



基于 MSAP 技术的中国野生大豆群体遗传多样性分析

燕雪飞¹, 郭伟¹, 曹莹¹, 王玉民², 袁翠平², 赵洪锟², 董英山², 刘晓冬^{2,3}

(1. 沈阳农业大学 农学院, 辽宁 沈阳 110866; 2. 吉林省农业科学院 大豆研究所, 吉林 长春 130033; 3. 吉林农业大学 农学院, 吉林 长春 130118)

摘要:为探究中国不同纬度的野生大豆天然种群的遗传多样性及其遗传结构,本研究利用 MSAP 技术分析研究 27° ~ 46°N 的 7 个野生大豆种群的 DNA 甲基化多态性。结果表明:(1)223 份材料、8 对 MSAP 引物共扩增到 1 617 个位点,对所有位点的甲基化模式分析表明,Ⅳ型甲基化模式(位点缺失或者全甲基化)占比最多,为 53.55%,Ⅱ型(半甲基化)和Ⅲ型(内侧甲基化)甲基化模式占比较少,分别为 11.75% 和 13.25%。(2)基于非甲基化位点的 *Shannon* 指数在巴彦种群最低($I=0.2796$),在安化种群最高($I=0.3130$),遗传多样性呈现随纬度降低而逐渐升高的渐变趋势;而基于甲基化敏感位点的 *Shannon* 指数在巴彦种群最低($I=0.5851$),在桐柏种群中最高($I=0.6030$),其表观遗传多样性随纬度渐变呈现不规则波动。(3)基于非甲基化位点和甲基化敏感位点的遗传结构分析显示,在遗传上,同属于一个种群的材料能够聚类到一组,不同种群间出现了明显的遗传分化,而在表观遗传上,除了巴彦、衡山、安化的材料能各自聚类到一组以外,其余 4 个种群的材料交织在一起。(4)基于甲基化敏感位点的表观遗传距离和基于非甲基化位点的遗传距离相关性分析显示,二者在 6 个种群相关性显著,说明表观变异在多数情况下依赖于遗传变异,但也会在某些情况表现出一定的独立性。

关键词:野生大豆;遗传多样性;纬度;MSAP;甲基化

Genetic Diversity Analysis of the Wild Soybean (*Glycine soja*) Populations in China by MSAP Method

YAN Xue-fei¹, GUO Wei¹, CAO Ying¹, WANG Yu-min², YUAN Cui-ping², ZHAO Hong-kun², DONG YING-shan², LIU Xiao-dong^{2,3}

(1. College of Agronomy, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 2. Soybean Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Science, Changchun 130033, China; 3. College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: Seven wild soybean populations between latitude 27° and 46°N in China were the targets for analysis of genetic diversity. Methylation-sensitive amplification polymorphisms (MSAP) was applied to evaluate the DNA methylation patterns and genetic structure. The main results were as follows: A total of 1 617 loci were detected with a set of eight primer pairs in 223 materials. Pattern Ⅳ of DNA methylation had the highest percentage and occupied 56.6% of the total loci, while Pattern Ⅱ and Ⅲ had lower percentages (11.75%, 13.25%). *Shannon* index based on unmethylated loci had the lowest value in the population of Bayan ($I=0.2796$), and with the increasing latitude, the genetic diversity rose gradually, which reached the highest value($I=0.3130$) in the population of Anhua. The population Bayan also had the lowest *Shannon* index value ($I=0.5851$) based on methylation-susceptible loci, however, the population of Tongbai had the highest ($I=0.6030$), which suggested no trend in epigenetic diversity with increasing latitude. The structure analysis showed that most of the materials were assigned to respective cluster based on unmethylated loci, which meant genetic differentiation existing in the populations. However, samples from population of Longjing, Wuqing, Yanggu and Tongbai tended to be clustered together based on methylation-susceptible loci. In the Mantel tests, correlations of the genetic distances with the epigenetic distances were high and statistically significant in the six populations, which suggested that epigenetic variation was to some degree dependent of variation in the DNA sequence.

