

华中农业大学学位论文独创性声明及使用授权书

学位论文 是否保密	否	如需保密, 解密时间	年 月 日
独创性声明			
<p>本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知, 除了文中特别加以标注和致谢的地方外, 论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果, 也不包含为获得华中农业大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料, 指导教师对此进行了审定。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中做了明确的说明, 并表示了谢意。</p>			
研究生签名: 刘传虎		时间: 2006年 6月 20日	
学位论文使用授权书			
<p>本人完全了解“华中农业大学关于保存、使用学位论文的规定”, 即学生必须按照学校要求提交学位论文的印刷本和电子版本; 学校有权保留提交论文的印刷版和电子版, 并提供目录检索和阅览服务, 可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。本人同意华中农业大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。</p>			
注: 保密学位论文在解密后适用于本授权书。			
学位论文作者签名: 刘传虎		导师签名: 姚远玲	
签名日期: 2006年 6月 20日		签名日期: 2006年 6月 20日	

注: 请将本表直接装订在学位论文的扉页和目录之间

摘要

龙须草 (*Eulaliopsis binata*) 为禾本科新发现的一种无融合生殖植物。本研究通过根尖细胞染色体制片技术, 确定龙须草体细胞染色体数目。通过分析龙须草核型和观察花粉母细胞减数分裂过程中染色体行为与变异, 判断其倍性水平和多倍体类型。以来自于中国 5 个省、12 个居群的龙须草为材料, 通过 RAPD 分子标记和形态学特征观察, 分析 12 个龙须草居群间的遗传差异, 划分出不同的类型。通过遗传差异较大的龙须草类型间杂交, 利用 RAPD 分子标记, 检测子代与亲本差异, 分析其无融合生殖程度, 探明子代的生殖来源; 并结合传粉生物学观察, 研究龙须草无融合生殖的遗传学特性。

主要研究结果如下:

1) 对湖北丹江, 湖南衡阳, 河南内乡、西峡, 陕西山阳 5 个居群的龙须草的根尖细胞染色体进行检测, 每个居群观察 30 个以上根尖, 每个根尖观察 10-20 分散良好的中期细胞, 取其平均值作为根尖细胞染色体数目。五个居群共观察 326 个根尖, 其中 308 个根尖细胞染色体为 40 条, 占 94.47%, 因此龙须草体细胞染色体数目为 40, 即 $2n=40$ 。观察中发现有 18 个根尖细胞染色体数目多于或少于 40, 有 80、60、30 和 20 等, 还有一些根尖细胞具有非整倍染色体数, 这些占观察根尖数的 5.53%。这一结果表明: 龙须草根尖细胞染色体存在一定的自然变异, 种群中可能存在不同倍性的个体。所观察的几个龙须草居群的根尖细胞染色体数目未发现明显差异。

2) 龙须草核型分析结果显示: 龙须草染色体形态较小, 平均绝对长度为 $3.820 \pm 0.415 \mu\text{m}$, 四个居群的龙须草在染色体形态特征上没有显著差异。龙须草 40 条染色体相对长度每两条相似, 20 对染色体, 除了第 6 对和第 11 对为近中部着丝粒染色体外, 其余 18 对都为中部着丝粒染色体, 表现出较高的对称性, 臂指数 (N.F.) 为 80。最长的染色体与最短的染色体长度比为 2.6356, 大于 2: 1 的比值, 且没有臂比大于 2: 1 的染色体, 根据 Stebbin (1971) 的核型分类标准, 龙须草的核型为 1B 型。用染色体分析软件计算出的核型参数, 得出其核型公式为 $2n=40=18m+2sm$ 。

3) 龙须草花粉母细胞减数分裂为连续型胞质分裂, 终变期染色体构型为

20 II。在其减数分裂过程中观察到一些异常现象，前期 I 出现不配对染色体，频率为 34.3%；后期 I 出现落后染色体，变幅为 1-3 个，频率为 32.4%；末期 II-四分体时期可观察到明显的微核现象，频率为 20%。

4) 利用 RAPD 分子标记和形态特征观察，分析研究了中国 12 个龙须草居群的遗传差异，16 个寡聚核苷酸引物扩增共得到 124 条带，其中 110 条为多态性带，占 88.7%。Shannon 多样性指数 (I) 为 0.3590，物种水平 Nei' s 基因多样性 (H) 为 0.2241。12 个龙须草居群的遗传相似系数在 0.48~0.99 之间。12 个居群的龙须草在植物体茎杆颜色、叶片颜色、生育期、茎高和花梗高度等形态特征上存在一定差异。聚类结果结合形态学特征分析，12 个龙须草居群可划分为 4 类，河南、湖北、陕西山阳的 9 个居群聚为 1 类，陕西洋县居群、广东星子山居群、广西百色居群各代表 1 类。

5) 通过遗传差异较大的龙须草类型间杂交，获得杂交种子萌发后，得到 46 株 F1 代。利用 RAPD 分子标记，检测子代与亲本差异，发现其中 3 株 F1 代与其母本带型不一致。龙须草传粉过程观察结果表明，其萌发的花粉管生长速度缓慢，而且生长有限，基本上没有能够到达子房进入胚珠的。分析认为龙须草无融合生殖程度较高，约 93.5%。

本课题研究确定了龙须草为异源四倍体植物，具有 40 条染色体。把来自 5 个省的 12 龙须草居群划分成 4 种类型：类型 I 为河南、湖北、陕西山阳等 9 个居群；类型 II 为广东星子山居群；类型 III 为陕西洋县居群；类型 IV 为广西百色居群。利用 RAPD 分子标记检测了龙须草 46 株杂交 F1 代，其中 3 株来自有性生殖方式，确定龙须草为兼性无融合生殖植物。

关键词：龙须草；无融合生殖；细胞学； RAPD；遗传学

Abstract

In this paper, the number of chromosomes in *E. binata* was investigated by the root tip squash method, its ploidy was analyzed by the karyotype and chromosomes behavior of the pollen mother cells meiosis. Genetic diversity in 12 populations of apomictic *Eulaliopsis binata* was evaluated by morphological observation and RAPD analyse, as a result, 12 populations of *E. binata* were divided into different types. In order to study *Eulaliopsis binata* genetics characteristic, combining with pollination biology, we analysed the origin of crossbreed offspring by RAPD in different types with significant diversity and further discussed its degree of apomixis

1) More than 30 root tips in each of populations of *E. binata* were observed, separately, and 10-20 cells with dispersive metaphase chromosome were statistic, thereby obtaining the average number of chromosomes in root tips. In one study of 326 root tips, 308 contained 40 chromosomes and 18 had varying number of chromosome in *E. binata*, for example, some contain 80, 60, 30, 20 chromosomes, respectively, while the others appeared aneuploid. Therefore, we proposed that the somatic cells of *E. binata* contained 40 chromosomes ($2n=40$). Furthermore, it was noted that, few significant difference among those populations was found in *E. binata*, although some natural mutations exist in the root tip cells of *E. binata*, indicating a few individuals with differing ploidy in *E. binata*.

2) The results of karyotype analysis presented the morphology in chromosomes was relatively small and the average absolute length in *E. binata* was $3.820 \pm 0.415 \mu\text{m}$. The 6th and 11st chromosomes belonged to sub-middle centromere, whereas, the other chromosomes attributed to middle centromere, presenting relatively high symmetry, more precisely, the nombre fondamentale (N. F.) is 80. Plus, we found that the ratio (the length of the longest chromosome/ the length of the shortest chromosome) was 2.6356, which was more than 2/1, and all chromosome arm ratios were not more than 1/2. According to the standard for classifying chromosome karyotype, established by Stetbbin, the karyotype of *E. binata* belonged to type 1B, and the formula of karyotype in *E. binata* was $2n=40=18m+2sm$, depending upon the data derived from karyotype parameters.

3) The meiosis in *E. binata* undergoes successive cytokinesis, and 20 bivalents appeared at diakinesis. Furthermore, in this study, some abnormal phenomena were observed: some unpaired chromosomes with a 34.3% frequency appearing at metaphase I, one or three lagging chromosomes with a 32.4% frequency observed at anaphase I and the occurrence of micronuclei was detected in one of five cells during the tetrad period.

4) Genetic diversity in 12 wild populations of apomictic *E. binata* was evaluated by morphological observation and RAPD analysis, 124 loci were identified with 16 oligonucleotide primers, out of which 110 loci were polymorphic and account for 88.7%. Shannon's indices of diversity $I=0.3590$, Nei's gene diversity $H=0.2241$ at species level. The genetic similarity coefficient in 12 wild populations of *E. binata* varied from 0.48 to 0.99. The 12 populations of *E. binata* could be divided into four types according to their clustering analysis and morphological characters. Nine populations from Henan, Hubei and Shanxi displayed high similarity and be clustered into one type, while the other 3 populations from Yangxian Shanxi, Baise Guangxi and Xingzi Guangdong respectively showed great differences and could be divided into isolated type.

5) The cross were underdone in different types with significant diversity, and 46 F1 were obtained after the cross -seed germinated. The differences between parents and offsprings were investigated, as a result 3 F1 were not identical with their parents in strips. The results of pollination process showed the burgeoned pollen-tubes grew slowly, and the growth is limited to ovary or ovule in *E. binata*. So the degree of apomixis is very high in *E. binata*, approximately 93.5%.

The results showed that *E. binata* is a heterotetraploid plant with 40 chromosomes. The 12 populations of *E. binata* could be divided into four types: Nine populations from Henan, Hubei and Shanxi (type I), Xingzi Guangdong (type II), Yangxian Shanxi (type III), Baise Guangxi (type IV). The genetic results showed the *E. binata* is facultative apomixis plant.

Keywords: *Eulaliopsis binata*; apomixis; cytology; RAPD; genetics

第一章 课题的提出与文献综述

1 课题的提出及研究的目的和意义

无融合生殖是一种特殊的生殖方式，它避免减数分裂和受精过程，由母体胚胎组织通过无性途径形成种子。无融合生殖对于提高作物种质是一个有诱惑力的性状，由它可介导形成大量遗传上一致的种群并且可以继承上一代的杂种优势。无融合生殖在育种上具有许多农艺学的优势：迅速的产生和繁殖优势性状的种子；减少育种的资金与时间；避免了有性生殖相关的复杂性问题，比如授粉和杂交的兼容性；也避免了在营养繁殖中非常典型的病毒传递，如马铃薯（Hanna, 1995; Koltunow et al., 1995; Jefferson et al., 1996; Savidan, 2000）。而令人遗憾的是迄今在栽培作物中尚未发现可直接利用的无融合生殖材料。因此在作物育种和种子生产中，利用无融合生殖的策略有：1) 发掘和利用作物近缘无融合生殖物种，通过有性杂交向作物转育无融合生殖特性；2) 定位和分离自然的专性或高度无融合生殖基因，利用基因工程将其转移到作物中（Koltunow, 1995; Koltunow et al., 2003）。

禾本科植物龙须草 (*Eulaliopsis binata*) 是一种优质的造纸原料植物和优良的水土保持植物 (Gupta, 1984; 王清锋, 1993; 张友德等, 1993b), 并且是高光效 (C4 植物) 植物 (张友德等, 1994b、1994a; 邹冬生等, 2000a)。更有意义的是近年来发现其具有无融合生殖现象 (张友德等, 1996)。中国作为龙须草的物种起源地和主要的自然分布区, 有丰富的龙须草资源 (南京大学生物系, 中国科学院植物研究所, 1959; 刘亮, 1994)。由于龙须草的经济价值有限, 对这种野生植物的研究仅局限于形态结构、栽培管理、生态作用、造纸性能等方面。近年来杨小菊、姚家玲等人的研究, 证明龙须草为无融合生殖植物 (杨小菊等, 1998; Yao 等, 2004)。姚家玲等利用 AFLP 分子标记技术, 结合形态学特征观察和叶片纤维素等成分含量的测定, 将来自湖北武当、郧县, 河南淅川、西峡, 广西白色, 陕西洋县等 4 个省的龙须草居群划分为 4 种生态型: 窄叶类型 (湖北)、浓绿叶类型 (广西)、红杆类型 (陕西)、宽叶类型 (河南) (姚家玲等, 2004)。陈智慧等在此基础上, 对窄叶型和红杆型龙须草花粉活性及结实率与其无融合生殖的关系研究中发现, 龙须草花粉对其种子形成没有实质性贡献, 龙须草具有很高的无

融合生殖程度，是优良的无融合生殖基因供体（陈智慧等，2005）。但对龙须草种质资源及遗传多样性、细胞学、遗传规律等研究十分缺乏。鉴于被子植物中无融合生殖植物的稀少和宝贵，以及无融合生殖研究的重要理论和实践意义。本研究通过根尖压片确定其体细胞染色体数目，分析其核型和花粉母细胞减数分裂过程中染色体的行为和变异，判断龙须草的倍性水平和多倍体类型，检测龙须草种群内是否存在不同倍性的个体，为进一步研究不同倍性个体间的生殖方式、遗传特点提供细胞学资料，同时也为其种质资源的研究鉴定和系统进化提供细胞学依据；从前期的分子标记结果来看，分布于我国的龙须草物种内至少存在不同的类型，表明龙须草的系统分类和种内遗传多样性有必要深入研究。本实验扩大了国内龙须草主要分布区的资源收集，共采集 5 个省份的 12 个自然分布区居群（湖北郧西、郧县、杨溪镇、丹江口、凉水河，河南内乡、淅川、西峡，陕西洋县、山阳，广西百色、广东星子山等），利用 RAPD 分子标记和形态学观察，分析居群间的遗传差异，并划分出不同的类型，为遗传学研究提供依据，同时为其系统分类提供分子水平的参考；以不同类型的龙须草为材料，通过田间杂交试验，检测子代与亲本的遗传差异，分析龙须草的无融合生殖程度，为进一步研究龙须草无融合生殖遗传规律和分子机理，为定位、克隆无融合生殖基因奠定基础。同时对其它材料的无融合生殖研究也有一定的借鉴作用。

2 龙须草的研究现状

龙须草 (*Eulaliopsis binata*) 俗称蓑衣草，羊胡子草，羊草等，属禾本科 (*Gramineae*) 黍亚科 (*Sumfam Panicoideae*) 甘蔗族 (*Trib Saccharene*) 楔颖草亚族 (*Subtrib Apocopidinae*) 拟金茅属 (*Eulaliopsis Honda*)，多年生高光效纤维草本植物，分蘖能力很强（耿以礼，1965；刘亮，1988）。主要分布于印度、伊朗、菲律宾、越南、缅甸等东南亚及中亚地区，中国也是龙须草的主要分布区之一。龙须草主要生长于我国秦岭以南地区，湖北西北部，湖南南部、西南部，广西西南部、西部、西北部，云南大部分地区，广东连洲地区，贵州的黔南、黔东南、黔西南及安顺、铜仁地区，四川东部、东北部、南部，陕西汉中、安康地区及河南南阳地区广有分布（刘亮，1994）。龙须草作为一种优质的造纸原料、良好的编织材料和优良的水土保持植物（陈之伦，1990；张友德等，1993a），80

年代后逐渐有人对其栽培管理、形态解剖、生理活性、开花习性、及分蘖规律等进行了研究(张友德等, 1993b; 张友德等, 1994a; 张友德等, 1994b)。近年来, 张友德、杨小菊等对窄叶型龙须草进行了初步的胚胎学研究, 认为其成熟胚囊是4细胞大黍型无孢子生殖胚囊(张友德等, 1996; 杨小菊, 1998a)。此后, 姚家玲等对窄叶型龙须草和红杆型龙须草大孢子的发生, 胚囊的起源, 发生和发育, 胚的起源, 胚乳的产生等过程进行了系统研究, 得到了龙须草无融合生殖的证据, 探明了龙须草胚和胚乳的发育可以不经过受精而分别由卵细胞和极核自发分裂形成; 并对其龙须草的花粉发育过程进行了观察, 其雄性配子的发育过程类似于其它有性生殖的禾本科植物, 最后形成3细胞型成熟花粉粒(杨平仿, 2002; Yao jia-ling et al., 2004)。姚家玲等利用 AFLP 分子标记技术, 结合形态学特征观察和叶片纤维素含量、成分等的测定, 将龙须草划分为4种类型: 窄叶类型、浓绿叶类型、红杆类型和宽叶类型(姚家玲等, 2004)。陈智慧等对窄叶型和红杆型龙须草花粉活性及结实率与其无融合生殖的关系研究中发现, 龙须草花粉对其种子形成没有实质性贡献, 龙须草具有很高的无融合生殖程度, 是优良的无融合生殖基因供体(陈智慧等, 2005)。有关龙须草的系统分类学研究资料较少, 中国高等植物图鉴和中国植物志以及刘亮在其禾本科黍亚科的分类系统中, 描述拟金茅属只有龙须草一个种类(耿以礼; 1965 刘亮, 1988)。但印度学者 Sur (Sur, 2001) 对拟金茅属的修订中指出这个属内有三个种, 分别是: *Eulaliopsis binata* (Retz.) C.E. Hubb. ; *E. duthiei* Sur ; *E. sykesii* Bor. 他认为这三个种在印度都有分布, 在中国大陆、中国的台湾地区和菲律宾群岛的龙须草自然分布区只有 *E. binata* 这一个种类。此外, 与植物无融合生殖密切相关的细胞学研究, 如龙须草的染色体数目、核型特点和倍性水平等细胞学资料尚处空白。

