

刘本立, 李霓, 贾凌云, 张辉, 苏雪, 侯勤正, 孙坤. 黑河上游灌丛建群种中国沙棘自由授粉子代父本分析和花粉流[J]. 植物科学学报, 2019, 37(2): 164–170

Liu BL, Li N, Jia LY, Zhang H, Su X, Hou QZ, Sun K. Paternity analysis and pollen flow for open-pollination progenies of *Hippophae rhamnoides* ssp. *sinensis* Rousi, a constructive species of shrub from the upper reaches of Heihe River[J]. *Plant Science Journal*, 2019, 37(2): 164–170

黑河上游灌丛建群种中国沙棘自由授粉子代父本分析和花粉流

刘本立, 李霓, 贾凌云, 张辉, 苏雪, 侯勤正, 孙坤*

(西北师范大学生命科学学院, 兰州 730070)

摘要: 利用 SSR 分子标记对中国沙棘 (*Hippophae rhamnoides* ssp. *sinensis* Rousi) 自由授粉的种子进行父本分析, 研究其子代的父本来源和花粉散布模式。结果显示: 在 80% 的置信水平上, 193 个子代中有 104 个个体可以确定花粉来源; 在 20 个确定的父本中, 16 个为中国沙棘, 4 个为肋果沙棘 (*H. neurocarpa* S. W. Liu et T. N. He)。传粉格局分析结果显示, 中国沙棘有效花粉散布范围为 3~71 m, 平均距离为 20.4 m, 2 株母本分别有 87.23% 和 78.95% 的有效花粉来自距其 30 m 的范围之内, 研究结果表明中国沙棘自然种群以近距离传粉为主。此外, 在黑河上游沙棘杂交带中, 中国沙棘子代中的肋果沙棘花粉平均贡献率达到 14.84%, 表明中国沙棘与肋果沙棘存在较高的种间当代花粉流。

关键词: 中国沙棘; 父本分析; 传粉格局; 种间花粉流; 微卫星标记

中图分类号: Q944.43

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2019)02-0164-07

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.2019.20164

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Paternity analysis and pollen flow for open-pollination progenies of *Hippophae rhamnoides* ssp. *sinensis* Rousi, a constructive species of shrub from the upper reaches of Heihe River

Liu Ben-Li, Li Ni, Jia Ling-Yun, Zhang Hui, Su Xue, Hou Qin-Zheng, Sun Kun*

(College of Life Sciences, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: To explore the paternal origin of offspring and the pollen dispersal pattern in natural populations under open-pollination, we conducted paternity analysis for seeds of *H. rhamnoides* ssp. *sinensis* using SSR markers. Results showed that in 104 seedlings of 193 open-pollinated offspring, the pollen source was identified at an 80% confidence level. In 20 male parents deduced, 16 were *H. rhamnoides* ssp. *sinensis* and four were *H. neurocarpa* S. W. Liu et T. N. He. Pollination pattern analysis showed that the effective distance of *H. rhamnoides* ssp. *sinensis* pollen dispersal was in the range of 3–71 m, with an average distance of 20.4 m. Furthermore, 87.23% and 78.95% of the effective pollen received by the two respective female parents examined came from a distance range of 30 m. These results indicate that the natural populations of *H. rhamnoides* ssp. *sinensis* are mainly pollinated within a close range. In addition, in the seabuckthorn hybrid zone of the upper reaches of Heihe River, the average pollen contribution from *H. neurocarpa* to the offspring of *H. rhamnoides*

收稿日期: 2018-08-27, 退修日期: 2018-10-17。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31660060, 31270429)。

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (31660060, 31270429)。

作者简介: 刘本立(1991–), 男, 硕士研究生, 研究方向为进化生态学和生物多样性(E-mail: junzerun@163.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: kunsun@nwnu.edu.cn)。

ssp. *sinensis* reaches 14.84%, indicating that *H. rhamnoides* ssp. *sinensis* and *H. neurocarpa* possess a relatively high frequency of contemporary interspecific pollen flow.

