

广东 5 个野生大豆居群的遗传多样性分析

赵青松^{1,2}, 陈振伦¹, 赵云云¹, 张 杰¹, 马启彬¹, 年 海¹, 杨存义^{1*}

(1 亚热带农业生物资源保护和利用国家重点实验室, 国家大豆改良中心广东分中心, 华南农业大学 农学院, 广州 510642; 2 河北省农林科学院粮油作物研究所, 石家庄 050031)

摘 要: 采用 SSR 分子标记对来自广东省 5 个县野生大豆居群的遗传多样性进行了分析, 为广东野生大豆资源保护和利用提供依据。结果显示: (1) 5 个野生大豆居群在 60 个 SSR 位点共检测出 263 个等位变异, 同一位点上等位基因数目最多为 10 个, 最少为 2 个, 平均为 4.38 个; 不同群体中特有等位基因数不同, 其中连州(LZ)和南雄(NX)野生大豆的特有等位基因数目较多, 分别为 19 个和 16 个; Shannon 指数(I)变化范围为 0.162~2.174, 期望杂合度(H_e)的变化范围为 0.073~0.899。 (2) 广东连州(LZ)野生大豆居群的遗传多样性最高, 而仁化(RH)野生大豆的遗传多样性最低, 二者的 Shannon 指数(I)分别为 0.811、0.113; 群体分子方差(AMOVA)分析结果揭示, 居群间变异占 51%, 群体内变异占 49%, 且仁化居群与其他居群间基因流较小。 (3) 依据遗传距离可将连州(LZ)和连南(LN)聚类为一类, 乳源(RY)和南雄(NX)为一类, 仁化(RH)单独为一类。研究表明, 广东不同野生大豆居群间遗传多样性差异较大, 而且居群内基因类型多, 其中连州(LZ)和乳源(RY)野生大豆居群的遗传多样性较高, 证明广东野生大豆群体保存了丰富的基因资源。

关键词: 遗传多样性; 野生大豆; SSR

中图分类号: Q346⁺.5

文献标志码: A

Genetic Diversity of 5 Wild Soybean Populations from Guangdong

ZHAO Qingsong^{1,2}, CHEN Zhenlun¹, ZHAO Yunyun¹, ZHANG Jie¹,
MA Qibin¹, NIAN Hai¹, YANG Cunyi^{1*}

(1 State Key Laboratory of Agricultural and Biological Resources Protection and Utilization in Subtropics, Guangdong Subcenter of National Center for Soybean Improvement, College of Agronomy, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2 Institute of Cereal & Oil Crops, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050031, China)

Abstract: Genetic diversities of 5 wild soybean populations from Guangdong were examined by SSR. The results showed that: (1) There were 263 alleles at 60 SSR loci, varying from 2 to 10 with an average of 4.38 alleles for each locus. Lianzhou and Nanxiong populations had higher unique alleles, each with 19 and 16. Shannon diversity indexes varied from 0.162 to 2.174, while the expected heterozygosity (H_e) ranged from 0.073 to 0.899. (2) Lianzhou populations had the highest genetic diversity with Shannon diversity index 0.811 among 5 wild soybean populations in Guangdong, while Renhua population had the lowest genetic diversity with Shannon diversity index 0.113. AMOVA analysis results indicated that there is 51% variance among the populations and 49% in populations. Renhua population(RH) had lower gene flow with the other populations. According to genetic distance the 5 populations were divided into three groups: Lianzhou and Liannan as a group, Ruyuan and Nanxiong as a group, Renhua only for a group. The results indicated

收稿日期: 2013-06-05; 修改稿收到日期: 2013-07-15

基金项目: 国家自然科学基金(30771364); 广东省旱地作物品种改良技术研究团队(2011A020102010)

作者简介: 赵青松(1975—), 男, 硕士, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: zhaqingsonga@163.com

* 通信作者: 杨存义, 博士, 副教授, 主要从事大豆分子育种和资源利用研究。E-mail: ycy@scau.edu.cn

that there were different levels in genetic diversity among populations and within population, and Lianzhou and Ruyuan populations had higher genetic diversity than others.