目前有关龙须草的研究结果表明, 龙须草为无融合生殖植物, 且某些居群无融合生殖程度较高, 接近专性, 而关于龙须草种质资源鉴定和种内遗传多样性、细胞学、遗传规律等研究十分缺乏, 限制了对龙须草无融合生殖机理的深入研究和实际应用。

3 植物无融合生殖研究概况

3.1 植物无融合生殖的概念和类型

无融合生殖是相对于有性生殖的雌雄配子融合而言，广义的无融合生殖 (apomixis) 是指不经过雌雄配子的融合而繁衍后代的生殖方式，对被子植物来说是指在胚珠内不发生受精作用而产生种子的生殖方式。植物中的无融合生殖曾经是个很广泛的概念，Maheshwari (Maheshwari, 1950) 将包括营养繁殖所有的无性繁殖都归在无融合生殖的范畴内，后来 Battaglia (Battaglia, 1963) 定义无融合生殖只限定为发生胚珠内的、不经过受精作用而形成种子的生殖方式。胡适宜 (胡适宜, 1981) 则将珠心等体细胞经过胚胎发育形成的不定胚也归在无融合生殖的范畴。虽然对无融合生殖的确切定义研究者们一直都存在争论，但从实际应用价值及其对作物改良的意义出发，目前植物中无融合生殖一般专指二倍体无融合生殖，是一种发生在胚珠内的不经过减数分裂和受精作用形成胚(种子)的生殖方式，根据生殖中是否有胚囊形成，分为配子体无融合生殖和孢子体无融合生殖，而配子体无融合生殖包括无孢子生殖和二倍体孢子生殖，孢子体无融合生殖是指不定胚生殖 (Nogler, 1984a; Asker, 1992; Koltunow, 1993)

3.2 植物无融合生殖的细胞学研究及多倍体化

植物的无融合生殖跟植物的倍性水平有着特殊的关系。通常配子体无融合生殖跟高倍性有关，在自然界很少有能进行配子体无融合生殖的二倍体植物，而进行配子体无融合生殖的草本植物则都是多倍体的 (Asker, 1992)。雀稗属 80% 以上的种是多倍体，这些多倍体种群中约 50% 是四倍体种群，且基本上都具无融合生殖现象 (Quarin, 1996)。在雀稗属普通种百喜草 (*bahiagrass, paspalum notatum* $2n=4x=40$) 具无孢子生殖方式，与此对应的二倍体 *paspalum notatum var. saurae* ($2n=2x=20$) 则是有性生殖种，而当它用秋水仙素加倍后，有三分之二的后代具兼性无融合生殖特性，这也说明二倍体植物也具有无融合生殖基因，但它的表达有倍性依赖性 (Camilo L et al., 2001)。禾本科是被子植物中包含无融合生殖种类最多的科 (Asker, 1992; Anna, Ueli, 2003; Brysting et al., 2003)。黄群策等 (黄群策, 1999; 马国华, 2001) 总结出禾本科 42 属 166 种植物为无融合生殖植物，且都为多倍体，其中 32 个属 102 个种类为无孢子生殖类型。

对无融合生殖植物多倍体化问题不同学者有不同的认识。一种认为无融合生殖的理想表达只能与多倍体的染色体组存在相关联(Quarin, 2001; Roodt, Spies, 2003), 因为很少二倍体配子体无融合生殖的植物被报道, 且一些有性生殖植物染色体加倍后出现无融合生殖体(Camilo L et al., 2001)。但大量的诱导产生的多倍体植物并未发现无融合生殖现象, 相反的事例是 Asker 所描述的无融合生殖植物 *Potentilla argenta* 染色体加倍后恢复了有性生殖(Asker, 1992)。由此一些学者认为多倍体并不一定是无融合生殖表达的必要条件, 多倍体也许只是促进无融合生殖表达而不是保证无融合生殖性状的存在(Galltski, 1999)。有关无融合生殖与多倍体化的关系和机制仍需进一步的研究。

3.3 植物无融合生殖的遗传学基础

自从 1841 年, Smith 首次报道雌、雄异株的三稜菖属植物 *Achornea ilicifolia* 不经传粉产生种子的现象, 至今对无融合生殖研究的 160 多年的历史中, 已在 40 多个科的 400 多种被子植物中发现无融合生殖现象。根据无融合生殖发生的程度有专性(obligate)和兼性(facultative)之分(Carman, 1997)。专性无融合生殖个体的后代都通过无融合生殖产生, 不需经过减数分裂和受精作用, 其子代可以保持遗传的纯合性和稳定性。而兼性无融合生殖个体同时具有有性生殖和无融合生殖能力, 有性生殖胚囊和无融合生殖胚囊在同一胚珠中和不同胚珠中共同发育, 因此兼性无融合生殖个体的后代在遗传上是不一致的, 来自无融合生殖的后代是纯合的母本型, 来自有性生殖的是杂合体, 其后代会发生性状和生殖方式的分离(Anonymous, 2001)。

在大多数现在的研究系统中, 均报道配子体无融合生殖的遗传是由一个或少数几个位点进行传递的。在进行无孢子生殖的草本植物 *Pennisetum* (Sherwood et al., 1994)、*Panicum* (Savidan, 1983) 和 *Brachiaria* (Valle et al., 1994) 中, 其无融合生殖是通过一个显性基因进行性状传递的简单遗传。双子叶 *Ranunculaceae* 科(Nogler, 1984b) 和 *Hieracium* 科(Bicknell et al., 2000) 的一些无孢子生殖植物无融合生殖性状也被报道为简单的显性遗传。在二倍体孢子生殖植物中, 进行二倍体孢子生殖的蒲公英 *Taraxacum* (Van Dijk et al., 1999) 和 *Erigeron* (Noye, 2000) 为独立遗传, Voigt 和 Burson 报道了进行二倍体孢子生殖的 *Eragrostis curvula* 为简单显性遗传 (Voigt and Burson, 1983)。

虽然无融合生殖性状是由一个基因位点或少数几个基因位点控制的观点已经被大多数学者接受，但是在分析遗传学数据时仍有许多疑问。在上面提到的一些例子中，无融合生殖的遗传学研究都是通过与亲缘关系相近的有性生殖种杂交并分析的，在这些研究中，无融合生殖的表达常常限制了亲本花粉的利用。而且回交也鲜有报道，并且母性效应仍然普遍的没有被检测。Nogler (1984) 认为无融合生殖是一个复合的性状，应该通过后代遗传产物来进行严格的检测，并辅以细胞学研究确认每一个子代的生殖模式，并且评估所有后代的倍性，这些增加了无融合生殖遗传分析的困难，也很耗时间 (Bicknell, 2001)，在无融合生殖植物山柳菊 *Hieracium* 中，并不能确定一些进行孤雌生殖的胚囊是否来源于不减数的卵细胞。回顾以往 *Hieracium* 的研究数据，结合最新的研究结果，Bicknell 认为控制无融合生殖的位点数被低估了，它至少表现出三个不连锁的显性位点以保证自发二倍体无孢子生殖性状在 *Hieracium* 中完整传递，而不是只包含一个位点 (Bicknell, 2004)。

在解释一些发表的无融合生殖遗传学数据的另一个困难是，这些数据往往把无融合生殖解释成为质量性状，这个性状的特点是或者遗传或者不遗传。但是无融合生殖在大多数的植物中是兼性表达的，并且通过有性生殖产生的种子在亲本个体中变化相当大。遗传学研究的一个普遍现象是，F1 代的无融合生殖的表达程度比无融合亲本低 (Koltunow et al., 2000)，这个效应有很深远的意义。在对 *Hieracium* 的遗传学研究发现，大多数 F1 代表达无融合生殖性状的仅为总种子数的 5%，然而在亲本中无融合生殖个体要占到 98% (Bicknell et al., 2000)。这些现象引发了对无融合生殖的重新思考，即无融合生殖性状可能不是简单遗传或者像常常被报道的在自然系统中被简单控制。

3.4 无融合生殖的细胞学研究

如前所述，已报道的配子体无融合生殖植物，绝大多数都是多倍体的，而它们中有性生殖的个体或近缘有性种类一般是二倍体 (Asker, 1992)。在无融合生殖研究过程中，无融合生殖植物染色体数目和倍性的研究，成为筛选和鉴定具不同生殖方式个体和种类的重要方法，并为无融合生殖遗传学研究提供细胞学资料。近年来，在无融合生殖研究中随着新方法和新技术的发展，如 Matzk 采用流式细胞计，检测了 32 种专性、兼性无融合生殖和有性生殖的单子叶、双子叶植

物的成熟种子，甄别其生殖方式，结果显示成熟种子中的胚和胚乳细胞的相对 C 值很好地反应了其生殖方式 (Matzk, 2000)。目前流式细胞计在鉴定植物地相对倍性中，已成为一种快速、简便且较准确的方法。而传统的根尖或茎尖压片和涂片方法，因其具有直观和准确等优点仍然被广泛应用。

核型分析、带型分析和花粉母细胞减数分裂终变期染色体构型分析成为鉴定物种倍性水平和多倍体类型的有效手段。

对于细胞中的染色体进行分组，并对每条染色体的形态特征进行细致的观测和描述，即为核型分析 (刘大钧, 1999)。染色体核型分析对于细胞遗传、细胞分类以及遗传工程的研究都是十分基本而必要的。目前已经对一些经济植物或有特殊研究和应用价值的植物染色体进行了观察和分析，并制作了一些植物的染色体图谱 (利容千, 1989; 陈瑞阳等, 2003)。染色体分带是 20 世纪 70 年代初兴起的一项细胞学新技术，它借助特殊的处理程序，使染色体的一定部位显示出深浅不同的染色带纹。这些带纹具有物种及不同染色体的特异性，每条染色体上带的数目、部位、宽窄、与浓淡具有相对的稳定性，从而在以往染色体形态特征之外又增添了一类新的标志，可以更有效地鉴别染色体个体性和研究染色体地结构和功能，且在植物染色体组及物种倍性地判断中也有着重要意义。

Stebbins 将多倍体分为同源多倍体、异源多倍体、同源异源多倍体和区段异源多倍体 (Stebbins, 1947)。在确定多倍体的类型时，需考虑多倍体供体亲本的染色体构型、多倍体杂种后代的染色体配对及育性等因素，而染色体的配对构型和频率则是主要的判断依据。因同源多倍体染色体联会不正常，在前期常出现多价体和单价体联会不正常，如同源四倍体的同源染色体可以在同一时间配对形成四价体 (Wu et al., 2001)。而在后期的花粉母细胞中会有染色体落后和微核现象 (邢少辰等, 2001)，庄东红和石田雅士还在柿树 (*Diospyros kaki L.*) 减数分裂中发现“拟多价体现象”，即几个二价体重叠或紧挨在一起，这是多倍体减数分裂中期 I 的特殊现象 (庄东红等, 2000)。但同源多倍体的染色体配对因受繁殖世代、二倍体供体亲本的染色体配对构型及其他的配对控制机制等的影响表现较为复杂。有研究者已经报道过没有多价体的同源多倍体 (Chen et al., 1995)，也有人指出二倍体供体亲本中环状二价体对四价体形成的贡献明显大于棒状二价体 (Lavania et al., 1991)，而且限制性近端交叉位点的存在也会影响同源

四倍体中多价体的形成 (Khazanehdari et al., 1995)。因此确定同源多倍体时需考虑这些因素。一般异源多倍体的确定较为简单, 只需根据多倍体物种减数分裂中期 I 的二价体配对构型就可以确定 (Wu et al., 2001)。

3.5 无融合生殖的分子生物学研究及进展

一些分子标记技术 RAPD、RFLP、AFLP、ISSR, 以及 cDNA 差异显示和 mRNA 原位杂交等技术的应用极大的促进了植物无融合生殖的研究。特别是一些和无融合生殖相关的 DNA 片断的发现, 为深入了解其无融合生殖遗传机理和分子机制带来了希望。

RAPD 分子标记技术是由 Williams 等和 Welsh 等两个课题组几乎同时提出的一种分子标记技术 (Williams, 1990)。其基本原理是采用单个或多个 10 碱基随机引物, 通过多聚酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 对 DNA 进行体外扩增, 然后经过电泳获得多态性图谱作为遗传标记的方法。它具有简便、快速、费用低和多态性检出率高等优点, 在植物种质资源研究和遗传育种领域的应用非常广泛, 近几年在无融合生殖遗传学研究中也发挥了重要作用。无融合生殖个体与有性生殖或与其近缘种杂交, 利用 RAPD 分子标记可以简单、准确、快速地鉴定杂交后代来自无融合生殖还是有性生殖 (张开春等, 1997; Kim et al., 1999; Casa et al., 2002; Hovmalm et al., 2004)。在有性生殖的 *Brachiaria ruzizensis* 和无孢子生殖 *Brachiaria brizantha* 的杂交后代中, Martinez 等用 184 个引物进行 RAPD 分析, 发现 OPC4 引物扩增后得到一特异片段, 该片段与无融合生殖有关 (Martinez et al., 2003)。

RFLP 标记是应用最早的 DNA 标记技术。因其稳定性好, 目前仍是使用较普遍的分子标记。在植物无融合生殖研究中, Lebanc 采用 RFLP 标记识别玉米和摩擦禾杂交后代的无融合生殖植株, 并找到了一个与二倍体孢子生殖紧密连锁的基因片段, 已将该标记定位在玉米第 6 条染色体长臂末端 (Martinez et al., 2003; Pupilli et al., 2004)。Roche 等利用 RFLP 技术, 从非洲狼尾草分离出无融合生殖特有的 12 个分子标记, 并以此为探针进行分子杂交, 结果发现有 6 个标记在无融合生殖后代中存在, 其中 5 个与无孢子生殖紧密连锁, 另外一个在无融合和有性生殖后代中都存在 (Roche et al., 2002)。在蒺藜草 (*Brachiaria brizantha*) 有性生殖的和无孢子生殖的杂交后代中, Pessino 等进行 RFLP 分析,

结果发现 2 个标记 umc72、umc147 与无孢子生殖有关，目前已将这两个标记定位于蒺藜草的 1 号染色体长臂末端和 5 号染色体短臂上 (Pession, 2001)。

AFLP 标记 AFLP 是 Vos 发明的一项专利技术,其实质是 RFLP 和 RAPD 两项技术的结合 (Vos, 1995)。其基本原理是基于对限制性酶切片断的选择性扩增。基因组 DNA 被限制性内切酶酶切后,在限制性片断末端连上双链接头,根据接头序列和相邻的限制性位点序列设计引物,对限制性酶切片段进行扩增,扩增产物经电泳检测后再比较其谱带的差异。AFLP 技术具有高分辨率、高重复性与高灵敏度,且为共显性等特点。AFLP 标记随机分布于整个基因组,后代分离遵循孟德尔遗传规律 (熊立仲等, 1998)。因此,该技术一经问世就被迅速用于品种鉴定、亲缘关系分析、体细胞无性系变异的检测、遗传图谱的构建、基因定位和克隆、基因表达研究等 (贾继增, 1996)。

第二章 龙须草核型分析和花粉母细胞 减数分裂的细胞学研究

1 前言

植物细胞内相对稳定的染色体数目、大小、形态和结构，代表了一个种的特点（利容千，1989；Wang et al., 1991；王琼等，2001）。龙须草（*Eulaliopsis binata*）染色体数目和倍性的研究，可以检测龙须草种群内是否存在不同倍性的个体，为进一步研究不同倍性个体间的生殖方式、遗传特点提供细胞学资料，同时也为其种质资源的研究鉴定和系统进化提供细胞学依据。龙须草为禾本科黍亚科拟金茅属多年生草本植物，主要分布于东南亚及中亚地区，我国主要分布于秦岭以南丘陵山地（刘亮，1988）。龙须草作为水土保持先锋植物和优良的造纸原料，前人的研究主要集中在其基本形态特征、田间栽培管理及水土保持效率等方面（周茂堂等，1990；胡德林等，1994；邹冬生等，2000；喻夜兰等，2004）。近年来杨小菊、姚家玲等人的研究，证明龙须草为无融合生殖植物（杨小菊等，1998；Yao et al., 2004）。但龙须草的细胞学研究尚为空白。植物的无融合生殖特性与其倍性水平有着特殊的关系，已发现的无融合生殖物种，大多存在不同的倍性类型，一般高倍体的进行无融合生殖，低倍体的进行有性生殖（Asker et al., 1992；Tamara et al., 1999；Camilo et al., 2001；Urbanil et al., 2002）。黄群策等总结出禾本科黍亚科21个属的91个种类为无融合生殖植物，且都为多倍体（黄群策，1999）。因此龙须草的染色体数目和倍性水平是深入研究其无融合生殖与倍性水平的关系、遗传特点及系统进化的基础。本研究以来自4个省的5个居群的龙须草为材料，通过根尖压片确定其体细胞染色体数目，通过分析其核型和花粉母细胞减数分裂过程中染色体的行为和变异，判断龙须草的倍性水平和多倍体类型。

2 材料和方法

2.1 试验材料

试验材料龙须草植株和种子于 2004 年 7 月采自湖北丹江口, 湖南衡阳, 河南内乡、西峡, 陕西山阳 4 个省份的 5 个自然分布区, 草菟采回后移栽到华中农业大学实验基地。种子采回后干燥备用。

