

菊花 SSR-PCR 反应体系的建立和优化

李亚慧^{1,2}, 黄丛林², 董然¹

(1. 吉林农业大学 园艺学院, 吉林 长春 130118; 2. 北京市农林科学院 北京农业生物技术研究中心, 北京 100097)

摘要:为快速确定菊花 SSR 反应体系, 利用正交实验设计 $L_{16}(4^5)$ 对菊花基因组 SSR-PCR 反应体系的 5 个因素(模板 DNA、 Mg^{2+} 、dNTP、引物和 Taq 酶)在 4 个水平上进行正交设计, 筛选出适合菊花的最佳 SSR-PCR 反应体系, 进一步利用单因素完全随机试验筛选各反应因素的最佳水平。结果表明: 建立菊花基因组 DNA SSR-PCR 反应体系为 25 μ L; 60 ng 模板 DNA、2.0 mmol/L Mg^{2+} 、0.1 mmol/L dNTP、0.3 μ mol/L 引物、1 U Taq 酶。并对菊花引物进行梯度退火试验, 其最佳退火温度在 53.1℃; 扩增程序是: 95℃ 预变性 5 min; 32 个循环的 94℃ 变性 50 s、53.1℃ 退火 50 s、72℃ 延伸 50 s; 72℃ 延伸 8 min, 4℃ 保存。该体系的建立为今后菊花 SSR 分析奠定了基础。

关键词:菊花; SSR 标记; 正交设计; 反应体系优化

中图分类号:S 682.1⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)13-0127-05

菊花(*Chrysanthemum morifolium*)起源于中国, 是中国十大传统名花之一和世界四大切花之一^[1-2]。中

国菊花资源丰富, 但经过长期的自然杂交和人工引种, 目前已导致菊花遗传背景复杂、亲缘关系混乱, 同名异物、同物异名严重, 极大地制约了菊花育种及其产业发展^[3]。因此研究菊花种与种、种与品种之间的遗传多样性, 对菊花的优良品种选育和遗传改良以及种质资源保存可提供科学依据。

分子标记方法多种多样, 然而 SSR(Simple sequence repeat)标记方法优点尤为突出, 是研究物种之间、种群之间等遗传多样性的重要手段之一。SSR 简单序列重复标记(Simple sequence repeat), 亦叫微卫星序列重复,

第一作者简介:李亚慧(1985-), 女, 硕士, 现主要从事园林植物资源与种质创新等研究工作。E-mail: liyahui_12@163.com.

责任作者:董然(1966-), 女, 博士, 教授, 现主要从事长白山野生植物引种驯化工作。E-mail: dongr999@163.com.

基金项目:北京市科委资助项目(Z09050600630906, D101105046210001); 科技部科技支撑计划资助项目(2009BADB8B04); 北京市园林绿化局花卉育种研发资助项目(YLHH201100104)。

收稿日期:2012-03-15

[4] 莫测辉, 吴启堂, 周友平, 等. 城市污染对作物种子发芽及幼苗生长影响的初步研究[J]. 应用生态学报, 1997, 8(6): 645-649.

[5] 陶嘉龄, 郑光华. 种子活性[M]. 北京: 科学出版社, 1991.

[6] 刘永军, 郭守华, 杨晓玲. 植物生理生化实验[M]. 北京: 中国农业科

技出版社, 2002.

[7] 邹琦. 植物生理生化实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997.

[8] 孙村普, 张建中, 段少锦. 自由基生物学导论[M]. 北京: 中国科学技术大学出版社, 1999.

The Impact of Babaan on the Seed Germination and Root Growth of Cucumber

LI Yuan-yuan¹, WANG Ning², FENG Jian-jun³

(1. Agriculture College, Inner Mongolia University for Nationality, Tongliao, Inner Mongolia 028042; 2. Grassland Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 010010; 3. Station for Popularizing Agriculture Technique, Kerchin Right Middle Banner, Xinganmeng, Inner Mongolia 029400)

Abstract: 'Jinchun No. 4' cucumber were treated by seed soaking with different Babaan concentrations (0, 50, 100, 500, 1 000, 1 500 mg/L), the effect on seed germination and morphological indexes during seed germination were studied. The results showed that 50~500 mg/L Babaan could effectively improve seed germination rate and its root growth, but high concentration was inhibition to it, and the higher concentration the inhibition stronger. The cucumber root vigor was enhanced in low concentration Babaan, but it reduced in high concentration Babaan. Electrolyte leakage of cucumber root was reduced by 50 mg/L Babaan concentrations, and the ability of resistant low temperature. Comprehensive analysis showed that the treatment effect was best by 50 mg/L Babaan concentrations.

