

濒危植物望天树 SSR-PCR 反应体系的优化

张美玲^{1,2}, 李巧明¹

(1. 中国科学院 西双版纳植物园 植物系统与保护生物学试验室, 云南 昆明 650223;
2. 中国科学院 研究生院 北京 100039)

摘要: 为探索适宜望天树(*Parashorea chinensis*)的 SSR-PCR 反应体系, 利用 $L^{16}(4^5)$ 正交试验设计, 对 SSR-PCR 反应体系中的 5 个反应组分(dNTPs、引物、DNA 模板、 Mg^{2+} 、*Taq* DNA 聚合酶)进行优化。结果显示, 各因素水平的变化对望天树 SSR-PCR 反应的影响由大到小依次为: 模板 DNA > dNTPs > 引物 > Mg^{2+} > *Taq* DNA 聚合酶。最终建立了适合望天树 SSR-PCR 分析的最佳反应体系: 在 25 μ L 反应体系中, $10 \times$ buffer(Mg^{2+} Free) 2.5 μ L, 模板 DNA 30 ng, dNTPs 20 mmol/L, 引物 13 μ mol/L, Mg^{2+} 50 mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶 0.5 U。利用该优化体系, 采用 3 对不同引物对 12 份分布于不同地区的望天树材料进行了检验, 证明此反应体系具有良好的稳定性和可重复性。

关键词: 望天树; SSR; 正交设计; PCR 反应; 优化

中图分类号: Q 948; Q 78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-7971(2011)S2-0425-08

望天树(*Parashorea chinensis*)又名擎天树^[1], 为龙脑香科(Dipterocarpaceae)柳安属(*Parashorea*)植物, 其适生于终年高温高湿、静风的热带季风气候, 主要分布于我国滇南、滇东南及桂西南等局部地区^[2-3]。望天树为常绿大乔木, 其树形高大通直圆满, 材质优良, 为世界著名用材^[4], 并含有多种有效药用活性成分^[5], 有很大的经济开发价值。而且, 望天树作为亚洲热带雨林的特有种, 对研究我国的热带植物区系有重要意义。由于近年来人们对望天树大量的采集和砍伐, 望天树种群数量锐减。加上人类经济活动的影响, 望天树赖以生存的生境也逐渐丧失和破碎化, 致使其种群扩张更加困难, 望天树的生存受到严重威胁。在《中国植物红皮书》中, 望天树被列为国家一级重点保护野生植物^[6]。对其进行保护生物学方面的研究迫在眉睫, 而利用稳定高效的分子标记对于其进行遗传分析, 可为其保护措施的制定提供科学依据, 对于合理、有效的保护该物种具有重要科学意义。

SSR(Simple Sequence Repeat)即简单重复序列, 是指由 1~6 个碱基组成的基序以首尾相接的

方式串联重复而成的一段 DNA 序列, 在真核生物的基因组中普遍存在, 植物基因组中含量尤其丰富^[7]。同一物种的不同基因型间, 微卫星基序的重复次数差异很大, 从而造成了微卫星位点的长度多态性^[8]。SSR 标记呈共显性的孟德尔式遗传, 其数量极为丰富、覆盖整个基因组, 信息含量极高, 而且对 DNA 数量及质量要求较低, 具有灵敏度高、稳定性好、可靠性高、操作简单等众多优点。现在已被广泛应用于群体遗传多样性分析^[9]、植物交配系统研究^[10]、种质资源鉴定^[11]、遗传图谱构建^[12]等多个领域。目前, 已有多种龙脑香科植物有了 SSR 标记方面的报道^[13-17], 但由于 SSR 标记引物具有物种特异性, 不同物种的 SSR-PCR 反应体系也不一样, 因此, 望天树 SSR-PCR 的最适反应条件还需要摸索。本研究利用正交设计分析法, 优化并建立适宜望天树的稳定高效的 SSR-PCR 反应体系, 为 SSR 分子标记在望天树上的应用打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

