

羊草的遗传多样性及其分化

刘欣, 崔继哲, 张隽, 王东艳, 弭晓菊, 路芳

(哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150025)

摘要:羊草是一种优质牧草,对改善生态环境和促进草原畜牧业的可持续发展具有十分重要的战略意义。由于环境恶化,羊草草地缺乏科学管理,羊草种质资源的多样性面临着严重威胁,现通过结合相关的研究,对羊草的形态和生理分化、分子水平的遗传多样性进行了综合分析,并探讨了该领域未来的发展方向,以期对羊草种质资源保护和培育提供参考。

关键词:羊草;遗传多样性;遗传分化;种质资源

中图分类号:S 54 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)08-0182-04

羊草(*Leymus chinensis*)属禾本科赖草属多年生草本植物,其环境适应性强,具有耐寒、耐旱、耐盐碱、产草量高、适口性好等优点,在发展草原畜牧业^[1]、人工草地和生态建设及研究盐生植物抗逆机制^[2]等方面具有重要作用^[3-6]。但是近年来,由于全球气候变化、干旱高温、过度放牧和草地盐碱化日益加重,我国90%以上的羊草草地发生了不同程度的退化^[7],羊草种质资源的多样性面临着严重威胁^[8]。因此,对我国的羊草种质资源进行系统研究,以筛选出能代表羊草种质遗传多样性的关键种质材料,对羊草种质资源的保护、草场生态建设具有重要意义。关于羊草的遗传多样性及其分化已有许多研究,现结合相关文献,对羊草的表型、生理特性及分子水平的分化进行综合分析,并探讨了该领域未来的发展方向,以期对羊草种质资源的深入研究、保护和利用提供参考。

1 羊草的表型分化

形态学性状是羊草种质资源收集、整理和评价研究中的一类重要数据资料,并且是改良羊草种质的基础。羊草分布广泛,不同地理环境下的羊草在形态结构上发生了一定程度的变异,这些变异与羊草的生境有着紧密的联系^[9-11]。

生长在砂质土壤的羊草根毛数较多,根部具有沙

套,茎、叶内机械组织发达^[12]。生长在盐碱土上的羊草较生长在黑土地上的羊草的根相对较粗,外皮层细胞较小且壁厚,有助于支持作用,根外皮层栓化程度高,皮层部分薄壁细胞破损为发达的通气组织,茎细胞均为薄壁型,髓腔小,叶厚,角质层厚,气孔多关闭,叶维管束鞘介于C₃和C₄植物之间^[13],由此可见,土壤是影响羊草表型重要的因素。

随后的研究发现,羊草结构上的差异和它们原生境的水分条件关系较为密切,羊草的分化是多种生态因子共同作用的结果,不同的生境导致羊草出现不同的变异。任文伟等^[9]比较了吉林、中国科学院草原定位站和谢尔塔拉3个区域种群羊草的形态解剖结构。吉林羊草叶的横截面积及维管束之间泡状细胞的排列方式与中国科学院草原定位站和谢尔塔拉明显不同,吉林羊草叶的维管束之间泡状细胞的排列方式更有利于干旱情况下叶片快速且更大幅度的卷曲,其防止水分散失能力即抗旱能力最强;另外,吉林羊草可能由于长期生长在高盐度土壤环境,产生了一些类似于盐腺的结构,谢尔塔拉羊草由于适应长期的湖水浸泡,长出了一些类似于通气孔的结构。

不同地理种群羊草选择的繁殖对策也是不同的,阿旗、谢尔塔拉、西乌旗、吉林和中国科学院草原定位站5个区域的羊草种子萌发率相差较大,其中阿旗的萌发率最高为33.75%,其次分别为谢尔塔拉、西乌旗、吉林,中国科学院草原定位站的萌发率最低为4.5%。中国科学院草原定位站和吉林的种子萌发率虽然较低,但是其无性繁殖的总苗数却大大超过了阿旗羊草,虽然阿旗和谢尔塔拉的萌发率较高,但其无性繁殖的种苗数却较低^[9]。

王克平^[14-15]较早开展了羊草表型分化类型的调查研究,发现按穗状花序的不同,羊草可分为单生型、复生

第一作者简介:刘欣(1988-),女,硕士研究生,研究方向为植物分子生物学。E-mail:LX606088@163.com.