Key words: Babaan; cucumber; seed germination; root

是一类由几个核苷酸(1~5个)为单位经多次重复形成长达几十个核苷酸的重复序列,普遍分布在染色体中。由于重复单位的不同和重复单位次数的不同,促成了微卫星序列长度的高度变异性,由此,构成了 SSR 标记。固然基因组上的 SSR 位置不尽相同,但是分布在 SSR 两端的序列多是保守的单拷贝序列,因而,能够利用微卫星区域的特定顺序来设计成对引物,采用 PCR 技术得到的产物再经非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,结果显示不同个体间 SSR 位点有所不同,这即是其个体间的多态性^[4]。该种分子标记方法是在 20 世纪 90 年代发展起来建立在 PCR 基础上的新型分子标记技术,被认为是一种理想的分子标记,相比其它 DNA 分子标记,SSR 分子标记具有更高的多态性^[5],同时在植物基因组研究中具有广阔的应用前景^[6]。

运用 SSR 技术对菊花这一物种的基因组进行研究时,首先应优化菊花的 SSR-PCR 反应体系,建立一套适合菊花的 SSR-PCR 反应体系。目前,SSR 技术已被应用于大豆^[7]、小麦^[8]、玉米^[9]、番茄^[10]、苹果^[11]等多种作物和果蔬的遗传多样性分析、遗传作图、种质鉴定的研究。然而,有关标准化的菊花 SSR-PCR 反应体系仍未报道。该文所采用的正交设计分析方法^[12]与单因素完全随机试验相结合,对菊花 SSR-PCR 反应中 5 个因素进行优化处理,研究其最佳反应体系和反应条件,为今后菊花的 SSR 分子标记、基因定位研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 大菊品种材料均来自北京市农林科学院生物中心和北京菊产业研究中心的菊花种质资源圃。采集菊花未完全展开的幼嫩叶片,带回实验室用无菌蒸馏水冲洗数次,滤纸吸干放入干净塑料袋中,置于一80℃冰箱中保存备用。

1.1.2 试剂和引物 引物由上海生工生物工程公司合成,引物 A23 (Forward primer: 5'-CTCAATAACAC-CTACCAAAC-3', Reverse primer: 5'-TAAGCTAAAG-GCTAACCCCTA-3')作为正交实验初步筛选的固定引物。dNTP、*rTaq* 酶、 Mg^{2+} 、20 bp 标准分子量(Marker) DNA ladder 都购买于 TaKaRa 生物公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菊花基因组 DNA 提取与测定 使用改良的 CTAB 法^[13]提取基因组 DNA,用 1%的琼脂糖电泳检测。使用 Eppendorf 公司生产的 BioPhotometer 核酸检测仪测定 DNA 溶液浓度,稀释为 60 ng/ μ L, -20℃下保存。

1.2.2 SSR-PCR 扩增 菊花 SSR-PCR 扩增反应在 PTC-100 Peltier Thermal Cycler 基因扩增仪上进行,初

步反应体系和程序参照 Huang W G^[14]。PCR 扩增产物使用 3%的琼脂糖凝胶,在 3 V/cm 电压下电泳 2 h,结果用 GelDoc XR 凝胶成像系统(Bio-Rad 公司)拍照后保存其结果。

1.2.3 SSR-PCR 反应水平的初步确定和正交设计 PCR 反应中含有的 5 个因素(dNTP、*Taq* 酶、模板 DNA、引物、 Mg^{2+}),为了确定这 5 个因素的最佳水平,最初利用正交设计 $L_{16}(4^5)$ 在 4 水平基础上进行试验, $L_{16}(4^5)$ 设计方案见表 1、2。3 次重复。再设计单因素 4 个水平随机试验,加强优化各反应成分的终浓度水平,最终确定相对较优的因素组合。

