

基于DNA分子标记的花粉流动态分析

周伟^{1,2} 王红^{1*}

1 (中国科学院昆明植物研究所生物多样性与生物地理学重点实验室, 昆明 650204)

2 (中国科学院昆明植物研究所中国西南野生生物种质资源库, 昆明 650204)

摘要: 花粉介导的基因流是植物有性繁殖世代之间的桥梁, 花粉散布属性是植物繁殖生态学、保护生物学和进化生物学研究关注的焦点。随着DNA分子技术的发展, 花粉流分析所使用的分子标记(尤其是微卫星标记)逐步替代了早期物理标记, 基于最大似然法估计以及新兴的基于贝叶斯推断的父本指派算法的发展, 能有效地估计花粉流散布的方向、距离和强度等重要特征。花粉散布曲线由单一参数向多参数模型发展, 以更好地获得花粉散布特征的拟合效果, 双组分的复合模型利用相互独立的参数空间使得散布曲线在长距离和短距离形状上呈现更大的可塑性。这些革新的技术和方法被成功应用于植物性别表型、隔离种群和杂交物种间花粉流分析, 以探讨进化、生态和保护等多领域的基础理论问题。近年来, 高通量测序技术的发展将进一步加快以分子标记为基础的花粉流动态分析在更广泛的植物类群中运用。

关键词: 分子标记, 基因流, 花粉散布, 亲本分析, 父本指派, 散布曲线, 高通量测序

Pollen dispersal analysis using DNA markers

Wei Zhou^{1,2}, Hong Wang^{1*}

1 Key Laboratory of Biodiversity and Biogeography, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204

2 Germplasm Bank of Wild Species in Southwest China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204

Abstract: Modes of pollen dispersal are important for plant ecology, conservation, and evolutionary biology as pollen-mediated gene flow connects one generation of sexually-reproducing plants to the next. With the development of DNA molecular techniques, molecular markers (especially microsatellite markers) have replaced traditional physical markers for pollen flow analysis. Methods of paternity assignment with maximum likelihood and Bayesian inference have greatly improved the estimation of pollen flow characteristics with regard to direction, distance, and strength. Pollen dispersal curves have been characterized by single parameter, two-parameter, multi-parameter, and two-component composite models to better evaluate the shape of dispersal distributions. These innovative techniques and methods have been successfully applied to assess pollination patterns in studies of plant sexual polymorphism, population connectivity, and natural hybridization, which, in turn, have provided important insights into basic theories of evolution, ecology, and conservation. In the coming years, high-throughput sequencing technologies are expected to accelerate the application of molecular marker-based pollen flow analysis across a wide range of plant taxa.

Key words: molecular marker, gene flow, pollen dispersal, parentage analysis, paternity assignment, dispersal kernel, next-generation sequencing

1859年达尔文发表《物种起源》, 人类科学史上从此新增了一个无比奥秘的命题: 演化。20世纪50年代以来, DNA分子技术的革新不断深化着人们

对物种演化的认识。尽管如此, 无论在宏观还是微观领域物种演化机制的诸多方面仍然存在许多未解之谜。

收稿日期: 2013-06-06; 接受日期: 2013-10-09

基金项目: 国家青年科学基金(31200289)、中国科学院重点部署项目(KSZD-EW-Z-011)和云南省应用基础研究计划项目(2012FB182)

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: wanghong@mail.kib.ac.cn

在植物有性繁殖过程中，配子体介导的基因流是衔接世代间的桥梁，雌/雄配子体的运动结合属性在自然选择的作用下决定着基因延续的命运。由于植物营固着生长，雌配子体的空间移动能力受限，它只能通过其附属结构的亲和性及有限的运动(Li *et al.*, 2001)，被动地选择到访的异性配子体；相反，携带雄配子体的植物花粉能够利用各种媒介，如风力、水力和动物等，展现非凡的散布能力(Lexer *et al.*, 2000; Rahmé *et al.*, 2009)。雌、雄配子体迁移能力极端不对称分化，使花粉散布属性的研究变得极其重要，并使之成为探讨植物繁殖、适应和演化等问题的关键。

基于分子标记的植物亲本分析(parentage analysis)通常以半同胞系子代为取样对象，根据遗传数据推断各自的父本来源，以此研究花粉介导的基因流动过程和式样(He & Ge, 2001)。与传统人工授粉实验相比，亲本分析不仅能获得繁育系统的基本参数，同时可以推断影响繁殖成功的各种潜在因素，如种群密度和空间分布格局、生理异熟及亲和性、花部构造与传粉者互动、杂交以及外来花粉流等，以此描绘群体水平上植物交配的网络格局。本文试图对以分子标记为基础的植物亲本分析研究模式进行初步的总结，着重于父本分析方法和各种花粉散布模型比较。首先，回顾花粉散布标记研究的历史，分析以分子标记开展花粉流研究的突出优势，以及各种父本推断算法及其适用性，比较了常见的花粉散布模型特征；然后从性别表型、隔离种群和杂交物种三个层次综述基于亲本分析方法开展的交配系统研究的最新进展，分析当前亲本分析方法的应用瓶颈及其局限性，以及测序技术的发展可能带来的新契机。

1 从物理标记到分子标记

花粉散布的跟踪技术可以划分为早期的物理标记和当前的遗传标记。物理标记的方法通常是用已知花粉供体检测可能的受体；分子标记的方法则是根据已知花粉受体推断花粉供体(图1)。

物理标记是间接推断花粉转移路径的技术，一般是通过追踪传粉者或者花粉模拟物的运动轨迹来实现。例如，对传粉者进行捕获-标记-重捕获实验，由此粗略推断传粉者介导的花粉散布模式(Levin *et al.*, 1971; Parra *et al.*, 1993; Walther-

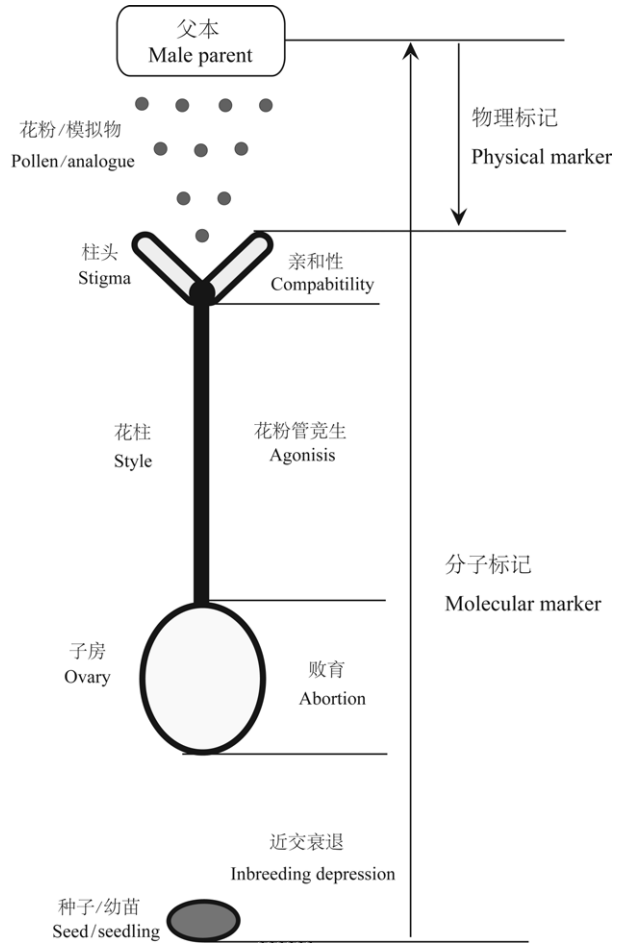


图1 花粉散布轨迹的正向物理跟踪标记和反向遗传回溯标记
Fig. 1 The forward physical and backward genetic marker for pollen dispersal analysis