Key words: genetic diversity; wild soybean; SSR

野生大豆属于东亚温带物种,仅在亚洲东部北回归线以北地区有分布,包括中国、朝鲜半岛、日本、俄罗斯的远东地区等。在中国野生大豆分布广泛,除青海、海南和新疆外,其他省区均有^[1]。野生大豆在长期的进化过程中保留着大量优良基因,是大豆育种重要的遗传资源,而了解野生大豆的遗传结构是保护和利用野生大豆资源的前提。利用表型性状、同工酶和分子标记对不同生态区的大豆和一年生野生大豆比较都发现野生大豆比栽培大豆有较高遗传多样性^[1-9]。通过分子标记对来源于中国^[10-12]、日本^[13-15]、韩国^[16]和俄罗斯^[17]的野生大豆群体分析,发现群体间存在巨大变异,这主要是由遗传漂变和突变造成的^[18-19]。中国不同地区的野生大豆群体存在明显差异,同一区域内的不同野生大豆群体也存在遗传分化^[20],对湖南新田县野生大豆^[21]和辽宁新宾县野生大豆^[22]分析均发现居群内分化较小,而居群间遗传变异较大。

根据野生大豆考察报告认为野生大豆最南分布在北纬 24°10′左右的广东英德南至阳山白莲一线^[23]。广东北部山区韶关、清远等地区有丰富的野生大豆资源,但有关广东野生大豆群体遗传结构的系统研究未见报道。本研究通过对广东野生大豆的收集及其植物学性状和生境调查,收集了 5 个县的不同野生大豆自然居群,运用 SSR 分子标记技术,分析了其遗传多样性和遗传结构,为广东野生大豆的保护和利用提供依据。

1 材料和方法

1.1 材 料

根据广东省野生大豆考察组对广东野生大豆的考察记录信息^[23],2008 年 10 月分别在广东省的乳源县一六镇、连南县三江镇、连州市西岸镇、南雄市

梅岭镇和仁化县仁化镇等地进行野生大豆(*G. soja*)的收集,根据居群大小,混合或单株采集成熟野生大豆种子放入信封,记录采集地点的 GPS 数据。从 5 个居群中分别随机选择 29~32 个不同的株系进行盆栽,采集野生大豆新鲜叶片共计 153 份(表 1),置于一 20℃冰箱中。

1.2 SSR 引物

参照 Song 等^[24]建立的大豆分子标记连锁图,从每个连锁群上选择 3~4 个 SSR 位点,共计 60 对引物(表 2)。SSR 引物序列来源于美国农业部大豆基因组数据库(<http://129.186.26.94/SSR.html>),由上海生物技术有限公司合成。

1.3 DNA 提取及 PCR 扩增

每份材料取叶片 3~4 片,依据快速 CTAB^[25]方法提取大豆基因组 DNA。

实验采用 20 μL PCR 反应体系,包括 10×PCR 缓冲液(含 Mg²⁺) 2.0 μL, dNTP(10 mmol/L) 0.2 μL, *Taq* 酶(5 U/μL) 0.2 μL, 模板 DNA 2.0 μL(约 50 ng), SSR 引物(50 μmol/L) 0.18 μL, 双蒸水 15.44 μL。PCR 反应程序为:95℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 35 s, 共 35 个循环;72℃延伸 10 min。反应结束后,加 4 μL 上样指示剂,用 7.2%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染后记录条带数据。

1.4 数据统计分析

对每个 SSR 标记的等位基因进行赋值,有条带记为 1,无条带记为 0。等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、期望杂合度(H_e)、Shannon 多样性指数(I)、居群多态位点百分数(P)、分化系数(F_{st})、基因流(N_m)等用 Peakall 等^[28]编写的 GENALEX6 计算。群体遗传距离(GD)用 POPGENE32^[26]计算。

表 1 广东 5 个野生大豆采集地点及采样数

Table 1 The collection sites and the number of sample of 5 wild soybean populations at Guangzhou Provence