2.2 试验方法

2.2.1 根尖细胞染色体制片及观察

取龙须草种子萌发的根尖(长约 0.5 cm), 用饱和对二氯代苯+ α -溴代萘前处理 2.5 h (15~20 °C), 水洗后用卡诺(Canoys)固定液(无水乙醇:冰醋酸=3:1)固定 2~24 h, 然后用 1 mol/L 的 HCl 解离 10 min (60 °C 水浴), 充分水洗后采用改良的卡宝品红染色, 压片镜检, 观察统计染色体数目, Olympus BH2 显微镜观察, CCD 摄影。

2.2.2 根尖细胞染色体的核型分析

核型分析采用李懋学, 陈瑞阳和 Levan 等的植物核型分析标准(陈瑞阳等, 2003; Levan et al., 1964)。核型分类按 Stebbins 的分类标准(Stebbins, 1971)。见(附录 I)。利用 Simple PCI (C-IMAGING, PA, USA) 专业图像分析软件进行染色体长度的测量, 利用 LUCIA Cytogenetics (C-IMAGING, PA, USA) 染色体图像分析系统进行染色体核型配对。从湖北丹江, 河南西峡, 内乡, 陕西山阳四个龙须草根尖染色体图片中, 分别选取 5 个典型的中期细胞进行测量, 求其平均值, 制成染色体参数表, 绘制核型模式图, 选择具有代表性的分裂相排成核型(河南西峡居群)。

2.2.3 花粉母细胞减数分裂过程中染色体行为的观察

于龙须草初花期, 取幼穗(长约 0.8~1.5 cm) 用卡诺固定液固定 24 小时后, 转入 70% 酒精 4°C 保存备用。采用酶解压片法制片: 蒸馏水洗去固定液后, 将花药置于载玻片上, 滴加一滴 2% 的纤维素酶(上海伯奥生物科技公司, 批号: 05128) 和 1% 的果胶酶 (*Aspegillus niger*, 6036-2) 混合酶液酶解 20min (37 °C), 用滤纸吸去酶液, 卡宝品红染色, 压片, Olympus BH2 显微镜观察, CCD 摄影。

3 结果与分析

3.1 龙须草根尖细胞染色体数目

每个居群观察 30 个以上根尖, 每个根尖观察 10~20 个分散良好的中期细胞, 取其平均值作为根尖细胞染色体数目, 结果见表 2-1。观察根尖最多的为湖北丹江居群, 有 92 个; 湖南衡阳居群只观察了 35 个根尖。每个居群含 40 条染色体的根尖数目都在 93% 以上。5 个居群共观察 326 个根尖, 其中 308 个根尖细胞具有 40 条染色体, 占 94.47%, 因此龙须草体细胞染色体数目为 40, 即 $2n=40$ 。观察中发现有 18 个根尖细胞染色体数目多于或少于 40, 有 80、60、30 和 20 等, 还有一些根尖细胞具有非整倍染色体数, 这些占观察根尖数的 5.53% (图版 I: 1-4)。这一结果表明, 龙须草根尖细胞染色体存在一定的自然变异, 种群中可能存在不同倍性的个体。但不同居群间龙须草的根尖细胞染色体数目没有明显差异。

表 2-1 不同居群龙须草的根尖细胞染色体数目
Table 2-1 Chromosome numbers in root tip cells of five populations
of *Eulaliopsis binata*

居群 populations	观察根尖 (个) No. of root tips observed	40 条染色体的根 尖 (个) No. of root tips containing 40 chromosomes	其它数目染色体根 尖 (个) No. of root tips con- taining variable chromosomes other than 40	40 条染色体根尖的百 分率 (%) Percentage of root tips containing 40 chromosomes
湖北丹江 Danjiang Hubei	92	87	5	94.53
湖南衡阳 Hengyang Hunan	35	33	2	94.28
河南内乡 Neixiang He nan	82	78	4	95.12
河南西峡 Xixia He nan	60	56	4	93.33
陕西山阳 Shanyang Shanxi	57	54	3	94.73
合计 sum	326	308	18	94.47

3.2 龙须草根尖细胞染色体的核型分析

用 Simple PCI 专业图像分析软件对 5 个根尖细胞典型的中期染色体进行长度测量, 并计算出核型参数, 结果见表 2-2。龙须草染色体形态较小, 平均绝对长度为 $3.820 \pm 0.415 \mu\text{m}$, 四个居群的龙须草在染色体形态特征上没有显著差异。龙须草 40 条染色体相对长度每两条相似, 20 对染色体, 除了第 6 对和第 11 对为近中部着丝粒染色体外, 其余 18 对都为中部着丝粒染色体, 表现出较高的对称性, 臂指数 (N.F.): 80。最长的染色体与最短的染色体长度比为 2.6356, 大于 2: 1 的比值, 且没有臂比大于 2: 1 的染色体, 根据 Stebbin (1971) 的核型

表 2-2 龙须草核型分析参数表

Table 2 Parameters obtained in karyotype analysis of *Eulaliopsis binata*

染色体序号 Chromosome No.	相对长度 Relative length/% (S+L=T)			相对长度 系数 Index of relative length	着丝粒指 数 Centromere index/%	臂比 Arm ratio (Long/ Short)	类型 Type
1	1.516	2.332	3.848	1.540	39.397	1.538	m
2	1.682	1.998	3.679	1.471	45.741	1.199	m
3	1.574	1.848	3.422	1.369	46.032	1.174	m
4	1.475	1.822	3.297	1.319	44.746	1.243	m
5	1.241	1.868	3.109	1.243	39.837	1.613	m
6	0.992	1.789	2.781	1.112	35.671	1.804	sm
7	1.148	1.567	2.715	1.086	42.203	1.433	m
8	1.136	1.423	2.559	1.023	44.416	1.263	m
9	0.988	1.534	2.523	1.009	39.202	1.583	m
10	1.041	1.424	2.467	0.987	42.272	1.378	m
11	0.862	1.503	2.365	0.946	36.448	1.744	sm
12	0.919	1.340	2.259	0.904	40.669	1.462	m
13	0.972	1.247	2.219	0.888	43.786	1.316	m
14	1.040	1.141	2.182	0.873	47.658	1.101	m
15	0.903	1.150	2.053	0.821	43.967	1.277	m
16	0.879	1.057	1.936	0.774	45.383	1.222	m
17	0.823	1.043	1.867	0.747	44.028	1.298	m
18	0.673	1.008	1.681	0.672	39.988	1.501	m
19	0.722	0.857	1.579	0.632	45.706	1.207	m
20	0.654	0.806	1.460	0.584	44.503	1.270	m

注: 相对长度=每一条染色体的长度/染色体组总长度 $\times 100$, 随体长度未计算在内。

Note: The relative length of chromosome=the length of each chromosome/the total length of chromosomes $\times 100$, and the length of satellites is not included in the chromosome length.

分类标准，即按核型中最长染色体与最短染色体之比、臂比值大于 2 的染色体在染色体组中所占的比例，把核型的不对称程度分为 12 个等级，分别为 1A、2A、3A、4A、1B、2B、3B、4B、1C、2C、3C、4C，即由对称向不对称发展，其中“1A”型最对称，“4C”型最不对称，那么龙须草的核型应该为 1B 型。由染色体分析软件计算出的核型参数，得出其核型公式为 $2n=40=18m+2sm$ 。选取其中一个中期分裂相（河南西峡居群），用 LUCIA Cytogenetics 染色体图像分析系统进行染色体配对，染色体核型图见图 2-1，核型模式图见图 2-2。

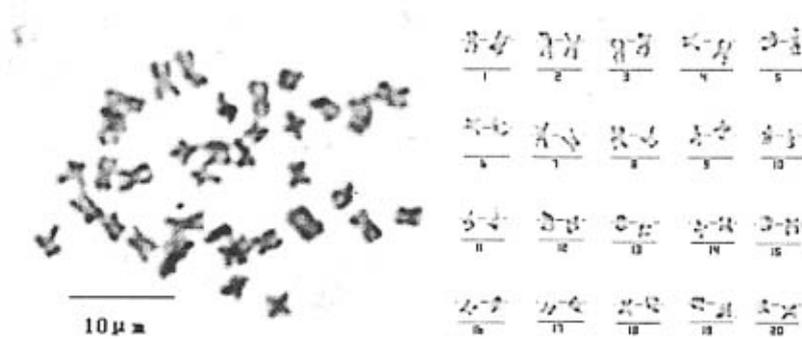


图 2-1 河南西峡居群龙须草根尖细胞染色体和核型

Fig. 2-1 The chromosomes and karyotype of *Eulaliopsis binata* in Xixia He'nan population

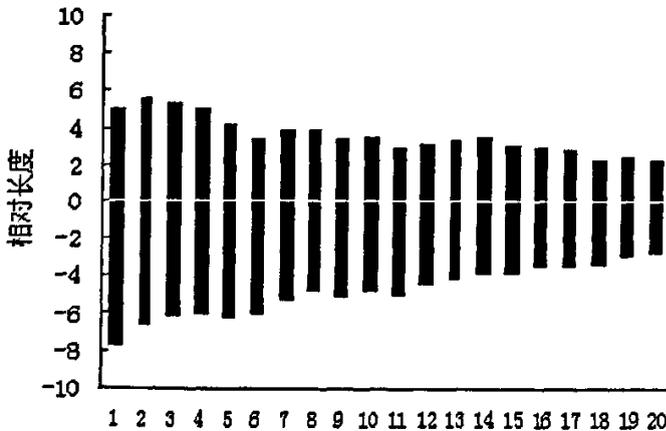


图 2-2 龙须草核型模式图

Fig. 2-2 Idiogram of *Eulaliopsis binata*

3.3 龙须草花粉母细胞减数分裂过程中染色体行为的观察

花粉母细胞减数分裂过程中染色体行为和配对的研究,在植物染色体组分析和多倍体类型的确定中起着重要的作用。我们详细观察了龙须草花粉母细胞减数分裂过程中染色体的行为特点和配对情况,在其减数分裂过程中发现有单价体、多价体、落后染色体和微核等异常现象。

前期 I 在减数分裂前期 I 的细线期,花粉母细胞的核仁开始解体,着色能力越来越弱。此时的染色质螺旋化形成长细丝状的染色体,呈“花束”状形态(图版 I:5)。至粗线期,核仁仍然可见,染色体逐渐缩短变粗,同源染色体配对完成。双线期的染色体进一步浓缩,可见交叉结,能识别棒状和环状染色体(图版 I:6)。终变期的染色体构型为 20 个二价体,即 20 II,二价体构型的形状有棒型、环型、丁字型和十字型,以棒型为主(图版 I:7)。此时还观察到单价体和拟四价体即染色体交叉端化现象(图版 I:8)。共观察终变期细胞 286 个,形成二价体构型的频率为 84.6%。由于龙须草染色体较小,多价体交叉构型不易识别,未统计交叉频率。

中期 I—末期 I 在减数分裂的中期 I,可观察到部分细胞的单价体游离在赤道板外,有的单价体在其它染色体分离前已经到达两极(图版 I:9-11),统计 105 个中期 I 细胞,其中 36 个观察到游离单价体,频率为 34.3%。在后期 I 观察到 32.4% 细胞内有 1~3 个落后染色体随机向两极移动(图版 I:13-15)。这些落后的染色体可能是中期 I 单价体向两极移动而形成的。在末期 I 可以观察到 2 个子细胞之间有明显的细胞板分隔,形成二分体,因此龙须草花粉母细胞的减数分裂为连续型胞质分裂。

中期 II 减数分裂中期 II 持续的时间较短,两个刚分离的子细胞并列在一起,二分体细胞的染色体由纺锤丝牵引定位在两个子细胞中央(图版 I:16)。中期 II 的两个二分体细胞分裂较同步,不同步的频率为 12%,中期 II 依然能观察到有单价体游离在赤道板外,有的已经到达两极。(图版 I:17)

后期 II 在减数分裂的后期 II,二分体细胞的姊妹染色单体发生分离(图版 I:18-19),随后被随机分配到子细胞的两极,染色单体到达两极后即开始解螺旋,当新的核膜核仁开始形成时即进入末期 II。在后期 II 仍然可以观察到滞后染色体,变幅 1~3 个,频率比后期 I 稍低,为 28%。因此,后期 II 落后染色体的出

现可能与进入二分体的单价体继续落后有关。

末期Ⅱ—四分体 减数分裂的末期Ⅱ，到达两极的染色体单体已经解螺旋，子细胞中间形成细胞板，新的核膜和核仁形成，此时在细胞核外观察到微核（图版 I：20），这些微核一直持续到四分体后期小孢子释放出来时（图版 I：23-24）。观察统计了 135 个小孢子，具有微核的有 27 个，频率为 20%，其中具两个微核的占 4.4%。观察结果显示每个小孢子中微核的数目小于后期 I 落后染色体数，具有微核的小孢子少于前期 I 出现落后染色体的细胞。这可能和落后染色体在小孢子发育过程中未能产生核膜而被降解有关。因此龙须草小孢子中的微核是花粉母细胞减数分裂过程中，不配对染色体随机分配到子细胞中形成的。

龙须草花粉母细胞减数分裂完成后，形成十字型排列的小孢子四分体（图版 I：21）。同时也观察到一些染色体分离，胞质不分离的异常四分体（图版 I：22）。

4 讨论

4.1 龙须草核型分析及其意义

染色体是遗传信息的载体，控制细胞的各种生命活动。对于细胞中的染色体进行分组，并对每条染色体的形态特征进行细致的观测和描述，即为核型分析（刘大钧，1999）。染色体核型分析对于细胞遗传、细胞分类以及遗传工程的研究都是十分基本而必要的。目前已经对一些经济植物或有特殊研究和应用价值的植物染色体进行了观察和分析，并制作了一些植物的染色体图谱（利容千，1989；陈瑞阳等，2003）。因此龙须草染色体核型的研究不仅可以为龙须草的起源、进化与分类提供基础资料，填补龙须草细胞学研究的空白，而且可以为龙须草无融合生殖的遗传机理和分子机制的研究提供理论依据。

在染色体核型分析研究中，学界普遍认同的是 Stebbins 的核型分类标准，即按核型中最长染色体与最短染色体之比及臂比值大于 2 的染色体在染色体组中所占的比例，把核型的不对称程度分为 12 个等级，分别为 1A、2A、3A、4A、1B、2B、3B、4B、1C、2C、3C、4C，即由对称向不对称发展，其中“1A”型最对称，“4C”型最不对称。Levitzky 和 Stebbins 关于核型进化的基本观点，认为高等植物染色体核型的进化趋势是由对称向不对称发展，系统演化上处于比较古老或原始的植物，大多具有较对称的核型，而不对称的核型则主要见于衍生

的、特化的以及比较进化的植物类群中 (Stebbins, 1971)。根据这一分类标准, 龙须草的核型应属于“1B”型, 这是一个较不对称的核型, 而龙须草属于禾本科黍亚科拟金茅属植物, 在禾本科的系统进化中, 黍亚科处于比较进化的地位, 龙须草的核型类型对此提供了间接的证据。

4.2 龙须草的倍性分析

龙须草为拟金茅属单种植物 (刘亮, 1988), 为其倍性的研究增加了困难, 但根据黍亚科的系统分类和演化可知, 拟金茅属与甘蔗亚族、高粱亚族亲缘关系较近, 而这两个亚族的植物染色体组的基数多为 10, 如高粱、甘蔗 (刘亮, 1988; 陈瑞阳等, 2003); 此外已研究过并收录在陈瑞阳等编著的《中国主要经济植物基因组染色体图谱》中的 86 种禾本科植物, 有 85 个种类的染色体组基数在 7~12 之间 (陈瑞阳等, 2003)。因此龙须草的染色体组基数可能在 7~12 之间。对植物减数分裂过程中染色体行为的观察常有助于鉴定植物的倍性水平。刘大钧等认为多倍体的非同源染色体在减数分裂过程中, 个别染色体不能进行正常的联会配对, 在中期呈单价体, 在后期随机的移向两极或滞后, 在末期形成微核 (刘大钧, 1999)。在龙须草花粉母细胞减数分裂过程中, 不配对染色体、落后染色体和微核的出现 (频率分别为 34.3%、32.4% 和 20%) 为其是多倍体植物提供了进一步的细胞学证据。大量的根尖细胞制片结果显示, 龙须草体细胞染色体数为 40 条, 表明龙须草是一个四倍体物种。

龙须草核型分析分析结果显示 (图 2-2), 其染色体的对称性较高, 而且 40 条染色体在形态和相对长度上每 2 条基本相同, 则意味龙须草可能是一个异源多倍体类型。Wu 等认为异源多倍体在减数分裂中期 I 的染色体构型为二价体 (郭君祥等, 2004), 龙须草花粉母细胞减数分裂的终变期, 其染色体构型为 20 个二价体, 则表明龙须草的多倍体类型可能是杂种性起源。通常在异源四倍体中出现单价体的频率较低, 而在龙须草减数分裂过程中却出现了较高的单价体频率, 由终变期二价体的形态推测, 可能是 2 个染色体组中不同序号的染色体具有节段同源关系, 结果是来自不同染色体组的具有节段同源关系的染色体配对, 形成一个 II, 另外应正常配对的染色体因配对伙伴的缺失反而成了单价体。

此外, 龙须草为无融合生殖植物。禾本科是无融合生殖植物种类最多的科, 而那些能进行无融合生殖的物种或个体都为多倍体 (黄群策, 1999), Asker 等也

认为在自然界能进行配子体无融合生殖的草本植物都是多倍体。因此综合实验结果和比对分析，我们认为龙须草是一个异源四倍体植物，染色体组基数为 10，即 $2n=4x=40$ 。

