

黔东南香禾糯 AFLP 遗传多样性分析与评价

雷启义^{1,2}, 熊 勇¹, 周江菊², 张文华², 孙 军², 龙春林^{1,3}

(¹ 中央民族大学生命与环境科学学院, 北京 100081; ² 凯里学院环境与生命科学学院, 贵州凯里 556000;

³ 中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650201)

摘要: 香禾糯是我国侗族人民数百年来传统主食,也是传统农业生态系统的重要组成部分。本文通过民族植物学调查与现代分子生物学试验相结合的方法,对黔东南侗族地区传统分类的香禾糯农家品种进行了评价,以便探讨香禾糯种质资源的遗传多样性变化。通过 8 对 AFLP 引物并基于遗传距离和遗传相似系数,对从黔东南侗族地区收集的 95 个香禾糯农家品种进行了分析。共检测到 707 个位点,其中多态性位点为 619 个,占 87.55%,Shannon-Weiner 多样性指数为 0.3738,基因多样性指数为 0.2446,遗传相似系数为 0.7121~0.9958。当遗传相似系数为 0.7546 时,可划分为 I、II 两大类,外加 1 个特殊品种,其中 I 类群有 88 个品种,II 类群有 6 个品种,来自相同和相邻侗寨或者形态性状相近的品种并没有完全聚在一起。结果表明黔东南地区香禾糯农家品种遗传多样性总体水平较高,特别是传统耕作文化保护较好的侗寨内,其遗传背景差异较大。香禾糯种质资源的多样性形成,在很大程度上与黔东南地区复杂多变的自然环境有关,还与该地区少数民族的传统耕作制度和民族传统文化延续密切相关。

关键词: 香禾糯;遗传多样性;AFLP;种质资源;传统文化;民族植物学

Genetic Diversity Analysis and Evaluation of Kam Aromatic Glutinous Rice in Qiandongnan Prefecture Based on AFLP Molecular Markers

LEI Qi-yi^{1,2}, XIONG Yong¹, ZHOU Jiang-ju², ZHANG Wen-hua², SUN Jun², LONG Chun-lin^{1,3}

(¹ College of Life and Environmental Sciences, Minzu University of China, Beijing 100081; ² College of Environmental and Life Sciences, Kaili University, Kaili Guizhou 556000; ³ Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201)

Abstract: The Kam aromatic glutinous rice is the Dong ethnic traditional staple food for hundreds of years, and also an important component of traditional agroecosystem in the area. In this paper, in order to discuss the variation of the genetic diversity of the Kam aromatic glutinous rice germplasm resources, an approach combining ethnobotany and molecular biology was used to evaluate the genetic diversity of the rice landraces in Dong ethnic area of Qiandongnan Prefecture. AFLP (amplified fragment length polymorphism) analysis of 95 Kam aromatic glutinous rice landraces collected from Dong villages in the area was carried out by using 8 pairs of AFLP primers, and the cluster analysis of each village and between the landraces based on the genetic distance and genetic similarity coefficient. A total of 707 clear bands were obtained, 619 of them were polymorphic bands and the percentage of polymorphic was 87.55%. Shannon's information index was 0.3738, the gene diversity index was 0.2446, the genetic similarity coefficient of the 95 accessions was 0.7121-0.9958. It could be clustered into 2 big clusters (I and II) when the genetic similarity coefficient was 0.7546, with the addition of a special group of landraces. Branch I included a group of 88 landraces, and branch II had a total of 6 landraces. The varieties were collected from the same and adjacent villages or the varieties with similar morphological traits that were not clustered completely together. There was no correlation

收稿日期: 2017-05-26 修回日期: 2017-08-03 网络出版日期: 2017-10-25

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20171025.0949.004.html>

基金项目: 国家自然科学基金(31360070, 31761143001); 贵州省自然科学基金([2010]2078); 贵州省自然科学基金(LKK-2013-05); 贵州省教育厅自然科学基金(20090082); 贵州省教育厅创新群体重大项目(KY[2017]047)

第一作者研究方向为植物资源学、民族生态学。E-mail: leiqiqi@126.com

通信作者: 龙春林, 研究方向为民族植物学、生物多样性、植物种质资源。E-mail: long@mail.kib.ac.cn

between the genetic distance and geographical location. The results showed that there was higher genetic diversity in the landraces of Qiandongnan Prefecture, especially in the Dong villages where the genetic differentiation was high, and the genetic background was very complicated in the Kam aromatic glutinous rice landraces. The formation of diversity was related to complex environment, ethnic traditional farming system and culture in the prefecture.

Key words: Kam aromatic glutinous rice; genetic diversity; AFLP; germplasm resources; traditional culture; ethnobotany

农作物地方品种是作物遗传资源的重要组成部分^[1],是农业生物多样性与资源保护的重要对象,对粮食安全和人民生计具有重大意义。水稻是世界一半以上人口的主要粮食和全球最为重要的农作物之一^[2-3]。水稻对环境适应范围较广,丰富的水稻多样性资源已经成为水稻品种改良的重要基础和来源^[4]。近年来,由于经济全球化和环境影响,全球作物品种多样性受到了严重的威胁。特别是世界各国边远少数民族地区社会经济的快速发展,传统的农耕文化发生了根本性的改变,耕作环境不断恶化,导致了这些地区多样性的水稻、小麦等主要农作物品种已经面临濒危,因此开展民族地区重要作物种质资源的多样性评价及其保护利用工作显得非常的必要和迫切^[5-8]。近几十年来,随着分子生物学的发展和水稻基因组测序的完成以及水稻全基因组分析的不断深入,人们利用 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, 限制性片段长度多态性)、SSR (Simple Sequence Repeat, 简单序列重复标记)等多种分子标记和相关方法在水稻的品质改良、抗病虫害、遗传多样性评价等方面开展了大量的研究工作^[4,9],如 G. Rajkumar 等^[10]利用 AFLP 对斯里兰卡新改良水稻品种进行了研究并揭示了其具有较高的遗传多样性,N. Zossou 等^[11]利用 AFLP 标记揭示西非水稻种群具有丰富的遗传多样性,J. S. Bao 等^[12]用 AFLP 与 ISSR 分子标记都揭示了地方糯稻种质具有较高的遗传多样性水平并确定了其亲缘关系,陈亮等^[13]利用 AFLP 和 RFLP 技术对 20 个水稻品种(系)进行了遗传多样性分析,表明 AFLP 更适应于多样性的研究,R. R. Vasudeo 等^[14]用 AFLP 辅助标记揭示了水稻栽培种与野生稻的遗传多样性差异性与进化上的相关性。由于 AFLP 标记没有种属的特异性,不受植物材料发育阶段的影响,重复性好,结果可靠,比较广泛用于水稻、小麦等作物种质资源的遗传多样性评价研究工作,并都取得了很好的效果^[15-20]。