取样地点 Collection site	编号 Code	采样数 No. of sample	经度 Longitude	纬度 Latitude	海拔 Altitude/m
南雄 Nanxiong	NX	32	114°19.327′	25°19.346′	250
连州 Lianzhou	LZ	29	112°11.457′	24°58.868′	132
乳源 Ruyuan	RY	30	113°08.316′	24°55.287′	489
连南 Liannan	LN	32	112°18.875′	24°45.434′	127
仁化 Renhua	RH	30	113°40.486′	25°05.702′	86

2 结果与分析

2.1 野生大豆 SSR 位点的多样性分析

从表 2 结果可以看出,每个位点在总群体中都表现出多态性,60 个位点共检测到 263 个等位变异

(图 1),等位基因(N_a)变异数目范围为 2~10 个,平均为 4.38 个等位变异,其中最多的 Satt232 为 10 个等位变异,大于等于 7 个等位变异的有 7 个位点,介于 4~6 个等位变异之间的有 37 个位点,小于等于 3 个等位变异的有 16 个位点,其中 Satt579、Sat_

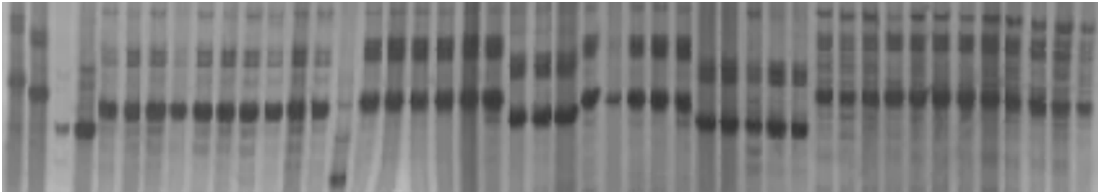


图 1 Satt173 引物在广东 5 个野生大豆群体中扩增产物电泳图(部分截图)
Fig. 1 The polymorphic image of Satt173 in 5 wild soybean populations from Guangdong (Partial)

表 2 广东 5 个野生大豆居群的位点遗传多样性参数

Table 2 The main parameters of genetic diversity in 5 wild soybean populations from Guangdong

位点 Locus	N_a	N_e	I	H_e	位点 Locus	N_a	N_e	I	H_e
Satt073-A1	2	1.986	0.676	0.497	Satt352-G	4	2.577	1.188	0.612
Satt236-A1	4	3.617	1.312	0.724	Satt394-G	8	4.688	1.815	0.787
Satt382-A1	4	3.224	1.227	0.69	Satt570-G	5	3.602	1.573	0.722
Satt341-A2	7	2.933	1.588	0.659	Sat_218-H	4	3.948	0.898	0.899
Satt538-A2	9	5.161	1.744	0.806	Satt279-H	5	3.788	1.378	0.736
Satt197-B1	4	2.868	1.18	0.651	Satt194-I	5	2.405	1.049	0.584
Satt415-B1	2	1.079	0.162	0.073	Satt239-I	5	2.533	1.135	0.605
Sat_177-B2	3	1.865	0.7	0.464	Satt330-I	5	4.463	1.539	0.776
Satt126-B2	6	4.903	1.677	0.796	Satt419-I	5	2.139	1.073	0.532
Satt168-B2	2	1.079	0.162	0.073	Sct_189-I	4	4.191	1.354	0.761
Satt556-B2	5	3.66	1.305	0.727	Satt249-J	7	3.6	1.639	0.722
Sat_235-C1	4	2.577	1.188	0.612	Satt431-J	5	4.133	1.004	0.758
Satt476-C1	3	2.751	1.055	0.636	Satt596-J	4	1.266	0.456	0.21
Satt286-C2	5	3.812	1.406	0.738	Satt349-K	4	2.609	1.284	0.617
Satt305-C2	4	2.945	1.119	0.66	Satt539-K	4	2.781	1.119	0.64
Satt371-C2	3	2.578	0.984	0.612	Satt588-K	3	1.839	0.779	0.456
Satt681-C2	5	3.501	1.362	0.714	Satt232-L	10	5.647	2.174	0.823
Satt184-D1a	4	4.414	1.352	0.773	Satt497-L	5	4.834	1.556	0.793
Satt203-D1a	4	2.166	0.833	0.538	Satt513-L	5	3.424	1.328	0.708
Sat_135-D1b	6	5.282	1.759	0.811	Satt150-M	4	3.491	1.246	0.714
Satt558-D1b	3	1.521	0.579	0.343	Satt308-M	4	3.83	1.364	0.739
Satt579-D1b	2	1.613	0.568	0.38	Satt536-M	3	1.809	0.732	0.447
Satt135-D2	3	1.235	0.855	0.191	Satt590-M	4	1.719	0.909	0.418
Satt389-D2	4	3.41	1.276	0.707	Satt152-N	3	2.121	1.054	0.68
Sat_112-E	2	1.726	0.595	0.421	Satt339-N	3	2.147	0.89	0.534
Satt045-E	4	3.52	0.893	0.716	Satt387-N	7	3.919	1.534	0.745
Satt146-F	4	2.781	1.092	0.64	Satt530-N	4	2.274	1.042	0.56
Satt269-F	2	1.52	0.619	0.342	Satt153-O	4	2.242	1.023	0.554
Satt595-F	5	3.15	1.401	0.683	Satt173-O	7	4.604	1.596	0.783
Satt656-F	3	1.125	0.258	0.111	Satt487-O	4	2.24	0.893	0.554
					平均 Mean	4.38	3.01	1.13	0.61

