

利用 SSR 标记分析小豆种质资源的遗传多样性

王丽侠, 程须珍, 王素华, 徐宁, 梁辉, 赵丹

(中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘要: 【目的】分析小豆起源国中国丰富的小豆种质资源的遗传多样性及群体结构, 提高这些种质在育种中的利用效率。【方法】选用 51 对 SSR 引物对国内外 145 份小豆种质进行多样性评价, 并分析了中国小豆种质资源间的遗传关系和遗传结构。【结果】共检测出 222 个等位变异, 每 SSR 位点的等位变异数为 2~13 不等, 平均为 4.35 个, 其中分布频率低于 5% 的等位变异数占 35.9%。多态性信息含量 (PIC 值) 为 0.014~0.838, 平均为 0.472。不同种质间遗传相似性系数为 0.227~0.951, 平均为 0.482。比较分析发现, 湖北、陕西等省小豆资源的遗传变异最丰富, 且遗传背景与中国主产区小豆存在较大差异。基于 NTSYS 的聚类可以将 145 份小豆种质划分为 5 组, 根据组内种质的地理来源, 可分别命名为东北组、华北 I 组、华北 II 组、华东组和混合组, 其中混合组主要由湖北、陕西及国外种质组成。利用 STRUCTURE 对小豆种质资源的遗传结构分析与 NTSYS 聚类结果基本一致, 即种质的遗传背景与地理来源有关。【结论】中国小豆种质资源遗传变异丰富, 不同地理来源小豆间存在遗传分化, 可以作为小豆生态区划的重要参考依据。

关键词: 小豆; SSR; 遗传多样性

Genetic Diversity Among Adzuki Bean Germplasm Revealed by SSR Markers

WANG Li-xia, CHENG Xu-zhen, WANG Su-hua, XU Ning, LIANG Hui, ZHAO Dan

(Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: 【Objective】 Adzuki bean originated from China, and there are abundant germplasm in China. Evaluation of the genetic diversity can accelerate the application of them in breeding program. 【Method】 In this study, 51 pairs of SSR primers were used to assess the genetic diversity and structure among 137 Chinese and eight alien adzuki bean germplasm. 【Results】 A total of 222 alleles were detected and the alleles with frequency lower than 5% accounted for about 35.9%. The number of alleles changed from 2 to 13 with an average of 4.35 per locus. The PIC value varied from 0.014 to 0.838, and the mean PIC value for SSRs on each linkage group was 0.440. The similarity coefficient between accessions varied from 0.227 to 0.951 and averaged at 0.487. Adzuki bean from Hubei and Shaanxi provinces had much higher genetic variations, and their genetic backgrounds are much different from that of other provinces. Cluster analysis divided the 145 accessions into five groups, which is much agreeable with that obtained in analysis by using STRUCTURE package, and the accessions within five groups almost related with their origins of geographical distribution. 【Conclusion】 There are abundant genetic variations in Chinese adzuki bean. The genetic differentiation among adzuki bean from different origins is important in dividing ecological region for Chinese adzuki bean.

Key words: adzuki bean; SSR; genetic diversity

0 引言

【研究意义】小豆 (*Vigna angularis*) 是豆科

(Leguminosae) 蝶形花亚科 (Papilionaceae) 菜豆族 (Phaseoleae) 豇豆属 (*Vigna*) 的一年生栽培种。小豆除富含蛋白质、维生素、矿质元素等营养物质, 还

收稿日期: 2008-10-21; 接受日期: 2009-06-15

基金项目: 农作物种质资源保护项目 (nb07-2130135-25-30-13)、食用豆类行业科研专项 (NyhyZX07-017)、国家食用豆产业技术体系 (08-18)

作者简介: 王丽侠 (1972-), 女, 副研究员, 博士, 研究方向为食用豆类资源。通信作者程须珍 (1954-), 女, 研究员, 研究方向为食用豆类资源。E-mail: chengxz@caas.net.cn; 010-62189159

