

正交设计直观分析法优化苦瓜 SSR-PCR 反应体系

王心迪^{1,2,3}, 黄如葵^{2,3}, 冯诚诚^{2,3}, 梁家作², 黄熊娟^{2,3}, 刘杏连²

(1. 广西大学 农学院, 广西 南宁 530001; 2. 广西农业科学院 蔬菜研究所, 广西 南宁 530007;

3. 广西作物遗传改良生物技术重点实验室, 广西 南宁 530007)

摘要:以苦瓜‘MC9’为试材,采用 $L_{16}(4^5)$ 正交实验,对苦瓜 SSR-PCR 反应体系的 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度、模板 DNA 量、Taq 聚合酶量、引物浓度等 5 个因素的 4 个水平进行优化试验,并通过正交设计直观分析法对 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度、Taq 聚合酶量进行了单因素确定。结果表明:最佳反应体系为 $1 \mu L$ $10\times$ PCR buffer, Mg^{2+} 浓度为 $1.75 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$, dNTPs 浓度为 $0.25 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$, Taq DNA 聚合酶 1 U , DNA 100 ng , 引物 $0.20 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$, ddH_2O 补足至 $10 \mu L$ 。

关键词: 苦瓜; 正交实验; 单因素设计

中图分类号: S 642.503.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2016)10-0099-05

苦瓜(*Momordica charantia* L.)属葫芦科苦瓜属一年生草本植物,其起源中心位于印度、缅甸,广泛分布于热带、亚热带及温带地区,在东非、亚洲、南美等世界各

地均有栽培,在我国也已有几百年的栽培历史。我国苦瓜种质资源丰富,品种间差异大,单独利用传统形态学标记方法很难对种质资源的遗传多样性做出准确有效的评价。近年来,随着 DNA 分子标记技术的发展,利用分子标记对 DNA 碱基序列进行比较和分析,为植物种质遗传多样性分析提供了新途径。其中,SSR 分子标记技为共显性标记,具有多态性丰富、试验重复性好等优点,已广泛地应用于目的基因的标记、连锁图谱的绘制、遗传资源的鉴定和分类等方面^[1]。目前,国内苦瓜的 AFLP、SRAP、ISSR、RAPD 等体系均已构建^[2-6],而关于 SSR 反应体系优化的研究尚鲜见报道,由于植物 PCR 体系的优化是进行后续相关分子生物学研究的前提与基

第一作者简介:王心迪(1991-),女,硕士研究生,研究方向为苦瓜核心种质筛选。E-mail: xindikaka@126.com

责任作者:黄如葵(1969-),女,博士,研究员,现主要从事蔬菜育种及种子学等研究工作。E-mail: rkhuang@gxaas.net

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项资助项目(CARS-25); 国家科技计划资助项目(2014BAD05B04); 广西科学研究与技术开发计划资助项目(桂科合 14125008-2-19); 广西农业科学院基本科研业务专项资助项目(2015YT66)。

收稿日期: 2015-12-18

Study on High Quality Plantlets Propagation Technique of *Dendrobium officinale*

ZHOU Li¹, WANG Yuan¹, YE Yuanting¹, XU Zhenghai²

(1. Key Laboratory of National Medicinal and Biological Resources, Xingyi Normal University for Nationalities, Xingyi, Guizhou 562400;

2. Southwest Guizhou Lyuyuan Animal and Plant Technologies Co. Ltd., Xingyi, Guizhou 562400)

Abstract: Taking wild *Dendrobium officinale* as test material, using root restriction culture method, a high quality plantlets breeding technology of *Dendrobium officinale* was introduced by researching its characteristics of the asymbiotic seed germination. The results showed that the seeds of 120 days after pollination (DAP) reached maturity, the seeds could germinate; the seeds of 140 DAP could be morphologically mature, with a seed germination rate up to 98.51%; low temperature and darkness restriction could inhibit of protocorms growth; using medium of restrictions on root growth in a particular container could get high quality seedlings, restriction on root growth medium was $MS + 0.10 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 6-BA + $0.3 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ NAA + $80 \text{ g} \cdot L^{-1}$ mashed banana; and the survival rate could be up to 97.62% when the plantlets were transplanted to pine bark. Therefore, this research provided a new method for the industrial production of *D. officinale*.

