

## 大豆 CDDP 分子标记技术体系的优化、验证及引物筛选

李 强<sup>1,2</sup>, 苏二虎<sup>2</sup>, 高聚林<sup>1</sup>, 李丽君<sup>3</sup>, 谢 岷<sup>1</sup>, 于晓芳<sup>1</sup>

(1. 内蒙古农业大学 农学院, 内蒙古 呼和浩特 010019; 2. 内蒙古自治区农牧业科学院 玉米研究所, 内蒙古 呼和浩特 010031; 3. 内蒙古自治区种子管理站, 内蒙古 呼和浩特 010010)

**摘要:** CDDP 分子标记是一种新型目的基因分子标记技术。采用  $L_{16}(4^5)$  正交试验设计对影响大豆 CDDP-PCR 反应的  $Mg^{2+}$  浓度、Taq DNA 聚合酶用量、引物浓度、dNTPs 浓度和模板 DNA 用量等因素进行优化。优化后的大豆 CDDP-PCR 体系为:  $Mg^{2+}$  浓度  $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、Taq 聚合酶用量  $1.5 \text{ U}$ 、引物浓度  $0.375 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、dNTPs 浓度  $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、DNA 模板用量  $40 \text{ ng}$ 。该反应体系在 16 个大豆品种的验证中表现稳定可靠。利用大豆品种吉育 75、本地黑豆及其 9 株  $F_2$  代对该反应体系进行了初步的遗传验证, 结果显示, 杂交后代植株中出现了双亲的位点及亲本位点的缺失。并从 21 条引物中筛选出条带清晰、多态性较好的 13 条引物。该反应体系的建立为大豆种质遗传多样性分析、遗传连锁图谱构建及分子标记辅助育种奠定了基础。

**关键词:** 大豆; CDDP; 正交设计; 体系验证; 引物筛选

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2013)03-0310-07

## Optimization, Validation and Primer Screening of CDDP Molecular Marker System in Soybean

LI Qiang<sup>1,2</sup>, SU Er-hu<sup>2</sup>, GAO Ju-lin<sup>1</sup>, LI Li-jun<sup>3</sup>, XIE Min<sup>1</sup>, YU Xiao-fang<sup>1</sup>

(1. College of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010019, China; 2. Maize Research Institute, Inner Mongolia Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Huhhot 010031, China; 3. Seeds Management Station of Inner Mongolia, Hohhot 010010, China)

**Abstract:** Conserved DNA-Derived Polymorphism (CDDP) is a novel gene targeted marker technique.  $L_{16}(4^5)$  orthogonal experiment design were applied to optimize CDDP-PCR amplification system of soybean in five factors of  $Mg^{2+}$ , Taq DNA polymerase, primer, dNTPs and template DNA. The suitable reaction system was obtained, that was  $20 \mu\text{L}$  containing  $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$ ,  $1.5 \text{ U}$  Taq polymerase,  $0.375 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  primer,  $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTPs,  $40 \text{ ng}$  DNA template. The optimized CDDP-PCR system was tested on sixteen soybeans, and the result was stable and reliable. Amplifications and genetic verification were carried out on Jiyu 75, local black soybean and 9  $F_2$  progenies from Jiyu 75  $\times$  local black soybean. The results showed that the site in all progenies were derived from their parents and had their parents' deletion. From the 21 primer combinations tested, thirteen were selected with clear band patterns and abundant polymorphism. The system provides the basis for evaluation of genetic diversity, construction of genetic linkage map and molecular marker assisted breeding for the soybean.

**Key words:** Soybean; CDDP; Orthogonal design; System validation; Primers screening

大豆是重要的粮油兼用作物, 是人类食用油和植物蛋白的主要来源<sup>[1]</sup>。大豆起源于我国, 其栽培历史悠久, 经过长期自然选择、人工栽培, 产生了丰富的遗传变异类型。但是, 品种退化、品种混乱严重给大豆种质鉴别和大豆育种工作带来了诸多困难, 而分子标记技术可有效地进行品种鉴定、遗传多样性研究, 并能很好地指导育种工作<sup>[2]</sup>。前人已先后应用 RAPD<sup>[3]</sup>、AFLP<sup>[4]</sup>、SSR<sup>[5]</sup>、ISSR<sup>[6]</sup>、SRAP<sup>[7]</sup> 等分子标记技术对大豆种质遗传多样性、亲缘关系鉴定及杂交后代鉴定等多方面进行了研究。但这些分子标记技术都是传统意义上的随机 DNA 分子标记, 或是扩增基因组非编码区域, 或是随机在基因组中扩增, 扩增位点往往与目标性状基因位点距离较远, 虽各具特点, 但均不理想<sup>[8]</sup>。随着功能基因组学和大规模测

序技术的发展, 目的基因分子标记备受研究者关注, 在随机分子标记技术基础上增加了对 DNA/cDNA 等相关序列信息的需求, 但并不需要目的基因及其等位基因的序列信息, 这类标记本身可能是目的基因的一部分或者与目的基因紧密连锁, 并且该类技术在不同物种间可以通用<sup>[9]</sup>。因此, 建立一套简单、有效、实用的目的基因分子标记技术对大豆亲缘关系鉴定、遗传多样性及分子标记辅助育种具有重要意义。

