

## 中国东北野生大豆 SSR 遗传多样性及亲缘关系分析

魏 苗<sup>1</sup>, 李建东<sup>1</sup>, 燕雪飞<sup>1</sup>, 王国骄<sup>1</sup>, 胡翼宁<sup>2</sup>, 田凤芝<sup>3</sup>

(1. 沈阳农业大学 农学院, 辽宁 沈阳 110866; 2. 北京麋鹿生态实验中心, 北京 100076; 3. 彰武县兴隆堡乡农科农机站, 辽宁 阜新 123200)

**摘 要:**利用 60 对 SSR 引物对东北 52 份野生大豆资源进行遗传多样性分析。结果表明:①其中 40 对 SSR 引物扩增出 408 个等位变异, 平均每个位点等位变异 10.2 个, Shannon-Weaver 指数变化范围为 1.2203~2.6392, 平均为 2.0560, 东北野生大豆具有较丰富的遗传变异;②41°~43°N×124°~126°E 区的野生大豆资源分布广、遗传多样性丰富, 推测处于该经纬区间的辽河平原为东北野生大豆的初生遗传多样性中心;39°~41°N×120°~122°E 区的野生大豆遗传多样性指数较高, 但搜集的资源仅有 4 份, 推测处于该经纬区间的辽东丘陵区可能为东北野生大豆的次生多样性中心。证明东北野生大豆形成了不均衡的 2 个多样性中心;③基于 SSR 数据, 把 52 份野生大豆材料共聚为 6 大类, 聚类结果与野生大豆材料地理分布具有一定的相关性。

**关键词:**野生大豆; 微卫星; 遗传多样性; 亲缘关系

**中图分类号:** S565.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-9841(2011)03-0388-05

## Analysis of Genetic Diversity and Relationship of *Glycine soja* in Northeast China

WEI Miao<sup>1</sup>, LI Jian-dong<sup>1</sup>, YAN Xue-fei<sup>1</sup>, WANG Guo-jiao<sup>1</sup>, HU Yi-ning<sup>2</sup>, TIAN Feng-zhi<sup>3</sup>

(1. College of Agronomy, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, Liaoning; 2. Beijing Milu Ecological Experimental Center, Beijing 100076; 3. Zhangwu County Xinglongbao Township Agricultural Machinery Station, Zhangwu County 123200, Liaoning, China)

**Abstract:** The genetic diversity of 52 northeast wild soybeans were analyzed by 60 pairs of SSR primers. The results showed that: 408 alleles were detected by 40 pairs of SSR markers, with an average of 12.5 alleles for each locus. Shannon-Weaver diversity indexes varied from 1.2203 to 2.6392 with averaged 2.0560, wild soybean has a rich genetic variation in northeast China; wild soybean in 41°~43°N×124°~126°E area have the richest accessions and genetic diversity, thus the Liaohe plain might be the newborn genetic diversity centre. Wild soybean in 39°~41°N×120°~122°E region have higher genetic diversity index, but fewer resources were collected, thus the Liaodong hilly area might be the secondary genetic diversity centre of the northeast China. It proved that the formation of two uneven wild soybean centers of diversity in northeast China. Based on SSR data, 52 wild soybeans were clustered into six categories, the results of clustering was related with the geographical distribution of wild soybeans.

**Key words:** *Glycine soja*; SSR; Genetic diversity; Relationship

一年生野生大豆(*Glycine soja*)是栽培大豆的直接祖先,是豆科(*Leguminosae*)蝶形花亚科(*Papilionatae*)大豆(*Soja*)亚属的一个种<sup>[1]</sup>。在经历长期的自然选择后,野生大豆形成了极其丰富的变异类型,对病虫害有较强的抗性,而且对环境具有较强的适应性,野生大豆具有的优良基因是选育新品种、开展生物技术研究的基因来源。野生大豆分布于亚洲东部的中国、朝鲜、日本及与中国毗邻的前苏联远东地区,而中国分布最广,拥有量占全世界的90%<sup>[2]</sup>。