Keywords: *Dendrobium officinale*; seed; asymbiotic germination; high quality plantlets

础,迫切需要建立及优化苦瓜的 SSR 反应体系。

现利用正交设计直观分析法,对苦瓜 SSR-PCR 反应体系中的模板浓度、dNTPs 浓度、 Mg^{2+} 浓度引物浓度、酶浓度等 5 个因素进行优化,筛选出最优的反应体系,并对该反应体系进行验证,以期苦瓜通过 SSR 分子标记进行种质鉴定与遗传多样性分析提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的苦瓜材料‘MC9’由广西农业科学院蔬菜研究所苦瓜课题组提供,试验所需的引物序列来自已经公布的苦瓜 SSR 引物序列(表 1)^[7-8],由上海生工公司合成。其中引物 N6 用于体系的优化,其余 4 对用于最优体系的验证。 $10\times$ PCR Buffer、 Mg^{2+} 、dNTPs、*Taq* 酶均购自大连宝生物公司。

表 1 苦瓜 SSR 上下游引物序列

Table 1 Sequences of forward and reverse SSR primers of bitter melon

引物序号	上游引物	下游引物
No. of primer	Forward primer(5'-3')	Reverse primer(5'-3')
N6	GGGAATTCTCAAAGAGCCAGA	TGGCACACTCTGCATGAAAT
S13	TTGGTTGTGGTGCTGAGTTC	GATGTAGGGGTTGGGTTGAT
S24	GCTCTGCGTTTTCATTCTTCA	TGAACCCCTCAGACTCAAACCTC
S26	GAAAGCCCTGTGACTTTAGC	TTTCGTCTTCCAATGAGCC
S32	CTAATACACGAAACCCATC	GAGCAAAAGACTGAGGAAAC

1.2 试验方法

1.2.1 苦瓜基因组 DNA 的提取 采用改良 CTAB 法提取苦瓜基因组 DNA,用紫外分光光度法和 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 样品的浓度和质量。样品浓度稀释到 $50\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.2 PCR 反应体系的正交设计优化 采用 $L_{16}(4^5)$ 正交设计,对 PCR 扩增体系中的 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度、模板 DNA 量、*Taq* 聚合酶量、引物浓度等影响因素设计 5 因素 4 水平的正交实验(表 2),共有 16 个组合(表 3),每个组合 3 次重复。总反应体积为 $10\text{ }\mu\text{L}$,内含 $1\text{ }\mu\text{L}$ 的 $10\times$ PCR buffer,用 ddH_2O 补足体积,所用引物为 N6。

表 2 苦瓜 SSR-PCR 体系的因素与水平

Table 2 SSR-PCR factors and levers in bitter melon

水平	Mg^{2+} 浓度	dNTPs 浓度	引物浓度	模板 DNA	<i>Taq</i> 聚合酶
Level	Mg^{2+} concentration	dNTPs concentration	Primer concentration	Template DNA	<i>Taq</i> DNA polymerase
	$/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	$/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	$/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	$/\text{ng}$	$/\text{U}$
1	0.75	0.20	0.20	25	0.5
2	1.50	0.30	0.30	50	1.0
3	2.25	0.40	0.40	75	1.5
4	3.00	0.50	0.50	100	2.0

1.2.3 PCR 反应体系的单因素优化设计 在正交实验的基础上,对影响 SSR-PCR 体系的部分因素进行单因素分析,以便可以进一步的优化反应体系。单因素试验

表 3 苦瓜 SSR-PCR 的 $L_{16}(4^5)$ 正交设计

Table 3 SSR-PCR orthogonal design $L_{16}(4^5)$ in bitter melon

编号	Mg^{2+} 浓度	dNTPs 浓度	引物浓度	模板 DNA	<i>Taq</i> 聚合酶
No.	Mg^{2+} concentration	dNTPs concentration	Primer concentration	Template DNA	<i>Taq</i> DNA polymerase
	$/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	$/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	$/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	$/\text{ng}$	$/\text{U}$
1	0.75	0.20	0.20	25	0.5
2	0.75	0.30	0.30	50	1.0
3	0.75	0.40	0.40	75	1.5
4	0.75	0.50	0.50	100	2.0
5	1.50	0.20	0.30	75	2.0
6	1.50	0.30	0.20	100	1.5
7	1.50	0.40	0.50	25	1.0
8	1.50	0.50	0.40	50	0.5
9	2.25	0.20	0.40	100	1.0
10	2.25	0.30	0.50	75	0.5
11	2.25	0.40	0.20	50	2.0
12	2.25	0.50	0.30	25	1.5
13	3.00	0.20	0.50	50	1.5
14	3.00	0.30	0.40	25	2.0
15	3.00	0.40	0.30	100	0.5
16	3.00	0.50	0.20	75	1.0