Hellwig & Frankl, 2000), 该方法精确度低且不适用于传粉者泛化的植物类群花粉散布研究。近年，实时追踪的微型雷达发射器被用于传粉者标记(Pasquet *et al.*, 2008; Hadley & Betts, 2009), 该方法能够很好地估测传粉距离上限。例如, Pasquet等(2008)利用该技术跟踪木蜂(*Xylocopa flavorufa*)长距离传粉行为, 评估转基因豇豆中抗虫基因随花粉散布而发生逃逸的潜在可能; Wikelski等(2010)使用类似的方法跟踪雄性长舌花蜂(*Exaerete frontalis*), 探讨其长距离觅食习性对低密度的兰花繁殖成功的影响。对于鸟类和蝙蝠而言, 背负轻巧的无线发射装置对飞行距离的实际影响较小; 但对于蜂类等自重较小的传粉者而言, 这种方法仍可能低估实际传粉距离。传粉者标记侧重于散布距离的间接估测, 而花粉标记则能够获得实际散布距离。例如, Nils-

son等(1992)曾使用微型标签标记了马达加斯加船形兰(*Aerangis ellisii*)花粉块, 通过排查邻近个体柱头上标记的花粉块落置情况来推断天蛾的传粉模式。显然, 这种花粉标记的方法仅限于在具备较大花粉团的植物中使用(Huang & Guo, 2000)。因此, 相对折中的方法是使用荧光着色的粉末模拟花粉, 将体积相仿的荧光粉末布置于花药上, 在不同距离区间的柱头上检测荧光粉末落置情况从而间接推断花粉转移路线。此方法不仅适用于虫媒植物(Townsend & Levey, 2005; Van Rossum, 2009), 更被广泛使用于风媒植物(Castillo *et al.*, 2002; Adler & Irwin, 2006; Baena-Diaz *et al.*, 2012)。现有的研究表明, 荧光标记方法能够基本反映花粉散布的总体特征(Campbell, 1991; Van Rossum *et al.*, 2011), 但是针对不同的传粉者和植物类群, 其准确性和可靠度难以估测。例如, 在以熊蜂为传粉媒介的情况下, 荧光标记方法可能高估花粉的实际散布距离(Thomson *et al.*, 1986), 而在蜜蜂传粉植物中则可能低估花粉落置比率(Adler & Irwin, 2006)。相对传粉者标记而言, 荧光标记具有更广的适用性且足以开展一些定量研究, 但是灵敏度低和信号衰减快等缺陷使其难以在种群水平上真实反映花粉散布的整体状况。

物理标记采用正向追踪方法只能反映交配前花粉散布的特性, 无法提供花粉落置后受精(如亲和性排斥, 花粉管竞争)和发育(近交衰退)等影响雄性现实繁殖成功的信息; 相反, 遗传标记以代表繁殖成功的子代(种子或幼苗)为对象, 通过反向回溯父本的方法推断种群内有效花粉流的散布模式。近十年来, 分子标记技术的不断发展使得花粉流研究逐步由反向回溯的方法替代传统的物理标记方法。直到21世纪初, 大部分基于分子标记的父本分析都采用等位酶方法(Wang, 2004; Dunphy & Hamrick, 2005, 2007; O'Connell *et al.*, 2006; Fuchs & Hamrick, 2011)。尽管在早期也有少数父本回溯分析采用RAPD(random amplified polymorphic DNA)和AFLP(amplified fragment length polymorphism)等分子标记, 但其多态性及可重复性存在一定的局限性(Lewis & Snow, 1992)。值得注意的是, 近年的研究表明, 共显性的微卫星(SSR)标记在各种父本指派分析中已经占据主导, 并且在较长一段时期仍将保持这种趋势(Ashley, 2010; Leonarduzzi *et al.*, 2012)。

显然, 这得益于微卫星标记多方面的突出优势: 首先, 微卫星位点在植物基因组中广泛分布, 对于任意物种通常都能够获得足够的非连锁位点用于遗传分析; 其次, 位于非编码区的微卫星位点重复单元呈现高度多态性, 而共显性和近中性的遗传特征尤其适合于植物交配系统的分析; 另外, 微卫星良好的近缘种间转移性是标记被广泛使用的又一个重要原因。目前, 来源于核基因组的微卫星是最常用于花粉流分析的分子标记(Ashley, 2010; Leonarduzzi *et al.*, 2012)。当然, 也有一些研究采用核基因组和叶绿体基因组微卫星相结合的标记方法(Robledo-Arnuncio & Gil, 2005; Geng *et al.*, 2008)。对于叶绿体父系遗传的植物类群而言, 这种方法能够更加有效地提高父本推断的准确率。仅有少数的亲本分析研究单独采用叶绿体微卫星标记(Wang *et al.*, 2010)。

2 分子标记的花粉流分析

2.1 父本推断方法

共显性分子标记(如核基因微卫星标记)用于父本推断的依据是每个子代与其真实双亲之间在任一位点上共享一个等位基因。然而, 从交配群体的取样覆盖度到PCR扩增、基因分型以及分子片段长度度量等环节存在的实验误差, 都可能导致错误指派。因此, 减少各类误差对指派效率的干扰, 是父本推断算法从最初的排除法(exclusion)到最大似然法(maximum likelihood)以及贝叶斯法不断改进的动力。

排除法是所有父本分析中最基本和最简洁的方法。它根据孟德尔遗传法则, 将子代(母本已知)基因型逐一与候选父本群体比对, 最终锁定每个特定子代的唯一父本(Chakraborty *et al.*, 1974)。假定一个二倍体子代在第一个位点上的基因型为AB, 其已知母本基因型为AC, 则在候选父本中首先剔除所有不含等位基因B的个体。如果剩余的个体(B-)作为真实父本并非唯一, 则借助其他位点继续排除直到获得唯一父本。理论上, 当微卫星标记多态性较高且候选父本群体较小的时候, 排除法能够获得理想结果。但是该方法在实际使用中具有一定缺陷, 尤其是当标记位点偏离孟德尔遗传分离比例时, 例如在雄配子体形成阶段所发生的突变可能导致真实父本被错误排除(Eckert & Hile, 2009)。对于微卫星

标记而言, 这种风险不容忽视, 毕竟标记的多态性越高, 意味着微卫星单元重复次数发生突变的概率越大(Ellegren, 2004)。同样, 当突变发生在引物设计区域时会致使哑等位基因发生, 此时一个杂合的位点却表现为纯合状态(Dakin & Avise, 2004), 那么真实父本将有50%的概率被错误地排除。相对于突变事件, 实验过程中非自然的基因分型误差在敏感的排除分析法下对分析结果的影响更大(Hoffman & Amos, 2005)。因此, 在实际排除分析过程中都会适当地允许子代和父本之间存在少量(1-2)位点错配, 以减小突变和分型误差造成的影响, 但前提是需要承担非真实父本被错误保留的风险。

显然, 当研究群体较大且微卫星多态性不够高时, 排除法只能缩小候选父本群体而不能将所有子代花粉供体指派到一个特定个体。因此, 如何从潜在父本群体中寻找最可能的父本, 是多数亲本分析所面临的共同问题。基于最大似然法的父本指派提供了一个解决方案。该方法是由 Meagher 和 Thompson(1986)提出的亲本指派的似然模型发展而来。对于一个特定微卫星位点, 假定基因型为 g_o 的一个子代, 其已知母本基因型为 g_m , 那么对于一个基因型为 g_f 的候选父本可能为真实父本的似然值可以表示为:

$$L(H_1, H_2 | g_m, g_f, g_o) = \frac{T(g_o | g_m, g_f)P(g_m)P(g_f)}{T(g_o | g_m)P(g_m)P(g_f)}$$

$$= \frac{T(g_o | g_m, g_f)}{T(g_o | g_m)} \quad (\text{公式 1})$$

其中, $T(g_o | g_m, g_f)$ 表示假定已知基因型的现实母本与被检测的潜在父本交配, 获得当前特定基因型子代的孟德尔转移概率, $T(g_o | g_m)$ 表示该基因型母本随机交配获得当前子代基因型的概率。按照上述方法分别计算各个独立微卫星位点的似然值 $L(x)$ 并求积, 便是联合似然值(公式2, n 表示SSR位点数目)。通常将联合似然值转换成对数似然值, 并命名为LOD(log-odds ratio):

$$\text{LOD} = \ln \prod_{x=1}^n L(x) = \sum_{x=1}^n \ln L(x) \quad (\text{公式 2})$$

