

## 辽宁省野生大豆资源遗传多样性的比较分析

吴禹, 沈军, 陈爱国, 王岩, 李兆波, 孟未来, 崔晓光, 路明祥

(辽宁省农业科学院 创新中心, 辽宁 沈阳 110866)

**摘要:**利用20对SSR引物对来自辽宁省14个地级市的963份野生大豆种质进行了遗传多态性分析。结果共检测到等位基因变异141个,每对引物等位基因变异范围4~11个。等位基因的平均频率是0.1326,范围是0.0016~0.9045。各地区间遗传相似度变幅为0.6730~0.8589,其中沈阳和铁岭的遗传相似性最大;其次是大连和鞍山、辽阳和鞍山;丹东和朝阳、抚顺和大连的遗传相似度最低。聚类分析中,14个地区共分为2个大类和4个小类,表明材料的遗传背景与地理分布具有一定的相关性。

**关键词:**野生大豆;遗传多样性;遗传相似性;聚类分析;SSR

**中图分类号:**S565.1      **文献标识码:**A      **文章编号:**1000-9841(2012)03-0368-06

## Genetic Similarity for Wild Soybeans from Different Geographical Origins in Liaoning Province

WU Yu, SHEN Jun, CHEN Ai-guo, WANG Yan, LI Zhao-bo, MENG Wei-lai, CUI Xiao-guang, LU Ming-xiang

(Innovation Center, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang 110866, Liaoning, China)

**Abstract:** The genetic diversity of 963 wild soybean germplasms from 14 regions in Liaoning province was analyzed using 20 pairs of SSR primers. A total of 141 variation were detected in alleles with the frequency of 4-11 per pair of primer. The averaged frequency of allele was 0.1326 in the range of 0.0016-0.9045. The genetic similarity index of wild soybeans in different regions varied from 0.6730 to 0.8589, with that between Shenyang and Tieling the highest; followed by Dalian and Anshan, Liaoyang and Anshan; Dandong and Chaoyang, Fushun and Dalian was the smallest. The 14 areas were divided into 2 major categories and 4 sub-categories in clustering analysis, which showed that the genetic background of germplasm was correlated to its geographical distribution to some extent.

**Key words:** Wild soybean; Genetic diversity; Genetic similarity; Cluster analysis; SSR

野生大豆是栽培大豆的祖先,并且为东亚地区所特有,尤其在我国分布广泛,除青海、新疆和海南几个地区以外,其余各省均有野生大豆的分布<sup>[1-2]</sup>。我国是拥有野生大豆资源最丰富的国家,目前国家基因库收集的野生大豆资源已超过9 000余份,约占世界总量的90%以上。由于材料的限制,国外学者对野生大豆的研究鲜有报道, Lee等<sup>[3]</sup>通过对韩国、中国以及俄罗斯东部地区的野生大豆材料进行研究,认为韩国是野生大豆遗传多样性中心。相比之下,国内对野生大豆的研究较多,董英山等<sup>[4]</sup>对来自我国25个省的6 172份野生大豆材料进行了遗传多样性分析,结果显示,我国有3个遗传多样性中心,分别为东北地区、黄河流域以及东南沿海地区,与丁艳来等<sup>[5]</sup>对来自于我国3个地理生态区域的具有代表性的野生大豆材料的遗传变异分析

结果一致。关媛等<sup>[6]</sup>揭示了湖北大豆的遗传丰富度显著高于湖南大豆,但2个省份大豆遗传多样性指数之间没有显著差异。王果<sup>[7]</sup>利用30对SSR引物分析了49份山西太原野生大豆材料,共检测到208个等位变异,每个SSR位点的等位变异平均为7个。该研究利用20对SSR引物,对来自辽宁省14个地级市的963份野生大豆资源进行了SSR检测,探讨了辽宁省野生大豆种质资源的遗传多样性以及不同地理来源的野生大豆品种的遗传相似性。

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 供试材料

2008~2010年自辽宁省14个地级市,共计48个县,144个乡镇收集野生大豆。根据野生大豆

收稿日期:2012-03-12

基金项目:公益性行业(农业)科研专项经费资助(201003021)。

第一作者简介:吴禹(1969-),女,研究员,主要从事农作物品种资源研究。E-mail:wuyuwheat@163.com。

的叶形、茸毛色、荚色、荚型、主茎、粒色、脐色及源,从中选择芽率较好的 963 份作为的试验材料泥膜有无等表型性状收集 1 100 份野生大豆种质资 (表 1)。

表 1 辽宁省不同地区的材料分布

Table 1 Distribution of test materials from different regions of Liaoning province