已发现的无融合生殖物种，大多存在不同的倍性类型，一般高倍性的进行无融合生殖，低倍性的进行有性生殖，如蒲公英、飞蓬等 (Peter et al., 2003; Nyoes, 2005)。葛传吉等对小花鬼针草染色体数目和自然多倍体类型的研究发现，小花鬼针草的染色体基数 $x=12$ ，存在 $2n=24、36、48、72、84$ 和 96 等不同的倍性，其中 $2n=48$ 所占比例最大，认为小花鬼针草的进化趋势是以 $2n=48$ 为中心向更高倍性发展的种内整倍性变异 (葛传吉等, 1994)。在龙须草的细胞学研究中，一些 $2n=20、60$ 和 80 的倍性变异也被观察到，表明龙须草中可能存在其它倍性的个体，为了进一步研究其倍性水平与生殖方式的关系，了解龙须草在禾本科中的分类地位，有必要对其进行深入的细胞学、分子生物学等方面的研究。

4.3 根尖压片方法的优化

在染色体制片过程中，根尖压片法是最长用且较成熟的一种方法。通常条件下植物材料经过简单地前处理、固定、酸解或酶解后即可制片。在龙须草根尖压片过程中，因其根尖长势较弱、染色体小且较多，为了得到较好结果，本研究对根尖压片法进行了优化。

1) 取材：龙须草根尖长至 0.5 cm 左右时是取材的最好时机，此时龙须草根尖分生区处于分裂最旺盛时期，为得到分散良好的中期细胞，保证了一定数量处于分裂期的细胞。(龙须草种子萌发条件：温度 $26\sim 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，水分要适中)

2) 前处理：饱和对二氯代苯 + α -溴代钠水溶液 (500 ml 对二氯代苯 + 2, 3 滴 α -溴代钠) 处理时间 2~4 h。前处理应注意：温度应在 $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右为宜，若温度高于 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 染色体容易发生粘连，分散不好；处理用的容器也不宜用尖底容器，每一指形管 (或青霉素小瓶) 中，处理 10~15 个根尖为宜，宁少勿多；切取根尖宜短，一般以长 2~3 mm 为宜；遮光条件下处理最好；每隔约半小时，摇动一次。

3) 前低渗：用 0.075 mol/l 的 KCL 溶液进行低渗，前低渗的目的是使细胞吸水膨胀，压片时染色体分散均匀。

4) 固定：卡诺固定液 (纯酒精：冰醋酸 3：1) 固定 30 min 以上，固定后的

材料在一周之内制片效果较好。

5) 解离: 用 1 mol/L HCL, 60 °C 水浴解离 10 min。解离太过一是染色体易丢失, 二是不易着色; 解离不够则细胞不易分散, 不易观察。

龙须草的压片操作中, 在前处理适宜的条件下, 染色体不难分散。难点是染色体太小而通常不易作到极为平整的铺展。在高倍放大的显微镜视野中, 由于景深极小, 常可看到所有的染色体不能同时准焦在一个平面上。其结果导致无法获得平整而清晰的照片。之所以出现上述现象, 主要因为细胞的内含物太多, 或细胞壁未能充分软化所致。为此, 如遇上述情况, 参看聂汝芝、李懋学<<棉属植物核形研究>>, 可采取以下的解离方法加以改善。1) 固定或保存的材料, 转入蒸馏水中清洗 3 次, 每次约 10 min。转入 2% 纤维素酶和果胶酶混合酶溶液中, 于 28~35 °C 酶解 30~60 min。倾去酶液, 加蒸馏水洗几次。用上述固定液重新固定 10~20 min, 直接转入 1 mol/L HCL 中于室温下解离约 10 min。水洗 10 min 后, 既可进行染色和压片。2) 材料经预热 60 °C 的 1 mol/L HCL 解离 15 min 后, 水洗 10~20 min, 转入卡宝品红染色液中染色 2~3 h。倾去染色液, 水洗 30 min。用上法之混合酶水溶液于 37 °C 处理 2~3 h, 水洗 10~20 min, 用 45% 的乙酸压片。

第三章 不同居群龙须草的 RAPD 分析及类型划分

1 前言

龙须草为无融合生殖植物。利用无融合生殖固定作物杂种优势，必须探明其无融合生殖的遗传学机制，因此龙须草种内遗传多样性分析和类型划分，对研究龙须草的遗传规律，进而从分子水平上研究其无融合生殖机制具有十分重要的意义。龙须草的系统分类学研究资料相当缺乏，中国高等植物图鉴和中国植物志以及刘亮在其禾本科黍亚科的分类系统中，都认为拟金茅属只有龙须草一个种类（耿以礼；1965 刘亮，1988）。但印度学者 Sur (Sur, 2001) 对拟金茅属的修订中指出这个属内有三个种，分别是：*Eulaliopsis binata* (Retz.) C.E. Hubb. ; *E. duthiei* Sur ; *E. sykesii* Bor. 他认为这三个种在印度都有分布，在中国大陆、中国的台湾地区和菲律宾群岛的龙须草自然分布区只有 *E. binata* 这一个种类。这些基础研究的缺乏都限制了对龙须草无融合生殖现象的深入研究。

由于无融合生殖避开了减数分裂和受精作用，会导致种群内基因型变异和遗传变异的下降，个体间在形态和遗传上具有较高的相似性，仅从形态学上难以划分种或种以下的单位。RAPD 分子标记技术以其快速、简便、多态性检出率较高的特点，不仅在很多物种种以下水平遗传多样性检测、品种鉴定、遗传图谱构建等研究中广泛应用，而且在无融合生殖遗传学研究的后代鉴定等方面也发挥了重要作用（赵锦等，2003）。本实验采用 RAPD 分子标记技术，研究 5 个省的 12 个龙须草居群之间的遗传差异，并结合形态学特征观测划分出不同的类型，为龙须草的遗传学研究提供分子水平的参考，为进一步开展龙须草分子生物学研究奠定基础。

2 材料和方法

2.1 植物材料

供试的 12 个龙须草居群于 2004 年 7 月采自湖北郧西、郧县、杨溪镇、丹江口、凉水河，河南内乡、淅川、西峡，陕西洋县、山阳，广西百色、广东星子山等 5 个省份的 12 个自然分布区（见表 3-1）。每个居群随机挖取不同草莖，并采

收种子，草薹采回后移栽到华中农业大学实验基地，移栽成活率 95%左右。第 2 年春天，取龙须草幼嫩叶片抽提 DNA。

2.2 形态学观察

第 2 年春季，植株返青后观察记录不同龙须草居群生育期、叶片和茎秆的颜色等形态学特征，并测量植株的茎秆高度和花梗长度求其平均值；种子成熟后，观察各居群种子的颜色，并测量种子大小。

2.3 RAPD 分子标记

2.3.1 植物基因组 DNA 的提取

鉴于龙须草为无融合生殖植物，后代之间较为均一，为更好地代表居群的遗传信息，又不致使试验规模扩大，取样时，从居群中随机取 8~10 个单株，采幼嫩叶片 10~20 mg 混和，用改良的 CTAB 方法提取龙须草总 DNA(卢圣栋,1993)。

2.3.2 RAPD 的 PCR 扩增与检测

DNA 扩增在 PTC DNA Engine™ systemsPCR 仪上进行。PCR 反应体系为 20 μ l，PCR 反应条件：94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min，94 $^{\circ}$ C 变性 1 min，36 $^{\circ}$ C 复性 1 min，72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min，共 45 个循环，最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 扩增产物在 1% 浓度的琼脂糖凝胶中电泳，溴化乙锭染色，在凝胶成像系统中拍照，保存图片。

2.3.3 引物的筛选

筛选了 angon 公司生产的 168 个 10bp 的随机引物，选择扩增条带丰富、重复性好的 16 个引物进行 RAPD 实验，所使用的引物序列及扩增结果见表 3-2。

2.3.4 数据分析

根据 DNA 条带的有无 RAPD 扩增后的结果转化成二元数据矩阵，(有带赋值为 1，无带赋值为 0)。根据 Nei 公式 (Nei, 1979): $F=2NXY/(NX+NY)$ 获得各样品间遗传相似度，其中 NXY 为 2 个样品共同享有 RAPD 标记数，NX、NY 分别为 X 和 Y 样品各自有的 RAPD 标记数，再经 $D=1-F$ 公式计算出相应的遗传距离，通过 NTSYS2.1 软件进行聚类分析，得到聚类关系图。应用 POPGEN32 计算有效等位基因 (ne)，Nei's 基因多样性 (h) 和 Shannon 多样性指数 (I)。

2.3.5 居群间的地理距离

利用北京灵图软件技术有限公司开发的中国电子地图，软件版本为 VRMap2.0，计算得到的居群间直线距离为其地理距离。

3 结果与分析

3.1 形态学观察

对不同龙须草居群的形态特征和生物学习性观察,发现来源于同一地区或相近地区的龙须草居群其形态特征相似,河南、湖北、陕西山阳等9个龙须草居群在植物体茎杆颜色、叶片颜色、生育期、茎高和花梗高度等特征上均较一致;地理距离较远的龙须草居群形态特征上存在一定的差异,陕西洋县、广东星子山和广西百色3个居群龙须草的茎杆颜色、叶片颜色与上述9个龙须草居群相比,颜色较深,且这三个居群龙须草的花梗高度也高于其它9个居群;广西百色龙须草居群的茎杆最高;结实后收获籽粒观察,发现不同龙须草居群的种子大小、形状和颜色等也有差别。具体观察和测量结果见表3-1。

表3-1 12个龙须草居群的来源及形态学特征

Table 3-1 Origin and morphological characters of 12 populations in *E.binata*

居群 Populat- ion	来源 Origin	茎高 (cm) Haulm heigh	花梗长 (cm) Bennet heigh	茎杆颜色 Haulm color	叶色 Leaf color	生育期 Bearing period	种子长度 Length of seed	种子颜色 Colour of seed
1	陕西山阳 Shanyang, Shaanxi	68	60	黄白色 White-yellow	浅绿色 Light-green	四月初~ 五月中 April to Mid-May	2.08	红棕色 Red-brown
2	河南浙川 Xichuan, He nan	67	68	黄白色 White-yellow	浅绿色 Light-green	四月初~ 五月中 April to Mid-May	2.08	红棕色 Red-brown
3	河南西峡 Xixia, He nan	67	65	黄白色 White-yellow	浅绿色 Light-green	四月初~ 五月中 April to Mid-May	2.08	红棕色 Red-brown
4	河南内乡 Neixiang, He nan	65	66	黄白色 White-yellow	浅绿色 Light-green	四月初~ 五月中 April to Mid-May	2.08	红棕色 Red-brown
5	湖北郧西 Yunxi, Hubei	79	66	白色 White	浅绿色 Light-green	四月初~ 五月中 April to Mid-May	2.08	红棕色 Red-brown

6	湖北郧县	82	65	白色	浅绿色	四月初~ 五月中	2.08	红棕色
	Yun county,Hubei			White	Light-green	April to Mid-May		Red-brown
7	湖北杨溪镇	73	67	白色	浅绿色	四月初~ 五月中	/	红棕色
	Yangxi town,Hubei			White	Light-green	April to Mid-May		Red-brown
8	湖北丹江口	79	68	白色	浅绿色	四月初~ 五月中	2.08	红棕色
	Danjiangkou,Hubei			White	Light-green	April to Mid-May		Red-brown
9	湖北凉水河	78	66	白色	浅绿色	四月初~ 五月中	2.08	红棕色
	Liangshuihe,Hubei			White	Light-green	April to Mid-May		Red-brown
10	陕西洋县	69	108	紫红色	深绿色	四月中~ 六月	2.03	深棕色
	Yang county,Shaanxi			Prunusus	Dark-green	Mid-April toJune		Dark-brown
11	广东星子山	68	114	紫红色	深绿色	四月中~ 六月	2.17	黑色
	Xingzishan,Guangdong			Prunusus	Dark-green	Mid-April toJune		Black
12	广西百色	105	100	微红色	深绿色	四月中~ 六月	1.90	深棕色
	Baise,Guangxi			Light- red	Dark-green	Mid-April toJune		Dark-brown

注：以上材料分单株栽培于温室内，生长栽培及管理条件一致。

Note:The materials above were planted in the greenhouse under the same cultural conditions

3.2 多态性引物扩增

从 168 个 10bp 的随机引物中筛选出 16 个具有丰富多态性的引物(见表 3-2)，对 16 个引物的扩增结果进行统计分析，电泳结果(图 3-1，部分引物 RAPD 结果)表明，16 个引物共扩增出 124 条 DNA 片段，其中多态性 DNA 片段 110 条，占总扩增 DNA 片段的 88.7%。扩增条带最多的是 S42，为 12 条；扩增条带最少的是 S67，为 4 条。平均每个引物在 12 个龙须草居群中扩增出 7 条多态性 DNA 片段，说明不同龙须草居群之间存在一定的遗传差异。

表 3-2 RAPD 引物及扩增结果

Table 3-2 RAPD primers and amplified results

引物 Primer	序 列 Sequence (5'-3')	总 带 数 Total bounds	多态性带 数 Polymorphi c bounds	引 物 Primer	序 列 Sequences (5'-3')	总 带 数 Total bounds	多态性带 数 Ploymorphi c bounds
S12	CCTTGACG CA	8	7	S75	GACGGATC AG	8	7
S30	GTGATCGC AG	6	5	S83	GAGCCCTC CA	6	6
S42	GGACCCAA CC	12	10	S87	GAACCTGC AC	8	7
S53	GGGGTGAC GA	10	9	S93	CTCTCCGC CA	8	6
S55	CATCCGTG CT	6	6	S94	GGATGAGA CC	7	6
S65	GATGACCG CC	6	6	S97	ACGACCGA CA	10	8
S66	GAACGGAC TC	10	10	S98	GGTCATG TG	8	7
S67	GTCCCGAC GA	4	4	S149	CTCACCC GA	7	6

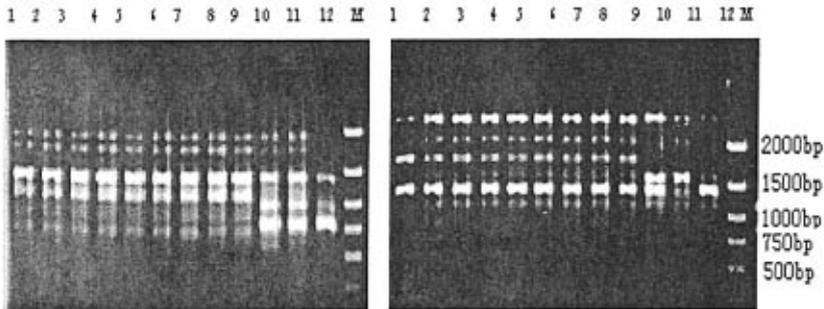


图 3-1 S98、S83 的 RAPD 扩增图谱。

Fig. 3-1 Fingerprints of RAPD products from primers S98、S83

注：M, Marker; 1-12 依次为山阳居群, 浙川居群, 西峡居群, 内乡居群, 郧西居群, 郧县居群, 杨溪镇居群, 丹江口居群, 凉水河居群, 洋县居群, 星子山居群, 百色居群。

Note: M, Marker; 1-12 represent population of Shanyang, Xichuan, Xixia, Neixiang, Yunxi, Yun county, Yangxi town, Danjiangkou, Liangshuihe, Yang county, Xingzishan, Baise, respectively

3.3 遗传距离和聚类分析

由 16 个引物扩增得到的结果, 根据 Nei 公式计算出 12 个龙须草居群间的遗传相似系数 (表 3-3), 结果表明: 12 个龙须草居群的遗传相似系数在 0.48~0.99 之间, 平均遗传相似系数为 0.78。河南浙川居群和内乡居群遗传背景高度一致, 与西峡居群只检测到微小的差异, 遗传相似系数达到 0.96; 来自湖北郧西、郧县、杨溪镇、丹江口、凉水河的 5 个龙须草居群 (编号为 5~9), 也没检测出较大的遗传差异, 遗传相似系数在 0.92~0.93 之间; 然而, 陕西山阳居群 (编号 1) 与同省份的洋县居群 (编号 10) 存在着较大的遗传差异, 遗传相似系数为 0.64, 却与河南、湖北的 8 个居群遗传差异较小; 广东星子山居群 (编号 11)、广西百色居群 (编号 12) 和陕西洋县居群彼此间的遗传差异较大, 其中百色居群与其它居群遗传差异最大, 遗传相似系数为 0.48~0.58。

表 3-3 12 个居群龙须草的遗传相似系数和地理距离

Table 3-3 Genetic similarity coefficient and geographical distance of 12 populations

in *E. binata*

population	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	* *	169	160	200	100	120	127	150	168	250	984	1116
2	0.96	* *	18	47	100	75	68	51	53	405	910	1140
3	0.95	0.96	* *	46	112	83	75	66	71	410	928	1156
4	0.96	0.99	0.96	* *	130	132	103	74	59	440	900	1136
5	0.95	0.97	0.94	0.97	* *	43	50	82	110	300	913	1075
6	0.95	0.95	0.94	0.95	0.96	* *	8	39	68	350	890	1070
7	0.96	0.96	0.95	0.95	0.96	0.96	* *	32	62	342	887	1084
8	0.95	0.98	0.95	0.96	0.96	0.96	0.98	* *	30	380	872	1078
9	0.93	0.94	0.94	0.95	0.92	0.92	0.92	0.93	* *	405	860	1080
10	0.64	0.64	0.64	0.65	0.63	0.63	0.62	0.62	0.64	* *	1034	1029
11	0.59	0.60	0.58	0.59	0.60	0.59	0.58	0.60	0.58	0.76	* *	700
12	0.51	0.50	0.50	0.49	0.50	0.49	0.48	0.48	0.50	0.56	0.58	* *

注: 1-12 依次为山阳居群、浙川居群、西峡居群、内乡居群、郧西居群、郧县居群、杨溪镇居群、丹江口居群、凉水河居群、洋县居群、星子山居群和百色居群。表的上部分为各居群间的地理距离, 表的下部分为各居群间的遗传相似系数。地理距离 (km) 为两居群间的直线距离。

Note: 1-12 represent population of Shanyang, Xichuan, Xixia, Neixiang, Yunxi, Yun county, Yangxi town, Danjiangkou, Liangshuihe, Yang county, Xingzishan, Baise, respectively. Geographical distance (above diagonal) and genetic similarity coefficient (below diagonal) between every two populations. The geographical distance (km) equals the linear distance between two populations.