* 收稿日期: 2011-11-10

作者简介: 张美玲(1985-), 女, 湖北人, 硕士生, 主要从事保护植物分子生物学研究。

通讯作者: 李巧明(1973-), 女, 云南人, 副研究员, 主要从事保护遗传学研究。E-mail: lqm@xtbg.ac.cn

1.1.1 试验材料 供试材料为分别来自云南河口、马关、云南西双版纳白沙河、会都河、补蚌、会阴河等 6 个居群的 12 份望天树叶片(2 份/居群) , 分别编号 1 ~ 12 , 其中来自云南补蚌的 9 号为体系优化模板 , 其它均为体系检测模板。每株取其幼嫩叶片 , 用变色硅胶干燥 , 室温保存。

1.1.2 主要试剂与仪器 所用试剂 10 × PCR Buffer(Mg^{2+} Free) 、dNTPs (2. 5 nmol/ μ L) 、MgCl (25. 0 nmol/ μ L) 、*Taq* DNA 聚合酶(5. 0 U/ μ L) 等均为 TaKaRa 公司产品。100 bp DNA Marker 为分子量标准 , 购自百泰克公司。

引物为自行设计的 SSR 引物序列(表 1) , 正交试验所用引物为 JN900076 , 体系验证所用引物为 JN900061、JN900062、JN900078 , 均为上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 采用改良的 3 × CTAB

法^[18]从望天树叶片中提取基因组 DNA , 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其质量和浓度 , 根据相对的 EB 染色荧光强度 , 对总 DNA 浓度进行粗略估算 , 最终将 DNA 模板质量浓度定量在 20 ng/ μ L。

1.2.2 正交设计优化 SSR - PCR 反应体系 以云南补蚌居群的望天树基因组 DNA 为模板 , JN900076 为引物 , 采用 $L^{16}(4^5)$ 正交表 (表 2、3) , 对 SSR - PCR 反应体系的 DNA 模板、 Mg^{2+} 、dNTP、引物、*Taq* DNA 聚合酶共 5 个因素分别设 4 个浓度梯度水平 , 共 16 个处理的正交设计来确定望天树 SSR - PCR 反应的最佳水平。除表中变化因素外 , 每个反应体系均含有 2. 5 μ L 10 × PCR Buffer (Mg^{2+} Free) , 最后加入 ddH₂O 补齐到 25 μ L。PCR 扩增反应程序为: 95 ℃ 预变性 3 min; 94 ℃ 变性 30 s , 54 ℃ 复性 60 s , 72 ℃ 延伸 60 s , 35 个循环; 最后 72 ℃ 延伸 10 min , 4 ℃ 保存。扩增产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离及银染检测。

表 1 4 对望天树 SSR 引物
Tab. 1 Four pairs of SSR primers of *Parashorea chinensis*

Genbank 序列号	引物序列	重复基元
JN900061	F: 5'-CTGATTGATGGTGGACTA 3' R: 5'-ATGTCTCGAATAAGGAGC 3'	(TC) ₁₀ ...(AC) ₉
JN900062	F: 5'-GAGCGCACGAGCTATCAA 3' R: 5'-GATCGGGAGGGATTTCAG 3'	(TGC) ₃ tgg(TTC) ₃ gtc(TTC) ₅ (GA) ₉
JN900076	F: 5'-TGGAGGGTTGCTGATGCT 3' R: 5'-TCAACTGGCCCTTTGATG 3'	(TC) ₁₄
JN900078	F: 5'-TAGCAGCTTTTATGGGATT 3' R: 5'-GATTTGGATTTTAGTATTCTGG 3'	(TC) ₁₈

表 2 望天树 SSR - PCR 体系优化的因素及水平
Tab. 2 Factors and levels used for optimizing SSR - PCR reaction system of *Parashorea chinensis*

水平	因素				
	<i>m</i> (模板 DNA) / 20 ng	<i>c</i> (Mg^{2+}) / (mmol • L ⁻¹)	<i>c</i> (dNTPs) / (mmol • L ⁻¹)	<i>c</i> (引物) / (μ mol • L ⁻¹)	ρ (<i>Taq</i> DNA 聚合酶) / (U • μ L ⁻¹)
1	30	25	15	8	0. 02
2	40	37. 5	20	10	0. 04
3	50	50	25	13	0. 06
4	60	62. 5	30	15	0. 08

表 3 望天树 SSR - PCR 反应的 $L^{16}(4^5)$ 正交设计因素水平
Tab. 3 The $L^{16}(4^5)$ orthogonal design for SSR - PCR of *Parashorea chinensis*