Key words: *Hippophae rhamnoides* ssp. *sinensis*; Paternity analysis; Pollination pattern; Interspecific pollen flow; SSR markers

基因流是指基因在种群内和种群间的流动,作为一种重要的进化动力,对生物进化与生物多样性的产生具有重要作用。植物花粉散布是自然种群中重要的基因流方式。花粉运动,特别是风媒花粉的成功传递不仅由风力决定,还受到不同生境中植物群落结构的多样性、稳定性和温湿度、降水量等生物和非生物因素的影响。为准确揭示植物的花粉流,前人已采用多种方法尝试研究花粉的运动^[1-3]。近年来,许多分子标记技术,如微卫星标记(SSR)、限制性片段长度多态性(RFLP)、单核苷酸多态性(SNP)等,由于能够提供大量稳定、高效、可重复的遗传变异信息,可以精确估计群体的遗传组成和花粉散布模式,在基因流研究中得到了普遍的应用^[4-8]。

中国沙棘(*Hippophae rhamnoides* ssp. *sinensis* Rousi)为胡颓子科沙棘属多年生落叶灌木、小乔木或乔木,该植物为雌雄异株、风媒传粉,具有较强的水土保持和土壤改良的能力,具有重要的生态和经济价值。研究表明,沙棘属植物除能依靠鸟类传播种子实现长距离的基因交流外,也具有利用风媒远距离传播花粉的能力^[9-12]。但由于花粉的传播距离受外界环境影响较大,中国沙棘种内的有效花粉散布范围和传粉格局还缺乏深入了解^[11, 12]。另外,中国沙棘是黑河上游高山灌丛的主要建群种,在海拔3000 m左右常与肋果沙棘(*H. neurocarpa* S. W. Liu et T. N. He)为群落共建种,两者间通过自然杂交形成了杂种棱果沙棘(*H. goniocarpa* Lian, X. L. Chen et K. Sun)^[13],但在其同域分布的区域内2个物种间是否存在当代花粉流仍不清楚。因此,本文利用SSR分子标记的方法,研究中国沙棘自然种群自由授粉状态下子代的父本(花粉)来源、花粉有效散布距离及传粉格局,检测是否存在当代的种间花粉交流,以期为进一步开展中国沙棘的生殖适应和隔离机制研究、种群的恢复与重建以及沙棘的合理栽培种植提供理论依据。

1 研究样地概况

研究样地位于青藏高原东北部,北祁连山脉中西

部的青海省祁连县拱北湾(38°15' N, 100°16' E),年均温-1℃,年均降水量约420 mm,属典型的高原大陆性气候,降水量充足,常形成季节性沟谷,沟谷两侧山坡为青海云杉林,沿山坡沟谷海拔2800~3100 m范围内从上至下狭长分布有以中国沙棘和肋果沙棘为共建种的沙棘灌丛,其中沟谷上部以肋果沙棘为主,中下部则以中国沙棘数量较多。拱北湾样地内的中国沙棘和肋果沙棘5月开花、6月挂果,果实成熟期为9月。

2 研究方法

2.1 样本采集

于2012年9月,在样地中部沙棘灌丛内选取2株相距25 m、结实量较大的中国沙棘母本(母本1和母本2),每株分别采集成熟果实,带回实验室后剥去果皮,于4℃保存备用。对样地内的成年雄株进行全面采样,共获得中国沙棘21株(S1~S21)和肋果沙棘18株(N1~N18)。另外,对样地周围其它成年雄株(距样地边界距离均大于100 m)全部采样。对2株母本及候选父本的位置定位,野外采集各候选父本的幼嫩叶片,用硅胶干燥后备用。

2.2 DNA提取

随机选取来自2株中国沙棘母本(母本1和母本2)的种子各200粒,培养20~30 d后共获得193个实生幼苗,其中来自母本1的子代84个,来自母本2的子代109个。待幼苗长出6~8片真叶后去除根部,用于提取DNA。总DNA提取用改良的CTAB法^[14],所得DNA检测后保存于-20℃备用。

2.3 SSR引物筛选

本实验从Wang等^[15]和许汀等^[16]开发的13对沙棘属植物SSR引物中筛选出6对条带清晰、重复性好且具有明显多态性的引物用于PCR扩增(表1),反应条件参考李霓等^[17]的方法。