来源保守 DNA 序列多态性 (conserved DNA-derived polymorphism, CDDP) 分子标记是 Collard 等 2009 年在水稻上提出的一种基于 DNA 保守序列的新型分子标记方法。其原理是根据一些功能得到验证的重要基因或基因家族中的保守氨基酸序列对应的 DNA 保守序列在不同物种间也是相当保守

收稿日期: 2013-01-30

基金项目: 内蒙古自治区科技创新引导奖励资金项目 (20111017); 内蒙古农牧业科学院青年创新基金项目 (2011QNJJN07)。

第一作者简介: 李强 (1982-), 男, 在读博士, 助理研究员, 主要从事大豆育种、栽培研究。E-mail: hamerliqiang@163.com。

通讯作者: 高聚林 (1964-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事作物生理生态及决策系统研究。E-mail: gaojulin@yahoo.com.cn。

的,利用多重比较软件对来自不同物种的功能基因序列或功能蛋白质序列进行多重比较,找出不同物种中同时存在的保守 DNA 或蛋白质序列,为引物的设计提供锚定位点。这类基因大多数是多基因家族,因此,引物在整个基因组内有很多的结合位点,从而为单引物进行 PCR 扩增提供可能。CDDP 标记结合了 RAPD 和 ISSR 标记的优点,操作简单,稳定性、重复性更好,引物设计简单,标记开发费用较少,引物具有通用性,能产生丰富的遗传信息<sup>[10]</sup>。但目前国内外 CDDP 分子标记应用很少,仅在水稻<sup>[10]</sup>、欧白英<sup>[11]</sup>等作物上成功应用,尚未见有 CD-DP 标记在大豆上应用的研究报道。为此,以大豆为材料,采用  $L_{16}(4^5)$  正交试验设计建立了大豆 CD-DP-PCR 反应体系,并对该反应体系进行了验证及引物筛选,旨在为研究大豆的遗传多样性、遗传图谱构建及分子标记辅助育种提供新的技术手段。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

试验用大豆地方品种、育成品种及  $F_2$  代材料 25 个。正交设计所用大豆品种为本地黑豆;体系稳定性验证所用大豆品种为蒙豆 9 号、吉林 30、四粒黄、小粒秣食豆、Weber、铁豆 46、铁 02064-17、吉育 82、蒙豆 14、Decabig、蒙豆 30、合丰 50、铁荚四粒黄、中

黄 35、吉育 75、本地黑豆;体系遗传验证所用材料为吉育 75、本地黑豆及其 9 个  $F_2$  代材料。所有材料 2012 年种植在内蒙古农牧业科学院试验地,同年 5 月 12~19 日采集幼嫩真叶,液氮速冻后用冰盒带回实验室,贮存于  $-70^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱备用。

供试 CDDP 引物 21 条,由 Collard 等<sup>[10]</sup>将转录因子 WRKY、MYB、ERF、KNOX、MADS-BOX 及生长素结合蛋白 ABP1 作为引物的锚定序列所设计,所有引物由上海生工生物工程有限公司合成;Taq DNA 聚合酶、 $\text{Mg}^{2+}$ 、dNTPs、 $10\times$  Buffer 等均购自宝生物工程(大连)有限公司;DL3000 marker 购自南京博尔迪生物有限公司;植物基因组 DNA 提取试剂盒购自 QIAGEN 公司;核酸染料购自赛百盛公司。

1.2 DNA 模板的提取与检测

参照植物基因组 DNA 提取试剂盒说明提取叶片总 DNA。所得的 DNA 用紫外分光光度计和 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测其浓度及纯度。根据检测结果,将 DNA 浓度稀释至  $20\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

1.3 CDDP-PCR 扩增程序及电泳检测

PCR 反应在美国 BIO-RAD 公司 MYCycler PCR 仪中进行,扩增程序为: $94^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min; $94^{\circ}\text{C}$  变性 50 s, $48.5\sim 52.5^{\circ}\text{C}$  退火 1 min, $72^{\circ}\text{C}$  复性 2 min,35 个循环;最后  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 8 min。扩增反应结束后,取  $10\text{ }\mu\text{L}$  扩增产物,加入  $2\text{ }\mu\text{L}$   $6\times$  loading buffer,在 1.5%

表 1 大豆 CDDP-PCR 反应体系  $L_{16}(4^5)$  正交试验设计

Table 1  $L_{16}(4^5)$  orthogonal experimental design of soybean CDDP-PCR

处理组合 Treatment No.	模板 DNA 用量 Template DNA/ng	镁离子 $\text{Mg}^{2+}/\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	脱氧核苷酸 dNTPs/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	引物 Primer/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Taq 聚合酶 Taq polymerase/U
1	20	1.5	0.2	0.125	0.5
2	20	2.0	0.3	0.250	1.0
3	20	2.5	0.4	0.375	1.5
4	20	3.0	0.5	0.500	2.0
5	30	1.5	0.3	0.375	2.0
6	30	2.0	0.2	0.500	1.5
7	30	2.5	0.5	0.125	1.0
8	30	3.0	0.4	0.250	0.5
9	40	1.5	0.4	0.500	1.0
10	40	2.0	0.5	0.375	0.5
11	40	2.5	0.2	0.250	2.0
12	40	3.0	0.3	0.125	1.5
13	50	1.5	0.5	0.250	1.5
14	50	2.0	0.4	0.125	2.0
15	50	2.5	0.3	0.500	0.5
16	50	3.0	0.2	0.375	1.0