地区 Region	材料份数 Number of test materials	地区 Region	材料份数 Number of test materials
鞍山 Anshan	98	锦州 Jinzhou	49
本溪 Benxi	46	辽阳 Liaoyang	19
朝阳 Chaoyang	132	葫芦岛 Huludao	16
大连 Dalian	72	营口 Yingkou	102
丹东 Dandong	90	盘锦 Panjin	36
抚顺 Fushun	50	沈阳 Shenyang	44
阜新 Fuxin	44	铁岭 Tieling	165

### 1.2 田间种植与 DNA 提取

材料于 2011 年 5 月种植于铁岭市农科院试验田,田间肥力均匀,地势平坦。每份材料播种 4 穴,搭架绑蔓。待复叶完全展开后取嫩叶约 3 g,保存于 80℃ 冰箱备用。DNA 提取参照 Murray 等<sup>[8]</sup> 的 CTAB 法,略有改动。

### 1.3 引物选择

根据大豆公共图谱选择标记,结合 Xie 等<sup>[9]</sup> 筛选的大豆核心引物选择均匀分布各个染色体的并且

在栽培和野生大豆间具有良好多态性的 SSR 标记 300 个,选择 16 份材料对这些标记进行多态性筛选,在每个染色体上至少 1 个标记的前提下选择条带清晰、等位变异较为丰富、适用于辽宁省野生大豆资源遗传多样性研究的 SSR 标记 20 个(表 2)。SSR 引物序列来自大豆数据库 SoyBase (<http://soy-base.agron.iastate.edu>),由北京鼎国生物技术有限公司合成。

表 2 辽宁省野生大豆品种的 SSR 位点多态性

Table 2 Polymorphism of SSR locus in wild soybean of Liaoning province

位点 Locus	染色体 Chromosome	等位基因数目 Alleles number	Shannon 指数 Shannon index	Simpson 指数 Simpson index
satt424	A2	7	1.5920	0.7776
sat_115	A2	6	1.6365	0.8407
satt429	A2	6	1.6426	0.8350
satt286	C2	6	1.7413	0.8229
satt216	D1b	8	1.8910	0.8420
sat_417	F	5	0.3855	0.1766
satt138	G	11	1.8938	0.8361
sat_064	G	8	1.8734	0.8866
satt559	K	6	1.3920	0.8133
sat_391	M	6	1.5340	0.8359
satt300	A1	8	1.6380	0.7870
satt197	B1	8	1.9293	0.8373
satt194	C1	8	1.6285	0.8205
sat_130	C2	6	1.3955	0.9126
satt267	D1a	7	1.6037	0.7693
satt268	E	7	1.6459	0.7840
satt279	H	10	1.9488	0.8488
satt239	I	8	1.7234	0.7951
sct_001	J	4	1.2786	0.7016
satt462	L	8	1.6570	0.8602

### 1.4 PCR 反应及产物检测

PCR 反应采用 20  $\mu\text{L}$  的反应体系,包括 1.0  $\mu\text{L}$  ( $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 引物,0.2  $\mu\text{L}$  ( $5 \text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) Taq DNA 聚合酶,1  $\mu\text{L}$  ( $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) dNTP,25 ng 模板 DNA 和 2  $\mu\text{L}$  的  $10\times$  PCR 反应液。PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min,55 $^{\circ}\text{C}$  复性 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$  下延伸 2 min,进行 35 个循环。用 6% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测获得的 PCR 产物。

### 1.5 数据分析

以 0、1、2 数据统计 SSR 扩增产物带型,并且建立相应的数据阵。在每个相同迁移位置上,有带记为“1”,无带记为“0”,缺失记为“2”。利用 Pop Gene Ver. 1.31 软件计算每个 SSR 位点的等位基因数、Simpson 指数和 Shannon-weaver 指数。利用 NTSYS 软件对野生大豆材料来源地区进行非加权类平均法(Unweighted pair group method arithmetic averages,UPGMA)的系统聚类。