Keywords: Wild soybean; Genetic diversity; Latitude; MSAP; Methylation

遗传多样性对于物种的适应性和长期进化十分重要,研究不同环境下对人类社会有经济价值物种的种群遗传变异特征有助于阐明物种的遗传结构及其迁移进化历史,是进化生物学的重要研究课

收稿日期:2019-09-24

基金项目:辽宁省高等学校基本科研项目(LSNQN201711);吉林省农业科技创新工程自由创新项目(CXGC2018ZY0010)。

第一作者简介:燕雪飞(1979-),女,博士,讲师,主要从事野生大豆遗传多样性研究。E-mail:syau_yanxuefei@163.com。

通讯作者:刘晓冬(1979-),男,硕士,副研究员,主要研究方向为遗传资源保护与利用研究。E-mail:liuxd214@foxmail.com。

题^[1]。野生大豆 (*Glycine soja*) 是栽培大豆 (*Glycine max*) 的近缘野生种^[2-3],其天然的基因库为开展生物技术与发展可持续农业提供了丰富的材料基础。野生大豆地理分布仅限于东亚中北部地区,包括中国、朝鲜半岛、日本、俄罗斯远东地区^[4]。中国的野生大豆地理分布非常广泛,除海南、青海和新疆三省(自治区)外,其余各省区均有野生大豆分布^[5]。其广泛的分布性为研究不同环境下种群的遗传特征提供了材料。早在 19 世纪 70 年代,中国在开展全国性的野生大豆资源考察的基础上,开始研究野生大豆的遗传变异及其遗传结构,并逐渐阐明了表型水平,等位酶水平,以及 DNA 水平的遗传结构与地理环境的关系。Dong 等^[6]利用资源库中 6 172 份野生大豆材料对其 12 个农艺性状的遗传多样性、综合变异系数和地理分布进行了较全面地统计分析,从而提出了野生大豆的 3 个表型遗传变异中心,丰富了野生大豆的适应进化理论。丁艳来等^[7]对 196 份不同地理区域的野生大豆样本进行 SSR 分子标记,同时对其表型性状进行了多样性分析,结果表明野生大豆的表型变异和遗传变异都很丰富,并通过一致性对比阐明了中国野生大豆地理群体间表型性状分化有其遗传分化基础。近几年高通量 DNA 测序技术带来的前所未有的 DNA 测序能力,也使得遗传多样性的研究有了革命性的进展,Zhou 等^[8]通过对 302 份栽培大豆和野生大豆进行重测序和全基因组关联分析,得出某些大豆的性状以及基因位点与地理区域相关联的结论,再次印证了大豆种群具有一定的地理遗传结构。野生大豆不同地理种群的遗传多样性研究已经被广泛研究并取得显著进展^[9-12],而对于表观遗传变异在野生大豆群体研究中很少涉及,对不同地理种群的表观遗传多样性及表观遗传结构的研究鲜有报道。

近几年迅速发展的表观遗传学揭示出自然变异不仅可以存在于 DNA 序列,同时也存在于表观水平^[13]。表观遗传变异的研究主要从 DNA 甲基化和组蛋白的甲基化、乙酰化、磷酸化等共价修饰以及非编码 RNA 的调控等方面开展^[14]。目前,对表观变异了解最多的形式就是 DNA 甲基化模式,而 DNA 甲基化模式研究最有效并且经济的应用技术就是甲基化敏感扩增多态性 (methylation-sensitive amplification polymorphisms, MSAP) 技术^[15-16]。早在 1997 年,Reyna-Lopez 等^[17]就应用 MSAP 技术研究真菌的 DNA 甲基化模式,自此以后,一大批以 MSAP 为基础的 DNA 甲基化模式的研究广泛的应用于模式植物以及许多栽培物种^[18-20]。研究证实这些物种在种内和种间都存在着较高的 DNA 甲基

