

基于 SCoT 标记的黑稻种质资源遗传多样性分析

刘柯忻¹, 张晓娟¹, 张卫平¹, 李新生¹, 吴升华², 马秀奇¹

(¹陕西理工大学生物科学与工程学院, 汉中 723001; ²汉中市农业技术推广与培训中心, 陕西汉中 723000)

摘要: 黑稻种质资源分布广泛, 遗传背景较为复杂, 揭示黑稻材料的遗传背景、明确材料间的亲缘关系具有重要意义。本研究利用实验室前期筛选的 30 条 SCoT 引物对 90 份水稻材料(包括 21 份黑叶黑稻、24 份紫叶黑稻、30 份绿叶黑稻、15 份白稻)进行遗传多样性分析。结果显示, SCoT 引物共扩增出 194 个条带, 其中多态性条带 165 条, 多态性比例为 85%。等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、Nei's 基因多样性指数(H)以及 Shannon's 信息指数(I)的平均值分别为 1.9216、1.3922、0.2445 和 0.3836。聚类分析结果显示, 在遗传相似系数为 0.73 处, 将 90 份水稻材料分为 4 类。群体结构分析与聚类分析结果一致性较好, 说明 SCoT 标记适用于黑稻遗传背景及亲缘关系的研究。供试水稻种质间的遗传相似系数主要分布在 0.59~0.79 之间, 遗传相似度较高, 分子方差分析显示, 91% 遗传变异来源于群体内, 群体间的遗传变异为 9%, 说明供试水稻材料间遗传差异较小, 应进一步丰富黑稻种质资源遗传多样性。本研究为黑稻杂交育种中的亲本选择提供参考依据, 同时为黑稻品种的遗传改良、新品种培育提供理论依据。

关键词: 黑稻; SCoT 标记; 遗传多样性

Genetic Diversity Analysis of Black Rice Germplasm Resources Based on SCoT Markers

LIU Kexin¹, ZHANG Xiaojuan¹, ZHANG Weiping¹, LI Xincheng¹, WU Shenghua², MA Xiuqi¹

(¹School of Biological Sciences and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001;

²Hanzhong Agricultural Technology Promotion and Training Center, Hanzhong 723000, Shaanxi)

Abstract: Considering the complexity of black rice germplasm resources on distribution and origin, uncovering the genetic diversity of black rice materials and clarify their genetic relationship becomes of significance. This study analyzed the genetic diversity of 90 rice materials (including 21 black leaf black rice, 24 purple leaf black rice, 30 green leaf black rice, and 15 white rice) by using 30 SCoT primers. A total of 194 fragments were detected by SCoT primers, including 165 that showed polymorphic with the ratio of 85%. The average values of allele number (N_a), effective allele number (N_e), Nei's gene diversity index (H) and Shannon's information index (I) were 1.9216, 1.3922, 0.2445 and 0.3836, respectively. The results of cluster analysis showed that at a genetic similarity coefficient of 0.73, these genotypes were clustered into four groups, coincidence with the results of population structure analysis. The genetic similarity coefficient predominantly ranged from 0.59 to 0.79, indicating a relatively high genetic similarity. Analysis of molecular variance (ANOVA) showed that 91% of the genetic variations were within the population, with only 9% being between the populations. These findings indicate that there is limited genetic diversity in the collection, and enriching

收稿日期: 2024-04-12 网络出版日期: 2024-10-12

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240412001>

第一作者研究方向为水稻分子遗传, E-mail: 2253687889@qq.com

通信作者: 张晓娟, 研究方向为水稻分子遗传, E-mail: zxj12162001@163.com

基金项目: 陕西省科技厅项目(2023-YBNY-267); 秦巴生物资源与生态环境省部共建国家重点实验室(培育)“市校共建”科研专项项目(SXC-2303)

Foundation projects: Shaanxi Provincial Department of Science and Technology Project(2023-YBNY-267); The Ministry of Biological Resources and Ecology and Environment of Qinba Jointly Established the State Key Laboratory (Cultivation) of the "City-School Co-construction" Scientific Research Project(SXC-2303)

genetic diversity of black rice germplasm resources required further efforts. This study provides valuable insights for parental selection in black rice hybridization, and offers a theoretical basis for genetic improvement and cultivation of new black rice varieties.

Key words: black rice; SCoT marker; genetic diversity

水稻是全球最重要的粮食作物之一,世界上半数以上的人口以水稻为主食^[1]。我国有色稻种质资源非常丰富,主要包括黑米、红米、紫米、绿米和黄米等^[2]。与白米相比,黑米具有极高的食用和药用价值。黑米含有较高的蛋白质、植物脂肪、维生素、矿物质、膳食纤维等营养物质^[3],同时,还含有丰富的花青苷。黑米花青苷主要组分有矢车菊素-3-O-葡萄糖苷、矢车菊素-3,5-二葡萄糖苷、矢车菊素-3-鼠李糖苷等^[4]。黑米花青苷具有抗氧化、抗肿瘤、抑菌、调节糖类脂类代谢、调节肠道菌群等作用^[5],有益于人体健康。水稻中存在大量的黑叶稻资源,其叶片颜色为黑色、紫色,富含花青苷类物质。黑叶稻“黑冠”是由汉中市农科所吴升华老师培育的黑稻新品种,其叶片自苗期到成熟期均为黑色。本课题组前期研究表明,“黑冠”叶片中花青苷(矢车菊素-3-O-葡萄糖苷)含量比较高,约为0.7%~0.9%,具有重要的开发利用价值。

陕西汉中是我国黑稻原产地之一,黑稻的栽培和研究历史悠久,选育的黑稻品种有“汉中黑糯”“黑丰糯”“黑帅”等,在国内广泛种植^[6]。黑稻杂交育种实践表明,亲本之间适宜的遗传差异,有利于提高杂交水稻的质量和产量。因此,黑稻种质资源的遗传多样性分析及遗传背景研究是黑稻杂交育种的前提和基础,为黑稻品种选育中的杂交亲本选择提供参考依据,也为黑稻种质资源的保护和利用、遗传改良提供了理论基础。

种质资源遗传多样性研究方法主要包括形态学标记、细胞学标记、生理生化标记及分子标记^[7]。相对于其他标记,分子标记技术直接以DNA序列特异性为依据,具有多态性高、稳定性好、可靠性强的特点,能真实准确地反映材料间的遗传差异^[8]。目前,广泛应用的DNA分子标记技术主要有SRAP、SCoT (Start codon targeted polymorphism)、SSR、SNP等。SCoT标记,即目标起始密码子多态性标记,是由Collard等^[9]等开发的一种新型分子标记技术,其原理是基于植物DNA翻译起始密码子ATG侧翼区域的保守性,设计引物对不同样本DNA进行PCR扩增。引物设计时,起始密码子ATG(+1,+2和