注: N_a . 等位变异数; N_e . 有效等位变异数; I . Shannon 多样性指数; H_e . 期望杂合度; 下同。
Note: N_a . The number of alleles; N_e . The number of effective alleles; I . Shannon index; H_e . Expected heterozygosity per locus; The same as below.

112、Satt073、Satt269、Satt168、Satt415 等 6 个位点只有 2 个等位变异。各位点的有效等位变异(N_e)的变化范围从 1.0~5.6,平均为 3.0。位点 Shannon 指数(I)的变化范围从 0.162 到 2.174,期望杂合度(H_e)的变化范围从 0.073 到 0.899。各位点多样性指标明显不同,表明不同位点的遗传多样性不同。

2.2 不同野生大豆居群的多样性分析

期望杂合度独立于样本大小,可以用来作为居群遗传多样性的主要依据^[28]。从表 3 可以看出,5 个广东野生大豆居群的 H_e 变化范围从 0.068 到 0.462,期望杂合度从大到小依次为连州(LZ)、乳源(RY)、连南(LN)、南雄(NX)、仁化(RH),表明各居群间的遗传多样性存在很大差异。居群的等位基因数、多态位点百分数、有效等位基因数和 Shannon 指数也是反映群体遗传多样性的指标,5 个居群在这些指标上的排序与期望杂合度的排序基本一致,而且在连州(LZ)和乳源(RY)居群中均有较高的值,这些表明广东 5 个地方中连州(LZ)和乳源(RY)野生大豆的遗传多样性较高。

2.3 不同野生大豆居群的特有等位基因分析

居群特有等位基因是指只在某个居群中出现而不在其他居群中出现的等位基因。60 个位点中的 39 个位点在 5 个居群总共检测到 61 个特有等位基因,其中有 23 个位点只在 1 个群体中检测到特异等位基因,有 9 个位点在 2 个群体中检测到特有等位基因,有 5 个位点在 3 个群体中检测到特有等位基因,有 1 个位点在 4 个群体中检测到特有等位基因(表 5)。不同群体特有等位基因的位点不同,其中连州群体(LZ)有 19 个,南雄群体(NX)有 16 个,乳源群体(RY)有 13 个,仁化群体(RH)有 8 个,连南群体(LN)有 5 个。这些特有等位基因的频率分布在 11.1%~100%,特定群体所有个体都具有的特有等位基因在不同群体间不同,仁化群体(RH)8 个

特有位点中 4 个是 100%的高频率位点,而连州群体(LZ)19 个特有等位位点中无 100%的高频率位点,主要是低频率特有等位基因,表明连州群体(LZ)内多样性较高。特有等位基因多的居群则含有的其他居群所不具有的基因较多,有更大的保存利用价值。