我国从分子水平对野生大豆进行遗传多样性研究始于20世纪80年代初,即对大豆贮藏蛋白

RNA分离及其翻译产物的获得<sup>[3]</sup>。2006年西北农林科技大学作物遗传育种课题组利用33对SSR引物分析河南省268份野生大豆材料,推断出河南省野生大豆资源的遗传多样性中心<sup>[4]</sup>。2005年吉林省农科院对我国国家种质资源库中保存的6172份一年生野生大豆(*Glycine soja*)资源进行了系统的遗传多样性分析,其聚类结果与野生大豆材料生长的地理环境具有一定的相关性<sup>[5]</sup>。中国东北界于北纬38°43′~53°33′和东经118°53′~135°05′范围内,地形复杂,气候条件有较大差异。影响野生大豆分布及类型的环境因素比较复杂,通过了解野生大豆的分布及类型状况的信息可以明确地理环境因素

收稿日期:2011-01-18

基金项目:辽宁省高等学校创新团队科研资助项目(2009T088)。

第一作者简介:魏苗(1987-),女,硕士,研究方向为野生大豆遗传多样性。E-mail:weimiao.1987@163.com。

通讯作者:李建东(1964-),男,教授,主要从事农业生态学和生物多样性研究。E-mail:syljiandong@126.com。

对于野生大豆的影响。因此,在课题组前期研究<sup>[6]</sup>的基础上,对东北 52 份野生大豆材料进行 SSR 遗传多样性分析,旨在明确东北野生大豆遗传多样性分布特点,揭示不同地理环境因素与不同地区野生大豆遗传多样性、亲缘关系之间的相关性,为东北野生大豆种质资源的利用和开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

用于 SSR 分析的东北各地区 52 份野生大豆材料(表 1),均由中国农业科学院作物品种资源研究所提供。

表 1 供试材料的编号和来源  
Table 1 Accession number and origin of experiment materials

国家编号 National code	地理来源 Origin	国家编号 National code	地理来源 Origin	国家编号 National code	地理来源 Origin
ZYD00003	塔河县 Tahe	ZYD00802	榆树 Yushu	ZYD01914	辽中县 Liaozhong
ZYD00006	呼玛县 Huma	ZYD00878	农安 Nongan	ZYD01931	台安县 Taian
ZYD00095	嘉荫县 Jiayin	ZYD01007	怀德 Huaide	ZYD01942	海城县 Haicheng
ZYD00112	讷河县 Nehe	ZYD01044	敦化 Dunhua	ZYD02119	金县 Jin
ZYD00158	克东县 Kedong	ZYD01065	汪清 Wangqing	ZYD02145	庄河县 Zhuanghe
ZYD00218	龙江县 Longjiang	ZYD01152	双辽 shuangliao	ZYD02211	桓仁县 Hengren
ZYD00245	桦川县 Huachuan	ZYD01159	梨树 Lishu	ZYD02225	本溪县 Benxi
ZYD00313	庆安县 Qingan	ZYD01206	盘石 Panshi	ZYD02413	阜新县 Fuxin
ZYD00337	望奎县 Wangkui	ZYD01271	东辽 Dongliao	ZYD02530	建昌县 Jianchang
ZYD00383	集贤县 Jixian	ZYD01300	延吉 Yanji	ZYD02560	锦县 Jin
ZYD00437	泰来县 Tailai	ZYD01344	东丰 Dongfeng	ZYD02591	义县 Yi
ZYD00447	依兰县 Yilan	ZYD01456	伊通 Yitong	ZYD02593	黑山县 Heishan
ZYD00511	宾县 Bin	ZYD01559	浑江 Hunjiang	ZYD02607	兴城县 Xingcheng
ZYD00552	勃力县 Boli	ZYD01570	通化 Tonghua	ZYD02617	绥中县 Suizhong
ZYD00599	延寿县 Yanshou	ZYD01590	长白 Changbai	ZYD02684	抚顺县 Fushun
ZYD00616	双城县 Shuangcheng	ZYD01603	集安 Jiān	ZYD01922	新民县 Xinmin
ZYD00684	鸡东县 Jidong	ZYD01620	昌图县 Changtu		
ZYD00719	穆棱县 Muling	ZYD01896	铁岭县 Tieling		