+3)、及附近的G(+4)、A(+7)、C(+8)、C(+9)固定不变,其他位置核苷酸序列可自由填充。与RAPD、ISSR分子标记相比,SCoT分子标记作为一种建立在PCR基础上的单引物扩增技术,具有引物设计简单、通用性强、操作便捷及多态性高、重复性好等优点,适合于生物多样性分析、遗传图谱构建及重要性状标记等方面研究^[10]。

目前,SCoT标记技术已应用于花椒(*Zanthoxylum bungeanum* Maxim.)^[11]、猕猴桃(*Actinidia chinensis* Planch.)^[12]、金线莲[*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.]^[13]、黄桃(*Prunus persica* L.)^[14]、甘薯[*Dioscorea esculenta* (Lour.) Burkill]^[15]、朱顶红[*Hippeastrum rutilum* (Ker-Gawl.) Herb.]^[16]等植物的遗传多样性分析,但在水稻中的研究报道较少。Collard等^[9]利用36条SCoT引物对10份白稻进行遗传多样性分析,结果表明,SCoT引物对白稻基因型的聚类与已知的分类和系谱信息一致;Mollier等^[17]利用25条SCoT引物对8份白稻进行遗传多样性分析得出,22条引物表现出多态性,在遗传相似系数0.48处,将8份白稻聚为2类。SCoT标记技术在黑稻中的研究未见报道。本研究以90份水稻材料为研究对象,通过SCoT分子标记开展遗传多样性分析,旨在明确供试水稻材料间的亲缘关系,揭示材料的遗传背景,从而为黑稻遗传育种工作提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

90份水稻材料均由汉中市农科所吴升华老师提供,包括21份黑叶黑稻、24份紫叶黑稻、30份绿叶黑稻、15份白稻,材料基本信息见表1。材料于2023年3月底种植于汉中市农业科学研究所试验田,种植小区长×宽为100 cm×100 cm,每个小区播种1份种质,每个种质播种200粒催芽处理的水稻种子,种植10行,行长100 cm,行距10 cm,株距5 cm。2023年4月20日采集水稻幼嫩叶片,保存于-80℃冰箱备用。

表1 试验材料名称及类型

Table 1 The name and type of the test materials

编号Code	名称Name	类型Type	编号Code	名称Name	类型Type
1	黑冠	黑叶黑稻	46	黑帅ck	绿叶黑稻
2	黑叶稻1	黑叶黑稻	47	78紫香糯737-13	绿叶黑稻
3	紫叶稻1	黑叶黑稻	48	79紫香糯737-3	绿叶黑稻
4	紫糯	黑叶黑稻	49	80(17)隆黑帅-2-2-4	绿叶黑稻
5	海南半紫叶稻	黑叶黑稻	50	88云南S/制西F1	绿叶黑稻
6	25黑叶稻 δ	黑叶黑稻	51	90冠S/451黑BF1	绿叶黑稻
7	28谷A/黑冠F1	紫叶黑稻	52	94云南黑谷-1-1-101	绿叶黑稻
8	29黑冠 δ	黑叶黑稻	53	961316黑S/制西-1	绿叶黑稻
9	30谷A/紫黑F1	紫叶黑稻	54	105黑糯-1-1	绿叶黑稻
10	31紫叶黑变 δ	黑叶黑稻	55	118紫香糯737-9	绿叶黑稻
11	4522-WB1766	黑叶黑稻	56	125云南黑谷-1-1-1	绿叶黑稻
12	4622-WB1767	黑叶黑稻	57	154(17)隆黑帅-2-2-5	绿叶黑稻
13	4722P840	黑叶黑稻	58	157WGRS70黑帅-18-2	绿叶黑稻
14	4822P853	黑叶黑稻	59	162(17)长黑-1-1-2-1	绿叶黑稻
15	5022P867	黑叶黑稻	60	166(13)Y黑矮-1-1	绿叶黑稻
16	56黑寸谷	黑叶黑稻	61	174(13)Y黑矮-3-1-1	绿叶黑稻
17	57紫叶黑变-5-1-1	黑叶黑稻	62	233东北黑米	绿叶黑稻
18	62紫壳黑粳	紫叶黑稻	63	271(13)Y黑-2-5-6S	绿叶黑稻
19	70湛江黑叶稻	黑叶黑稻	64	274(13)Y黑-2-5-9S	绿叶黑稻
20	73培811黑-1-1-1-4	紫叶黑稻	65	278(13)Y黑-7-1-1-1S	绿叶黑稻
21	75WGRS70黑帅-1-10	紫叶黑稻	66	279(13)Y黑-7-1-1-2S	绿叶黑稻
22	81WGRS70黑帅-9-1	紫叶黑稻	67	280(13)Y黑-7-1-1-3S	绿叶黑稻
23	84谷丰A/黑帅F1	紫叶黑稻	68	285(13)Y黑-7-1-1-4S	绿叶黑稻
24	86谷丰A/黑优占F1	紫叶黑稻	69	288(13)Y黑-7-1-1-7S	绿叶黑稻
25	87黑优占 δ	紫叶黑稻	70	291(13)Y黑-7-1-1-11S	绿叶黑稻
26	93(18)106黑香-1-103	紫叶黑稻	71	293(13)Y黑-7-1-1-13S	绿叶黑稻
27	103洋黑3号-1	紫叶黑稻	72	299(13)Y黑-2-3S	绿叶黑稻
28	108泰国黑米-1-1	紫叶黑稻	73	302(13)Y黑-2-7S	绿叶黑稻
29	109黑砉谷	紫叶黑稻	74	303(13)Y黑-7-2-1S	绿叶黑稻
30	110451黑B-1-2	紫叶黑稻	75	707(13)Y黑-2-1-2-1-1-1	绿叶黑稻
31	111培811黑-1-1-2-1	紫叶黑稻	76	黄华占ck	绿叶白稻
32	124矮黑-1-1	紫叶黑稻	77	34冠S/紫叶稻F1	绿叶白稻
33	128培811黑-1-1-1-1	紫叶黑稻	78	36昌A/紫叶稻F1	绿叶白稻
34	147培811黑-1-1-8-1	紫叶黑稻	79	305冠S	绿叶白稻
35	159黑优占ck	紫叶黑稻	80	749韶香100	绿叶白稻
36	182WGRS70黑帅-1-1	紫叶黑稻	81	635重大粒	绿叶白稻
37	192WGRS70黑帅-2-1	紫叶黑稻	82	602	绿叶白稻
38	208WGRS70黑帅-16-1	紫叶黑稻	83	603	绿叶白稻
39	222紫香糯737	紫叶黑稻	84	607	绿叶白稻
40	22422-WB-1770	黑叶黑稻	85	601	绿叶白稻
41	25422P1089	黑叶黑稻	86	605	绿叶白稻
42	296(19)黑帅-2S	紫叶黑稻	87	609	绿叶白稻
43	307黑冠S	黑叶黑稻	88	634黄叶稻	黄叶白稻
44	44早黑冠	黑叶黑稻	89	紫叶稻2	紫叶白稻
45	720早黑一号	黑叶黑稻	90	35紫叶稻 δ	紫叶白稻