表 4 SSR-PCR 体系的单因素处理和水平设置

Table 4 Optional concentration gradient of each factor and level in SSR-PCR

因素	水平(序号)			
Factor	Level(No.)			
Mg^{2+} 浓度	0.50(1)	0.75(2)	1.00(3)	1.25(4)
Mg^{2+} concentration	1.50(5)	1.75(6)	2.00(7)	2.25(8)
$/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	2.50(9)	2.75(10)	3.00(11)	3.25(12)
dNTPs 浓度	0.05(1)	0.10(2)	0.15(3)	0.20(4)
dNTPs concentration	0.25(5)	0.30(6)	0.35(7)	0.40(8)
$/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	0.45(9)	0.50(10)	0.55(11)	0.60(12)
<i>Taq</i> 聚合酶	0.25(1)	0.50(2)	0.75(3)	1.00(4)
<i>Taq</i> DNA polymerase/U	1.25(5)	1.50(6)	1.75(7)	2.00(8)

的处理因素和水平设计参照表 4。总反应体系内含 $1\text{ }\mu\text{L}$ 的 $10\times$ PCR buffer,其它因素的浓度参照正交实验中的最佳反应体系,用 ddH_2O 补足体积。

1.2.4 PCR 反应最佳体系的验证 选择另外的 4 对 SSR 引物为检测引物,运用优化后的苦瓜 SSR-PCR 反应体系,对苦瓜 DNA 进行扩增,检测 PCR 反应体系的稳定性,每对引物进行 3 次重复试验。检测所用的引物为 S13、S24、S26、S32。

1.2.5 PCR 反应条件及产物检测 SSR-PCR 扩增反应程序为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s, $50\sim 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (根据引物 T_m 值确定退火温度)退火 45 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 35 次循环, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。所有 PCR 产物均采用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离,用银染法染色显影。

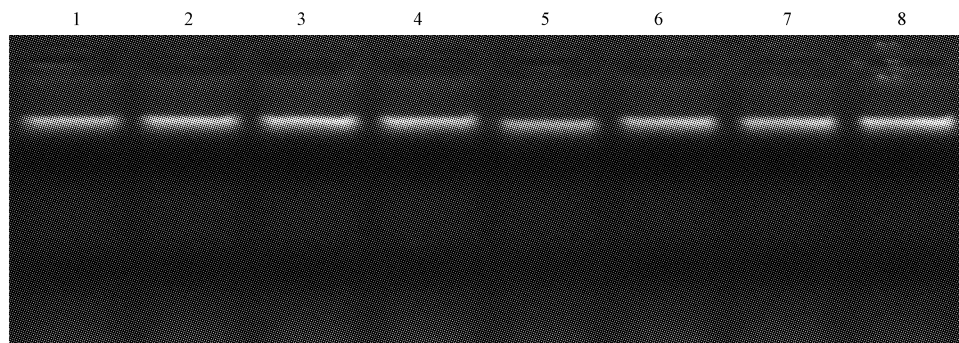
2 结果与分析

2.1 苦瓜基因组 DNA 检测

由图 1 可知,苦瓜基因组 DNA 条带清晰,无拖尾现

象;电泳孔附近无残留,表明 DNA 无蛋白质污染;紫外分光光度计检测结果, OD_{260}/OD_{280} 值范围皆介于 1.80~2.20,且浓度均不低于 $1\ 800\ \text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,说明苦瓜 DNA

提取纯度和浓度都较高,符合后续试验要求。将 DNA 稀释为 $50\ \text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 备用。



注:1~8 为苦瓜材料。

Note:1—8 are test materials of *Momordica charantia*.