表 1 SSR-PCR 反应因素及其水平

Table 1 Factors and its' levels of SSR-PCR reaction

水平 Levels	模板 Template /ng	Mg^{2+} 浓度 concentration /mmol · L ⁻¹	dNTP 浓度 concentration /mmol · L ⁻¹	引物浓度 Primers concentration /μmol · L ⁻¹	<i>Taq</i> 酶浓度 concentration /U
1	60	1.5	0.1	0.1	0.5
2	80	2.0	0.15	0.2	1.0
3	100	2.5	0.2	0.3	1.5
4	120	3.0	0.25	0.4	2.0

表 2 SSR-PCR 反应因素水平的正交实验设计

Table 2 Orthogonal design of SSR-PCR reaction factors

编号 Serial number	模板 Template DNA content /ng	Mg^{2+} 浓度 concentration /mmol · L ⁻¹	dNTP 浓度 concentration /mmol · L ⁻¹	引物浓度 Primers concentration /μmol · L ⁻¹	<i>Taq</i> 酶浓度 concentration /U
1	60	1.5	0.10	0.1	0.5
2	60	2.0	0.15	0.2	1.0
3	60	2.5	0.20	0.3	1.5
4	60	3.0	0.25	0.4	2.0
5	80	1.5	0.15	0.3	2.0
6	80	2.0	0.10	0.4	1.5
7	80	2.5	0.25	0.1	1.0
8	80	3.0	0.20	0.2	0.5
9	100	1.5	0.20	0.4	1.0
10	100	2.0	0.25	0.3	0.5
11	100	2.5	0.10	0.2	2.0
12	100	3.0	0.15	0.1	1.5
13	120	1.5	0.25	0.2	1.5
14	120	2.0	0.20	0.1	2.0
15	120	2.5	0.15	0.4	0.5
16	120	3.0	0.10	0.3	1.0

1.2.4 SSR-PCR 最佳反应体系退火温度筛选 在确定最佳反应体系各因素的基础上,对试验中所使用引物的退火温度进行筛选。退火温度选在 47~60℃,共设计 12 个温度:47.0、47.7、48.5、49.8、51.5、53.1、54.4、56.0、57.6、58.7、59.5、60.0℃。所得 PCR 产物进行电泳检测。

1.2.5 SSR 最佳反应体系的验证 使用引物 Forward primer: 5'-CTCAATAACACCTACCAA3', Reverse primer: 5'-TAAGCTAAAGGCTAACCCCTA-3'对 16 个菊花品

种及其近缘种 DNA 进行 SSR-PCR 扩增,进一步验证其优化后的菊花 SSR-PCR 反应体系以及反应参数的稳定性。

2 结果与分析

2.1 菊花基因组 DNA 提取物检测

大菊品种基因组 DNA OD_{260}/OD_{280} 在 1.71~1.92, DNA 浓度在 100~300 ng/ μ L, 1% 琼脂糖检测其条带清晰未降解,说明所得到的 DNA 完整性好,可用于 SSR 标记分析(图 1)。

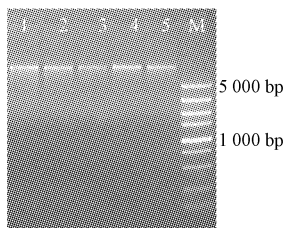


图 1 菊花基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

注:M 标准分子量 DL 5000 bp;1. ‘紫如意’;2. ‘彩龙爪’;3. ‘金红交辉’;4. ‘大红托桂’;5. ‘西施巧妆’。

Fig. 1 Electrophoresis of Chrysanthemum DNA

Note:M, 5000 bp DNA ladder;1. ‘Ziruyi’;2. ‘Cailongzhua’;3. ‘Jinhongjiaohui’;4. ‘Dahongtuogui’;5. ‘Xishiqiaozhuang’.