2.4 不同野生大豆居群的分化及各居群间基因流

群体分子方差(AMOVA)显示,群体 51%的变异存在于居群间,49%的遗传变异存在于居群内。表明广东野生大豆居群间存在遗传分化,居群内也存在遗传分化。因此在野生大豆保护和利用时,对多样性较高的群体取样要尽量多,避免遗漏。

基因流被视为使居群遗传结构均质化的主要原因之一。一般认为,当 $N_m > 1$ 时,基因流足以抵制居群由遗传漂变引起的居群之间的遗传分化,维持遗传变异的均一性。广东野生大豆居群成对基因流数据见表 4,基因流变化范围为 0.161~0.884,基因流较大的为连南(LN)与连州(LZ)之间和乳源(RY)与连州(LZ)之间,分别为 0.884 和 0.809。较小的是南雄(NX)与仁化(RH)之间和连南(LN)和

表 4 居群间基因流及分化系数

Table 4 The N_m and the F_{st} among the populations			
居群 1 Population 1	居群 2 Population 2	分化系数 F_{st}	基因流 N_m
NX	RY	0.348	0.469
NX	LN	0.378	0.411
RY	LN	0.261	0.709
NX	RH	0.609	0.161
RY	RH	0.460	0.294
LN	RH	0.547	0.207
NX	LZ	0.310	0.557
RY	LZ	0.236	0.809
LN	LZ	0.221	0.884
RH	LZ	0.451	0.305
平均 Mean		0.382	0.480

表 3 广东 5 个野生大豆居群遗传多样性参数

Table 3 The genetic diversity parameters of 5 wild soybean populations from Guangdong

居群编号 Code of population	居群个体数 Number of individuals(N)	多态位点百分数 Percentage of polymorphic loci/%	N_a	N_e	I	H_e
NX	32	47.01	2.12	1.62	0.492	0.311
RY	29	51.33	2.35	1.81	0.633	0.392
LN	30	47.63	2.05	1.73	0.518	0.322
RH	32	28.90	1.37	1.12	0.113	0.068
LZ	30	68.50	2.88	2.09	0.811	0.462
平均 Mean		43.47	2.15	1.67	0.513	0.311

仁化(RH)之间分别为 0.161 和 0.207。从数据发现广东不同地方野生大豆居群间未出现基因流大于 1 的居群对,表明不同地方野生大豆居群间没有高频率的基因交流。

2.5 不同野生大豆居群的遗传距离与聚类

遗传一致度和遗传距离是评价居群间相似程度的重要参数。各居群之间平均遗传距离为 0.718,居群间遗传距离最小的为连南(LN)和连州(LZ)之

表 5 广东 5 个野生大豆居群特有等位基因的频率
Table 5 The frequency of the unique alleles of 5 wild soybean populations from Guangdong

位点 Locus	特有位点出现频率 Frequency of the unique alleles/%					特有位点出现的群体数 No. of populations for unique locus
	NX	RY	LN	RH	LZ	
Satt382-A1	66.70	70	0	100	0	3
Satt341-A2	66.70	0	0	0	11.10	2
Satt538-A2	58.30	10	30	100	0	4
Sat_177-B2	0	0	0	0	11.10	1
Satt126-B2	50	0	0	0	22.20	2
Satt168-B2	16.70	0	0	0	0	1
Satt556-B2	0	0	0	0	11.10	1
Sat_235-C1	100	0	0	0	0	1
Satt286-C2	0	0	0	100	0	1
Satt305-C2	0	0	0	0	11.10	1
Satt203-D1a	58.30	0	0	0	33.30	2
Sat_135-D1b	0	50	100	0	88.90	3
Satt558-D1b	0	0	0	10	0	1
Satt135-D2	0	70	0	0	0	1
Satt389-D2	0	70	0	0	88.90	2
Satt146-F	83.30	10	0	0	0	2
Satt595-F	0	50	0	0	22.20	2
Satt656-F	0	0	0	0	11.10	1
Satt352-G	0	50	0	0	0	1
Satt394-G	66.70	30	0	10	0	3
Sat_218-H	0	0	0	0	11.10	1
Satt279-H	66.70	0	0	0	11.10	2
Satt194-I	0	50	0	0	0	1
Satt239-I	0	0	30	0	11.10	2
Satt419-I	25	0	50	0	0	2
Sct_189-I	0	0	0	90	0	1
Satt431-J	0	0	30	0	0	1
Satt596-J	0	60	0	0	0	1
Satt539-K	25	0	0	90	0	2
Satt232-L	33.30	40	0	0	88.90	3
Satt497-L	0	0	0	100	0	1
Satt513-L	0	50	0	0	0	1
Satt536-M	0	0	0	0	22.20	1
Satt339-N	41.70	0	0	0	0	1
Satt387-N	0	0	0	0	22.20	1
Satt530-N	0	0	0	0	22.20	1
Satt153-O	100	0	0	0	0	1
Satt173-O	100	0	0	0	11.10	2
Satt487-O	0	0	0	0	33.30	1
特有点数 No. of unique locus	16	13	5	8	19	
100%特有位点数 No. of 100% unique locus	3	1	1	4	0	