## 2 结果与分析

### 2.1 群体的遗传多样性

利用 20 对 SSR 引物对 963 份野生大豆品种进行 SSR 标记检测,共检测到 141 个等位变异,变幅为 4~11 个,平均为 7.1 个。等位基因的平均频率是 0.1326,范围是 0.0016~0.9045。satt138 位点的等位基因数最多,为 11 个,其 Shannon 指数为 1.8938,Simpson 指数为 0.8361;其次为 satt279 位

点,有 10 个等位基因,其 Shannon 指数为 1.9488,Simpson 指数为 0.8488。set\_001 的等位基因数最少,为 4 个,其 Shannon 指数为 1.2786,Simpson 指数为 0.7016。

不同的 SSR 引物多态性信息量存在着一定的差异,SSR 位点的 Shannon 指数分布范围为 0.3855~1.9488,平均为 1.6015,其中 satt279(位于 H 连锁群)的 Shannon 指数最高(1.9488),sat\_417(位于 F 连锁群)的 Shannon 指数最低(0.3855);Simpson 指数分布范围是 0.1766~0.9126,平均为 0.7892,其中 sat\_130(位于 C2 连锁群)的 Simpson 指数最高(0.9126),sat\_417(位于 F 连锁群)的 Simpson 指数最低(0.1766)。

### 2.2 不同地区野生大豆品种的遗传相似性及其聚类分析

辽宁省各个市的野生大豆种质间的遗传相似度变幅在 0.6730~0.8589(表 3),平均为 0.7836。

其中沈阳和铁岭的遗传相似性最大;其次是大连和鞍山、辽阳和鞍山,均为 0.8582。丹东和朝阳、抚顺和大连的遗传相似度最低。由此可见,辽宁省野生大豆种质资源的分布表现为较强的地域性差异,即南部和北部、东部和西部的品种表现出较低的遗传相似度,而遗传相似度较高值则多出现在地理来源较近或者相邻地区的材料间。

利用 NTSYS 2.10 软件计算辽宁省野生大豆材料进行聚类分析,用 UPMGA 法构建聚类图(图 1)。

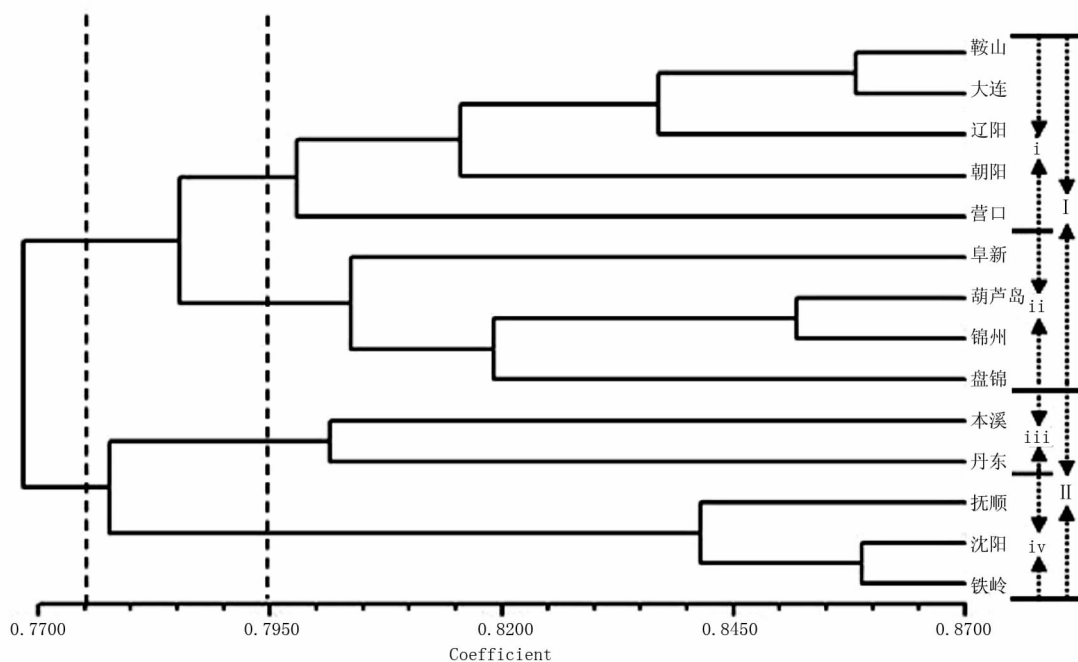


图 1 辽宁省 14 个地级市野生大豆资源的聚类图

Fig. 1 Dendrogram of wild soybean from 14 cities of Liaoning province

表3 不同地理来源的野生大豆种质资源的遗传相似性

Table 3 The genetic similarity of wild soybean germplasms from different geographical origins