责任作者:崔继哲(1962-),女,博士,教授,现主要从事植物抗逆分子生物学和分子生态学等研究工作。E-mail:shiccc1@sina.com.

基金项目:黑龙江省自然科学基金资助项目(C201309);黑龙江省教育厅科学技术研究资助项目(12541230);哈尔滨师范大学科技发展预研资助项目。

收稿日期:2015-01-19

型和圆锥型 3 种类型;按花药、粒色和颖可分为黄色、紫色和斑色 3 种类型;从叶色上可分为灰色、灰绿色和黄绿色 3 种类型。经移栽试验和等位酶技术分析发现,灰色和灰绿色羊草只是不同的生境型,并没有出现稳定的遗传分化,自然生境中的灰色和灰绿色羊草混生构成了灰绿型羊草种群;而黄绿型羊草则是一种稳定的差异类型^[16]。在羊草的生长区域内,黄绿型和灰绿型 2 种叶片颜色明显不同的羊草呈小斑块状镶嵌分布,但是分布的优势存在差异,在内蒙古草原上黄绿型羊草分布占优势,在松嫩平原盐碱化草地上灰绿型羊草比例明显增多^[17]。同一生境下,黄绿型羊草有相对高的叶质量和叶片厚度、较低的气孔密度,表现出更加喜旱的解剖学特征^[18],2 种叶色羊草的平均叶片数没有差别,但是灰绿型的平均叶长和叶宽高于黄绿型羊草,平均株高也高于黄绿型羊草,灰绿型羊草的生长活力总体优于黄绿型羊草;此外,灰绿型羊草的表皮毛较少,但具有非常密集的微绒毛,而黄绿型羊草的上表面只有零星的微绒毛分布^[19],花的数量,谷粒重差异显著^[20],灰绿型羊草的产量远高于黄绿型(约 1.4 倍)^[19]。

在较早的研究中,并没有关注到羊草的生态型分化,称羊草为广幅旱生型,认为在不同区域中,形态、发育和生理上有差异的羊草只是不同的生境型或适应型,但是在驯化栽培后发现,灰绿型和黄绿型 2 个差异型羊草的不同性状是稳定遗传的,并且从光合生理生态特性^[21-22]、种群特征^[23-24]和分子水平上^[25-26],这 2 个类型种群都表现出了明显的遗传分化,证实了黄绿型和灰绿型是 2 种不同的生态型^[25]。

此外,羊草的小穗数、种子千粒重、有性繁殖量和结实率与遗传多样性指标存在显著的相关性^[27],因此在羊草种质资源的遗传评估研究中,羊草的叶色、小穗数、种子千粒重、有性繁殖量和结实率与遗传多样性指标这 5 个表型性状应作为考察的重点^[19]。

2 羊草的生理特性分化

不同地理种群羊草生理特性存在明显分化。不同种源的羊草对 PEG 模拟干旱胁迫处理的反应不同,不同地理种群羊草按 SOD 和 POD 活性及 MDA 含量不同可分成三大类,这种类别与它们对各自自然生境水环境的适应一致^[28]。不同地理种群羊草在 PEG 模拟干旱条件下的 SOD、POD 活性和 MDA 含量的变化也表现出不同,吉林羊草明显异于其它羊草,可能是因为吉林羊草生长在盐碱地中,长期的自然选择使其分化成抗逆性非常强的地理种群;比较叶片含水量、游离脯氨酸含量、电阻及电导并通过聚类分析发现,谢尔塔拉明显异于其它羊草,可能是因为谢尔塔拉羊草的原生境是一个环水的小岛,在自然选择的压力下,分化成为 5 个区域中一类

抗涝性很强却最不抗旱的一个地理种群^[9]。

虽然 2 种生态型羊草种群的生理指标在整个生长季内是不断变化的,但是黄绿型和灰绿型羊草在生理特性上表现出了明显的分化特征。在同一生境下,2 种生态型羊草对光强度、气温、相对湿度、叶温、气孔扩散阻力的响应、光合生理等方面均表现为差异显著^[22],灰绿型羊草种群的含水率、叶绿素含量、含氮量、脯氨酸、 K^+/Na^+ 含量都高于黄绿型羊草种群,而细胞膜透性小于黄绿型羊草种群^[18,29],灰绿型的光合速率和蒸腾速率相对较高^[22],而且表现出更强的渗透调节能力^[18]。