编号	因素				
	m (模板 DNA) / 20 ng	$c(Mg^{2+})$ / (mmol · L ⁻¹)	$c(dNTPs)$ / (mmol · L ⁻¹)	c (引物) / (μmol · L ⁻¹)	ρ (Taq DNA 聚合酶) / (U · μL ⁻¹)
1	30	25	15	8	0.02
2	30	37.5	20	10	0.04
3	30	50	25	13	0.06
4	30	62.5	30	15	0.08
5	40	25	20	13	0.08
6	40	37.5	15	15	0.06
7	40	50	30	8	0.04
8	40	62.5	25	10	0.02
9	50	25	25	15	0.04
10	50	37.5	30	13	0.02
11	50	50	15	10	0.08
12	50	62.5	20	8	0.06
13	60	25	30	10	0.06
14	60	37.5	25	8	0.08
15	60	50	20	15	0.02
16	60	62.5	15	13	0.04

10 × PCR Buffer(Mg^{2+} Free) 均为 2.5 μL, 加 ddH₂O 至 25 μL.

1.2.3 数据分析 参照何正文等^[19]的方法,对 16 个处理的扩增条带按其主带的强弱,杂带的多少以及背景的深浅进行评分,共设 4 次重复.主带清晰度越高,杂带越少,背景越浅的评分越高,最高记为 16 分;反之,主带模糊有弥散现象,杂带多,背景深的评分越低,最低记为 1 分.采用 SPSS 软件对 4 次评分结果做方差分析和多重比较,用 EXCEL 软件做出曲线图.

1.2.4 SSR - PCR 体系稳定性检测 以表 1 中的 JN900061、JN900062、JN900078 为引物,用优化的最佳 SSR - PCR 体系对所有的 12 份望天树材料进行扩增,PCR 产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,以验证其稳定性和广泛性.

2 结果与分析

2.1 SSR - PCR 正交设计结果 将正交设计的 16 个处理(表 3)按上述扩增程序进行 SSR - PCR

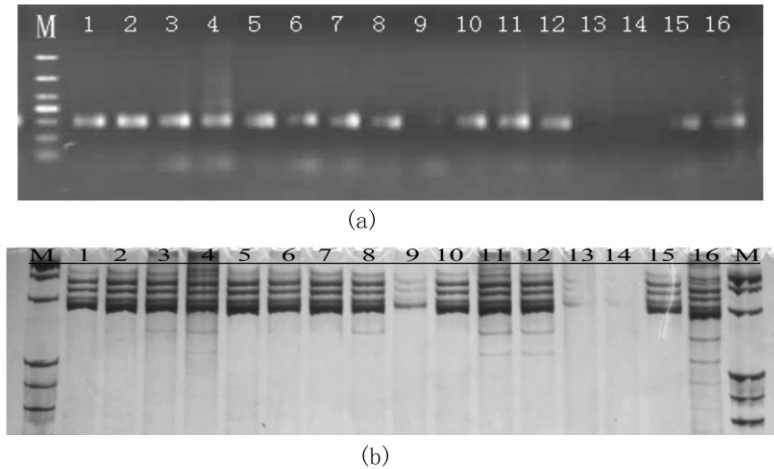
反应,反应产物经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后银染检测.检测结果如图 1 所示.除了第 14 个反应体系没有扩增出条带,其余 15 个具有扩增条带,说明试验所设计的各个试验因素浓度梯度均没有偏离最适范围.依照评分标准,对各处理进行评分,评分结果见表 4.4 次计分结果比较一致,表明各处理重复性好.

2.2 正交试验结果分析 将以上处理的的评分结果用 SPSS 软件进行方差分析,由表 5 可知,模板 DNA 的量对 PCR 反应结果的影响最大,Taq DNA 聚合酶浓度的影响最小,各因素水平的变化对 PCR 反应的影响由大到小依次为:模板 DNA > dNTPs > 引物 > Mg^{2+} > Taq DNA 聚合酶.由 P 值可知各因素水平间的差异均达到了极显著水平,因此进一步对各因素进行因素内多重比较.

