

东北野生大豆核心种质单核苷酸多样性分析

孟 爽^{1,2},赵洪锬²,袁翠平²,尹 光³,刘晓冬²,王玉民²,董英山²,李建东¹

(1. 沈阳农业大学 农学院,辽宁 沈阳 110866; 2. 吉林省农业科学院 农业生物技术研究所,吉林 长春 130033; 3. 深圳市高级中学,广东 深圳 518040)

摘 要:对 196 个东北野生大豆核心种质的 *NRT2*、*AspAT2* 和 *CPK13* 三个基因片段进行单核苷酸扫描,共检测到 94 个 SNPs 位点及 10 个插入/缺失位点(Indel),碱基转换和颠换平均比例约 2:1。稀有 SNPs 位点(<10%) 39 个,比率约为 41.5%。196 份核心种质平均多态性位点比例约为 74%,Shannon's 指数是 0.366,多样性指数为 0.241;不同纬度群体的平均多样性指数随纬度下降逐渐升高,在 44°N 时达到峰值,然后随纬度降低缓慢下降,多样性指数变化呈近似正态曲线模式。初步推测 N 42°~N45°区域为东北野生大豆的多样性中心。
关键词:野生大豆;核心种质;SNP;Indel;遗传多样性
中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2015.02.0185

Genetic Diversity Analysis on SNP of Core Collection of Wild Soybean in Northeastern China

MENG Shuang^{1,2}, ZHAO Hong-kun², YUAN Cui-ping², YIN Guang³, LIU Xiao-dong², WANG Yu-min², DONG Ying-shan², LI Jian-dong¹

(1. College of Agronomy, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 2. Agro-biotechnology Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China; 3. Shenzhen Senior High School, Shenzhen 518040, China)

Abstract: One hundred and ninety-six wild soybean germplasm were selected from core collection of Northeastern China and the *NRT2*, *AspAT2* and *CPK13* gene sequences were used for SNP analysis. We detected 94 SNPs and 10 Indel with average proportion of nucleotide transitions and transversions of about 2:1. There was 39 rare SNPs(<10%), with ratio of approximately 41.5%. The average proportion of polymorphic sites for 196 core collection was 74%, Shannon's index of 0.366 and diversity index was 0.241. With the decline of latitude, average diversity index of populations of different latitudes was increased, reaching peak at 44°N. Changes in diversity index exhibited normal mode curve. It showed that the central diversity of wild soybean in Northeastern China was found at 42°N-45°N.
Keywords: Wild soybean;Core collection;SNP;Indel;Genetic diversity

东北地区是我国野生大豆分布最广泛的地区之一,也是我国野生大豆资源库中占组成比例最多的生态区。《中国野生大豆资源目录》及其续编显示,库存资源收录的 6 172 份野生大豆资源中 50% 以上(3 257 份)来源于东北地区^[1-2]。作为我国野生大豆资源宝库的重要组成部分,东北地区野生大豆遗传多样性研究一直是众多学者关注的热点,因取样策略、样本来源的均衡性和方法选择等存在差异,导致学者们对其分布和特点描述不尽相同。徐豹等^[3]根据野生大豆籽粒性状的变异特点提出东北东南部很可能是大豆的起源地之一;董英山等^[4]综合分析野生大豆多个数量性状和质量性后,提出东北中南部可能是野生大豆的初生多样性中心或者是起源中心之一。许东河等^[5]分析野生大豆形态性状、等位酶标记和细胞器 DNA 的 RFLP 标记结

