

微卫星分子标记在野生大豆遗传多样性研究中的应用

董思言, 孙 备, 李建东, 王国娇, 曹 赫, 徐 亮

(沈阳农业大学农学院生态学系, 辽宁沈阳 110161)

摘 要:微卫星分子标记即 SSR 标记, 因为具有共显性, 重复性高, 高度丰富的多态性等优点, 十分有利于遗传多样性分析。本综述主要从微卫星序列的基本特征、原理等方面阐述了微卫星分子标记, 对在野生大豆遗传多样性研究中的应用进行了系统论述, 为微卫星分子标记在野生大豆遗传多样性研究体系的建立提供理论依据。

关键词:野生大豆; 微卫星序列; 分子标记; 遗传多样性

Application of Microsatellite Molecular Marker in the Genetic Diversity of *Glycine soja*

DONG Si-yan, SUN Bei, LI Jian-dong, WANG Guo-jiao, CAO He, and XU Liang

(Department of Ecology Agronomy College of Shenyang Agricultural University, Shenyang 11016, Liaoning, China)

Abstract: Microsatellite molecular marker which is called SSR marker is available to be used in the analysis of genetic diversity for its advantage of co-dominance, good repetition and high polymorphism. This paper expounded the characteristics and principles of SSR marker and discussed its application in genetic diversity of *Glycine soja*, which will supply the related theoretic basis for the system of the research about genetic diversity of *Glycine soja*.

Key words: *Glycine soja*; Microsatellite; Molecular marker; Genetic diversity

野生大豆 (*G. soja* Sieb. & Zucc.) 属于大豆属 (*Glycine* L.)、*Soja* 亚属, 和栽培大豆 (*G. max* (L.) Merr.) 都是一年生的。野生大豆主要分布在我国, 除新疆、青海和海南外, 其余省市均有分布 (庄炳昌, 1999)。野生大豆 (*G. soja*) 是唯一能和栽培大豆杂交且杂种可育的野生种, 对其遗传多样性研究, 有助于野生大豆遗传资源深入而有效的评价。充分利用野生大豆遗传资源中的优良性状, 保护其遗传多样性, 不断开发可供利用的基因资源, 对保护和开发大豆种质、改良品质具有重要意义。

利用 DNA 技术检测遗传多样性是近十年发展起来的新手段, 对基因组分析包括 DNA 的编码区和非编码区, 保守区和高变区, 以及核内 DNA 和细胞器 DNA, 克服了等位酶遗传标记数量有限的不足, 也避免了形态学上根据表型性状来判断基因型时出现的许多问题。而微卫星分子标记因其具有共显性, 重复性高, 高度丰富的多态性等优点, 成为构建遗传连锁图谱, 研究群体遗传学, 保护生物学, 评估遗传多样性等方面的理想工具。本文主要对微卫星

分子标记在野生大豆遗传多样性研究中的应用进行了系统论述。

1 微卫星序列的基本特征

微卫星序列 (microsatellite, MS) 即简单重复序列 (Simple Sequence Repeat, SSR), 又称短串联重复 (short tandem repeats, STR) 是一类由几个 (多为 1 ~ 6 个) 碱基组成的基序 (motif) 串联重复而成的 DNA 一段序列, 其长度一般较短, 在 100bp 以内, 现已证明存在于绝大多数真核生物基因组中 (王彪和邱丽娟, 2002; 李汝玉, 1999)。微卫星的突变率很高, 从而产生了很多等位基因, 导致了微卫星的高度多态性。微卫星的突变率在不同物种、在同一物种的不同位点和同一位点的不同等位基因间存在很大差异 (周延清, 2005)。

微卫星分子标记又称 SSR 标记, 是针对微卫星序列的特点, 用人工合成的寡核苷酸作为探针, 探测高变异位点。不同遗传材料重复次数的可变性, 导致了 SSR 长度的高度变异性, 这正是 SSR 标记产生

收稿日期 (Received): 2007-12-10; 接受日期 (Accepted): 2007-12-21

作者简介: 董思言 (1982 -), 男, 在读硕士, 从事野生大豆遗传多样性研究。

通讯作者 (Corresponding author): 李建东, 教授。

的基础。现多用微卫星两侧保守序列作为引物,根据微卫星两端序列设计一对特异引物,进行 PCR 扩增技术将其间的核心微卫星 DNA 扩增出来,经琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳,就可以找到其长度多态性,即 SSR 标记(Weber and May,1989)。

