

中国卵叶海桑遗传多样性的 ISSR 研究

李海生^{1,2}, 陈桂珠¹

(1. 中山大学环境科学研究所, 广东广州 510275; 2. 广东教育学院生物系, 广东广州 510310)

摘要: 卵叶海桑(*Sonneratia ovata*)是海桑科濒危红树植物,在我国仅分布于海南文昌清澜自然保护区内。采用简单序列重复区间扩增(ISSR)分子标记技术对该天然居群和东寨港红树林自然保护区引种的人工居群共 3 个居群 39 个个体进行了遗传变异分析。11 个引物共扩增出 185 条带,其中 127 条具多态性,多态位点百分率为 68.65%。在居群水平上相对较低,多态位点百分率 36.76%~54.59%,平均值为 47.21%。Nei 的基因多样性、Shannon 信息指数在物种水平上分别为 0.141 1 和 0.229 2;在居群水平上平均值分别为 0.120 9 和 0.191 0。Nei 的遗传分化系数 G_{ST} 表明:87.58%遗传变异分布在居群内,12.42%的遗传变异分布在居群间。居群间的遗传一致度达 0.970 7。东寨港迁地保护的人工居群有效地保护了卵叶海桑的遗传多样性。

关键词: 卵叶海桑; ISSR; 遗传多样性; 遗传分化; 保护

中图分类号: Q948 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2004)01-0017-06

Genetic diversity of *Sonneratia ovata* (Sonneratiaceae) in China detected by inter-simple sequence repeats (ISSR) analysis

LI Hai-sheng^{1,2}, CHEN Gui-zhu¹

(1. Institute of Environmental Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China; 2. Department of Biology, Guangdong Education Institute, Guangzhou 510310, China)

Abstract: *Sonneratia ovata* is an endangered mangrove species of Sonneratiaceae restricted in Hainan Qinglan Natural Reserve of Wenchang City, Hainan Province. Inter-simple sequence repeats (ISSR) markers were used to investigate the genetic variations within and among the wild population and two introduced populations at Hainan Dongzhai Harbor Mangrove Natural Reserve. Leaf samples were collected from 39 individuals. Eleven ISSR primers gave rise to 185 discernible DNA bands of which 127 (68.65%) were polymorphic. However, there were relatively low levels of polymorphism at the population level with the percentage of polymorphic bands (P) from 36.76% to 54.59%, 47.21% on average. Nei's genetic diversity (h) and Shannon's information index (I) were 0.141 1 and 0.229 2 respectively at specific level, 0.120 9 and 0.191 0 at population level. Based on Nei's G_{ST} value, a large proportion of genetic variance (87.58%) was among individuals within population, 12.42% genetic variance was among populations. Genetic identity between populations was 0.970 7 on average. The *ex situ* conservation of *S. ovata* at Dongzhai Harbor Mangrove Natural Reserve was successful in the conservation of genetic diversity.

Key words: *Sonneratia ovata*; ISSR; genetic diversity; genetic differentiation; conservation

卵叶海桑(*Sonneratia ovata* Backer)是海桑科 海桑属红树植物,分布于泰国、马来西亚、新几内亚

收稿日期: 2003-04-08 修订日期: 2003-05-26

基金项目: 教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20010558004)

作者简介: 李海生(1971-),男,河南沁阳人,讲师,博士生,从事植物学、生态学和保护生物学的研究。

巴布亚湾以及昆士兰等地(Tomlinson, 1986)。在我国的海南岛,卵叶海桑亦有分布。作为沿海红树林的组成成分之一,卵叶海桑对于防风、防浪、固堤、保护农田和村庄、促淤造陆有显著的效果,同时,其树干饱满,材质好,亦可作为我国红树林用材树种。但该植物在我国仅天然分布于海南文昌清澜保护区,分布范围狭窄,主要分布在文昌头宛保护站附近的霞场村及八门湾附近乡镇,除在霞场村卵叶海桑个体数量较集中分布外,在八门湾附近乡镇多呈零星分布。由于近年来卵叶海桑生长地受到人类搞水产养殖等经济活动的干扰,生存受到严重的威胁,个体数量变得极为稀少,估计仅有 200 株左右。上世纪 90 年代以来,海南东寨港红树林自然保护区陆续从文昌清澜保护区采种育苗,现在三江(1990 年引种)有 8 棵,苗圃和林家湾各有 30 多棵(1998 年引种)。