表 6 广东 5 个野生大豆居群的遗传一致度和遗传距离
Table 6 The genetic identity and genetic distance
of 5 wild soybean populations from Guangdong

	NX	RY	LN	RH	LZ
NX	—	0.602	0.465	0.365	0.514
RY	0.508	—	0.565	0.483	0.497
LN	0.766	0.571	—	0.429	0.662
RH	1.007	0.727	0.847	—	0.379
LZ	0.666	0.700	0.412	0.971	—

注:—上方为遗传一致度;一下方为遗传距离。
Note:— up show genetic identity;— down show genetic distance.

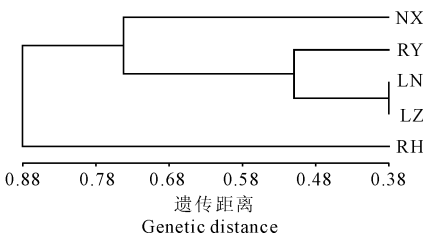


图 2 广东野生大豆聚类分析结果
Fig. 2 The cluster of 5 wild soybean
populations in Guangdong

间,仅为 0.412,而南雄(NX)和仁化(RH)之间的遗传距离最大为 1.007。仁化与其余 4 个居群之间的遗传距离均较大,其中空间距离上仁化与南雄最近,但南雄(NX)和仁化(RH)居群间的遗传距离最大(表 6)。表明仁化野生大豆居群和广东其他地方野生大豆居群差异较大,来源可能不同。

依据遗传距离对广东 5 个野生大豆居群进行聚类分析,在遗传距离 0.88 处可将 5 个居群分为 2 类,仁化(RH)单独为一类,其他居群为一类(图 2)。连州(LZ)和连南(LN)首先聚类,而仁化居群(RH)与其他居群最后才聚类,表明连州(LZ)和连南(LN)居群遗传相似程度最高,而仁化居群与其他居群的亲缘关系较远。

3 讨 论

野生大豆是栽培大豆的近缘野生种,具有高蛋

白、抗逆性强、繁殖系数高等优良特性,是进一步改良栽培大豆的重要基因的来源。亚热带地区的野生大豆长期进化、生长在特殊的气候、土壤环境中,进化了一些适合于亚热带地区环境的优良基因。因此,对这些材料的研究和特定环境适应性性状的挖掘可为南方大豆的改良提供丰富的宝贵遗传资源。

广东野生大豆主要分布在粤北山区的韶关、清远等地,这些地区地形复杂,野生大豆生境差别很大^[23]。广东野生大豆居群中只有乳源的野生大豆被研究过^[7,29],其他地区的野生大豆未被研究过。在已有的研究结果认为中国北纬 25°附近是野生大豆的一个多样性中心,同时也可能是一个起源中心^[7,29]。在本研究所研究的广东 5 个县野生大豆居群主要分布在该范围,用 60 对 SSR 引物对这些群体进行遗传多样性分析,等位基因的变化范围从 2~10,平均每个位点检测到 4.38 个等位基因,期望杂合度的变化范围从 0.073 到 0.899,平均值为 0.61。以位点多样性为指标与其他群体相比,略低于湖南新田县野生大豆自然居群(N_a 5.44, H_e 0.64)^[21],但明显高于辽宁新宾县野生大豆居群(N_a 2.3, H_e 0.317)^[22]和山东垦利黄河口自然保护区野生大豆居群(N_a 2.88, H_e 0.431)^[30]。本研究证明野生大豆分布最南端的广东野生大豆群体保存了高的遗传多样性,这为广东野生大豆的保护和利用提供了依据。