在干旱胁迫下,2 种生态型羊草的电解质外渗率、脯氨酸、植株含水率、植株鲜重、 SO_4^{2-} 和 NO_3^- 等均有显著或极显著差异,灰绿型羊草的耐旱能力强于黄绿型^[30-31]。幼苗期分别在不同强度的 NaCl、 Na_2CO_3 和混合盐碱胁迫下,灰绿型和黄绿型 2 个试验种群羊草叶片的叶绿素含量、电解质外渗率、脯氨酸和 Na^+/K^+ 含量均有显著或极显著差异^[17],灰绿型羊草的耐盐碱能力强于黄绿型^[32],光合生产能力和生理适应性均优于黄绿型^[21]。在 60、120、180、240、300、360 mM 的不同浓度的混合中性盐($NaCl:Na_2SO_4=9:1$)和碱性盐($NaHCO_3:Na_2CO_3=9:1$)胁迫下,羊草植株的多糖含量变化较为明显,蔗糖、葡萄糖和果糖的变化很小,在自然生境下,灰绿型和黄绿型羊草的可溶性多糖含量、单糖组分、组成结构上不同,灰绿型羊草的可溶性多糖组分中甘露糖和阿拉伯糖高于黄绿型,而葡萄糖则低于黄绿型,说明多糖可能在羊草的抗逆性中起着一定的作用,灰绿型羊草较强的抗盐碱能力可能与其体内较高的甘露糖和阿拉伯糖有关^[33-34]。总之,灰绿型和黄绿型羊草对干旱和盐碱环境有不同的适应策略,在光合生理生态特性、抗干旱、耐盐碱胁迫等方面具有稳定遗传差异,是羊草育种中特别值得重视的种质资源。

3 羊草分子水平的多样性

羊草分子水平多样性的研究目前主要集中在 2 个方面,一是对羊草自然种群遗传多样性的研究,二是对羊草 2 种叶色种群遗传多样性的比较和彼此间分化程度的研究。

RAPD 是羊草早期生物学研究中利用较为广泛的分子标记技术,被用于不同地理种群羊草的遗传多样性的研究中。研究揭示,羊草种群的遗传多样性与其生境的相似性有关,相似度高的生境,羊草种群的遗传一致度高,而地理区域复杂的生境中羊草的遗传多样性更为丰富。崔继哲等^[35]分析了松嫩草原上 9 个羊草不同种群的遗传多态性,发现相似生境或同一地域的种群的 RAPD 扩增片段的有无及频率变化在一些位点上表现出相似或相同的趋势。祝延成^[36]对我国东北天然草地上 16 个羊草种群遗传变异的研究发现,即使地理距离

很近,但是生境不同的种群间也有较大的遗传分化。刘惠芬等^[27]分析了内蒙古典型草原不同生境下的8个羊草种群,生境相似的种群能聚类到一起,而个别群体间的地理距离非常近,但是由于小范围内生境的异质性并没有聚类到一起。

利用 RAPD 和 AFLP 等技术对灰绿型和黄绿型羊草种群的研究,明确揭示了它们之间的遗传分化。崔继哲等^[37]对松嫩草原上分布的灰绿型和黄绿型羊草种群的 RAPD 分析发现,灰绿型种群的多态位点百分率都在 70% 以上,而黄绿型种群的都小于 50%,羊草表型分化与基因型分化一致,黄绿型种群的遗传多样性低于灰绿型种群。Xu 等^[26]用 AFLP 技术研究了 53 份羊草种质之间的遗传变异,同样发现灰绿型和黄绿型羊草的遗传多样性具有显著差异。结合上述 2 种生态型羊草的表型及生理特性的比较,灰绿型羊草比黄绿型羊草具有更大的遗传变异、灰绿型羊草的多态位点更多、抗逆性更强。总之,灰绿型和黄绿型在遗传结构上已经存在明显的分化,是明显不同的 2 个种群。