化多态性,而随后的研究则表明这种表观遗传变异在适应环境中具有重要角色^[21-22],首先,环境因素(例如生物和非生物胁迫)可诱导植物基因组发生 DNA 甲基化变异,从而调整表型多样性、实现对环境变化的响应^[16,23],另一方面,表观遗传变异可以通过促进遗传变异的产生来增加植物表型上的多样性并增强植物对环境的适应性^[24-25]。随着表观过程在生态适应过程中的作用理解越来越深入,一些学者提出把表观遗传作为进化理论中一个独特的研究方向^[26]。本研究选择分布在 27°~46°N 的 7 个野生大豆天然种群,利用 MSAP 技术研究其 DNA 甲基化多态性,揭示不同纬度野生大豆种群的表观遗传多样性及其遗传结构,以期补充和完善野生大豆迁移分化、适应进化理论。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为 7 个野生大豆自然保护区内的天然种群(表 1),河南桐柏种群材料少,收集量不足 30,其它每个种群收集 30 株以上的野生大豆种子,这 7 个天然种群以 3~4 个纬度等差取样,纬度跨度基本覆盖了中国野生大豆自然分布区。

表 1 7 个野生大豆种群材料来源信息
Table 1 Accession data of 7 wild soybean populations

调查地点 Investigation site	省(市) Province (City)	经纬度 Latitude longitude	株数 Plant number	面积 Area /hm ²
巴彦 Bayan	黑龙江	46°N, 127°E	31	45.0
龙井 Longjing	吉林	42°N, 129°E	33	70.0
武清 Wuqing	天津	39°N, 117°E	34	380.0
阳谷 Yanggu	山东	36°N, 115°E	33	3.0
桐柏 Tongbai	河南	32°N, 113°E	28	60.0
安化 Anhua	湖南	28°N, 111°E	32	19.5
衡山 Hengshan	湖南	27°N, 112°E	32	60.0

1.2 方法

将采集到的种子以单粒种子为单位(从采集的单株种子中随机选取 1 粒种子),于 25℃ 温室内培养发芽,待单株长出幼嫩叶片,每株采集 3~5 个叶片,用于全基因组 DNA 提取。采用改进的 CTAB 法^[27]提取野生大豆总 DNA。

根据 MSAP 技术的工作原理,利用甲基化敏感程度不同的两种酶组合 (*EcoR* I/*Msp* I、*EcoR* I/*Hpa* II) 分别检测野生大豆基因组中甲基化位点 5'-CCGG-3' 的变异,*Hpa* II 能切割只有 1 条链上外侧胞嘧啶未被甲基化的序列,即半甲基化的序列;而 *Msp* I 能切割仅内侧胞嘧啶完全甲基化或半甲基化

的序列。因此,酶切结果将获得每个种群所有个体在所有位点的二元条带信息,有带的地方替换为1,无带的地方替换为0,得到MSAP二维矩阵。统计每一个单株4种甲基化模式,I型(HPA+/MSP+):*Hpa* II和*Msp* I都能切开(1,1),非甲基化;II型(HPA+/MSP-):*Hpa* II能切开,*Msp* I切不开(1,0),半甲基化;III型(HPA-/MSP+):*Hpa* II切不开,*Msp* I能切开(0,1),内侧甲基化;IV型(HPA-/MSP-):*Hpa* II和*Msp* I都切不开(0,0),全甲基化或位点缺失。这样既可以分析各种甲基化模式在单株中的变化,又可以分析甲基化模式在种群间、种群内的变异。

MSAP的反应体系包括以下步骤:限制性酶切及连接反应、预扩增、选择性扩增和ABI377测序仪电泳检测^[28-29]。8对选择性引物及其序列见表2。

表2 MSAP 选择性引物组合及其序列
Table 2 Selecting amplified primers used in MSAP

引物名称 Primer name	<i>Eco</i> R I	<i>Hap</i> II/ <i>Msp</i> I
d1	GACTGCGTACCAATTCACT	ATCATGAGTCCTGCTCGGTGCG
e2	GACTGCGTACCAATTCACA	ATCATGAGTCCTGCTCGGTTA
d2	GACTGCGTACCAATTCACT	ATCATGAGTCCTGCTCGGTTA
e3	GACTGCGTACCAATTCACC	ATCATGAGTCCTGCTCGGTGA
g3	GACTGCGTACCAATTCAGC	ATCATGAGTCCTGCTCGGTGA
e4	GACTGCGTACCAATTCACC	ATCATGAGTCCTGCTCGGTGT
f7	GACTGCGTACCAATTCACG	ATCATGAGTCCTGCTCGGTCT
g7	GACTGCGTACCAATTCAGC	ATCATGAGTCCTGCTCGGTCT