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取与检测 采用植物基因组 DNA 提取试剂盒(北京庄盟国际生物基因科技有限公司), 提取水稻基因组 DNA。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 微量分光光度计(赛默飞世尔科技有限公司, 上海)检测 DNA 质量和浓度, 将 DNA 稀释至 100 ng/uL, 保存于 -20 °C 冰箱备用。

1.2.2 PCR 扩增 使用 Primer 3 软件 (<https://primer3.org/>)设计引物, 由奥科鼎盛生物科技有限公司

(北京)合成, 引物序列见表 2。以 90 份水稻材料基因组 DNA 为模板, 利用 30 个 SCoT 引物进行 PCR 扩增。PCR 总反应体系为 10 μ L, 其中 2 \times Taq Master Mix(苏州近岸蛋白质科技股份有限公司) 5 μ L, ddH₂O 3 μ L, 10 μ mol/L SCoT 引物 1 μ L, 100 ng/uL DNA 模板 1 μ L。PCR 扩增程序为 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 1 min, 50 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 10 个循环; 94 °C 变性 30 s, 35 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。

表 2 SCoT 引物序列

Table 2 The sequence of primers

引物编号 Primer code	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	引物编号 Primer code	序列(5'-3') Sequence(5'-3')
SCoT1	CAACA ATGGCT ACCACCA	SCoT20	ACC ATGGCT ACCACCGCG
SCoT2	CAACA ATGGCT ACCACCC	SCoT21	ACGAC ATGGCG ACCACACA
SCoT3	CAACA ATGGCT ACCACCG	SCoT22	AACC ATGGCT ACCACCAC
SCoT4	CAACA ATGGCT ACCACCT	SCoT23	CACC ATGGCT ACCACCAG
SCoT6	CAACA ATGGCT ACCACGC	SCoT25	ACC ATGGCT ACCACCGGG
SCoT9	CAACA ATGGCT ACCAGCA	SCoT26	ACC ATGGCT ACCACCGTC
SCoT11	AAGCA ATGGCT ACCACCA	SCoT27	ACC ATGGCT ACCACCGTG
SCoT12	ACGAC ATGGCG ACCACG	SCoT29	CC ATGGCT ACCACCGCC
SCoT13	ACGAC ATGGCG ACCATCG	SCoT30	CC ATGGCT ACCACCGCG
SCoT14	ACGAC ATGGCG ACCACGC	SCoT31	CC ATGGCT ACCACCGCCT
SCoT15	ACGAC ATGGCG ACC CGA	SCoT32	CC ATGGCT ACCACCGCAC
SCoT16	ACC ATGGCT ACCACCGAC	SCoT33	CC ATGGCT ACCACCGCAG
SCoT17	ACC ATGGCT ACCACCGAG	SCoT34	ACC ATGGCT ACCACCGCA
SCoT18	ACC ATGGCT ACCACCGCC	SCoT35	C ATGGCT ACCACCGCCC
SCoT19	ACC ATGGCT ACCACCGGC	SCoT36	GCAACA ATGGCT ACCACC

使用红色字体标注 SCoT 引物中不变碱基位点

The invariant base sites in the SCoT primers are marked in red

1.2.3 凝胶电泳检测 PCR 产物采用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 电压设置为 150 V, 电泳时间为 2 h。电泳结束后, 将凝胶置于 0.2% AgNO₃ 染色液中摇床染色 5 min, 蒸馏水洗涤 3 次, 每次 30 s, 加入显色液, 摇床显色直至条带清晰, 拍照。

1.2.4 数据统计 统计聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱中的清晰条带, 在相同迁移位置上, 有条带记为“1”, 无条带记为“0”, 用 Excel 构建 0-1 矩阵。利用 Popgene 1.32 软件 (<http://www.ualberta.ca/~7Efyeh/Pop32.exe>) 计算多态性信息含量 (PIC, polymorphism information content)、等位基因数 (N_a , number of alleles)、有效等位基因数 (N_e , number of effective alleles)、Nei's 基因多样性指数 (H , Nei's gene

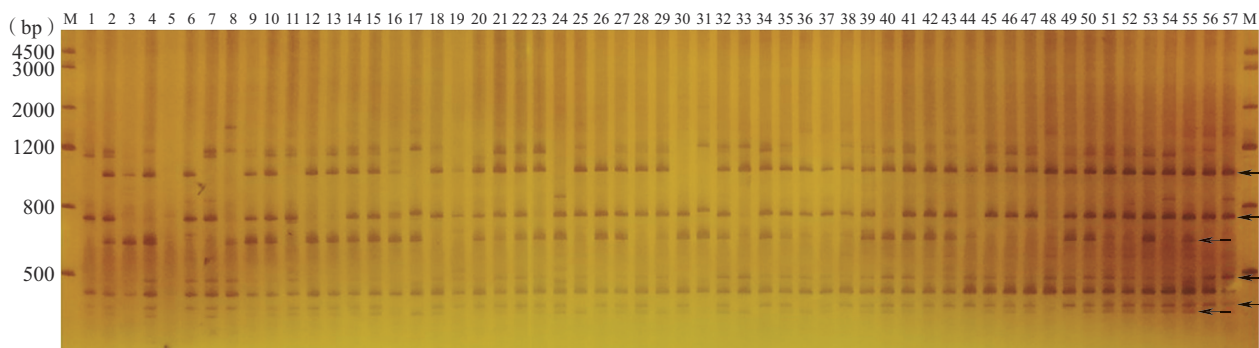
diversity index)、Shannon's 信息指数 (I , Shannon's information index)。利用 NTSYS-pc2.10e 软件 (<https://appliedbiostat.com/ntsyspc/downloads/ntinst21.exe>) 进行聚类分析, 构建聚类分析图。主成分分析使用 NTSYS-pc2.10e 软件 (<https://appliedbiostat.com/ntsyspc/downloads/ntinst21.exe>) 中的 Dcenter 和 Eigen 程序进行。运用 Structure 软件 (https://web.stanford.edu/group/pritchardlab/structure_software/release_versions/v2.3.4/html/structure.html) 进行群体结构分析。运用 Arlequin 3.5.2.2 软件 (<https://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/Arl35Downloads.html>) 进行分子方差分析。

2 结果与分析

2.1 SCoT引物扩增结果

SCoT引物对供试水稻材料扩增的电泳图谱条带清晰,结果稳定(图1)。30个SCoT引物在90份水稻材料中共扩增出194个条带(表3),其中多态性条带165个,多态性比例约为85%,有8个SCoT引物的多态性条带比例达到100%。说明SCoT引物多态性高,适合于水稻遗传背景和亲缘关系的研究,同时也表明水稻材料间存在明显的遗传差异。