对候选父本逐一计算LOD值, 其中LOD值最大的个体被指定为最可能的父本, 这种方法即为绝对指派(categorical allocation)(Marshall *et al.*, 1998; Gerber *et al.*, 2000)。相对排除法而言, 基于最大似然的绝对指派能够很好地克服基因分型误差和突

变可能导致的错误指派, 因此该方法被广泛应用于花粉供体分析。

尽管如此, 因为最大似然法提供的只是一系列潜在父本作为真实父本的不同可能性, 而绝对指派将LOD值最大的个体认定为真实父本, 显然具有一定风险。为此, 一些学者提出了相对指派(fractional allocation)的概念。其原理是根据似然值或贝叶斯后验概率(posterior probability), 以不同的比率将多个个体同时指定为一个特定子代的父本(Nielsen *et al.*, 2001; Hadfield *et al.*, 2006)。显然, 任何一个子代都只有一个唯一的父本, 只有针对特定问题(如探索群体中特定的性状而非个体对繁殖适合度的贡献), 相对指派的结果才能被赋予恰当的生物学意义, 因此它在实际应用中并不常见。

尽管最常用的父本指派大多基于最大似然法(如Cervus和COLONY等软件), 但该方法依然受到多方面的质疑(Nielsen *et al.*, 2001)。首先, 当多个潜在父本同时具有相近的联合似然值时, 如何在有效的置信水平上确定似然值相对较高的个体为真实父本? 通常的做法是以两个最高的似然值比构建一个新的统计量 Δ , 同时以繁殖种群内的基因频率模拟足够交配事件获得 Δ 分布, 以此确定似然值差异显著与否的临界值(Marshall *et al.*, 1998)。该方法的不足在于仅考虑两个似然值最大的个体作为特定子代的竞争父本, 而忽略了其他所有个体的信息, 因此可能导致父本与子代间错误匹配。其次, 对于一个特定子代而言, 最大似然法隐式假定研究种群内所有可育个体作为其潜在父本的概率均等(Marshall *et al.*, 1998)。当缺乏任何额外的交配信息时, 对于交配事件采用均匀的先验分布当然是最稳妥的做法。然而, 许多植物种群内交配网络并不匀称(如性别表型多态植物), 在多种强度不对称的交配策略共存的情况下, 均匀的先验分布假设可能会导致指派结果的有偏估计(Adams *et al.*, 1992; Neff *et al.*, 2001)。例如, 近期我们对二型花柱植物滇丁香(*Luculia pinceana*)的指派分析表明, 在交配模式中占优势地位的非选型交配(disassortative mating)事件发生的频率被低估, 而选型交配(assortative mating)事件则被高估(未发表数据)。可见, 将直接影响交配事件先验信息(prior information)(如地理邻接度、繁殖性状及交配模式等数据)结合到基因型数据中进行联合分析, 无疑能有效提高父本指派的

可靠性和精确度(Neff *et al.*, 2001; Hadfield *et al.*, 2006)。因此, 近年来一些学者提出了多种基于贝叶斯推断的方法(Nielsen *et al.*, 2001; Hadfield *et al.*, 2006; Christie *et al.*, 2013), 并提供诸如PATRI、MasterBayes和SOLOMON等基于R平台的程序包(<http://www.r-project.org/>)。这些方法不仅能够充分利用非遗传的生态数据, 同时以父本错误匹配的后验概率替代似然法中常被诟病的 Δ 统计量作为参数的点估计。目前, 贝叶斯框架下的亲本分析方法大多由动物生态学领域的研究者提出, 其目的是结合各种影响雄性繁殖成功的因素(如领地、发情期和年龄等)获得最优父本指派结果, 它在植物父本推断中的应用仍有待进一步完善。

2.2 花粉散布特征

无论基于上述何种方法的花粉供体推断, 其最终获得的结果都是一套不同置信度的父本-子代系列(paternity-progeny array)。结合研究样地内个体的空间分布数据, 父本-子代系列可转化为由多个独立交配事件构成的花粉散布距离矩阵, 它代表了研究物种所处的特定自然种群内花粉散布网络的抽样。少数特殊的研究系统直接从距离矩阵中读取传粉信息, 如Ahmed等(2009)利用距离矩阵将榕小蜂(*Ceratosolen arabicus*)的花粉传送距离上限精确到160 km。通常, 从交配事件的样本信息推断总体花粉散布特征, 最有效的方法是构建花粉散布模型(Adams *et al.*, 1992)。假定 x 和 y 表示花粉受体(母本)坐标, 以花粉供体(父本)位置为原点, 则 $\sqrt{(x^2+y^2)}$ 代表花粉散布距离, 以此构建的常见花粉散布模型主要有单参数、双参数和多参数3类(图2)。

单参数花粉散布模型主要有常态分布模型(方程1)和指数分布模型(方程2)。在常态散布曲线方程中, 其中的唯一参数为 $a = \sigma\sqrt{2}$, σ 表示正态分布标准差。常态散布方程在计算上具有便利的优势, 通常作为基准的散布曲线用于数据的探索性分析和比较, 事实上, 很多父本指派的数据(Dick *et al.*, 2003)表明, 其薄尾(thin-tailed)特征有时并不能很好地刻画自然种群中花粉的散布规律。相比之下, 指数分布具有尖峰特征且尾部分布更厚(Lexer *et al.*, 2000)。

$$f_{nor}(a; x, y) = \frac{1}{\pi a^2} \exp \left[-\left(\frac{\sqrt{x^2+y^2}}{a} \right)^2 \right] \quad (\text{方程 1})$$

$$f_{exp}(a; x, y) = \frac{1}{2\pi a^2} \exp \left[-\left(\frac{\sqrt{x^2+y^2}}{a} \right) \right] \quad (\text{方程 2})$$

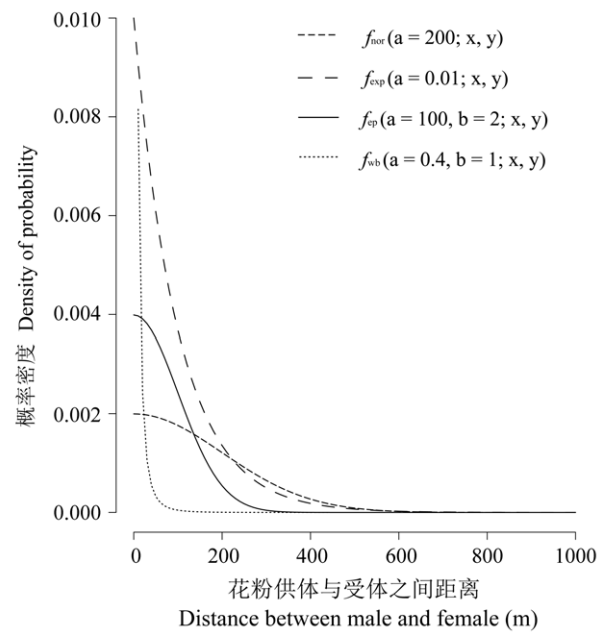


图2 4种常用模型代表的花粉散布曲线及其尾部特征。单参数: 常态分布模型, 指数分布模型; 双参数: 指数幂分布模型, 韦伯分布模型。

Fig. 2 Example of curves and the characters of tail for the different pollen dispersal models. Single parameter: normal distribution model, exponential distribution model; Two parameters: exponential power distribution model and Weibull distribution model.