香禾糯是黔东南侗族对糯性禾类的统称,主要分布在贵州东南部的黎平、从江和榕江等县,对山区

阴、冷、贫瘠等不良气候环境具有较好的适应性,是一类特殊的水稻生态类型,至今在黔东南侗族地区还保持着丰富多样的品种,是我国水稻研究的宝贵遗传资源之一。由于其米饭清香可口,素有“一家煮饭十家香,一寨煮饭香十里”之美誉,深受侗族人民的喜爱,并称之为香禾糯^[21]。香禾糯不仅仅是侗民族生活中的主食,而且在其文学艺术、宗教信仰、医药等民族传统文化和耕作文化等方面均具有重要的价值和作用^[21-24]。虽然在近代以来黔东南经历了“三次糯改粘”的变革^[25],但目前该地区仍然保存着繁多的香禾糯品种种植而引起了众多学者的关注。20 世纪 80 年代初,吴祥厚^[26]对黔东南香禾糯品种进行了较全面考察,马琳等^[27]用 SSR 分析部分贵州“禾”并揭示了其具有较高遗传多样性分析水平,雷启义等^[23]、王艳杰等^[24]、焦爱霞等^[28]都对香禾糯的传统管理和文化多样性保护进行了一些探讨。此外,在香禾糯的栽培历史、生态、文化以及品质性状等方面也开展了一些相关的研究工作^[25,29-31],但对于表型性状丰富多样的香禾糯种质资源,其遗传差别和亲缘关系如何以及有关的分子标记评价并不多见。虽然现存的黔东南香禾糯表型特征丰富多样,品种的传统分类与命名也多种多样,表型性状和命名的多样性也是衡量遗传多样性最直观的方法,但由于它们都易受环境和人为因素影响,仅依靠表型性状和传统的民间分类和命名难以准确反映不同种质间的遗传差别和亲缘关系,为此,开展香禾糯分子标记的遗传多样性相关研究工作是非常必要的。本研究利用 AFLP 分子标记方法,对黔东南侗族地区 8 个主要侗族村寨民间分类的 95 个香禾糯农家品种资源进行遗传多样性评价,拟揭示黔东南香禾糯的遗传多样性信息和形成背景,为后续品种选育和种质资源的保护和利用提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

从 2005-2015 年,连续 10 年对黔东南黎平、从江、榕江 3 县主要侗族地区 36 个主要侗寨进行香禾

糯种质资源收集,共收集到 368 份香禾糯种质资源,通过民族植物学调查方法和民间分类确定最能代表侗族地区当前的香禾糯农家品种类型,并以这些确定或待定的 95 个农家品种作为试验样品。

1.2 试验品种的民间分类与鉴别方法

为了全面收集和确定本地区的香禾糯农家品种,主要采取了以下收集及鉴别方法:首先是到主要侗寨香禾糯种植农户家庭进行收集并对其表型性状进行初步的鉴定;其次是收集每个侗寨的所有品种,

然后通过寨老或村干部的识别鉴定;最后把收集于整个侗族地区的香禾糯品种资源,通过 13 个侗寨的普通村民、寨老或村干部(26 人,男 19 人,女 7 人,年龄 50~83 岁)的集中比较和鉴定,合并异名同种和分开异种同名,同时保留一些民间分类有争议的品种,最终选择 8 个侗族村寨最具有代表性的 95 个农家品种作为试验样品(表 1,序号 1~95)。选取每个品种的种子作为幼苗培养材料,采用 CTAB 法提取样本的基因组 DNA,为开展后续的工作准备。

表 1 试验材料

Table 1 Samples in this study

编号 Serial	村寨名 Village	品种数量 Number	品种序号 Sample number
1	高仟 Gaoqian	18	1,23,25,31,43,47,48,49,52,54,58,76,82,83,84,93,94,95
2	黄岗 Huanggang	23	5,7,8,12,22,26,33,39,45,46,50,51,60,61,62,63,68,78,85,87,88,90,91
3	坑洞 Kengdong	13	4,11,14,15,24,27,29,32,34,41,75,86,92
4	侗家园 Dongjiayuan	7	3,9,10,67,70,71,72
5	小黄 Xiaohuang	9	13,16,20,36,37,38,42,59,79
6	岩洞 Yandong	10	18,19,30,40,55,56,57,74,89,21
7	占里 Zhanli	10	6,28,35,44,64,65,73,77,80,81
8	肇兴 Zhaoxing	5	2,17,53,66,69

1.3 主要试剂及引物

Taq 酶(2 U/ μ L), dNTP (10 mmol/L), 引物(10 mmol/L), 内切酶(10 U/ μ L)(NEB 公司), T4 连接酶(5 U/ μ L) 来自 NEB 公司。Marker 为 DL2000、100 bp DNA Ladder,分子量内标为 Liz-500。8 对引物(E35M48, E35M58, E36M58, E41M59, E41M63, E59M84, E76M64, E85M48)由上海生工合成,正向引物均为 FAM 标记,试验所用接头和引物信息见表 2。