多数微卫星序列无功能作用,增加或减少几个重复序列的频率高,因而在品种间具广泛位点变异,SSR 分子标记比 RFLP 及 RAPD 分子标记多态性高。基于以上特征,SSR 已成为在大豆上应用最广、最为重要的分子标记,而利用系谱分析、地理来源及有限的表型鉴定数据,往往难以将数以万计的大豆品种资源区别开来(王彪和邱丽娟,2002)。目前设计出来的大豆基因组 SSR 引物超过 900 种,而且数目还在增加,产品有专门公司出售,使用简便,结果稳定、准确。

2 运用微卫星进行遗传多样性分析的原理和方法

运用微卫星进行遗传多样性分析中,用微卫星 DNA 两端的保守序列做 PCR,并使用凝胶电泳分离产生含有微卫星 DNA 片段的方法最为普遍。微卫星标记的关键是通过微卫星序列设计引物。微卫星序列的获得通常有 2 种途径:一是从基因组文库中获得含有微卫星的阳性克隆;一是通过检索 Genbank(美国基因、蛋白数据库)、EMBL(欧洲分子生物学实验室数据库)和 DDBJ(日本国家遗传研究所基因数据库)等 DNA 序列数据库,从互联网上获得含有微卫星的序列。前者获得微卫星 DNA 标记需要建立、筛选基因组文库和克隆测序等一系列实验,消耗大,工作量也大(Bell et al.,1994)而通过后者可以直接快速地获得微卫星标记。随着基因组计划的全面展开,新的序列大量地进入数据库,用此方法将能较容易的获得更多标记,将可能成为获取微卫星 DNA 标记的一个主要途径(熊立仲等,1998)。虽然开始筛选重复序列和设计引物过程较慢,但只要引物确定,使用便极为简单,结果极为稳定。另外,由于微卫星的侧翼序列在基因组中是单拷贝使得某一微卫星可特异定位于染色体的某一部分,且具有一定的通用性,这就可使用相关物种的微卫星引物进行扩增(张玉梅等,2006)。

微卫星检测过程是以前侧翼序列为引物进行 PCR 扩增,既可以用一对引物扩增,也可应用多重 PCR。另外,采用多次点样法可以提高微卫星标记

量化分析的效率。由于微卫星序列短,产物分离既可在测序 PAGE 胶也可在非变性 PAGE 胶上进行电泳。产物检测可采用同位素标记放射自显影技术,硝酸银染色分析以及荧光标记自动化检测。根据分离片段的大小决定基因型并分析等位基因在所研究群体中的频率及各位点的杂合度。根据等位基因频率采用分析软件包(NTSYSpc、GENEIN POPULATIONS 等)计算遗传距离,进行聚类分析。在遗传多样性研究中常用的指标有相似指数、基因型多样性指数、多态信息量(PIC 值)、居群间的分化系数等。

3 微卫星分子标记在遗传多样性上的应用

一个居群(或物种)遗传多样性越高或遗传变异越丰富,对环境变化的适应能力就越强,越容易扩展其分布范围和开拓新环境(Huenneke,1991)。遗传多样性的保护实质上就是在基因和基因组水平上的保护。另外,对物种保护方针和措施的制定,如采样策略、迁地或原位保护的选择等,都依赖对物种遗传多样性的认识(Schall et al.,1991;陈灵芝,1999)。

微卫星技术具有多态性高、鉴别能力强、重复性好和带型清晰等特点,十分有利于遗传多样性分析,已被用于多种植物的遗传多样性研究。例如:玉米、大豆、水稻、小麦等。一系列的研究结果表明,微卫星等位基因数目与重复单位数目有明显的正相关,它能更加有效地揭示遗传多样性,而且特别适用于其它类型标记所揭示变异水平低的物种。Powell 等(1999)指出微卫星比其他分子标记如 RAPD 和 RFLP 等更能揭示遗传多样性。Colson 等(1999),Parker 等(1998)通过分析表明,微卫星比当前所有的分子标记都能够带来更多的信息。贾继增(1996)也认为 SSR 标记比较适合于遗传多样性的分析。并且用微卫星分子标记技术对大豆进行品种间聚类分析,与运用其他分子标记方法如 RAPD、RFLP 取得的结果吻合很好(徐莉和赵桂仿,2002;吴俊江,2005)。微卫星在种群杂合度上具有更加精确和高效性估测,可以采用微卫星标记来鉴别不同种群尤其是亲缘关系较近种群间的遗传距离,绘制系统发育树,进行种质资源的评估和鉴定(胡则辉和周志刚,2006)。