2.2.1 DNA 模板用量对 SSR - PCR 反应体系的影响 方差分析显示,模板 DNA 的用量对 PCR 反

应结果的影响最大. PCR 反应中 模板 DNA 含量过低 与引物的碰撞几率降低 则结合概率亦降低 扩增产物量少或扩增不稳定; 模板 DNA 含量过高 则会增加非特异性扩增. 图 1 中 ,1 到 8 号处理均有清晰的条带 ,而在 9 ~ 16 号处理中 ,除了 3 个处理

(9 ,13 ,14) 扩增条带极弱或者无 ,其它 5 个处理条带的亮度也远远低于 1 ~ 8 的处理. 图 2 的结果与此相合 ,当 DNA 在 30 ~ 40 ng 时 ,均能扩增出较好的产物 ,且随着模板 DNA 用量的增加 ,评分结果均值逐步递增; 当 DNA 用量为 40 ~ 60 ng 时 ,评分结



(a) : 4% 琼脂糖凝胶电泳图谱; (b) : 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱; M: DNA Marker. (1 ~ 16 为 16 个组合)

图 1 望天树正交设计 SSR - PCR 产物电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis profiles of SSR - PCR of *Parashorea chinensis* by orthogonal design

表 4 $L^{16}(4^5)$ 正交设计的 16 个处理
Tab. 4 The $L^{16}(4^5)$ orthogonal design for SSR - PCR

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

表 5 PCR 反应各因素间方差分析
Tab. 5 The results of variance analysis among factors

变异来源	自由度(DF)	平方和(SS)	均方(MS)	F 值	显著水平(P 值)
模板 DNA	3	662. 643	220. 881	589. 016	<0. 001
Mg ²⁺	3	63. 810	21. 270	56. 720	<0. 001
dNTPs	3	165. 810	55. 270	147. 386	<0. 001
引物	3	98. 810	32. 937	87. 831	<0. 001
Taq 酶	3	24. 500	8. 167	21. 778	<0. 001
误差	48	18. 000	0. 375		
总变异	63	1041. 750			

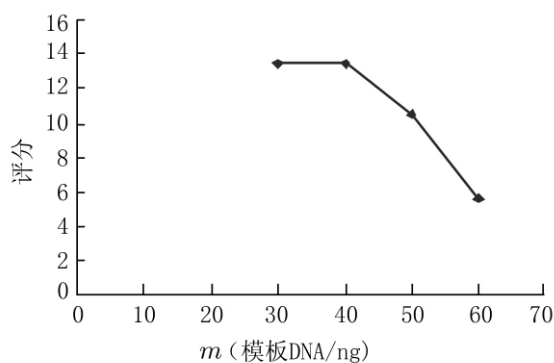


图2 模板 DNA 用量与评分结果的关系

Fig. 2 The relationship between template DNA concentration and the evaluation result

果均值呈递减趋势,用量越高评分越低。对模板 DNA 的 4 个用量水平进行多重比较,结果显示,30 ng 与 40 ng 间无显著差异。因此,从经济的角度考虑,将模板 DNA 的最适用量定为 30 ng。

2.2.2 dNTPs 浓度对 SSR-PCR 反应体系的影响

dNTPs 的浓度是影响望天树 SSR-PCR 的另一个重要因素。dNTPs 是 PCR 反应的原料,浓度过低会导致扩增产量低,而浓度过高则会与 *Taq* DNA 聚合酶竞争性结合 Mg^{2+} ,使酶反应活性降低,从而降低扩增效率。由图 3 可见,当 dNTPs 的浓度为 20 mmol/L 时扩增效果最好,25 mmol/L 时扩增效果最差。对 dNTPs 各浓度水平进行因素内多重比较,结果显示,20 mmol/L 和其它 3 个浓度水平均有显著差异。因此,选定模板 dNTPs 的最适浓度为 20 mmol/L。