具有清火解毒等药用价值^[1]。作为中国的传统、特色作物,小豆不仅在现代农业种植结构调整中起重要作用,也是重要的出口创汇商品^[2]。但近年来,随着中国小豆名优品种的退化严重及小豆引种植区域的扩大等方面的影响,中国小豆在国际市场的竞争面临严峻挑战。因此,发掘新的基因,提高小豆新品种选育水平,对增强中国小豆及其食品的国际市场竞争力,稳定国内小豆生产均具有重要意义^[3]。目前中国收集和保存的小豆种质资源 5 000 余份,分析这些种质资源的遗传多样性分布及遗传背景,既可发掘潜在的优异基因,提供育种利用,还能了解不同来源小豆资源的遗传差异,指导人们设计育种程序,加强资源利用效率,从而丰富中国小豆品种的遗传基础,提高小豆育种技术水平。【前人研究进展】以往对小豆种质资源的研究主要集中在表型分析与鉴定^[4-5]。虽然也有利用 DNA 分子标记研究小豆遗传多样性的报道,但所用标记类型主要为 AFLP^[6-10]、RAPD^[11-13]等通用型 DNA 标记。因 RAPD 具重复性差、AFLP 具耗费高、操作复杂、读带准确率低等诸多缺点。操作简单、耗费低的 SSR 标记逐渐取而代之应用于多样性分析^[14]及其它遗传研究中^[15-16]。小豆遗传研究相对薄弱,公开发表的 SSR 标记也非常有限,故在小豆种质资源的遗传分析中还很少用到。本课题组通过国际合作,从日本引进了近 200 对小豆 SSR 标记^[17]。初步分析表明,有 60% 的 SSR 引物在中国小豆种质资源中可以检测到多态性(未发表)。【本研究切入点】本研究利用几乎覆盖小豆全基因组的 51 对多态性 SSR 引物分析了 145 份不同来源小豆种质。【拟解决的关键问题】以明确中国小豆种质资源的遗传多样性水平、分布规律及不同来源种质间的遗传分化,为加强种质资源的收集与提高利用效率等研究奠定基础;基于本研究结果,文章最后作者还对小豆的生态区划进行了讨论。

1 材料与方法

1.1 实验材料

145 份小豆种质,分别从中国小豆核心样本中依据地理来源按 30% 的比例随机选取;其国内不同省份种质 137 份,国外种质 8 份,包括日本 6 份,朝鲜 1 份,澳大利亚 1 份(表 1)。

1.2 SSR 分析

用 CTAB 法从每份种质的 2-3 株小豆植株上取新鲜叶片混合提取基因组 DNA^[18]。选用的 51 对 SSR 引物几乎遍布小豆全基因组^[17,19]。PCR 扩增反应在

Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9600 热循环仪上进行。反应体积为 20 μ l (1 \times PCR 缓冲液, 2 mmol·L⁻¹MgCl₂, 100 μ mol·L⁻¹ dNTP, 0.4 mmol·L⁻¹引物, 20 ng DNA, 1 U Taq DNA 聚合酶)。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 然后以 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s 循环 35 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。扩增产物用 6% 的聚丙烯酰胺凝胶在恒功率 70 W 下电泳分离, 银染法染色, 具体操作程序主要参考 Van Toai 等^[20]。

1.3 数据处理

依据 SSR 等位变异在不同小豆种质中的分布,用 NTSYS 以非加权平均法(UPMGA)计算种质间 Nei-Li 遗传相似系数,并分别用 NTSYS 和 STRUCTURE 进行聚类分析作树状聚类图及遗传结构分析^[21-22];利用 POPGEN32 软件包计算多态性信息含量 PIC (Polymorphic information content) 值和群体间遗传分化系数 F_{st} ^[23];利用不同软件分析时,相应的转换数据格式。其它统计分析均在 Excel 表格中完成。

2 结果与分析

2.1 小豆种质资源的遗传多样性

51 对 SSR 引物共检测到 222 个等位变异, SSR 位点等位变异数的变化从 2 到 13 不等,平均每 SSR 位点检测到 4.35 个等位变异,其中检测等位变异数最多的是位于 LG5 的 SSR31 (13 个);不同连锁群上 SSR 位点的平均等位变异数见表 2。稀有等位变异(指分布频率小于 5% 的等位变异)占总等位变异数的 35.9%, 特异等位变异(指只在一份种质中检测到的等位变异)占 8.1%。其中国外 8 份种质分别在 SSR6 (LG1)、SSR35 (LG6)、SSR42 (LG7)、SSR44 (LG8) 等 4 个位点各检测到 1 个特异等位变异。