地区(市)	鞍山	本溪	朝阳	大连	丹东	抚顺	阜新	葫芦岛	锦州	辽阳	盘锦	沈阳	铁岭	营口
Areas(city)	Anshan	Benxi	Chaoyang	Dalian	Dandong	Fushun	Fuxin	Huludao	Jinzhou	Liaoyang	Panjin	Shenyang	Tieling	Yingkou
鞍山 Anshan	1													
本溪 Benxi	0.7730	1												
朝阳 Chaoyang	0.8440	0.8014	1											
大连 Dalian	0.8582	0.7589	0.8156	1										
丹东 Dandong	0.8014	0.8014	0.6730	0.7730	1									
抚顺 Fushun	0.8298	0.7589	0.7282	0.6730	0.7589	1								
阜新 Fuxin	0.8156	0.8014	0.6730	0.7589	0.7014	0.7730	1							
葫芦岛 Huludao	0.7801	0.7943	0.7660	0.7660	0.7943	0.7660	0.8227	1						
锦州 Jinzhou	0.7589	0.7872	0.7589	0.8014	0.7730	0.7447	0.7872	0.8518	1					
辽阳 Liaoyang	0.8582	0.7872	0.7872	0.8156	0.8156	0.8298	0.7540	0.8085	0.8014	1				
盘锦 Panjin	0.8440	0.7730	0.7872	0.7872	0.7589	0.7589	0.8014	0.8369	0.8014	0.8014	1			
沈阳 Shenyang	0.7730	0.7872	0.8014	0.7872	0.8440	0.8530	0.7447	0.7518	0.8014	0.7872	0.7589	1		
铁岭 Tieling	0.8440	0.7589	0.6872	0.7730	0.7589	0.8298	0.7414	0.6777	0.7447	0.8156	0.7656	0.8589	1	
营口 Yingkou	0.8156	0.7447	0.7730	0.8014	0.7447	0.7872	0.7447	0.7943	0.8014	0.8014	0.8014	0.7730	0.8014	1

聚类结果可以看出,14个地区共划分为2个大类和4个次级分类。在以相似系数0.7710为阈值时可分为2个大类,第1大类(I)包括9个地区,其中鞍山和大连在相似度阈值为0.8455处聚在一起,然后依次和辽阳、朝阳、营口聚成第1个次级分类(i),葫芦岛和锦州聚在一起后又依次与盘锦及阜新聚成第2个次级分类(ii);第2大类(II)包括5个地区,其中本溪和丹东在相似度为0.8015处聚在一起形成了第3个次级分类(iii);铁岭和沈阳在相似度为0.8575处聚在一起,然后与抚顺聚为第4个次级分类(iv)。不难看出,聚类结果第1大类的几个地区分布在辽宁西部和南部区域,而第2大类的几个地区则分布在辽宁东部以及东北部和东南部区域。

### 2.3 不同地区野生大豆品种的遗传多样性比较

对不同地区内分别进行了遗传多样性指数的计算(表4),结果表明,鞍山市和锦州市的品种间相似性系数最高,分别为0.7888和0.7700,相应的Shannon指数均值和Simpson指数均值也相对较高,

分别为1.7140、0.8946和1.7767、0.8876。说明鞍山市和锦州市的野生大豆资源具有较高的遗传多样性,可将这2个地区看作辽宁省野生大豆资源分布的中心区域。朝阳市的品种间相似性系数平均值最低,为0.6870,相应的Shannon指数均值和Simpson指数均值分别为1.3343和0.6816,表明朝阳市的野生大豆资源多样性较低。

## 3 讨论

### 3.1 野生大豆群体遗传多样性

高惠等<sup>[10]</sup>利用20对引物对天津和山东沿海滩涂的242份野生大豆资源进行遗传多样性分析,共检测到157个等位基因,平均每个位点等位基因数目为7.85个,Simpson指数平均为0.6507,Shannon-weaver指数平均为1.3990。李建东等<sup>[11]</sup>以来自辽宁省的30份野生大豆为材料,用18对SSR引物扩增出129个等位变异,平均每个位点等位变异7.22个,Shannon-Weaver指数变化范围为1.1753~2.1234,平均为1.7285。该研究利用20对SSR引