指数幂分布模型是Clark(1998)最早用于拟合种子散布的双参数模型, 由于它灵活多变的形状, 后来被广泛应用于花粉散布曲线拟合(Austerlitz *et al.*, 2004; Oddou-Muratorio *et al.*, 2005; Robledo-Arnuncio *et al.*, 2006, 2007)。在指数幂分布中(方程3), Γ 为典型定义的伽马函数(Abramowitz & Stegun, 1964), a 和 b 分别为尺度和形状参数, 它决定着花粉散布曲线尾部的厚薄特征。实际上, 常态分布和指数分布分别是 b 等于1和2时的指数幂分布特例, 当 $b < 1$ 时, 散布曲线呈现比指数分布更明显的厚尾特征, 尤其适合于模拟长距离花粉散布事件(Dick *et al.*, 2003)。另外, 还有一些不常用的两参数花粉分布模型, 如韦伯分布(方程4)(Ottewell *et al.*, 2012), 几何分布(Austerlitz *et al.*, 2012)和双变量的 t 分布(Austerlitz *et al.*, 2004; Byrne *et al.*, 2008)。

$$f_{ep}(a, b; x, y) = \frac{b}{2\pi a^2 \Gamma(2/b)} \exp \left[-\left(\frac{\sqrt{x^2+y^2}}{a} \right)^b \right] \quad (\text{方程 3})$$

$$f_{wb}(a, b; x, y) = \frac{a^{-b}b}{2\pi} \left(\frac{\sqrt{x^2+y^2}}{a} \right)^{b-2} \exp \left[- \left(\frac{\sqrt{x^2+y^2}}{a} \right)^b \right] \quad (\text{方程 4})$$

对于多数风媒植物而言, 绝大部分花粉只受局部气流的影响, 因而其散布密度在较短距离内呈快速衰减趋势(Robledo-Arnuncio & Gil, 2005; Baena-Diaz *et al.*, 2012), 在模型选择时必然应首先考虑能否准确拟合短距离的花粉散布曲线。然而, 少部分花粉由于上升气流影响而被带到一个不相称的距离之外, 这些长距离传播的花粉可能在维系片断化和隔离种群间的基因流通方面起到重要作用(Robledo-Arnuncio, 2011)。但是, 上述模型由于参数限制, 有时并不能同时兼顾长、短两种距离的花粉流特征(Slavov *et al.*, 2009), 由此发展出一些多参数复合模型(方程5和方程6)。这些模型的共同特点是将整体花粉流拆分为长距离和短距离(β 和 $1-\beta$)两个组分, 利用各组分内部相互独立的参数空间, 使得整体花粉散布曲线形状呈现更大的可塑性。例如, Goto等(2006)使用多种模型对雌雄异株的风媒植物 *Fraxinus mandshurica* var. *japonica* 花粉散布比较发现, 复合的正态分布模型(三参数: $a_1 = \sigma_1\sqrt{2}$, $a_2 = \sigma_2\sqrt{2}$, β)产生最优的拟合。Geng等(2008)同样使用复合的正态模型对虫媒植物秋茄(*Kandelia candel*)进行的研究表明, 在高密度种群内, 昆虫介导的花粉散布事件有72%以上都发生在50 m范围之内。另外, Niggemann等(2012)使用了包含5个参数的复合指数幂分布模型(方程6)对杨属植物 *Populus nigra* 的花粉散布进行了比较分析。值得注意的是, 参数数量增加并不能保证更加准确地拟合花粉散布曲线, 只有在较多的交配事件下才能获得相对可靠的参数估计。

$$f(a_1, a_2, \beta; x, y) = \beta \times f_{nor,1}(a_1; x, y) + (1 - \beta) \times f_{nor,2}(a_2; x, y) \quad (\text{方程 5})$$

$$f(a_1, b_1, a_2, b_2, \beta; x, y) = \beta \times f_{ep,1}(a_1, b_1; x, y) + (1 - \beta) \times f_{ep,2}(a_2, b_2; x, y) \quad (\text{方程 6})$$

3 基于分子标记的亲本分析应用

随着分子标记技术的推广和算法不断优化, 基于亲本分析的方法应用于包括生态、进化和保护等多个领域的花粉流过程和式样研究。早期的研究多

数以相对隔离的单一一种群为对象, 主要探讨传粉媒介、种群密度以及空间分布式样对花粉散布属性的影响。近年来, 隔离种群间的花粉流研究也汇聚了大量亲本分析(Bacles & Ennos, 2008; Craft & Ashley, 2010; Kamm *et al.*, 2010; Lander *et al.*, 2010), 主要探讨生境破碎和片断化对基因流的阻隔。当然, 在种内性别表型间和杂交物种间开展花粉流和交配模式的研究尤其值得关注(图3)。

一般认为, 种群内表型比例的维持主要是非选型交配引起的频度依赖选择的作用(Barrett, 2010), 而亲本分析方法则更加清晰地描绘出表型多态物种的繁殖交配格局(Field & Barrett, 2012)。例如, 针对表型比例平衡的胡桃楸(*Juglans mandshurica*) (Bai *et al.*, 2007)和色木槭(*Acer mono*) (Kikuchi *et al.*, 2009)的分析均表明, 种群内非选型交配频率显著高于选型交配。然而, 在表型比例不平衡的日本胡桃(*J. ailantifolia*)种群内父本指派分析则发现, 特定母本发生选型交配的频度取决于附近异型植株的密度(Kimura *et al.*, 2012)。最近, Shang等(2012)的研究则进一步表明, 非选型交配是色木槭种群内多态性维持的主要动力, 而不均衡的表型比例可能与同型交配事件相关。到目前为止, 通过亲本分析的方法, 以性别表型多态的雌雄异熟(Gleiser *et al.*, 2008a, b)和异型花柱(Ishihama *et al.*, 2006; Kitamoto *et al.*, 2006, 2008; Hodgins & Barrett, 2008)为代表类群的研究表明, 无论在风媒或虫媒条件下, 性别表型间和表型内的非随机交配特征直接决定可遗传的多态表型在种群内的特异分布。这些结果为深入了解性比结构的发生及其维持提供了重要线索。然而, 交配网络内各表型间雄性繁殖成功分化大都归因于开花物候、繁育器官形态和配子体亲和性等决定的适合度分异, 而遗传因素导致的配子体阶段竞争效应则没有引起足够的重视。近来, 研究者首先通过人工授粉方法分别获得近交和远交起源的白花蝇子草(*Silene latifolia*)亲本, 随后对自然传粉条件下产生的子代进行父本回溯, 结果表明不同遗传来源的个体的雄性繁殖力存在显著差异(Austerlitz *et al.*, 2012)。

可见, 通过控制花粉来源并利用多态的性系统, 亲本分析方法能够定量检测各种遗传因素对雄性繁殖成功的影响, 且同样适用于雌性功能的检验, 尽管目前还没有相关报道。显然, 表型间花粉

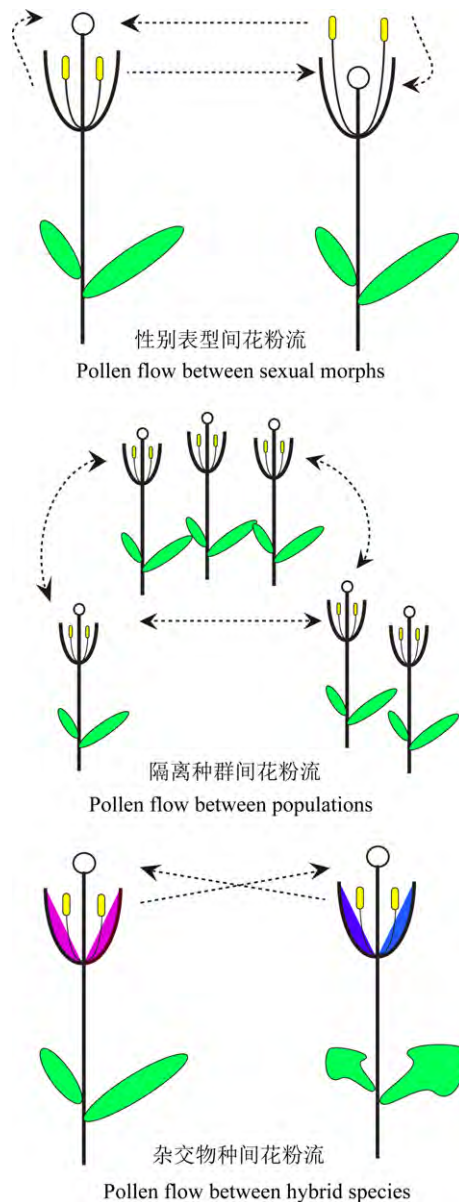


图3 3个层次的花粉流研究: 性别表型间花粉流, 隔离种群间花粉流和杂交物种间花粉流

Fig. 3 The pollen flow analysis at three levels: pollen flow between sexual morphs, between populations, and between hybrid species

