

# 野生红三叶种群表型性状变异研究

张鹤山 陈明新 田宏 蔡化 刘洋 熊军波

(湖北省农业科学院 畜牧兽医研究所/湖北省动物胚胎工程及分子育种重点实验室 湖北 武汉 430064)

**摘要:** 通过变异系数、主成分分析和聚类分析对来自湖北地区 25 个野生红三叶居群进行表型多样性分析。结果表明: 表型性状在野生红三叶居群内具有较大程度的变异, 其中单株分枝数(33.33%)和单株花序数量(32.25%)变异系数较大; 各性状在居群间也具有显著差异性( $P < 0.01$ )。主成分分析说明: 株高、叶片大小、种子千粒重、总叶柄长度及单个花序小花数是引起红三叶表型性状变异的主要因子; 聚类分析表明: 25 个居群分为 3 类, 第一类包括 1 个居群, 其特点是植株低, 单株花序数和单个花序小花数较其他两个类群多, 理论种子产量高; 第二类包括 6 个居群, 其特点是植株低矮, 分枝少; 第三类包括 18 个居群, 其特点是植株高大、叶片大, 理论牧草产量高。

**关键词:** 红三叶; 表型性状; 变异

中图分类号: S541+.9 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)01-0044-06

## A Study on the Variation in Phenotypic Characters of Wild Red Clover

ZHANG He-shan, CHEN Ming-xin, TIAN Hong,  
CAI Hua, LIU Yang, XIONG Jun-bo

(Institute of Animal Science, Hubei Academy of Agricultural Science/Hubei Key Lab of Animal Embryo and Molecular Breeding, Wuhan 430064, China)

**Abstract:** Based on the variation coefficient, principal component and cluster analysis, 25 populations of wild red clover (*Trifolium pratense* L.) from different regions in Hubei Province were evaluated by their phenotypic diversities. The results showed that the variance of phenotypic characters occurred widely within wild red clover population. The properties of shoot numbers and inflorescence numbers per plant had a relatively high level of variance and the coefficients of variation were 33.33% and 32.25%, respectively. Meanwhile, the phenotypic characters of red clover were significantly different among populations ( $P < 0.01$ ). The traits such as plant height, leaf length, leaf width, 1 000-seed weight, petiole length and inflorescence numbers per plant were the major factors leading to variation of phenotypic characters. The 25 populations were classified into 3 groups based on Euclidean distance by cluster analysis. The first cluster was composed of one population with the lowest plant height but the highest potential yield of seed within the 3 clusters. The second group contained 6 populations with lower plant height and fewer shoot numbers. And the third group consisted of 18 populations with the highest plant height, bigger leaf and higher potential grass yield.

收稿日期: 2011-09-27 修回日期: 2011-11-27

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2011BAD17B02)、湖北省动物胚胎工程及分子育种重点实验室开放项目(2010ZD200~299)和现代农业产业技术体系建设专项基金项目

作者简介: 张鹤山(1979—),男,助理研究员,硕士,主要从事种质资源保护、牧草育种与牧草产业化示范研究, E-mail: sdzhanghs@163.com; \* 通讯作者: 刘洋, 研究员, E-mail: liuyang430209@163.com.

**Key words:** red clover; phenotypic character; variation

红三叶(*Trifolium pratense* L.) 又名“红车轴草”,最早分布于地中海小亚细亚地区东南欧<sup>[1]</sup>,属于温性植物,主要分布在欧洲、俄罗斯、新西兰等海洋性气候地区,是世界上被广泛栽培的豆科牧草之一<sup>[2]</sup>,约2 000万 $\text{hm}^2$ <sup>[3]</sup>。红三叶属于异花授粉植物且自交不亲和,其种群是一个具有不同类型个体组成的杂合体,这使得在红三叶种群内和种群间存在高水平的基因变异<sup>[4]</sup>。尽管已经育成四倍体红三叶品种,但野生型红三叶是由7对染色体组成的二倍体物种<sup>[1]</sup>。在中国,红三叶在19世纪末期由外国传教士带入我国,最初在湖北巴东县种植用于养马,目前已在全国各地广泛栽培,成为一种具有较高饲用价值的优良牧草<sup>[5]</sup>,目前,它的具体来源尚不清楚,在湖北、东北地区有天然群体分布。由于其“固氮”特性,近几年在欧洲地区也越来越被重视,在法国、德国、意大利和澳大利亚都是非常重要的饲料作物,在美洲和南非也被广泛栽培。