果后提出南方群野生大豆群体遗传多样性最高,东北群体最低。刘亚男^[6]对野生大豆微核心种质进行 SSR 分析后则认为,在地理区域群体水平上,遗传信息指数和特异等位基因变异数以东东北地区最高;而在个体水平上,由南到北呈降低趋势,东北最低。可见,多角度深入研究东北地区野生大豆资源遗传多样性对揭示野生大豆进化历史、保护和保存策略的制定及开发利用具有重要意义。
单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphisms,简称 SNPs)是目前为止分布最为广泛,存在数量最多,并且标记密度最高的一种遗传多态性标记,具有位点丰富、较高的遗传稳定性和代表性、并且易于实现分析自动化等特点^[7-8]。因其应用范围较微卫星更加广泛,被认为是第三代遗传标记^[9]。
本研究选取来源于东北地区的 196 份野生大豆

收稿日期:2014-04-01
基金项目:国家自然科学基金(31300282);吉林省科技厅应用基础项目(20130102050JC);公益性行业(农业)科研专项(201003021)。
第一作者简介:孟爽(1988-),女,硕士,主要从事野生大豆遗传多样性研究。E-mail:mengshuang0518@126.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;
董英山(1963-),男,研究员,主要从事野生大豆资源研究。E-mail:ysdong@cjaas.com。

核心种质为样本,选择硝酸盐转运子基因(*NRT2*)、天冬氨酸转氨酶基因(*AspAT2*)和钙依赖性蛋白激酶基因(*CPK13*)三个基因片段进行 SNP 扫描,分析 SNP 的频率、分布及特征,在 DNA 序列水平上研究东北野生大豆遗传多样性情况,旨在为野生大豆资源的合理保护及其在育种中的利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验所用的 196 份材料选自董英山^[4]构建的野生大豆核心种质中来源于东北地区的种质(表 1)。种子破皮后,利用发芽纸进行发芽,芽长 5 cm 左右时,单株提取总 DNA。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计及 PCR 反应 选取候选基因的栽培大豆 cDNA 序列为查询序列,与大豆 EST 数据库进行同源性对比,搜索同源性大于 80% 的 EST。通过电子克隆得到一条含编码区的大豆 cDNA 序列,利用 NCBI 网站进行 BLAST 对比,获得相对保守区域。通过利用 Primer Premier 5.0 软件设计基因的特异引物(表 2)。

PCR 反应体系为 50 μL ,含 25 μL 的 $2 \times \text{Taq}$ Plus PCR MasterMix 溶液(KT205,天根生化),1 μL 的 40 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 模板 DNA,10 $\text{pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的正、反向

引物各 1 μL ,22 μL 的灭菌双蒸水。94℃ 预变性 5 min;94℃ 45 s,51 ~ 60℃ 45 s,72℃ 1 min,35 个循环;72℃ 延伸 10 min。1.0% 琼脂糖凝胶电泳。

1.2.2 PCR 产物的回收、连接、转化及测序 采用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒(上海生工)回收目的片段。回收纯化后的目的片段连接至 PMD18-T 载体,热击转化导入 *E. coli* DH5 α 大肠杆菌感受态细胞,蓝白斑法筛选目的克隆,经菌落 PCR 检测阳性克隆后送至北京六合华大基因科技有限公司进行序列测定。测序引物为扩增引物,正反向测序。

表 1 200 份野生大豆核心种质的材料编号和来源
Table 1 Accession number and origin of 200 *G. soja*

材料编号 Accession	群体 Population	纬度(北纬) Latitude(N)
1 ~ 22	Pop1	$\geq 48^{\circ}$
23 ~ 48	Pop2	47°
49 ~ 64	Pop3	46°
65 ~ 93	Pop4	45°
94 ~ 110	Pop5	44°
111 ~ 146	Pop6	43°
147 ~ 181	Pop7	42°
182 ~ 196	Pop8	$\leq 41^{\circ}$

表 2 PCR 引物序列

Table 2 Primers sequence of PCR

基因或基因片段名称 Gene or region	引物(5' - 3') Primer sequence	退火温度 Annealing temperature/℃
<i>NRT2</i>	F: CAGAATTCACATTCGCGAGCAGCACCTCT	60
	R: TCAAGCTTCGAGGTTTCCATCAGGCAAG	
<i>AspAT2</i>	F: CGGAATTCTATCCTCGGGGTAAGTGTCTG	55
	R: CTAAGCTTCCAGTTCCAGACAAGCATTGA	
<i>CPK13</i>	F: CAGGCTCCTAATGTTCCAC	51
	R: GCTTGTCCGAGTCTACTTCTA	