流的研究大多集中于个体内雌雄功能相对隔离的物种(如雌雄异熟、异位), 而对于两性功能呈现个体间隔离配置的物种(如雌雄异株、雌全异株等)则有待更为广泛的研究(Austerlitz *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012), 后者将为深入理解植物性别分化可塑性、繁殖资源配置以及性系统演化途径等关键问题提供新的视野(Barrett, 2010; Spigler & Ashman, 2012)。尤

其值得注意的是, Rymer等(2010)将亲本分析方法应用于非性别相关的表型间花粉流研究, 探讨了传粉者介导下的歧化选择是否导致同域物种形成。

除了能够推断种内花粉流的大小和方向外, 基于分子标记的亲本分析还能够用于检测种间杂交花粉流, 从而精确推断自然杂交事件(Valbuena-Carabana *et al.*, 2005)。通常, 过渡性状个体是发掘自然杂交事件的重要线索, 但当杂种频度较低时, 这种形态预测的方法可能遗漏众多的杂交事件。相反, 亲本分析的方法即使在缺乏形态信息的条件下仍然可以检测到低频度的种间杂交(Burgarella *et al.*, 2009), 尤其在同域分布的多个近缘物种间存在复杂的杂交网络时, 这一方法可得到很好的应用(Curtu *et al.*, 2007, 2009; Penaloza-Ramirez *et al.*, 2010; Lepais & Gerber, 2011)。另外, 亲本分析方法应用于形态特征可塑性较大的物种间杂交检测时, 优势尤其明显, 例如, Craft等(2002)采用亲本分析方法估算栎属*Quercus lobata*和*Q. douglasii*杂交频率后指出, 形态聚类的方法极有可能高估杂交频率。在确证物种间存在杂交基因流的同时, 多数研究都表明, 由花粉介导的基因流在杂交物种间呈现不对称的基因渐渗(Pospiskova & Salkova, 2006; Salvini *et al.*, 2009; Abraham *et al.*, 2011)。利用高多态性的标记或者人工控制授粉的方法, 能够定量检测物种间杂交渐渗强度的分化及其潜在影响因素(Rahmé *et al.*, 2009)。另外, 驯化植物与其野生近缘种之间的杂交事件非常普遍。近年来, 携带各种特殊抗性的转基因作物释放所带来的潜在生态风险, 使得人们开始重新审视花粉介导的基因流可能引起的转基因逃逸危险, 而亲本分析方法精确的杂交回溯能力使其在这一领域的应用备受青睐(Pons *et al.*, 2011; DiFazio *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2012)。

4 测序技术更新带来的契机

近年来, 二代测序(next-generation sequencing, NGS)技术的发展与成熟为植物交配网络研究带来了新的契机。在以微卫星为主流标记的现状下, 二代测序技术将促使位点的分离走出传统测序条件下高成本低效率的困境(Karron *et al.*, 2012; Zalapa *et al.*, 2012), 而单核苷酸多态位点(SNPs)可能在二代测序技术的背景下成为未来亲本分析研究的首选标记。

目前,应用于微卫星位点分离的二代测序平台主要是Riche 454 和Illumina测序。Riche 454平台测序读长(约400 bp)使它在微卫星引物开发中占据明显的优势。该长度范围的序列无需拼接加工即可有宽裕的侧翼长度用于引物设计。然而, Illumina平台的读长(50–100 bp)只有在经过比对和组装后方可用于引物设计,但其优势在于单位碱基的测序成本更低(约为454平台的1/50)。由于二代测序技术可生成大量的微卫星备选位点,为后期筛选高质量的可用位点提供了更多的选择空间。这主要体现在以下几个方面:(1)短片段类型和高频度的微卫星重复意味着更高的突变频率(Kelkar *et al.*, 2008),例如,两核苷酸重复类型的变异率依次大于三核苷酸和四核苷酸(Cavagnaro *et al.*, 2010)。二代测序的技术方案允许研究者选择特定的重复单元类型和重复频度以最大程度地获得高多态性位点,而这在传统测序方法中则完全受限于富集探针的类型。(2)利用二代测序数据进行多序列比对的优势在于可以尽可能选择单拷贝或低拷贝位点,从而避免了在多拷贝区域设计微卫星位点(Zhu *et al.*, 2012)。多拷贝现象普遍存在于传统测序方法的引物开发中,它体现为二倍体物种在PCR扩增过程中形成多个信号强度相当的条带(副带或杂带),尽管这种情况可以通过优化PCR扩增条件(如提高退火温度)适当减少,但是它会折损扩增效率,尤其是采用荧光基团标记的基因分型时,会产生更多的数据缺失。(3)位于基因编码区的微卫星可能与基因表达调控相关,因此,利用转录组测序数据很可能会捕获到与植物特定功能和性状相关的微卫星位点,这将为后续的遗传学研究提供契机(Li *et al.*, 2002)。当然,蛋白质编码区突变率较低,相对非编码区序列,其微卫星数量和多态性必然更低。

单核苷酸多态性(SNP)是植物基因组中分布最广的另一类共显性遗传标记。相对多等位基因的微卫星标记而言, SNP位点一般只包含2个等位基因,其杂合度通常都不超过0.5。可见, SNP标记要达到与微卫星标记相当的指派效率,必然需要更多的位点作为补偿。理论上,过多的位点必将导致内部的连锁从而影响位点间信息的独立性。那么,在多大范围内指派效率能够随位点数目增加而有效递增?上述种种疑虑导致SNP标记在亲本分析中没有得到广泛应用。为此, Anderson和Garza(2006)使用模

拟的数据对上述问题开展理论分析,结果证实即使在极大的种群中(>1,000), SNP标记在家系重建中仍然有出色的表现。事实上,除了模式植物或少数具有基因组信息的类群外,利用传统测序法分离足够数量的SNP位点通常比微卫星成本更高,这成为SNP标记长期被搁置的另一原因。近年来,基于二代测序的简易基因组扫描技术(如RAD-seq、GBS等方法)的发展,使得大量SNP位点在非模式物种中唾手可得(Baird *et al.*, 2008; Davey *et al.*, 2011; Seeb *et al.*, 2011),高通量的位点分离技术为充分挖掘SNP标记在亲本分析中的潜在应用价值铺平了道路,于是SNP标记又重新受到众多研究者的关注。Tokarska等(2009)和Hauser等(2011)分别比较了微卫星和SNP标记在亲本分析中的指派功效,结果一致表明,足量的SNP位点的成功指派率远远超过微卫星标记。正如多数研究者所断言,在亲本分析领域,即使微卫星时代不会马上结束, SNP标记也终将占据主导。

5 结语

对于多数植物类群而言,在合理的实验设计下,借助分子标记的亲本分析方法能够将交配系统参数从定性说明提升为定量分析,尤其对于一些特殊传粉系统(如水媒等),该方法具有明显的优势。但是我们仍需强调:即使是当前被广泛使用的共显性微卫星标记,依然存在多方面的局限性。

首先,在多倍体物种中,由于等位基因数目和微卫星位点的遗传方式的不确定性,使得基于标记的父本指派分析缺乏充分的理论依据。到目前为止,只有少数高度二倍化的古多倍体有过相关研究,如八倍体草莓(*Fragaria virginiana*),该物种部分微卫星位点被确证为共显性的二倍化标记(Ashley *et al.*, 2003)。