2.4 数据统计分析

采用Cervus 3.0软件^[18],将拱北湾样地的39株沙棘雄株与样地周围其它成年雄株作为候选父

本, 依据最大似然法分配的原理, 估算每个候选父本的似然性值比率(LOD), LOD 值越大则鉴定出真实亲本的可能性也越大。为了更准确地鉴定真实父本, 将最大和次大可能父本的 LOD 值之差定义为 Δ 值, 通过比较 Δ 值与临界值, 检验其显著性。 Δ 值的显著水平采用可信度表示。本文采用父本分析研究中常用的 2 种可信度检验, 即 80% 和 95%^[19], 对中国沙棘自由授粉子代进行父本分析。

3 结果与分析

3.1 父本分析

研究结果显示, 当置信水平高于 80% 时, 2 株母本所有检测子代的父本组成为 S1、S3、S4、S10 ~ S14; N5、N7、N10 等 20 个雄株。父本分析结果显示(表 2、表 3), 在 20 个父本中有 4 个父本为肋果沙棘, 占有父本的 20%, 其余均为中国沙棘(16 个), 占有父本的 80%。

表 1 SSR 引物序列
Table 1 Sequences of SSR primers

引物名称 Primer name	重复单元 Repeat motif	引物序列 Primer sequence (5'-3')	条带范围 Band size (bp)
Hr-06	CA(9)	F: CAACAAAATACAATTCGGAAC R: AATAGGAGACACAGAGGCTTC	70~90
HTP-06	A(6)CAAACA(3)	F: CAATTGTTCAATACTAAATG R: ATCCTAATCAAAAGAAATC	113~125
HTP-08	A(10)	F: CCCCTTCTTTTCAGATAGT R: GAGAGTTGCATTTTGCCCTTT	135~140
HTP-12	A(8)	F: TGCCAGAAGATTAGACTTTTAC R: GGAGCAGCTTATACCCATTAC	70~85
HTI-01	A(8)---T(6)	F: GACGCTTGCGGACAATATAACA R: CAAACCCATAGCCTCTACCTCC	125~145
NHTP-27	TGA(8)	F: AACCACAGCAAAACAAAAAAC R: TAAAAATACACCTCCAACCTCA	230~250

表 2 中国沙棘母本 1 自由授粉子代的父本分析
Table 2 Paternity analysis for open-pollinated seeds of maternal 1

父本来源 Paternity	种子数(> 80%置信度) No. of seeds (Significance level> 80%)	种子数(< 80%置信度) No. of seeds (Significance level < 80%)	花粉贡献率(%) Contribution rate of pollen	距母本距离(m) Distance to maternal tree
样地内父本来源 Paternal origin inside plot	S3	4(*), 5(+)	19.15	19
	S14	1(*), 6(+)	14.89	18
	S9	5(+)	10.64	19
	S13	4(+)	8.51	16
	S12	3(+)	6.38	15
	S4	3(+)	6.38	17
	S21	2(+)	4.26	71
	S10	1(+)	2.13	7
	S11	1(+)	2.13	5
	N10	7(+)	14.89	21
	N5	1(+)	2.13	10
	小计	5(*), 38(+)	91.49	
样地外父本来源 Paternal origin outside plot	2S21	3(+)	6.38	
	2N19	1(+)	2.13	
	小计	4(+)	8.51	
可能的父本 Paternal candidate	S1	2		
	S5	4		
	小计	6		
不能判断父本来源 Paternity unknown		6		
	小计	6		

注: “+”和“*”分别表示在 80%(相当于 $P < 0.2$) 和 95%(相当于 $P < 0.05$) 的置信水平。下同。
Notes: “+” and “*” mean 80% ($P < 0.2$) and 95% ($P < 0.05$) confidence level, respectively. Same below.

表 3 中国沙棘母本 2 自由授粉子代的父本分析
Table 3 Paternity analysis for open-pollinated seeds of maternal 2