1.3 数据分析

测序结果采用 Vector NTI 8.0 软件的 ContigExpress 程序序列拼接,通过 DNASTar 7.10 软件的 EditSeq 程序去掉两端冗余的序列,采用 Clustal X^[10] 软件进行多序列比对,找到高度保守位点、SNP 位点以及 InDel 位点。序列比对结果导入 DnaSP 5.10^[11] 软件进行 Tajima's D 值的计算和 DNA 多样性分析。多态性位点的连锁不平衡分析及绘图采用 TASSEL 3.0,并采用 GenALEx6.5 软件,计算了 196 份样本平均 Shannon 信息指数(Shannon's Information Index, I)、多样性指数(Diversity, h), Nei 遗传同一性

距离及不同纬度群体间的 Nei 遗传同一性距离的配对群体矩阵,并以配对群体矩阵为基础数据,通过 NTSYS 软件构建了系统发育树。

2 结果与分析

2.1 核苷酸序列特征比较

对 196 个东北野生大豆核心种质的 *NRT2*、*AspAT2* 和 *CPK13* 共 3 个基因片段进行单核苷酸扫描,共检测到 104 个核苷酸多态性位点,包含 94 个 SNPs 位点及 10 个插入/缺失位点(Indel),呈现较高的单核苷酸多态性。其中稀有 SNPs 位点(< 10%)

39 个,比率约为 41.5%。总体上,外显子区检测到的核苷酸多态性位点数与内含子区相同,均为 52 个,Indel 存在于 *CPK13* 基因片段的内含子区。SNPs 的碱基置换类型以转换为主,转换和颠换平均比例约 2:1(表 3)。

NRT2 的有效比对基因片段长度为 481 bp, SNPs 发生在外显子区,检测到的单核苷酸多态性位点数为 23 个,发生频率约 4.78%。其中 SNPs 位点(<10%)6 个,约占 26.1%。碱基置换以转换为主,转换和颠换的比例约 1.5:1,其中,7 个 A↔G 转换,7 个 C↔T 转换,5 个 A↔T 颠换,2 个 A↔C 颠换和 2 个 C↔G 颠换。变异发生频率最高的位置是 61 bp 位点,有 48.5% 的核心种质发生了变异。SNPs 位点(<10%)6 个,约占 26.1%。

AspAT2 有效比对基因片段总长度为 244 bp, 包含 1 个 148 bp 的外显子区和 1 个 96 bp 的内含子区。多态性位点发生在外显子区 62 bp 处,C↔T 转换,仅 1 个核心种质在此位点发生了变异,发生频率仅 0.41%。

3 个基因片段中,*CPK13* 基因检测到的核苷酸

多态性位点最为丰富。它的有效比对基因片段总长度为 752 或 763 bp,包含 1 个外显子区(382 bp)和 2 个内含子区域(82 和 299 bp)。共检测到 80 个核苷酸多态性位点,发生频率约 10.5%。其中,外显子区共检测到 28 个核苷酸位点发生变异,稀有 SNPs 位点(<10%)18 个,占总数的 64.3%;变异位点中发生频率最高的位置是 646 和 703 bp 位点,196 份核心种质中 60 个发生了变异;碱基置换以转换为主,转换和颠换比例约为 3:1,13 个 T↔C 转换,8 个 A↔G 转换;7 个位点发生了碱基颠换,3 个 A↔C 颠换,2 个 A↔T 颠换和 2 个 G↔C 颠换。内含子区检测到位点的多态性高于外显子区,共检测到 42 个 SNPs 位点及 10 个 Indel 位点;稀有 SNPs 位点(<10%)位点 14 个,占 1/3;变异发生频率最高的位置在 539 bp 位点处,47.4% 的核心种质在此处发生了变异;碱基转换和颠换比例约 1.6:1,17 个 T↔C 转换,9 个位点发生了 A↔G 转换,7 个 A↔C 颠换,6 个 G↔T 颠换,2 个 A↔T 颠换和 1 个 G↔C 颠换。Indel 位点发生在 *CPK13* 基因片段的内含子区的 423~428 bp、456,457,506 和 507 bp 位点。