在植物育种上,种质收集是保持物种遗传多样性和确保一个广泛遗传基因的重要手段,已逐渐被广泛重视<sup>[6-7]</sup>。在国外,许多研究者对红三叶的表型性状展开了研究,Kouame<sup>[8]</sup>在1993年对全世界范围内收集的800份红三叶种质材料的表型特征展开评价并进行了聚类,将所有材料划为早、中、晚熟3个类群;在红三叶种群变异研究方面也有报道,Greene<sup>[9]</sup>、Rosso<sup>[4]</sup>和Paula<sup>[10]</sup>发现了红三叶表型特征在群体间和群体内存在显著差异,而且这种差异在红三叶亚种群中也存在<sup>[11]</sup>;在国内,王凤春等<sup>[12]</sup>在1989年对黑龙江东部山区分布的野生红三叶种群的中内变异进行了研究,发现表型性状在种群内存在较大变异性。

物种内和群体内的遗传变异数量以及在群体间遗传多样性的分布情况对于育种者和植物学家是非常重要的<sup>[13]</sup>。在湖北地区,红三叶集中分布,成为当地优势物种,在长期逸生蔓延和自然选择的影响下形成了不同类型的表型特征,不同群落间具有了明显的表型差异。据笔者初步调查,湖北地区红三叶在株高、分枝长度、单株分枝数、叶片、花序、种子千粒重等表型性状上存在较大程度的变异,这种变异丰富了红三叶的遗传多样性。本研究目的是评价红三叶种群的表型变异并根据表型特征进行聚类分析,旨在为红三叶优良种质筛选、培育新品种提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验地概况

试验地设于湖北省畜牧兽医研究所牧草资源圃,114°10'E,30°18'N,海拔31 m,属亚热带北缘季风气候,光照充足,热量丰富,雨水充沛,年平均温度16.7℃,年降水量1 277 mm,无霜期269 d;该地区为丘陵岗地,土壤属丘陵黄土,酸性;土壤有机质含量1.86%,pH值4.92,速效氮、磷、钾的含量分别为91.8, 18, 88.3 mg/kg。

### 1.2 试验材料

材料为收集于湖北地区不同生境下的野生红三叶种质,分布在300~2 000 m的海拔,共25份(自R01~R25按顺序编号)。

### 1.3 试验方法

将采集的25个居群种子单独种植于试验田,每个居群小区面积6 $\text{m}^2$ (2 m×3 m),株行距30 cm×40 cm,每区50株;随机区组排列,3次重复;试验期间统一常规管理。

在红三叶开花期,随机选取20个单株测定株高、单株分枝数、叶片长度、叶片宽度、总叶柄长度,在盛花期测定单株花序数、花序长度、花序直径、单个花序小花数,记录每个居群种子成熟时期,种子收获后测定种子千粒重,对11个表型性状进行测定。

### 1.4 主要性状测定方法

(1)株高:直尺测量植株自地面至最高点的绝对高度;(2)单株分枝数:以植株基部分枝(即一级分枝)为准,计数每个单株的分枝数;(3)叶片长度和宽度、叶柄长度:选择已生长完全的复叶中间叶片,测量长度与中间最宽处的距离,同时测量该复叶总叶柄的长度作为叶柄长度;(4)单株花序数:计数每个植株所有已经开花的花序数,现蕾期花序未计数在内;(5)花序长度和宽度、单个花序小花数:选择完全盛开的花序,游标卡尺测量花序长度和花序最大自然宽度;计数该花序小花总数;(6)种子千粒重:选取大小较均匀一致的种子,用分析天平称500粒种子的质量,重复5次;(7)种子熟性:分为早熟和晚熟两

类早熟用“1”表示,晚熟用“2”表示。

数据分析用 Excel 和 SPSS 13.0 数据统计分析软件对试验数据进行处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 居群内个体间性状变异

以居群 R20 为例对居群内不同个体的主要性状变异情况进行分析,平均值、标准差及变异系数等参数见表 1。结果表明,个体间单株分枝数(33.33%)、单株花序数量(32.25%)、株高(15.68%)和总叶柄长度(15.91%)变异系数较大,种子千粒重(1.40%)和花序直径(4.82%)等性状变异系数较小。从整体变异程度来看,营养器官(如株高、单株分枝数、叶片大小及花序大小等)变异程度要大于生殖器官(如单个花序小花数、种子千粒重),表明红三叶居群内个体的差异是由外在自然环境和内在遗传因素共同决定的,营养器官的表型特征更易受外界环境的影响。