30个SCoT引物的扩增条带数在4~11之间,其中扩增条带数最多的是SCoT1;扩增条带数最少的是SCoT19和SCoT35。30个SCoT引物的多态性信息含量在0.60~0.87之间,平均值为0.76;等位基因数在1.6667~2.0000之间,平均值为1.9216;有效等位基因数在1.1214~1.6731之间,平均值为1.3922;Nei's基因多样性指数在0.1004~0.3632之间,平均值为0.2445;Shannon's信息指数在0.1937~0.5396之间,平均值为0.3836。



M: DNA marker III; 1~57: 材料编号同表1, 下同; 黑色箭头表示多态性条带

1-57: The material numbers are the same as those in table 1, the same as below; Black arrows represent polymorphic bands

图1 SCoT17在部分水稻材料中扩增的电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretogram amplified by SCoT17 in partial rice materials

表3 SCoT引物对90份水稻材料的扩增结果

Table 3 The amplified results of 90 rice materials with SCoT primers

引物编号 Primer code	总条带数 Total bands	多态性条带数 Polymorphic bands	多态性比例(%) Polymorphism ratio	多态性信息含量 PIC	等位基因数 <i>Na</i>	有效等位基因数 <i>Ne</i>	Nei's基因多样性指数 <i>H</i>	Shannon's信息指数 <i>I</i>
SCoT1	11	10	90.90	0.87	1.9091	1.3557	0.2266	0.3642
SCoT2	5	4	80.00	0.69	1.8000	1.2474	0.1718	0.2854
SCoT3	7	7	100	0.63	2.0000	1.2809	0.1988	0.3356
SCoT4	5	4	80.00	0.74	1.8000	1.4054	0.2445	0.3721
SCoT6	8	6	75.00	0.78	2.0000	1.4025	0.2470	0.3842
SCoT9	5	4	80.00	0.60	1.8000	1.3609	0.2363	0.3731
SCoT11	5	5	100	0.74	2.0000	1.4257	0.2931	0.4666
SCoT12	6	6	100	0.80	2.0000	1.4524	0.2632	0.4050
SCoT13	6	6	100	0.76	2.0000	1.2409	0.1731	0.3005
SCoT14	6	5	83.33	0.76	2.0000	1.4553	0.2768	0.4303
SCoT15	6	5	83.33	0.77	1.8333	1.1795	0.1168	0.2017
SCoT16	6	4	66.70	0.79	1.6667	1.3858	0.2183	0.3231
SCoT17	7	6	85.71	0.81	2.0000	1.5167	0.3071	0.4679
SCoT18	7	7	100	0.81	2.0000	1.3474	0.2429	0.3999
SCoT19	4	3	75.00	0.70	2.0000	1.1214	0.1004	0.1937
SCoT20	7	5	71.43	0.81	1.7143	1.3717	0.2332	0.3579

表 3 (续)

引物编号 Primer code	总条带数 Total bands	多态性条带数 Polymorphic bands	多态性比例(%) Polymorphism ratio	多态性信息含量 <i>PIC</i>	等位基因数 <i>Na</i>	有效等位基因数 <i>Ne</i>	Nei's 基因多样性指数 <i>H</i>	Shannon's 信息指数 <i>I</i>
SCoT21	9	7	77.78	0.85	1.8889	1.2491	0.1640	0.2703
SCoT22	5	5	100	0.64	2.0000	1.3307	0.2118	0.3497
SCoT23	8	6	75.00	0.83	2.0000	1.4708	0.2890	0.4493
SCoT25	7	6	85.71	0.83	2.0000	1.4415	0.2738	0.4206
SCoT26	8	7	87.50	0.80	1.8750	1.4709	0.2840	0.4329
SCoT27	7	7	100	0.82	2.0000	1.6731	0.3630	0.5297
SCoT29	6	5	83.33	0.72	1.8333	1.3509	0.2354	0.3761
SCoT30	5	4	80.00	0.73	2.0000	1.4524	0.2894	0.4555
SCoT31	6	5	83.33	0.79	2.0000	1.6191	0.3632	0.5396
SCoT32	6	5	83.33	0.76	2.0000	1.4679	0.2840	0.4425
SCoT33	9	7	77.78	0.84	1.7778	1.5108	0.2838	0.4172
SCoT34	8	6	75.00	0.82	1.7500	1.3762	0.2321	0.3592
SCoT35	4	3	75.00	0.64	2.0000	1.2808	0.1872	0.3039
SCoT36	5	5	100	0.69	2.0000	1.5229	0.3255	0.4996
平均 Mean			85.00	0.76	1.9216	1.3922	0.2445	0.3836

PIC: Polymorphism information content; *Na*: Number of alleles; *Ne*: Number of effective alleles; *H*: Nei's gene diversity index; *I*: Shannon's information index

2.2 遗传相似系数分布

SCoT 标记分析得出, 供试 90 份水稻材料间遗传相似系数在 0.37~0.97 之间, 平均值为 0.67。其中, 材料 4(紫糯) 和材料 70 [291(13)Y 黑-7-1-11S] 的遗传相似系数最小; 材料 72(299(13)Y 黑-2-3S) 和材料 73 [302(13)Y 黑-2-7S] 的遗传相似系数最大。

对供试水稻材料间的两两遗传相似系数共计 4005 个数值的次数分布分析(图 2), 发现供试材料遗传相似系数主要分布在 0.59~0.79 之间, 占比 81.97%。遗传相似系数在 0.73 处时, 频次最高。遗传相似系数小于 0.73 的有 2462 个, 占比 61.47%; 遗传相似系数大于等于 0.73 的有 1543 个, 占比 38.53%。

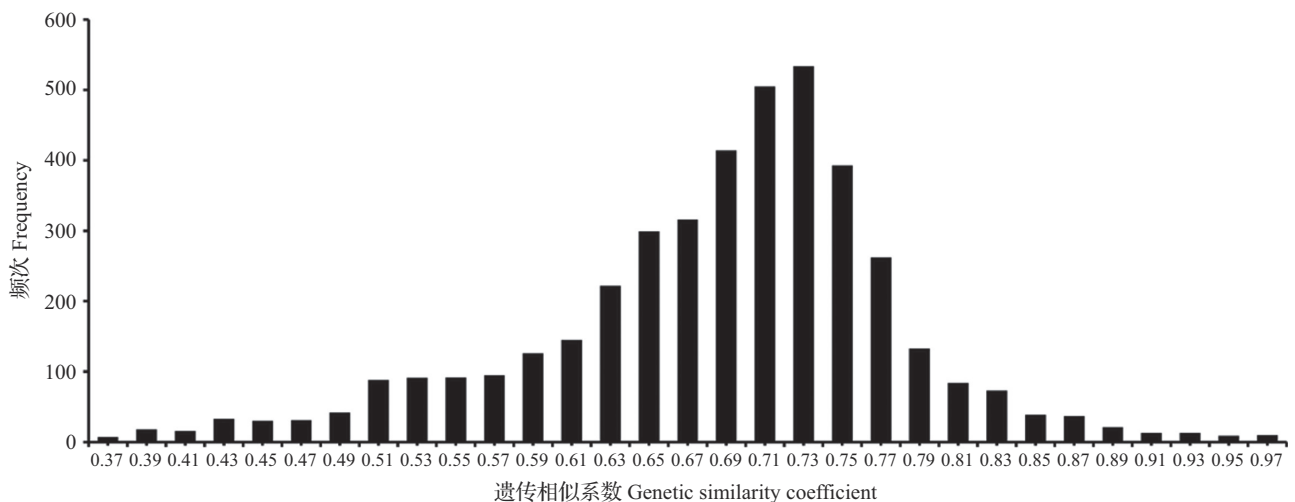


图 2 供试水稻材料间遗传相似系数分布

Fig. 2 Distribution of genetic similarity coefficients among the tested rice materials