1.4 AFLP 试验及检测

首先选用 4 个香禾糯品种(10,26,69,77)作为样品进行引物筛选,24 对随机引物选出 8 对引物,然后进行批量试验。

(1)酶切-连接:对所选样品采用 *Eco*RI/*Mse*I 双酶切,酶切与连接反应同步进行。酶切与连接体系(20 μ L)为:10 $\times$ AFLP digest-ligation Buffer 2 μ L, AFLP digest-ligation Enzyme Mix 1.8 μ L, *Eco*R I Adaptor 1 μ L (10 μ mol/L), *Mse* I Adaptor 1 μ L (10 μ mol/L), 模板 DNA 5 μ L, 补 ddH₂O 至 20 μ L。酶切-连接反应条件为 25 $^{\circ}$ C 5 h, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

(2)预扩增反应体系:2 $\times$ PCR Mix 10 μ L; E00 1 μ L (20 μ mol/L); M00 1 μ L (20 μ mol/L); 酶切-连接模板 DNA 4 μ L; 加 ddH₂O 至 20 μ L。PCR 扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s; 50 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环。

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequence

接头与引物 Connector and primer	序列(5'-3') Sequence
<i>Eco</i> RI 接头 1	CTCGTAGACTGCGTACC
<i>Eco</i> RI 接头 2	AATTGGTACGCAGTCTAC
<i>Mse</i> I 接头 1	GACGATGAGTCCTGAG
<i>Mse</i> I 接头 2	TACTCAGGACTCAT
E00	GACTGCGTACCAATTC
M00	GATGAGTCTTGAGTAA
E35	GACTGCGTACCAATTCACA
E36	GACTGCGTACCAATTCACC
E41	GACTGCGTACCAATTCAGG
E59	GACTGCGTACCAATTCCTA
E72	GACTGCGTACCAATTCGGC
E85	GACTGCGTACCAATTCCTCG
M48	GATGAGTCTTGAGTAACAC
M58	GATGAGTCTTGAGTAACGT
M59	GATGAGTCTTGAGTAACCTA
M63	GATGAGTCTTGAGTAAGAA
M64	GATGAGTCTTGAGTAAGAC
M84	GATGAGTCTTGAGTAATCC

(3)选择性扩增反应体系:2 $\times$ PCR Mix 10 μ L; Eprimer 1 μ L (20 μ mol/L); Mprimer 1 μ L (20 μ mol/L);

模板 DNA 5 μ L(预扩增产物稀释 20 倍);加 ddH₂O 至 20 μ L。PCR 扩增程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 35 s,65 $^{\circ}$ C 复性 35 s(每循环降低 0.7 $^{\circ}$ C),72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,12 个循环;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,56 $^{\circ}$ C 复性 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,23 个循环。

(4)将甲酰胺与分子量内标按 100 : 1 的体积比混匀后,取 9 μ L 加入上样板中,再加入 1 μ L 稀释 10 倍的 PCR 产物,然后使用 3730XL 测序仪进行毛细管电泳。

1.5 数据分析

1.5.1 AFLP 扩增图谱转换和品种间相似系数分析

利用 GeneMarker 2.2 软件将 95 个样品、8 对引物组合扩增,产物经测序仪进行毛细管电泳后得到的原始数据,将各泳道内分子量内标的位置与各样品峰值的位置做比较分析,得到片段大小,再根据无

带和有带情况转化为“0,1”数据矩阵。采用 NTSYS-pc 2.11 软件包进行品种相似系数计算并用 UPGMA 法进行聚类分析,利用 Popgene 和 NTSYS 软件对样品进行遗传多样性分析。

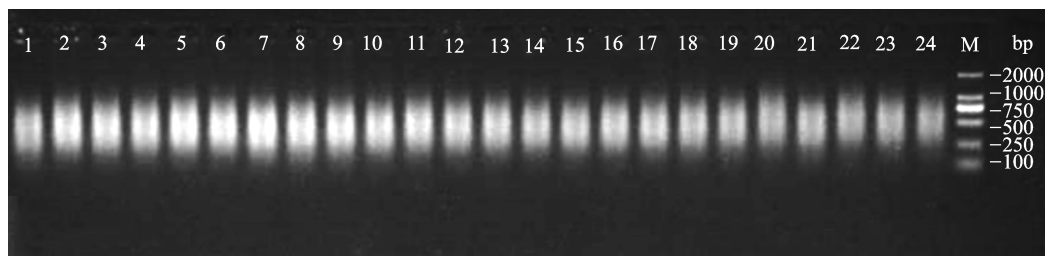
1.5.2 伺寨间香禾糯遗传多样性分析

利用 PopGene32 计算各个伺寨香禾糯的多态性位点百分率 PPL(Percentage of Polymorphic Loci),Nei's 基因多样性指数 H(Nei's Gene Diversity),Shannon's 多态性信息指数 I(Shannon's information index)。

2 结果与分析

2.1 酶切后预扩增的琼脂糖凝胶电泳图谱

样品的 DNA 经 *Eco*RI/*Mse*I 双酶切后,用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳,结果如图 1,无明显条带,试验达到预期目的,可以进行下一步的连接反应。



图中序号同表 1 品种序号

The serial number of the figure is the same as the serial number of Table 1

图 1 部分样品酶切后琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 1 The AGE of part samples digested by restriction enzyme

2.2 AFLP 标记遗传多样性分析

利用 8 对 AFLP 引物组合扩增 95 个样品,结果如表 3 所示。总共检测到 707 个位点,其中多态性位点 619 个,多态百分率为 87.55%。基因多样性指数为 0.2446;多样性信息指数为 0.3738。从扩增

条带的数量看,E59M84 引物最多为 127 条,其次是 E36M58 引物为 89 条,E35M48 引物扩增的条带最低为 73 条。平均每对引物扩增出 88.38 个位点和 77.38 个多态性位点。