表 1 R20 居群内 11 个表型性状的平均数、标准差、最大值、最小值及变异系数

Tab.1 The average standard deviation, maximum minimum value and coefficient of variation in 11 characters of R20 population

性状 Traits	平均值 Mean value	标准差 Standard deviation	最大值 Maximum value	最小值 Minimum value	变异系数/% Coefficient of variation
株度/cm Plant height	64.86	10.17	79.00	50.00	15.68
单株分枝数 No. of shoots per plant	15.14	5.05	26.00	11.00	33.33
叶片长度/mm Leaf length	52.86	5.55	63.02	46.03	10.50
叶片宽度/mm Leaf width	28.86	2.61	32.00	25.03	9.04
总叶柄长度/cm Petiole length	16.57	2.64	21.00	14.00	15.91
单株花序数量 No. of inflorescences per plant	101.12	32.48	160.00	56.00	32.25
花序长度/mm Inflorescence length	26.70	2.63	31.04	23.04	9.84
花序直径/mm Inflorescence diameter	19.71	0.951	21.01	18.12	4.82
单个花序小花数 No. of flowers per inflorescence	126.43	9.23	135.00	113.00	7.31
种子千粒重/g 1 000-seed weight	1.472	0.02	1.494	1.453	1.40
种子熟性 Seed maturity	1.00	0.00	1.00	1.00	0.00

### 2.2 居群间性状变异分析

25 个居群分属于不同的生态位,在长期外界环境影响下表现出不同的表型特征。从育种角度来讲,它们丰富了红三叶的种质资源。

2.2.1 居群间变异分析 红三叶 25 个居群 11 个性状的数据统计结果见表 2。11 个性状中种子熟性分化程度最大,变异系数达 34.57%;其次为单株分枝数、单株花序数和叶柄长度,变异系数分别达到 26.69%、26.21% 和 23.77%;株高和花序小花数亦具有较大的变异分化,其变异系数均超过 16%;而叶片大小、花序大小以及种子千粒重等性状变异程度较低,其变异系数范围 5.93% ~ 13.50%。由此可见,经过多年自然变异和人为选择,巴东红三叶原始群体在牧草产量(株高、单株分枝数、叶柄长度)、种子产量(单株花序数、花序小花数)和早晚熟(种子熟性)性状上已经分化不同的类型。

2.2.2 居群间差异性分析 为研究不同性状在居群间的差异性,对 25 个居群的 11 个表型性状进行方差分析,结果见表 2。11 个性状在不同居群间均存在显著差异,除单株分枝数性状差异显著( $P < 0.05$ )外,其他 9 个性状差异性均达极显著水平( $P < 0.01$ )。可见,表型性状的变异程度在不同居群间是不均衡的,即不同的生态因子对同一性状的影响或不同性状对同一生态因子的响应是不同的。

表 2 25 个居群各性状的平均值、标准差、最大值、最小值、变异系数及居群间差异性

Tab.2 Means , standard deviation , maximum value , minimum value , difference in 11 characters of 25 populations

性状 Traits	平均值 Mean value	标准差 Standard deviation	最大值 Maximum value	最小值 Minimum value	变异系数/% Coefficient of variation	差异性 Difference
株度/cm Plant height	56.819.29	79.00	29.00	16.35	**	
单株分枝数 No. of shoots per plant	14.24	3.62	26.00	8.00	26.69	*
叶片长度/mm Leaf length	56.70	6.88	80.00	36.02	12.13	**
叶片宽度/mm Leaf width	31.94	4.31	45.03	19.97	13.50	**
总叶柄长度/cm Petiole length	14.54	3.46	27.00	7.00	23.77	**
单株花序数量 No. of inflorescences per plant	107.22	28.12	198.00	53.00	26.21	**
花序长度/mm Inflorescence length	28.01	2.88	36.96	21.00	10.28	**
花序直径/mm Inflorescence diameter	21.12	2.01	26.01	16.04	9.51	**
单个花序小花数 No. of flowers per inflorescence	124.76	20.45	189.00	45.00	16.55	**
种子千粒重/g 1 000-seed weight	1.53	0.09	1.70	1.30	5.93	**
种子熟性 Seed maturity	1.44	0.50	2.00	1.00	34.57	**

\* 表示差异 5% 显著; \*\* 表示差异 1% 水平显著。

\* , \*\* indicates significant at 0.05 and 0.01 level , respectively.