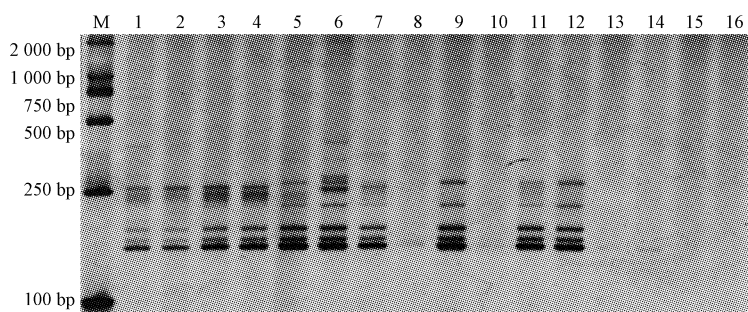
图 1 苦瓜基因组 DNA 检测结果

Fig. 1 The result of *Momordica charantia* DNA

2.2 PCR 反应体系正交实验结果

由图 2 可知,各组合之间的扩增结果存在明显差异。通过直观观察,其中组合 8、10、13、14、15、16 未扩增出条带,而其它组合均有明显的条带,组合 1、2、5、7、11

特异性条带部分缺失,带型模糊,极难观察,组合 3、4、6、9、12 均能扩增出清晰明显的特异性条带,其中组合 6 扩增效果最好,其扩增条带清晰,主带明显,多态性丰富,在 3 次重复中表现稳定,可以确定为最佳组合。



注:M,DL 2 000 DNA Marker;1~16,表 3 组合的编号。

Note:M,DL 2 000 DNA Marker;1—16, No. show in Table 3.

图 2 SSR-PCR 正交实验结果

Fig. 2 Result of orthogonal design for SSR-PCR

根据电泳检测的结果,参照何正文等^[9]的打分方法,根据条带数量的丰富程度和清晰度对 16 个处理的 3 次重复试验进行独立的打分,最佳的记 16 分,最差的计 1 分,3 次打分结果见表 5。根据打分求出每个因素同一水平下的试验值之和 K_i 以及每一因素水平下的数据平均值 k_i ,并求出同一因素不同水平间平均值的极差 R 。在假设各因素之间不存在交互作用情况下,极差 R 反映了影响因素对反应体系的影响, R 值越大,影响越显著。由表 6 可知,各因素水平的变化对 PCR 体系的影响从大到小依次为 $\text{Mg}^{2+} > \text{Taq 酶} > \text{模板 DNA} > \text{引物} > \text{dNTPs}$ 。 k 值反映了影响因素各水平对反应体系的影响情况, k 值越大,反应水平越好。根据 k 值得出的最佳反应体系为: $\text{Mg}^{2+}\ 2.25\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,dNTPs $0.2\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,

表 5 苦瓜 SSR-PCR 正交优化打分结果

Table 5 Scores of SSR-PCR orthogonal design in bitter melon

组合 Treatment	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	9	8	14	14	12	16	10	2	15	1	12	15	1	2	1	1
2	8	8	14	13	12	16	9	2	16	3	11	15	1	2	1	2
3	7	8	14	12	12	16	9	3	15	1	11	15	2	1	1	2

引物 $0.2\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,模板 DNA $100\ \text{ng}$,Taq 酶 $1.5\ \text{U}$ 。其中,最佳水平中的 Mg^{2+} 浓度和 dNTPs 浓度与最高得分组合 6 中的含量不同。为了进一步精确 PCR 最优反应体系,需要对 PCR 体系影响最大的 Mg^{2+} 浓度和 Taq 酶以及最佳水平与最佳组合中含量不同的 dNTPs 进行单因素分析。

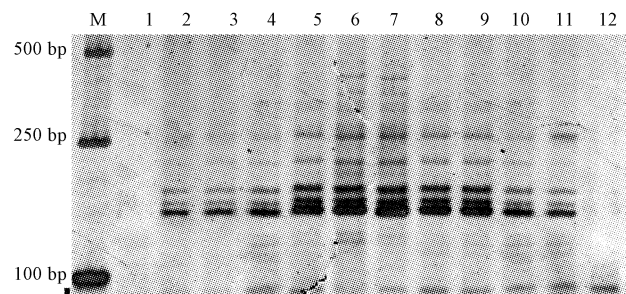
表 6 正交设计直观分析

Table 6 Orthogonal design-direct analysis

结果	Mg ²⁺ 浓度 concentration /(mmol · L ⁻¹)	dNTPs 浓度 concentration /(mmol · L ⁻¹)	引物浓度 concentration /(mmol · L ⁻¹)	模板 DNA Template DNA /ng	Taq 聚合酶 Taq DNA polymerase /U
K ₁	43.00	36.67	37.00	34.00	11.00
K ₂	39.67	27.33	36.00	23.00	34.33
K ₃	43.33	35.67	33.33	29.33	46.33
K ₄	5.67	32.33	25.33	45.33	38.00
k ₁	10.75	9.17	9.25	8.50	2.75
k ₂	9.92	6.83	9.00	5.75	8.58
k ₃	10.83	8.92	8.33	7.33	11.58
k ₄	1.42	8.08	6.33	11.33	9.50
R	9.41	2.34	2.92	5.58	8.83