生物多样性和居群的遗传结构的研究可为濒危植物的保护提供依据。广东是野生大豆分布区的最南端,本研究发现野生大豆的遗传多样性指数高,居群基因类型多,其中连州野生大豆的 Shannon 指数最高为 0.811,其特有等位基因数为 19 个,群体内蕴藏了丰富的有益基因;来自乳源一六镇的群体是首次记录收集的群体,多样性也较高;南雄和连南居群在过去的考察中有记录,多样性中等;仁化群体不同于其他群体,群体内遗传结构简单,高频率的特有基因多。这些信息为利用这些野生大豆资源改良南方大豆提供依据。

参考文献:

[1] LI X H(李向华),WANG K J(王克晶),LI F SH(李福山),et al. Research progress of wild soybean (*Glycine soja*) and suggestions for improving its effective utilization and protection[J]. *Soybean Science* (大豆科学),2005,24(4):305—309(in Chinese).
[2] KUROSU Y,TOMOOKA N,KAGA A,et al. Genetic diversity of wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.) and Japanese cultivated soybeans [*Glycine max* (L.) Merr.] based on microsatellite (SSR) analysis and the selection of a core collection[J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*,2009,56:1 045—1 055.
[3] CHEN Y W,NLESON R L. Genetic variation and relationships among cultivated,wild,and semiwild soybean[J]. *Crop Science*,2004,44:316—325.