物对 963 份野生大豆材料进行分析,共检测到等位变异数 141 个,每对引物基因变异范围 4~11 个,平均等位变异数 7.1 个。等位基因的平均频率为 0.1326,范围在 0.0016~0.9045。遗传相似度变幅为 0.6730~0.8589,平均为 0.7836。SSR 位点的 Shannon 指数分布范围为 0.3855~1.9488,平均为 1.6015,Simpson 指数分布范围为 0.1766~0.9126,平均为 0.7892,平均 Shannon 指数比李建东等<sup>[11]</sup>的

研究结果略低。另外,该研究中 SSR 标记 satt138 和 satt279 表现为较多的等位基因变异和较高的基因多样性,因此,这 2 个标记适合用于辽宁省野生大豆品种多样性的检测。satt138 的等位变异数大于 satt279,而相应的遗传多样性指数却相反,由此可见,并非等位变异数越多,相应的遗传多样性指数就越高。这是由于同一位点的等位基因在不同地区的野生大豆品种间的分布存在差异所致。

表 4 辽宁省各地区平均遗传多样性指数

Table 4 The average genetic diversity index from different regions of Liaoning province

地区 Regions	平均相似性系数 Average similarity index	平均 Shannon 指数 Average Shannon index	平均 Simpson 指数 Average Simpson index
鞍山 Anshan	0.7888	1.7140	0.8946
本溪 Benxi	0.7410	1.5309	0.8041
朝阳 Chaoyang	0.6870	1.3343	0.6816
大连 Dalian	0.7150	1.6454	0.7593
丹东 Dandong	0.7215	1.6786	0.8304
抚顺 Fushun	0.7090	1.7071	0.7593
阜新 Fuxin	0.7375	1.5514	0.7740
锦州 Jinzhou	0.7700	1.7767	0.8876
辽阳 Liaoyang	0.7281	1.6542	0.8129
葫芦岛 Huludao	0.7175	1.6150	0.7185
营口 Yingkou	0.7288	1.7119	0.9001
盘锦 Panjin	0.6932	1.4558	0.7118
沈阳 Shenyang	0.6860	1.6119	0.8124
铁岭 Tieling	0.6827	1.4356	0.7017

### 3.2 不同地区间聚类分析

严茂粉等<sup>[12]</sup>对北京地区野生大豆 10 个种群的聚类分析结果表明野生大豆种群遗传结构与地理分布有一定的相关性。王丹等<sup>[13]</sup>利用 27 对 SSR 引物扩增出 209 个多态性带,平均每个位点 7.74 个,Simpson 指数为 0.3998~0.8358,Shannon-weaver 指数为 0.7567~1.9879,并且发现冀东靠近海岸线地区的材料与内陆材料之间存在明显的遗传差异,同一居群的材料遗传距离较近。该研究对辽宁省不同地区的野生大豆分别进行了遗传多样性和聚类分析。结果地理位置较近的材料被划分为同一个分类,如沈阳、铁岭、抚顺、丹东几个地区被划分为一个大类,其它地区则被划分为另一个大类,从而形成了辽宁省野生大豆资源的 2 大亚类。

### 3.3 野生大豆资源收集的必要性

李向华等<sup>[14]</sup>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,利用 60 对引物进行遗传分析,结果表明新收集材料在 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,并且对东北地区野生大豆分布进行考察,发现由于畜牧业发展、开垦荒地以及公路建设等原因使野生大豆的分布面积锐减。该研究在材料采集过程中也对辽宁省野生大豆资源分布情况做了调查,全省野生大豆分布范围呈急剧减少的趋势,如绥中县砂子庙镇、喀左县龙庙镇等地,也包括李向华等<sup>[14]</sup>提到的凌源县和彰武县,已从以前的大面积分布减少为现在的零星分布,且披针叶形的材料已经很少发现。李向华等<sup>[14]</sup>的研究结果还表明新收集的野生大豆材料使总体材料的遗传多样性水平得到提高。结合该研究所进行的考察,对各个地区的资源进行加密收集是非常必要的,可以进一步充实和丰富我国大豆基因库,为大豆分子改良提供可靠基础。