2.2.3 主成分分析 变异系数分析和差异性检验结果表明, 11 个表型性状在不同居群间和居群内均存在差异。在此基础上对 11 个性状进行主成分分析, 获得这些性状之间的特征值、累计贡献率及因子负荷值等参数(表 3 和表 4), 分析不同性状对居群间或居群内差异性的影响程度。

表 3 对原有变量的总体描述

Tab.3 Overall description on original variables of the initial eigenvalue of factor analysis

因子 Components	初始特征值 Initial eigenvalues		
	总特征值 Total vlue	特征值/% Eigen value	累计特征值/% Total eigen value
1	2.767	25.154	25.154
2	2.017	18.335	43.490
3	1.630	14.815	58.305
4	1.410	12.815	71.120
5	1.013	9.205	80.325
6	0.833	7.575	87.900
7	0.537	4.877	92.777
8	0.361	3.285	96.062
9	0.202	1.841	97.903
10	0.124	1.125	99.028
11	0.107	0.972	100.000

由表 3 可以看出, 前 5 个因子对变量的总体描述累计贡献率达 80.325% , 它们可以描述出原始因子所代表的绝大部分信息。因此, 抽取前 5 个因子进行因子载荷分析(表 4) 结果表明, 在第一因子中, 叶片长度和叶片宽度 2 个特征向量绝对值较高, 是反映第一因子特征值的主要性状指标; 第二因子中种子千粒重绝对值最高, 是构成第二因子特征值的主要指标; 同样, 第三因子中株高特征向量绝对值最高; 第四因子中总叶柄长度特征向量绝对值最高; 第五因子中单株分枝数和单个花序小花数 2 个特征向量绝对值较高。这 5 个因子包含了 7 个性状指标。

2.2.4 聚类分析 根据欧氏距离系数, 采用分层聚类法对巴东红三叶 25 个居群的 11 个性状进行聚类, 结果见图 1。从聚类图上可以看出, 25 个居群可以划分为三个类群, 第一类群包括 1 个居群, 第二类群包括 6 个居群, 第三类群包括 18 个居群。对各类群表型性状的统计见表 5, 结果表明, 第一类群特点是植株低矮、分枝多, 叶片大, 单株花序数多, 单个花序包含小花较多, 种子千粒重高, 属于早熟、种子产量较高的类群; 第二类群植株低矮、分枝少, 叶片、花序较小, 单株花序数少, 种子千粒重低, 属于低矮、晚熟型类群; 第三类群属于植株高大但分枝少、叶片大、花序较大的一类群体。

表4 11个性状的因子载荷矩阵  
Tab.4 Component load matrix in characters

性状 Traits	因子 Components				
	1	2	3	4	5
株度/cm Plant height	0.083	0.353	-0.756	0.324	0.079
单株分枝数 No. of shoots per plant	0.139	0.623	0.339	-0.210	-0.556
叶片长度/mm Leaf length	0.822	-0.041	0.155	0.207	0.002
叶片宽度/mm Leaf width	0.766	0.021	0.066	0.525	0.185
总叶柄长度/cm Petiole length	-0.314	0.392	-0.206	0.638	-0.176
单株花序数量 No. of inflorescences per plant	0.545	0.497	-0.232	-0.247	0.237
花序长度/mm Inflorescence length	0.646	0.319	0.350	0.107	0.091
花序直径/mm Inflorescence diameter	0.703	-0.306	-0.049	-0.294	-0.389
单个花序小花数 No. of flowers per inflorescence	-0.225	0.470	0.513	-0.206	0.586
种子干粒重/g 1 000-seed weight	0.293	-0.715	-0.208	-0.131	0.261
种子熟性 Seed maturity	-0.186	-0.417	0.623	0.562	-0.068