物种的遗传多样性是长期进化的产物,也是其生存和发展的前提。对稀有濒危植物遗传多样性和遗传结构的研究,是探讨其适应性、生存力的基础,也是分析致濒机理的基础,从而帮助制定科学有效的保护策略和措施。目前对卵叶海桑的形态、解剖、细胞学、生理生态作过一些研究(陈泽濂, 1996; 黄庆昌等, 1994; 王瑞江等; 1998; 邓传远等, 2000; 邓传远等, 2001)。但对该物种在 DNA 水平上的遗传多样性及保护生物学方面的研究至今尚未见报道。ISSR(Inter-Simple Sequence Repeat)又称简单重复序列区间扩增,是利用真核生物基因组广泛存在的简单重复序列,设计单一通用引物对基因组 DNA 进行 PCR 扩增,扩增产物经聚丙烯酰胺胶或琼脂糖凝胶电泳分离获得扩增指纹图,从而可以揭示样本间的遗传多样性。ISSR 分子标记技术具有 DNA 样品用量少,操作简单,无需预先知道受试基因组 DNA 序列,结果记录方便,实验成本低,重复性好,能提供丰富的关于基因组的信息等优点,已广泛用于遗传多样性分析、绘制 DNA 指纹图谱、品种鉴定、进化及分子生态学研究。因而本研究采用 ISSR 分子标记来研究卵叶海桑的遗传变异,以阐明其遗传多样性水平和遗传结构,为保护卵叶海桑提供基础资料和科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

根据卵叶海桑的居群大小随机采样。对于小居群一般全部采,大居群则按比例采集。采样时采摘

卵叶海桑的嫩叶,置于盛有硅胶的塑胶袋中干燥保存。采样时间为 2001 年 12 月。各居群的基本情况见表 1。

表 1 卵叶海桑取样居群的基本情况
Table 1 The general situation of *Sonneratia ovata* sampling populations

居群代号 Population code	居群地点 Population location	经度 Longitude	纬度 Latitude	取样数 No. of samples
TW	文昌头宛霞场村	110°47'43"	19°37'22"	14
MP	东寨港苗圃	110°34'33"	19°57'01"	17
SJ	东寨港三江	110°36'49"	19°55'35"	8

1.2 DNA 提取

采用 CTAB 法(Doyle 等, 1987)提取基因组 DNA。用电泳法测其含量。

1.3 PCR 扩增

对购自于哥伦比亚大学的 100 个引物(UBC set No. 9)进行了筛选,从中选取扩增条带清晰,重复性较好的 11 个引物(表 2)用于 PCR 扩增。扩增反应在 PTC-100 TM Programmable Thermal Controller(美国)PCR 扩增仪上进行。经实验证实较好的扩增条件为每 10 μ L 反应体积分含 1 μ L 10 $\times$ buffer, 3.0 mmol/L MgCl₂, 300 mmol/L dNTPs, 0.3 μ mmol/L primer, 1U Taq DNA 聚合酶(加拿大真达公司), 10 ng 模板 DNA。扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 之后进行 45 个循环, 每个循环包括 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 52~53.5 $^{\circ}$ C 退火(退火温度随引物而定)(表 2)45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。将扩增产物置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

1.4 PCR 产物鉴定

将 PCR 扩增产物在用 0.5 $\times$ TBE 配制的含有 EB 的 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳分离。以 100 bp DNA ladder(100~3 000 bp)作为相对分子质量标准。在 60 mA 的恒流下电泳 3 h。电泳结束后在紫外检测仪上观察记录扩增产物的泳带,并在凝胶成像系统中保存图像。