表 3 95 个品种的遗传多样性分析

Table 3 Results of genetic diversity analysis of 95 samples

引物组合 Primer pair	样品数量 Sample size	观察等位基因数 Observed allelic number	有效等位基因数 Effective number of allele	基因多样性指数 Nei's gene diversity	多样性信息指数 Shannon's information index	多态位点 Polymorphic loci	总位点 Total loci	多态百分率(%) Percentage of polymorphic loci
E35M48	95	1.8082 $\pm$ 0.3964	1.4590 $\pm$ 0.3697	0.2681 $\pm$ 0.1890	0.4026 $\pm$ 0.2604	59	73	80.82
E35M58	95	1.9762 $\pm$ 0.1534	1.4284 $\pm$ 0.3585	0.2557 $\pm$ 0.1804	0.3944 $\pm$ 0.2378	82	84	97.62
E36M58	95	1.9101 $\pm$ 0.2876	1.4005 $\pm$ 0.3614	0.2399 $\pm$ 0.1833	0.3702 $\pm$ 0.2477	81	89	91.01
E41M59	95	1.8395 $\pm$ 0.3694	1.3537 $\pm$ 0.3280	0.2207 $\pm$ 0.1729	0.3451 $\pm$ 0.2416	68	81	83.95
E41M63	95	1.8068 $\pm$ 0.3971	1.3530 $\pm$ 0.3684	0.2105 $\pm$ 0.1901	0.3248 $\pm$ 0.2628	71	88	80.68
E59M84	95	1.8583 $\pm$ 0.3502	1.4100 $\pm$ 0.3807	0.2383 $\pm$ 0.1980	0.3600 $\pm$ 0.2723	109	127	85.83
E76M64	95	1.8588 $\pm$ 0.3503	1.4729 $\pm$ 0.3611	0.2767 $\pm$ 0.1861	0.4148 $\pm$ 0.2562	73	85	85.88
E85M48	95	1.9500 $\pm$ 0.2193	1.4221 $\pm$ 0.3453	0.2545 $\pm$ 0.1791	0.3910 $\pm$ 0.2425	76	80	95.00
总体 Total	95	1.8755 $\pm$ 0.3304	1.4115 $\pm$ 0.3613	0.2446 $\pm$ 0.1861	0.3738 $\pm$ 0.2545	619	707	87.55

2.3 侗寨间香禾糯的遗传多样性分析

根据 AFLP 扩增结果转化成“0,1”矩阵,利用 PopGene1.32 软件分析黔东南侗寨间香禾糯的遗传多样性。在 8 个侗寨中除了肇兴村(43.56%)外,其余 7 个侗寨香禾糯多态性位点百分率都大于 50%,表明黔东南地区侗寨内香禾糯遗传多样性较

高,遗传背景差异较大。按照多态百分率由高到低排序依次为黄岗村>高仟村>坑洞村>岩洞村=占里村>小黄村>侗家园>肇兴村,黄岗村和高仟村香禾糯的遗传多样性水平较其他侗寨的高。基因多样性指数最高的是高仟侗寨(0.2177),其次是黄岗侗寨(0.2065)(表 4)。

表 4 侗族村寨香禾糯的遗传多样性分析结果

Table 4 Genetic diversity analysis of Kam aromatic glutinous rice in Dong villages

村寨 Village	样品数量 Sample size	观察等位基因 Observed allelic number	有效等位基因 Effective number of allele	基因多样性指数 Nei's gene diversity	多样性信息指数 Shannon's information index	多态位点 Polymorphic loci	总位点 Total loci	多态百分率(%) Percentage of polymorphic loci
侗家园 Dongjiayuan	7	1.5021 ± 0.5003	1.3370 ± 0.4003	0.1896 ± 0.2108	0.2788 ± 0.2989	355	707	50.21
高仟 Gaoqian	18	1.6252 ± 0.4844	1.3648 ± 0.3799	0.2117 ± 0.2022	0.3167 ± 0.2860	442	707	62.52
黄冈 Huanggang	23	1.6506 ± 0.4771	1.3544 ± 0.3776	0.2065 ± 0.2003	0.3109 ± 0.2824	460	707	65.06
坑洞 Kengdong	13	1.6238 ± 0.4848	1.3528 ± 0.3788	0.2053 ± 0.2006	0.3087 ± 0.2832	441	707	62.38
小黄 Xiaohuang	9	1.5092 ± 0.5003	1.3163 ± 0.3870	0.1807 ± 0.2046	0.2689 ± 0.2905	360	707	50.92
岩洞 Yandong	10	1.5728 ± 0.4950	1.3384 ± 0.3823	0.1957 ± 0.2025	0.2930 ± 0.2869	405	707	57.28
占里 Zhanli	10	1.5728 ± 0.4950	1.3394 ± 0.3822	0.1961 ± 0.2032	0.2932 ± 0.2878	405	707	57.28
肇兴 Zhaoxing	5	1.4356 ± 0.4962	1.2963 ± 0.3938	0.1664 ± 0.2069	0.2447 ± 0.2945	308	707	43.56

2.4 侗族村寨间香禾糯遗传相似系数与遗传距离

黔东南 8 个主要侗寨香禾糯品种资源中,遗传距离范围在 0.0141~0.0529 之间(表 5),其中小黄和肇兴两个侗寨遗传距离最大,达到 0.0529。

8 个侗寨香禾糯品种资源的遗传相似系数范围在 0.9484~0.9860 之间,其中黄岗村和占里村 2 个侗寨的遗传相似性高达 0.9860,岩洞村和黄岗村侗寨的遗传相似性为 0.9844 次之。