其次,对于遗传多样性很低的种群,如经历长期隔离、瓶颈效应以及奠基者种群,即使采用微卫星标记也难以捕获足够的信息位点开展有效的亲本分析研究,近来我们对高度濒危物种巧家五针松(*Pinus squamata*)的相关工作即证实了这点(未发表数据)。另外,由于技术限制,当前几乎所有分子标记研究都采用孢子体组织作为基因分型材料,而此类数据只有在少数精巧的实验设计下(Austerlitz *et al.*, 2012)才能用于探讨配子体阶段的繁殖竞争问

题。因此, 分子标记方法如果要被更广泛地用于探讨合子前繁殖成功问题, 有待于配子体基因型检测技术的进一步发展(Hasegawa *et al.*, 2009)。

最后, 由于分子标记的区分度只能达到个体水平, 无法涉足个体内或无性系克隆内部的有性生殖问题研究。例如, 在多花植物中的自花授粉和同株异花授粉, 就传粉媒介的生态功能而言两者具有显著差别, 但是分子标记方法却不可能通过遗传差异区分子代的来源方式。可见, 分子标记的方法并非解决植物交配问题的万能工具, 至少到目前为止, 它仍然存在一些有待完善的技术环节, 甚至一些难以逾越的障碍。

参考文献

- Abraham ST, Zaya DN, Koenig WD, Ashley MV (2011) Interspecific and intraspecific pollination patterns of valley oak, *Quercus lobata*, in a mixed stand in coastal central California. *International Journal of Plant Sciences*, **172**, 691–699.
- Abramowitz M, Stegun IA (1964) *Handbook of Mathematical Functions with Formulas, Graphs, and Mathematical Tables*. U.S. Government Printing Office, Washington D.C.
- Adams WT, Griffin AR, Moran GF (1992) Using paternity analysis to measure effective pollen dispersal in plant populations. *The American Naturalist*, **140**, 762–780.
- Adler LS, Irwin RE (2006) Comparison of pollen transfer dynamics by multiple floral visitors: experiments with pollen and fluorescent dye. *Annals of Botany*, **97**, 141–150.
- Ahmed S, Compton SG, Butlin RK, Gilmartin PM (2009) Wind-borne insects mediate directional pollen transfer between desert fig trees 160 kilometers apart. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **106**, 20342–20347.
- Anderson EC, Garza JC (2006) The power of single-nucleotide polymorphisms for large-scale parentage inference. *Genetics*, **172**, 2567–2582.
- Ashley MV (2010) Plant parentage, pollination, and dispersal: how DNA microsatellites have altered the landscape. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **29**, 148–161.
- Ashley MV, Wilk JA, Styan SMN, Craft KJ, Jones KL, Feldheim KA, Lewers KS, Ashman TL (2003) High variability and disomic segregation of microsatellites in the octoploid *Fragaria virginiana* Mill. (Rosaceae). *Theoretical and Applied Genetics*, **107**, 1201–1207.
- Austerlitz F, Dick CW, Dutech C, Klein EK, Oddou-Muratorio S, Smouse PE, Sork VL (2004) Using genetic markers to estimate the pollen dispersal curve. *Molecular Ecology*, **13**, 937–954.
- Austerlitz F, Gleiser G, Teixeira S, Bernasconi G (2012) The effects of inbreeding, genetic dissimilarity and phenotype on male reproductive success in a dioecious plant. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **279**, 91–100.
- Bacles CFE, Ennos RA (2008) Paternity analysis of pollen-mediated gene flow for *Fraxinus excelsior* L. in a chronically fragmented landscape. *Heredity*, **101**, 368–380.
- Baena-Díaz F, Fornoni J, Sosenski P, Molina-Freaner FE, Weller SG, Pérez-Ishiwara R, Domínguez CA (2012) Changes in reciprocal herkogamy during the tristylly-distylly transition in *Oxalis alpina* increase efficiency in pollen transfer. *Journal of Evolutionary Biology*, **25**, 574–583.
- Bai WN, Zeng YF, Zhang DY (2007) Mating patterns and pollen dispersal in a heterodichogamous tree, *Juglans mandshurica* (Juglandaceae). *New Phytologist*, **176**, 699–707.
- Baird NA, Etter PD, Atwood TS, Currey MC, Shiver AL, Lewis ZA, Selker EU, Cresko WA, Johnson EA (2008) Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS ONE*, **3**, e3376, doi: 10.1371/journal.pone.0003376.
- Barrett SCH (2010) Darwin's legacy: the forms, function and sexual diversity of flowers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **365**, 351–368.
- Burgarella C, Lorenzo Z, Jabbour-Zahab R, Lumaret R, Guichoux E, Petit RJ, Soto A, Gil L (2009) Detection of hybrids in nature: application to oaks (*Quercus suber* and *Q. ilex*). *Heredity*, **102**, 442–452.
- Byrne M, Elliott CP, Yates CJ, Coates DJ (2008) Maintenance of high pollen dispersal in *Eucalyptus wandoo*, a dominant tree of the fragmented agricultural region in Western Australia. *Conservation Genetics*, **9**, 97–105.
- Campbell DR (1991) Comparing pollen dispersal and gene flow in a natural population. *Evolution*, **45**, 1965–1968.
- Castillo RA, Cordero C, Domínguez CA (2002) Are reward polymorphisms subject to frequency- and density-dependent selection? Evidence from a monoecious species pollinated by deceit. *Journal of Evolutionary Biology*, **15**, 544–552.
- Cavagnaro PF, Senalik DA, Yang LM, Simon PW, Harkins TT, Kodira CD, Huang SW, Weng YQ (2010) Genome-wide characterization of simple sequence repeats in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *BMC Genomics*, **11**, 569.
- Chakrabo R, Shaw M, Schull W (1974) Exclusion of paternity-current state of art. *American Journal of Human Genetics*, **26**, 477–488.
- Christie MR, Tennessen JA, Blouin MS (2013) Bayesian parentage analysis with systematic accountability of genotyping error, missing data and false matching. *Bioinformatics*, **29**, 725–732.
- Clark JS (1998) Why trees migrate so fast: confronting theory with dispersal biology and the paleorecord. *The American Naturalist*, **152**, 204–224.
- Craft KJ, Ashley MV, Koenig WD (2002) Limited hybridization between *Quercus lobata* and *Quercus douglasii* (Fagaceae) in a mixed stand in central coastal California. *American Journal of Botany*, **89**, 1792–1798.
- Craft KJ, Ashley MV (2010) Pollen-mediated gene flow in isolated and continuous stands of bur oak, *Quercus*