1.5 数据的统计和分析

1.5.1 居群遗传结构及遗传多样性分析 在琼脂糖凝胶电泳图谱上同一 ISSR 位点上有电泳带记为 1, 无电泳带的记为 0, 作 0,1 矩阵输入计算机。应用 Popgene 1.31 程序,假定居群在这些 ISSR 标记位点处于 Hardy-Weinberg 平衡状态,统计下列参数: (1)多态位点百分数(P): 扩增的 DNA 片段出现频率小于或等于 0.99 的位点即为多态位点,多态位点

百分数 = 具有多态的位点数 / 检测到的位点数 × 100 %; (2) 平均每个位点的观察等位基因数 (N_a); (3) 平均每个位点的有效等位基因数 (N_e); (4) N_e 的基因多样性 (h) (Nei, 1973); (5) Shannon 信息指数 (I); (6) 总的基因多样性 (H_t) 和居群内的基因多样性 (H_s); (7) 基因分化系数 (G_{st}) 和基因流 (N_m); (8) N_e 的遗传距离 (D) (Nei, 1972) 和遗传一致度 (I)。

1.5.2 聚类分析 采用算数平均数的非加权成组配对法 (UPGMA) 对居群间使用 Nei (1972) 遗传距离进行聚类分析, 对居群个体之间使用 Nei 和 Li (1979) 的相似性系数进行聚类分析。使用软件为 NTSYSpc 2.02。

2 结果与分析

2.1 卵叶海桑居群的遗传多样性

用 11 个 ISSR 引物扩增了 3 个卵叶海桑居群共 39 个个体, 共扩增出 185 条带, 每个引物扩增的条带数为 12~24 条, 平均每个引物扩增的条带数为 16.8 条, 扩增的条带在 150 bp 至 2 500 bp 之间, 其中 127 条具多态性 (表 2), 多态位点百分率为 68.65 %。由表 3 可知, 居群内的多态位点百分率在 36.76 %~54.59 % 之间, 平均值为 47.21 %。随着个体数的增加, 居群多态位点百分率亦随着相应提高。 N_e 的基因多样性在 0.100 8~0.133 9 之间, Shannon 信息指数反映的遗传多样性比 N_e 的基因多样性高, 在 0.158 5~0.212 4 之间, 但表现出同样的趋势, 即 $MP > TW > SJ$ 。

2.2 卵叶海桑的遗传分化

由 Popgene 分析, 卵叶海桑所有群体总的基因多样性为 0.138 0, 居群内基因多样性 0.120 8, 居群

间遗传多样性为 0.017 2, 分化系数 G_{st} 为 0.124 2。换言之, 卵叶海桑居群间发生了一定的遗传分化, 居群间的遗传变异占总遗传变异的 12.42 %, 居群内的遗传变异占总遗传变异的 87.58 %。居群间的基因流为 1.763 2。居群间的遗传距离 (D) 矩阵和遗传一致度 (I) 见表 4。 I 值变化范围为 0.961 9~0.976 5, 所有群体间的平均一致度达 0.970 9。根据 Nei (1972) 遗传距离将所有群体进行 UPGMA 聚类, 聚类结果为头宛居群 (TW) 和三江居群 (SJ) 首先聚在一起, 然后在距离 0.03 处再与苗圃 (MP) 居群聚为一起。利用 NTSYSpc 2.02 软件计算卵叶海桑 39 个样品之间 Nei 和 Li (1979) 的遗传相似性系数, 并根据相似性系数使用 UPGMA 法聚类, 结果见图 2。从聚类图中可知, 每一个居群的样品一般并非都单独地聚为一类。

表 2 ISSR 引物、序列、退火温度和
扩增后产生的带型数

Table 2 Name of ISSR primers, sequence, annealing temperature and bands after amplification				
引物 Primer	引物序列 Sequence of primer	退火温度 Annealing temperature ($^{\circ}C$)	记录的带数 No. of bands scored	多态带数 No. of polymorphic bands
808	(AG) ₈ C	53.5	15	9
809	(AG) ₈ G	52	12	9
835	(AG) ₈ (CT)C	53.5	21	14
836	(AG) ₈ (CT)A	52	12	7
840	(GA) ₈ (CT)T	53	13	10
842	(GA) ₈ (CT)G	53	12	7
847	(CA) ₈ (AG)C	53.5	24	21
857	(AC) ₈ (CT)G	52	21	19
864	(ATG) ₆	53.5	21	13
868	(GAA) ₆	52.5	21	12
887	(AGT)(ACG) (AGT)(TC) ₇	52	13	6
Total	—	—	185	127