琼脂糖凝胶(含核酸染料)中电泳,电极缓冲液为  $0.5 \times \text{TBE}$ ,最后在 SN-NJ0601 凝胶成像系统观察和记录。

#### 1.4 正交试验设计

以大豆地方品种本地黑豆 DNA 为模板,以 16 号引物(MADS-2)进行扩增,该引物是根据 MADS-BOX 转录因子设计的,序列为: ATGGGCCGSG-GCAAGGTGG。将模板 DNA 用量、 $\text{Mg}^{2+}$  浓度、dNTPs 浓度、引物浓度、Taq 聚合酶用量 5 种因素设置 4 个不同水平(表 1),采用  $L_{16}(4^5)$  正交设计对大豆 CDDP-PCR 进行体系优化,2 次重复,各处理总体积  $20 \mu\text{L}$ ,每个处理的  $10 \times \text{Buffer}$  用量均为  $2 \mu\text{L}$ 。按照进行遗传多样性分析、QTL 定位的要求,依据电泳条带的多少、清晰度、灵敏度、特异性及背景颜色进行打分<sup>[12-13]</sup>,利用正交设计助手专业软件,取 2 次得分的平均值进行直观分析和方差分析,求出各因素同一水平下的得分平均值( $k_i$ )及各因素不同水平间的极差(R)。

#### 1.5 大豆 CDDP-PCR 最适退火温度的筛选

在  $45 \sim 54^\circ\text{C}$  的温度范围内,PCR 仪自动生成 8 个温度梯度,分别为 45.0,45.6,46.7,48.3,50.4,52.1,53.2 和  $54.0^\circ\text{C}$ 。对 21 条引物进行最适退火温度的筛选。

#### 1.6 反应体系稳定性验证及多态性 CDDP 引物筛选

采用优化好的反应体系,用 16 个大豆品种检测反应体系的稳定性,并对 21 条引物进行多态性筛选。

#### 1.7 CDDP 分子标记在大豆杂交后代中的初步遗传验证

利用 16 号引物(MADS-2)对大豆品种吉育 75、本地黑豆及其 9 个  $F_2$  代材料进行 CDDP 标记的进一步遗传验证。

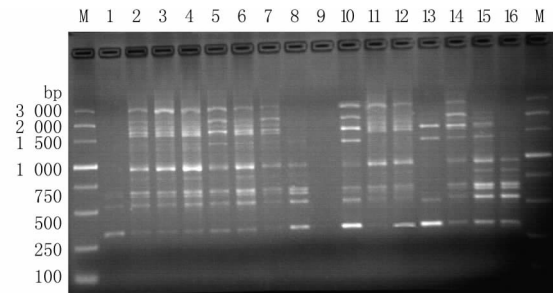
## 2 结果与分析

#### 2.1 大豆 CDDP 反应体系的正交试验分析

由正交试验电泳结果(图 1)可看出,由于不同处理中各因素用量搭配的不同,其扩增结果差异较大。其中,处理 9 无扩增条带,处理 1 扩增条带较弱,处理 13、16 扩增条带较少,处理 5、10、14 扩增条带多且清晰。

极差(R)的大小反映该因素对试验结果的影响程度,R 值越大表明该因素对试验结果影响越大。由表 2 可看出,5 个因素中, $\text{Mg}^{2+}$  浓度的 R 值最大,对试验结果的影响最大,其次为 Taq 酶用量、引物浓

度、dNTPs 浓度,模板 DNA 用量的 R 值最小,说明其对试验的影响最小。方差分析结果(表 3)也显示,除模板 DNA 用量外,其他 4 个因素对试验结果的影响都达到了显著水平。



M. DL3000 marker,从左到右依次为正交表  $L_{16}(4^5)$  的 1 ~ 16 个处理。

M. DL3000 marker, 1 to 16 corresponding to treatments of  $L_{16}(4^5)$ .

图 1 大豆 CDDP-PCR 反应体系  
正交试验优化结果

Fig. 1 Results of soybean CDDP-PCR system  
optimized with orthogonal design

表 2 大豆 CDDP-PCR 反应体系正交设计直观分析结果

Table 2 Intuitive analysis result of  
orthogonal design of soybean CDDP-PCR

参数 Parameter	模板 DNA Template DNA/ng	镁离子 $\text{Mg}^{2+}$ /nmol·L <sup>-1</sup>	脱氧核 苷酸 dNTPs /nmol·L <sup>-1</sup>	引物 Primer /μmol·L <sup>-1</sup>	Taq 聚合酶 Taq polymerase/U
$k_1$	8.75	5.25	6.25	8.75	7.00
$k_2$	8.25	13.00	11.00	6.50	5.75
$k_3$	9.25	8.50	8.00	12.00	9.75
$k_4$	7.75	7.25	8.75	6.75	11.50
R	1.50	7.75	4.75	5.50	5.75

$k_1 \sim k_4$ : 各因素各水平下的得分数据平均值;R: 极差。

$k_1 \sim k_4$ : Mean of score in four factors; R: Range.