2.3 聚类分析

SCoT标记构建的聚类图显示,90份水稻材料的遗传相似系数介于0.50~0.97,均值为0.74。在遗传相似系数为0.73处,将90份水稻材料分为4类(图3)。第I类包括材料1(黑冠)、材料16(56黑寸

谷)、材料19(70湛江黑叶稻)等5份黑叶黑稻材料。第II类包括25份材料,其中有21份黑叶、紫叶黑稻材料、2份绿叶黑稻材料及2份白稻材料。第III类包括37份材料,其中有25份绿叶黑稻材料、7份紫叶黑稻材料及5份白稻材料。其余23份材料较为

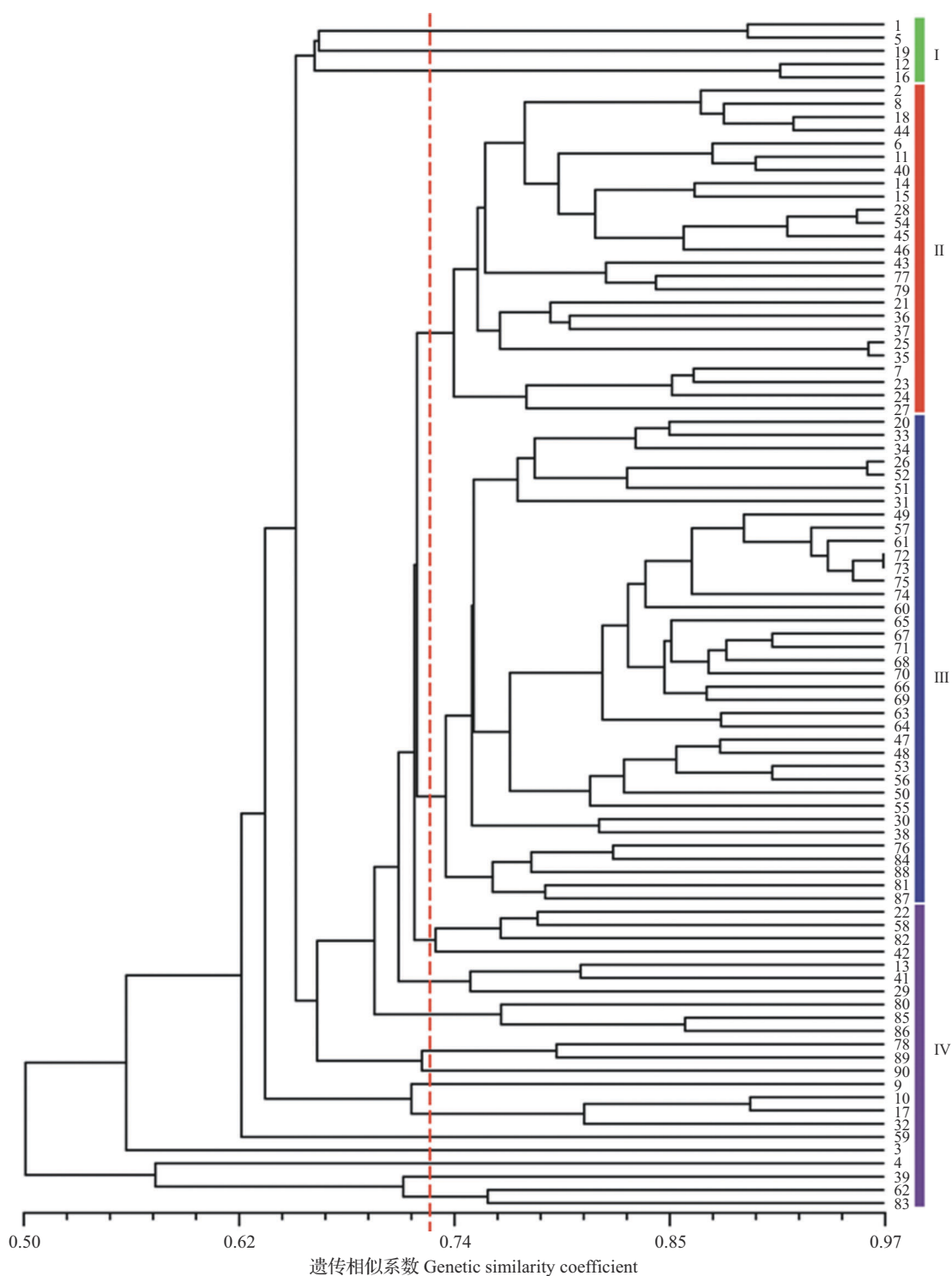


图3 SCoT标记构建的90份水稻材料的聚类图

Fig. 3 Cluster dendrogram of 90 rice materials constructed by SCoT markers

分散,没有明显的特征聚为第IV类,其中有6份黑叶黑稻材料、6份紫叶黑稻材料、3份绿叶黑稻材料及8份白稻材料。聚类图中除第IV类外,第I、II、III类能较好地地区分绿叶黑稻和黑叶黑稻,同时,绿叶黑稻和黑叶、紫叶稻也能区分开。在聚类图中,亲缘关系较近的材料如材料10(31紫叶黑变 δ)与材料17(57紫叶黑变-5-1-1),材料72[299(13)Y黑-2-3S]、材料73[302(13)Y黑-2-7S]与材料75[707(13)Y黑-2-1-2-1-1-1],材料85(601)与材料86(605)聚在一起。说明 SCoT 标记能准确反映水稻材料的亲缘关系及类型。