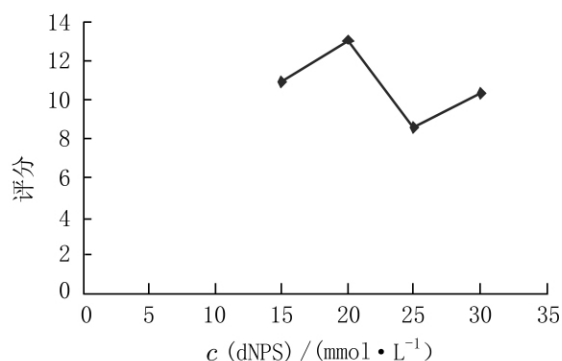


图3 dNTPs 浓度与评分结果的关系

Fig. 3 The relationship between dNTPs concentration and the evaluation result

2.2.3 引物浓度对 SSR-PCR 反应体系的影响

引物浓度直接影响到 PCR 产物的生成,浓度过低时,所结合的模板 DNA 减少,造成模板 DNA 的浪费,扩增产量降低;浓度过高时则会引起模板与引物的错配,增加非特异性结合的几率,容易形成引物二聚体。由图 4 可见,当引物浓度为 13 $\mu\text{mol/L}$ 时,所得的评分结果均值最高,而当低于或高于此浓度时,评分结果均值均为减少。对引物浓度进行因素内多重比较,结果表明,引物浓度各水平间差异均达到极显著水平。因此,试验中采用 13 $\mu\text{mol/L}$ 的引物浓度为宜。

2.2.4 Mg^{2+} 浓度对 SSR-PCR 反应体系的影响

Mg^{2+} 是 *Taq* DNA 聚合酶的激活剂,适量浓度的 Mg^{2+} 可促进 *Taq* DNA 聚合酶发挥聚合作用。但当 Mg^{2+} 浓度过高时,容易生成非特异产物;而 Mg^{2+} 浓度过低时,会使扩增产物量减少。如图 5 可见, Mg^{2+} 含量在 50 mmol/L 时评分结果均值最高,当低于或高于这个浓度时,评分结果均值降低。对 Mg^{2+} 浓度进行因素内多重比较,结果表明,50 mmol/L 和 60 mmol/L 间差异不显著。为了节约成本,故选择 50 mmol/L 为 Mg^{2+} 最适用量。

2.2.5 *Taq* DNA 聚合酶对 SSR-PCR 反应体系的影响

由方差分析得知,在望天树 SSR-PCR 反应体系中,*Taq* DNA 聚合酶浓度的影响最小。由图 6 可知,*Taq* DNA 聚合酶的 4 个浓度梯度均有大于 10 的评分结果均值,且 *Taq* DNA 聚合酶浓度为 0.02 U/ μL 时,扩增结果评分最高,浓度为 0.02 ~ 0.08 U/ μL 时,评分结果均值则逐步递减。对 *Taq* DNA 聚合酶的 4 个浓度水平进行多重比较,结果显

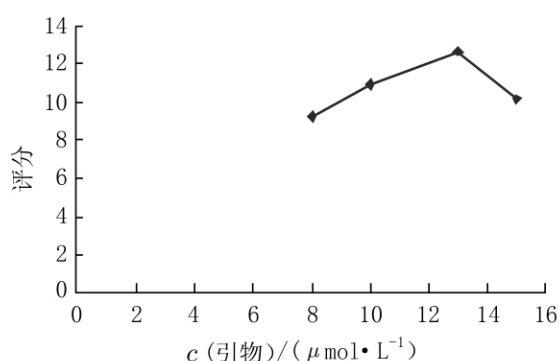


图4 引物浓度与评分结果的关系

Fig. 4 The relationship between the primers concentration and the evaluation result

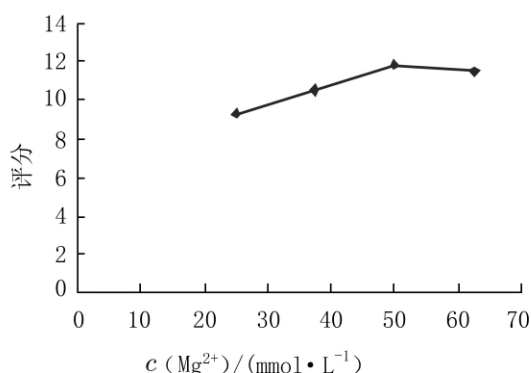


图5 Mg^{2+} 浓度与评分结果的关系

Fig. 5 The relationship between Mg^{2+} concentration and the evaluation result

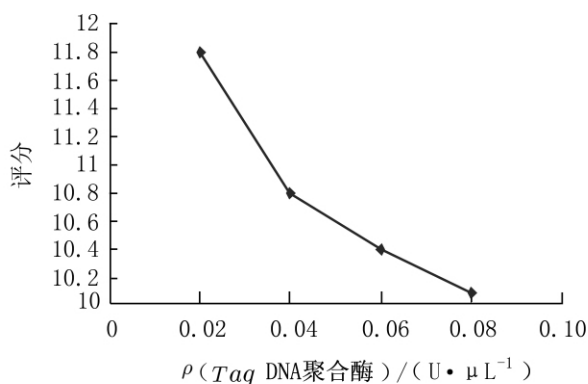


图6 *Taq* DNA 聚合酶浓度与评分结果的关系

Fig. 6 The relationship between *Taq* DNA polymerase concentration and the evaluation result