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取 从每份材料中选取 3 粒野生大豆种子,划破种皮后放于装有蛭石的塑料盆中恒温培养,待长出三出复叶后,选取 1 株长势良好的幼苗剪取其叶片,采用改良的 CTAB 法提取 DNA<sup>[7]</sup>。

1.2.2 PCR 扩增与电泳检测 在每个连锁群上随机选出 3 对 SSR 引物进行筛选,SSR 引物由上海赛百盛基因技术公司合成,引物序列见 <http://www.soybean.org/resources/ssr.php>。其中 40 对引物表现出扩增条带清晰、反应稳定。利用这 40 对引物对东北 52 份野生大豆 DNA 样本进行扩增。PCR 反应体系为 20 μL,含 10 × buffer 2.0 μL(含 Mg<sup>2+</sup>),10 μmol · L<sup>-1</sup> dNTPs 0.4 μL,10 μmol · L<sup>-1</sup> 正、反向 SSR 引物各 1.5 μL,Taq 聚合酶(2.5 U · μL<sup>-1</sup>) 0.2 μL,以及 1.5 μL 的 30 ng · μL<sup>-1</sup> 模板 DNA,ddH<sub>2</sub>O 为 12.9 μL。反应在 BIO-RAD 公司的 MJ PTC200 上进行扩增,反应程序为:94℃ 下模板预变性 5 min 后,94℃ 下模板 DNA 变性 1 min,55℃ 下退火 1 min,72℃ 下延伸 2 min,35 个循环,最后 72℃ 下延伸 7 min。扩增产物在 6% 非变性聚丙烯酰胺凝

胶中电泳,银染显色并记录。银染程序参照 Sangui-netti 等<sup>[8]</sup>的方法。

1.3 数据分析

1.3.1 数据分析方法 利用 Quantity One 软件(Bio-Rad)结合人工的方法进行读带,根据每个 SSR 标记的等位变异的差异分别以 1、2 记,以此类推建立原始矩阵。再将赋值为“1”的用“AA”代表,“2”用“BB”,依次类推,即将数值化的分子数据进行编码,用 Popgen 统计软件统计等位变异数、有效等位变异数、Nei’s 遗传距离以及遗传多样性指数。用 NTSYSpc2. 10e 计算供试材料的遗传相似系数矩阵,按类平均法(UPGMA)进行聚类分析,绘制亲缘关系树状图。

1.3.2 数据分析内容 ①计算遗传相似系数根据 Nei 和 Li 的公式  $S_{ij} = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$ ,其中  $N_{ij}$  为种质  $i$  和种质  $j$  共有的等位变异数, $N_i$  为种质  $i$  中具有

的等位变异数, $N_j$  为种质  $j$  中具有

的等位变异数。

②不同组群内某一位点的等位变异数及有效等位变异数。

③组群内某一位点 Shannon-weaver 多样性指数

$H_i = - \sum P_j \ln P_j$ ,  $P_j$  是指  $i$  位点第  $j$  个等位变异出现的频率。

④组群内某一位点 Simpson 多样性指数  $H_i = 1 - \sum P_j^2$ ,  $P_j$  为  $i$  位点第  $j$  个等位变异频率。