4 微卫星分子标记在野生大豆遗传多样性上的应用

对野生大豆微卫星分析研究,始于对栽培大豆的研究,在野生大豆中开展这一技术应用较晚。微卫星标记已经广泛地应用于大豆遗传图谱构建、遗传多样性研究、遗传系谱与进化关系、QTL 分析、品种鉴定、分子标记辅助育种等(宋启建,1999)。微卫星序列均匀、随机、广泛地分布于野生大豆基因组。采用快捷、准确、可靠的 SSR 标记方法对野生大豆进行遗传多样性分析,可了解野生大豆的遗传结构、生活背景,分析其进化的历史和潜力,以及探讨野生大豆濒危的原因和现状,提出合理的保护措施。

4.1 微卫星分子标记在野生大豆遗传多样性和遗传结构研究上的应用

刘峰等(2000)应用 SSR 分析大豆种质多样性和遗传变异性,用 5 对引物对 15 份材料进行扩增,共获得 21 个等位变异,每个 SSR 位点的等位基因数目为 3~6 个,基因多样性范围在 0.439~0.668 之间。周晓馥等(2002)利用 RAPD 和 SSR 标记技术对 N25°野生大豆种群 16 个样本进行分析,发现种群内存在大量的遗传变异,平均遗传距离为 0.2209,杂合度为 0.6961,种群内多态性不丰富,符合自交群体的特点。Kuroda 等(2006)利用 20 个微卫星引物,对 77 个日本野生大豆居群中 616 株进行了分析,发现日本野生大豆已经受到栽培大豆基因渗入的影响。赵丽梅等(2005)用 20 对 SSR 引物扩增 299 份材料,共扩增出 549 条带,平均每对引物扩增 27.5 条带,核心资源相对于原始资源在这 20 对 SSR 引物所代表的等位基因中丢失 93 个,平均每对引物丢失 4.7 条带。

海林等(2002)利用 12 对 SSR 引物对 10 个省的 67 份半野生大豆种质进行了遗传多样性的检测分析,12 个位点共检测到 184 个等位基因变异,等位基因范围为 12~31 个,平均每个位点等位基因数目为 15.41 个。供试材料种质之间的遗传相似系数达 0.882,略高于庄炳昌(2000)得到的结果;没有观察到遗传多样性地理间的分布规律,认为利用 SSR 标记在半野生大豆群体中所揭示的遗传多样性和生态地理没有显著的相关性。如果采用更多引物进行试验,使微卫星标记尽量覆盖整个基因组,这样的结果将会更加真实可靠并且具有说服力。李向华等

(2003)利用 60 对 SSR 引物,以 65 份东北地区新收集野生大豆资源以及与其来源相同的已经编目保存的资源为材料进行遗传多样性分析,共检测到 570 个等位变异,平均每个位点有 9.5 个等位变异,新收集材料在 22 个位点的遗传多样性指数都高于以前收集的资源,有 62 个等位变异是新收集材料所特有。微卫星标记在野生大豆基因组分布数量多、多态性丰富、日趋成熟的检测技术以及较为完善的统计分析方法,使其成为野生大豆资源遗传多样性研究的理想分子标记。