表 3 大豆 CDDP-PCR 反应体系正交设计方差分析

Table 3 Variance analysis of orthogonal  
design of soybean CDDP-PCR

因素 Source	自由度 df	方差 SS	均方 MS	F 值 F value
$\text{Mg}^{2+}$	3	43.17	14.39	25.90 *
dNTPs	3	15.50	5.17	9.30 *
primer	3	25.83	8.61	15.50 *
Taq	3	27.17	9.06	16.30 *
DNA	3	1.67	0.56	
Error	16	1.67	0.56	
Total	31	115.01		

\* 代表 0.05 水平差异显著。

\* means significant difference at 0.05 level.

结果均值大小反映各因素各个水平间的差异,理论上结果均值越大说明该水平越合适。由图 1、表 2 可看出,当  $Mg^{2+}$  浓度为  $1.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时,条带很弱(组合 1、9、13)。当  $Mg^{2+}$  浓度处于  $2.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时,结果均值为 13.00,显著高于其他水平,扩增结果也最为清晰(组合 2、6、10、14);*Taq* 酶用量结果均值( $k_4$ )最大,结合图 1 中组合 3、6 的扩增效果并从经济角度考虑,选择 1.5 U 作为 *Taq* 酶的最佳用量;引物浓度较低时,扩增条带模糊,并且有缺带现象(组合 1、8、13)。当引物浓度处于  $0.375\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时,结果均值为 12.00,显著高于其他水平,扩增结果清晰(组合 3、5、10);dNTPs 浓度各水平间差异不显著, $0.3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时,其结果均值最大,扩增结果清

晰(组合 2、5);模板 DNA 用量影响不显著,各水平间差异也不大,40 ng 时结果均值相对较大,扩增结果清晰(组合 10、11、12)。

综上,确定正交试验的最优体系为: $Mg^{2+}$  浓度  $2.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、*Taq* 聚合酶用量 1.5 U、引物浓度  $0.375\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、dNTPs 浓度  $0.3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、模板 DNA 用量 40 ng。

2.2 大豆 CDDP-PCR 最适退火温度的筛选

根据电泳检测结果,选择扩增条带数量多、清晰、稳定性好的作为最适退火温度,扩增效果相同的情况下选择温度高的作为最适退火温度,以确保 PCR 产物的特异性。各引物最适退火温度如表 4 所示,其中引物 17 和 20 在 8 个温度下都没有扩增产物。

表 4 CDDP 引物最适退火温度  
Table 4 Annealing temperatures of CDDP primer

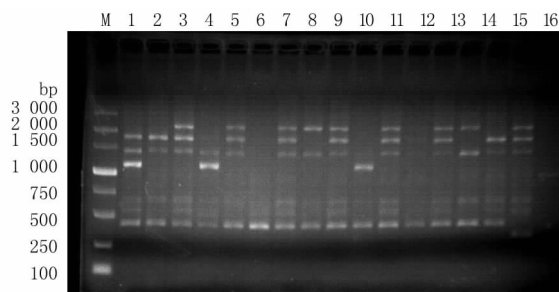
引物编号 Primer No.	基因 Gene	氨基酸序列 Amino acid motif	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Sequence(5'-3')	退火温度 Annealing temperatures/℃
1	WRKY	WRKYGQ	WRKY-F1	TGGCGSAAGTACGGCCAG	52.1
2	WRKY	GKHNH	WRKY-R1	GTGCTTGTGCTTGCC	48.3
3	WRKY	TTYEG	WRKY-R2	GCCCTCGTASGTS GT	48.3
4	WRKY	GEHTC	WRKY-R3	GCASGTGTGCTCGCC	50.4
5	WRKY	TTYEG	WRKY-R2B	TGSTGSATGCTCCCG	50.4
6	WRKY	GEHTC	WRKY-R3B	CCGCTCGTGTGSACG	50.4
7	MYB	GKSCR	Myb1	GGCAAGGGCTGCCGC	52.1
8	MYB	GKSCR	Myb2	GGCAAGGGCTGCCGG	52.1
9	ERF	HYRGVR	ERF1	CACTACCGCGSCTSCG	53.2
10	ERF	AEIRDP	ERF2	GCSGAGATCCGSGACCC	53.2
11	ERF	WLGTF	ERF3	TGGCTSGGCACSTTCGA	50.4
12	KNOX	KGKLPK	KNOX-1	AAGGCSAAGCTSCCSAAG	50.4
13	KNOX	HWWELH	KNOX-2	CACTGGTGGGAGCTSCAC	50.4
14	KNOX	KRHWKP	KNOX-3	AAGCGSCACTGGAAGCC	50.4
15	MADS	MGRGKV	MADS-1	ATGGGCCGSGGCAAGGTGC	53.2
16	MADS	MGRGKV	MADS-2	ATGGGCCGSGGCAAGGTGG	53.2
17	MADS	LCDAEV	MADS-3	CTSTGCGACCGSGAGGTC	-
18	MADS	LCDAEV	MADS-4	CTSTGCGACCGSGAGGTG	53.2
19	ABP1	TPIHR	ABP1-1	ACSCCSATCCACCGC	50.4
20	ABP1	TPIHR	ABP1-2	ACSCCSATCCACCGG	-
21	ABP1	HEDVQ	ABP1-3	CACGAGGACCTSCAGG	50.4

- 代表各温度下均无扩增产物。  
- means there were no amplification products under different temperature.