多态性信息含量 PIC 值的变异范围从 0.014 到 0.838, 平均为 0.472, PIC 值最高的是位于 LG1 的 SSR2, 最低的是位于 LG1 的 SSR5。简单相关分析表明 ($R=0.149$), 多态性信息含量与检测等位变异数不相关, 从侧面说明同一 SSR 位点不同等位变异的分布频率差异较大。等位变异分布频率的不均匀性, 预示着小豆种质资源中蕴含着丰富的低频率等位变异, 这是新基因发掘、种质创新等工作丰厚的物质基础。

国内不同省份小豆种质中检测等位变异数及其特异等位变异数见表 1。其中以安徽省小豆中特异等位变异数最高, 北京、湖北次之, 说明这些省市小豆种质资源中的遗传变异比较丰富, 将是新基因发掘的重

表 1 国内不同省份小豆种质的检测种质数、等位变异数及特异等位变异

Table 1 Number of accessions, alleles and specific alleles in different provinces of China

来源 Origin	检测种质数 Num of accessions	等位变异数 Num of alleles	特异等位变异数 Num of specific alleles
安徽 Anhui	15	162	9
北京 Beijing	20	136	3
河北 Hebei	15	136	1
河南 Henan	4	88	0
黑龙江 Heilongjiang	7	111	0
湖北 Hubei	8	139	2
吉林 Jilin	11	120	0
江苏 Jiangsu	7	110	1
辽宁 Liaoning	5	93	0
内蒙古 Inner Mongolia	8	110	1
山东 Shandong	11	115	0
山西 Shanxi	11	117	0
陕西 Shaanxi	11	143	4
天津 Tianjin	4	80	0

表 2 不同连锁群 SSR 位点在小豆种质中检测的等位变异数及 PIC 值

Table 2 The NA, PIC values for SSR loci in each linkage group

连锁群 Linkage group	等位变异数 Number of alleles	PIC 值 PIC value
1	4.2	0.565
2	3.29	0.41
3	4.2	0.446
4	4.14	0.477
5	6.0	0.556
6	5.2	0.424
7	4.75	0.436
8	3.33	0.346
9	3.75	0.463
11	5	0.277

点资源。

2.2 小豆种质间遗传关系及聚类

基于 NTSYS 分析发现, 145 份小豆种质间的遗传相似性系数变化从 0.227 到 0.951, 平均为 0.487。其中遗传背景差异最大的是山东宁阳红小豆和日本的农林 6 号, 遗传背景最近的是来自北京 86 早 46 和 86

早 1 号种质。依据遗传相似性系数, 利用 UPGMA 方法基本上可以将 145 份种质分为 5 大类别。同一省份内的种质在聚类图上大多成簇状分布, 但很难完全聚在一起; 其中除辽宁省外, 其它省份的种质分别分布于不同类别中。尤其是河北省、湖北省和国外种质分别被聚在 4 个不同类别 (表 3)。

除第 V 类外, 其余 4 大类别的划分基本和各省份的地理分布相吻合。其中东北三省的种质主要分布在第 II 类 (占 87.0%), 简称东北组; 来自华北的种质主要分布于第 II (48.3%)、第 III 类 (19.0%), 分别简称华北 I 组、华北 II 组; 来自安徽的种质主要分布在第 IV 类 (86.7%), 简称华东组。来自湖北、陕西的种质则与国外种质组成第 V 类, 简称混合组。陕西种质均来自陕南地区, 这可能是能够与湖北小豆聚在一起的主要原因。上述结果表明, 尽管同一省份内小豆种质间的遗传距离比较大, 同一生态区域小豆种质间的遗传背景相似程度较高。

表 3 聚类分析小豆群体与种质地理来源的分布

Table 3 Geographical distribution of adzuki bean within populations divided by cluster analysis