父本来源 Paternity		种子数(> 80%置信度) No. of seeds (80% significance level)	种子数(< 80%置信度) No. of seeds (80% significance level)	花粉贡献率(%) Contribution rate of pollen	距母本距离(m) Distance to maternal tree
样地内父本来源 Paternal origin inside plot	S17	9(+)	5	15.79	26
	S13	6(+)	0	10.53	6
	S10	5(+)	1	8.77	12
	S12	5(+)	0	8.77	6
	S9	1(*), 3(+)	0	7.02	18
	S11	4(+)	1	7.02	14
	S19	4(+)	0	7.02	23
	S5	1(*), 2(+)	0	5.26	27
	S21	3(+)	3	5.26	53
	S1	1(*), 1(+)	6	3.51	32
	S3	1(*)	3	1.75	31
	S4	1(*)	2	1.75	32
	N10	2(+)	1	3.51	3
	N7	2(+)	0	3.51	10
	N5	1(+)	0	1.75	21
	小计	5(*), 47(+)	22	91.23	
样地外父本来源 Paternal origin outside plot	2S21	2(*)	0	3.51	
	2S10	1(+)	1	1.75	
	4S5	1(+)	1	1.75	
	2N19	1(+)	3	1.75	
	小计	2(*), 3(+)	5	8.77	
可能的父本 Paternal candidate	S2		2		
	S6		2		
	S8		1		
	S15		4		
	S18		4		
不能判断父本来源 Paternity unknown	小计	12	13		
	小计	12			

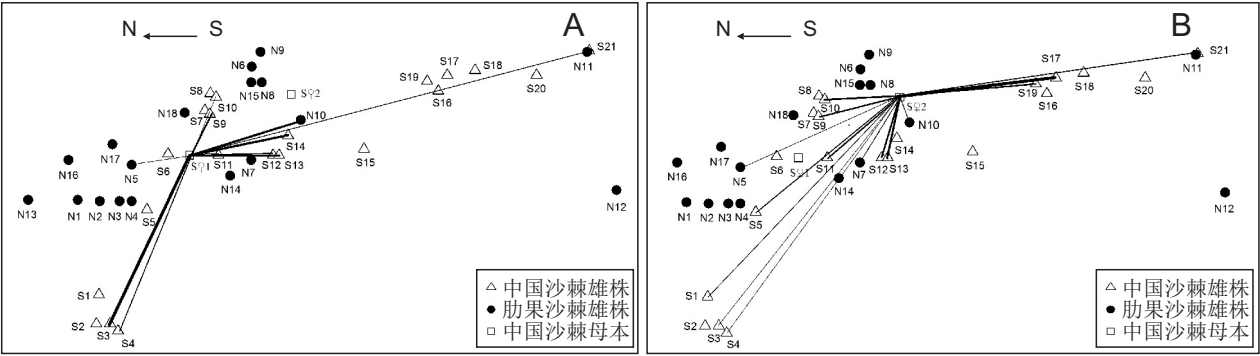
中国沙棘母本 1 的 84 粒种子中有 47 粒(占 55.95%)确定了唯一父本来源, 其中 9 个子代的花粉来源于肋果沙棘, 其余 38 个子代花粉来源于中国沙棘。在确定花粉来源的 13 个父本中, 3 株为肋果沙棘, 10 株为中国沙棘; 其中, S3、S14、S9、N10 这 4 个父本的花粉贡献率较高, 累计达到 53.19%。中国沙棘母本 2 的 109 粒种子中有 57 粒(占 52.29%)确定了唯一父本来源, 其中 6 个子代的花粉来源于肋果沙棘, 其余 51 个子代花粉来自中国沙棘。在确定花粉来源的 19 个父本中, 4 株为肋果沙棘, 15 株为中国沙棘; 其中, S17、S13、S10、S12 这 4 个父本的花粉贡献率较高, 累计达到 43.86%。

3.2 花粉流与传粉格局

根据中国沙棘母本在实验样地中的位置及样地内各候选父本的定位信息, 结合父本的分析结果绘

制出中国沙棘 2 株母本自由授粉子代的花粉来源图(图 1)。

实验结果表明(表 4, 图 2), 沙棘有效花粉散布距离分别在 5~71 m 以及 3~53 m 范围内, 平均距离为 20.4 m, 这与张冬梅等^[19]利用微卫星分子标记技术对风媒传粉植物油松(*Pinus tabulaeformis* Carr.)控制授粉和自由授粉的子代进行父本分析的结果相似。中国沙棘母本 1 87.23%花粉的来自周围 30 m 范围内; 4.26%的花粉来自样地内距离母本 30 m 以外的范围; 样地外的花粉来源达到 8.51%。中国沙棘母本 2 78.95%花粉的来自周围 30 m 范围内; 30~40 m 范围内的花粉来源占 7.02%; 5.26%来自样地内离母本 40 m 以外; 样地外来源达到 8.77%的花粉。父本 S12 和 S13 对两株母本子代贡献的花粉比例较大, 其中 S12 对母本 1 和母本 2 的花粉贡献率分别为 6.38%和



线条表示有效花粉流，线条粗细反映有效花粉量的多少。
Lines indicate pollen flow to female tree, line thickness is proportional to number of effective pollen grains contributed by corresponding male tree.