2.3 CDDP-PCR 反应体系的稳定性验证

应用优化好的 20  $\mu\text{L}$  大豆 CDDP-PCR 反应体系,用 CDDP16 号引物对 16 个大豆品种进行扩增,

由图 2 可见,所有材料都能扩增出清晰稳定的条带,且多态性丰富,重复性好,反应体系稳定。表明该反应体系非常适合大豆 CDDP-PCR 分析。



M: DL3 000 marker; 1~16. 蒙豆 9 号、吉林 30、四粒黄、小粒秣食豆、Weber、铁豆 46、铁 02064-17、吉育 82、蒙豆 14、Decabig、蒙豆 30、合丰 50、铁荚四粒黄、中黄 35、吉育 75、本地黑豆。

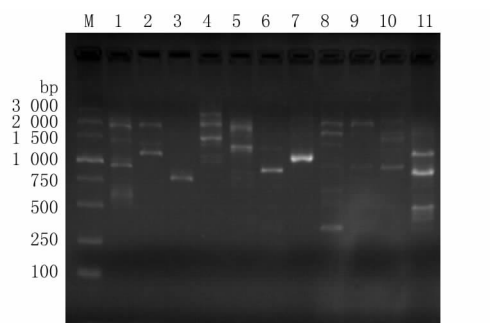
M: DL3 000 DNA Marker; 1-16. Mengdou 9, Jilin 30, Silihuang, Xiaolimoshidou, Weber, Tiedou 46, Tie 02064-17, Jiyu 82, Mengdou 14, Decabig, Mengdou 30, Hefeng 50, Tiejiasilihuang, Zhonghuang 35, Jiyu 75, Local black soybean.

图 2 引物 CDDP 16 对 16 个大豆品种的 CDDP-PCR 扩增

Fig. 2 CDDP-PCR amplification of 16 soybeans varieties using primer CDDP 16

## 2.4 CDDP 引物的筛选

采用优化好的大豆 CDDP-PCR 反应体系及本地黑豆基因组 DNA, 对 21 条引物进行多态性筛选。结果显示, 19 条引物能扩增出清晰可辨的条带, 条带数目 1~12 条不等, 部分引物扩增效果见图 3。筛选出 13 个条带清晰、多态性好的引物用于后续遗传多样性分析。



M: DL 3 000 marker; 1~11; CDDP 引物 1, 2, 4, 8, 9, 10, 15, 16, 18, 21, 19。

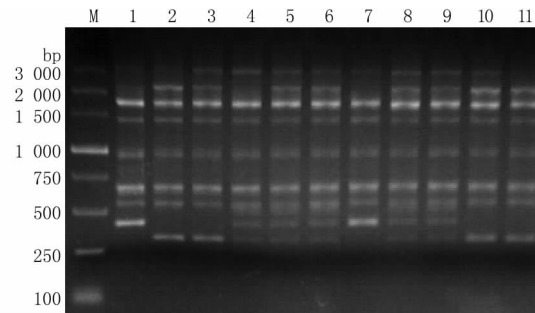
M: DL 3 000 DNA marker; 1 to 11; CDDP primers. 1, 2, 4, 8, 9, 10, 15, 16, 18, 21, 19.

图 3 部分 CDDP 引物筛选结果

Fig. 3 Part of CDDP primer screening results

## 2.5 CDDP 分子标记在大豆杂交后代中的初步遗传验证

应用建立的 CDDP 技术体系对吉育 75、本地黑豆及其 9 株  $F_2$  代材料进行 PCR 扩增和电泳检测。结果显示, 扩增条带清晰, 扩增产物大小为 250~3 000 bp。并且在杂交后代植株中出现了双亲的位点及亲本位点的缺失 (图 4)。



M: DL3 000 marker; 1: 吉育 75; 2: 本地黑豆; 3~11: 吉育 75 × 本地黑豆的  $F_2$  后代。

M: DL3 000 DNA marker; 1. Jiyu75; 2. Local black soybean; 3~11: Progenies from Jiyu75 × Local black soybean.