由聚类结果可以看出,居群间的遗传距离与居群的地理分布呈现一定的相关性(表 3-3),居群间的地理距离越近,遗传相似系数越大。如来自河南、湖北、陕西山阳等 9 个居群之间的地理距离在 8~169 km 之间,其遗传相似系数为 0.92~0.99;山阳居群与洋县居群虽然都来自陕西省,但山阳居群距河南、湖北的 8 个居群较洋县居群近,表现出遗传差异小而聚为一类。陕西洋县居群、广东星子山居群和广西百色居群相互之间的地理距离均在 700 km 以上,相互之间的遗传相似系数也较小。结合形态学观察,将 12 个龙须草居群划分为以下四种类型:来自河南、湖北、陕西山阳等 9 个居群聚为一类,陕西洋县居群、广东星子山居群和广西百色居群各为 1 种类型。

3.4 龙须草遗传多样性分析

对龙须草居群的 RAPD 谱带进行种内遗传多样性分析,结果表明:Shannon 信息指数 (I) 为 0.3590, Nei' s 基因多样性指数 (H) 为 0.2241 (表 3-4),可见龙须草在物种水平上具有较高的遗传多样性。其种内遗传多样性的形成,可能是一些相距较远的居群对不同的地理环境适应的结果。如百色居群距河南、湖北的几个居群均在 1000 km 以上,在表型上也表现出较高的形态多样性。

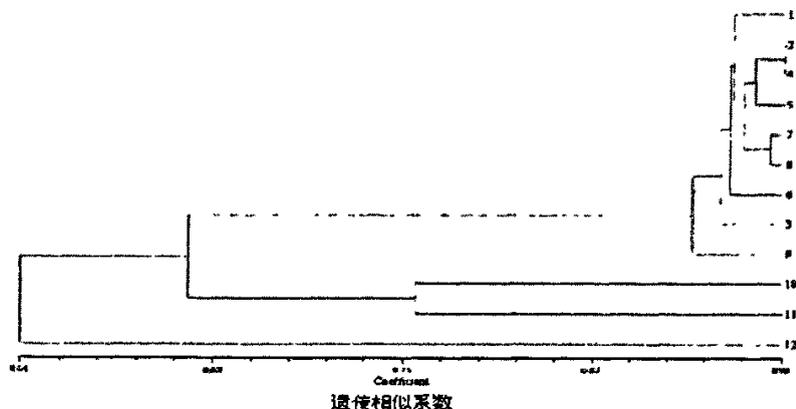


图 3-2 12 个居群龙须草的 RAPD 聚类图

Fig. 3-2 Dendrogram of 12 populations in *E. binata* based on cluster analysis of RAPD loci

表 3-4 龙须草的遗传多样性
Table 3-4 Genetic diversity of *E.binata*

	有效等位基因 (ne) Effective number of alleles	Nei's 基因多样性 (h) Nei's gene diversity	Shannon 多样性指数 (I) . Shannon's Information index
Mean	1.3333	0.2241	0.3590

4 讨论

4.1 龙须草种内的遗传多样性产生和维持的可能原因

龙须草是近年发现的一种新的无融合生殖植物 (Yao et al., 2004), 且某些居群可能具有专性无融合生殖特性。由于无融合生殖种内缺少基因重组和基因交流会导致基因型变异和遗传变异的下降。Daurelio (Daurelio et al., 2004) 对进行有性生殖和无融合生殖的百喜草居群的遗传多样性进行研究, 发现其遗传多样性分别为 0.119 和 0.097, 即无融合生殖降低了居群内的遗传多样性。段惠 (段惠等, 2005) 用 AFLP 技术分析无融合生殖植物紫茎泽兰的遗传多样性, 其 Shannon 信息指数 (I) 为 0.42, Nei's 基因多样性指数 (H) 为 0.29, 认为其具有较丰富的遗传多样性。而龙须草的 Shannon 信息指数 (I) 为 0.3590, Nei's 基因多样性指数 (H) 为 0.2241, 说明其种内的遗传多样性水平也较高。对无融合生殖植物种内遗传多样性产生的机制, Maki 认为可能来自种群的多起源。分析我国龙须草的自然居群, 可能也是多个不同的基因型个体建立起来的, 因而能够保持一定的遗传差异。同时在龙须草种内还发现有兼性无融合生殖类型, 即保留了部分有性生殖能力 (Maki, 1999)。Silander 提出, 兼性无融合生殖植物存在有性重组的机会, 提供了可供自然选择的遗传变异, 产生新的有利基因型通过无融合生殖迅速占领某个地区, 从而补充了因无融合生殖而降低的遗传多样性, 提高了居群间的遗传变异水平并降低了居群内的遗传差异 (Silander, 1979)。

4.2 龙须草居群间的遗传多样性与地理分布的关系

从实验结果可以看出不同龙须草居群之间的遗传多样性与地理分布具有一定的相关性。地理距离较近的河南、湖北、陕西山阳等 9 个龙须草居群聚在一起; 陕西洋县居群、广东星子山居群、广西百色居群相互之间地理距离较远, 遗传差异也较大, 被各划分为 1 种类型。分析认为龙须草主要以无融合生殖和营养繁殖

繁衍后代，变异主要通过突变产生，无法通过遗传重组将这些变异进一步扩散，因此同一地区或相近地区龙须草居群间的遗传差异在大多数情况下很小，相距较远的龙须草居群由于分布的地理环境不同，在长期的进化发展中对环境的适应形成不同的类型（张大勇，2003）。

12 个居群中，陕西洋县居群与其它居群之间的亲缘关系并不遵循地理分布远近的规律，这一居群与陕西山阳居群的地理距离较广东星子山居群近，而与山阳居群的遗传相似系数却比星子山居群的小（分别为 0.64 和 0.76）。这一结果暗示洋县居群的龙须草生殖方式可能是多样化的，产生了较多的遗传变异，其生殖方式值得重点研究。

4.3 RAPD 分子标记技术人无融合生殖研究中的应用

RAPD 分子标记技术近年来在植物无融合生殖研究中得到广泛应用，促进了无融合生殖遗传和分子机理的研究。Ebina 和 Nakagawa 对无融合生殖和有性生殖的大黍及其杂种进行 RAPD 分析，结果发现，在所用的 16 个引物中，8 个可以明显区分无融合生殖和有性生殖植株（Ebina and Nakagawa, 2001）。Ortiz 研究雀稗属的标志雀稗时发现，利用引物 OPG10、OPI04 进行 RAPD 分析，可以区分有性生殖和无融合生殖，而且与胚胎学的研究结果相符（Ortiz et al., 1997）。

本研究结果表明，RAPD 分子标记可以有效地划分龙须草的类型并分析其遗传差异。而且分子标记与形态特征观察的结果基本吻合。但陕西洋县居群和广东星子山居群在形态特征上是一致的，而在分子水平上却表现出一定差异，表明 RAPD 分子标记技术具有较高的多态性检测率，对龙须草类型的划分具有更高的准确性。我们通过胚胎学和细胞学研究，发现龙须草无融合生殖程度很高，有些居群接近专性（数据未发表），而且龙须草在中国为拟金茅属单种，为其遗传学研究增加了困难。通过 RAPD 分子标记技术，寻找到分子水平上有较大差异的龙须草不同类型，通过这些类型间的杂交及后代分析，有助于研究龙须草无融合生殖遗传规律。

第四章 龙须草无融合生殖遗传学研究

1 前言

无融合生殖是一种特殊的生殖方式,它避开了减数分裂和受精过程,由母体组织通过无性途径形成种子。无融合生殖方式会形成大量遗传上一致的种群并且可以继承母体的优势,在农业生产上具有巨大的应用价值。而令人遗憾的是迄今在栽培作物中未发现可直接利用的无融合生殖材料。因此在作物育种和种子生产中,利用无融合生殖的策略有:1)发掘和利用作物近缘无融合生殖物种,通过有性杂交向作物转育无融合生殖特性;2)定位和分离自然的专性或高度无融合生殖基因,利用基因工程将其转移至作物中(Koltunow, 1995; Koltunow et al., 2003)。而这些策略首先要解决的前提就是要摸清无融合生殖的遗传学规律。

龙须草为禾本科拟金茅属单种植物(刘亮, 1988),为其遗传学研究增加了难度。由于远缘杂交困难较大,故本研究首先把分布在国内5个省的12龙须草居群,依据RAPD分子标记和形态特征差别划分出4种类型,遗传差异较大的类型之间进行杂交实验,得到F1代,利用RAPD分子标记技术筛选出类群间亲本特异引物,并通过这些特异引物的特异带型分析子代来源于何种生殖方式,以寻找通过有性生殖产生的后代;并通过观察传粉受精时花粉在柱头上附着和生长的状态,了解花粉的活力以及花粉与种子形成的关系,以便深入研究龙须草的遗传规律,为进一步阐明龙须草无融合生殖机理奠定基础。

2 材料与amp;方法

2.1 植物材料

供试的12个龙须草居群于2004年7月采自湖北郧西、郧县、杨溪镇、丹江口、凉水河,河南内乡、淅川、西峡,陕西洋县、山阳,广西百色、广东星子山等5个省份的12个自然分布区。每个居群随机挖取不同草菹,并采收种子,草菹采回后移栽到华中农业大学实验基地,移栽成活率95%左右。(图版II:1)

通过RAPD分子标记和形态特征观察把12个龙须草居群分为4种类型:类型I为河南、湖北、陕西山阳等9个居群;类型II为广东星子山居群;类型III为

陕西洋县居群；类型IV为广西百色居群（详见本文第三章）。（图版II：2、3）

2.2 龙须草花粉活性的检测

取新鲜的龙须草花粉，置于载玻片上，经 I-KI 染色后，镜检。每片观察 10 个以上的视野，染色深、形状圆且饱满的计为有活性，染色浅或不着色的计为无活性，统计有活性花粉的百分率。

2.3 龙须草传粉过程的观察

在龙须草盛花期，开花当天至花后 1~2d，取刚授粉及授粉后数小时至 2d 的龙须草小穗（每次取样间隔 2h），卡诺固定液（无水乙醇：冰醋酸=3：1）固定 24 h 后，转入 70%酒精 4 ℃保存备用，制片时在解剖镜下剥出子房（保证柱头的完整性），用乳酚棉蓝染色液（1%水溶性苯胺蓝 5 ml+乳酸苯酚 100 ml）染色 5~8 min，在 Olympus BH2 显微镜下观察，Pixera 150 CCD 数码拍摄。

2.4 龙须草田间去雄、杂交试验

于 4 月下旬~5 月份，龙须草盛花期，在开花前 1 d 或开花当天散粉前，完成人工剪颖去雄、人工授粉等操作，用硫酸钠纸袋套袋。6 月中、下旬收获杂交种子并统计结实率。

2.5 龙须草去雄杂交子代生殖来源的检测

2.5.1 杂交后代的种植

将同一杂交处理母本的后代种子 3~4 粒种植于 16X16 网格沙盘的一个网格中，以花肥土灭菌后作为萌发基质，盟发温度 28 ℃，保持土壤湿润。种子萌发后统计萌发率，待小苗长 15 cm 长时分单株移植于 1 一次性塑料杯中。

2.5.2 引物的筛选

在前期对不同居群龙须草的 RAPD 分析和分类研究中，从 168 个随机引物中筛选出 16 个扩增条带丰富、重复性好的引物，（引物号和序列见表 4-1）。本研究从上述 16 个引物中挑选出 5 个引物用于龙须草子代的检测，图 4-1 为其中 4 个引物的 RAPD 扩增图谱，显示父母本的特异带型。

表 4-1 RAPD 引物及扩增结果

Table 4-1 RAPD primers and amplified results

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')	总带数 Total bounds	多态性带数 Polymorphic bounds
S161	ACCTGGACAC	11	7
S66	GAACGGACTC	10	10
S61	TTCGAGCCAG	6	3
S87	GAACCTGCAC	8	7
S97	ACGACCGACA	10	8

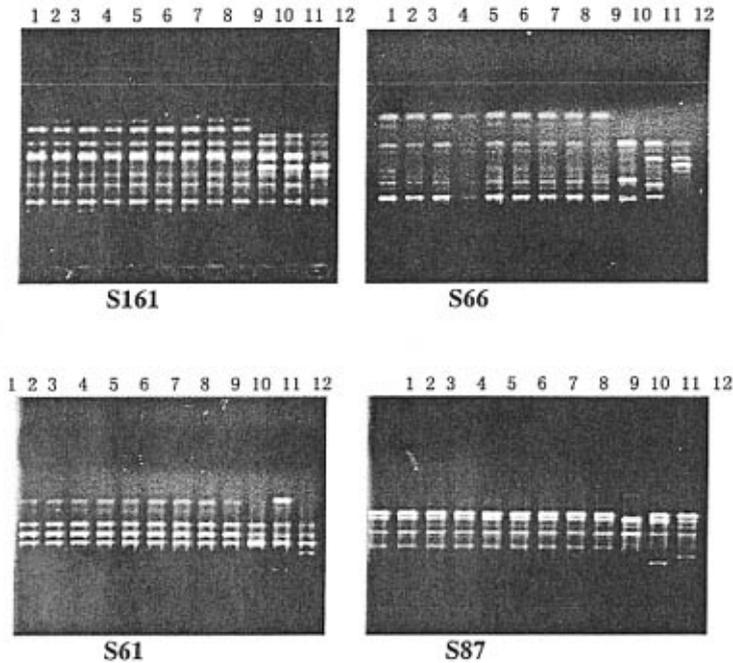


图 4-1 S161、S66、S61、S87 的 RAPD 扩增图谱。

Fig. 4-1 Fingerprints of RAPD products from primers S161、S66、S61、S87

注: 1-12 依次为山阳居群, 浙川居群, 西峡居群, 内乡居群, 郧西居群, 郧县居群, 杨溪镇居群, 丹江口居群, 凉水河居群, 洋县居群, 星子山居群, 百色居群。

Note: 1-12 represent population of Shanyang, Xichuan, Xixia, Neixiang, Yunxi, Yun county, Yangxi town, Danjiangkou, Liangshuihe, Yang county, Xingzishan, Baise, respectively

2.5.3 杂交后代和亲本基因组 DNA 的提取

待龙须草杂交后代长成小苗后(图版 II, 4), 分单株取幼嫩叶片(10~20 mg)

提取基因组 DNA。龙须草杂交子代和亲本基因组总 DNA 的提取均以幼嫩叶片为材料，采取改良的 CTAB 方法。

2.5.4 PCR 扩增与检测

为了提高检测效率，同一居群或同一单株来源的杂交后代 1~5 份 DNA 样品混合，与其父母本 DNA 样品一起用亲本特异引物进行 DNA 扩增，待检测出差异后再分单株检测。DNA 扩增在 PTC DNA Engine™ systems PCR 仪上进行。PCR 反应体系为 20 μ l，PCR 反应条件：94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min，94 $^{\circ}$ C 变性 1 min，36 $^{\circ}$ C 复性 1 min，72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min，共 45 个循环，最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 扩增产物在 1% 浓度的琼脂糖凝胶中电泳，溴化乙锭染色，在凝胶成像系统中拍照，保存图片。

3 结果与分析

3.1 龙须草花粉活性的检测结果

分别对百色居群龙须草、星子居群龙须草、洋县居群龙须草和西峡居群龙须草的花粉活性进行了检测，西峡居群龙须草的花粉活性较高为 45.05%，星子和洋县居群龙须草的花粉活性较低，分别为 34.92% 和 33.39%，各居群龙须草花粉的平均活性为 38.48%，具体结果见表 4-2（图版 II，5）。