### 3 讨论与结论

红三叶物种具有高水平的变异性，而这种变异在群体内几乎都存在<sup>[13]</sup>。红三叶在湖北已有100多年的历史，因其所处的地理环境、气候和土壤类型不同，以及栽培者在利用过程中有目的的选择和放牧家畜的选择性采食，造成了其在形态特征方面的差异，形成了不同的生态型。本研究结果表明，红三叶各居群间和居群内存在广泛的表型变异（表1、表2），但各性状在不同居群间和居群内的变异程度是不均衡的，这种不平衡造就了物种内的遗传多样性<sup>[14]</sup>。许多关于红三叶表型变异的研究都证明了红三叶种群存在显著的变异<sup>[9-11]</sup>，在其他物种上，如蒙古冰草、鹅观草、苜蓿、中华鹅观草以及柠条锦鸡，居群间和居群内存在表型变异的研究也已被报道<sup>[15-19]</sup>。除此之外，也有人用分子标记技术对红三叶种群的遗传变异进行分析<sup>[9-10, 20]</sup>，发现种群内具有遗传多样性。由此可见，不同生态环境可以造就不同的物种生态类型，变异是物种为适应环境而产生的适应性改变。

对不同居群间各性状的方差分析表明，株高、叶片、花序等11个性状在25个不同居群间差异显著，这与Greene和Paula关于红三叶表型变异的研究结果一致<sup>[9-10]</sup>，说明了不同生态位对红三叶物种的形态特征产生了重要影响。由于所处环境以及所用试验材料的不同，本研究结果与前人研究成果没有直接的可比性，只是说明红三叶种群存在形态性状上的变异，尽管如此，这些研究有助于有价值的红三叶种质材料的选择，对红三叶育种者来说具有积极意义。

主成分分析结果表明，80%以上的变异可以通过株高、叶片大小、种子干粒重等7个主要性状来描述，这7个性状是引起红三叶种群变异的主要因子。通过聚类分析将25个红三叶居群分为3大类群，每个类群可能与各材料的采集地有关<sup>[4]</sup>。根据3个类群的形态特征，在红三叶育种过程中可选择性利用。

物种的变异受多种因素如气候、温度、水分以及栽培措施等的影响，因而形态上的变异也是易变的，

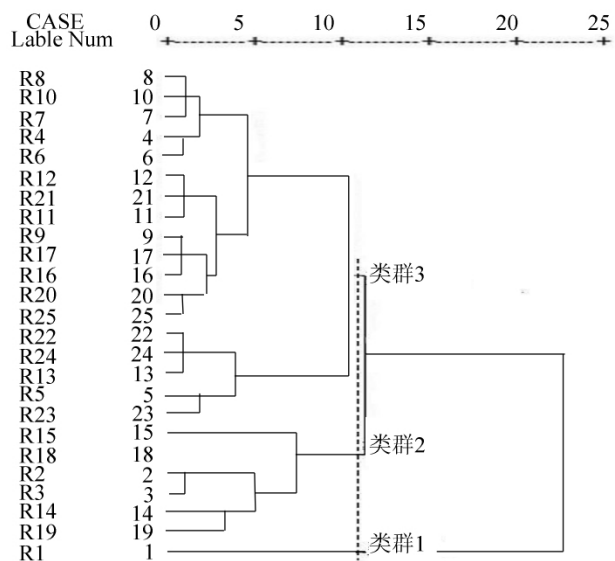


图1 红三叶25个居群形态学性状聚类分析  
Fig.1 Diagram of cluster analysis of the 25 populations of Red Clover

表 5 红三叶三个类群表型性状统计结果

Tab. 5 The main characters of three groups classified by morphological datas

性状 Traits	类群 1 Cluster one		类群 2 Cluster two		类群 3 Cluster three	
	变异幅度 Variation range	均值 Mean value	变异幅度 Variation range	均值 Mean value	变异幅度 Variation range	均值 Mean value
株度/cm Plant height	-	49.31	39.58~55.91	49.46	53.64~64.88	59.69
单株分枝数 No. of shoots per plant	-	15.98	10.42~16.72	13.83	11.41~17.15	13.42
叶片长度/mm Leaf length	-	58.42	47.63~60.30	53.31	51.70~64.32	57.77
叶片宽度/mm Leaf width	-	31.62	26.87~34.00	30.01	28.70~36.45	32.59
总叶柄长度/cm Petiole length	-	11.65	12.61~18.94	14.70	11.40~18.14	14.72
单株花序数量 No. of inflorescences per plant	-	146.42	80.41~102.92	93.60	88.02~125.31	109.73
花序长度/mm Inflorescence length	-	29.02	25.04~31.01	27.04	25.32~30.36	28.33
花序直径/mm Inflorescence diameter	-	22.41	18.42~23.09	20.47	19.41~23.44	21.30
单个花序小花数 No. of flowers per inflorescence	-	137.61	119.91~150.41	132.41	95.57~140.91	119.82
种子千粒重/g 1 000-seed weight	-	1.61	1.43~1.57	1.50	1.33~1.67	1.53
种子熟性 Seed maturity	-	1.00	1.00~2.00	1.83	1.00~2.00	1.33