表 5 侗族村寨间香禾糯遗传距离和遗传相似系数

Table 5 Genetic distance matrix and similarity matrix between Dong villages

	侗家园 Dongjiayuan	高仟 Gaoqian	黄冈 Huanggang	坑洞 Kengdong	小黄 Xiaohuang	岩洞 Yandong	占里 Zhanli	肇兴 Zhaoxing
侗家园 Dongjiayuan	****	0.9776	0.9789	0.9713	0.9608	0.9811	0.9677	0.9537
高仟 Gaoqian	0.0227	****	0.9779	0.9649	0.9653	0.9829	0.9727	0.9513
黄冈 Huanggang	0.0214	0.0224	****	0.9834	0.9762	0.9844	0.9860	0.9713
坑洞 Kengdong	0.0291	0.0357	0.0168	****	0.9637	0.9743	0.9727	0.9734
小黄 Xiaohuang	0.0400	0.0354	0.0241	0.0370	****	0.9697	0.9690	0.9484
岩洞 Yandong	0.0191	0.0173	0.0157	0.0260	0.0308	****	0.9797	0.9576
占里 Zhanli	0.0328	0.0277	0.0141	0.0277	0.0315	0.0205	****	0.9597
肇兴 Zhaoxing	0.0474	0.0499	0.0291	0.0269	0.0529	0.0433	0.0411	****

表中右上角为遗传相似性系数,左下角为遗传距离

The upper right corner of the table is the genetic similarity coefficient, the lower left is the genetic distance

基于黔东南香禾糯农家品种的遗传距离,采用UPGMA聚类法得到8个侗寨香禾糯品种资源的遗传距离图(图2)。8个主要侗寨香禾糯品种资源分为3大类群(I、II、III),I为整个遗传聚类图的基础,包含6个侗寨,又分为I-1、I-2两个亚类,其中I-1亚类含有侗家园、高仟和岩洞3个侗寨,I-2亚类含有占里、黄冈和坑洞3个侗寨。II、III类群分别只有小黄和肇兴1个侗寨。从整个遗传距离聚类图来看,大部分村寨的遗传距离与实际的地理位置差不完全对应,遗传距离与地理位置没有相关性。

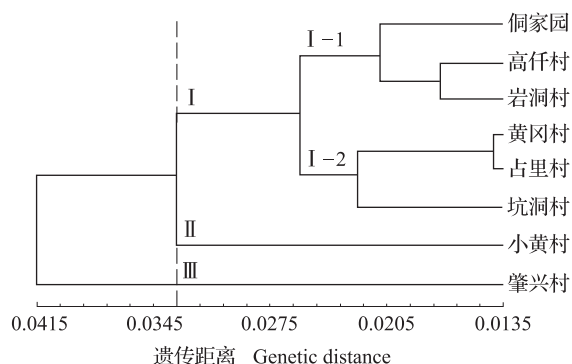


图2 基于香禾糯遗传距离的侗寨间聚类图

Fig. 2 Cluster dendrogram of Dong villages based on genetic distance of Kam aromatic glutinous rice

2.5 基于遗传相似系数的香禾糯品种的聚类分析

根据品种间遗传相似系数对供试材料进行聚类分析(图3)。95个香禾糯农家品种的遗传相似性系数值变异在0.6704~0.9958,其中31与20号两个品种的遗传相似系数最大(0.9958),31和14品种的遗传相似系数最小(0.6704)。当遗传相似系数为0.7546时,95个香禾糯农家品种在遗传聚类上被分为3大类(I、II、III),其中第III类群只有坑洞(Kengdong)的14号品种,14号品种的遗传背景较特殊,与其他香禾糯种群的亲缘关系较远,可能发生了极大的遗传变异或是外来引入品种。I类群又分为I-1、I-2两个亚类,但是整个聚类图主要以I-1簇为基础,包含了87个香禾糯品种,I-2只有1个品种。I-1又分出I-1-1、I-1-2两个分支,其中I-1-1分支又分成很多的小分支,包含的品种数量最大。II类群分出II-1和II-2两个分支,其中II-1分支含有2个品种(5,9),II-2分支含有4个品种(19,23,81,84)。在聚类图中,采集来自相同或相邻村寨的农家品种聚类是随机的,并没有明显地聚集为一个类群。