2 结果与分析

2.1 东北野生大豆 SSR 位点多态变异

该试验选用在野生大豆连锁群中分布较均匀且扩增条带清晰、反应稳定的 40 对 SSR 引物从 52

份东北地区的野生大豆材料中扩增出 408 个等位基因,平均每个位点等位变异 10.2 个。如表 2 所示,20 个连锁群中以 Dlb + W 连锁群扩增的等位变异数最多,同一连锁群上的不同引物之间扩增结果也存在差异,如 D2 连锁群上引物 Satt002 扩增出 13 个等位变异,而引物 Satt386 则只扩增出 5 个等位变异。Simpson 指数平均为 0.8381,变幅为 0.6479 (Satt242) ~ 0.9144 (Satt571); Shannon-weaver 指数平均为 2.0560,变化范围为 1.2203 (Sat\_112) ~ 2.6392 (Satt571)。说明供试材料的位点变异丰富。

表 2 SSR 分析结果

Table 2 Results of SSR analysis

引物 Primer	连锁群 LG	等位变异数 Observed number of alleles	有效等位变异数 Effective number of alleles	Shannon 指数 Shannon index	Simpson 指数 Simpson index
Satt276	A1	8	7.6053	2.0521	0.8685
Satt300	A1	13	11.0681	2.4761	0.9097
Satt177	A2	14	9.3424	2.4327	0.8930
Satt429	A2	6	4.0909	1.5761	0.7556
Satt453	B1	6	3.5788	1.4544	0.7206
Satt197	B1	8	3.9784	1.7014	0.7486
Satt168	B2	9	6.9444	2.0697	0.8560
Satt556	B2	12	9.8776	2.3800	0.8988
Satt565	C1	9	6.7227	2.0464	0.8512
Satt190	C1	8	6.6810	1.9765	0.8503
Satt307	C2	10	6.9398	2.0634	0.8559
Satt281	C2	9	6.2113	1.9470	0.8390
Satt147	Dla + Q	11	6.5850	2.1239	0.8481
Satt267	Dla + Q	13	9.4901	2.3795	0.8946
Satt005	Dlb + W	13	9.9811	2.4200	0.8998
Satt216	Dlb + W	12	8.0000	2.2649	0.8750
Satt002	D2	13	9.1990	2.3638	0.8913
Satt386	D2	5	4.2368	1.5132	0.7640
Satt268	E	8	5.1302	1.8153	0.8051
Satt_112	E	4	2.9572	1.2203	0.6618
Satt114	F	11	7.8150	2.2017	0.8720
Satt146	F	10	4.8263	1.8757	0.7928
Satt288	G	9	5.0248	1.8593	0.8010
Satt309	G	12	9.1429	2.3273	0.8906
Satt279	H	15	10.3784	2.5041	0.9036
Satt434	H	8	5.2301	1.8273	0.8088
Satt571	I	17	11.6822	2.6392	0.9144
Satt239	I	11	6.0166	2.0761	0.8338
Satt183	J	9	6.2364	1.9411	0.8397
Satt431	J	13	10.3846	2.4333	0.9037
Satt242	K	6	2.8403	1.3416	0.6479
Satt544	L	13	10.2155	2.4234	0.9021
Satt462	L	9	6.0623	1.9616	0.8350
Satt373	L	14	9.8489	2.4395	0.8985
Satt590	M	14	8.5290	2.3581	0.8828
Satt306	M	8	5.8182	1.8786	0.8281
Satt022	N	9	7.2295	2.0628	0.8617
Satt530	O	7	5.2236	1.7523	0.8086
Satt487	O	14	11.5654	2.5356	0.9135
Satt345	O	8	3.3379	1.5242	0.7004
平均值 Mean		10.2	7.1507	2.0560	0.8381

2.2 东北野生大豆资源遗传多样性分布

为了明确东北野生大豆遗传多样性中心,在 39~53°N 和 120~132°E 范围内以 2°为单位将野生大豆分布区划分为 21 个小区,分别计算了 21 个经纬小区的 Shannon 指数(表 3),结果显示:分布于 41~43°N×124~126°E 小区的野生大豆显著高于整