表 3 卵叶海桑居群间遗传变异统计

Table 3 The genetic variation statistics among populations of *Sonneratia ovata* (Mean $\pm$ SD)

居群 Population	观察等位基数 N_a	有效等位基数 N_e	期望杂合度 h	Shannon 信息指数 I	多态位点百分数 P
TW	1.502 7 $\pm$ 0.501 3	1.205 4 $\pm$ 0.308 3	0.127 9 $\pm$ 0.169 6	0.202 2 $\pm$ 0.246 2	50.27
MP	1.545 9 $\pm$ 0.499 2	1.215 9 $\pm$ 0.316 5	0.133 9 $\pm$ 0.171 3	0.212 4 $\pm$ 0.246 6	54.59
SJ	1.367 6 $\pm$ 0.483 5	1.162 5 $\pm$ 0.289 6	0.100 8 $\pm$ 0.159 8	0.158 5 $\pm$ 0.234 9	36.76
平均 Average	1.472 1 $\pm$ 0.093 0	1.194 6 $\pm$ 0.028 3	0.120 9 $\pm$ 0.017 6	0.191 0 $\pm$ 0.028 6	47.21
总群体 All locus	1.686 5 $\pm$ 0.465 2	1.221 8 $\pm$ 0.306 5	0.141 1 $\pm$ 0.164 9	0.229 2 $\pm$ 0.235 2	68.65

Note: N_a =observed number of alleles, N_e =effective number of alleles, h =Nei's gene diversity, I =Shannon's Information index, P =the percentage of polymorphic bands.

表 4 卵叶海桑居群间 Nei(1972)的遗传一致度
(右上角)和遗传距离(左下角)
Table 4 Nei's (1972)genetic identity(above diagonal)and
genetic distance(below diagonal)of *Sonneratia ovata*

居群 Population	TW	MP	SJ
TW	*	0.9742	0.9765
MP	0.0261	*	0.9619
SJ	0.0238	0.0389	*

3 讨 论

3.1 卵叶海桑的遗传多样性

尽管卵叶海桑目前分布范围和个体数量非常有限,但从实验结果来看,多态位点百分率远高于红树植物红海榄 (*Rhizophora stylosa*) (Goodall 等,

1989)、秋茄 (*Kandelia candel*) (黄生,1994)、老鼠簕 (*Acanthus ilicifolius*) (Lakshmi 等,1997),原因可能在于本研究采用 ISSR 分子标记技术,较上述研究所采用的等位酶、RFLP、RAPD 技术可检测到更多的基因位点,发现更加丰富的遗传信息 (Godwin 等,1997;Nagoaka 等,1997;钱韦等,2000;杜金昆等,2002)。另外,采用 ISSR 分子标记研究表明:红树植物银叶树 (*Heritiera littoralis*) 总的基因多样性为 0.232 7,多态位点百分率为 83.19% (Jian 等,2002);桐花树 (*Aegiceras corniculatum*) 总的遗传多样性仅 0.039,多态位点百分率为 16.18% (Ge 等,1999);而卵叶海桑总的基因多样性为 0.138 0,多态位点百分率为 68.65%。因此,从卵叶海桑的遗传多样性来看,在种的水平上,遗传多样性在红树