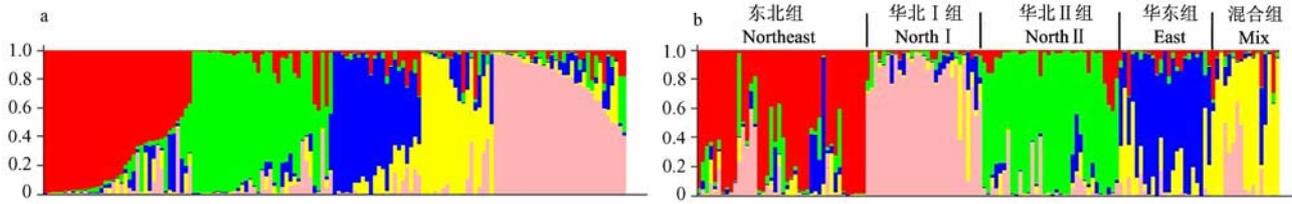
	东北组 Northeast	华北 I 组 North I	华北 II 组 North II	华东组 East	混合组 Mix
北京 Beijing	12	1	7		
天津 Tianjin	1		3		
河北 Hebei	3	1	9		2
山西 Shanxi		5	6		
内蒙 Inner Mongolia	4	4			
辽宁 Liaoning	5				
吉林 Jilin	8			3	
黑龙江 Heilongjiang	5		1	1	
江苏 Jiangsu	1			6	
安徽 Anhui	1		1	12	1
山东 Shandong		8	3		
河南 Henan		1	3		
湖北 Hubei	1	2	1	1	3
陕西 Shaanxi		5		1	5
国外 Aboard	1	1	1	1	4
合计 Total	42	28	35	25	15

2.3 小豆群体的遗传结构

利用 SSR 标记和 Structure 软件对 145 份小豆种质的群体遗传结构分析中发现, 在 $K=2\sim 8$ 中, 当 $K=5$ 时似然值最大, 即所分析的小豆种质从遗传结构上可

分为 5 类血缘 (图-a)。进一步分析显示这五类血缘的种质在地理分布上与聚类的分组结果基本一致(图),

即小豆种质资源的遗传背景在地理区域间存在分化,这说明外引种质有助于拓宽当地小豆的遗传背景。



a: K=5 时的群体遗传结构分析; b: 不同聚类群体在各类血缘中的分布
a: The genetic structure of adzuki bean when K=5; b: The distribution of clusters in different ancestry sources

图 基于 Structure 的小豆群体遗传结构分析

Fig. The genetic structure of adzuki bean populations based on structure package

3 讨论

3.1 小豆遗传多样性研究

对小豆种质资源的遗传多样性分析有助于新基因发掘、种质创新、新品种选育等工作的进一步开展。目前已有不少小豆遗传多样性研究的报道,包括表型数据^[5,24-25]和 DNA 分子标记的研究^[10,14]。研究均表明,小豆种质资源呈现一定的地理区域分化,并认为外引种质有助于拓宽当地小豆品种的遗传背景。不同国家及不同类型小豆的多样性分析则表明,栽培型小豆的遗传多样性均比较低,这对小豆的遗传研究如作图群体的构建等有一定局限性^[12,26]。然而所用标记类型及材料的差异也导致多样性水平存在差异^[7]。

由于 RAPD、AFLP 等通用型 DNA 标记在遗传多样性分析中存在缺陷,故逐渐被 SSR 标记所取代。小豆遗传研究相对落后,公开发表的 SSR 标记极其有限^[20]。叶剑等^[27]仅用 7 对 SSR 引物对不同国家 104 份小豆种质进行分析,检测到平均等位变异为 6.29 个,高于本研究结果 (4.35 个)。但 4 对共用引物检测的平均等位变异为 5.75 个,却低于本研究结果 (8.0 个)。因此说明中国小豆种质资源中存在丰富的等位变异类型。上述结果也显示所分析的大部分 SSR 引物的多态性水平较低,这势必降低其利用效率,因此利用多种渠道发掘更多的多态性 SSR 引物对深入发掘中国小豆资源的遗传变异尤为重要。