图 4 引物 CDDP16 对吉育 75 和本地黑豆及其杂交后代的扩增图谱

Fig. 4 Amplification profiles of hybrids of and their parents by primer CDDP 16

## 3 讨论

CDDP 标记作为一种基于 PCR 技术的新型分子标记具有几大特点: (1) CDDP 是一种利用单引物进行扩增的分子标记方法, 扩增产物在琼脂糖凝胶上分离, 操作简单、可靠, 易于各物种反应体系的建立。 (2) 与 RAPD 和 ISSR 标记相比, 它是一种目的基因分子标记技术, 能有效地产生和目标性状连锁的分子标记, 在品种鉴定、遗传多样性分析及分子标记辅助育种中具有重要的应用价值。 (3) CDDP 引物长度为 15~19 bp, 较 RAPD 标记长度更长, GC 含量更高, 重复性更好。 (4) CDDP 引物设计简单, 标记开发费用较少, 并且, 引物具有通用性, 可广泛地应用到各物种中。 (5) CDDP 标记多态性高, 可获得的遗传信息丰富, 能很好地反应物种的亲缘关系和遗传多样性<sup>[14]</sup>。CDDP 反应体系受  $Mg^{2+}$  浓度、dNTPs 浓度、引物浓度、Taq 聚合酶用量和模板 DNA 用量等诸多因素的影响, 因此, 采用 CDDP 分子标记时有必要对其 PCR 体系进行优化。

PCR 反应体系的优化的方法有很多种, 主要有单因素试验、正交试验设计、均匀设计等。单因素试验能对影响试验结果的每个因素逐个优化, 操作比较简单, 因素不同水平的扩增效果对比比较明显, 能从中轻易选出该因素的最佳用量。该方法缺陷主要在于没有考察 PCR 反应体系中各组分的交互作用, 也不能保证各组分最佳浓度的组合就是最佳反应体系<sup>[15]</sup>。正交试验设计可综合考察 PCR 反应体系中各组分之间的交互作用, 可快速获得满意的试验结果, 节省人力物力<sup>[16]</sup>。因此, 本试验在前期单因素试验基础上, 用正交试验设计对 CDDP-PCR 反应体系中的关键影响因子进一步优化, 最终确立大豆 CDDP-PCR 最佳的反应体系。

本试验研究结果表明, 在一定范围内,  $Mg^{2+}$  浓

度对大豆 CDDP-PCR 扩增结果影响最大,  $Mg^{2+}$  浓度过低会降低 Taq 聚合酶的活性, 使扩增条带减少, 浓度过高会引起非特异性扩增。这与侯小改等<sup>[8]</sup>、秦国新等<sup>[17]</sup>在目标起始密码子多态性(start codon targeted polymorphism, SCoT) 标记中的研究结果相一致。酶的活性与用量直接关系到扩增反应的成败, 是反应中最重要的因子之一, 其浓度过低扩增速率低、条带少且弱, 重复性、稳定性较差, 酶浓度过高则会产生非特异性条带。本试验中 Taq 酶用量相对较大, 这与谢云海等<sup>[18]</sup>、苏辉等<sup>[19]</sup>的研究结果一致, 与何海燕等<sup>[20]</sup>、刘海云等<sup>[21]</sup>在大豆 ISSR 和 SSR 中的研究结果有差异。本研究中引物浓度与 dNTPs 浓度对扩增结果的影响也达到了显著水平。引物浓度过低, 其与 DNA 模板的结合位点减少, 扩增量也随之减少, 浓度过高易产生错配, 非特异性扩增增多; dNTPs 浓度过低影响扩增效率, 产物较少, 浓度过高, 错误渗入率会大大增加, 也可导致酶活性下降, 影响重复性。相比较而言 DNA 用量对试验结果影响不显著, 说明 CDDP 反应体系对模板浓度要求不是很高。

Collard 等<sup>[10]</sup>提出 CDDP 分子标记技术后, 只是通过了水稻品种遗传亲缘关系验证, 并未在分离群体后代中进行遗传验证。本研究对吉育 75、本地黑豆及部分杂交后代进行了初步的多态性分析, 结果表明, 16 号引物在双亲中有多态性, 后代中出现了母本的带型、父本的带型、父母本的带型及父母本带型的缺失类型。这与韩国辉等<sup>[22]</sup>对柑橘 SCoT 的研究有一定的差异, 他们研究结果表明在杂交后代植株中出现双亲的带型、亲本位点的缺失及非双亲新位点, 但本研究中暂未发现非双亲新位点。本研究选取的杂交后代数量虽少, 但是基本上证明了 CDDP 标记用于杂交后代鉴定、遗传连锁图谱构建等研究是完全可行的。

## 4 结 论

综合正交设计试验结果, 得到的 20  $\mu\text{L}$  大豆最佳 CDDP-PCR 体系为:  $Mg^{2+}$  浓度  $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、Taq 聚合酶用量 1.5 U、引物浓度  $0.375 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、dNTPs 浓度  $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、DNA 模板用量 40 ng。利用大豆种质资源及  $F_2$  杂交后代初步验证了该体系的稳定性及 CDDP 标记技术的有效性。初步筛选出了 13 个多态性较好的 CDDP 引物, 为今后的遗传多样性分析、遗传连锁图谱构建、分子标记辅助育种奠定基础。

## 参考文献

[1] Cho M J, Widholm J M, Vodkin L O. Cassettes for seed-specific expression tested in transformed embryogenic cultures of soybean