表 3 不同基因的核苷酸多态性位点分布

Table 3 Distribution of nucleotide polymorphism sites for different genes							
基因 Gene	长度 Length/bp	SNP 数量 SNP quantity		SNP 频率 SNP frequency/%	InDel 数量 InDel quantity	转换 Transition	颠换 Transversion
		外显子 SNP exon	内含子 SNP intron				
<i>NRT2</i>	481	23	0	4.780	0	14	9
<i>AspAT2</i>	244	1	0	0.409	0	1	0
<i>CPK13</i>	752/763	28	42	9.170	10	47	23

2.2 不同基因区域核苷酸序列多样性分析

分别对 *NRT2*、*CPK13* 和 *AspAT2* 三个基因区域内的核苷酸序列多样性进行分析。从表 4 可见, *NRT2* 和 *CPK13* 的 Hd 值分别为 0.996 和 0.926,表明东北野生大豆核心种质在这 2 个基因区域的核苷酸序列多态性较高,*AspAT2* 则非常低,其 Hd 值只有 0.01。在 *NRT2* 和 *CPK13* 的群体中,其中等频率的等位基因占主导(π 值 < θ_w 值),低频 SNPs 较理论预期要少。Tajima's D 检测结果显示,*NRT2* 的 Taji-

ma's D 值 2.458 6, $P < 0.05$, 达到显著水平, *AspAT2* 和 *CPK13* 的 Tajima's D 值分别为 -0.955 9 和 0.937 9,两者都未达到显著水平($P > 0.10$),表明 *NRT2* 发生的变异不符合中性学说,选择在进化中起到重要的作用;*AspAT2* 和 *CPK13* 发生的变异遵循中性进化模型。基因中的多态性位点间的 LD(连锁不平衡)分析显示,处于显著连锁不平衡状态的相邻多态性位点遍布 *NRT2* 和 *CPK13* 基因片段区(图 1),与其为自交作物的特性相一致。

表 4 *NRT2*、*CPK13* 和 *AspAT2* 三个基因的核苷酸序列多样性

Table 4 The nucleotide polymorphism results of <i>NRT2</i> , <i>CPK13</i> and <i>AspAT2</i>					
基因 Gene	单倍型多样性 Hd	序列多样性 Sequence diversity		遗传变异频率检测 Tajima's D	显著水平值 P
		π	θ_w		
<i>NRT2</i>	0.996	0.015 47	0.008 14	2.458 61	<0.05
<i>AspAT2</i>	0.010	0.000 04	0.000 70	-0.955 88	>0.10
<i>CPK13</i>	0.926	0.020 74	0.015 85	0.937 93	>0.10