- macrocarpa* (Fagaceae). *American Journal of Botany*, **97**, 1999–2006.
- Curtu AL, Gailing O, Finkeldey R (2007) Evidence for hybridization and introgression within a species-rich oak (*Quercus* spp.) community. *BMC Evolutionary Biology*, **7**, 218.
- Curtu AL, Gailing O, Finkeldey R (2009) Patterns of contemporary hybridization inferred from paternity analysis in a four-oak-species forest. *BMC Evolutionary Biology*, **9**, 284.
- Dakin EE, Avise JC (2004) Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, **93**, 504–509.
- Davey JW, Hohenlohe PA, Etter PD, Boone JQ, Catchen JM, Blaxter ML (2011) Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics*, **12**, 499–510.
- Dick CW, Etchelecu G, Austerlitz F (2003) Pollen dispersal of tropical trees (*Dinizia excelsa*: Fabaceae) by native insects and African honeybees in pristine and fragmented Amazonian rainforest. *Molecular Ecology*, **12**, 753–764.
- DiFazio SP, Leonardi S, Slavov GT, Garman SL, Adams WT, Strauss SH (2012) Gene flow and simulation of transgene dispersal from hybrid poplar plantations. *New Phytologist*, **193**, 903–915.
- Dunphy BK, Hamrick JL (2005) Gene flow among established Puerto Rican populations of the exotic tree species, *Albizia lebbbeck*. *Heredity*, **94**, 418–425.
- Dunphy BK, Hamrick JL (2007) Estimation of gene flow into fragmented populations of *Bursera simaruba* (Burseraceae) in the dry-forest life zone of Puerto Rico. *American Journal of Botany*, **94**, 1786–1794.
- Eckert KA, Hile SE (2009) Every microsatellite is different: intrinsic DNA features dictate mutagenesis of common microsatellites present in the human genome. *Molecular Carcinogenesis*, **48**, 379–388.
- Ellegren H (2004) Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, **5**, 435–445.
- Field DL, Barrett SCH (2012) Disassortative mating and the maintenance of sexual polymorphism in painted maple. *Molecular Ecology*, **21**, 3640–3643.
- Fuchs EJ, Hamrick JL (2011) Mating system and pollen flow between remnant populations of the endangered tropical tree, *Guaiaacum sanctum* (Zygophyllaceae). *Conservation Genetics*, **12**, 175–185.
- Geng QF, Lian CL, Goto S, Tao JM, Kimura M, Islam MDS, Hogetsu T (2008) Mating system, pollen and propagule dispersal, and spatial genetic structure in a high-density population of the mangrove tree *Kandelia candel*. *Molecular Ecology*, **17**, 4724–4739.
- Gerber S, Mariette S, Streiff R, Bodenes C, Kremer A (2000) Comparison of microsatellites and amplified fragment length polymorphism markers for parentage analysis. *Molecular Ecology*, **9**, 1037–1048.
- Gleiser G, Segarra-Moragues JG, Pannell JR, Verdu M (2008a) Siring success and paternal effects in heterodichogamous *Acer opalus*. *Annals of Botany*, **101**, 1017–1026.
- Gleiser G, Verdu M, Segarra-Moragues JG, Gonzalez-Martinez SC, Pannell JR (2008b) Disassortative mating, sexual specialization, and the evolution of gender dimorphism in heterodichogamous *Acer opalus*. *Evolution*, **62**, 1676–1688.
- Goto S, Shimatani K, Yoshimaru H, Takahashi Y (2006) Fat-tailed gene flow in the dioecious canopy tree species *Fraxinus mandshurica* var. *japonica* revealed by microsatellites. *Molecular Ecology*, **15**, 2985–2996.
- Hadfield JD, Richardson DS, Burke T (2006) Towards unbiased parentage assignment: combining genetic, behavioural and spatial data in a Bayesian framework. *Molecular Ecology*, **15**, 3715–3730.
- Hadley AS, Betts MG (2009) Tropical deforestation alters hummingbird movement patterns. *Biology Letters*, **5**, 207–210.
- Hasegawa Y, Suyama Y, Seiwa K (2009) Pollen donor composition during the early phases of reproduction revealed by DNA genotyping of pollen grains and seeds of *Castanea crenata*. *New Phytologist*, **182**, 994–1002.
- Hauser L, Baird M, Hilborn R, Seeb LW, Seeb JE (2011) An empirical comparison of SNPs and microsatellites for parentage and kinship assignment in a wild sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) population. *Molecular Ecology Resources*, **11**, 150–161.
- He TH (何田华), Ge S (葛颂) (2001) Mating system, paternity analysis and gene flow in plant populations. *Acta Phytocologica Sinica* (植物生态学报), **25**, 144–154. (in Chinese with English abstract)
- Hodgins KA, Barrett SCH (2008) Asymmetrical mating patterns and the evolution of biased style-morph ratios in a tristylous daffodil. *Genetics Research*, **90**, 3–15.
- Hoffman JI, Amos W (2005) Does kin selection influence fostering behaviour in Antarctic fur seals (*Arctocephalus gazella*)? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **272**, 2017–2022.
- Huang SQ, Guo YH (2000) New advances in pollination biology and the studies in China. *Chinese Science Bulletin*, **45**, 1441–1447.
- Ishihama F, Ueno S, Tsumura Y, Washitani I (2006) Effects of density and floral morph on pollen flow and seed reproduction of an endangered heterostylous herb. *Primula sieboldii*. *Journal of Ecology*, **94**, 846–855.
- Jiang ZX, Xia HB, Basso B, Lu BR (2012) Introgression from cultivated rice influences genetic differentiation of weedy rice populations at a local spatial scale. *Theoretical and Applied Genetics*, **124**, 309–322.
- Kamm U, Gugerli F, Rotach P, Edwards P, Holderegger R (2010) Open areas in a landscape enhance pollen-mediated gene flow of a tree species: evidence from northern Switzerland. *Landscape Ecology*, **25**, 903–911.
- Karron JD, Ivey CT, Mitchell RJ, Whitehead MR, Peakall R, Case AL (2012) New perspectives on the evolution of plant mating systems. *Annals of Botany*, **109**, 493–503.
- Kelkar YD, Tyekucheva S, Chiaromonte F, Makova KD (2008)

- The genome-wide determinants of human and chimpanzee microsatellite evolution. *Genome Research*, **18**, 30–38.
- Kikuchi S, Shibata M, Tanaka H, Yoshimaru H, Niiyama K (2009) Analysis of the disassortative mating pattern in a heterodichogamous plant, *Acer mono* Maxim. using microsatellite markers. *Plant Ecology*, **204**, 43–54.
- Kimura MK, Goto S, Suyama Y, Matsui M, Woeste K, Seiwa K (2012) Morph-specific mating patterns in a low-density population of a heterodichogamous tree, *Juglans ailantifolia*. *Plant Ecology*, **213**, 1477–1487.
- Kitamoto N, Ueno S, Takenaka A, Tsumura Y, Washitani I, Ohsawa R (2006) Effect of flowering phenology on pollen flow distance and the consequences for spatial genetic structure within a population of *Primula sieboldii* (Primulaceae). *American Journal of Botany*, **93**, 226–233.
- Kitamoto N, Ueno S, Tsumura Y, Washitani I, Ohsawa R (2008) Effect of population density of compatible neighbours on inbreeding level within a *Primula sieboldii* population. *Ecological Research*, **23**, 307–315.
- Lander TA, Boshier DH, Harris SA (2010) Fragmented but not isolated: contribution of single trees, small patches and long-distance pollen flow to genetic connectivity for *Gomortega keule*, an endangered Chilean tree. *Biological Conservation*, **143**, 2583–2590.
- Leonarduzzi C, Leonardi S, Menozzi P, Piotti A (2012) Towards an optimal sampling effort for paternity analysis in forest trees: what do the raw numbers tell us? *iForest*, **5**, 18–25.
- Lepais O, Gerber S (2011) Reproductive patterns shape introgression dynamics and species succession within the European white oak species complex. *Evolution*, **65**, 156–170.
- Levin DA, Kerster HW, Niedzlek M (1971) Pollinator flight directionality and its effect on pollen flow. *Evolution*, **25**, 113–118.
- Lewis PO, Snow AA (1992) Deterministic paternity exclusion using RAPD markers. *Molecular Ecology*, **1**, 155–160.
- Lexer C, Heinze B, Gerber S, Macalka-Kampfer S, Steinkeller H, Kremer A, Glossl J (2000) Microsatellite analysis of maternal half-sib families of *Quercus robur*, pedunculate oak: II. inferring the number of pollen donors from the offspring. *Theoretical and Applied Genetics*, **100**, 858–865.
- Li JM, Koski MH, Ashman TL (2012) Functional characterization of gynodioecy in *Fragaria vesca* ssp. *bracteata* (Rosaceae). *Annals of Botany*, **109**, 545–552.
- Li QJ, Xu ZF, Kress WJ, Xia YM, Zhang L, Deng XB, Gao JY, Bai ZL (2001) Pollination: flexible style that encourages outcrossing. *Nature*, **410**, 432.
- Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, **11**, 2453–2465.
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, **7**, 639–655.
- Meagher TR, Thompson E (1986) The relationship between single parent and parent pair genetic likelihoods in genealogy reconstruction. *Theoretical Population Biology*, **29**, 87–106.
- Neff BD, Repka J, Gross MR (2001) A Bayesian framework for parentage analysis: the value of genetic and other biological data. *Theoretical Population Biology*, **59**, 315–331.
- Nielsen R, Mattila DK, Clapham PJ, Palsboll PJ (2001) Statistical approaches to paternity analysis in natural populations and applications to the North Atlantic humpback whale. *Genetics*, **157**, 1673–1682.
- Niggemann M, Wiegand T, Robledo-Arnuncio JJ, Bialozyt R (2012) Marked point pattern analysis on genetic paternity data for uncertainty assessment of pollen dispersal kernels. *Journal of Ecology*, **100**, 264–276.
- Nilsson LA, Rabakonandrianina E, Pettersson B (1992) Exact tracking of pollen transfer and mating in plants. *Nature*, **360**, 666–668.
- O'Connell LM, Mosseler A, Rajora OP (2006) Impacts of forest fragmentation on the mating system and genetic diversity of white spruce (*Picea glauca*) at the landscape level. *Heredity*, **97**, 418–426.
- Oddou-Muratorio S, Klein EK, Austerlitz F (2005) Pollen flow in the wildservice tree, *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. II. Pollen dispersal and heterogeneity in mating success inferred from parent-offspring analysis. *Molecular Ecology*, **14**, 4441–4452.
- Ottewell K, Grey E, Castillo F, Karubian J (2012) The pollen dispersal kernel and mating system of an insect-pollinated tropical palm, *Oenocarpus bataua*. *Heredity*, **109**, 332–339.
- Parra V, Vargas CF, Eguiarte LE (1993) Reproductive-biology, pollen and seed dispersal, and neighborhood size in the hummingbird-pollinated *Echeveria gibbiflora* (Crassulaceae). *American Journal of Botany*, **80**, 153–159.
- Pasquet RS, Peltier A, Hufford MB, Oudin E, Saulnier J, Paul L, Knudsen JT, Herren HR, Gepts P (2008) Long-distance pollen flow assessment through evaluation of pollinator foraging range suggests transgene escape distances. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **105**, 13456–13461.
- Penaloza-Ramirez JM, Gonzalez-Rodriguez A, Mendoza-Cuenca L, Caron H, Kremer A, Oyama K (2010) Interspecific gene flow in a multispecies oak hybrid zone in the Sierra Tarahumara of Mexico. *Annals of Botany*, **105**, 389–399.
- Pons E, Navarro A, Ollitrault P, Peña L (2011) Pollen competition as a reproductive isolation barrier represses transgene flow between compatible and co-flowering citrus genotypes. *PLoS ONE*, **6**, e25810, doi: 10.1371/journal.pone.0025810.
- Pospiskova M, Salkova I (2006) Population structure and parentage analysis of black poplar along the Morava River. *Canadian Journal of Forest Research*, **36**, 1067–1076.
- Rahmé J, Widmer A, Karrenberg S (2009) Pollen competition as an asymmetric reproductive barrier between two closely