- [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1995, 13: 255-269.
- [2] 姚丹, 闫伟, 张扬, 等. 分子标记技术在大豆遗传育种中的应用[J]. 吉林农业科学, 2009, 34(6): 31-33. (Yao D, Yan W, Zhang Y, et al. Applications of molecular marker in the soybean genetic breeding[J]. Jilin Agricultural Sciences, 2009, 34(6): 31-33.)
- [3] 张志永, 盖钧镒. RAPD 在大豆种质资源及遗传连锁研究中的应用[J]. 大豆科学, 1997, 16(1): 60-65. (Zhang Z Y, Gai J Y. Utilization of RAPD in soybean germplasm resources and genetic linkage studies[J]. Soybean Science, 1997, 16(1): 60-65.)
- [4] 田清震, 盖钧镒, 喻德跃. 大豆 DNA 扩增片段长度多态性(AFLP)研究[J]. 大豆科学, 2000, 19(3): 210-217. (Tian Q Z, Gai J Y, Yu D Y. A study on amplified fragment length polymorphism(AFLP) in soybean[J]. Soybean Science, 2000, 19(3): 210-217.)
- [5] 关荣霞, 刘燕, 刘章雄, 等. 利用 SSR 方法鉴定大豆品种纯度[J]. 分子植物育种, 2003, 1(3): 357-360. (Guan R X, Liu Y, Liu Z X, et al. Purity identification of soybean varieties with SSR technique[J]. Molecular Plant Breeding, 2003, 1(3): 357-360.)
- [6] 何海燕, 沙伟, 张艳馥. 黑龙江省大豆种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 大豆科学, 2011, 30(1): 37-40. (He H Y, Sha W, Zhang Y F. Genetic diversity analysis of soybean germplasm in Heilongjiang province by ISSR markers[J]. Soybean Science, 2011, 30(1): 37-40.)
- [7] 王芳, 徐翔, 李领川, 等. 大豆种质资源 SRAP 分子标记中的引物筛选[J]. 生物技术通报, 2012(7): 83-87. (Wang F, Xu X, Li L C, et al. Primer screening on germplasm resources of *Glycine max* (L.) Merr. with SRAP molecular marker[J]. Biotechnology Bulletin, 2012(7): 83-87.)
- [8] 侯小改, 王娟, 贾甜. 牡丹 SCoT 分子标记正交优化及引物筛选[J]. 华北农学报, 2011, 26(5): 92-96. (Hou X G, Wang J, Jia T. Orthogonal optimization of SCoT-PCR system and primer screening of tree peony[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2011, 26(5): 92-96.)
- [9] 熊发前, 蒋菁, 钟瑞春, 等. 分子标记技术的两种新分类思路及目标分子标记技术的提出[J]. 中国农学通报, 2010, 26(10): 60-64. (Xiong F Q, Jiang J, Zhong R C, et al. Two novel classifications on molecular marker techniques and proposal of targeted molecular marker technique[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(10): 60-64.)
- [10] Collard B C Y, Mackill D J. Conserved DNA-derived polymorphism (CDDP): A simple and novel method for generating DNA markers in plants[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2009, 27: 558-562.
- [11] Poczai P, Varga I, Bell N E, et al. Genetic diversity assessment of bittersweet (*Solanum dulcamara*, *Solanaceae*) germplasm using conserved DNA-derived polymorphism and intron-targeting markers[J]. Annals of Applied Biology, 2011, 159: 141-153.
- [12] 何正文, 刘云生, 陈立华. 正交设计直观分析法优化 PCR 条件[J]. 湖南医科大学学报, 1998, 23(4): 403-404. (He Z W, Liu Y S, Chen L H. Orthogonal design-direct analysis for PCR optimization[J]. Journal of Hunan Medical University, 1998, 23(4): 403-404.)
- [13] 司鹏, 戴洪义, 薛华柏, 等. 苹果 SRAP-PCR 反应体系的建立[J]. 果树学报, 2010, 27(2): 168-173. (Si P, Dai H Y, Xue H B, et al. Establishment of SRAP-PCR reaction system in apple[J]. Journal of Fruit Science, 2010, 27(2): 168-173.)

(下转第 320 页)

时间缩短所导致荚腔数的损失,高密度条件下,单株同步结荚节数的增加必然会加剧荚与植株其它器官的营养物质竞争程度。这在一定程度上增加了中熟品种实现超高产的栽培技术调控难度。如何在开花结荚期间对中熟超高产大豆品种进行合理的生长调控,以增加单位面积荚腔数,充分发挥其增产潜力是需要进一步研究的问题。