2.2 SSR-PCR 反应体系的建立

2.2.1 正交设计各个因素的确定 根据表 2 所设计的 16 个处理组合进行 SSR-PCR 扩增反应,所得产物经琼脂糖电泳,由图 2 可知,在 16 个处理组合中由于模板 DNA、dNTP、 Mg^{2+} 、*Taq* 酶、引物 5 个因素浓度组合的不同,扩增产物的差异很明显,其中第 2、3、4、5、11、12 组合所得扩增产物产生了不同程度的假带;第 1、7、8、10、15、16 组合所得产物模糊,表现其产物的量不够丰富,亦不易观察;第 6、9、13、14 组合均得到清晰的扩增产物,但是第 6、9 组合都有不同程度的二聚体,第 13 组合重复性相对差些,第 14 组合稳定性强、条带清晰。因而,选取第 14 种组合,即在 25 μ L 体系中各成分的最佳浓度分别为 DNA 120 ng、dNTP 0.2 mmol/L、 Mg^{2+} 3.0 mmol/L、*Taq* 酶 0.4 U、引物浓度为 1 μ mol/L,用于菊花 SSR-PCR 反应。

2.2.2 最适酶、模板 DNA、 Mg^{2+} 、dNTP 和引物浓度的筛选 利用单因素完全随机试验,以 A23 引物对作为研究体系引物,分别研究菊花 SSR-PCR 体系中酶量、模板 DNA、 Mg^{2+} 、dNTP 和引物浓度对体系扩增结果的影响。在以酶浓度为变量,其它组分不变,当酶量在 0.5 U 时,由于酶量过少,导致扩增产物少、条带模糊;随着酶量的增加产物也增多,条带亮度加强。从节约药品角度分析,当酶量在 1 U 时即可(图 3)。在前面因素确定的前

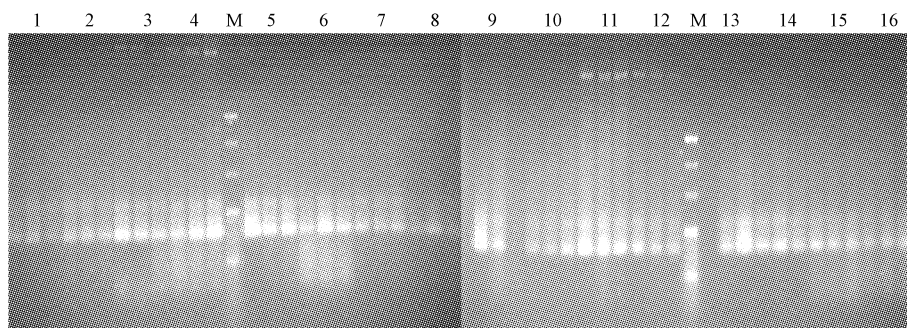


图 2 正交设计组合 PCR 产物的电泳

注:处理编号见表 2;M 标准分子量 DL 20 bp。

Fig. 2 Electrophoresis of PCR amplification products with different combination

Note:The number refers to combination number according to table 2;M:20 bp DNA ladder marker.

提下,以 Mg^{2+} 浓度为变量。 Mg^{2+} 浓度为 1.5 mmol/L 时扩增条带弱;浓度为 2.0~3.0 mmol/L 时条带比较清晰,浓度为 2.0 mmol/L 时最清晰,扩增效果最好,表明 Mg^{2+} 的最佳浓度为 2.0 mmol/L(图 4)。再以 dNTP 浓度为变量。dNTP 浓度在 0.1~0.25 mmol/L 时都能得到清晰的扩增产物,相比在 0.1 mmol/L 时扩增效果最佳,所以 dNTP 浓度选 0.1 mmol/L(图 4)。最后以引物浓度为变量,引物浓度在 0.1~0.2 μ mol/L 时,产物量少、条带较弱,不能满足分析的需要。在 0.3~0.4

μ mol/L 时,均能得到清晰的扩增产物,但是引物浓度过高时将会导致非特异性扩增,致使泳道背景发亮。所以最佳的引物浓度定为 0.3 μ mol/L(图 4)。

2.3 SSR-PCR 退火温度的筛选

PCR 扩增反应程序包括变性、退火和延伸 3 个基本步骤的循环,当中退火温度是扩增程序最为重要的影响因素,直接影响产物的扩增特异性。不同的引物退火温度亦不相同,退火温度主要影响引物与模板 DNA 的特异性结合。依据以上所得到的最佳反应体系,进行引物