示 0.02 U/μL 与其它 3 个水平有极显著差异,因此,选定 *Taq* DNA 聚合酶的最佳浓度为 0.02 U/μL.

综上所述,本试验得到望天树 SSR-PCR 反应的最适宜体系: 25 μL 体系中, 10 × buffer (Mg^{2+} Free) 2.5 μL, 模板 DNA 30 ng, dNTPs 20 mmol/L, 引物 13 μmol/L, Mg^{2+} 50 mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶 0.02 U/μL. SSR-PCR 扩增程序为: 95 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 54 °C 复性 60 s, 72 °C 延伸 60 s, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存.

2.3 最佳 SSR-PCR 反应体系的验证 采用上述最佳体系,以分别来自 6 个自然居群的共 12 个望天树个体为 DNA 模板,用 JN900078、JN900062 和 JN900061 共 3 对引物进行 SSR-PCR 反应. 反应结果如图 7 所示, 36 个反应中除了 1 个无扩增产物,其它均能扩增出目的条带,且扩增条带清晰,无弥散现象,说明此反应体系稳定,并由较高的可重复性.

3 讨论

PCR 反应是 SSR 检测过程中的一个重要环节,建立稳定高效的 SSR-PCR 反应体系是 SSR 分子标记技术应用的基础. 而 SSR 反应涉及诸多影响因素,且各个因素之间还相互影响,因此我们选用正交设计来对望天树的 PCR-SSR 体系进行优化. 正交设计利用正交表的整齐可比性和均衡分散性,能够以有限可行的试验次数来研究多个因素不同水平间的交互作用,比单因素试验更加可

靠^[20]. 目前正交试验设计多已在多个物种的 SSR-PCR 反应体系的优化中得到应用^[21-24]. 本试验采用正交设计,结合统计分析软件,增强了试验的可靠性和精确性.

本试验采用正交设计,结合统计分析软件,对望天树反应体系进行了优化.

本研究中, DNA 模板的含量对 PCR 反应的影响最大. 望天树组织细胞中含有较多的多糖和多酚类次生代谢产物,这些物质很容易与 DNA 结合形成不溶的复合物. 因此, DNA 模板量过多时,不光会增加非特异性产物, DNA 中的杂质还会抑制 *Taq* 聚合酶的活性,从而影响到 PCR 的效率. 其次 dNTPs 的浓度也对 PCR 反应有着较大的影响, dNTPs 是 PCR 反应的原料,其浓度直接影响了 PCR 产物的生成,浓度过低会导致扩增产量降低,浓度过高则会与 *Taq* DNA 聚合酶竞争性结合 Mg^{2+} , 从而影响 *Taq* DNA 聚合酶反应的活性,不仅浪费,还会增加错配率. 此外,引物也要适量,浓度过低无法启动 PCR 反应,过高则会产生引物二聚体,出现非特异产物. Mg^{2+} 可催化 *Taq* DNA 聚合酶的聚合作用,当用量不足时会抑制 *Taq* DNA 聚合酶的活性,减少扩增产物的产量,而当用量过多时,则会增加非特异产物的扩增. *Taq* 聚合酶浓度对望天树 SSR-PCR 反应的影响最小,但当其浓度过高时也会提高错配几率,导致非特异性条带的产生.