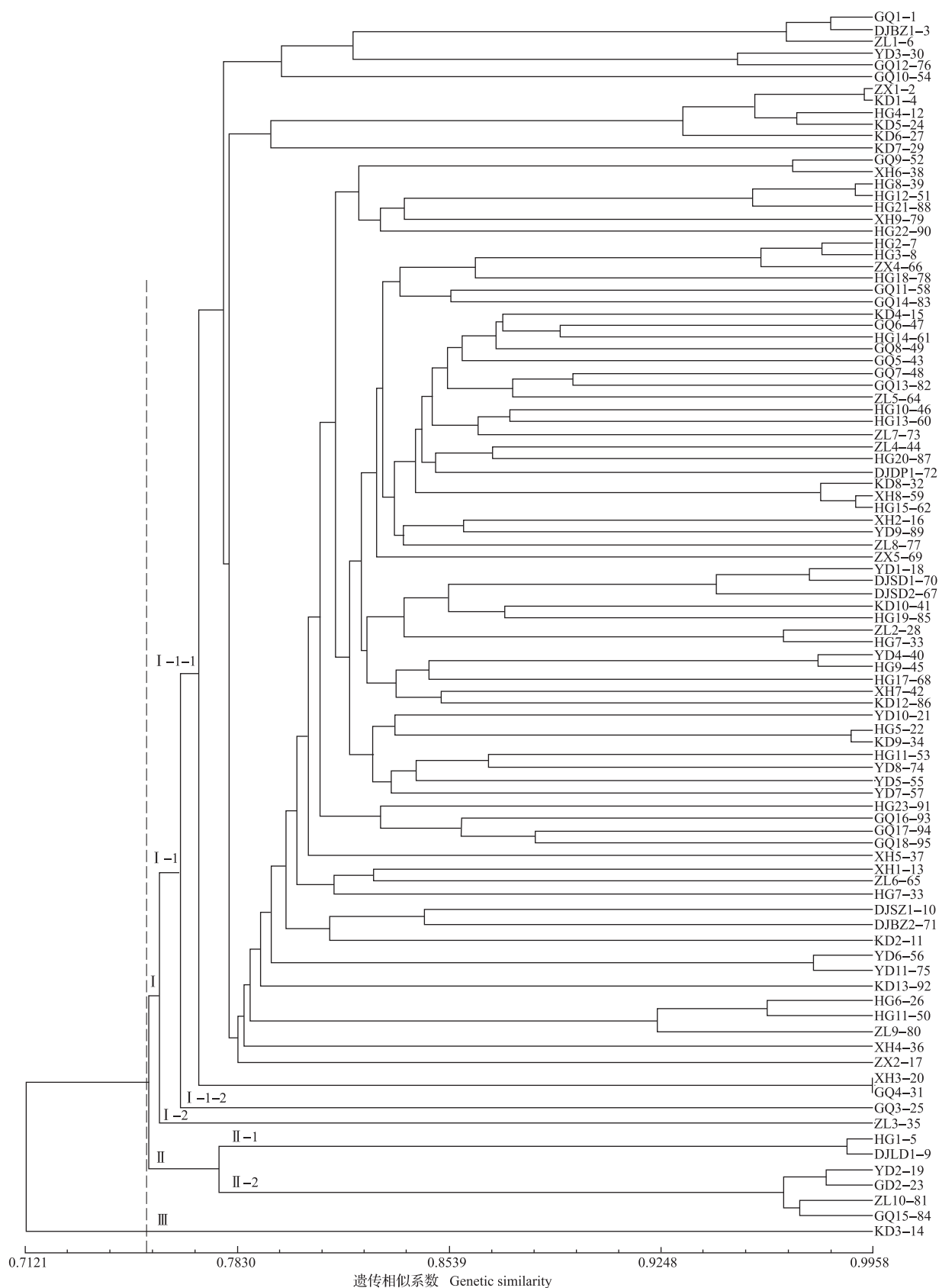
3 讨论

3.1 AFLP分子标记与黔东南香禾糯种质资源的多样性

本研究材料是2005-2015年在黔东南香禾糯主产区的黎平、从江和榕江3县全面收集到的368份种质资源基础上,通过民间分类确定的来源于8个主要侗族自然村寨的95个香禾糯品种。通过筛选的8对AFLP引物组合对该种质资源进行遗传多样性分析,共检测到707个位点,其中多态性位点为619个,多态百分率为87.55%。本研究的多态百分率比陈亮等^[13]用15对AFLP引物组合扩增来自韩国、非洲、美国及国内的部分优良水稻品种平均多态百分率(27%)要高出很多,也比K. Sorkheh等^[32]用10对AFLP引物组合扩增来自伊朗北部地区的水稻种质资源平均多态性百分率(64.71%)还高,本试验中8对AFLP引物组合中,平均每对引物扩增出88.38个位点和77.38个多态性位点,而蔡健等^[20]用4对AFLP引物组合,平均每个引物组合扩增出10.1个位点和40.5个多态性位点,从位点数和多态性位点数都远远没有本试验所检测到的多。说明AFLP分子标记技术对香禾糯种质资源多样性检测的效率较高,是分析香禾糯遗传多样性比较可靠的工具。95个香禾糯品种的遗传相似性系数范围为0.71~0.99,多样性信息指数为0.3738,说明黔东南香禾糯种质资源具有较高多样性水平。通过香禾糯种质资源AFLP遗传多样性的系统分析,揭示了黔东南地区香禾糯资源群间的亲缘关系和遗传多样性差异。AFLP用于民间传统分类香禾糯品种资源的遗传标记,显示出较高的多态性和有效性,明显地分开了民间传统分类的多样性香禾糯品种,说明了香禾糯民间传统分类对于认识作物品种的多样性具有重要的参考意义。

3.2 侗族村寨内香禾糯的遗传多样性

8个侗寨香禾糯多态性位点百分率范围为43.56%~65.06%(表4),除了肇兴村外,其余的7个侗寨的多态百分率都大于50%,表明黔东南地区主要侗寨内香禾糯的遗传多样性较高,遗传背景具有较大的差异。值得注意的是高仟和黄冈2个侗寨内遗传多样性水平相对较高,这可能与这些村寨复杂多样的自然环境、传统耕作文化和生活习俗相关。例如黄冈村至今仍然保存和延续着上千年传统生产生活习俗,耕作环境多样,耕田海拔相差近800m,村民一直保持主食香禾糯的习惯,每户至少都种植



3~4 个香禾糯品种,最多时全村一年可见 19 个品种的种植,香禾糯品种多样性较丰富,因而该村香禾糯群体遗传多样性水平较高。高仟村地理环境与民族传统习俗与黄岗侗寨很类似,直到 1996 年才引入少量的杂交稻种植,虽然近几年来杂交稻种植面积不断增加,但村民们种植的香禾糯品种数量并没有因此而减少,因而该侗寨的遗传多样性水平也相对较高。而八舟和尚重等侗寨,地势平缓、交通便利,杂交稻推广较早、种植面积较大,这些村寨的糯米品种大多数已经被糯性杂交稻所代替,仅种植少量的八舟黑禾和尚重红禾等这类非常有特色的传统香禾糯品种,一些传统的香禾糯品种已经消失。但总体来说,侗族地区很多边远村寨仍然保持着传统的生产生活习俗,耕作环境复杂多样,各村种植的香禾品种也各不相同,因而这些侗寨内和整个地区的香禾糯遗传多样性水平都较高。