## 参考文献

- [1] 罗庚彤,战勇,刘胜利,等. 新大豆 1 号和石大豆 1 号高产记录的创造[J]. 大豆科学,2001,20(4):270-273. (Luo G T, Zhan Y, Liu S L, et al. The creation of the highest yield records on Xindadou 1 and Shidadou 1 of soybean cultivars[J]. Soybean Science, 2001, 20(4):270-273. )
- [2] 王晓光,赵念力,魏建军,等. 中黄 35 大豆超高产实例分析[J]. 大豆科学,2010,30(6):1051-1053. (Wang X G, Zhao N L, Wei J J, et al. Case analysis of super-high-yielding soybean variety, Zhonghuang 35 [J]. Soybean Science, 2010, 30(6):1051-1053. )
- [3] 王连铮,罗庚彤,王岚,等. 北疆春大豆中黄 35 公顷产量 6 吨的栽培技术创建[J]. 大豆科学,2012,31(2):217-223. (Wang L Z, Luo G T, Wang L, et al. Development of soybean cultivation technology with the yield over 6 tonnes per hectare for soybean [J]. Soybean Science, 2012, 31(2):217-223. )
- [4] 章建新,翟云龙,薛丽华. 密度对高产春大豆生长动态及干物质积累分配的影响[J],大豆科学,2006,25(1):1-5. (Zhang J X, Zhai Y L, Xue L H. Effect of plant density on growth tendency, dry matter accumulation and distribution in high yield spring soybean [J]. Soybean Science, 2006, 25(1):1-5. )
- [5] 章建新,李劲松. 窄行密植对高产春大豆根系生长的影响[J]. 大豆科学,2007,26(4):500-505 (The effect of solid seeding on the growth of soybean root in high yield spring soybean [J]. Soybean Science, 2007, 26(4):500-505. )
- [6] 章建新,周婷,贾珂珂. 超高产大豆品种花荚形成及其时空分布[J]. 大豆科学,2012,31(5):739-743. (Zhang J X, Zhou T, Ja K K. Formation and space-time distribution of flowers and pods for super-high yielding soybeans [J]. Soybean Science, 2012, 31(5):739-743. )
- [7] 章建新,李金霞,崔可夫,等. 不同熟期大豆品种的花荚形成和时空分布[J]. 新疆农业大学学报,2012,35(2):1-2. (Zhang J X, Li J X, Cui K F, et al. Formation of flower and pod and space-time distribution of soybean varieties in different maturation periods [J]. Journal of Xinjiang Agricultural University, 2012, 35(2):1-2. )
- [8] 魏建军,罗庚彤,张力,等. 中黄 35 超高产大豆群体的生理参数[J]. 作物学报,2009,35(3):506-511. (Wei J J, Luo G T, Zhang L, et al. Physiological parameters of super-high yielding soybean cultivar Zhonghuang 35 [J]. Acta Agronomica Sinica, 2009, 35(3):506-511. )
- [9] 魏建军,杨相昆,张占琴. 土壤主要养分变化和超高产大豆养分吸收之间关系的研究[J]. 大豆科学,2010,29(5):791-795. (Wei J J, Yang X K, Zhang Z Q. Relationship between nutrient contents in soil and the nutrient absorption of super-high yielding soybean [J]. Soybean Science, 2010, 29(5):791-795. )
- [10] D A, Jiang J, et al. Optimization for ISSR-PCR system of *Fraxinus mandshurica* Rupr. using orthogonal design [J]. Molecular Plant Breeding, 2005, 3(3):445-450. )
- [11] 苏辉,李志刚,宋书宏. 正交设计优化大豆 SSR-PCR 反应体系及引物筛选[J]. 华北农学报,2009,24(2):99-102. (Su H, Li Z G, Song S H. Optimization of SSR-PCR system on soybean by orthogonal design and SSR primer selection [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2009, 24(2):99-102. )
- [12] 何海燕,沙伟,张艳馥. 大豆 ISSR-PCR 反应体系的优化[J]. 大豆科学,2010,29(3):510-513. (He H Y, Sha W, Zhang Y F. Optimization for ISSR-PCR reaction system of soybean [J]. Soybean Science, 2010, 29(3):510-513. )
- [13] 刘海云,王敏,王继亮,等. 大豆 SSR 技术反应体系的优化[J]. 华北农学报,2007,22(5):36-39. (Liu H Y, Wang M, Wang J L, et al. Optimization of soybean SSR reaction system [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2007, 22(5):36-39. )
- [14] 熊发前,庄伟建,唐荣华,等. 两种新型目标分子标记技术——CDDP 与 PAAP[J]. 植物生理学通讯,2010,46(9):871-875. (Xiong F Q, Zhuang W J, Tang R H, et al. Two Novel targeted molecular marker techniques—CDDP and PAAP [J]. Plant Physiology Communications, 2010, 46(9):871-875. )
- [15] 杨云水,李续娥,吴红伟. 正交实验法在 PCR 反应优化中的应用[J]. 生物数学学报,2005,20(2):202-206. (Yang Y S, Li X E, Wu H W. Application of orthogonal design to optimize PCR conditions [J]. Journal of Biomathematics, 2005, 20(2):202-206. )
- [16] 郭大龙,张君玉,李猛,等. 葡萄 SRAP 反应体系优化及引物筛选[J]. 基因组学与应用生物学,2010,29(2):379-384. (Guo D L, Zhang J Y, Li M, et al. Optimization of SRAP-PCR system in grape and primers screening [J]. Genomics and Applied Biology, 2010, 29(2):379-384. )
- [17] 秦国新,何桥,梁国鲁,等. 草莓属植物 SCoT 分析体系的建立及优化[J]. 果树学报,2012,29(3):393-397. (Qin G X, He Q, Liang G L, et al. Establishment and optimization of SCoT-PCR system in *Fragaria* [J]. Journal of Fruit Science, 2012, 29(3):393-397. )
- [18] 谢云海,夏德安,姜静,等. 利用正交优化水曲柳 ISSR-PCR 反应体系[J]. 分子植物育种,2005,3(3):445-450. (Xie Y H, Xia

(上接第 315 页)