1.3 数据分析

根据Cervera等^[19]提出的方法,把MSAP二维矩阵数据分为甲基化敏感位点(Methylation-susceptible loci,MSL)和非甲基化位点(No methylated loci,NML)两大类。MSL指只能够被*Hpa* II或*Msp* I 1种酶切开,为(1,0)或(0,1)情况,即甲基化模式(II、III型),记为1,其余模式(I、IV型),记为0。NML指同时能被*Hpa* II和*Msp* I酶切开,记为(1,1),即甲基化模式I型记为1,其余模式(II、III、IV型)都记为0。

采用R软件MSAP程序包分析各群体的位点多态性。对甲基化敏感位点和非甲基化位点以及各自的多态性位点进行统计和Shannon多样性指数分析;用AMOVA方法分析各天然群体的甲基化敏感位点变异和非甲基化位点变异;对各天然群体进行遗传结构的聚类分析;基于甲基化敏感位点的表观遗传距离和基于非甲基化位点的遗传距离进行

Mantel 检验。

2 结果与分析

2.1 野生大豆群体甲基化模式

采用8对MSAP引物对223份材料共扩增到1617个位点,7个保护区所有位点的甲基化模式如表3所示,IV型的甲基化模式占比最大,在7个种群中平均占53.55%,其次是I型模式,7个种群中平均占21.46%,II和III型模式所占比例较少,分别平均为11.75%和13.25%。7个种群甲基化模式有一定差异:I型在巴彦种群所占比例最高,在桐柏种群最低;II型在衡山种群所占比例较高,在桐柏所占比例最少;III型在衡山种群所占比例最高,在桐柏种群最少;IV型则在桐柏种群有最高比例,在巴彦种群最少。

表3 7个野生大豆种群甲基化模式
Table 3 Methylation mode in 7 wild soybean populations(%)

种群 Population	甲基化模式 Methylation mode			
	I	II	III	IV
巴彦 Bayan	23.83	12.37	14.00	49.81
龙井 Longjing	22.11	12.40	14.21	51.28
武清 Wuqing	20.56	11.73	13.16	54.55
阳谷 Yanggu	22.31	11.81	12.69	53.19
桐柏 Tongbai	17.75	8.80	10.83	62.62
安化 Anhua	22.72	11.79	12.88	52.62
衡山 Hengshan	20.95	13.32	14.97	50.75

2.2 野生大豆群体 MSAP 多态性及遗传多样性

对甲基化敏感位点和非甲基化位点,以及各自的多态性位点的统计结果表明:甲基化敏感位点数目在衡山种群最多,为906个,而甲基化敏感位点多态性比例在龙井和安化种群最高,均为65%。对于非甲基化位点数则在桐柏种群中最高,为886个,非甲基化位点多态性所占比例在龙井种群最高,为33%(表4)。

由于MSAP检测到的非甲基化位点主要由序列变异引起,可以利用这些序列变异评估遗传多样性,而基于甲基化敏感位点的变异则可以评估表观遗传多样性。对于基于非甲基化位点的Shannon指数,安化种群最高,为0.3130,巴彦种群最低,为0.2796,其遗传多样性有随纬度降低逐渐升高的趋势;对于基于甲基化敏感位点的Shannon指数,桐柏种群中最高,为0.6030,巴彦种群最低,为0.5851,其表观遗传多样性随纬度的渐变呈现不规则波动(表4)。

表 4 7 个野生大豆种群 MSAP 多态性及遗传多样性

Table 4 Methylation polymorphism and genetic diversity in 7 wild soybean populations