体平均遗传多样性指数,说明位于该区内各县材料间分子水平的遗传差异大。以此向西南的 41~43°N×122~124°E 和 39~41°N×120~122°E 2 个小区平均遗传多样性指数依次递减,但高于周围小区;以此向北 43~45°N×124~126°E 小区的平均遗传多样性指数均高于周围小区。

表 3 东北野生大豆遗传多样性分布  
Table 3 The distribution of genetic diversity of wild soybean in Northeast

纬度 Latitude(°N)	经度 Longitude(°E)					
	120~122	122~124	124~126	126~128	128~130	130~132
39~41	0.9877(4)	0.5154(2)				
41~43	0.7249(3)	1.1303(6)	1.2049(6)	0.3466(2)	0.5199(2)	
43~45			1.0576(5)	0.7530(3)	0.6721(3)	——(1)
45~47		——(1)		0.7588(3)	0.4560(2)	0.4088(2)
47~49		——(1)	——(1)	——(1)		0.5332(2)
49~51				——(1)		
51~53			——(1)			

括号内数字为小区材料数,当小区只有 1 份材料时,没有分析其遗传多样性。  
Values in bracket indicate material number in one plot, when there was only one material in plot, the genetic diversity was not analyzed.

2.3 亲缘关系分析

根据遗传相似系数矩阵,对 52 份资源进行 UPGMA 聚类分析(图 1)。结果东北各县材料聚为 6 大类。第 1 类主要分布于黑龙江北部(塔河县、鸡东县、呼玛县)和辽宁省北部的丘陵山区(昌图县)。第 2 类主要分布于吉林省东部、南部(汪清、东丰、梨树、伊通、浑江、通化、长白、集安)和辽宁省南部、中部的平原区(金县、绥中、台安、黑山县)。第 3 类主要分布于黑龙江东部(龙江县、桦川县、勃利县、穆棱县)、吉林省西南部(延吉、双辽、怀德、盘石)以及辽宁省中西部平原丘陵过渡区(新民县、义县)。第 4 类主要分布于黑龙江北部、中部(嘉荫县、望奎县、集贤县、讷河县)和辽宁省平原区(建昌县、铁岭县、锦县、辽中县、庄河县)。第 5 类主要分布于黑龙江中部(庆安县、依兰县)和辽宁省平原丘陵过渡区(本溪县、阜新县、兴城县)。第 6 类主要分布于黑龙江东南部(延寿县、宾县)、吉林省(农安、敦化)和辽宁省中部、东部山区(海城县、恒仁县)。

3 讨 论

该文通过东北野生大豆 SSR 位点多态变异分析表明,东北 52 份供试材料具有较为丰富的遗传变异。41~43°N×124~126°E 区的野生大豆资源分布广、遗传多样性丰富,推测处于该经纬区间的辽河平原为东北野生大豆的初生遗传多样性中心。

对东北野生大豆资源遗传多样性分布研究表明 41~43°N×124~126°E、41~43°N×122~124°E、43~45°N×124~126°E、39~41°N×120~122°E 4 个经纬区表现出较高的遗传多样性,特别是 41~43°N×124~126°E 区,表现出最高的遗传多样性,说明其材料间分子水平的遗传变异丰富。围绕 41~43°N×124~126°E 区的各经纬区,遗传多样性指数均低于该区,而且总体有距离该区域越远,遗传多样性越低的趋势。根据 Vavilov 和 Harlan“每种作物都有一个独特的多样性初生中心,这也就是它的起源中心,这种中心往往在进化的起始阶段就扩散到较大的区域,其分布是地理学上的连续统一体”的理论<sup>[9]</sup>,可以推测出 41~43°N×124~126°E 区为东北野生大豆遗传多样性中心。41~43°N×124~126°E 区处于辽河平原东北边缘,主要分布于辽宁省,属于温带湿润季风型气候,有极为丰富的野生大豆资源分布和很高的遗传多样性,说明这里可能是东北野生大豆的初生遗传多样性中心;而 41~43°N×122~124°E 区多样性指数较大,是辽河平原右侧区域,处于辽河冲积平原、松辽平原及松辽平原的丘陵过渡区,与遗传多样性中心辽河平原区相邻,而且不符合 Vavilov 的遗传多样性中心理论,只能是遗传多样性中心的辐射区,而不是独立的遗传多样性中心,辐射区包含辽宁省野生大豆遗传多样性中心 41~42°N×122~123°E<sup>[6]</sup>,进一步证明了辽