本文对 SSR-PCR 反应体系中 DNA 模板用量、 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度、引物浓度和 *Taq* DNA 聚合酶浓度进行了优化试验,最终建立了适合望天树

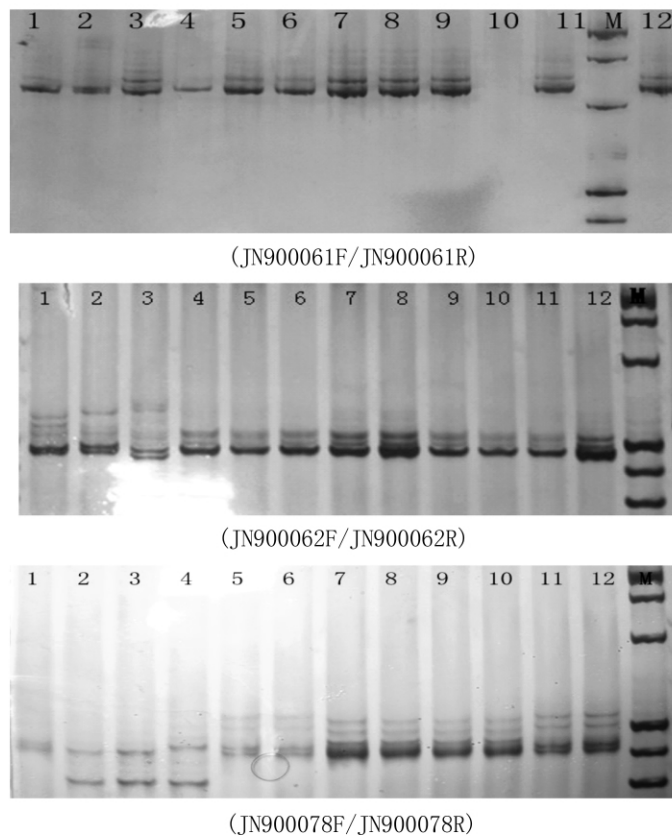


图 7 3 对引物组合在 12 个望天树个体上的 SSR-PCR 扩增结果

Fig. 7 Electrophoresis profiles of SSR-PCR in 12 individuals of *Parashorea chinensis* with 3 pairs of primers

SSR-PCR 分析的最佳反应体系: 在 25 μL 反应体系中, 引物浓度为 13 $\mu\text{mol/L}$, dNTPs 浓度为 20 mmol/L, Mg^{2+} 浓度为 50 mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶浓度为 0.02 U/ μL , 模板 DNA 用量为 30 ng. 经 3 对望天树 SSR 引物对 12 份分布于不同地区的望天树材料进行检测, 所建立的体系稳定, 重复性好. 此优化体系的建立为今后利用 SSR 标记对望天树的种质资源鉴定、交配系统研究、遗传多样性分析及遗传图谱构建等工作奠定了良好的基础.

参考文献:

- [1] 擎天树协作组. 广西珍贵树种擎天树[J]. 植物分类学报, 1977, 15(2): 22-30.
- [2] 陶国达, 童绍全. 中国龙脑香科资料[J]. 云南植物研究, 1982, 4(4): 345-346.
- [3] 陶国达, 童绍全. 中国植物志 50 卷 2 分册[M]. 北京: 科学出版社, 1990.
- [4] 张景良. 西双版纳主要木材(一) [M]. 北京: 中国林业出版社, 1989.
- [5] 郑哲彬、赵守训. 望天树根皮三萜类成分的分离鉴定[J]. 中国药科大学学报, 1994, 25(5): 262-264.
- [6] 傅立国. 中国植物红皮书(第一册) [M]. 北京: 科学出版社, 1992.
- [7] TAUTZ D, RENZ M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes[J]. Nucleic Acids Research, 1989, 17: 4127-4138.
- [8] MAGUIRE T L, PEAKALL R, SAENGER P. Comparative analysis of genetic diversity in the mangrove species *avicennia marina* (Forsk.) Vierh (Avicenniaceae) detected by AFLPs and SSRs [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 104: 388-398.
- [9] GE X J, SUN M. Reproductive biology and genetic diversity of a cryptoviviparous mangrove *Aegiceras corniculatum* (Myrsinaceae) using allozyme and inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis [J]. Molecular Ecology, 1999, 8: 2061-2069.
- [10] GAIOTTO F A, GRATAPAGLIA D, VENCOSKY R. Genetic structure, mating system and long-distance gene flow in heart of palm [J]. Journal of Heredity, 2003, 94(5): 399-406.
- [11] 陈佩度. 作物育种生物技术[M]. 北京: 中国农业出