- related *Silene* species. *Journal of Evolutionary Biology*, **22**, 1937–1943.
- Robledo-Arnuncio JJ (2011) Wind pollination over mesoscale distances: an investigation with Scots pine. *New Phytologist*, **190**, 222–233.
- Robledo-Arnuncio JJ, Austerlitz F, Smouse PE (2006) A new method of estimating the pollen dispersal curve independently of effective density. *Genetics*, **173**, 1033–1045.
- Robledo-Arnuncio JJ, Austerlitz F, Smouse PE (2007) POLD-ISP: a software package for indirect estimation of contemporary pollen dispersal. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 763–766.
- Robledo-Arnuncio JJ, Gil L (2005) Patterns of pollen dispersal in a small population of *Pinus sylvestris* L. revealed by total-exclusion paternity analysis. *Heredity*, **94**, 13–22.
- Rymer PD, Johnson SD, Savolainen V (2010) Pollinator behaviour and plant speciation: Can assortative mating and disruptive selection maintain distinct floral morphs in sympatry? *New Phytologist*, **188**, 426–436.
- Salvini D, Bruschi P, Fineschi S, Grossoni P, Kjaer ED, Vendramin GG (2009) Natural hybridization between *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus pubescens* Willd. within an Italian stand as revealed by microsatellite fingerprinting. *Plant Biology*, **11**, 758–765.
- Seeb JE, Carvalho G, Hauser L, Naish K, Roberts S, Seeb LW (2011) Single-nucleotide polymorphism (SNP) discovery and applications of SNP genotyping in nonmodel organisms. *Molecular Ecology Resources*, **11**, 1–8.
- Shang H, Luo YB, Bai WN (2012) Influence of asymmetrical mating patterns and male reproductive success on the maintenance of sexual polymorphism in *Acer pictum* subsp. *mono* (Aceraceae). *Molecular Ecology*, **21**, 3869–3878.
- Slavov GT, Leonardi S, Burczyk J, Adams WT, Strauss SH, Difazio SP (2009) Extensive pollen flow in two ecologically contrasting populations of *Populus trichocarpa*. *Molecular Ecology*, **18**, 357–373.
- Spigler RB, Ashman TL (2012) Gynodioecy to dioecy: Are we there yet? *Annals of Botany*, **109**, 531–543.
- Thomson JD, Price MV, Waser NM, Stratton DA (1986) Comparative studies of pollen and fluorescent dye transport by bumble bees visiting *Erythronium grandiflorum*. *Oecologia*, **69**, 561–566.
- Tokarska M, Marshall T, Kowalczyk R, Wójcik JM, Pertoldi C, Kristensen TN, Loeschcke V, Gregersen VR, Bendixen C (2009) Effectiveness of microsatellite and SNP markers for parentage and identity analysis in species with low genetic diversity: the case of European bison. *Heredity*, **103**, 326–332.
- Townsend PA, Levey DJ (2005) An experimental test of whether habitat corridors affect pollen transfer. *Ecology*, **86**, 466–475.
- Valbuena-Carabaña M, González-Martínez SC, Sork VL, Collada C, Soto A, Goicoechea PG, Gil L (2005) Gene flow and hybridisation in a mixed oak forest (*Quercus pyrenaica* Willd. and *Quercus petraea* (Matts.) Liebl.) in central Spain. *Heredity*, **95**, 457–465.
- van Rossum F (2009) Pollen dispersal and genetic variation in an early-successional forest herb in a peri-urban forest. *Plant Biology*, **11**, 725–737.
- van Rossum F, Stiers I, van Geert A, Triest L, Hardy OJ (2011) Fluorescent dye particles as pollen analogues for measuring pollen dispersal in an insect-pollinated forest herb. *Oecologia*, **165**, 663–674.
- Walther-Hellwig K, Frankl R (2000) Foraging distances of *Bombus muscorum*, *Bombus lapidarius*, and *Bombus terrestris* (Hymenoptera, Apidae). *Journal of Insect Behavior*, **13**, 239–246.
- Wang HF, Sork VL, Wu JG, Ge JP (2010) Effect of patch size and isolation on mating patterns and seed production in an urban population of Chinese pine (*Pinus tabulaeformis* Carr.). *Forest Ecology and Management*, **260**, 965–974.
- Wang KS (2004) Gene flow in European beech (*Fagus sylvatica* L.). *Genetica*, **122**, 105–113.
- Wikelski M, Moxley J, Eaton-Mordas A, López-Urbe MM, Holland R, Moskowitz D, Roubik DW, Kays R (2010) Large-range movements of neotropical orchid bees observed via radio telemetry. *PLoS ONE*, **5**, e10738, doi: 10.1371/journal.pone.0010738.
- Zalapa JE, Cuevas H, Zhu HY, Steffan S, Senalik D, Zeldin E, McCown B, Harbut R, Simon P (2012) Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (ssr) loci in the plant sciences. *American Journal of Botany*, **99**, 193–208.
- Zhu H, Senalik D, McCown BH, Zeldin EL, Speers J, Hyman J, Bassil N, Hummer K, Simon PW, Zalapa JE (2012) Mining and validation of pyrosequenced simple sequence repeats (SSRs) from American cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.). *Theoretical and Applied Genetics*, **124**, 87–96.

(责任编辑: 张大勇 责任编辑: 时意专)