4.2 微卫星分子标记在野生大豆与栽培大豆遗传多样性比较分析的应用

有许多人将野生大豆与栽培大豆用 SSR 方法分析,结果都得出野生大豆遗传多样性和分化程度都较高的结论。如 Maughan 等(1995)利用 SSR 分析 94 份野生大豆和栽培大豆,在 5 个 SSR 位点检测出了 74 个等位变异,等位变异范围 5~21 个,平均每个位点为 15.8 个,多态信息量范围为 0.55~0.81,野生大豆和栽培大豆多态信息量分别为 0.55、0.87。Rongwen 等(1995)在 96 份野生大豆和栽培大豆种质中,共得到 11~26 个等位变异,多态信息量范围为 0.71~0.95,平均为 0.87,栽培大豆多态信息量范围 0.52~0.88,平均为 0.74。吴晓雷等(2001)用 SSR 标记分析了大豆属 11 个种的 37 个材料的遗传多样性和遗传关系,不同位点在种间的等位基因数为 6~29,平均每个位点 15.9 个等位基因,Soja 亚属的等位基因数是 Glycine 亚属的 71.5%。

赵洪锟等(2001)采用 12 对 SSR 引物对我国不同纬度的野生大豆和栽培大豆各 22 份进行了多样性分析,野生大豆和栽培大豆的平均遗传距离分别为 0.176 和 0.150,表明野生大豆的多态性比栽培大豆较为丰富;在遗传距离 0.130 处,野生大豆和栽培大豆被明显分为二类,与以往大豆属 Soja 亚属的形态学分类结果相一致。许占友等(1999)从中国大豆品种资源中选择农艺性状差异显著的 90 份材料,用一份野生大豆品种作对照,用 12 对 SSR 引物对其分析,平均每个引物可扩增出 6 个等位位点,认为 SSR 标记无论在多态信息含量、多态性水平及评价效率方面都较高。

也有人对野生大豆的叶绿体微卫星遗传多样性进行了研究。微卫星位点存在于植物中的核 DNA、叶绿体 DNA 和线粒体 DNA 中,相对核基因组来说,

叶绿体基因组比较保守,突变少,且一旦发生突变,就可能保留下来。Powell 等(1996)已经将 cpSSR 用于大豆叶绿体基因组遗传多样性研究。Xu 等(2002)利用 6 个 cpSSR 引物对 326 份野生大豆和栽培大豆进行分析,观测到 23 个等位变异,野生大豆和栽培大豆的基因多样性指数分别为 0.964 和 0.421,发现野生大豆遗传多样性高于栽培大豆。此试验将为进一步研究叶绿体微卫星与野生大豆遗传多样性关系提供有力的参考价值。所以借助微卫星分子标记,通过野生大豆群体遗传结构和多样性分析、大豆演化和亲缘关系研究,能够精确确定大豆的进化途径和分类学地位,进而对野生大豆种质资源、基因库进行有目的的保护。

4.3 微卫星分子标记在保护野生大豆遗传多样性方面的应用

野生大豆做为自交作物,大部分遗传变异存在居群间,在研究野生大豆居群遗传多样性时,可以适当增加样本的数量。Jin 等(2003)用分子标记(ISSR)对野生大豆这一严格自交的一年生植物的居群遗传学研究和多次随机抽样统计结果表明,35~45 个样本能基本包含该居群 100 个样本中绝大部分的遗传变异。研究还表明,对野生大豆取样时每一个个体应该间隔 10 m 以上,这样才能保证不对遗传变异完全相同的个体重复取样。关荣霞等(2006)认为异位保护取样时,应从不同居群中采集样本随机抽样分析表明,40 个左右样本可保留 95% 的遗传变异。另外,关荣霞等(2006)首次从辽宁新宾县野生大豆原位保护区 10 个自然居群采集了 150 株野生大豆叶片样本,利用居群个体 DNA 等量混合建池,用 53 对微卫星引物进行遗传多样性分析。发现居群内的分化较小,大部分遗传变异存在于居群间;居群间基因流强度很小, $N_m = 0.119$;遗传多样性分布不均匀,呈斑块状,与 Jin 等(2003)用 ISSR 标记分析海江湾机场多样性相似。朱维岳等(2006)筛选了 17 对 SSR 引物对山东省垦利黄河口自然保护区野生大豆居群 892 份材料进行了遗传多样性分析,同时以计算机模拟随机抽取样本方法,并计算各样本的多样性指数与样本量变化的回归关系,发现 27~52 个样本即可达到居群总体多样性水平的 95%。通过空间自相关分析,得出该居群遗传结构的斑块大小约为 18 m。该研究为野生大豆居群的合理取样提供了科学依据。