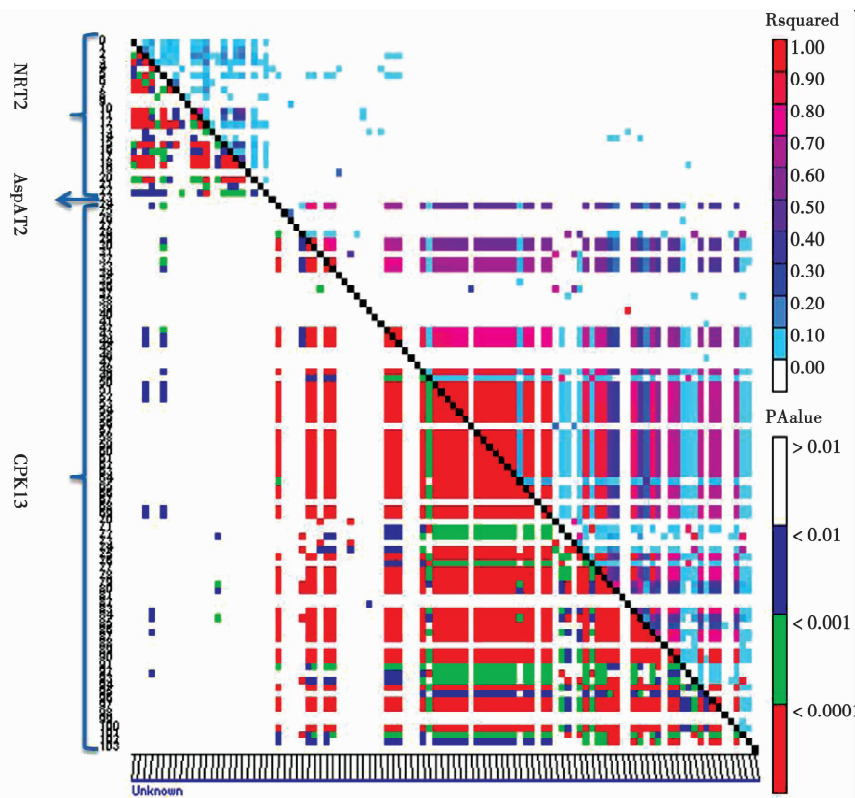


图 1 基因多态性位点间的连锁不平衡 (LD) 分析

Fig. 1 Linkage disequilibrium between pairs of gene polymorphic sites

2.3 不同纬度群体的遗传多样性水平

将 *NRT2*、*AspAT2* 和 *CPK13* 中检测到 104 个核苷酸多态性位点分别看作成 1 个标记位点, 根据 196 份东北野生大豆核心种质在不同位点发生碱基变异的频率, 对东北野生大豆核心种质的多样性水平进行了分析(表 5)。总体上, 平均多态性位点比例为 0.74, Shannon's 指数是 0.366, 多样性指数为 0.241。尽管在 196 份野生大豆核心种质中多态性位点发生的比例较高, 种质间的多样性程度并不高。从按不同纬度分成 8 个群体的平均多样性水平

来看, 高于 48°N 的群体 Pop1 的平均多样性指数最低(0.201), 随着纬度降低, 群体的平均多样性指数逐渐升高, 在 44°N 群体 Pop5 时, 群体的平均多样性指数最高(0.282), 然后, 随着纬度的继续降低, 群体的平均多样性指数缓慢下降, 群体的多样性指数带型模式图(图 2)显示, 不同纬度的群体多样性指数变化近似呈正态曲线。而群体间遗传同一性距离非常高(表 6), 平均遗传同一性距离达到 0.971, 表明群体间变异水平较低。

表 5 不同群体内的遗传多样性参数

Table 5 Genetic diversity parameters of different populations

群体 Population	样本数 Sample size	等位基因数 Na	有效等位基因数 Ne	香农威尔指数 I	Nei 基因多样性指数 h	多样性位点比例 P	备注 Remarks
Pop1	22	1.404	1.302	0.318	0.201	0.70	≥48°N
Pop2	26	1.462	1.313	0.323	0.205	0.73	47°N
Pop3	16	1.346	1.379	0.346	0.229	0.67	46°N
Pop4	28	1.558	1.462	0.402	0.269	0.78	45°N
Pop5	17	1.481	1.513	0.411	0.282	0.74	44°N
Pop6	39	1.596	1.463	0.399	0.268	0.80	43°N
Pop7	32	1.519	1.429	0.382	0.254	0.76	42°N
Pop8	16	1.423	1.346	0.347	0.223	0.71	≤41°N
平均值 Mean	24.500	1.474	1.401	0.366	0.241	0.74	