2.4 主成分分析

主成分分析结果显示,第1主成分和第2主成分分别占总变异的11.98%和7.96%(图4)。90份水稻材料分为3种类型,其中,除材料46(黑帅ck)、材料54(105黑糯-1-1)和材料62(233东北黑米)外,其他绿叶黑稻材料及多数白稻材料聚为一类(PI)。大多数紫叶黑稻材料及少数的黑叶黑稻材料聚为一类(PII),其余黑叶黑稻材料聚为一类(PIII)。主成分分析将绿叶黑稻与黑叶黑稻区分开,与按叶色表型进行分类相符,从分子水平揭示了绿叶黑稻与黑叶黑稻之间的遗传差异,表明 SCoT 标记适合于黑稻种质资源遗传多样性分析。

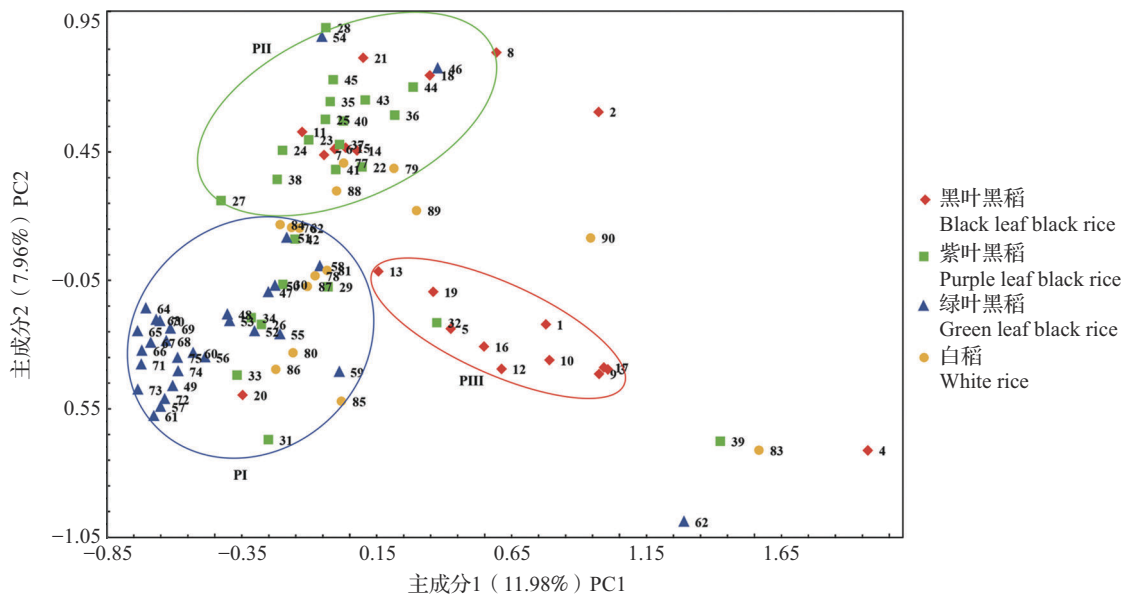


图4 90份水稻材料的主成分分析

Fig. 4 Principal component analysis of 90 rice materials

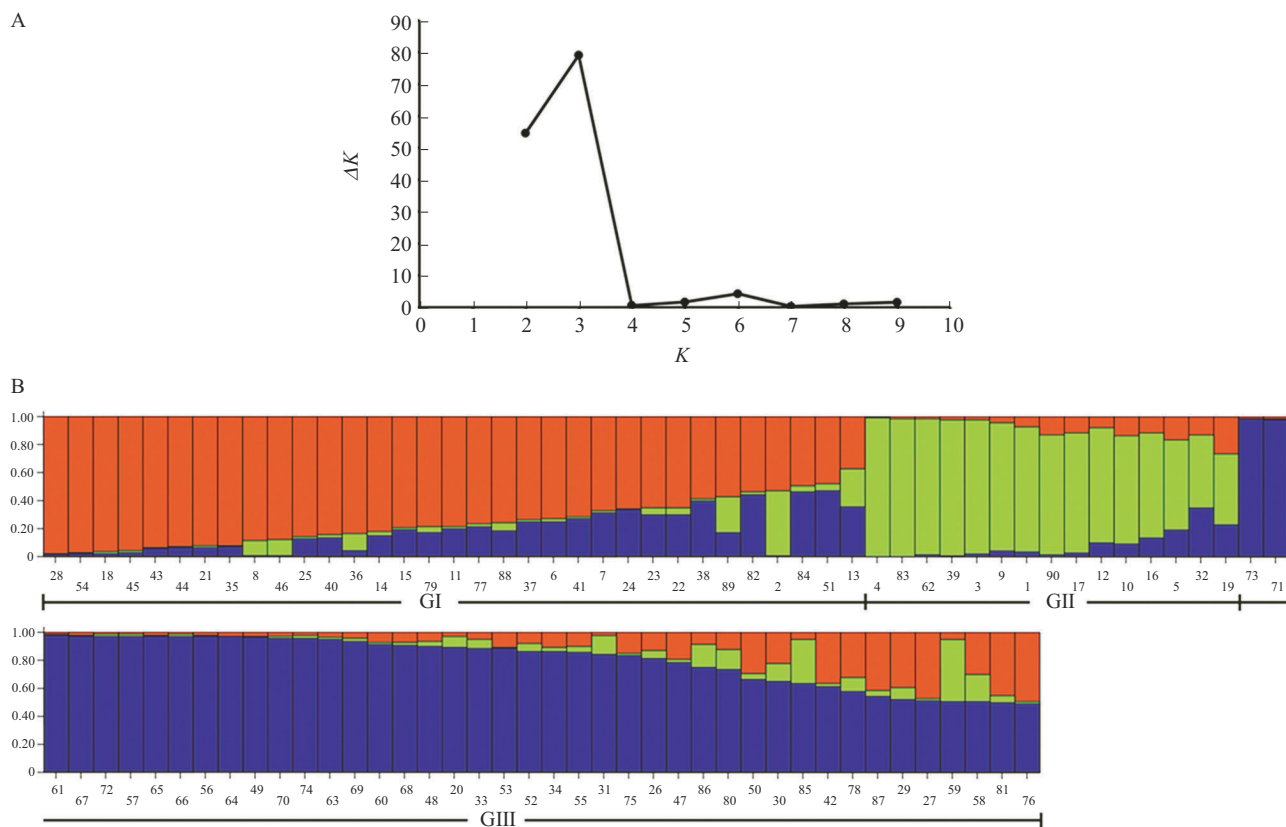
2.5 群体结构分析

Structure分析显示,当 $K=3$ 时, ΔK 值最大,表明90份水稻材料聚为3类较为合适(图5)。第I类(GI)包括33份材料,第II类(GII)包括15份材料,在45份黑叶、紫叶黑稻材料中,有36份黑叶、紫叶黑稻材料划分在第I类和第II类。第III类(GIII)包括42份材料,在30份绿叶黑稻材料中,有26份绿叶黑稻材料划分在第III类。群体结构分析能较好地分辨绿叶黑稻与黑叶黑稻、紫叶黑稻。说明 SCoT 分子标记技术作为新型分子标记技术用于水