3.2 龙须草传粉过程的观察结果

乳酚棉蓝染色使龙须草花粉粒和花粉管呈鲜艳的兰色，而龙须草的柱头在成熟时为红色，二者颜色差异明显，在显微镜下可以很直观地辨别，也利于显微测量和拍摄。本研究观察了 9 个居群龙须草各 20 多个雌蕊，结果表明，同一种类型不同单株或同一单株的不同雌蕊，其花粉附着量及花粉萌发率也有较大差异，表现出与有性生殖植物散粉时相同的特点，即受开花散粉时温度、湿度的影响。星子、洋县和百色居群龙须草的花粉萌发率较低，平均为 34%；湖北、湖南和陕西山阳 9 个龙须草居群的花粉萌发率较高，平均为 46%。为了检验龙须草花粉管是否能够进入子房和胚珠，我们还观察了散粉后不同时期，柱头上萌发花粉管的生长情况，观察发现龙须草在散粉后 5~6 h（大约花序中 1/3 的小花开放时），花粉管生长较快，当散粉后 9~10 h（花序中 1/2 小花开放时），花粉管基本停止生长，未见延伸进入子房和胚珠。表明大多数雌蕊接受的花粉粒，其萌发的花粉管生长速度缓慢，而且生长有限，无法到达子房进入胚珠。那些萌发生长的花

粉管多数附着在柱头细胞表面,有的在柱头上打绕,弯曲生长,有的则没有方向性的生长(图版 II:6、7、8)。

对于双受精植物,大量花粉会散落在柱头上面,伸长的花粉管穿过柱头、花柱进入子房,将精细胞和极核融合,完成双受精。从龙须草受精过程看,龙须草花粉管多数没有进入柱头,基本上没有进入子房,且花粉管生长速度慢,伸长生长有限,使精细胞无法进入胚囊与卵细胞或者极核发生融合。因此龙须草无融合生殖种子中胚和胚乳的发育不依赖于受精,能够自发形成。

表 4-2 不同居群龙须草花粉活性的检测

Table 4-2 Pollen germination rate of *E.binata* in different populations

	视野 eye shot	视野内花粉总数 No.in eye shot	有活性的花粉数 No.of germinated pollens	平均百分率 average germinated rate
百色居群	10	715	290	40.56%
星子居群	10	1515	529	34.92%
洋县居群	10	548	183	33.39%
西峡居群	10	444	200	45.05%
合计	40	3222	1202	38.48%

3.3 龙须草田间去雄、杂交试验结果

以类型 I 为母本、类型 II 为父本共做了 21 个杂交小穗,收到杂交种子 258 粒,杂交处理后的平均结实率为 25.79%,而类型 I 龙须草自然结实率为 39.25%。杂交处理后的结实率低于自然结实率,可能由于人工处理损伤了雌蕊(柱头或子房)而降低了龙须草的结实率。以类型 II 为母本,以类型 I 为父本共做了 11 个杂交小穗,收到杂交种子 227 粒,杂交处理后的平均结实率为 20.3%,低于其自然结实率 35.56%,同样由于人工处理损伤了雌蕊(柱头或子房)而降低了结实率。

3.4 龙须草杂交子代生殖来源的检测

3.4.1 龙须草杂交子代的种子萌发

分两次种植龙须草去雄杂交的子代种子,第一次播种 132 粒,出苗 19 株,种子萌发出苗时间约 48 h,萌发率 14.4%;第二次播种 146 粒,出苗 27 株,种子萌发出苗时间 48 h 左右,萌发率 18.5%。

3.4.2 龙须草杂交子代的检测

我们对 46 株龙须草杂交子代幼苗分两次进行了初步检测。亲本与杂交子代的取样列于表 4-3、4-5，检测结果列于表 4-4、4-6。

表 4-3 1-12 泳道所检测的 DNA 样品

table 4-3 1-12 channels represent the tested DNA sample

泳道 (channels)	DNA sample
1	洋县 (亲本)
2	星子-3 (亲本)
3	郟西-7 (亲本)
4	西峡-1 (亲本)
5	山阳-4 (亲本)
6	山阳后代 山阳-2×星子 山阳-4×星子 (F1-1) 山阳-9×星子 山阳-5×星子
7	西峡后代 西峡-5×星子 西峡-1×星子
8	星子后代 星子-2×洋县 (2)
9	星子后代 星子-5×西峡 (2) 星子-12×西峡 (2) 星子-4×山阳
10	星子后代 星子-3×山阳 (2) 星子-4×山阳 星子-10×西峡
11	山阳后代 山阳-4×星子 (F1-2)
12	郟西后代 郟西-7×星子

注：括号内为单株数，F1-1 与 F1-2 为同一母本的不同后代单株。

Note: the parentheses represent the number of offspring, F1-1 and F1-2 are different offspring of the same parents.

表 4-4 引物 S161, S97, S61, S87 检测结果

table 4-4 the detected results of primes S161, S97, S61, S87

引物(primes)	检测结果(results)
S61	2, 8, 9, 10 一致 ; 5, 6 一致; 3, 12 一致; 4, 5, 7 不一致
S161	2, 8, 9, 10 一致; 5, 11 不一致; 3, 6, 7, 12 不清晰
S97	2, 8, 9, 10 一致; 3, 4, 5, 6, 7, 11, 12 一致
S87	2, 8, 9, 10 一致; 3, 4, 5, 6, 7, 11, 12 一致

第 1 批检测的 19 株杂交后代，其中 11 个单株为星子居群（类型 II）的杂交子代，分别来自 6 个母本单株。由引物 S161, S97, S61, S87 等的检测结果来看，11 个来自星子居群的后代单株，与其母本在带型上均无明显差异，说明来自星子居群的杂交子代与其母本遗传差异很小，是无融合生殖起源。对 8 个类型

I 居群的子代单株检测结果表明, 来自湖北郧西和陕西山阳居群的 5 个单株 (泳道 6、12), 所用的 4 个引物扩增谱带中均未发现子代与母本带型的差异, 也未见父本星子的特异条带。而来自河南西峡居群的 2 个子代单株, 其父本为星子居群, 在所用引物 S161, S97, S87 扩增时未表现出与母本带型的差异, 但用 S61 引物扩增时, 子代丢失了 1 条母本带 (图 4-2)。同时在星子为父本, 山阳-4 为母本的子代 F1-2 单株 (11 泳道), 利用引物 S161 扩增后, 子代获得了父本星子的特异条带 (图 4-3), 所以星子与山阳-4 的杂交子代中 F1-2 单株来自有性生殖, 说明类型 I 龙须草居群的生殖方式为兼性无融合生殖。

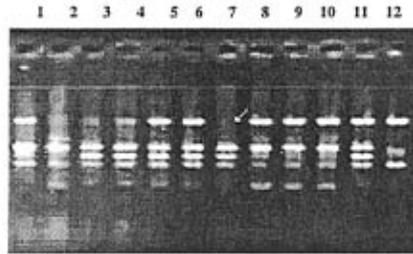


图 4-2 引物 S61 扩增电泳图

fig. 4-2 Fingerprints of RAPD products from primers S61

注: 1-5 泳道依次是洋县 (亲本); 星子-3 (亲本); 郧西-7 (亲本); 西峡-1 (亲本); 6-12 泳道依次是山阳-4 (亲本); 山阳后代; 西峡后代; 星子后代; 星子后代; 星子后代; 山阳后代; 郧西后代

Note: 1-5 represent respectively parents of Yang xian, Xing zi-3, Yun xi-7, Xi xia-1, Shan yang-4; 6-12: represent respectively offsprings of Shan yang, Xi xia, Xing zi, Xing zi, Xing zi, Shan yang, Yun xi.

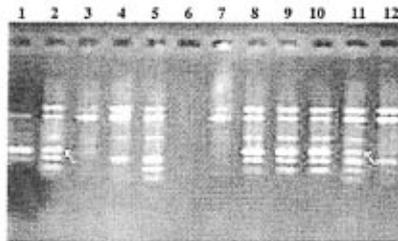


图 4-3 引物 S61 扩增电泳图

fig. 4-3 Fingerprints of RAPD products from primers S61

注: 1-5 泳道依次是洋县 (亲本); 星子-3 (亲本); 郧西-7 (亲本); 西峡-1 (亲本); 6-12 泳道依次是山阳-4 (亲本); 山阳后代; 西峡后代; 星子后代; 星子后代; 星子后代; 山阳后代; 郧西后代

Note: 1-5 represent respectively parents of Yang xian, Xing zi-3, Yun xi-7, Xi xia-1, Shan yang-4; 6-12: represent respectively offsprings of Shan yang, Xi xia, Xing zi, Xing zi, Xing zi, Shan yang, Yun xi.

第2次检测的27株杂交子代，其中13个单株为星子居群（类型II）龙须草后代，分别来自5个母本单株。14个单株为类型I龙须草居群后代，分别来自3个居群10个母本单株。我们采用引物S61, S66, S161进行检测，亲本与子代取样列于表4-4，检测结果列于表4-5。

表4-5 1-10泳道所检测的DNA样品

table 4-5 1-10 channels represent the tested DNA sample

泳道 (channels)	DNA sample	
1	星子 (亲本)	
2	星子后代	星子-12×洋县(3)
3	星子后代	星子-7×山阳 (6) 星子-6×山阳
4	星子后代	星子-5×西峡(2) 星子-14×西峡
5	山阳 (亲本)	
6	山阳后代	山阳-2×星子 山阳-9×星子 山阳-8×星子 山阳-6×星子
7	西峡亲本	
8	西峡后代	西峡-3×星子 (地) 西峡-1×星子 (3) 西峡-10×星子 (2) 西峡-9×星子
9	内乡亲本	
10	内乡后代	内乡-2×星子 内乡-4×星子 (3)

注：括号内为单株数。

Note: the parentheses represent the number of offspring.

表4-6 引物S61, S66, S161检测结果

table 4-6 the detected results of primes S61, S66, S161

引物(primes)	检测结果(results)
S161	1, 2, 3, 4一致; 5, 6, 7, 8, 9, 10一致
S66	1, 2, 3, 4一致; 5, 6, 7, 8, 9, 10一致
S61	1, 2, 3, 4一致; 5, 7一致 6, 8, 9, 10一致

利用亲本特异引物S61, S66, S161等对27株类型I和类型II的杂交子代进行检测，RAPD扩增结果表明，子代与其母本带型一致，子代未出现父本特异性条带。这些杂交子代具有较整齐的母亲带型，可能来自母本的无融合生殖。

2次共检测龙须草类型I和类型II杂交子代46个单株，仅有3株出现了与母本带型不一致，说明龙须草无融合生殖程度较高，为90%以上，其中类型I居群中为兼性无融合生殖，可能存在有性生殖个体。

4 讨论

4.1 龙须草兼性无融合生殖特性

无融合生殖植物绝大多数具有减数的发育正常的雄性配子,似乎无融合生殖基因只影响雌配子体的发育(Koltunow,Grossniklaus, 2003)。以往的研究结果表明,龙须草的花粉发育过程也没有受到无融合生殖的影响,花粉母细胞减数分裂正常,小孢子有丝分裂完成后形成 3 细胞型的成熟花粉粒,在活体上的萌发率为 40%左右,离体萌发率为 30%左右(陈智慧等, 2005)。表明龙须草的花粉发育正常,成熟花粉粒具有一定活性。暗示其物种中保留有一定比例的有性生殖能力,龙须草可能是一种兼性无融合生殖植物。

虽然龙须草有发育正常且能够萌发的花粉粒,但观察龙须草的传粉过程,发现花粉在柱头上附着率不高,能够附着在柱头并正常萌发的花粉管伸长、弯绕,多数不能穿过柱头进入花柱和子房。传粉生物学的观察结果为龙须草具有较高度度的无融合生殖率提供了辅助证据。

植物的结实规律能在一定程度上反应其生殖特性,无融合生殖程度对去掉雄蕊后的结实率有影响,如果无融合生殖程度低,含有较大程度的有性生殖,去雄套袋后会显著影响结实率。本研究的遗传学实验结果显示,在龙须草种子形成过程中,去雄套袋与授粉处理的结实率有显著差异(数据未给出),这一结果表明其种子中有一部分来自有性生殖,因为没有花粉的参与而降低了结实率,龙须草属于兼性无融合生殖。而花粉的参与对结实率的显著影响,表明龙须草可能属于假受精的无融合生殖或者为无融合生殖程度低的兼性植物。但在以往的胚胎学研究中未观察到典型的有性胚囊发育和明显的受精现象(姚家玲, 2004),杂交后代的检测也显示,其无融合生殖频率很高(94%),胚胎学研究也证明龙须草具有较高度度的无融合生殖率(95%),分析这一现象认为,龙须草的花粉对无融合生殖胚或胚乳的启动发育有重要的作用,虽然卵细胞和极核的分裂不需要受精,但是龙须草花粉在柱头上的萌发与花粉管的有限生长过程中,可能会释放出一些生理活性物质(如激素)而刺激和促进无融合生殖的发生,因此花粉参与条件下具有更高的结实率,无花粉参与时结实率很低。曾有报道称自发型无融合生殖植物胚和胚乳的发育需要花粉的刺激或某种信号的传导(Asker, 1992; Koltunow, 1993),如我们在龙须草中也观察到 50%左右为传粉后的迟发生胚(Yao

et al., 2004); 另外一个可能的原因就是龙须草无融合生殖胚乳的发生可能有一部分需要受精, 对此仍需要进一步大量细致的细胞胚胎学观察和验证。在已报道的禾本科无融合生殖植物中, 胚乳自发形成的种类很少见(黄群策, 1998), 而胚乳在植物种子形成中的作用是至关重要的。由此可见龙须草的无融合生殖特性相当复杂, 需要通过进一步的遗传学实验与细胞胚胎学实验一起反复论证。

van Dijk(2003)认为, 花粉等雄性功能的维持, 对兼性无融合生殖植物来讲, 除了能够更好的适应环境, 维持物种的多样性外, 还可摆脱因无融合生殖越积累越多的有害基因。因此龙须草种群中存在少数有性生殖个体、能够形成正常的雄性配子, 可以使龙须草在一定程度上获得进化的优势, 作为无融合生殖的一种补充。

4.2 龙须草无融合生殖后代与有性生殖后代的关系

对于所有已知的无融合生殖机理和大多数被深入研究的无融合生殖类型, 都报道在无融合生殖植物中出现一定程度的有性生殖是可能的, 因此大多数无融合生殖植物都属于兼性无融合生殖。对龙须草不同类型杂交后代的检测结果表明, 93.48%的子代与母本共享特异引物扩增出的分子标记带型, 表明后代没有父本的遗传物质而来自于母本, 为无融合生殖的结果。但在检测中也发现在星子与山阳、西峡的杂交后代中, 出现与母本带型不一致的情况。星子为父本山阳-4 为母本的杂交后代获得了父本的特异带型, 而星子为父本西峡为母本的杂交后代丢失了母本的条带。这表明其子代遗传物质相对于母本发生了改变, 这种改变可能与减数分裂和有性生殖有关。

在兼性无融合生殖中, 配子体无融合生殖可通过减数或者不减数的卵细胞形成杂合体。所以兼性无融合生殖后代的染色体倍性会发生一系列的变化, 产生的后代包括(1)母本严格的无融合生殖($2n+0$); (2)单倍体, 由减数的雌配子产生($n+0$); (3)不减数卵细胞与减数的精细胞融合($2n+n$); (4)减数的卵细胞重组($n+n$); 或者更稀少的(5)母本变化通过自体融合(Nyboom 1996; Savidan, 2000)。例如在无孢子生殖材料 *H. piloselloides* 的杂交后代中, 在遗传上与母本完全相同的个体($2n+0$)占后代总数的 97.05%, 单倍体后代($n+0$)占 0.94%, 杂交后代($n+n$)占后代的 1.91%, 杂交后代($2n+n$)占后代的 0.1%。此外在无融合生殖植物的大孢子母细胞的减数分裂过程中, 会有染色体丢失的情况发生。如在不融合生殖植

物飞蓬的研究中发现,一种二倍体孢子生殖的植株与二倍体有性生殖植株杂交,其杂交后代出现了非整倍的染色体,如 $2n=35(4n-1)$ 和 $2n=34(4n-2)$,研究者证明其是在受精前卵细胞丢失了母本的染色体。这些非整倍体丢失了母本的分子标记。在龙须草研究中,我们同样发现利用 S61 引物扩增星子与西峡的杂交后代时发生了丢失母本分子标记的情况,故推测有以下几种情况,(1) 后代为单倍体 ($n+0$), (2) 有性生殖卵细胞在受精前丢失了母本的染色体, (3) 因为有性生殖的重组而失去母本特异序列。在利用引物 S161 扩增后,我们发现星子与山阳-4 杂交的一株后代获得了父本特异条带(图 3-3),这显然是有性生殖的结果。这种后代的倍性有两种情况,或者为 $n+n$, 或者为 $2n+n$ 。前者为减数分裂后的卵细胞与减数精细胞融合结果,而后者为不减数卵细胞与减数的精细胞融合的结果。这个杂交后代具体是哪种倍性情况,需要对其染色体数目进行测定。

龙须草为无孢子生殖植物,是由特殊的珠心细胞发育成不减数的胚囊,在胚珠发育过程中观测到有性生殖的大孢子母细胞,但未见发育成熟的 7 细胞 8 核有性胚囊,也没有观察到受精现象。在本实验的授粉学研究也未观测到花粉深入胚囊,结合杂交后代检测结果,龙须草的无融合生殖程度很高,而有性生殖程度很低(6.52%)。在今后对龙须草的无融合生殖后代分析的研究中,在 RAPD 分析标记检测的基础上,如果采用流式细胞仪对后代的染色体倍性进行评估,有助于对无融合生殖性状的遗传有更深一步的认识。