图 1 样地内 2 个中国沙棘母本自由授粉子代的花粉来源母本 1 (A) 和母本 2 (B)
Fig. 1 Pollen origin of maternal 1 (A) and maternal 2 (B) under open-pollination

表 4 传粉距离与花粉贡献率
Table 4 Dispersal distance and pollen contribution rate

母本 Maternal	有效传粉范围(m) Effective range of dispersion	平均传粉距离(m) Average distance of dispersion	花粉贡献率(%) (< 30 m) Pollen contribution rate	种间花粉贡献率(%) Interspecific pollen contribution rate
1	5 ~ 71	19.8	87.23	19.15
2	3 ~ 53	20.9	78.95	10.53
平均 Mean		20.4	83.09	14.84
汇总 Total	3 ~ 71			

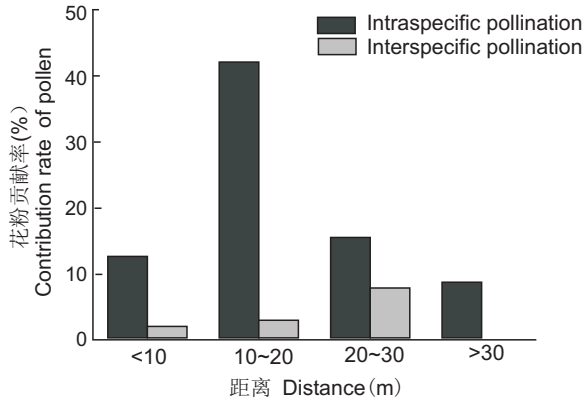


图 2 有效花粉的散布距离

Fig. 2 Dispersal distance of effective pollen grains

8.77%；S13 分别为 8.51%和 10.53%。

本研究发现，中国沙棘的花粉流以种内为主，但同时也检测到与肋果沙棘有较高的种间当代花粉流。在中国沙棘母本 1 与母本 2 的子代中，肋果沙棘花粉贡献率分别为 19.15%和 10.53%。通过对中国沙棘母本 1 与确定的肋果沙棘父本定位结果显示，有效花粉散布距离在 10~21 m，平均距离为 19.6 m。而母本 2 的定位结果显示，有效花粉散布距离在 3~21 m，平均距离为 9.4 m。两株中国沙棘子代中来源于肋果沙棘的花粉平均贡献率达到

14.84%，有效花粉散布距离为 3~21 m，平均距离为 15.7 m。

4 讨论

风媒传粉作为一种重要的传粉方式，可以增加植物对复杂多变的非生物环境的适应能力^[20]，但是成功的风媒传粉也受到种群密度、周围植被类型等生物因素以及风速、地理距离等非生物因素的影响^[21]。研究表明，大部分风媒传粉植物以近距离传粉为主，但也有一些风媒植物可以远距离传播花粉^[11, 12, 22-25]。中国沙棘是雌雄异株的风媒植物，鲁先文等^[10]和王子科等^[22]通过重力玻片法分别检测到中国沙棘大部分花粉分布在 10~20 m 处，但在一定条件下花粉可以传播到 100 m 以上，实现远距离传粉。在黑河上游的青海祁连地区，中国沙棘是高山灌丛的主要建群种，本研究在对该地 2 株中国沙棘自由授粉的子代进行父本分析时发现，其有效花粉散布距离为 3~71 m，有效花粉来源与母本的平均距离为 20.4 m；有 83.09%的有效花粉来自 30 m 范围内的雄株，且大部分集中在 15 m 左右。另外，本研究也检测到沙棘有效花粉的 8.65%来源于样地外，样地外的沙棘雄株距离这两