- [4] XU D H, GAI J Y. Genetic diversity of wild and cultivated soybeans growing in China revealed by RAPD analysis[J]. *Plant Breeding*, 2003, **122**(6): 503–506, 2003.
- [5] LI Z L, NELSON R L. RAPD marker diversity among cultivated and wild soybean accessions from four Chinese Provinces[J]. *Crop Science*, 2002, **42**(5): 1 737–1 744.
- [6] XU D H, ABE J, GAI J Y, *et al.* Diversity of chloroplast DNA SSRs in wild and cultivated soybeans: evidence for multiple origins of cultivated soybean[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, **105**: 645–653.
- [7] XU D H, ABE J, KANAZAWA A, *et al.* Identification of sequence variations by PCR-RFLP and its application to the evaluation of cDNA diversity in wild and cultivated soybeans[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, **102**: 683–688.
- [8] CHEN Y W, NELSON R L. Genetic variation and relationships among cultivated, wild and semi wild soybean[J]. *Crop Science*, 2004, **44**: 316–325.
- [9] KANAZAWA A, TOZUKA A, AKINMOTO S I, *et al.* Phylogenetic relationships of the mitochondrial genomes in the genus *Glycine* subgenus Soja[J]. *Genes and Genetic Systems*, 1998, **73**(4): 255–261.
- [10] 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**: 98–103.
- [11] SHIMAMOTO Y, FUKUSHI H, ABE J, *et al.* RFLPs of chloroplast and mitochondrial DNA in wild soybean, *Glycine soja*, growing in China[J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1998, **45**(5): 433–439.
- [12] GUO J, LIU Y F, WANG Y S, *et al.* Population structure of the wild soybean (*Glycine soja*) in China: implications from microsatellite analyses[J]. *Annals of Botany*, 2012, **110**: 777–785.
- [13] WANG K J, TAKAHATA Y. A. Preliminary comparative evaluation of genetic diversity between Chinese and Japanese wild soybean (*Glycine soja*) germplasm pools using SSR markers[J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2007, **54**(1): 157–165.
- [14] KURODA Y, KAGA A, TOMOOKA N, *et al.* Population genetic structure of Japanese wild soybean (*Glycine soja*) based on microsatellite variation[J]. *Molecular Ecology*, 2006, **15**: 959–974.
- [15] TOZUKA A, FUKUSHI H, HIRATA T, *et al.* Composite and clinal distribution of *Glycine soja* in Japan revealed by RFLP analysis of mitochondrial DNA[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, **96**: 170–176.
- [16] LI Z L, NELSON R L. RAPD marker diversity of wild soybean (*Glycine soja* Sieb. and Zucc.) accessions from South Korea and other countries[J]. *Crop Science*, 2008, **48**(3): 606–616.
- [17] SEITOVA A M, IGNATOV A N, SUPRUNOVA T P, *et al.* Genetic variation of wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.) in the far east region of the Russian Federation[J]. *Russian Journal of Genetics*, 2004, **40**(2): 165–171.
- [18] HE S, WANG Y S, VOLIS S, *et al.* Genetic diversity and population structure: Implications for observation of wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.) based on Nuclear and chloroplast microsatellite variation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, **13**(10): 12 608–12 628.
- [19] NICHOLS D M, WANG L Z, PEI Y L, *et al.* Variability among Chinese *Glycine soja* and Chinese and North American soybean genotypes[J]. *Crop Science*, 2007, **47**(5): 1 289–1 298.
- [20] ZHAO H K(赵洪锟), WANG Y M(王玉民), LI Q Y(李启云), *et al.* SSR analysis of wild soybean (*G. soja*) and cultivated soybean from different latitude in China[J]. *Soybean Science* (大豆科学), 2001, **20**(3): 172–176 (in Chinese).
- [21] ZHAO Q S(赵青松), NIAN H(年海), YANG C Y(杨存义). Genetic diversity of nature wild soybean populations in Xintian County, Hunan Province[J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.* (西北植物学报), 2009, **29**(11): 2 221–2 227 (in Chinese).
- [22] GUAN R X(关荣霞), LIU X M(刘秀敏), CHANG R ZH(常汝镇), *et al.* Genetic diversity analysis of wild soybean (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) from in-situ conserved population in Xinbin County of Liaoning Province[J]. *High Technology Letters* (高技术通讯), 2006, **16**(1): 67–72 (in Chinese).
- [23] Guangdong Province Wild Soybean Surveying Team(广东省野生大豆考察组). Report on the survey of wild soybean resources in Guangdong Province[J]. *Guangdong Agricultural Sciences* (广东农业科学), 1984, **3**: 15–17 (in Chinese).
- [24] SONG Q J, MAREK L F, SHOEMAKER R C, *et al.* A new integrated genetic linkage map of the soybean[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, **109**(1): 122–128.
- [25] NEAL STEWART J, LAURA E. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications[J]. *Bio. Techniques*, 1993, **14**(5): 748–749.
- [26] PEAKALL R, SMOUSE P E, GENALEX 6: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2006, **6**(1): 288–295.
- [27] YEH F C, YANG R C, BOYLE T. Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis (POPGENE)[C]. University of Alberta and Tim Boyle; Centre for International Forestry Research, 1999.
- [28] YAN L N(闫路娜), ZHANG D X(张德兴). Effects of sample size on various genetic diversity measures in population genetic study with microsatellite DNA markers[J]. *Acta Zoologica Sinica* (动物学报), 2004, **50**(2): 279–290 (in Chinese).
- [29] WEN Z X(文自翔), ZHAO T J(赵团结), *et al.* Genetic diversity, geographic differentiation and evolutionary relationship among ecotypes of *Glycine max* and *G. soja* in China[J]. *Chinese Science Bulletin* (科学通报), 2009, **54**(21): 3 301–3 310 (in Chinese).
- [30] ZHU W Y(朱维岳), ZHOU T Y(周桃英), ZHONG M(钟明), *et al.* Sampling strategy for wild soybean (*Glycine soja*) populations based on their genetic diversity and fine-scale spatial genetic structure[J]. *Journal of Fudan University* (Nat. Sci. Edi.) (复旦学报·自然科学版), 2006, **45**(3): 321–327 (in Chinese).