2.3 单因素试验结果与分析

2.3.1 Mg²⁺ 浓度单因素试验 由图 3 可知, Mg²⁺ 浓度对 PCR 的扩增有较大的影响, 这也与正交实验的直观分析结果一致。当 Mg²⁺ 浓度为 0.50 mmol · L⁻¹ 时, 没有扩增出条带, 当 Mg²⁺ 浓度为 0.75~1.75 mmol · L⁻¹ 时, 随着 Mg²⁺ 浓度的增加, 条带逐渐清晰, 多态性逐渐增强。但当浓度大于 2.00 mmol · L⁻¹ 后, 随着 Mg²⁺ 浓度的增加, 条带开始变淡, 引物多态性开始降低, 引物二聚体增加。当 Mg²⁺ 浓度大于 3.00 mmol · L⁻¹ 后, 条带模糊不清。因此反应体系中 Mg²⁺ 浓度确定为 1.75 mmol · L⁻¹。这也与正交实验结果基本一致。



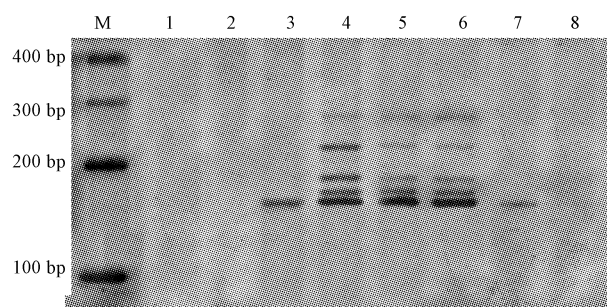
注: M, DL 2 000 DNA Marker; 泳道 1~12, Mg²⁺ 浓度 1~12 分别为 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75, 2.00, 2.25, 2.50, 2.75, 3.00, 3.25 mmol · L⁻¹。

Note: M, DL 2 000 DNA Marker; Lane 1-12, Mg²⁺ concentration are 0.50 mmol · L⁻¹, 0.75 mmol · L⁻¹, 1.00 mmol · L⁻¹, 1.25 mmol · L⁻¹, 1.50 mmol · L⁻¹, 1.75 mmol · L⁻¹, 2.00 mmol · L⁻¹, 2.25 mmol · L⁻¹, 2.50 mmol · L⁻¹, 2.75 mmol · L⁻¹, 3.00 mmol · L⁻¹, 3.25 mmol · L⁻¹, respectively.

图 3 Mg²⁺ 浓度单因素试验

Fig. 3 Optional concentration gradient of Mg²⁺ concentration

2.3.2 Taq 酶单因素试验 由图 4 可知, 当体系中的 Taq 酶小于 0.5 U 时, 没有扩增出条带, 当 Taq 酶介于 0.50~1.25 U 时, 随着 Taq 酶量增加, 扩增产物增多, 条带逐渐变清晰, 引物的多态性增强。当 Taq 酶量大于 1.75 U 时, 不能扩增出条带。酶量在 1.00, 1.25, 1.50 U 时, 扩增效果差异不大, 为了节约材料, 反应体系中最佳的 Taq 酶量为 1.00 U。



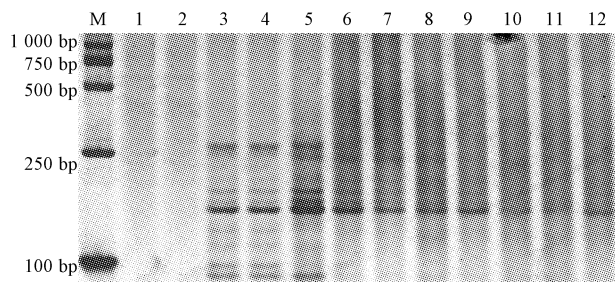
注: M, DL 1 000 DNA Marker; 泳道 1~8, Taq 酶量 1~8 分别为 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75, 2.00 U。

Note: M, DL 1 000 DNA Marker; Lane 1-8, Taq DNA polymerase of lane 1-8 are 0.25 U, 0.50 U, 0.75 U, 1.00 U, 1.25 U, 1.50 U, 1.75 U, 2.00 U, respectively.