表 6 群体间 Nei 遗传同一性距离的矩阵

Table 6 Pairwise population matrix of Nei genetic identity

Pop1	Pop2	Pop3	Pop4	Pop5	Pop6	Pop7	Pop8	
1.000								Pop1
0.993	1.000							Pop2
0.984	0.989	1.000						Pop3
0.968	0.976	0.984	1.000					Pop4
0.904	0.919	0.938	0.968	1.000				Pop5
0.968	0.976	0.984	0.996	0.970	1.000			Pop6
0.970	0.977	0.985	0.996	0.961	0.997	1.000		Pop7
0.970	0.968	0.973	0.983	0.923	0.983	0.988	1.000	Pop8

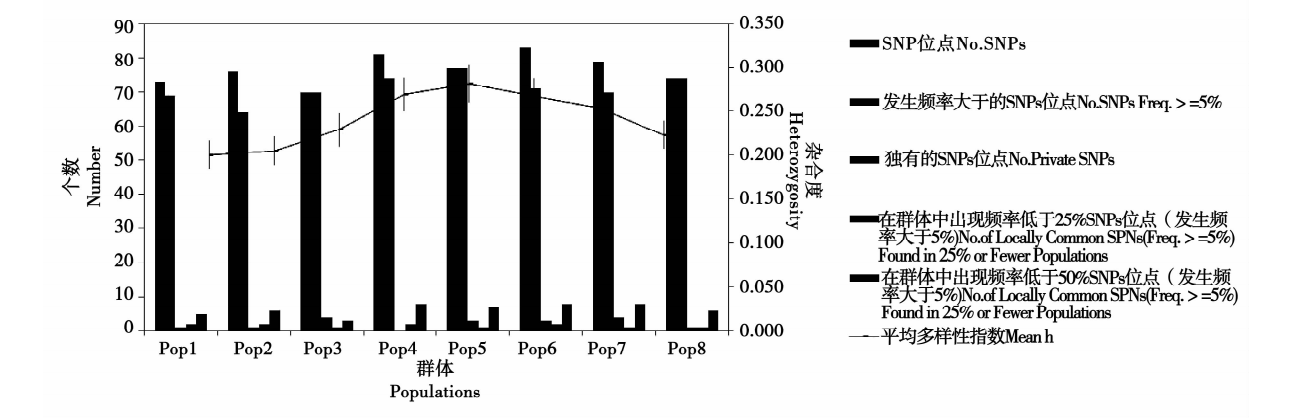


图 2 群体的带型模式图

Fig. 2 Band patterns across populations

从构建的系统发育树来看(图 3),8 个群体共划分成两大类群:Pop1 ($\geq N 48^\circ$)、Pop2 ($N47^\circ$)、Pop3 ($N46^\circ$)、Pop4 ($N45^\circ$)、Pop6 ($N43^\circ$)、Pop7 ($N42^\circ$)和 Pop8 ($N\leq 41^\circ$)为一大类群,Pop5 ($N44^\circ$)为另一大类群。同样我们也能看出 Pop5 的遗传同一性距离要低于其它群体。第一大类又包含 A1 和 A2 两个亚群,其中 A1 亚群由 Pop1 ($\geq N48^\circ$)、Pop2

($N47^\circ$)和 Pop3 ($N46^\circ$)组成,A2 亚群由 Pop4 ($N45^\circ$)、Pop6 ($N43^\circ$)、Pop7 ($N42^\circ$)和 Pop8 ($N\leq 41^\circ$)组成,显示出种群间的遗传多样性水平与材料的纬度来源存在相关性, $N44^\circ$ 为分界点,高于或低于 $N44^\circ$ 地区的野生大豆核心种质均与 $N44^\circ$ 地区的野生大豆核心种质发生明显分化。