3.2 中国小豆遗传多样性分布

虽然本研究中的小豆种质几乎覆盖了中国小豆主产区的所有省份,但在选材时亦考虑了中国小豆种质资源分布的不均衡性,故不同省份的分析种质数存在

差异。对检测种质数相当的省份,如吉林、山东、陕西、山西的比较发现,陕西的等位变异数及特异等位变异数最高;而黑龙江、湖北、江苏及内蒙古相比,则以湖北最高;检测种质数较多的省份如安徽、北京、河北相比则以安徽的多样性最丰富。这与徐宁等的分析结果完全一致^[28]。上述进一步说明中国中西部省份的小豆种质资源中含有更丰富的遗传变异,尤其是一些低频率和特异等位变异的存在,为今后的资源收集、鉴定及新基因发掘、种质创新等工作提供了可靠信息。小豆主产区如黑龙江、天津、河北等省市的小豆种质资源遗传基础相对狭窄,可能是这些地区的小豆育种水平较高,新品种的示范和推广,导致生产上的主栽培种比较单一。因此,在制订今后的育种策略时,应尽力引进国内其它省份或国外材料来拓宽这些区域品种的遗传背景。

3.3 中国小豆生态区划

生态区划不仅对作物引种、育种具有重要的指导意义,对确定核心样本构建的策略也有一定的参考价值。中国大豆、小麦等主要农作物都进行过生态区划的研究^[29-30]。小豆对光温反应比较敏感,生态适应性较差,而目前关于小豆的生态区划还未形成公认的标准。胡家蓬^[31]根据不同来源种质资源的熟性,初步认为中国小豆可划分为东北生态区(东北三省及内蒙)、华北生态区(河北、山西、北京、天津)、黄河中游生态区(陕西、河南)和南方生态区(广西、云南)等 4 区,然而由于当时分析的种质数量有限,很多地区的小豆资源并没包括进去;金文林^[32]根据小豆生长发育所需的气候因子(温度、日照、降水量)进行聚类分析,将中国小豆划分为 8 个气候资源区。上述两

种划分方法的主要依据均与成熟期有很大关系, 而熟性仅仅是小豆农艺性状表现的一个方面, 很难反应小豆种质资源真实的遗传背景。

本研究所选 51 个 SSR 位点几乎遍布小豆基因组, 反映信息量比较全面、可靠, 因此将在 DNA 水平上为小豆生态区划提供重要的信息。研究表明依据 NTSYS 聚类分析后, 各群体间遗传分化均比较明显 ($F_{st}=15.7$), 然而由于五大类别种质的地理分布与省份不完全吻合, 尤其是华北地区的种质被分为两大类, 而详细分析发现这两类种质的地理分布并无明显规律, 故在生态区划时可以考虑合并; 基于上述分析, 笔者认为中国小豆区划基本上可以分为东北区、华北区、华东区、华中区和西南区, 这与胡加蓬的观点基本一致, 但就省份而言, 也存在一定差异, 比如本研究发现将山东和河南纳入华北区比较合适, 而安徽和江苏两省份内小豆的遗传背景比较特异, 有必要单独划为一区, 华中区主要为湖北、陕西两省; 另外, 因本研究中缺乏西南地区的小豆种质, 而以往对食用豆的研究表明, 西南山区的食用豆遗传背景也比较特异^[28,33], 故暂时可以单独划分一区。当然, 因小豆遗传背景与其地理分布相关, 那么随着小豆种植面积及种植区域的扩大, 本研究中未涉及到的省区小豆资源也可以暂时按照就近原理, 划入相应生态区。

4 结论

中国小豆种质资源遗传变异丰富。湖北、安徽及陕西等省份的特异变异类型较多, 应加强这些区域的资源收集与分析利用。地理生态环境对小豆遗传背景的影响较大, 可用于小豆生态区划的主要参考因子。