种群 Population	MSL				NML			
	数量 Number	多态性位点数	多态性位点占比	Shannon 指数 Shannon index	数量 Number	多态性位点数	多态性位点占比	Shannon 指数 Shannon index
		Number of	Proportion of			Number of	Proportion of	
		polymorphic loci	polymorphic loci/%			polymorphic loci	polymorphic loci/%	
巴彦 Bayan	894	555	62	0.5851 ± 0.1080	723	151	21	0.2796 ± 0.1038
龙井 Longjing	835	541	65	0.5937 ± 0.0988	782	257	33	0.2944 ± 0.0870
武清 Wuqing	863	552	64	0.5995 ± 0.0970	754	227	30	0.2997 ± 0.0946
阳谷 Yanggu	798	529	66	0.5919 ± 0.0966	819	261	32	0.2926 ± 0.0888
桐柏 Tongbai	731	439	60	0.6030 ± 0.0917	886	168	19	0.3007 ± 0.0913
安化 Anhua	798	516	65	0.5873 ± 0.0986	819	206	25	0.3130 ± 0.1089
衡山 Hengshan	906	552	61	0.5873 ± 0.0995	711	221	31	0.3035 ± 0.0904

多态性位点占比(%) = 多态性位点数/位点数量 × 100。
Proportion of polymorphic loci(%) = Number of polymorphic loci/ Number of loci × 100.

2.3 野生大豆群体 AMOVA 分析

对 7 个天然群体的非甲基化位点变异和甲基化敏感位点变异的分析表明:总遗传变异(非甲基化位点)中,只有 3.33% 的变异来源于种群间,而 96.67% 的变异来源于种群内;总表观遗传变异(甲基化敏感位点)中,也仅有 4.88% 的变异来源于种群间,95.12% 的变异来源于种群内(表 5)。

2.4 不同纬度种群的野生大豆遗传结构分析

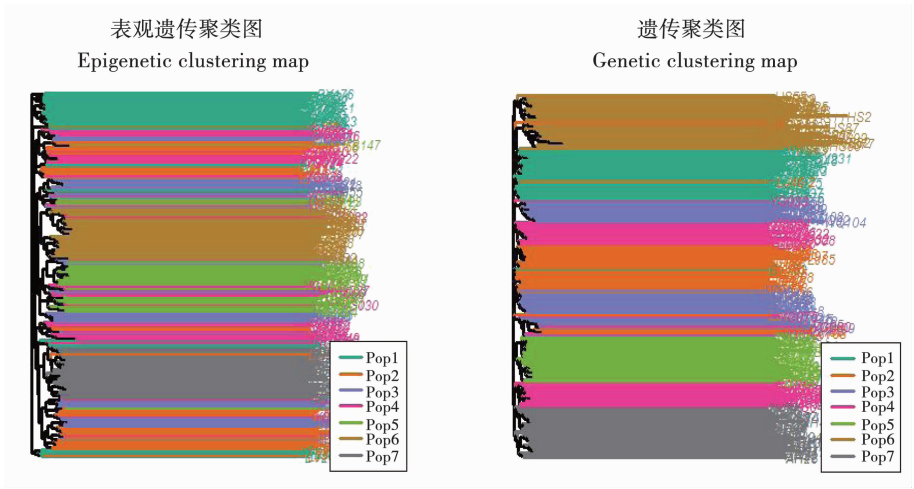
对 7 个保护区材料进行聚类分析表明:在遗传上,同属于同一保护区的材料大致能够聚类到 1 组,而在表观遗传上,除了巴彦、衡山、安化的材料能相对的各自聚类到 1 组以外,其余 4 个保护区的材料

相互交织在一起(图 1)。

表 5 7 个野生大豆种群分子方差分析(AMOVA)

Table 5 Analysis of molecular variance (AMOVA) of 223 individuals from 7 wild soybean populations

项目 Item	变异来源 Source of variation	df	SS	VC	PV/%
MSL	种群间	6	0.406	0.0011	4.88
	种群内	216	6.972	0.0323	95.12
NML	种群间	6	3.985	0.0129	3.33
	种群内	216	54.480	0.2522	96.67



Pop1:巴彦; Pop2:龙井; Pop3:武清; Pop4:阳谷; Pop5:桐柏; Pop6:安化; Pop7:衡山。
Pop1:Bayan; Pop2:Longjing; Pop3:Wuqing; Pop4:Yanggu; Pop5:Tongbai; Pop6:Anhua; Pop7:Hengshan.