羊草的遗传变异和分化受多种生态因子的影响。任文伟等^[28]从个体、生理、细胞、同工酶及 DNA(RAPD)等水平上研究不同地理种群羊草,发现羊草遗传分化的过程比较复杂,在不同层次上表现出不同的适应性反应,水因子是影响羊草分化的主导因子。刘杰等^[38]运用 RAPD 技术研究发现,在同一气候区域,但不同土壤条件下影响羊草种群遗传多样性的主要因子是土壤的电导率和水溶性钠离子的含量。利用 AFLP 和 MSAP 分子标记技术对松嫩平原 4 个天然灰绿型羊草种群 48 个单株进行遗传与表观遗传多态性和遗传结构的研究,可遗传的表观遗传变异可能是由不同的盐碱条件引起的栖息地异质性的影响造成的,甲基化变异模式具有种群特异性,同时种群间也存在甲基化变异,但是程度不同, AFLP 相似度比 MSP(甲基化敏感多态性)和 MISP(甲基化不敏感多态性)要高很多,说明羊草 DNA 甲基化多态性既受遗传变异的影响,同时也具有独立产生和维持的机制^[39]。遗传多样性与生态因子的相关结果表明,土壤中的有机质、全氮含量与多态位点百分数呈现较大的负相关;土壤中镁离子、钙离子与特有条带百分数呈较大的负相关;土壤的电导率、水溶性钠离子的含量与遗传距离呈现较大的正相关^[40]。可见,羊草的遗传分化的多样性不是某种单一生态因子作用的结果,而是与多种生态因子的共同作用相关。

4 展望

一个物种遗传多样性的高低决定了这个物种进化的潜力和抵御不良环境的能力^[41],羊草是我国典型草原植物群落中的优势植物种,可以在干旱、盐碱等多种土壤和气候条件下正常生长,不同类型的生境造就了羊草

极其丰富的遗传多样性。加强对羊草种质资源的研究,对草原畜牧业的发展,对退化、沙化、盐碱化草地的改良,及我国北方生态环境的治理等都具有举足轻重的地位。

羊草遗传多样性丰富、抗逆性很强、产草量高,是挖掘优良基因的重要材料,有关研究已经鉴定出了羊草中一些与植物抗逆性、信号转导、能量产生和转换、无机离子的运输等有关的重要基因。在 Na_2CO_3 碱胁迫处理的羊草幼苗中分离得到了 22 个差异表达的基因片段^[42];通过构建盐胁迫的消减文库,获得了 548 个响应盐碱胁迫的基因^[43];鉴定出了 2 979 个冷胁迫响应基因^[44];对羊草盐胁迫试验组和对照组进行转录组测序分析,鉴定出了在盐胁迫后 36 497 个上调表达和 18 218 个下调表达的基因,其中 16 个基因的转录情况已经通过实时定量 PCR 证实^[45]。羊草的转录因子 DREB(LcDREB)明显增强了拟南芥对低温、干旱和盐等多种逆境的适应和抵抗能力^[46],LcDREB2 和 LcSAMDC2 相互作用对植物抵抗非生物胁迫起着重要的作用^[47]。

对羊草优良基因的挖掘,可为近缘农作物的育种提供可利用的重要基因资源,小麦抗逆新品种的选育是世界性急需解决的重大课题,羊草与小麦和小麦密切相关,羊草作为小麦品质改良的三级基因库^[19],克隆与羊草优良性状相关的基因,通过远缘杂交或遗传转化将其导入小麦,有望可以改良小麦,增强小麦对环境的适应性。总之,羊草基因丰富的遗传多样性,将是未来基因表型研究和羊草及其它禾本科植物分子育种的一个宝贵的资源。