References

- [1] 龙静宜, 林黎奋, 侯修身, 段醒男, 段宏义. 食用豆类作物. 北京: 科学出版社, 1989.
Long J Y, Lin L F, Hou X S, Duan X N, Duan H Y. *Legume Crops*. Beijing: Science Press, 1989.
- [2] 郑卓杰. 中国食用豆类学. 北京: 中国农业出版社, 1997: 141-166.
Zheng Z J. *Food Legumes in China*. Beijing: Chinese Agricultural Press, 1995: 141-166. (in Chinese)
- [3] 林汝法, 柴岩, 廖琴, 孙世贤. 中国小杂粮. 北京: 中国农业出版社, 2002: 192-209.
Lin R F, Chai Y, Liao Q, Sun S X. *Minor Crops in China*. Beijing: Chinese Agricultural Press, 2002: 192-209. (in Chinese)
- [4] 田静, 赵春霞. 河北省小豆品种质资源主要农艺性状的遗传变异分析. 河北农业科学, 2001, 5(2): 7-11.
Tian J, Zhao C X. Genetic variability of agronomic traits of adzuki bean in Hebei province. *Journal of Hebei Agricultural Sciences*, 2001, 5(2): 7-11. (in Chinese)
- [5] 濮绍京, 金文林, 赵波, 王占丽. 中国北方小豆地方品种资源研究. 北京农学院学报, 2003, 18(3): 174-177.
Pu S J, Jin W L, Zhao B, Qang Z L. Study on adzuki bean variety sources of North China. *Journal of Beijing Agricultural College*, 2003, 18(3): 174-177. (in Chinese)
- [6] Yee E, Kidwell K K, Sils G R. Diversity among selected *Vigna angularis* accessions on the basis of RAPD and AFLP markers. *Crop Science*, 1999, 39: 268-275.
- [7] Xu R Q, Tomooka N, Vaughan A. AFLP markers for characterizing the adzuki bean complex. *Crop Science*, 2000, 40: 808-815.
- [8] 王述民, 张赤红. 利用 AFLP 标记鉴定小豆种质遗传多样性. 植物遗传资源学报, 2002, 3(3): 1-5.
Wang S M, Zhang C H. Genetic diversity of adzuki bean (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi) germplasm revealed by AFLP markers. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2002, 3(3): 1-5. (in Chinese)
- [9] Zong X X, Kaga A, Tomooka N, Wang X W, Han OK, Vaughan D. The genetic diversity of the *vigna angularis* complex in Asia. *Genome*, 2003, 46: 647-658.
- [10] 粟生群, 荣廷昭, 余跃辉, 刘坚. 利用 AFLP 标记鉴定小豆栽培型种质遗传多样性. 四川农业大学学报, 2005, 23(2): 156-162.
Su S Q, Rong T Z, Yu Y H, Liu J. Genetic diversity in cultivated adzuki bean germplasm resources revealed by AFLP markers. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2005, 23(2): 156-162. (in Chinese)
- [11] Mimura M, Yasua K, Yamaguchi H. RAPD variation in wild, weedy and cultivated adzuki beans in Asia. *Genetic Research and Crop Evolution*, 2000, 47: 603-610.
- [12] 王述民, 胡英考, 胡家蓬. 利用 RAPD 标记评价小豆种质遗传多样性. 植物遗传资源学报, 2002, 3(1): 14-19.
Wang S M, Hu Y K, Hu J P. Study on genetic diversity of adzuki bean (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi) germplasm based on RAPD markers. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2002, 3(1): 14-19. (in Chinese)
- [13] 金文林, 文自翔, 濮绍京, 赵波. 应用 RAPD 分析小豆种质资源遗传多样性及遗传演化趋势. 中国农业科学, 2005, 38(2): 241-249.
Jin W L, Wen Z X, Pu S J, Zhao B. Genetic diversity and evolution of adzuki bean germplasm resources based on RAPD markers. *Scientia Agricultural Sinica*, 2005, 38(2): 241-249. (in Chinese)
- [14] Wang L X, Guan R X, Liu Z X, Chang R Z, Qiu L J. Genetic diversity

