2] Huang C C(黄成就), Chang Y T(张永田), Hsu Y C(徐永椿), et al. Fagaceae [M] // Chun W Y(陈焕镛), Huang C C(黄成就). Flora Reipublicae Popularis Sinicae Tomus 22. Beijing: Science Press, 1998: 8-13.(in Chinese)
- [3] Hamrick J L, Godt Mary J W, Hamrick J L, et al. Conservation Genetics of Endemic Species [M]. New York: Chapman and Hall, 1996: 281-304.
- [4] Sokal R R, Oden N L. Spatial autocorrelation in biology: 1. Methodology [J]. Biol J Soc, 1978, 10(2): 199-228.
- [5] Sokal R R, Oden N L. Spatial autocorrelation in biology: 2. Some biological implications and four applications of evolutionary and ecological interest [J]. Biol J Soc, 1978, 10(2): 229-249.
- [6] Brown A H D, Clegg M T, Kahler A L, et al. Spatial Patterns of Genetic Variation within Plant Populations [M]. MA: Sinauer Associates, 1990: 229-253.
- [7] He T H(何田华), Yang J(杨继), Rao G Y(饶广远). Spatial autocorrelation analysis of plant population genetic variation [J]. Chin Bull Bot(植物学通报), 1999, 16(6): 636-641.(in Chinese)
- [8] Wang Y(王英), Kang M(康明), Huang H W(黄宏文). Subpopulation genetic structure in a panmictic population as revealed by molecular markers: A case study of *Castanea sequinii* using SSR markers [J]. J Plant Ecol(植物生态学报), 2006, 30(1): 147-156.(in Chinese)
- [9] Cottrell J C, Munro R C, Tabbener H E, et al. Comparison of fine-scale genetic structure using nuclear microsatellites within two British oakwoods differing in population history [J]. For Ecol Manag, 2003, 176(1/2/3): 287-303.
- [10] Brunsfeld S J, Soltis D E, Soltis P S. Evolutionary patterns and processes in *Salix* sect. *Longifoliae*: Evidence from chloroplast DNA [J]. Syst Bot, 1992, 17(2): 239-256.
- [11] Marinoni D, Akkai A, Bounous G, et al. Development and characterization of microsatellite markers in *Castanea sativa* Mill. [J]. Mol Breed, 2003, 11(2): 127-136.
- [12] Yamamoto T, Tahaka T, Kotobuki K, et al. Characterization of simple sequence repeats in Japanese chestnut [J]. J Hort Sci Biotechn, 2003, 78(2): 197-203.
- [13] Tian H(田华), Kang M(康明), Li L(李丽), et al. Genetic diversity in natural populations of *Castanea mollissima* inferred from nuclear SSR markers [J]. Biodiv Sci(生物多样性), 2009, 17(3): 296-302.(in Chinese)
- [14] Peakall R, Smouse P E. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Poulution genetic software for teaching and research [J]. Mol Ecol Notes, 2006, 6(1): 288-295.
- [15] Wright S. Coefficients of inbreeding and relationship [J].

- Amer Nat, 1922, 56(645): 330–338.
- [16] Geburek T. Are gene randomly distributed over space in mature populations of sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.) [J]. Ann Bot, 1993, 71(3): 217–222.
- [17] Vekemans X, Hardy O J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations [J]. Mol Ecol, 2004, 13(4): 921–935.
- [18] Hardy O J, Maggia L, Bandou E, et al. Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 Neotropical tree species [J]. Mol Ecol, 2006, 15(2): 559–571.
- [19] Hardy O J, Vekemans X. Spagedi: A versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels [J]. Mol Ecol Notes, 2002, 2(4): 618–620.
- [20] Loiselle B A, Sork V L, Nason J, et al. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae) [J]. Amer J Bot, 1995, 82(11): 1420–1425.
- [21] Lang P(郎萍), Huang H W(黄宏文). Genetic diversity and geographic variation in natural populations of the endemic *Castanea* species in China [J]. Acta Bot Sin(植物学报), 1999, 41(6): 651–657.(in Chinese)
- [22] Li Z Z(李作洲), Lang P(郎萍), Huang H W(黄宏文). Spatial structure of allozyme frequencies in *Castanea mollissima* Bl. [J]. J Wuhan Bot Res(武汉植物学研究), 2002, 20(3): 165–170.(in Chinese)
- [23] Liu Y(刘莹), Ning Z L(宁祖林), Wang J(王静), et al. Study on leaf phenotypic variation of a sympatric population of *Castanea mollissima* and *C. henryi* [J]. J Wuhan Bot Res(武汉植物学研究), 2009, 27(5): 480–488.(in Chinese)
- [24] Muir G, Schlotterer C. Evidence for shared ancestral polymorphism rather than recurrent gene flow at microsatellite loci differentiating two hybridizing oaks (*Quercus* spp.) [J]. Mol Ecol, 2005, 14(2): 549–561.
- [25] Soto A, Lorenzo Z, Gil L. Differences in fine-scale genetic structure and dispersal in *Quercus ilex* L. and *Q. suber* L.: Consequences for regeneration of Mediterranean open woods [J]. Heredity, 2007, 99(6): 601–607.
- [26] Rousset F. Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-statistics under isolation by distance [J]. Genetics, 1997, 145(4): 1219–1228.
- [27] Valbuena-Carabaña M, Gonzalez-Martinez S C, Hardy O J, et al. Fine-scale spatial genetic structure in mixed oak stands with different levels of hybridization [J]. Mol Ecol, 2007, 16(6): 1207–1219.
- [28] Kalisz S, Nason J D, Hanzawa F A, et al. Spatial population genetic structure in *Trillium grandiflorum*: The roles of dispersal, mating history and selection [J]. Evolution, 2001, 55(8): 560–568.
- [29] Jü T Z(巨天珍). A quantitation study of the interspecific association of *Quercus diena* var. *acuteserrata* community in Xiaolongshan Mountain of Tianshui [J]. Acta Bot Boreal-Occid Sin(西北植物学报), 1995, 15(3): 250–253.(in Chinese)
- [30] Xiao Z S(肖治术), Zhang Z B(张知彬). Hoarding behavior of rodents and plant seed dispersal [J]. Acta Theriol Sin(兽类学报), 2004, 24(2): 61–67.(in Chinese)
- [31] El-Kassaby Y A, Jaquish B. Population density and mating pattern in Western Larch [J]. Heredity, 1996, 87(6): 438–443.
- [32] Dyer R J, Sork V L. Pollen pool heterogeneity in shortleaf pine, *Pinus echinata* Mill. [J]. Mol Ecol, 2001, 10(4): 859–866.
- [33] Sousa V A, Hattemer H H. Pollen dispersal and gene flow by pollen in *Araucaria angustifolia* [J]. Botany, 2003, 51(3): 309–317.
- [34] Manel S, Schwartz M K, Luikart G, et al. Landscape genetics: Combining landscape ecology and population genetics [J]. Trend Ecol Evol, 2003, 18(4): 189–197.