参考文献

- [1] 刘公社,齐冬梅. 羊草生物学研究进展[J]. 草业学报,2004,13(5):6-11.
- [2] Sun Y L, Hong S K. Sensitivity of translation initiation factor eIF1 as a molecular target of salt toxicity to sodic-alkaline stress in the halophytic grass *Leymus chinensis*[J]. Biochem Genet, 2013, 51: 101-118.
- [3] 侯振安,李品芳,龚元石. 盐渍条件下羊草生长和营养吸收的比较研究[J]. 草业学报,2000,9(4):68-73.
- [4] 夏丽华,郭继勋. 磁处理种子对羊草生长及抗盐碱性的影响[J]. 草业学报,2001,10(1):58-63.
- [5] 刘颖,王德利,王旭,等. 不同放牧强度下羊草草地三种禾草叶片再生动态研究[J]. 草业学报,2001,10(4):40-46.
- [6] Liu S H, Kang Y H, Wan S Q. Water and salt regulation and its effects on *Leymus chinensis* growth under drip irrigation in saline-sodic soils of the Songnen Plain[J]. Agricultural Water Management, 2011, 98: 1469-1476.
- [7] 孔祥军,梁正伟. 羊草分子生物学研究进展[J]. 生命科学研究, 2007, 11(4): 289-294.
- [8] 郝亚琦,刘公社,王丽娟,等. 羊草光合作用相关基因的克隆与分析[J]. 西北植物学报,2007,27(5):859-863.
- [9] 任文伟,钱吉,吴霆,等. 不同地理种群羊草的形态解剖结构的比较研究[J]. 复旦学报(自然科学版),1999,38(5):561-564.
- [10] 任文伟,钱吉,郑师章. 不同地理种群羊草的遗传分化研究[J]. 生态学报,1999,19(5):689-696.
- [11] Vanrossum F, Meerts P, Gratia E, et al. Allozyme variation in relation to

ecotypic differentiation and population size in marginal populations of *silene nutans*[J]. *Heredity*,1997,78:552-560.

[12] 王策箴.羊草的内部构造及其细胞学的研究[J].中国草原,1983(1):41-45.

[13] 陆静梅,李建东.同种不同生态环境植物解剖结构比较研究[J].东北师大学报(自然科学版),1994(3):100-104.

[14] 王克平.羊草物种分化的研究.Ⅳ.野生种群的考察[J].中国草原,1984(2):32-36.

[15] 王克平.羊草物种分化的研究.试验地种群对比 1.羊草授粉特性的测定[J].中国草原,1985(2):43-44.

[16] 崔继哲,曲来叶,祖元刚.松嫩平原中部地区羊草种群的遗传结构研究[J].植物研究,2000,20(1):89-93.

[17] 周婵,杨允非.松嫩平原两个生态型羊草实验种群对盐碱胁迫的生理响应[J].应用生态学报,2003,14(11):1842-1846.

[18] Chen L,Wang R Z. Anatomical and physiological divergences and compensatory effects in two *Leymus chinensis* (Poaceae) ecotypes in Northeast China[J]. *Agriculture, Ecosystems and Environment*,2009,134:46-52.

[19] 刘公社,刘晓峰.羊草种质资源研究[M].北京:科学出版社,2011.

[20] Zhou C,Zhang Z,Zhang S,et al. Sexual reproduction and plasticity analysis of two ecotypes *Leymus chinensis* on heterogeneity soil[J]. *Applied Mechanics and Materials*,2014,522-524:450-453.

[21] 周婵,杨允非,王堃.红蓝复合光谱对两个生态型羊草光合生理特性的影响[J].光谱学与光谱分析,2008,28(7):1441-1444.

[22] 王德利,王正文,张喜军.羊草两个趋异类型的光合生理生态特性比较的初步研究[J].生态学报,1999(19):837-843.

[23] 杨允非,郑慧莹,李建东.松嫩平原两个趋异类型羊草无性系种群特征的比较研究[J].植物学报,1997,39(11):1058-1064.

[24] 周婵,杨允非.松嫩平原两个生态型羊草种群生长机制[J].应用生态学报,2006,17(1):51-54.

[25] 崔继哲,祖元刚,聂江力,等.松嫩草原羊草种群遗传分化的研究[J].植物研究,2001,21(1):116-125.

[26] Xu S X,Shu Q Y,Liu G S. Genetic relationship in ecotypes of *Leymus chinensis* revealed by polymorphism of amplified DNA fragment lengths[J]. *Russ J Plant Physiol*,2006,53:678-683.

[27] 刘惠芬,高玉葆,阮维斌,等.内蒙古中东部不同草原地带羊草种群遗传分化[J].生态学报,2004,24(10):2157-2164.

[28] 任文伟,罗岫泉,郑师章.不同种源羊草的SOD,POD的活性及丙二醛含量的比较[J].植物生态学报,1997,21(1):77-82.

[29] 周婵,杨允非.我国北方2个生态型羊草种群生理特性研究[J].草业科学,2007,24(2):40-46.