稻种质资源遗传多样性分析及种质鉴定准确、可靠。综上所述,群体结构分析结果与聚类分析结果具有较高一致性。

2.6 分子方差分析

将90份水稻材料分为3个群体,即黑叶黑稻和紫叶黑稻(45份)、绿叶黑稻(30份)、白稻(15份)进行分子方差分析。结果表明(表4),3个水稻群体的遗传变异主要存在于群体内部,群体内变异占总变异的91%,群体间的遗传变异仅占总变异的9%。



A: 利用 $\ln P(D)$ 得到的 ΔK 变化曲线; B: 90 份水稻材料的群体结构分析; 红色: GI 类; 绿色: GII 类; 蓝色: GIII 类; X 轴上的竖栏代表样本; 不同颜色的比例代表基因型属于对应类型的概率

A: ΔK curve obtained by $\ln P(D)$; B: Population structure analysis of 90 rice materials; Red: Class GI; Green: Class GII; Blue: Class GIII; Vertical columns on the X-axis represent each sample; The proportion of each color represents the probability that the genotype belongs to each class

图5 SCoT 标记构建的 90 份水稻材料的群体结构分析

Fig. 5 Population structure analysis of 90 rice materials constructed by SCoT markers

表 4 分子方差分析

Table 4 Analysis of molecular variance

变异来源 Source of variation	自由度 <i>df</i>	总方差 Sum of squares	方差分量 Variance components	方差分量比例(%) Percentage of variation
群体间 Among populations	2	166.84	2.2	9
群体内 Within populations	87	1987.24	22.84	91
总计 Total	89	2154.09	25.04	100

固定指数 F_{st} : 0.09

Fixation index F_{st} : 0.09

3 讨论

水稻种质资源的遗传背景及亲缘关系分析是水稻遗传育种的首要任务,可为杂交育种中合理选择亲本、培育优质水稻提供理论依据。目前,在水稻遗传多样性研究上主要使用的分子标记技术为 SSR 标记。Deepika 等^[18]利用 25 对 SSR 引物对 31 份水稻地方品种进行遗传多样性分析,均表现出多态性,多态性信息含量在 0.12~0.66 之间,在遗传相

似系数 0.68 处,将 31 份水稻地方品种聚为 10 类; Kalita 等^[19]利用 28 对 SSR 引物对 27 份地方水稻种质进行遗传多样性分析,有 17 个表现出多态性,多态性信息含量在 0.076~0.499 之间,系统发育树将 27 个基因型分为 3 个类群。

SCoT 分子标记为单引物标记,具有通用性好、操作方便、多态性高及重复性好等特点^[20]。与 SSR 标记技术相比,SCoT 标记技术在多态性条带数、多态性比例、标记指数等方面更具优势^[21]。本研究利

用 30 条 SCoT 引物对黑稻材料进行遗传多样性分析, SCoT 引物的多态性比例为 85%, 多态性信息含量为均值 0.76, 高于 SSR 标记, 说明 SCoT 引物多态性丰富, 适合进行黑稻遗传多样性分析。

聚类分析结果显示, 在遗传相似系数 0.73 处, 将 90 份水稻材料分为 4 类。大部分黑叶、紫叶黑稻材料划分在第 I、II 类, 大部分绿叶黑稻材料及少量白稻材料划分在第 III 类。结果表明, 黑叶、紫叶黑稻材料能够与白稻材料较好地地区分开, 符合传统的系谱分类; 绿叶黑稻与黑叶、紫叶黑稻之间的亲缘关系较远。根据本研究的聚类结果, 在水稻杂交育种实践中, 亲本应尽可能选择亲缘关系较远、遗传差异大的材料, 如选择黑叶黑稻中的材料 4(紫糯)和绿叶黑稻中的材料 70[291(13)Y 黑-7-1-1-11S]、紫叶黑稻中的材料 39(222 紫香糯 737)和绿叶黑稻中的材料 56(125 云南黑谷-1-1-1)进行杂交。避免选择亲缘关系近也就是遗传相似系数较大的材料。

此外, 选择不同类型的水稻材料进行杂交, 有利于丰富黑稻种质资源的遗传多样性。例如, 选择黑叶稻(叶片颜色为黑色的水稻)和黑米稻(米粒颜色为黑色的水稻)杂交有利于丰富黑米稻或黑叶稻的遗传基础, 为选育黑叶杂交稻或黑米杂交稻提供遗传差异较大的杂交稻亲本, 有利于培育出多种类型的黑米稻和黑叶稻新品种。现有的黑叶黑稻和绿叶黑稻的资源数量及类型有限, 不利于培育高产抗病的黑米杂交稻和黑叶杂交稻, 因此, 可选择遗传资源十分丰富的白米水稻与黑米、黑叶稻品种杂交以培育出与现有黑稻或黑叶稻遗传差异显著的杂交黑稻恢复系、优良的新型种质资源及新品种。此外, 还可开展黑叶稻和黑米稻籼与粳的亚种间杂交以丰富黑米稻或黑叶稻的遗传基础。分子方差分析结果显示, 总遗传变异的 91% 来自群体内, 9% 来自于群体间, 表明供试水稻材料的遗传变异主要来自群体内, 群体间的遗传变异较小, 但也说明群体间即黑叶黑稻和紫叶黑稻、绿叶黑稻、白稻之间存在一定的遗传变异。因此, 在未来的育种中, 可通过水稻不同群体之间的杂交实现群体间的基因交流, 从而对黑稻的杂交育种发挥积极的作用。