5 展望

微卫星标记的高效的多态性在评估野生大豆种群遗传多样性、估测遗传距离、揭示大豆同种属间的亲缘进化关系、并提出野生大豆遗传多样性就地保护等方面显示出了很强的优越性。这对野生大豆的研究具有重要的参考价值,也为利用生物技术对大豆基因进行分离和转移奠定了基础。然而,微卫星标记还较少应用于野生大豆遗传多样性保护方面。所以,今后应加强对我国野生大豆微卫星遗传标记的研究,为野生大豆的遗传资源保护和利用提供重要依据。同时还要应用微卫星标记对野生大豆的遗传多样性进行辅助保护,大大减小保护种群内目标基因丢失的风险。因此,随着人们对微卫星标记认识的不断深入与完善,微卫星标记在野生大豆中应用的潜力巨大,而简化其引物设计程序、寻找更多 SSR 位点、发挥该技术的优点,它必将成为野生大豆遗传多样性研究领域的一种强有力的工具,发挥其独特的优势。

References

- Bell C J, and Ecker J R. 1994. Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis thaliana*. *Genomics*, 19:137-144.
- Chen L Z, ed. 1993. China's biodiversity status and Conservation Strategies. Science Press, China, Beijing, pp. 99-113 (陈灵芝, 主编. 1993. 中国的生物多样性现状及其保护对策. 科学出版社, 中国, 北京, pp. 99-113)
- Colson I, Macdonald S J, and Goldstein D B. 1999. Microsatellite markers for interspecific mapping of *Drosophila stimulans* and *D. sechellia*. *Molecular Ecology*, 8(11):1951-1955.
- Guan R X, Liu X M, Chang R Z, Ning H X, Yuan C P, Liu Z X, and Qiu L J. 2006. Genetic diversity analysis of wild soybean (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) from in-situ conserved population in Xinbin county of Liaoning province. *High-tech communications*, 16(1):67-72 (关荣霞, 刘秀敏, 常汝镇, 宁慧霞, 袁翠平, 刘章雄, 邱丽娟. 2006. 辽宁新宾显原位保护区野生大豆 (*G. soja* Sieb. & Zucc.) 遗传多样性分析. 高技术通讯, 16(1):67-72)
- Hai L, Wang K J, and Yang K. 2002. Genetic diversity of semi-wild soybean using SSR markers. *Northwest Plant Journal*, 22(4):751-757 (海林, 王克晶, 杨凯. 2002. 半野生大豆种质资源 SSR 位点遗传多样性分析. 西北植物学报, 22(4):751-757)
- Hu Z H, and Zhou Z G. 2006. Microsatellite DNA marker technique and its application to the genetic of marine organisms. *Transactions of Oceanology and Limnology*, (1):37-45 (胡则辉, 周志刚. 2006. 微卫星 DNA 标记技术及其在海洋生物遗传学中的应用. 海洋湖沼通报, (1):37-45)