结论

本课题对龙须草根尖染色体数目、核型和花粉母细胞减数分裂过程染色体行为进行了研究,得出龙须草体细胞染色体为 40 条,核型公式为 $2n=40=18m+2sm$,核型分类为 Stebbin's 1B 型。龙须草花粉母细胞减数分裂为连续型胞质分裂,终变期染色体构型为 20II,在其减数分裂过程中出现落后染色体和微核等异常现象。综合分析认为龙须草是一个异源四倍体植物,具 40 条染色体。

对湖北郧西、郧县、杨溪镇、丹江口、凉水河,河南内乡、淅川、西峡,陕西洋县、山阳,广西百色、广东星子山等 5 个省份的 12 个龙须草居群进行 RAPD 分析和形态特征观测,12 个龙须草居群可分为 4 个类型:类型 I 为河南、湖北、陕西山阳等 9 个居群;类型 II 为广东星子山居群;类型 III 为陕西洋县居群;类型 IV 为广西百色居群。

利用 RAPD 分子标记检测了龙须草 46 株杂交 F1 代,其中 3 株 F1 子代,未检测到与其母本的遗传差异,1 株 F1 子代来自有性生殖方式;而其萌发的花粉管生长速度缓慢,而且生长有限,基本上没有能够到达子房进入胚珠的。分析认为龙须草为兼性无融合生殖植物,无融合生殖程度较高,约 93.5%。

参考文献

1. 陈瑞阳, 宋文芹, 李秀兰. 中国主要经济植物基因组染色体图谱. 北京: 科学出版社, 2003, 2: 561-567
2. 陈之伦. 龙须草人工繁殖栽培技术. 山区开发, 1990, 2 (1): 70-71
3. 陈智慧, 姚家玲. 龙须草花粉活性及结实率与其无融合生殖之间的关系. 武汉植物学研究, 2005, 23 (1): 68-72
4. 耿以礼. 中国主要植物图说-禾本科. 北京: 科学出版社, 1965
5. 段惠, 强胜, 苏秀红, 吴海荣, 朱云枝, 刘琳莉. 用AFLP技术分析紫茎泽兰的遗传多样性. 生态学报, 2005, 25 (8): 2109-2114
6. 葛传吉, 丁作超, 徐维芬. 小花鬼针草的染色体数目及其自然多倍体类型. 广西植物, 1994, 14(2): 174-176
7. 高建伟, 李志德, 孙其信, 刘建中. 植物无融合生殖研究进展. 生物工程进展, 2000, 20 : 43-47
8. 贾继增. 分子标记与种质资源鉴定以及分子标记育种. 中国农业科学, 1996, 29: 1-10
9. 黄群策. 禾本科植物无融合生殖的研究进展. 武汉植物学研究, 1999, 17(增刊): 39-44
10. 胡德林, 周大明, 王元富. 龙须草合理栽培密度探讨. 中国水土保持, 1994, (12): :26-28
11. 胡适宜. 被子植物胚胎学. 北京: 人民教育出版社, 1981
12. 刘大钧. 细胞遗传学. 北京: 中国农业出版社, 1999, 117
13. 刘亮. 论禾本科黍亚科的系统分类与演化. 植物分类学报, 1988, 26(1): 11-28
14. 利容千. 中国蔬菜植物核型研究. 武汉大学出版社, 1989, 28-36
15. 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 北京: 高等教育出版社, 1993, 315-320
16. 马三梅, 王永飞, 叶秀麟, 赵南先, 梁承邨. 植物无融合生殖鉴定方法的研究进展. 西北植物学报, 2002, 22: 985-993
17. 马国华. 禾本科植物无融合生殖. 热带亚热带植物学报, 2001, 9: 83-92
18. 南京大学生物系, 中国科学院植物研究所. 中国主要植物图说. 北京: 科学出版社, 1959
19. 王清锋. 论龙须草的开发价值及在我国的利用现状与展望. 自然资源学报, 1993, 8: 307-313
20. 王琼, 苏智先, 宋会兴, 汤泽生. 植物染色体数目及其变异与生境关系初探. 生态学杂

- 志, 2001, 20(5): 8-11
21. 邢少辰, 周开达, 庄炳昌. 特异多倍体水稻的遗传特性. 西南农业学报, 2001, 14 (3): 7-20
 22. 熊立仲, 王石平, 刘克德, 戴先凯, 胡锦涛, 张启发. 微卫星 DNA 和 AFLP 标记在水稻分子标记连锁图上的分布. 植物学报, 1998, 40: 605-614
 23. 喻夜兰, 邹冬生. 田间水分处理对龙须草生长及产量形成的影响研究. 草业学报, 2004, 13(6): 75-79
 24. 杨小菊, 张友德, 李和平. 龙须草无融合生殖现象研究-I 胚囊的起源和发育. 华中农业大学学报, 1998, 17: 606-610
 25. 杨平仿. 龙须草无融合生殖的胚胎学研究及遗传特性研究. (硕士学位论文). 武汉, 华中农业大学, 2002
 26. 姚家玲, 洪柳, 张友德, 胡春根, 骆柄山. 龙须草生态型的划分及遗传差异的 AFLP 分析. 中国农业科学, 2004, 37 (11): 1699-1704
 27. 周茂堂, 杨景峰, 步兆鹤. 龙须草蓄水保土和增产技术措施研究. 中国水土保持, 1990, (9): 35-37
 28. 庄东红, 石田雅士. 柿树减树分裂和小孢子形成过程的观察. 武汉植物学研究, 2000, 18: 356-358
 29. 张大勇. 植物生活史进化与繁殖生态学. 北京: 科学出版社, 2003, 208-212
 30. 邹冬生, 余铁桥, 周青, 阳树英. 龙须草蓄水保土机理及效益研究. 农业现代化研究, 2000, 21(4): 210-213
 31. 张开春, 李荣旗. RAPD 技术鉴定无融合生殖型平邑茶的有性后代. 农业生物技术学报, 1997, 5 (4): 392-396
 32. 张友德, 张君芝, 张新元. 龙须草资源的开发与利用前景. 武汉植物学研究, 1993a, 11: 273-279
 33. 张友德, 张君芝, 秦天才, 周大明, 胡德林. 龙须草叶的形态解剖特征, 华中农业大学学报, 1993b, 12: 83-87
 34. 张友德, 张君芝, 秦天才, 周大明, 胡德林. 龙须草-一种新的 C₄ 植物. 华中农业大学学报, 1994b, 13: 360-365
 35. 张友德, 张君芝, 秦天才, 周大明, 胡德林. 龙须草根的形态解剖和生理活性研究. 华中农业大学学报, 1994a, 13: 118-123

36. 张友德, 李和平, 杨小菊, 秦天才, 张君芝, 龙须草无融合生殖现象的观察, 华中农业大学学报, 1996, 15: 200-204
37. 赵锦, 刘梦军, 吴增仁, 王玖瑞. RAPD 分子技术在植物遗传多样性研究中的应用. 河北农业大学学报, 2000, 23 (1): 25-28
38. Anna M K, Ueli G. Apomixis: A developmental perspective. *Annual Review of Plant Biology*, 2003, 54: 547
39. Anonymous. How to avoid sex: The genetic control of gametophytic apomixis. *Plant Cell*, 2001, 13: 1491
40. Alle C B, Glienke C, Leguizamon, G O C. Inheritance of apomixis in *Brachiaria*, a tropical forage grass. *Apomixis Newsl*, 1994, 7: 42-43.
41. Asker S E, Jerling L. *Apomixis in Plants*. Boca Raton, Finland: CRC Press, 1992
42. Battaglia, E. recent advances in the embryology of angiosperm. *Delhi Intl: Soc PI Morphol*, 1963
43. Bicknell R A, Borst N K, Koltunow A M. Monogenic inheritance of apomixis in two *Hieracium* species with distinct developmental mechanisms. *Heredity*, 2000, 84: 228-237
44. Brysting A K, Aiken S G, Lefkovitch L P, Boles, R L. *Dupontia* (Poaceae) in North America. *Canadian Journal of Botany*, 2003, 81: 769
45. Bicknell R A, Podivinsky E, Catanach A, Erasmuson S, Lambie S. Strategies for isolating mutants in *Hieracium* with dysfunctional apomixis. *Sexual Plant Reproduction*, 2001, 14: 227-232
46. Camilo L, Quarín Francisco Espinoza, Eric J Martínez, Silvina C Pessino, Oscar A Bovo. A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. *Sex Plant Reprod*, 2001, 13: 243-249
47. Carman J G. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, pispory, tetraspory and polyembryony. *Biol.J.Linn.Soc*, 1997, 61: 51-94
48. Chen C, Sleper D A, West C P. RFLP and cytogenetic analysis of hybrids between *Festuca mairei* and *Lolium perenne*. *Crop Sci*, 1995, 35: 720-725
49. Casa A M, Mitchell S E, Lopes C R, Valls J F M. RAPD analysis reveals genetic variability among sexual and apomictic *Paspalum dilatatum* poiret biotypes. *The Journal of Heredity*, 2002, 93: 300

50. Daurelio L D, Espinaza F, Quanrin C L, Pessinol S C. Genetic diversity in sexual diploid and apomictic tetraploid populations of *Paspalum notatum* situated in sympatry or allopatry. *Plant Syst. Evol*, 2004, 10(2): 60-71
51. Ebina M, Nakagawa H. RAPD analysis of apomictic and sexual lines in guinea-grass (*Panicum maximum* Jacq.). *Grassland Sci*, 2001, 47(3): 251-255
52. Galltski T, Saldanha A J, Styles C A, Lander E S, Fink G R. Ploidy regulation of gene expression. *Science*, 1999, 285: 251-254
53. Gupta R K, Joshie P, Shukla D. Utilization and management of denuded lands for fiber plantations from *Agave* and *Eulaliopsis binata*. *Soil conservation in India*, 1984, 295-299
54. Hanna W W, Bashaw E C. Apomixis: its identification and use in plant breeding. *Crop Sci*, 1987, 27: 136-139.
55. Hanna W W. Use of apomixis in cultivar development. *Adv Agron*, 1995, 54: 333-350
56. Hovmalm H A P, Jeppsson N, Bartish I V, Nybom H. RAPD analysis of diploid and tetraploid populations of *Aronia* points to different reproductive strategies within the genus. *Hereditas (Lund)*, 2004, 141: 301-312
57. Jefferson R, Bicknell R A. The potential impacts of apomixis: a molecular genetics approach. See Ref, 1996, 92a: 225-238
58. Koltunow A M. Apomixis: Embryo sacs and embryo formed without meiosis of fertilization in ovules. *Plant Cell*, 1993, 1425-1437
59. Koltunow A, Bicknell L, Chaudhury G K. Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. *Plant Physiology*, 1995, 108: 1345-1352
60. Koltunow A M, Johnson S D, Bicknell R A. Apomixis is not developmentally conserved in related genetically characterized *Hieracium* plants of varying ploidy. *Sex Plant Reprod*, 2000, 12: 253-266
61. Khazanehdari K A, Jones G H, Ford-Lloyd B V. Meiosis in the leek (*Allium porrum* L.) revisited I. Prophase I pairing. *Chromosome Res*, 1995, 3: 433-439
62. Kim B J, Kwon Y C, Kwack Y H, Lim M S, Park E H. Evidence of partial apomixis using (RAPD) analysis in some individual within *Allium tuberosum* population. *Plant Biology (Rockville)*, 1999, 34
63. Levan A. Nomenclature for Centromeric Position on Chromosomes. *Hereditas*, 1964, 52:

201-220

64. Lavania U C, Srivastava S, Sybenga J. Cytogenetics of fertility improvement in artificial autotetraploids of *Hyoscyamus niger* L. *Genome*, 1991, 34: 190-194
65. Maki M, Morita H, Oiki S. The effect of geographic range and dichogamy on genetic variability and population genetic structure in *Tricyrtis* section *Flavae*(Liliaceae). *American Journal of Botany*, 1999, 86: 287-292
66. Matzk F, Meister A, Schubert I. An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. *Plant Journal*, 2000, 21: 97-108
67. Maheshwari P. An introduction to embryology of angiosperm. New York: McGraw-Hill Book Inc, 1950
68. Martinez E J, Hopp H E, Stein J, Ortiz J P A, Quarin C L. Genetic characterization of apospory in tetraploid *Paspalum notatum* based on the identification of linked molecular markers. *Molecular Breeding*, 2003, 12: 319-327
69. Nogler, G A. Gametophytic apomixis. In B M Johri(ed), *Embryology of Angiosperms*. New York: Springer-Verlag, 1984a
70. Nogler G A. Genetics of apospory in apomictic *Ranunculus auricomus*. V. *Conclusion Bot Helv*, 1984b, 94: 411-422
71. Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *PNAS USA*, 1979, 76(10): 5269-5273
72. Noyes R D. Inheritance of apomeiosis (diplospory) in *Fleabanes* (*Erigeron*, Asteraceae). *Heredity*, 2005, 94: 193-198
73. Noyes R D, Rieseberg L H. Two independent loci control agamospermy (apomixis) in the triploid flowering plant *Erigeron annuus*. *Genetics*, 2000, 155: 379-390
74. Ortiz J P A, Pessino S C, Leblanc O. Genetic fingerprinting for determining the mode of reproduction in *Paspalum nctatum*, a subtropical apomictic forage grass. *Theor Appl Genet*, 1997, 95(5/6): 850-856
75. Peter J van Dijk, Peter van Baarlen, J Hans de Jong. The occurrence of phenotypically complementary apomixis-recombinants in crosses between sexual and apomictic dandelions (*Taraxacum officinale*). *Sex Plant Reprod*, 2003, 16: 71-76
76. Pessino S C, Oetiz J P A, Leblanc O. Identification of a maize linkage group related to

- apomixes in Brachiaria. *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 439-444
77. Pupilli F, Martinez E J, Busti A, Calderini O, Quarin C L, Arcioni S. Comparative mapping reveals partial conservation of synteny at the apomixis locus in *Paspalum* spp. *MGG Molecular Genetics and Genomics*, 2004, 270: 539-548
 78. Quarin C L, Pozzobon M T, Vails J F. Cytology and reproductive behavior of diploid, tetraploid and hexaploid germplasm accessions of a wild forage grass *Paspalum*. *Euphytica*, 1996, 90: 345-349
 79. Quarin C L, Espinoza F, Martinez E J, Pession S C. A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. *Sex Plant Reprod*, 2001, 13: 243-249
 80. Roodt R, Spies J. Chromosome studies in the grass subfamily Chloridoideae. II. An analysis of polyploidy. *Taxon*, 2003, 52: 736-746
 81. Roche D, Conner, J A, Budiman M A, Frisch D, Wing R, Hanna W W, Ozias-Akins P. Construction of BAC libraries from two apomictic grasses to study the microcolinearity of their apospory-specific genomic regions. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 104: 804-812
 82. Stebbins G L. *Chromosomal Evolution in Higher Plants*. Edward Arnold Ltd, London, 1971
 83. Stebbins G L. Types of polyploids: their classification and significance. *Adv Genet*, 1947, 403-429
 84. Slande J A. Micro-evolution and clone structure in *spartina-patens*. *Science*, 1979, 203: 658-660
 85. Savidan Y H. Apomixis, the way of cloning seeds. *Curr Opin Plant Biol*, 2000b, 38-43
 86. Savidan Y H. Gametophytic apomixis: a successful mutation of the female gametogenesis. *Sex Plant Reprod*, 2001a, 419-423
 87. Savidan Y (1983). Genetics and utilization of apomixis for the improvement of guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). In *Proceedings of the 14th International Grasslands Congress (1981)*, Lexington K Y, J A. Smith and V W Hayes, eds (Boulder, CO: Westview Press), pp. 182-184
 88. Sur P R. Taxonomic review of the genus *Eulaliopsis* Honda (poaceae) in India. *Econ. Taxon. Bot*, 2001, 25(2): 374-378
 89. Sherwood R T, Berg C, Young B A. Inheritance of apospory in buffelgrass. *Crop Sci*, 1994,

- 34: 1490-1494
90. Tamara N, Naumova, Michael D, Hayward Marinus, Wagenvoort. Apomixis and sexuality in diploid and tetraploid accessions of *Brachiaria decumbens*. *Sex Plant Reprod*, 1999,12: 43-52
91. Urbani1 M H, Quarin1 C L, Espinoza1 F, Penteado M I O, Rodrigues I F. Cytogeography and reproduction of the *Paspalum simplex* polyploid complex. *Plant Syst. Evol*, 2002, 236: 99-105
92. van Dijk P J, van Baarlen P, de Jong J H. The occurrence of phenotypically complementary apomixis-recombinants in crosses between sexual and apomictic dandelions (*Taraxacum officinale*). *Sex Plant Reprod*, 2003, 16: 71-76
93. Van Dijk P J, Bakx-Schotman J M T. Formation of unreduced megaspores (diplospory) in apomictic dandelions (*Taraxacum officinale* s L) is controlled by a sex-specific dominant locus. *Genetics*, 2004, 166: 483-492
94. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van De Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23: 4407-4414.
95. Wang R Q, Wang J Z. A study on the chromosome numbers and their evolution in Salicaceae. *JOURNAL OF BEIJING FORESTRY UNIVERSITY*, 1991, 13(4): 31-38
96. Wu R L, Gallo M M, Litteu R C, Zeng Z B. A General Ployploid Model for Analyzing Gene Segregation in Cutcrossing Tetraploid Species. *Genetics*, 2001, 159: 869-882
97. Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, Rafalski J A, Tingey S V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 6531-6535.
98. Yao J L, Yang P F, Hu C G, Zhang Y D, Luo B-S. Embryological Evidence of Apomixis in *Eulaliopsis binata*. *Acta Botanica Sinica*, 2004, 46(1): 86-92