## 参考文献

- [1] 董英山. 中国野生大豆研究进展[J]. 吉林农业大学学报, 2008,30(4):394-400. (Dong Y S. Advances of research on wild soybean in China[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2008,30(4):394-400.)
- [2] 王志友,王昌陵,董丽杰,等. 辽宁省野生大豆种质资源及利用现状[J]. 杂粮作物,2008(4):241-243. (Wang Z Y, Wang C L, Dong L J, et al. Germplasm resources and utilization of wild soybean in Liaoning province[J]. Rain Fed Crops, 2008(4):241-243.)
- [3] Lee J D, Yu J K, Hwang Y H, et al. Genetic diversity of wild soybean (*Glycine soja* Sieb. And Zucc.) accessions from south Korea and other countries crop [J]. Crop Science, 2008, 48(2):606-616.
- [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] 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.)
- [6] 关媛,鄂文弟,王丽侠,等. 以湖南和湖北大豆为例分析影响遗传多样性评价的因素[J]. 作物学报,2007,33(3):461-468. (Guan Y, E W D, Wang L X, et al. Analysis of factors influencing the genetic diversity evaluation using two soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] collections from Hunan and Hubei [J]. Acta Agronomica Sinica, 2007, 33(3):461-468.)
- [7] 王果,胡正,张保缺,等. 山西省野生大豆资源遗传多样性分析[J]. 中国农业科学,2008,41(7):2182-2190. (Wang G, Hu Z, Zhang B Q, et al. Genetic diversity analysis of Shanxi's wild soybean (*Glycine soja*) [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(7):2182-2190.)
- [8] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. Nucleic Acids Research, 1980, 8(19):4321-4325.
- [9] Xie H, Chang R Z, Cao Y S, et al. Selection of core SSR loci by using Chinese autumn soybean [J]. Scientia Agriculture Sinica, 2003, 36(4):360-366.
- [10] 高慧. 北方沿海滩涂野生大豆资源的收集与其遗传多样性的SSR分析[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学, 2008;22. (Gao H. Collection and genetic diversity of the northern coastal wild soybean by SSR [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2008;22.)
- [11] 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):28-32. (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):28-32.)
- [12] 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, et al. Evaluation of genetic diversity by SSR markers for natural populations of wild soybean growing in the region of Beijing, China [J]. Journal of Plant Ecology, 2008, 32(4):938-950.)
- [13] 王丹,乔亚科,韩粉霞,等. 河北东部沿海地区野生大豆SSR多样性分析[J]. 大豆科学,2010,29(4):555-558. (Wang D, Qiao Y K, Han F X, et al. Genetic diversity of *Glycine soja* in eastern coastal area of Hebei province [J]. Soybean Science, 2010, 29(4):555-558.)
- [14] 李向华,田子罡,李福山,等. 考察新收集野生大豆与已保存野生大豆的遗传多样性比较[J]. 植物遗传资源学报,2003,4(4):345-349. (Li X H, Tian Z G, Li F S, et al. Genetic analysis of newly collected wild soybean materials and conserved germplasm collected from the same places [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2003, 4(4):345-349.)
- [15] 海林,王克晶,杨凯. 半野生大豆种质资源SSR位点遗传多样性分析[J]. 西北植物学报,2002,22(4):751-757. (Hai L, Wang K J, Yang K, et al. Genetic diversity of semi-wild soybean using SSR markers [J]. Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica, 2002, 22(4):751-757.)
- [16] 陈辉,张磊,张文明,等. 安徽省新收集野生大豆种质资源的SSR分析[J]. 中国农学通报,2008,24(3):345-349. (Chen H, Zhang L, Zhang W M, et al. SSR analysis of newly collected wild soybean germplasms from Anhui province [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2008, 24(3):345-349.)
- [16] Olhoft P M, Flagel L E, Donovan C M, et al. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method [J]. Planta, 2003, 216:723-735.
- [17] 张东旭. 大豆胚尖再生体系的建立及E2基因遗传转化[D]. 保定:河北农业大学,2008:16. (Zhang D X. Establishment of an efficient plant regeneration system via embryonic tips of soybean and *Agrobacterium*-mediated E2 gene transformation using the embryonic tips explants [D]. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2008;16)
- [18] 袁鹰,刘德璞,郑培和,等. 大豆组织培养再生植株研究[J]. 大豆科学,2001,20(1):129-131. (Yuan Y, Liu D P, Zheng P H, et al. Study on plant regeneration from soybean culture [J]. Soybean Science, 2001, 20(1):129-131.)

(上接第367页)