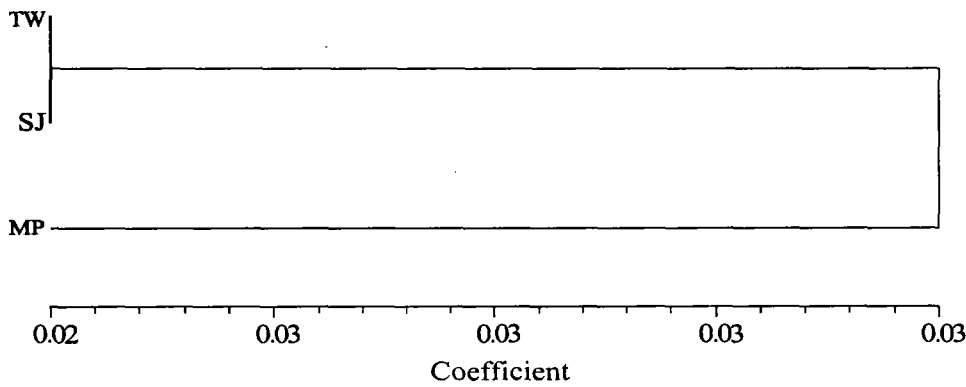


图 1 卵叶海桑居群间遗传距离(Nei,1972)UPGMA 聚类图
Fig. 1 Dendrogram of UPGMA cluster analysis based on Nei's (1972) genetic
distance among populations of *Sonneratia ovata*

植物中保持着中度的遗传多样性水平。

3.2 卵叶海桑的遗传结构

卵叶海桑群体间存在一定的遗传变异,居群间的遗传变异占总遗传变异的 12.42%,分布在居群内遗传变异占总遗传变异的 87.58%。这样的遗传结构与大多数热带树种的遗传结构相似 (Hamrick 等,1990)。影响居群间遗传结构的因素很多,如繁育系统、分布范围、种子传播机制等 (Hamrick, 1987)。海桑属植物繁育系统是以异交为主,主要靠蝙蝠、鸟 (Stafford-Deitsch, 1996)、天蛾 (Primack 等,1981)等传播花粉,造成了一定的基因流动 ($Nm = 1.763\ 2$);东寨港红树林保护区与文昌清澜保护区,两地毗邻,有着相似的立地、气候条件,且分布在

东寨港的卵叶海桑是从文昌采种育苗引种的,不同居群的植物个体间有很近的亲缘关系,用 UPGMA 法对个体之间聚类结果,每一居群中的个体并非单独聚为一类,亦表明了这一点。因此,可能正是由于上述因素导致了卵叶海桑的遗传变异主要分布在居群内。另外,卵叶海桑多生于高潮带,其果实为浆果,种子多数,果实落地后,部分果实会受到涨潮、退潮的影响而被带到他处,至于随潮水传播的距离及对由此造成的对卵叶海桑遗传结构的影响则尚待进一步研究。