- 表达[C]. 第四届中国植物细菌病害学术研讨会论文集. 2008: 68-72. (Jiang Z Y, Gao J, Zhang J H. Clone and expression of *hrpZpsta* genes from *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* [C]. The 4th China National Symposium on Phytobacteriology, 2008:68-72.)
- [2] He S Y, Huang H C, Collmer A P. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpinPss: A protein that is secreted via the *hrp* pathway and elicits the hypersensitive response in plants[J]. Plant Journal, 1993,73:1255-1266.
- [3] 余榕捷, 洪岸, 庞义, 等. SZZ-Harpin 融合蛋白在苏云金芽孢杆菌中的表达及活性测定[J]. 微生物学通报, 2003,30(2): 11-15. (Yu R J, Hong A, Pang Y, et al. Expression and biological assay of SZZ-Harpin fusion protein in bacillus thuringiensis [J]. Microbiology, 2003,30(2):11-15.)
- [4] 傅华欣, 陆云梅, 毛华方, 等. 康壮素在塑料大棚草莓上的应用效果[J]. 安徽农业科学, 1999,27(6):596. (Fu H X, Lu Y M, Mao H F, et al. Studies on the technique of applying Harpin for the diseases control of strawberry grown in greenhouse [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 1999,27(6):596.)
- [5] 高正良, 马国胜, 周本国, 等. 康壮素对烟叶产质量及综合抗病虫能力的影响[J]. 烟草科技, 1999(5): 43-44. (Gao Z L, Ma G S, Zhou B G, et al. Effect of Harpin on yield, quality and disease, insect resistance of flue-cured tobacco [J]. Tobacco Science & Technology, 1999(5): 43-44)
- [6] 李先平, 何云昆, 陈善娜. 表达 *Harpin\_Ea* 基因的转基因马铃薯的晚疫病抗性分析[J]. 云南农业大学学报, 2002,18(3): 252-257. (Li X P, He Y K, Chen S N. Analysis of late blight resistance in transgenic potato expressing *Harpin\_Ea* gene [J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2002,18(3):252-257.)
- [7] 韩青梅, 孟颖光, 曹丽华. 过敏素类蛋白研究进展[J]. 河南农业大学学报, 2004,38(3):319-322. (Han Q M, Meng J G, Cao L H. Progress of studies on harpins [J]. Journal of Henan Agricultural University, 2004,38(3):319-322.)
- [8] 任秀艳. Harpins 蛋白在黄瓜上的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2010,38(22): 11714-11716. (Ren X Y. Progress research on cucumber by Harpins [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010,38(22):11714-11716.)
- [9] 王丕武, 武丽敏, 张君, 等. *Bt + CpTI* 抗虫基因转化大豆的研究[C]. 植物分子育种(第四届全国植物分子育种学术研讨会论文集), 2004. (Wang P W, Wu L M, Zhang J, et al. A study on transformation of *Bt + CpTI* insect resistant gene into soybean [C]. Molecular Plant Breeding (China Academic Journal Electronic Publishing House), 2004.)
- [10] Tougou M, Yamagishi N, Furutani N, et al. Soybean dwarf virus-resistant transgenic soybeans with the sense coat protein gene[J]. Plant Cell Reports, 2007,26: 196-197.
- [11] 许修宏, 曲娟娟, 张喜萍, 等. 大豆疫霉根腐病研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2003,34(4): 474-477. (Xu X H, QU J J, Zhang X P, et al. Progress of research on *Phytophthora* root rot [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2003,34(4): 474-477.)
- [12] 张洁, 张东旭, 商蕾. 转基因技术在大豆育种上的应用与研究[J]. 华北农学报, 2008,23(2):133-138. (Zhang J, Zhang D X, Shang L. Study and application of transgenic technology in soybean breeding [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2008,23(2):133-138.)
- [13] 赵桂兰, 刘艳芝, 李俊波, 等. 影响农杆菌介导的大豆基因转化因素的研究[J]. 大豆科学, 2001,20(2):84-88. (Zhao G L, Liu Y Z, Li J B, et al. Study on factors influencing *Agrobacterium*-mediated soybean transformation [J]. Soybean Science, 2001,20(2):84-88.)