株中国沙棘母本距离较远,花粉来源最大距离可达到200 m以上。本研究结果与前人^[10, 12]的结果一致。本研究选取的样地内沙棘灌丛斑块状镶嵌分布于南北走向的山坡沟谷,沟谷两侧山坡为青海云杉(*Picea crassifolia* Kom.)林,在传粉季节该地盛行西北风与东南风^[26]。中国沙棘有效花粉来源大部分为母本周边的雄株,可见其子代多由近距离传粉形成。成斑块状分布的沙棘灌丛有利于雌株接收周边雄株的花粉,提高传粉效率^[10]。本研究结果显示,由于山谷走向等复杂的地理环境和风向的影响,植株在不同方向接收的有效花粉量差异较大,证明地理环境、植被及风向是影响中国沙棘传粉格局的重要因素。此外,本研究也发现中国沙棘能在一定程度上实现远距离传粉,这种远距离的花粉扩散虽然占比很小,但在某种程度上可以促进不同地方种群之间的基因交流,进而提高种群的遗传多样性^[27]。

中国沙棘与肋果沙棘是沙棘属2个分布于不同海拔环境下的类群,但在黑河上游海拔约3000 m的区域,中国沙棘常与肋果沙棘形成了群落共建种。近年来,我们已利用核基因组的ITS序列以及叶绿体基因组的trnS-G和trnL-F等序列对沙棘属植物进行了分子系统学方面的研究,结果证实棱果沙棘(*H. goniocarpa* Lian, X. L. Chen et K. Sun)是由同域分布的中国沙棘和肋果沙棘在不同重叠区独立通过种间自然杂交形成的^[28-30]。进一步的研究表明,在黑河上游等中国沙棘和肋果沙棘同域分布的区域还形成了棱果沙棘自然杂交带^[13, 31],但二者间是否存在当代基因流仍缺乏证据。本研究发现中国沙棘子代中来源于肋果沙棘的花粉平均贡献率达到14.84%,种间平均传粉距离为15.7 m。中国沙棘已确定父本的104个子代均来自于20个父本,其中4个为肋果沙棘,占有父本的20%。说明在中国沙棘与肋果沙棘种间确实存在较高的当代花粉流。张玉娜^[31]通过人工授粉实验也发现,中国沙棘雌株与肋果沙棘雄株可进行杂交并结实。事实上,中国沙棘的雌花花期与肋果沙棘的雄花花期有一定的重叠(11~14 d),为种间花粉流提供了基础。另外,目前普遍认为杂交带的维持是依靠其亲本间不断发生种间基因流以及对杂交个体的各种选择作用之间的平衡^[32, 33]。本研究结果表明,中国沙棘与肋果沙棘之间不断发生的基因流对该区

域棱果沙棘杂交带的维持可能起重要作用。这一研究结果为揭示沙棘杂交带的维持机制提供了证据。

参考文献:

- [1] 黄双全,郭友好. 传粉生物学的研究进展[J]. 科学通报, 2000, 45(3): 225-237.
Huang SQ, Guo YH. Advances in the studies of pollination biology[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2000, 45(3): 225-237.
- [2] 龚燕兵,黄双全. 传粉昆虫行为的研究方法探讨[J]. 生物多样性, 2007, 15(6): 576-583.
Gong YB, Huang SQ. On methodology of foraging behavior of pollinating insects[J]. *Biodiversity Science*, 2007, 15(6): 576-583.
- [3] 朱亚如,龚燕兵. 风媒传粉的研究方法探讨[J]. 生物多样性, 2017, 25(8): 864-873.
Zhu YR, Gong YB. Methods of wind pollination[J]. *Biodiversity Science*, 2017, 25(8): 864-873.
- [4] 张鹏飞,张福花,张茹,刘亚令,王志广. 山西省榛属植物居群的SSR遗传多样性研究[J]. 植物科学学报, 2014, 32(2): 131-138.
Zhang PF, Zhang FH, Zhang R, Liu YL, Wang ZG. Genetic diversity of hazel populations in Shanxi Province based on SSR markers[J]. *Plant Science Journal*, 2014, 32(2): 131-138.
- [5] 魏青永,郭水良,曹同,于晶. 基于ISSR数据探讨卷叶风尾蕨(*Fissidens dubius* P. Beauv.)遗传多样性[J]. 植物科学学报, 2016, 34(2): 238-245.
Wei QY, Guo SL, Cao T, Yu J. Genetic diversity of *Fissidens dubius* P. Beauv. based on ISSR data[J]. *Plant Science Journal*, 2016, 34(2): 238-245.
- [6] Chaix G, Gerber S, Razafimaharo V, Vigner P, Verhaegen D, Hamon S. Gene flow estimation with microsatellites in a Malagasy seed orchard of *Eucalyptus grandis*[J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107(4): 705-712.
- [7] 彭国清,唐绍清. 喀斯特耐阴灌木淡黄金花茶的精细空间遗传结构与基因流[J]. 生态学报, 2017, 37(21): 7313-7323.
Peng GQ, Tang SQ. Fine-scale spatial genetic structure and gene flow of *Camellia flavida*, a shade-tolerant shrub in Karst[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2017, 37(21): 7313-7323.
- [8] 周伟,王红. 基于DNA分子标记的花粉流动态分析[J]. 生物多样性, 2014, 22(1): 97-108.
Zhou W, Wang H. Pollen dispersal analysis using DNA markers[J]. *Biodiversity Science*, 2014, 22(1): 97-108.
- [9] 鲁先文,孙坤,马瑞君,张辉,苏雪,王明理. 鸟类取食中国沙棘果实的方式及其对种子的传播作用[J]. 生态学杂志, 2005, 24(6): 635-638.
Lu XW, Sun K, Ma RJ, Zhang H, Sun X, Wang ML. Fruits foraging patterns and seed dispersal effect of frugivorous birds on *Hippophae rhamnoides* ssp. *sinensis*[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2005, 24(6): 635-638.
- [10] 鲁先文,马瑞君,孙坤. 中国沙棘(*Hippophae rhamnoides* L. ssp. *sinensis* Rousi)的开花特性及风媒传粉距离的检测