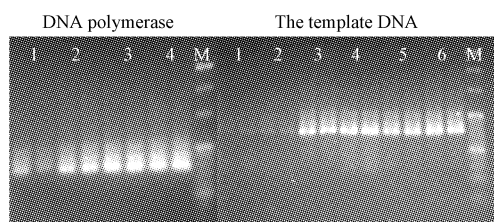


图3 使用不同 *Taq* 酶和 DNA 模板时 PCR 产物电泳结果

注: M. 标准分子量; 1~4. 酶量依次为 0.5、1.0、1.5、2.0 U; 1~6. DNA 模板 20、40、60、80、100、120 ng.

Fig. 3 Electrophoresis of SSR-PCR amplification products with different amounts of *Taq* enzyme and DNA template

Note: M. DNA marker; 1~4. the amount of *Taq* enzyme was 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 U respectively; 1~6. the amount of DNA was 20, 40, 60, 80, 100, 120 ng respectively.

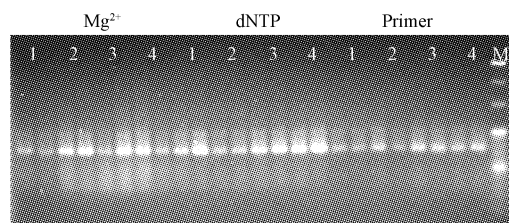


图4 不同浓度 Mg^{2+} 、dNTP、引物时 PCR 产物电泳结果

注: M. 标准分子量; 1~4. Mg^{2+} 浓度分别 1.5、2.0、2.5、3.0 mmol/L; 1~4. dNTP 浓度分别 0.1、0.15、0.2、0.25 mmol/L; 1~4. 引物浓度分别 0.1、0.2、0.3、0.4 μ mol/L.

Fig. 4 Electrophoresis of SSR-PCR amplification products with different amount of Mg^{2+} , dNTP, primers

Note: M. DNA marker; 1~4. Mg^{2+} concentration was 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mmol/L respectively; 1~4. dNTP concentration was 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 mmol/L respectively; 1~4. primers concentration was 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 μ mol/L respectively.



图5 不同退火温度下 PCR 产物电泳结果

注: M. 20 bp 标准分子量; 1~12. 退火温度依次为 47.0、47.7、48.5、49.8、51.5、53.1、54.4、56.0、57.6、58.7、59.5、60.0°C.

Fig. 5 Electrophoresis of SSR-PCR amplification products under different annealing temperatures

Note: M. 20 bp DNA marker; 1~12. the annealing temperature was 47.0, 47.7, 48.5, 49.8, 51.5, 53.1, 54.4, 56.0, 57.6, 58.7, 59.5, 60.0°C respectively.

PCR 反应退火温度梯度试验。根据该物种引物 *T_m* 值设计退火温度在 47~60°C, 扩增仪自动生成 12 个温度

梯度: 47.0、47.7、48.5、49.8、51.5、53.1、54.4、56.0、57.6、58.7、59.5、60.0°C。得到的 PCR 产物用 3% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测。如图 5 所示, 退火温度过低(条带 1), 易产生弥散状非特异性扩增, 产物少, 结果可靠性低; 退火温度提高能消除非特异性扩增(条带 2~9), 带型清晰, 但温度过高引物与模板结合差, PCR 产物过少, 电泳条带亮度差(条带 10~12)。理论上分析, 引物的退火温度越高, 扩增出的特异性产物也会越多, 退火温度在一定范围的降低, 其特异性降低而产生非特异性产物^[15]。综合分析 53.1°C 为最佳退火温度, 可扩增出清晰的 SSR 靶目标条带。

2.4 最佳 SSR-PCR 反应体系稳定性检测

应用上述最佳反应体系, 用引物对 A23: Forward primer: 5'-CTCAATAACACCTACCAAAC-3', Reverse primer: 5'-TAAGCTAAAGGCTAACCTA-3', 对 15 个菊花品种和 1 个近缘种的 DNA 进行了 SSR 扩增反应, 所有的 DNA 样品均扩增出清晰的目的片段(图 6), 说明该体系稳定, 适用于菊花 SSR-PCR 反应。