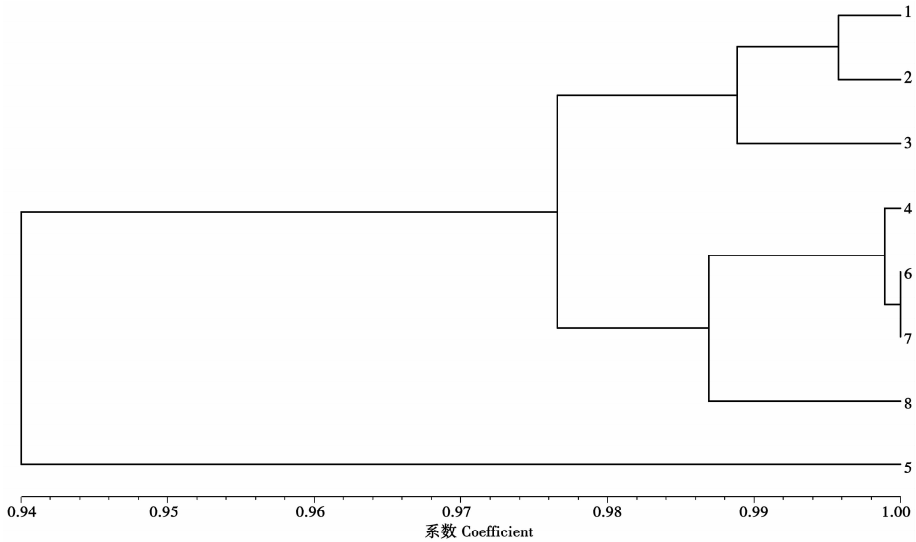


图 3 8 个不同纬度群体的聚类结果

Fig. 3 Clustering of 8 different populations

3 结论与讨论

DNA 水平上的遗传多样性研究不仅是研究群体遗传结构及其变化规律的重要手段,也有助于正确制定资源收集、保护方案,促进物种的起源进化和鉴定分类研究^[12]。采用 DNA 分子标记技术,通过多角度研究野生大豆的遗传多样性一直受到广大学者的广泛专注^[13-15]。本文采用 SNP 作为遗传标记,从 DNA 序列多样性水平研究东北野生大豆核种质的遗传多样性水平,主要基于该标记具有位点丰富、具较高的遗传稳定性和代表性以及易于实现分析的自动化等优点。*NRT2*、*AspAT2* 和 *CPK13* 三个基因片段中共检测到 104 个核酸多态性位点(94 个 SNPs,10 个 Indel),平均多态性位点比例为 0.74。核心种质间的平均多样性为 0.241,低于李杨^[16]对 21 个省份来源的野生大豆单倍型平均多样性计算结果(0.45),与玉米种质中为 0.236^[17] 非常接近。从不同纬度种群的遗传同一性距离来看,平均为 0.971,种群间的变异要低于种群内的遗传变异。综合群体的多样性指数带型模式图和根据群体间遗传同一性距离构建的系统发育树所反映的信息,更倾向推测 42°N~45°N 区域为东北野生大豆的多样性中心,并向四周辐射。

参考文献

[1] 中国农业科学院作物品种资源研究所. 中国野生大豆资源目录[M]. 北京:农业出版社,1990. (Institute of Crop Germplasm Resources in Chinese Academy of Agricultural Sciences. Catalog of wild soybean germplasm in China[M]. Beijing: Agricultural Press, 1990.)

[2] 中国农业科学院作物品种资源研究所. 中国野生大豆资源目录(续编)[M]. 北京:中国农业出版社,1996. (Institute of Crop Germplasm Resources in Chinese Academy of Agricultural Sciences. Catalog of wild soybean germplasm in China (continuation) [M]. Beijing: Chinese Agricultural Press, 1990.)