- [J]. 生态学报, 2008, 28(6): 2518–2525.
- Lu XW, Ma RJ, Sun K. Determination of the wind pollination distances and flowering characteristics of *Hippophae rhamnoides* L. ssp. *sinensis* Rousi (Elaeagnaceae) [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28(6): 2518–2525.
- [11] 张玉娜, 孙坤, 张辉, 苏雪, 温江波. 肋果沙棘(*Hippophae neurocarpa* S. W. Liu et T. N. He) 自然种群的风媒传粉特征[J]. 生态学报, 2009, 29(1): 508–514.
- Zhang YN, Sun K, Zhang H, Sun X, Wen JB. Characteristics of wind pollination in a natural population of *Hippophae neurocarpa* S. W. Liu et T. N. He (Elaeagnaceae) [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(1): 508–514.
- [12] 鲁先文. 中国沙棘的基因流研究[D]. 兰州: 西北师范大学, 2005.
- [13] 蒋严妃, 严容, 苏雪, 陈纹, 孙坤. 二倍体杂交种棱果沙棘双向杂交起源及其母本主要来源于中国沙棘的分子证据[J]. 植物研究, 2014, 34(1): 32–36.
- Jiang YF, Yan R, Su X, Cheng W, Sun K. Molecular evidence for bidirectional hybrid origin and *Hippophae rhamnoides* ssp. *sinensis* as the mainly maternal plant of the diploid hybrid *H. goniocarpa* (Elaeagnaceae) [J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2014, 34(1): 32–36.
- [14] Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19(1): 11–15.
- [15] Wang A, Qian Z, Wan D, Yang YZ, Liu J. Nine microsatellite DNA primers for *Hippophae rhamnoides* ssp. *sinensis* (Elaeagnaceae) [J]. *Conserv Genet*, 2008, 9(4): 969–971.
- [16] 许汀, 许璐, 王昊, 拉琼, 孙坤, 张文驹. 基于 5'锚定 PCR 法和磁珠富集法的西藏沙棘多态性 SSR 引物开发[J]. 复旦学报(自然科学版), 2014, 53(4): 543–549.
- Xu T, Xu L, Wang H, La Q, Sun K, Zhang WJ. Development of polymorphic microsatellite markers from *Hippophae tibetana* using 5'-anchored PCR methods and magnetic beads hybridization[J]. *Journal of Fudan University (Natural Science)*, 2014, 53(4): 543–549.
- [17] 李霓, 蒋严妃, 苏雪, 陈纹, 张辉, 孙坤. 肋果沙棘北缘居群的遗传多样性与遗传结构[J]. 广西植物, 2016, 36(5): 557–563.
- Li N, Jiang YF, Su X, Cheng W, Zhang H, Sun K. Genetic diversity and genetic structure of the northern margin populations of *Hippophae neurocarpa* [J]. *Guihaia*, 2016, 36(5): 557–563.
- [18] Jones AG, Small CM, Paczolt KA, Rattermanv NL. A practical guide to methods of parentage analysis[J]. *Mol Ecol Resour*, 2010, 10(1): 6–30.
- [19] 张冬梅, 孙佩光, 沈熙环, 茹广欣. 油松种子园自由授粉与控制授粉种子父本分析[J]. 植物生态学报, 2009, 33(2): 302–310.
- Zhang DM, Sun PG, Shen XH, Ru GX. Paternity analysis of open-and control-pollinated seeds collected from a seed orchard of *Pinus tabulaeformis* [J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2009, 33(2): 302–310.