图版与图版说明

Plates and explanations

图版 I 龙须草体细胞染色体和花粉母细胞减数分裂过程

- 1-2. 具有 40 条染色体的根尖细胞
3. 具有 80 条染色体的根尖细胞
4. 具有 20 条染色体的根尖细胞
5. 减数分裂细线期
6. 粗线期,可以识别部分染色体构型 (箭头)
7. 终变期, 示 20 个二价体。
8. 终变期, 示单价体 (箭头)
- 9-10. 中期 I, 分布在赤道板外的 1 条染色体 (箭头)
11. 中期 I, 示染色体不同步分离 (箭头)
12. 中期 I, 示染色体正常分离
- 13-14. 示 3 个落后染色体 (箭头)
15. 示 1 个落后染色体
16. 中期 II, 示染色体正常同步分离
17. 中期 II, 示一个染色体在赤道板外 (箭头)
- 18-19. 后期 II, 示落后染色体 (箭头)
20. 末期 II, 示微核 (箭头)
21. 十字型四分体
22. 非连续型胞质分离
- 23-24. 刚释放出来的小孢子, 具明显的微核 (箭头)

Plate I The chromosomes of somatic and the process of the pollen mother cells meiosis in *Eulaliopsis binata*

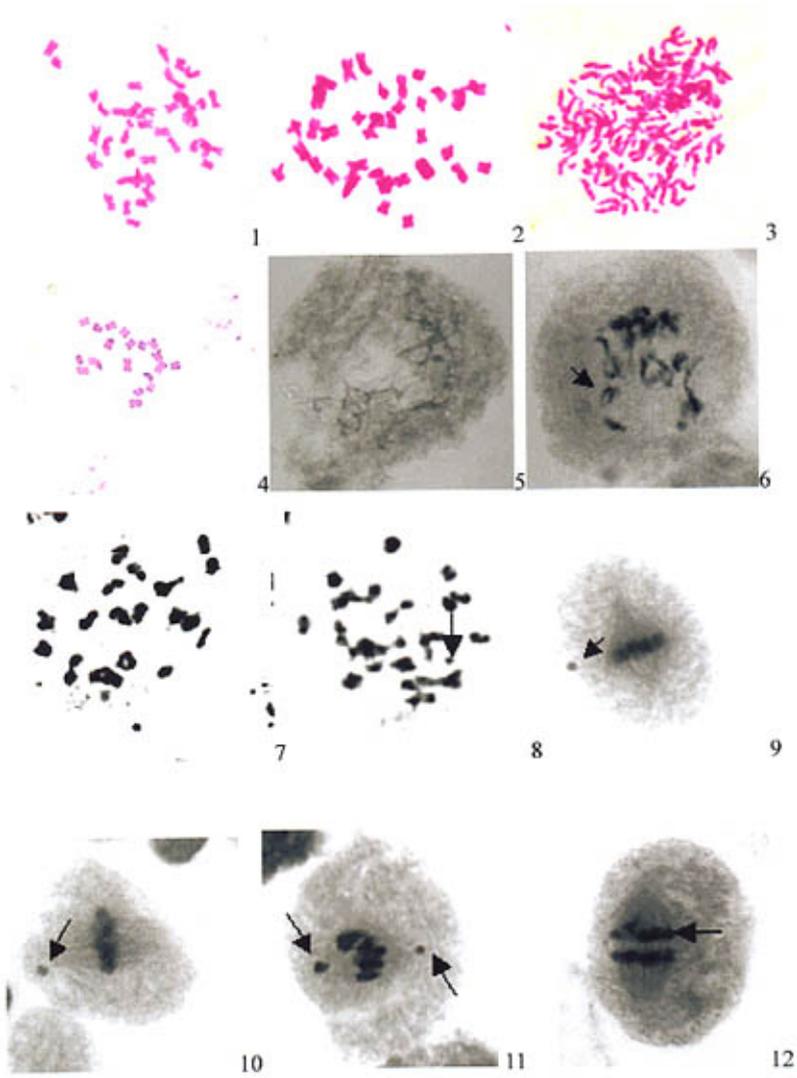
Plate I The chromosomes of somatic and the process of the pollen mother cells meiosis in *Eulaliopsis binata*

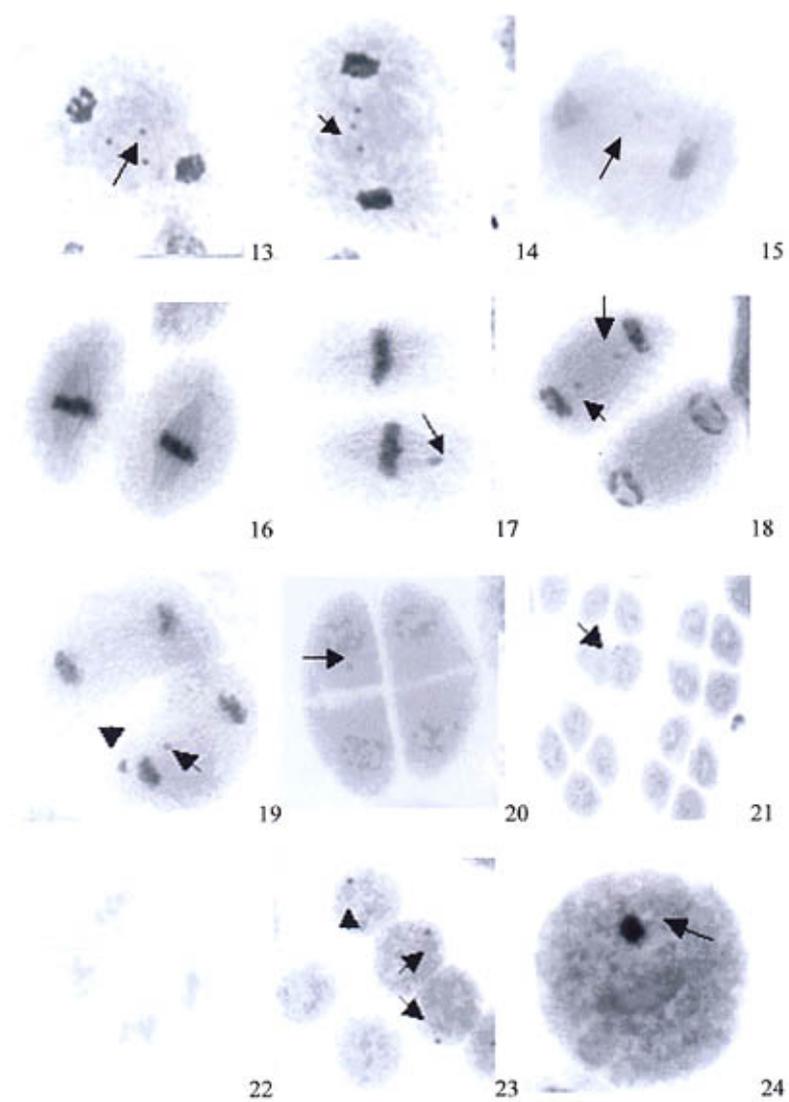
- 1-2. The root tip cells containing 40 chromosomes
3. The root tip cells containing 80 chromosomes
4. The root tip cells containing 20 chromosomes

5. Leptotene.
6. Pachytene, Some chromosomes structure may be identified (arrow).
7. Diakinesis, Showing 20 bivalents.
8. Diakinesis, Showing univalent (arrow).
- 9-10. Metaphase I , One chromosome orientated away from the equatorial plate (arrows).
11. Metaphase I , Showing chromosomes separated asynchronously (arrows).
12. Metaphase I , Showing chromosomes separated normally.
- 13-14. Anaphase I , Showing 3 lagged chromosomes (arrows)
15. Showing 1 lagged chromosome (arrow)
16. Metaphase II ,Showing chromosomes separated normally
17. Metaphase II , One chromosome orientated away from the equatorial plate (arrows)
- 18-19. Anaphase II ,Showing lagged chromosomes(arrows)
20. Telophase II ,A tetrad with a small micronucleus (arrow)
21. Sporads, Showing “+” structure
22. Not successive cytokinesis
- 23-24. Showing some pollen grains with a small micronucleus(arrows)

图版 I 龙须草根尖细胞染色体和花粉母细胞减数分裂过程

Plate I The chromosomes of somatic and the process of the pollen mother cells meiosis in *Eulaliopsis binata*





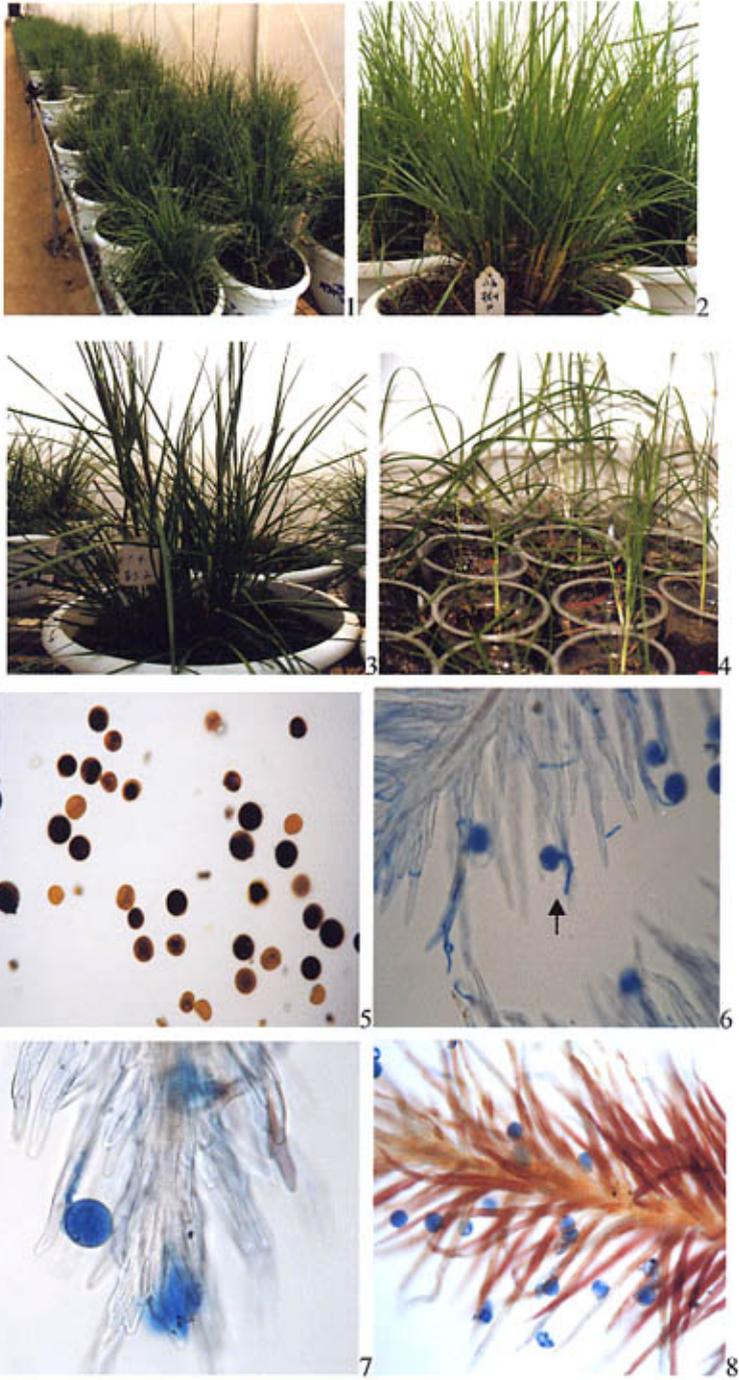
图版 II

1. 从不同的分布区采集的龙须草栽培于温室
2. 类型 I 龙须草的形态
3. 类型 II 龙须草的形态
4. 类型 I 和类型 II 相互杂交后 F1 代龙须草形态
5. 成熟花粉粒 I-KI 染色示花粉活力
6. 龙须草花粉管弯曲生长不能进入柱头
7. 龙须草花粉管进入柱头
8. 散粉后 9-10h 花粉和柱头

Plate II

1. The *E. binata* from different population growing in green-house
2. The morphology of type I of *E. binata*
3. The morphology of type II of *E. binata*
4. The morphology of F1 of *E. binata*
5. Showing vigor of pollen after staining by I-KI
6. Showing pollen tube curved on the surface of sigma of *E. binata*
7. Showing the pollen tube elongated into stigma cell of *E. binata*
8. Showing stigma and pollen after anthesis 9-10h

图版 II
Plate II



致谢

本研究和论文写作是在导师姚家玲教授的悉心指导下完成的，在三年的求学生涯中，导师在学习和生活上给予了无微不至的关怀和引导。导师治学态度严谨、为人谦逊正直、对待工作兢兢业业、对科学孜孜以求。这些宝贵品质永远值得我学习。衷心感谢导师多年来的指导和教诲！

在本次实验设计过程中，胡春根、陈春丽、张友德、刘彦老师给予了热情指导并提出了宝贵意见；实验室的李应祥、冯艳妮老师在实验仪器使用方面提供了方便和帮助，特向他们表示衷心的感谢！

本科生周云、冷正华、高欣、马昱、李学科、张秋平、张权和师弟旷乐参与了部分试验工作，付出了辛勤劳动；师兄周兆喜、陈智慧在试验方法上给予了指点和帮助；同学闫立霞，师弟杨波、范俊强、颜克亮，师妹赵莎、刘丽、邓芳、史银莲在整个实验过程中给予了支持和关心；植科院刘铁芳、水产学院孟丽霞、重点实验室胡志勇、武大的马路在数据处理上提供了帮助，在此一并向他们表示我最诚挚的谢意！

朋友于淼、赵开进、徐雪峰、袁秉政和我的家人，他们在精神上给予了我源源不断的鼓励，在物质上也为我提供了良好的条件，使我得以顺利完成学业，感谢他们！

再次向所有关心和帮助过我的老师、同学们表示衷心的感谢！

刘传虎

2005年5月

附录

附录一 植物核型分析的标准

1. 染色体数目

一般以体细胞染色体数目为准。统计细胞数目应在 30 个以上，其中 85% 以上的细胞具有恒定一致的染色体数，即可认为是该植物的染色体数目。

2. 染色体长度

1) 绝对长度 (或实际长度): 均以微米表示。

绝对长度 (或实际长度) = 放大的染色体长度 (毫米) / 放大倍数 × 1000

2) 相对长度: 均以百分比表示。现以 Levan(1964)的公式为准, 即

相对长度 = 染色体长度 / 染色体组长度 × 100

3) 染色体相对长度系数 (I、R、L): 这是郭幸荣等 (1972) 提出的对染色体长度进行分类的方法, 即

染色体相对长度系数 = 染色体长度 / 全组染色体平均长度

I、R、L < 0.76, 为短染色体 (S)

0.76 ≤ I、R、L ≤ 100, 为中短染色体 (M1)

1.01 ≤ I、R、L ≤ 125, 为中长染色体 (M2)

I、R、L ≥ 126, 为长染色体

4) 染色体长度比: 这是指核型中最长染色体与最短染色体的比值, 即

染色体长对比 = 最长染色体长度 / 最短染色体长度

3. 臂比

臂比公式计算如下: 臂比 = 长臂 / 短臂

4. 着丝粒位置

臂比值	着丝粒位置	简写
1.00	正中部着丝粒 (median point)	M
1.01~1.70	中部着丝粒区 (median region)	m
1.71~3.00	近中部着丝粒区 (submedian region)	sm
3.01~7.00	近端部着丝粒区 (subterminal region)	st
7.01 以上	端部着丝粒区 (terminal region)	t
∞	端部着丝粒区 (terminal point)	T

注: 以上述臂比值确定

5. 核型分类

Stebbins (1971) 参照生物界现有的核型资料, 根据核型中染色体的长度比和臂比两项主要特征, 用以区分核型的对称和不对称程度, 并将其分为 12 种类型, 如下表所示。

最长/最短	臂比大于 2: 1 的染色体百分比			
	0.0	0.01~0.5	0.5~0.99	1.0
<2: 1	1A	2A	3A	4A
(2: 1) ~ (4: 1)	1B	2B	3B	4B
>4: 1	1C	2C	3C	4C

附录二 研究生期间发表论文和参加的学术会议

一、 研究生期间发表论文

1. 刘传虎, 周兆喜, 周云, 姚家玲*. 不同居群龙须草 RAPD 分析及分类研究. 西北植物学报, 2006, 26 (5): 915-920
2. 刘传虎, 张秋平, 姚家玲*, 陈春丽. 龙须草核型分析和花粉母细胞减数分裂的细胞学研究. 中国农业科学, 2006, (接收发表).
3. 周云, 姚家玲*, 旷乐, 刘传虎. 被子植物胚乳自主发生的分子机理研究进展. 西北植物学报, 2005, 25 (12) 562-2568

二、 研究生期间参加的学术会议

1. 于 2003 年 12 月参加湖北省暨武汉植物学学会年会
2. 于 2004 年 12 月参加湖北省暨武汉植物学学会年会
3. 于 2005 年 10 月参加中国农业科学创刊 40 周年纪念大会