图 1 基于甲基化位点和非甲基化敏感位点的 7 个野生大豆种群遗传结构图

Fig. 1 Structure of 7 wild soybean populations based on MSL and NML

2.5 表观遗传距离与遗传距离的 Mantal 检验

基于甲基化敏感位点的表观遗传距离和基于非甲基化位点的遗传距离的 Mantel 检验结果表明:相关系数 r 值为 0.098 ~ 0.480, 平均为 0.316, 除了桐柏种群, 其它种群的表观遗传距离与遗传距离的相关性都达到显著水平 ($P < 0.01$), 说明基于甲基化敏感位点计算的表观遗传变异一定程度的依赖于遗传变异(表6)。

表6 7个野生大豆种群遗传距离与表观遗传距离的 Mantel 检测

Table 6 Mantel test between epigenetic distance and genetic distance based on MSAP data in 7 wild soybean populations

种群 Population	r	P
巴彦 Bayan	0.333	<0.01 *
龙井 Longjing	0.305	<0.01 *
武清 Wuqing	0.480	<0.01 *
阳谷 Yanggu	0.246	<0.01 *
桐柏 Tongbai	0.098	0.178
安化 Anhua	0.407	<0.01 *
衡山 Hengshan	0.346	<0.01 *

* 表示显著相关($P < 0.01$)。
* indicates statistically significant correlations($P < 0.01$).

3 讨论

3.1 甲基化模式变化

供试7个种群的223份材料使用MSAP技术检测到1617个位点, IV型甲基化模式(位点缺失或者全甲基化)占大多数(53.55%), 而甲基化模式II型(半甲基化)和III型(内侧甲基化)模式所占比例较少(11.75%, 13.25%)。由于MSAP技术的限制, 无法确定占多数的甲基化模式到底是位点缺失还是全甲基化, 但可以肯定的是, 半甲基化、内侧全甲基化以及内侧半甲基化是在所有材料的所有位点中出现频率最低的甲基化模式, 由此推断它们可能属于野生大豆甲基化模式的少数突变。

3.2 基于 MSAP 的野生大豆遗传多样性及遗传结构

MSAP检测到的非甲基化位点变异主要由序列变异引起, 因此, 可以利用这些序列变异评估遗传多样性。本研究结果显示基于非甲基化位点的 Shannon 多样性指数, 随着种群所处纬度的逐渐降低, 呈现升高趋势, 遗传多样性是物种长期适应环境进化的结果, 由此推测, 野生大豆种群的非甲基化位点变异随环境呈现的渐变特征, 可能是对某种环境因子长期适应的结果。而基于甲基化敏感位点的 Shannon 指数, 即能够表征表观遗传多样性的参数, 随纬度的渐变呈现不规则波动。一般认为甲

基化变异易受环境的诱导^[21,30-31], 本研究的结果正好与这一论点相符, 可以推测由于环境的诱导而产生的甲基化变异具有一定偶然性和波动性, 因此, 并没有表现出随纬度的变化规律。另外, 基于甲基化敏感位点计算得到的表观遗传多样性都大于基于非甲基化位点变异得到的遗传多样性, 在7个种群中, 表观遗传多样性指数是遗传多样性指数的1.88 ~ 2.09倍, 表明表观变异出现频率高于传统遗传变异, 也再次印证了表观变异易受环境影响的结论。

同时, 基于非甲基化位点和甲基化敏感位点的遗传结构分析也显示, 在遗传上, 同属于一个保护区的材料能够聚类到1组, 不同种群间出现了明显的遗传分化。而在表观遗传上, 除了3个保护区材料能相对的各自聚类到1组以外, 其余4个保护区的材料相互交织在一起。再次说明了甲基化变异包括对于环境的诱导而产生的短期效应, 并不能在表观遗传上形成明显的地理分化。