3.3 卵叶海桑的保护

目前人们在红树林生长地搞水产养殖,因挖鱼塘、虾塘等砍掉了大量的红树林植物,红树林植物的

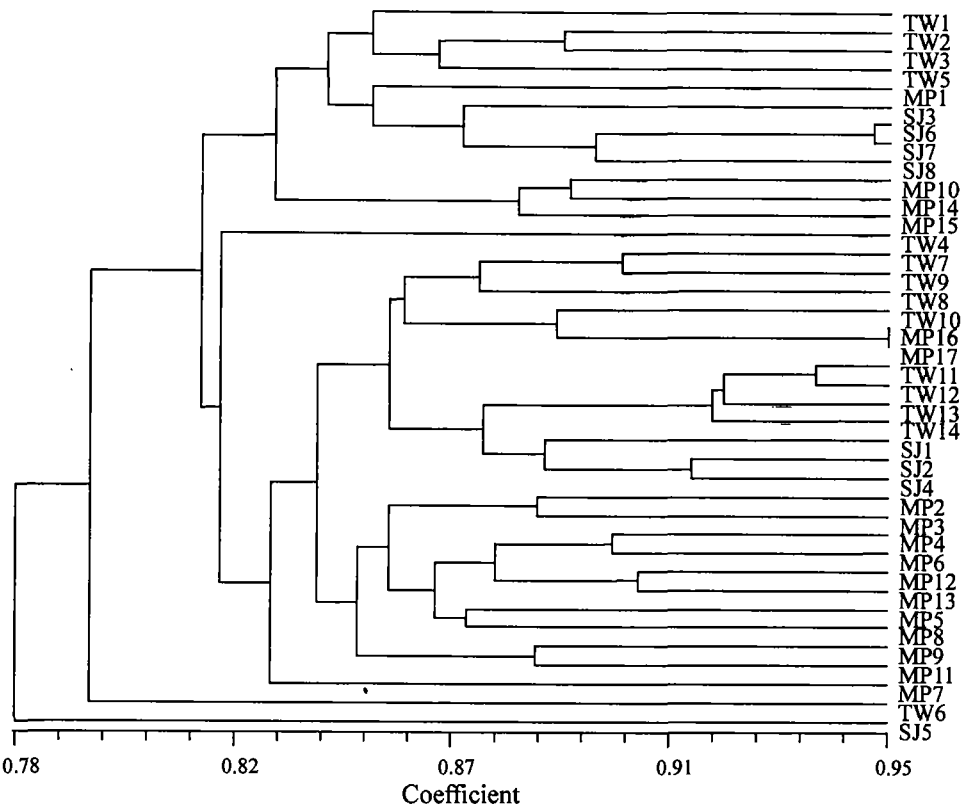


图 2 卵叶海桑个体间 Nei 和 Li(1979)的遗传相似性系数 UPGMA 聚类图
Fig. 2 The dendrogram of individuals of *Sonneratia ovata* based on the Nei and Li (1979) similarity coefficient and the UPGMA clustering method

生境受到很大破坏,给包括卵叶海桑在内的大量红树植物的生存带来极大的威胁。卵叶海桑作为红树林中的上层树种,更易遭到砍伐破坏。因此,人类的砍伐及所带来的生境丧失、生境片断化等是造成卵叶海桑濒危的主要原因。另外,卵叶海桑天然分布居群和迁地保护居群中,均较少发现有实生苗存在。这是由于卵叶海桑母树少,加之果实落地后,易受到螃蟹、蚂蚁的啃食,种子变得更为稀少,以及原生地可能缺乏种子萌发的立地条件。因此为保护卵叶海桑,除应在其天然生长地实行就地保护,保护其生境,制止乱砍乱伐外,还应进一步实施迁地保护工作。从我们的研究结果来看,头宛居群和在东寨港迁地保护的三江居群、苗圃居群间遗传多样性差异不大。居群间的遗传一致度高达 0.970 2。表明在东寨港迁地保护的卵叶海桑在很大程度上保持了原生居群的遗传多样性,迁地保护较为成功。由于东寨港引种栽植的卵叶海桑数量不多,为成功地保护这一濒危植物,还应进一步加强卵叶海桑种质资源

的收集工作,加强采种,提高育苗、造林技术。尽快让居群数量得以恢复。

本研究野外采样得到了文昌清澜自然保护区管理站梁勇站长和东寨港红树林保护区陈建海同志的帮助;实验在中山大学教育部基因工程重点实验室完成,实验过程中,一直得到了施苏华教授的关心和指导,简曙光博士、谈凤笑博士、田春杰博士、袁长春博士、南蓬博士、周仁超博士、余燕同学等在实验和数据处理过程中提供了帮助;王玉国博士对初稿提出了宝贵意见,在此作者深表谢意。

参考文献:

Chen ZL(陈泽濂). 1996. The morphology and anatomy of *Sonneratia* Linn. f. in China(国产海桑属 *Sonneratia* Linn. f.)植物的形态解剖[J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*(热带亚热带植物学报), 4(2): 18-24.
Deng CY(邓传远), Lin P(林 鹏), Li ZB(黎中宝). 2001. Study on comparative anatomy of secondary xylem in six *Sonneratia* species of mangroves (海桑属 *Sonneratia* 红树