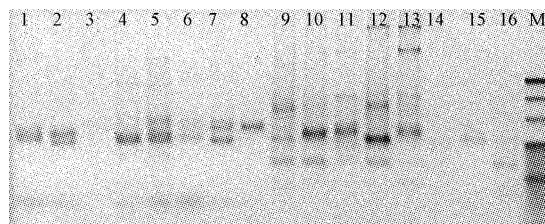


图6 16 个菊花品种 SSR-PCR 电泳结果

注: 1. '紫如意'; 2. '金葵向阳'; 3. '彩龙爪'; 4. '金风万里'; 5. '天女歌曲'; 6. '白松针'; 7. '龙舌'; 8. '毛华菊'; 9. '玉蝶翅'; 10. '金凤凰'; 11. '墨魁'; 12. '西施巧装'; 13. '瓶荷'; 14. '踏雪寻梅'; 15. '杭白菊'; 16. '新学士'。

Fig. 6 Electrophoresis of SSR-PCR Amplification products for 16 chrysanthemum varieties

Note: 1. 'Ziruyi'; 2. 'Jinkuixiangyang'; 3. 'Cailongzhua'; 4. 'Jinfengwanli'; 5. 'Tiannvgequ'; 6. 'Baisongzhen'; 7. 'Longshe'; 8. 'Maohuaju'; 9. 'Yudiechi'; 10. 'Jinfenghuang'; 11. 'Mokui'; 12. 'Xisiquaozhuang'; 13. 'Pinghe'; 14. 'Taxuexunmei'; 15. 'Hangbaiju'; 16. 'Xinxueshi'.

3 讨论与结论

试验结果表明, 模板 DNA 量对体系影响比较大, 而 dNTP 浓度和引物浓度对体系影响较小。此结果与万寿菊 SSR-PCR 体系优化结果相似^[16]。当模板浓度过低时, 分子碰撞的机率降低, 扩增产物少, 条带不清晰, 浓度过高时, 又会相应增加非特异性产物的扩增, 使背景加强, 出现弥散状^[17]。该研究所得最佳模板 DNA 为 60 ng, 引物浓度对体系影响不大, dNTP 浓度和 Mg^{2+} 浓度对体系影响相对较大, Mg^{2+} 在体系中直接影响着 *Taq* 酶, 是其发挥作用的保证, 因而 Mg^{2+} 的浓度必然影响试验结果。该研究表明, Mg^{2+} 浓度在 1.5 mmol/L 的时

候, Mg^{2+} 对 *Taq* 酶的催化效率低, 扩增的产物稀少。伴随着 Mg^{2+} 浓度的逐步增加, 其催化作用加强, 扩增所得产物增多, 条带亮度亦增强, 全面考虑 Mg^{2+} 浓度 2.0 mmol/L 时为最适该体系的浓度。dNTP 亦是体系反应的基础组分, 其量的多少将直接影响扩增产物的产量。该试验结果表明, 体系中 dNTP 为 0.1 mmol/L 时, 这一浓度下的 dNTP 量能满足正常 PCR 反应的要求, 而过多的 dNTP 量则会对 Mg^{2+} 产生拮抗作用, 特别是当 Mg^{2+} 浓度比较低时, dNTP 的拮抗作用更为显著^[16]。因此, 体系 dNTP 浓度定为 0.1 mmol/L。

该文采用正交重复因子实验和单因素随机试验相结合的试验设计方案, 建立了稳定性强、重复性好的菊花 SSR-PCR 反应体系, 即反应体系 25 μ L: 60 ng 模板 DNA、2.0 mmol/L Mg^{2+} 、0.1 mmol/L dNTP、0.3 μ mol/L 引物、1 U *Taq* 酶; 其最佳退火温度在 53.1℃; 扩增程序是: 95℃ 预变性 5 min、35 个循环的 94℃ 变性 50 s、53.1℃ 退火 50 s、72℃ 延伸 50 s; 72℃ 延伸 8 min, 4℃ 保存。

参考文献

- [1] Chen J Y. Studies the origin of Chinese Florist's chrysanthemum [J]. Acta Hort, 1985, 167: 349-361.
- [2] Anderson N O. Flower breeding and genetics: Issues, Challenges and opportunities for the 21st century. [J]. Springer, 2007(3): 389-395.
- [3] 戴思兰. 中国栽培菊花起源的综合研究[D]. 北京: 北京林业大学图书馆, 1994.
- [4] 方宣钧, 吴为人, 唐纪良, 等. 作物 DNA 标记辅助育种[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [5] Cho Y G, Ishil T, Temnykh S, et al. Diversity of microsatellites derived

from genomic libraries and Genbank sequences in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Thero Apple Genet, 2000, 100: 713-722.