基于甲基化敏感位点的表观遗传距离和基于非甲基化位点的遗传距离相关性分析显示, 二者在6个种群中相关性显著。一般认为, 表观变异可能直接受环境诱导而促进表型变异从而快速的适应环境^[15-16], 体现一定的独立性, 同时, 表观遗传变异可促进遗传变异的产生, 有助于植物形成长期对环境的适应性及表型上的多样性^[24], 体现其与遗传变异的相关性。本研究中大多数种群中遗传变异和表观遗传变异都具有显著相关性, 只在1个种群中二者相关不显著, 说明表观变异在多数情况下依赖于遗传变异, 但也会在某些情况表现出一定的独立性。

4 结论

本研究利用8对MSAP引物对223份野生大豆材料的遗传多样性及表观遗传多样性进行分析, 阐明了出现频率较低的甲基化模式, 证明遗传多样性及表观遗传多样性随纬度渐变的变化规律。探究不同纬度野生大豆群体的遗传结构和表观遗传结构, 说明遗传距离与表观遗传距离的关系。研究结果揭示不同纬度野生大豆群体遗传分化的基础, 为补充和完善野生大豆迁移分化、适应进化理论提供依据。

参考文献

[1] Leamy L J, Lee C R, Song Q, et al. Environmental versus geographical effects on genomic variation in wild soybean (*Glycine soja*) across its native range in northeast Asia[J]. Ecology and Evolution, 2016, 6(17): 6332-6344.
[2] Wee C D, Hashiguchi M, Ishigaki G, et al. Evaluation of seed