图 4 Taq 酶量单因素试验

Fig. 4 Optional concentration gradient of Taq DNA polymerase

2.3.3 dNTPs 浓度单因素试验 由图 5 可以看出, 当 dNTPs 浓度为 0.05~0.10 mmol · L⁻¹ 时, 没有扩增出条带, 当 dNTP 浓度大于 0.15 mmol · L⁻¹ 时, 随着 dNTPs 浓度的增加, 扩增条带逐渐明亮清晰; 当浓度为 0.25 mmol · L⁻¹ 时, 扩增效果最佳; 当浓度大于 0.30 mmol · L⁻¹ 后, 随着浓度的增大, 条带逐渐弥散, 引物多态性降低, 背景颜色加深, 难以观察; 当 dNTP 浓度大于 0.50 mmol · L⁻¹ 后, 无法扩增出条带。综合以上分析, dNTPs 的最佳浓度为 0.25 mmol · L⁻¹, 这与正交实验结果比较, dNTPs 浓度在最佳组合 6 与最佳水平之间。



注: M, DL 1 000 DNA Marker; 泳道 1~12, dNTPs 浓度 1~12 分别为 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45, 0.50, 0.55, 0.60 mmol · L⁻¹。

Note: M, DL 1 000 DNA Marker; Lane 1-12, dNTPs concentration of lane 1-12 are 0.05 mmol · L⁻¹, 0.10 mmol · L⁻¹, 0.15 mmol · L⁻¹, 0.20 mmol · L⁻¹, 0.25 mmol · L⁻¹, 0.30 mmol · L⁻¹, 0.35 mmol · L⁻¹, 0.40 mmol · L⁻¹, 0.45 mmol · L⁻¹, 0.50 mmol · L⁻¹, 0.55 mmol · L⁻¹, 0.60 mmol · L⁻¹, respectively.

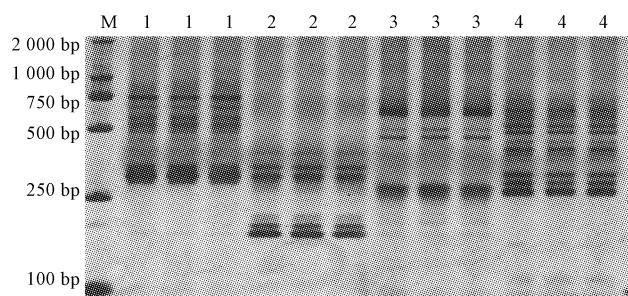
图 5 dNTPs 浓度单因素试验

Fig. 5 Optional concentration gradient of dNTPs concentration

2.4 苦瓜 SSR-PCR 最优反应体系稳定性的检测

综合正交实验和单因素试验的结果, 最后确立的最优体系包括: 1 μL 10 × PCR buffer, Mg²⁺ 浓度为 1.75 mmol · L⁻¹, dNTPs 浓度为 0.25 mmol · L⁻¹, Taq DNA 聚合酶 1 U, 模板 DNA 100 ng, 引物浓度为

0.20 mmol · L⁻¹, ddH₂O 补足至 10 μL。选用引物 S13、S24、S26、S32 对最优体系进行稳定性测试。由图 6 可知,4 对苦瓜 SSR 引物均可以扩增出清晰稳定的条带,对相同引物的 3 次 PCR 扩增结果进行比较,其多态性、条带强度及背景深浅都基本一致,说明该体系的稳定性较好。可以确定为苦瓜 SSR-PCR 的最优体系。



注:M,DL 2 000 DNA Marker;1,引物 S13;2,引物 S24;3,引物 S26;4,引物 S32。

Note:M,DL 2 000 DNA Marker;1,Primer S13;2,Primer S24;3,Primer S26;4,Primer S32.