(上接第 392 页)

## 参考文献

- [1] 李福山. 大豆起源及其演化研究[J]. 大豆科学, 1994,13(1):61-66. (Li F S. The study on origin and evolution of soybean [J]. Soybean Science, 1994,13(1):61-66.)
- [2] 庄炳昌. 中国野生大豆研究二十年[J]. 吉林农业科学, 1999,24(5):3-10. (Zhuang B C. Researches on wild soybean (*Glycine soja*) in China for twenty years [J]. Journal of Jilin Agricultural Science, 1999,24(5):3-10.)
- [3] 薛中天, 徐美琳, 庄乃亮, 等. 野生大豆 (*Glycine soja* SH1) 球蛋白 *glycinin* Gy4 基因家族的两端表达拷贝[J]. 中国科学(B 辑), 1987(8):36-43. (Xuan Z T, Xu M L, Zhuang N L, et al. SH1 Two expression copies of *glycinin* Gy4 gene family in *Glycine soja* [J]. Science in China (B Series), 1987(8):36-43.)
- [4] 王果. 河南省野生大豆资源遗传多样性分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007. (Wang G. The genetic diversity of annual wild soybeans in Henan province [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2007.)
- [5] 赵丽梅, 董英山, 刘宝, 等. 中国一年生野生大豆 (*Glycine soja*) 核心资源构建[J]. 科学通报, 2005(10):992-999. (Zhao L M, Dong Y S, Liu B, et al. Core resources construction of annual wild soybean (*Glycine soja*) in China [J]. Science Bulletin, 2005(10):992-999.)
- [6] 李建东, 燕雪飞, 董思言, 等. 辽宁省野生大豆种质资源的 SSR 遗传多样性分析[J]. 大豆科学, 2010,29(1):29-32. (Li J D, Yan X F, Dong S Y, et al. Analysis of genetic diversity of *Glycine soja* germplasm resources in Liaoning province [J]. Soybean Science, 2010,29(1):29-32.)
- [7] Doyle J J, Doyle J L. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochemical Bulletin, 1987,9:11-15.
- [8] Sanguinetti C J, Dias N E, Simpson A J G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels [J]. Biotechniques, 1994,17:915-919.
- [9] Vavilov N I. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants [M]. New York: Academic Press, 1973.
- [10] 董英山, 庄炳昌, 赵丽梅, 等. 中国野生大豆遗传多样性中心[J]. 作物学报, 2000,26(5):521-527. (Dong Y S, Zhuang B C, Zhao L M, et al. The genetic diversity centers of annual wild soybean in China [J]. Acta Agronomica Sinica, 2000,26(5):521-527.)
- [11] 李福山, 王衍桐. 野生大豆分布与环境条件[J]. 大豆科学, 1989,8(3):245-251. (Li F S, Wang Y T. The distribution and environment condition of wild soybean (*Glycine soja*) [J]. Soybean Science, 1989,8(3):245-251.)