- components of wild soybean (*Glycine soja*) collected in Japan using near-infrared reflectance spectroscopy [J]. *Plant Genetic Resources*, 2018, 16(2): 94-102.
- [3] La T, Large E, Taliencio E, et al. Characterization of select wild soybean accessions in the USDA germplasm collection for seed composition and agronomic traits [J]. *Crop Science*, 2019, 59(1): 233-251.
- [4] Kofsky J, Zhang H, Song B H. The untapped genetic reservoir; The past, current, and future applications of the wild soybean (*Glycine soja*) [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9:949.
- [5] 李福山,常汝镇,舒世珍. 中国的大豆属 (*Glycine* L.) 植物 [J]. *大豆科学*, 1983, 2(2): 109-115. (Li F S, Chang R Z, Shu S Z. The plants of the *Genus Glycine* in China [J]. *Soybean Science*, 1983, 2(2): 109-115.)
- [6] Dong Y S, Zhuang B C, Zhao L M, et al. The genetic diversity of annual wild soybeans grown in China [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 103(1): 98-103.
- [7] 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.)
- [8] Zhou Z, Jiang Y, Wang Z, et al. Resequencing 302 wild and cultivated accessions identifies genes related to domestication and improvement in soybean [J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(4): 408-414.
- [9] Wen Z, Ding Y, Zhao T, et al. Genetic diversity and peculiarity of annual wild soybean (*G. soja* Sieb. et Zucc.) from various eco-regions in China [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2009, 117: 371-381.
- [10] Li Y H, Li W, Zhang C, et al. Genetic diversity in domesticated soybean (*Glycine max*) and its wild progenitor (*Glycine soja*) for simple sequence repeat and single-nucleotide polymorphism loci [J]. *New Phytologist*, 2010, 188(1): 242-253.
- [11] Wang K J, Li X H. Genetic characterization and gene flow in different geographical-distance neighbouring natural populations of wild soybean (*Glycine soja* Sieb. and Zucc.) and implications for protection from GM soybeans [J]. *Euphytica*, 2012, 186(3): 817-830.
- [12] 张海平, 陈妍, 王志, 等. 基于 SSR 标记的山西野生大豆种质资源遗传多样性分析 [J]. *大豆科学*, 2019, 38(2): 189-197. (Zhang H P, Chen Y, Wang Z, et al. Genetic diversity analysis of wild soybean (*Glycine soja*) in Shanxi province based on SSR analysis [J]. *Soybean Science*, 2019, 38(2): 189-197.)
- [13] Vaughn M W, Tanurdzic M, Lippman Z, et al. Epigenetic natural variation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *PLoS Biology*, 2007, 5: 1617-1629.
- [14] Wolffe A P, Matzke M A. Epigenetics: Regulation through repression [J]. *Science*, 1999, 286(5439): 481-486.
- [15] Angers B, Castonguay E, Massicotte R. Environmentally induced phenotypes and DNA methylation: How to deal with unpredictable conditions until the next generation and after [J]. *Molecular Ecology*, 2010, 19(7): 1283-1295.
- [16] Guarino F, Ciatelli A, Brundu G, et al. The use of MSAP reveals epigenetic diversity of the invasive clonal populations of *Arundodonax* L. [J]. *PLoS One*, 2019, 14(4): e0215096.
- [17] Reyna-Lopez G E, Simpson J, Ruiz-Herrera J. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms [J]. *Molecular and General Genetics*, 1997, 253(6): 703-710.
- [18] Ashikawa I. Surveying CpG methylation at 5'-CCGG in the genomes of rice cultivars [J]. *Plant Molecular Biology*, 2001, 45(1): 31-39.
- [19] Cervera M T, Ruiz G L, Martinez Z J. Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2002, 268(4): 543-552.
- [20] Salmon A, Clotault J, Jenczewski E, et al. *Brassica oleracea* displays a high level of DNA methylation polymorphism [J]. *Plant Science*, 2008, 174(1): 61-70.
- [21] Richards C L, Bossdorf O, Verhoeven K J. Understanding natural epigenetic variation [J]. *New Phytologist*, 2010, 187(3): 562-564.
- [22] Richards C L, Schrey A W, Pigliucci M. Invasion of diverse habitats by few Japanese knotweed genotypes is correlated with epigenetic differentiation [J]. *Ecology Letters*, 2012, 15(9): 1016-1025.
- [23] Lele L, Ning D, Cuiping P, et al. Genetic and epigenetic variations associated with adaptation to heterogeneous habitat conditions in a deciduous shrub [J]. *Ecology and Evolution*, 2018, 8(5): 2594-2606.
- [24] Lewis N L, Zhan S. The plant genome's methylation status and response to stress: Implications for plant improvement [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007, 10: 317-322.
- [25] Thiebaut F, Hemery A S, Ferreira P C G. A role for epigenetic regulation in the adaptation and stress responses of non-model plants [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 246.
- [26] Diez C M, Roessler K, Gaut B S. Epigenetics and plant genome evolution [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2014, 18: 1-8.
- [27] 宫磊. 利用 AFLP 分析不同羊草种群间和种群内的遗传多样性 [D]. 长春: 东北师范大学, 2008: 7-12. (Gong L. Analysis of the genetic diversity within and between the *Leymus chinensis* Tzvel. population revealed by AFLP marker [D]. Changchun: Northeast Normal University, 2008: 7-12.)
- [28] Zhong X, Wang Y, Liu X, et al. DNA methylation polymorphism in annual wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.) and cultivated soybean (*G. max* L. Merr.) [J]. *Canadian Journal of Plant Science*, 2009, 89(5): 851-863.
- [29] 燕雪飞. 中国野生大豆遗传多样性及其分化研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2014: 72-74. (Yan X F. Genetic diversity and differentiation of the wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.) in China [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2014: 72-74.)
- [30] 郭万里. 中国松嫩平原短芒野大麦天然种群分子遗传与表观遗传多样性及其种群遗传结构的研究 [D]. 长春: 东北师范大学, 2006: 23-26. (Guo W L. Molecular genetic and epigenetic diversity and genetic structure of wild barley (*Hordeum brevisubulatum*) natural population endemic to Songnen Plain, China [D]. Changchun: Northeast Normal University, 2006: 23-26.)
- [31] Schmid M W, Heichinger C, Schmid D C, et al. Contribution of epigenetic variation to adaptation in *Arabidopsis* [J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 4446.