- 版社 2001.
- [12] BROWN P ,TANKSLEY S D. Characterization and genetic mapping of simple sequence repeat in the tomato genome [J]. Molecular Genetics and Genomics ,1996 , 250: 39-49.
- [13] ALINE F ,SASCHA I ,JABOURY G ,et al. Development of polymorphic microsatellite markers of the endangered and endemic *Vateriopsis seychellarum* (Dipterocarpaceae) a relict canopy tree of the Seychelles [J]. Conservation Genet Resour 2010 2: 309-311.
- [14] CHADAPORN S ,SUCHITRA C ,PAIROT P ,et al. Genetic structure and diversity of *Shorea obtuse* (Dipterocarpaceae) in Thailand [J]. Journal of Systematics and Evolution 2011 49(2) : 120-125.
- [15] CHIN H ,SOON L L ,KECIN K S ,et al. Development of microsatellite markers for *Shorea platyclados* (Dipterocarpaceae) [J]. Conservation Genet Resour 2009 1: 317-319.
- [16] OBAYASHI K ,TSUMURA Y ,IHARA - UJINO T. Genetic diversity and outcrossing rate between undisturbed and selectively logged forests of *Shorea curitisii* (Dipterocarpaceae) using microsatellite DNA analysis [J]. International Journal of Plant Sciences 2002 ,163 (1) : 151-158.
- [17] SHINSUKE M ,NAOKI T ,MASATO O ,et al. Isolation and characterization of 12 microsatellite loci for the tropical tree species *Shorea maxwelliana* and *S. laevis* (Dipterocarpaceae) [J]. Conservation Genet Resour , 2010 2: 109-111.
- [18] DOYLE J J ,DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue [J]. Physio Chemical. Bulletin ,1987 ,19: 11-15.
- [19] 何正文,刘运生,陈立华,等. 正交设计直观分析法优化条件 [J]. 湖南医科大学学报 ,1998 ,23 (4) : 403-404.
- [20] 姜同川. 正交试验设计 [M]. 济南: 山东科学技术出版社 ,1985.
- [21] 杨传平,王艳敏,魏志刚. 利用正交设计优化白桦的 SSR - PCR 反应体系 [J]. 东北林业大学学报 ,2006 , 34(6) : 1-3.
- [22] 王志勇,郭海林,刘建秀. 正交设计优化狗牙根 SSR - PCR 反应体系 [J]. 分子植物育种 ,2007 ,5 (6) : 201-206.
- [23] 李亚利,陈书霞,孟焕文,等. 利用正交设计优化黄爪的 SSR - PCR 反应体系 [J]. 西北农业学报 , 2008 ,17(3) : 250-284.
- [24] 黄丽芳,雷新涛,姚全胜,等. 芒果 SSR - PCR 反应体系的优化 [J]. 热带作物学报 ,2010 ,31(3) : 410-415.

Optimization of SSR - PCR reaction system on an endangered plant *Parashorea chinensis*

ZHANG Mei-ling^{1,2} , LI Qiao-ming¹

(1. The Lab of Plant Phylogenetics & Conservation ,Xishuangbanna Tropical Botanical Garden , Chinese Academy of Sciences ,Kunming 650223 ,China;

2. Graduate School of the Chinese Academy Sciences ,Beijing 100039 ,China)

Abstract: An orthogonal design of $L^{16}(4^5)$ was applied to optimize the SSR - PCR system on *Parashorea chinensis* ,which employed five major components (dNTPs ,primers ,template DNA , Mg^{2+} and *Taq* DNA polymerase) . The results indicated the significance of the effect of five factors on the PCR reaction was in the order of template DNA > dNTPs > primer > Mg^{2+} > *Taq* DNA polymerase. An optimal 25 μ L SSR - PCR reaction system of *Parashorea chinensis* has been constructed ,contained 2.5 μ L 10 $\times$ buffer(Mg^{2+} Free) ,30 ng template DNA ,20 mmol/L dNTPs ,13 μ mol/L primers ,50 mmol/L Mg^{2+} ,0.5 U *Taq* DNA polymerase. To validate the SSR - PCR reaction system above ,12 individuals of *Parashorea chinensis* which distributed in different areas and 3 different SSR primers were employed in this research. The results indicated that the SSR - PCR reaction system is repetitive and steady.

Key words: *Parashorea chinensis*; SSR; orthogonal design; PCR reaction; optimization