- Huenneke L F. 1991. Ecological implications of genetic variation in plant populations In: Falk D A and K E Holsinger (eds). Genetics and conservation of rare plants. Oxford University Press, New York, pp. 31-44
- Jia J Z. 1996. Molecular germplasm diagnostics and molecular marker assisted breeding. *Scientia Agricultura Sinica*, 29(4): 1-10 (贾继增. 1996. 分子标记种质资源鉴定和分子标记育种. *中国农业科学*, 29(4): 1-10)
- Jin Y, Zhang W J, Fu D X, and Lu B R. 2003. Sampling strategy within a wild soybean population based on its genetic variation detected by ISSR marker. *Acta Botanica Sinica*, 45(8): 995-1002
- Kuroda Y, Kaga A, Tomooka N, and Vaughan D A. 2006. Population genetic structure of Japanese wild soybean (*Glycine soja*) based on microsatellite variation. *Molecular Ecology*, 15: 959-974
- Li R Y. 1999. A simple sequence repeat (SSR) and its application in crop research. *Shandong Agricultural Sciences*, (4): 45-49 (李汝玉. 1999. 简单序列重复 (SSR) 及其在农作物研究的应用. *山东农业科学*, (4): 45-49)
- Li X H, Tian Z G, and Li F S. 2003. Genetic analysis of newly collected wild soybean materials and conserved germplasm collected from the same places. *Journal of Plant Genetic Resources*, 4(4): 345-349 (李向华, 田子罡, 李福山. 2003. 新考察收集野生大豆与已保存野生大豆的遗传多样性比较. *植物遗传资源学报*, 4(4): 345-349)
- Liu F, Dong F Y, Zhou J J, Xu S Y, and Zhuang B C. 2000. Soybean germplasm diversity and genetic variance detected by microsatellite Markers. *Acta Genetica Sinica*, 27(7): 628-633 (刘峰, 东方阳, 邹继军, 陈受宜, 庄炳昌. 2000. 应用 SSR 进行大豆种质多样性和遗传变异性分析. *遗传学报*, 27(7): 628-633)
- Maughan P J, Saghai-Marooof M A, and Buss G R. 1995. Microsatellite and amplified fragment length polymorphisms in cultivated and wild soybean. *Genome*, 38: 715-723
- Parker P G, Snow A A, Schug M D, Booton G C, and Fuerst P A. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*, 79: 361-382
- Powell W, Morgante M, and Andre C. 1999. The comparison of RFLP, RAPD and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2: 225-238
- Powell W, Morgante M, Doyle J J, McNicol J W, Tingey S V, and Rafalski A J. 1996. Genepool variation in genus *Glycine* subgenus *Soja* revealed by polymorphic nuclear and chloroplast microsatellites. *Genetics*, 144(2): 793-803
- Rongwen J, Akkaya M S, Bhagwat A A, Lavi U, and Cregan P B. 1995. The use of micro satellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theoretical and Applied Genetics*, 90(1): 43-48
- Schaal B A, Leverich W J, and Rogstad S H. 1991. Comparison of methods for assessing genetic variation in plant conservation biology In Falk D A. and Holsinger K E (eds.). *Genetics and Conservation of Rare Plants*. New York, Oxford University Press, pp. 123-134
- Song Q J. 1999. A review of development and application of simple sequence repeat (SSR) in soybean. *Soybean Science*, 18(3): 248-254 (宋启建. 1999. 大豆 SSR 分子标记的创制及其应用. *大豆科学*, 18(3): 248-254)
- Wang B, and Qiu L J. 2002. Current advance of simple sequence repeats in soybean. *Chinese Bulletin of Botany*, 19(1): 44-48 (王彪, 邱丽娟. 2002. 大豆 SSR 技术研究进展. *植物学通报*, 19(1): 44-48)
- Weber J L, and May P E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerize chain reaction. *Genetics*, (44): 388-396
- Wu J J. 2005. The usage of microsatellite molecular marking in soybean. *System Science and Comprehensive Studies in Agriculture*. 21(1): 16-19 (吴俊江. 2005. 微卫星分子标记在大豆中的应用. *农业系统科学与综合研究*, 21(1): 16-19)
- Wu X L, He C Y, Chen S Y, Zhuang B C, Wang K J, and Wang X C. 2001. SSR markers with a soybean genetic evolutionary relationships between species. *Journal of Genetics and Genomics*, 28(4): 359-366 (吴晓雷, 贺超英, 陈受宜, 庄炳昌, 王克晶, 王学臣. 2001. 用 SSR 分子标记研究大豆属种间亲缘进化关系. *遗传学报*, 28(4): 359-366)
- Xiong L Z, Wang S P, Liu K D, Dai X K, Saghai-Marooof M A, Hu J G, and Zhang Q F. 1998. Distribution of simple sequence repeat and AFLP markers in molecular linkage map of rice. *Plant Journal*, 40(7): 605-614 (熊立仲, 王石平, 刘克德, 戴先凯, Saghai-Marooof M A, 胡锦国, 张启发. 1998. 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*, 40(7): 605-614)
- Xu D H, Abe J, Gai J, Shimamoto Y. 2002. Diversity of chloroplast DNA SSRs in wild and cultivated soybeans; evidence for multiple origins of cultivated soybean. *Theoretical and applied Genetics*, 105: 645-653
- Xu L, and Zhao G F. 2002. Microsatellite DNA marker and its application in genetic diversity research. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 22(3): 714-722 (徐莉, 赵桂仿. 2002. 微卫星 DNA 标记技术及其在遗传多样性研究中的应用. *西北植物学报*, 22(3): 714-722)
- Xu Z Y, Qiu L J, Chang R Z, Li X H, Zheng C M, Liu L H, and Guo P. 1999. Using SSR markers to evaluate genetic diversity of soybean in China. *Scientia Agricultura Sinica*. 32 (Supplement): 40-48 (许占友, 邱丽娟, 常汝镇, 李向华, 郑翠明, 刘立宏, 郭蓓. 1999. 利用 SSR 标记鉴定大豆种质. *中国农业科学*, 32 (增刊): 40-48)
- Zhang Y M, Huang Y, Shi X W, and Liu C A. 2006. Application of microsatellite markers in the genetic diversity of goats. *Journal of Yunnan Agricultural university*, 21(2): 217-221 (张玉梅, 黄英, 史宪伟, 刘朝安. 2006. 微卫星标记在山羊遗传多样性研究中的应用. *云南农业大学学报*, 21(2): 217-221)
- Zhao H K, Wang Y M, Li Q Y, Zhang M, and Zhuang B C. 2001. SSR analysis of wild soybean (*G. soja*) and cultivated soybean from different latitude in China. *Soybean Science*, 20(3): 172-176 (赵洪锬, 王玉民, 李启云, 张明, 庄炳昌. 2001. 中国不同纬度野生大豆和栽培大豆 SSR 分析. *大豆科学*, 20(3): 172-176)
- Zhao L M, Dong Y S, Liu B, Hao S, Wang K J, and Li X H. 2005. China's one-year-old wild soybean (*Glycine soja*) construction of core resources. *Chinese Science Bulletin*, 50(10): 992-999 (赵丽梅, 董英山, 刘宝, 郝水, 王克晶, 李向华. 2005. 中国一年生野生大豆 (*Glycine soja*) 核心资源构建. *科学通报*, 50(10): 992-999)