- [6] Vogel J M, DuPont E I, Wilmington D E, et al. Application of genetic diagnostics to plant genome analysis and plant breeding [J]. Hort Science, 1996, 31(7): 1107-1108.
- [7] Akkaya M S, Bhagwat A A, Cregan P B, et al. Length polymorphism of simple sequence repeat DNA in soybean [J]. Genetics, 1992, 132: 1131-1139.
- [8] Ma Z Q, Roder M S, Sorrells M E, et al. Frequencies and sequence characteristics of di-, tri-, and tetranucleotide microsatellites in wheat [J]. Genome, 1996, 39: 123-130.
- [9] Chin E C L, Shu H, Smith J S C, et al. Maize simple repetitive DNA sequence abundance and allele variation [J]. Genome, 1996, 39(5): 886-873.
- [10] Taramino G, Tingey S. Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize [J]. Genome, 1996, 39(2): 277-287.
- [11] Broun P, Tanksley S D. Characterization and genetic mapping of simple repeat sequence in the tomato genome [J]. Mol Cen Genet, 1996, 2(50): 39-49.
- [12] 张春华, 周永志, 阎隐, 等. 数理统计方法 [M]. 济南: 山东大学出版社, 1992.
- [13] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. Nucleic Acids Research, 1980, 8(25): 4321-4325.
- [14] Huang G W G, Cipriani M, Morgante R, et al. Testolin. Microsatellite DNA in *Actinidia chinensis*: isolation, characterisation, and homology in related species [J]. Theor Appl Genet, 1998, 97: 1269-1278.
- [15] 赵世浩, 周清明, 蒋建雄, 等. 正交设计优化烟草 SSR 反应体系 [J]. 湖南农业科学, 2007(6): 48-51.
- [16] 杨帆, 曾丽, 赵子刚, 等. 万寿菊 SSR-PCR 反应体系的优化 [J]. 上海交通大学学报, 2001(1): 22-27.
- [17] 田义珂, 王彩虹, 张继澍, 等. 苹果基因组 RAPD 反应体系影响因素的优化 [J]. 莱阳农报, 2003, 20(3): 157-161.

Establishment and Optimization of Chrysanthemum SSR-PCR Reaction System

LI Ya-hui^{1,2}, HUANG Cong-lin², DONG Ran¹

(1. College of Gardening, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118; 2. Beijing Agro-Biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097)

Abstract: In order to obtain the optimal SSR-PCR system for *Chrysanthemum morifolium*, an orthogonal diagram $L_{16}(4^5)$ experimental design was employed to evaluate five factors (template DNA, Mg^{2+} , dNTP, primer and *Taq* DNA polymerase) at four different levels. The fully random single factor experiment was used to select the optimal level for each factor to optimize the SSR-PCR amplification system. The results showed that an optimal SSR-PCR system for chrysanthemum was obtained as following: 60 ng DNA template, 2.0 mmol/L Mg^{2+} , 0.1 mmol/L dNTP, 0.3 μ mol/L primer, 1 U *Taq* DNA polymerase in 25 μ L reaction system. The optimal annealing temperature for SSR-PCR reaction system was determined as 53.1℃ by gradient PCR. The suitable thermal cycling conditions with initial melting at 95℃ for 5 min, followed by 35 cycles at 94℃ for 50 s, 53.1℃ for 50 s, 72℃ for 50 s; then keep the reaction mixture at 4℃ after a final extension step of 72℃ for 8 min. The optimized system would be effective as a solid foundation for chrysanthemum SSR analysis.

Key words: chrysanthemum; SSR markers; orthogonal design; optimization of reaction system