8 个侗寨间的香禾糯遗传相似系数范围在 0.9484~0.9860 之间,其中黄岗村和占里村 2 个侗寨的遗传相似性高达 0.9860,亲缘关系是最近的,岩洞村和黄岗村的遗传相似性次之为 0.9844。黄岗村和占里村是香禾糯传统耕作文化保持相对最完整的侗寨,两村寨相距 20 多 km,由于近年来交往较频繁,香禾糯品种的交换较多,遗传相似性较大。黎平县的岩洞村到黄岗村山区公路有 80 多 km,这两个村寨的遗传相似性达到了 0.9844,其中的原因可能是 2006 年以来在岩洞镇岩洞村建设“侗人文化家园”后,每年从黄岗、高仟等乡村引进的部分香禾糯品种推广栽培后所导致的。从村寨的遗传距离聚类图来看,8 个侗寨的香禾糯遗传距离没有按地理距离的远近而聚类,说明了遗传距离与地理位置没有相关性。

3.3 香禾糯遗传多样性的形成与保护

苗族侗族自治州的自然环境历来有“九山半水半分田”之说,稻作环境复杂多样。如前所述侗寨的耕作环境和传统的农耕文化,说明了黔东南香禾糯种质资源遗传多样性的形成,不仅与地区复杂多变的自然环境有关,还与该地区少数民族的传统耕作制度和民族传统文化延续密切相关。许多的研究已表明,传统农耕种植系统中的种子交换是作物品种多样性形成的主要原因^[33-34]。在侗族传统社会里,村内和相邻村寨之间香禾糯品种的交换是非常普遍的,此外通过村民的讨要、赠予、婚嫁等传统习俗与礼仪则成为各村寨香禾糯新品种来源的重要途径。调查中发现,邻近村寨间的相同品种所占比例

一般约为 30%~50%。较远村寨之间品种增加只是通过走访后赠送或讨要等方式进行,仅仅讨要一个或几个认为较好的品种而已,村寨之间没有大量的品种交换,从来也没有市场的交换,这可能是村寨内香禾糯遗传多样性较高的原因,也许能解释在本研究的 95 个农家品种相似系数的聚类结果中,出现了有些侗寨虽然地理位置距离较远,如 20 号和 31 号属于不同侗寨的品种,但其遗传相似性却比较高的原因。

一些研究已表明,土著社会的传统农业模式以及传统文化是地方多样性作物种质资源得以保存下来的重要原因^[23-24,35-37]。通过民族植物学调查是收集本土植物利用与保护传统知识最常见的方法,可能是生物多样性评估的一个非常有价值的信息来源^[38]。至今,在侗寨地区的许多边远侗寨,诸如黄岗、占里等仍然保持着几百年来传统的耕作制度,侗民族在长期的生产实践中,以混作、轮作的传统耕作方式为主生产香禾糯,并利用稻田养鱼和鸭,形成了“稻鱼鸭共生”的原始农业生态系统。侗族这些传统的耕作文化不仅仅有利于病虫害防治、提高香禾糯产量,同时提供了鱼、鸭、蛋等丰富的农副产品,更好地保护了香禾糯品种的多样性,科学地解决了长期以来这一带侗族人民的重大生计问题而一直延续到现在,以香禾糯生产为主的“稻鱼鸭共生系统”也因此入选世界农业文化遗产。说明了传统农耕文化对于维系香禾糯种质资源的遗传多样性具有非常重要的作用。据资料记载,在明清时期的黔东南各少数民族几乎都种植糯稻并以糯米为主食^[25,30],这种传统至今在该地区苗族、侗族等少数民族的生活与生产中仍然延续着,糯米与他们的社会交往、礼仪习俗、医药与艺术等都有着非常密切的联系^[23]。因此,为了保证他们饮食习惯和满足各种文化活动的需要,他们在长期的生产实践中筛选了一系列适应各村寨耕作环境的香禾糯品种,不断改善品质和提高产量以满足他们生活与传统文化活动需要。此外,黑禾、紫禾以及杉树皮禾除了用于酿酒外,还具有治疗结核病、妇科病等重要医药价值而得到较为特别的保护,多样化的民族传统文化需要也许是该地区香禾糯品种多样性维持的主要动力和原因。因此,在当前该地区的香禾糯种质资源多样性保护工作中,不仅要考虑香禾糯的自然生态环境因素,还要充分考虑和重视维系这些珍贵品种资源极为重要的地域性民族文化传统因素。