- [20] Culley TM, Weller SG, Sakai AK. The evolution of wind pollination in angiosperms[J]. *Trends Ecol Evol*, 2002, 17(8): 361–369.
- [21] Friedman J, Barrett SCH. Wind of change: new insights on the ecology and evolution of pollination and mating in wind-pollinated plants [J]. *Ann Bot-London*, 2009, 103(9): 1515–1527.
- [22] 王子科, 郭百平, 阎立业. 黄土丘陵区沙棘花粉自然飞散特征研究[J]. 中国水土保持, 1989(4): 23–26.
- Wang ZK, Guo BP, Yan LY. Study on pollen flight characteristics of *Hippophae rhamnoides* in loess hilly region[J]. *Soil and Water Conservation in China*, 1989(4): 23–26.
- [23] 孙亚光, 李火根. 利用 SSR 分子标记对鹅掌楸自由授粉子代的父本分析[J]. 植物学报, 2007, 24(5): 590–596.
- Sun YG, Li HG. The paternity analysis for open-pollination progenies of *Liriodendron* L. using SSR markers[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2007, 24(5): 590–596.
- [24] 林慧, 张明莉, 王鹏鹏, 马森. 外来入侵植物意大利苍耳的传粉生态学特性[J]. 生态学报, 2018, 38(5): 1810–1816.
- Lin H, Zhang ML, Wang PP, Ma M. Study on pollination biology of the invasive plant *Xanthium italicum* Moretti [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2018, 38(5): 1810–1816.
- [25] Streiff R, Ducousso A, Lexer C, Steinkellner H, Gloess J, Kremer A. Pollen dispersal inferred from paternity analysis in a mixed oak stand of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl. [J]. *Mol Ecol*, 1999, 8(5): 831–841.
- [26] 张强, 张杰, 孙国武, 狄潇泓. 祁连山山区空中水汽分布特征研究[J]. 气象学报, 2007, 65(4): 633–643.
- Zhang Q, Zhang J, Sun GW, Di XH. Research on atmospheric water-vapor distribution over Qilianshan mountains [J]. *Acta Meteorologica Sinica*, 2007, 65(4): 633–643.
- [27] Robledo-Arnuncio JJ. Wind pollination over mesoscale distances: an investigation with Scots pine [J]. *New Phytol*, 2015, 190(1): 222–233.
- [28] Sun K, Ma RJ, Chen XL, Li CB, Ge S. Hybrid origin of the diploid species *Hippophae goniocarpa* evidenced by the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear rDNA [J]. *Belg J Bot*, 2003, 136(1): 91–96.
- [29] Wang A, Frank S, Liu J. Molecular evidence for double maternal origins of the diploid hybrid *Hippophae goniocarpa* (Elaeagnaceae) [J]. *Bot J Linn Soc*, 2008, 156(1): 111–118.
- [30] 张辉. 棱果沙棘的同倍体杂交起源: 来自叶绿体基因组和核基因组的证据[D]. 兰州: 西北师范大学, 2005.
- [31] 张玉娜. 沙棘属植物自然杂交带的生殖隔离状况的研究[D]. 兰州: 西北师范大学, 2009.
- [32] 王玉国. 自然杂交与物种形成[J]. 生物多样性, 2017, 25(6): 565–576.
- Wang YG. Natural hybridization and speciation [J]. *Biodiversity Science*, 2017, 25(6): 565–576.
- [33] Rieseberg LH, Baird SJE, Gardner KA. Hybridization, introgression, and linkage evolution [J]. *Plant Mol Biol*, 2000, 42(1): 205–224.