[3] 徐豹,徐航,庄炳昌,等. 中国野生大豆(*G. soja*)籽粒性状的遗传多样性及其地理分布[J]. 作物学报,1995,21(6):733-739. (Xu B, Xu H, Zhuang B C, et al. Polymorphism and geographical distribution of seed characters of wild soybean (*G. soja*) in China [J]. Acta Agronomica Sinica, 1995, 21(6): 733-739.)

[4] 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.)

[5] 许东河,高忠,田清震. 中国一年生野生大豆群体的遗传多样性研究[J]. 应用与环境生物学报,1999,5(5):439-443. (Xu D H, Gao Z, Tian Q Z. Genetic diversity of the annual wild soybean

(*Glycine Soja*) in China [J]. Chinese Journal of Applied Environmental Biology, 1999, 5(5): 439-443.)

[6] 刘亚男,李向华,王克晶. 国家基因库野生大豆微核心样本遗传变异性的 SSR 标记分析[J]. 植物遗传资源学报,2009,10(2):211-217. (Liu Y N, Li X H, Wang K J. Analysis of the genetic variability for the mini-core collection of Chinese wild soybean (*Glycine soja*) collection in the national gene bank based on SSR markers [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2009, 10(2): 211-217.)

[7] Marshall E. Snipping away at genome patenting [J]. Science, 1997, 277: 1752-1753.

[8] 邹喻苹,葛颂. 新一代分子标记-SNPs 及其应用[J]. 生物多样性,2003,11(5):370-382. (Zou Y P, Ge S. A novel molecular marker-SNPs and its application [J]. Biodiversity Science, 2003, 11(5): 370-382.)

[9] Venter J C, Adams M D, Myers E W, et al. The sequence of the human genome [J]. Science, 2001, 291: 1304-1351.

[10] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The Clustal X windows interface: Flexible strategies of multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997 (25): 4876-4882.

[11] Rozas J, Sanchez-DelBarrio J C, Messeguer X. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods [J]. Bioinformatics, 2003, 19: 2496-2497.

[12] 张传福,景蕊莲,张改生,等. 单核苷酸多态性在植物研究中的应用[J]. 植物遗传资源学报,2004,5(3):304-308. (Zhang C F, Jing R L, Zhang G S, et al. Application of single nucleotide polymorphism in plant research [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2004, 5(3): 304-308.)

[13] 丁艳来,赵团结,盖钧镒. 中国野生大豆的遗传多样性和生态特异性分析[J]. 生物多样性,2008,16(2):133-142. (Ding Y L, Zhao T J, Gai J Y. Genetic diversity and ecological differentiation of Chinese annual wild soybean (*Glycine soja*) [J]. Biodiversity Science, 2008, 16(2): 133-142.)

[14] 严茂粉,李向华,王克晶. 北京地区野生大豆种群 SSR 标记的遗传多样性评价[J]. 植物生态学报,2008,32(4):938-950. (Yan M F, Li X H, Wang K J. Evaluation of genetic diversity by SSR markers for natural populations of wild soybean (*Glycine soja*) growing in the region of Beijing, China [J]. Journal of Plant Ecology, 2008, 32(4): 938-950.)

[15] 关荣霞,刘秀敏,常汝镇,等. 辽宁省新宾县野生大豆遗传多样性分析[J]. 高技术通讯,2006,16:67-72. (Guan R X, Liu X M, Chang R Z, et al. Genetic diversity analysis of wild soybean (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) from in-situ conserved population in Xinbin county of Liaoning province [J]. Chinese High Technology Letters, 2006, 16: 67-72.)

[16] 李杨. 驯化和育种对大豆单核苷酸多样性的影响[D]. 南昌:南昌大学,2012. (Li Y. Impacts of domestication and breeding on single nucleotide polymorphisms in soybean [D]. Nanchang: Nanchang University, 2012.)

[17] Taramino G, Tingey S. Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize [J]. Genome, 1996, 39: 277-287.