参考文献

- [1] Govindaraj M, Vetriventhan M, Srinivasan M. Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: an overview of its analytical perspectives[J]. Genet Res Int, 2015, doi:10.1155/2015/431487
- [2] Babu B K, Meena V, Agarwal V, et al. Population structure and genetic diversity analysis of Indian and exotic rice (*Oryza Sativa* L.) accessions using SSR markers[J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(7):4329-4339
- [3] Travis A J, Norton G J, Datta S, et al. Assessing the genetic diversity of rice originating from Bangladesh, Assam and West Bengal[J]. Rice, 2015, DOI:10.1186/s12284-015-0068-z
- [4] Kaur S, Panesar P S, Bera M B, et al. Simple sequence repeat-markers in genetic divergence and marker-assisted selection of rice cultivars: A review[J]. Crit Rev Food Sci, 2015, 55(1):41-49
- [5] Tu M, Lu B R, Zhu Y, et al. Abundant within-varietal genetic diversity in rice germplasm from Yunnan Province of China revealed by SSR fingerprints[J]. Biochem Genet, 2007, 45(11-12):789-801
- [6] Nachimuthu V V, Muthurajan R, Duraiaguraja S, et al. Analysis of population structure and genetic diversity in rice germplasm using SSR markers: An initiative towards association mapping of agronomic traits in *Oryza sativa*[J]. Rice, 2015, DOI 10.1186/s12284-015-0062-5
- [7] Nourollah A. Genetic diversity, genetic erosion, and conservation of the two cultivated rice species (*Oryza sativa* and *Oryza glaberrima*) and their close wild relatives. Genetic Diversity and Erosion in Plants[M]. Switzerland: Springer International Publishing, 2016:35-73
- [8] 卢宝荣. 稻种遗传资源多样性的开发利用及保护[J]. 生物多样性, 1998, 6(1):63-72
- [9] Alam S M M, Siddika S, Haque M E, et al. Genetic diversity of some upland and lowland rice cultivars in Bangladesh using RAPD, ISSR and SSR markers[J]. Nucleus, 2016, 59(1):15-23
- [10] Rajkumar G, Weerasena J, Silva R, et al. Genomic diversity of Sri Lankan new improved rice varieties revealed by AFLP markers[J]. Int J Appl Sci Biotechnol, 2016, 4(1):32-38
- [11] Zossou N, Adoukonèou-Sagbadja H, Fonceka D, et al. Genetic diversity of rice vampireweed (*Rhaphicarpa fistulosa*) populations in rainfed lowland rice in west africa[J]. Weed Sci, 2016, 64(3):430-440
- [12] Bao J S, Corke H, Sun M. Analysis of genetic diversity and relationships in waxy rice (*Oryza sativa* L.) using AFLP and ISSR markers[J]. Genet Resour Crop Evol, 2006, 53(2):323-330
- [13] 陈亮, 梁春阳, 孙传清, 等. AFLP 和 RFLP 标记检测水稻亲本遗传多样性比较研究[J]. 中国农业科学, 2002, 35(6):589-595
- [14] Vasudeo R R, Ullah F M Q, Jin S K, et al. Genetic diversity and relationships among rice accessions (*Oryza sativa* L.) of cultivated and weedy types using CACTA-TD and AFLP markers[J]. Res J Biotechnol, 2016, 11(8):27-38
- [15] 张春庆, 贾继增. 水稻 AFLP 指纹图谱的引物选择研究[J]. 中国农业科学, 2002, 35(7):733-737
- [16] 李鸿雁, 李志勇, 辛霞, 等. 野生扁蓊豆种质资源 AFLP 遗传多样性的分析[J]. 植物遗传资源学报, 2016, 17(1):78-83
- [17] 许云, 吴文婧, 谢俊, 等. 111 份大薯种质资源遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(2):299-304
- [18] Sim S, Chang T, Curley J, et al. Chromosomal rearrangements differentiating the ryegrass genome from the Triticeae, oat, and rice genomes using common heterologous RFLP probes[J]. Theor Appl Genet, 2005, 110(6):1011-1019
- [19] Li M, Qi X, Yuyama N, et al. Synteny between *Zoysia japonica* Steud. and *Oryza sativa* L. based on RFLP, CISP and PLUG markers[J]. Genet Resour Crop Evol, 2015, 62(6):853-862
- [20] 蔡健, 兰伟. AFLP 标记与水稻杂种产量及产量杂种优势的预测[J]. 中国农学通报, 2005, 21(4):39-43
- [21] 杨黎, 周定生, 郑桂云, 等. 黔东南原生态农耕文化——禾[J]. 贵州农业科学, 2008, 36(4):23-26
- [22] 崔海洋. 从糯稻品种的多样并共存看侗族传统文化的生态适应成效[J]. 学术探索, 2009(4):74-79
- [23] 雷启义, 张文华, 孙军, 等. 黔东南香禾糯遗传资源的传统管理利用[J]. 植物分类与资源学报, 2013, 35(2):195-201
- [24] 王艳杰, 王艳丽, 焦爱霞, 等. 民族传统文化对农作物遗传多样性的影响——以贵州黎平县香禾糯资源为例[J]. 自然资源学报, 2015, 30(4):617-628
- [25] 严奇岩. 黔东南地区“香禾糯改籼稻”的历史考察[J]. 古今农业, 2008(3):27-34
- [26] 吴祥厚. 黎平、从江、榕江“禾”考察报告[J]. 贵州农业科学, 1981(5):65-69
- [27] 马琳, 余显权, 赵福胜. 贵州地方水稻品种的 SSR 遗传多样性分析[J]. 中国水稻科学, 2010, 24(3):237-243
- [28] 焦爱霞, 王艳杰, 陈惠查, 等. 贵州黎平县侗族村寨香禾糯资源利用与保护现状的考察[J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(1):173-177
- [29] 程良炳. 地方稻种——禾的特点及其利用意见[J]. 贵州农业科学, 1981(2):23-27
- [30] 杨筑慧. 侗族糯稻种植的历史变迁——以黔东南黎平、榕江、从江为例[J]. 云南民族大学学报: 哲学社会科学版, 2014, 31(5):53-61
- [31] 吴元华, 浦选昌, 杨昌元, 等. 黔东南禾稻类型分类及叶龄栽培模式研究[J]. 贵州农业科学, 2010, 38(1):49-52
- [32] Sorkheh K, Masaeli M, Chaleshtori M H, et al. AFLP-based analysis of genetic diversity, population structure, and relationships with agronomic traits in rice germplasm from north region of Iran and world core germplasm set[J]. Biochem Genet, 2016, 54(2):177-193
- [33] Thomas M, Dawson J C, Goldringer I, et al. Seed exchanges, a key to analyze crop diversity dynamics in farmer-led on-farm conservation[J]. Genet Resour Crop Evol, 2011, 58(3):321-338
- [34] Pautasso M, Aistara G, Barnaud A, et al. Seed exchange networks for agrobiodiversity conservation. A review[J]. Agron Sustain Dev, 2013, 33(1):151-175
- [35] Altieri M A, Merrick L. In situ conservation of crop genetic resources through maintenance of traditional farming systems[J]. Econ Bot, 1987, 41(1):86-96
- [36] 龙春林, 张方玉, 裴盛基, 等. 云南紫溪山彝族传统文化对生物多样性的影响[J]. 生物多样性, 1999, 7(3):245-249
- [37] Zhu Y Y, Wang Y Y, Chen H R, et al. Conserving traditional rice varieties through management for crop diversity[J]. Bioscience, 2003, 53(2):158-162
- [38] Zhu Y Y, Chen H R, Fan J H, et al. Genetic diversity and disease control in rice[J]. Nature, 2000, 406:718-722