- 植物木材结构的比较解剖学研究[J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)* (厦门大学学报), **40** (5): 1 100—1 104.
- Deng CY(邓传远), Lin QX(林清贤), Lin P(林 鹏), *et al.* 2000. Wood anatomy characteristics of 6 mangrove species of *Sonneratia* and their application (海桑属 *Sonneratia* 6 种红树植物的木材解剖特性及其应用)[J]. *Journal of Fujian Forestry Science and Technology* (福建林业科技), **27**(3): 1—5.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. *Phytochem Bull*, **19**: 11—15.
- Du JK(杜金昆), Yao YY(姚颖垠), Ni ZF(倪中福), *et al.* 2002. Genetic diversity revealed by ISSR molecular marker in common wheat, spelt, compactum and progeny of recurrent selection(普通小麦、斯卑尔小麦、密穗小麦和轮回选择后代材料 ISSR 分子标记遗传差异研究)[J]. *Acta Genetica Sinica* (遗传学报), **29**(5): 445—452.
- Ge XJ, Sun M. 1999. Reproductive biology and genetic diversity of a cryptoviviparous mangrove *Aegiceras corniculatum* (Myrsinaceae) using allozyme and intersimple sequence repeat (ISSR) analysis[J]. *Mol Ecol*, **8**: 2 061—2 069.
- Godwin ID, Aitken EAB, Smith LW. 1997. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics[J]. *Electrophoresis*, **18**: 1 524—1 528.
- Goodall JA, Stoddart JA. 1989. Techniques for the electrophoresis of mangrove tissue[J]. *Aquat Bot*, **35**: 197—207.
- Hamrick JL, Godt MJW. 1990. Allozyme diversity in plant species[A]. In: Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, *et al.* Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resource[M]. Sunderland, Massachusetts: Sinauer, 43—63.
- Hamrick JL. 1987. Gene flow and distribution of genetic variation in plant populations[A]. In: Urbanka K ed. Differentiation Patterns in Higher Plants[M]. New York: Academic Press, 53—67.
- Huang QC(黄庆昌), Huang QL(黄桂玲), Yang ML(杨曼玲). 1994. The studies on the development, structure and ecological adaptation of aboveground root apices of the mangrove plants(红树植物地上根端的发育、结构与生态适应)[J]. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), **36**(8): 592—596.
- Huang S(黄 生). 1994. Genetic structure of *Kandelia candel* (L.) Druce in Taiwan(秋茄 *Kandelia candel* 的区域性种群 population 遗传结构)[J]. *Chinese Biodiversity* (生物多样性), **2**(1): 68—75.
- Jian SG, Shi SH, Zhong Y, *et al.* 2002. Genetic diversity among south China *Heritiera littoralis* detected by Inter-simple sequence repeats (ISSR) analysis[J]. *J Genet Mol Biol*, **13**(4): 272—276.
- Lakshmi M, Rajalakshmi S, Parani M, *et al.* 1997. Molecular phylogeny of mangroves I. Use of molecular markers in accessing the intraspecific genetic variability in the mangrove species *Acanthus ilicifolius* Linn. (Acanthaceae) [J]. *Theor Appl Genet*, **94**: 1 121—1 127.
- Nagoaka T, Ogiwara Y. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers[J]. *Theor Appl Genet*, **94**: 597—602.
- Nei M, Li WH. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**: 5 269—5 273.
- Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided population[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **70**: 3 321—3 323.
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations[J]. *Amer Naturalist*, **106**: 283—292.
- Primack RB, Duke NC, Tomlinson PB. 1981. Floral morphology in relation to pollination ecology in five Queensland coastal plants[J]. *Austrobaileya*, **4**: 346—355.
- Qian W(钱 韦), Ge S(葛 颂), Hong DY(洪德元). 2000. Assessment of genetic variation of *Oryza granolata* detected by RAPDs and ISSRs(采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性)[J]. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), **42**(7): 741—750.
- Stafford-Deitsch J. 1996. Mangrove: the forgotten habitat [M]. London: Immel Publishing Ltd., 129—130.
- Tomlinson PB. 1986. The botany of mangroves[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 371—372.
- Wang RJ(王瑞江), Chen ZY(陈忠毅), Huang XX(黄向旭). 1998. Chromosome counts on Chinese mangroves(国产红树林植物的染色体计数)[J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany* (热带亚热带植物学报), **6**(1): 40—46.