[30] 周婵,杨允非,李建东.松嫩平原两种趋异类型羊草对干旱胁迫的生理

响应[J].应用生态学报,2002,13(9):1109-1112.

[31] Zhou C,Guo S,Yan X F,et al. Physiological response of *Leymus chinensis* with different leaf colors on drought stress[J]. *Advanced Materials Research*,2013,726-731:425-428.

[32] 周婵,邹志远,杨允非.盐碱胁迫对羊草可溶性蛋白质含量的影响[J].东北师范大学学报(自然科学版),2009,41(3):94-96.

[33] Li J J,Bi H T,Yan J H,et al. Comparative analysis of polysaccharides from two ecological types of *Leymus chinensis*[J]. *Chemical Research in Chinese Universities*,2012,28(4):677-681.

[34] 孙芳.羊草多糖的分析及其对羊草盐碱耐受性的影响[D].长春:东北师范大学,2010:37.

[35] 崔继哲,祖元刚,关晓铎.羊草种群遗传分化的RAPD分析 I:扩增片段频率的变化[J].植物研究,2001,21(2):272-277.

[36] 祝延成.羊草生物生态学[M].长春:吉林出版社,2004.

[37] 崔继哲,祖元刚,聂江城.羊草种群分化的RAPD分析 II. RAPD数据的统计分析[J].生态学报,2002,22(7):982-989.

[38] 刘杰,刘公社,齐冬梅,等.用微卫星序列构建羊草遗传指纹图谱[J].植物学报,2000,42(9):985-987.

[39] 张剑锋.松嫩平原天然羊草种群的分子遗传与表观遗传多态性及其种群遗传结构研究[D].吉林:东北师范大学,2009:57-61.

[40] 胡宝忠,刘娣,胡国富,等.羊草遗传多样性的研究[J].植物生态学报,2001,25(1):83-89.

[41] Millar C I,Libby W J. Strategies for conserving clinal, ecotypic, and disjunct population diversity in widespread species[M]. New York: Oxford University Press,1991:149-170.

[42] 孔祥军,梁正伟,刘森,等.羊草种质资源筛选及RAPD遗传多样性分析[J].生物技术通报,2008(6):110-114.

[43] 解莉楠,聂玉哲,张晓磊,等.盐碱胁迫下羊草消减文库的构建及分析[J].分子植物育种,2007,5(3):371-376.

[44] Chen S Y,Huang X,Yan X Q,et al. Transcriptome analysis in sheepgrass (*Leymus chinensis*): A dominant perennial grass of the Eurasian Steppe[J]. *PLoS One*,2013,8(7):e67974.

[45] Sun Y P,Wang F W,Wang N,et al. Transcriptome exploration in *Leymus chinensis* under saline-alkaline treatment using 454 pyrosequencing[J]. *PLoS One*,2013,8(1):e53632.

[46] Peng X J,Ma X Y,Fan W H,et al. Improved drought and salt tolerance of *Arabidopsis thaliana* by transgenic expression of a novel DREB gene from *Leymus chinensis*[J]. *Plant Cell Rep*,2011,30:1493-1502.

[47] Peng X J,Zhang L X,Zhang L X,et al. The transcriptional factor LcDREB2 cooperates with LcSAMDC2 to contribute to salt tolerance in *Leymus chinensis*[J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*,2013,113:245-256.

The Genetic Diversity and Differentiation of *Leymus chinensis*

LIU Xin,CUI Ji-zhe,ZHANG Jun,WANG Dong-yan,MI Xiao-ju,LU Fang

(College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin, Heilongjiang 150025)

Abstract: *Leymus chinensis* is a kind of excellent herbaceous species, has very important roles on improving ecological environment and maintaining sustainable development of grassland husbandry. However, the diversity of *Leymus chinensis* germplasm resources is facing serious problems owing to environment deteriorated and the shortage of scientific management for *Leymus chinensis* grassland. In this paper, the genetic differentiation of phenotypic and physiologic characteristic and the genetic diversity in molecular level of *Leymus chinensis* were analyzed and evaluated based on the related studies, and the further perspective in this field was discussed. We hope that would be useful for protection of germplasm and breeding new varieties of *Leymus chinensis*.

Keywords: *Leymus chinensis*; genetic diversity; genetic differentiation; germplasm resources