- 40-42(杨秋香. 1999. 浅谈印刷产业中的环保问题. 三晋测绘, (2):40-42)
- Yang Z B. 2002. Research into the problems in green packing printing. Editorial Office of Journal of Chongqing Technology and Business University, 19 (4):29-34(杨祖彬. 2002. 包装印刷的绿色化问题研究. 渝州大学学报, 19 (4):29-34)
- Yang Z G. 2002. The new members of printing ink-soybean printing ink. Print World, (2):5(杨志钢. 2002. 油墨新成员—大豆油油墨. 印刷世界, (2):5)
-
- (上接 149 页)
- Zhou X F, Zhuang B C, Wang Y M, and Zhao H K. 2002. Population differentiation of wild soybean based on the RAPD and SSR analysis. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 10(4):6-10(周晓馥, 庄炳昌, 王玉民, 赵洪琨. 2002. 利用 RAPD 与 SSR 技术进行野生大豆种群内分化的研究. 中国生态农业学报, 10(4):6-10)
- Zhou Y Q. 2005. DNA molecular marker technology in the study of plant. Chemical Industry Press, China, Beijing(周延清. 2005. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用. 化学工业出版社, 中国, 北京)
- Zhu W Y, Zhou T Y, Zhong M, and Lu B R. 2006. Sampling strategy for wild soybean(*Glycine soja*) populations based on their genetic diversity and fine-scale spatial genetic structure. Journal of Fudan University(Natural Science), 45(3):321-327(朱维岳, 周桃英, 钟明, 卢宝荣. 2006. 基于遗传多样性和空间遗传结构的野生大豆居群采样策略. 复旦学报(自然科学版), 45(3):321-327)
- Zhuang B C. 1999. Researches on wild soybean(*Glycine soja*) in China for twenty years. Journal of Jilin Agricultural Sciences, 24(5):3-10(庄炳昌. 1999. 中国野生大豆研究二十年. 吉林农业科学, 24(5):3-10)
- Zhuang B C. 2000. Genetic diversity of wild soybean(*G. soja*) in China and character of QTL location. Thesis for Ph D, Dissertation of China Agricultural University, Supervisor: Wang X K(庄炳昌. 2000. 中国野生大豆的遗传多样性及品质性状的 QTL 定位, 北京: 中国农业大学, 导师: 王象坤)