参考文献

- [1] 武文豪, 何冲冲, 王传波, 杨小川, 方中明. 特种稻黑米和红米研究进展. 植物遗传资源学报, 2024, 25(7): 1046-1055
Wu W H, He C C, Wang C B, Yang X C, Fang Z M. Research progress on black and red rice of special varieties. Journal of Plant Genetic Resources, 2024, 25(7): 1046-1055
- [2] 全东兴, 韩龙植, 南钟浩, 元东林. 特种稻种质资源研究进展与展望. 植物遗传资源学报, 2004, 5(3): 227-232
Quan D X, Han L Z, Nan Z H, Yuan D L. Progress and prospect of germplasm research for special rice. Journal of Plant Genetic Resources, 2004, 5(3): 227-232
- [3] 薛庆锋, 徐九文. 黑米的营养保健价值及应用发展探讨. 特种经济动植物, 2020, 23(8): 31-33
Xue Q F, Xu J W. Discussion on the nutritional and health value of black rice and its application development. Special Economic Animal and Plant, 2020, 23(8): 31-33
- [4] 王艳龙, 陈进, 韩豪, 李新生, 黄重, 张选明, 沙志鸿. 黑米花青苷药理学作用研究进展. 大麦与谷类科学, 2016, 33(3): 5-8
Wang Y L, Chen J, Han H, Li X S, Huang C, Zhang X M, Sha Z H. Research progress on pharmacological effects of black rice anthocyanins. Barley and Cereal Sciences, 2016, 33(3): 5-8
- [5] 李煦, 白雪晴, 刘长霞, 刘博静, 范小振. 天然花青素的抗氧化机制及功能活性研究进展. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(20): 8163-8171
Li X, Bai X Q, Liu C X, Liu B J, Fan X Z. Research progress on antioxidant mechanism and functional activity of natural anthocyanin. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(20): 8163-8171
- [6] 王胜宝, 冯志峰, 李新生, 张志健, 周宝龙, 周凯. 陕西汉中特种稻产业发展现状及前景. 新疆农业科学, 2010, 47(S2): 147-150
Wang S B, Feng Z F, Li X S, Zhang Z J, Zhou B L, Zhou K. Current situation and prospects of special rice industry in hanzhong, Shaanxi. Xinjiang Agricultural Sciences, 2010, 47(S2): 147-150
- [7] 田慧, 陈宏夏, 黄勇, 封毅, 曾昭清, 梁雪, 叶盛连, 潘小姣. 青钱柳种质资源 SCoT 分子标记遗传多样性分析. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(7): 2732-2739
Tian H, Chen H X, Huang Y, Feng Y, Zeng Z Q, Liang X, Ye S L, Pan X J. Genetic diversity of germplasm resource SCoT of *Cyclocarya paliurus* (batal.) Iljinsh by molecular markers. World Science and Technology-Modernization of Traditional Chinese Medicine, 2022, 24(7): 2732-2739
- [8] 陈熙, 张羽, 李佼, 席彦军, 张颜青. SCoT 标记分析陕西茶树资源的遗传多样性. 茶叶科学, 2016, 36(2): 131-138
Chen X, Zhang Y, Li J, Xi Y J, Zhang Y Q. Genetic diversity analysis of tea germplasm in Shaanxi province based on SCoT marker. Journal of Tea Science, 2016, 36(2): 131-138
- [9] Collard Y C B, Mackill J D. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: A simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. Plant Molecular Biology Reporter, 2009, 27(1): 86-93
- [10] 熊发前, 唐荣华, 陈忠良, 潘玲华, 庄伟建. 目标起始密码子多态性(SCoT): 一种基于翻译起始位点的目的基因标记新技术. 分子植物育种, 2009, 7(3): 635-638
Xiong F Q, Tang R H, Chen Z L, Pan L H, Zhuang W J.

- SCoT: A novel gene targeted marker technique based on the translation start codon. *Molecular Plant Breeding*, 2009, 7(3): 635-638
- [11] 孔丽娟. 基于SCoT标记对花椒种质资源的分析与鉴定. 杨凌: 西北农林科技大学, 2022
Kong L J. Analysis and identification of Chinese prickly ash germplasm resources based on SCoT markers. Yangling: Northwest A & F University, 2022
- [12] 王悦星, 周婉莹, 张文慧, 吴婉婉, 张晓娟, 于月华. 利用SCoT分子标记分析85个猕猴桃品种(系)及野生近缘种的遗传结构. *果树学报*, 2021, 38(7): 1044-1054
Wang Y X, Zhou W Y, Zhang W H, Wu W W, Zhang X J, Yu Y H. Genetic structure analysis of 85 kiwifruit varieties (lines) and wild relatives by SCoT molecular markers. *Journal of Fruit Science*, 2021, 38(7): 1044-1054
- [13] 顾浩栋, 吴梅, 孔向军, 王忠华. 基于SCoT标记的金线莲遗传多样性分析. *分子植物育种*, 2023, 21(9): 2980-2990
Gu H D, Wu M, Kong X J, Wang Z H. Genetic diversity analysis of *Anoectochilus roxburghii* based on SCoT markers. *Molecular Plant Breeding*, 2023, 21(9): 2980-2990
- [14] 李淼, 董晓民, 高晓兰, 李贵祥, 刘伟, 张安宁. 基于SCoT分子标记的19份黄桃种质遗传多样性分析. *果树学报*, 2021, 38(5): 664-671
Li M, Dong X M, Gao X L, Li G X, Liu W, Zhang A N. Genetic relationship analysis of 19 accessions of yellow peach germplasms based on SCoT markers. *Journal of Fruit Science*, 2021, 38(5): 664-671
- [15] 冯俊彦, 康乐, 郎涛, 张聪, 李明, 赵珊, 蒲志刚. 基于SCoT分子标记的甘薯及其野生种遗传多样性分析. *华北农学报*, 2021, 36(1): 18-26
Feng J Y, Kang L, Lang T, Zhang C, Li M, Zhao S, Pu Z G. Genetic diversity analysis of sweet potato and its wild species using SCoT molecular markers. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2021, 36(1): 18-26
- [16] 王黎, 徐郝, 俞云栋, 张海珍, 高燕会, 沈笑, 金晨莺, 陈伏敏. 基于SCoT标记的朱顶红品种遗传多样性分析. *浙江农林大学学报*, 2020, 37(5): 930-938
Wang L, Xu H, Yu Y D, Zhang H Z, Gao Y H, Shen X, Jin C Y, Chen Y M. Genetic diversity analysis of *Hippeastrum rutilum* cultivars based on SCoT markers. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2020, 37(5): 930-938
- [17] Mollier M, Roychowdhury R, Tzudir L, Sharma R, Barua U, Rahman N, Pal S, Gogoi B, Kalita P, Jain D, Das R. Evaluation of morpho-physiological and yield-associated traits of rice (*Oryza sativa* L.) landraces combined with marker-assisted selection under high-temperature stress and elevated atmospheric CO₂ levels. *Plants*, 2023, 12(20): 3655
- [18] Deepika C, Devaraju J P, Patted S V, Niranjan K, Kumar M D H. Molecular characterization of land races of rice by using SSR markers (*Oryza sativa* L.). *International Journal of Environment and Climate Change*, 2022, 12(11): 3201-3210
- [19] Kalita M, Saharia D D, Thakur K, Sonowal S, Goswami K R, Sarma K M, Baruah A. Study of genetic diversity and drought-tolerance characteristics of few rice varieties using morphological and molecular markers. *International Journal of Plant Soil Science*, 2024, 36(1): 38-53
- [20] 卢家仕, 李先民, 黄展文, 余海娟, 李春牛, 苏群, 卜朝阳. 基于SCoT分子标记的金花茶组植物种质资源遗传多样性分析. *中草药*, 2021, 52(20): 6357-6364
Lu J S, Li X M, Huang Z W, Yu H J, Li C N, Su Q, Bu Z Y. Genetic diversity analysis of *Camellia* sect. *chrysantha* Chang germplasm resources based on SCoT molecular markers. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2021, 52(20): 6357-6364
- [21] Zhang Y, Zhang X J, Chen X, Sun W, Li J. Genetic diversity and structure of tea plant in Qinba area in China by three types of molecular markers. *Hereditas*, 2018, 155(3): 22