图 6 SSR-PCR 最优反应体系稳定性的检测

Fig. 6 The stability testing result of optimized SSR-PCR system

3 讨论

在正交实验中 Mg²⁺ 浓度、Taq 酶含量、dNTPs 浓度全部都在单因素优化试验的最佳范围内。但是,结果并没有完全吻合,造成这种结果的原因可能是正交实验各因素设置的水平间隔过大,各水平之间未能形成明显差别,还可能是各因素之间有一定的互作效应,使试验所需的最佳浓度不同。从试验结果的对比中,也可以看出 SSR-PCR 对体系中各组分浓度的要求并不十分精确,只要在一定区间之内,都可以扩增出清晰稳定的条带^[10]。

由于 PCR 反应是分子标记的基础,反应体系是否合适直接影响着后续的研究观察和结果分析,而 PCR 反

应扩增效率受多个因素的影响,所以对 PCR 反应进行优化就显得十分重要。该试验采用了正交实验和单因素试验相结合对苦瓜 SSR-PCR 反应体系进行优化,并选取了 4 对 SSR 引物对体系进行验证,保证了试验结果的科学性和严谨性^[11-13],筛选出的 SSR-PCR 反应体系,可为今后苦瓜和其它苦瓜属作物的群体多样性遗传研究和种质纯度鉴定提供一定的技术参考。

参考文献

- [1] 罗冉,吴委林,张旸,等. SSR 分子标记在作物遗传育种中的应用[J]. 基因组学与应用生物学,2010(1):137-143.
- [2] 徐彦军,刘洋. 苦瓜外观性状 AFLP 反应体系的建立及优化[J]. 中国农学通报,2012,28(4):125-130.
- [3] 郭大龙,吴正景,郑玉萍,等. 苦瓜 SRAP 反应体系的建立与优化[J]. 安徽农业科学,2008,36(18):7583-7585.
- [4] 刘萌芽,黄如葵,黄玉辉,等. 正交直观分析法和新复极差法优化苦瓜 SRAP 反应体系研究[J]. 北方园艺,2014(5):85-88.
- [5] 田丽波,谷幸幸,商桑,等. 苦瓜基因组 DNA 的提取及 ISSR 扩增体系的优化[J]. 中国农学通报,2013,29(4):88-93.
- [6] 张菊平,巩振辉,张长远,等. 苦瓜 RAPD 分析体系的优化研究[J]. 河南农业大学学报,2003(1):49-53.
- [7] WANG S Z, PAN L, HU K, et al. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Momordica charantia* (Cucurbitaceae) [J]. American Journal of Botany, 2010, 97(8): 75-78.
- [8] GUO D L, ZHANG J P, XUE Y M, et al. Isolation and characterization of 10 SSR markers of *Momordica charantia* (Cucurbitaceae) [J]. American Journal of Botany, 2012, 99(5): 182-183.
- [9] 何正文,刘运生,陈立华,等. 正交设计直观分析法优化 PCR 条件[J]. 湖南医科大学学报,1998(4):76-77.
- [10] 孙佩光,奚如春,钮世辉,等. 油茶 SRAP-PCR 反应体系的建立和优化[J]. 基因组学与应用生物学,2010(6):1192-1199.
- [11] 周静,陈书霞,程智慧,等. 大蒜 SSR 体系的建立与优化[J]. 西北农业学报,2011(11):117-122.
- [12] 何仁锋,冯尚国,陈喆,等. 药用菊花 SSR-PCR 反应体系优化及引物筛选[J]. 分子植物育种,2015(2):367-378.
- [13] 徐阳,陈金慧,王颖,等. 杉木 SSR-PCR 体系优化[J]. 林业科技开发,2014(1):15-20.

Orthogonal Design-direct Analysis of SSR-PCR Reaction System in *Momordica charantia*

WANG Xindi^{1,2,3}, HUANG Rukai^{2,3}, FENG Chengcheng^{2,3}, LIANG Jiazu², HUANG Xiongjuan^{2,3}, LIU Xinglian²

(1. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530001; 2. Vegetable Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi 530007; 3. The Key Laboratory of Crops Genetic Improvement Biological Technology of Guangxi, Nanning, Guangxi 530007)

Abstract: Taking *Momordica charantia* 'MC9' as test material, an orthogonal experiment design of L₁₆(4⁵) with four levels and five factors was carried out, the factors were the concentration of Mg²⁺, the concentration of dNTPs, Taq polymerase, DNA template and the concentration of primers. The concentration of Mg²⁺, the concentration of dNTPs and DNA polymerase using single factor experiment design were also determined. The results showed that the optimum system containing 1 μL 10×PCR buffer, Mg²⁺ 1.75 mmol · L⁻¹, dNTPs 0.25 mmol · L⁻¹, Taq DNA polymerase 1 U, DNA template 100 ng, primer 0.20 mmol · L⁻¹.

Keywords: *Momordica charantia*; orthogonal experiment; single factor design