- of Chinese cultivated soybean revealed by SSR markers. *Crop Science*, 2006, 46: 1032-1038.
- [15] Sun G L, Fahima T, Korol A B, Turpeinen T, Grama A, Ronin Y I, Nevo E. Identification of molecular markers linked to the Yr-5 stripe rust resistance gene of wheat originated in wild emmer wheat, *Triticum dicocoides*. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, 95: 622-628.
- [16] 李仕贵, 王玉平, 黎汉云, 周开达, 朱立煌. 利用微卫星标记鉴定水稻的稻瘟病抗性. *生物工程学报*, 2000, 16(3): 324-327.
- Li S G, Wang Y P, Li H Y, Zhou K D, Zhu L H. The identification of blast resistance in rice by SSR markers. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2000, 16(3): 324-327. (in Chinese)
- [17] Han O K, Kaga A, Isemura T, Wang X W, Tomooka N, Vaughan D A. A genetic linkage map for adzuki bean [*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi and Ohashi]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2005, 111: 1278-1287.
- [18] Doyle J J, Doyle J E. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin*, 1987, 19: 11-15.
- [19] Wang X X, Kaga A, Tomooka N, Vaughan D A. The development of SSR markers by a new method in plants and their application to gene flow studies in azuki bean [*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi and Ohashi]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 109: 352-360.
- [20] Van Toai TT, Peng J, Martin S. Optimization of silver staining AFLP technique for soybean. *Soybean Genetic Newsletter*, 1996, 23: 206-209.
- [21] Rohlf F J. NTSYS-PC: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter Software, New York. 1992.
- [22] Falush D, Stephens M, Pritchard J K. Inference of population structure using multi-locus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 2003, 164: 1567-1587.
- [23] Yeh F C, Boyle T J B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany*, 1997, 129: 157.
- [24] 金文林. 中国北方小豆地方品种资源的研究— I. 小豆农艺性状在南京生态条件下表现的相关性研究. *北京农学院学报*, 1989, 4(3): 34-41.
- Jin W L. A research on local variety resources of adzuki bean of northern China I. Study on correlation of quantitative traits of adzuki bean in Nanjing. *Journal of Beijing Agricultural College*, 1989, 4(3): 34-41. (in Chinese)
- [25] Sharma J D, Rathore P K. Genetic divergence in adzuki bean. *Crop Improvement*, 1994, 21(1-2): 49-53.
- [26] Kaga A, Hosaka K, Kimura T, Misoo S, Kamijima O. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for adzuki bean and its related genera. *Science Reports of Faculty of Agriculture, Kobe University*, 1993, 20(2): 171-176.
- [27] 叶 剑, 赵 波, 佟 星, 濮绍京, 万 平. 栽培小豆种质资源遗传多样性 SSR 标记分析. *北京农学院学报*, 2008, 23(1): 8-13.
- Ye J, Zhao B, Tong X, Pu S J, Wan P. Genetic diversity of cultivated adzuki bean germplasm resources based on SSR markers. *Journal of Beijing University of Agriculture*, 2008, 23(1): 8-13. (in Chinese)
- [28] 徐 宁, 程须珍, 王素华, 王丽侠, 赵 丹. 以地理来源分组、利用表型数据构建中国小豆核心种质. *作物学报*, 2008, 34 (8): 1366-1373.
- Xu N, Cheng X Z, Wang S H, Wang L X, Zhao D. The establishment of Chinese adzuki bean core collection based on the geographical distribution and phenotypes. *Acta Agronomica Sinica*, 2008, 34 (8): 1366-1373. (in Chinese)
- [29] 汪越胜, 盖钧镱. 中国大豆品种生态区划的修正 II. 各区范围及主要品种类型. *应用生态学报*, 2002, 13(1): 71-75.
- Wang Y S, Gai J Y. Study on the ecological regions of soybean in China II. Ecological environment and representative varieties. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2002, 13(1): 71-75. (in Chinese)
- [30] 苗果园, 张云亭, 候跃生, 尹 钧, 王士英. 中国小麦品种温光生态区划. *华北农学报*, 1993, 8(2): 33-39.
- Miao G Y, Zhang Y T, Hou Y S, Yin J, Wang G Y. Ecological regions of Chinese wheat based of light and temperature. *Acta Agriculture Botani-Sinica*, 1993, 8(2): 33-39. (in Chinese)
- [31] 胡家蓬. 小豆资源研究初报. *中国种业*, 1984, (1): 21-25.
- Hu J P. The primary study of adzuki bean genetic resources. *Crop Genetic Resources*, 1984, (1): 21-25. (in Chinese)
- [32] 金文林. 中国小豆生态气候资源分区初探. *北京农业科学*, 1995, 13(6): 1-4.
- Jin W L. The Primary study on ecological regions of Chinese adzuki bean. *Beijing Agricultural Sciences*, 1995, 13(6): 1-4. (in Chinese)
- [33] 王丽侠, 程须珍, 王素华, 刘长友, 梁 辉. 小豆 SSR 引物在绿豆基因组中的通用性分析. *作物学报*, 2009, 35(5): 816-820.
- Wang L X, Cheng X Z, Wang S H, Liu C Y, Liang H. Transferability of SSR from Adzuki Bean to Mungbean. *Acta Agronomic Sinica*, 2009, 35(5): 816-820. (in Chinese)