进行分子水平上的遗传多样性分析也许是解决环境影响的有效方法,但可能与利用形态特征进行的分析有所不同<sup>[9]</sup>。就本研究结果而言,由于种质材料分布比较集中,尚不能完全代表整个中国境内的红三叶变异状况,因此大范围的红三叶种质收集是必要的,并且结合形态特征和分子水平来研究红三叶的来源可能是更准确的方法。虽然如此,我们的研究评价了湖北地区野生红三叶的表型多样性,并根据形态性状进行了聚类分析,对于红三叶育种过程中有价值性状的选择提供了参考依据。

#### 参考文献:

- [1] Taylor N L, Quesenberry K H. Red clover science [M]. Ordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996: 28.
- [2] Bowley S R, Taylor N L, Dougherty T. Physiology and morphology of red clover [J]. Adv Agrono, 1984, 37: 317-347.
- [3] Taylor N L. Clover science and technology [M]//Smith R R, Taylor N L, Bowley S R. Red clover. Madison: Agron Monogr, 1985: 457-470.
- [4] Rosso B S, Pagano E M. Evaluation of introduced and naturalised populations of red clover (*Trifolium pratense* L.) at Pergamino EEA-INTA, Argentina [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2005, 52: 507-511.
- [5] 陈默君, 贾慎修. 中国饲用植物 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 38.
- [6] Astley D. Genetic resource conservation [J]. Expl Agric, 1987, 23: 245-257.
- [7] Brush S B. Rethinking crop genetic resource conservation [J]. Conservation Biology, 1989(3): 19-29.
- [8] Kouame C N, Quesenberry K H. Cluster analysis of a world collection of red clover germplasm [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 1993, 40: 39-47.
- [9] Greene S L, Gritsenko M, Vandemark G. Relating morphologic and RAPD marker variation to collection site environment in wild populations of red clover (*Trifolium pratense* L.) [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2004, 51: 643-653.
- [10] Paula M B D, Bernadette J, Jean P S, et al. Genetic diversity in red clover (*Trifolium pratense* L.) revealed by morphological and microsatellite (SSR) markers [J]. Euphytica, 2008, 160: 189-205.
- [11] Pecetti L, Roman M, Rosa L D, et al. Variation in morphology and seed production of snow clover *Trifolium pratense* L. subsp. Nivale (Koch) germplasm from the Rhaetian Alps, Italy [J]. Genet Resour Crop Evol, 2008, 55: 939-947.
- [12] 王凤春, 刘鸣远. 黑龙江东部山区红车轴草 (*Trifolium pratense* L.) 种内变异类型的研究 [J]. 武汉植物学研究, 1989, 7(4): 317-326.
- [13] Mosjidis, Gorge A, Stephanie L G, et al. Isozyme diversity in wild red clover populations from the Caucasus [J]. Crop Science, 2004, 44(2): 665-670.
- [14] 姚启伦, 许江, 许冬梅, 等. 四川及重庆玉米地方品种遗传多样性的比较分析 [J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2008, 34(1): 6-12.
- [15] 兰保祥, 李立会, 王辉. 蒙古冰草居群遗传多样性研究 [J]. 中国农业科学, 2005, 38(3): 468-473.
- [16] 王赞, 高新中, 韩建国, 等. 柠条锦鸡儿表型多样性研究 [J]. 草地学报, 2006, 14(3): 201-205.
- [17] 高飞, 柴守诚, 高爱农. 基于形态学的中华鹅观草遗传多样性分析 [J]. 麦类作物学报, 2006, 26(3): 12-17.
- [18] 张鹤山, 刘洋, 田宏, 等. 苜蓿种质植物学形态特征变异分析 [J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2009, 35(1): 79-83.
- [19] 肖海峻, 徐柱, 李临航, 等. 鹅观草表型性状变异与生境间的相关性 [J]. 中国草地学报, 2007, 29(5): 22-30.
- [20] Hugo C Q, Fernando O K. Genetic variability among elite red clover (*Trifolium pratense* L.) parents used in Chile as revealed by RAPD markers [J]. Euphytica, 2001, 122: 61-67.