

李琳琳,严 林,王海春,等. 枸杞棉蚜 SSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 江苏农业科学,2017,45(7):40-44.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.07.009

枸杞棉蚜 SSR-PCR 反应体系的建立与优化

李琳琳,严 林,王海春,李成洁,冶成祥,谢永丽
(青海大学农牧学院草业科学系,青海西宁 810016)

摘要:采用单因素法和 $L_{25}(5^5)$ 正交试验设计进行简单重复系列 PCR(SSR-PCR)反应体系优化,并对引物退火温度进行筛选,以建立适宜枸杞棉蚜的 SSR 反应体系和扩增程序。结果表明,枸杞棉蚜 SSR-PCR 的优化体系总体积为 25 μL ,包括 50 ng 模板 DNA,1.5U *Taq* DNA 聚合酶,150 $\mu\text{mol/L}$ Mg^{2+} ,300 $\mu\text{mol/L}$ dNTPs,0.4 pmol/ μL 引物,优化后的检测体系更为经济有效;Ago66 引物 PCR 适宜退火温度为 58 $^{\circ}\text{C}$ 。

关键词:棉蚜;SSR;单因素试验;正交优化
中图分类号: S435.671 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)07-0040-04

运用分子生物学技术研究蚜虫已经成为热点问题^[1],棉蚜的分子生物学研究多集中于棉花型棉蚜和黄瓜型棉蚜,国内学者孟玲等初步应用随机扩增多态性 DNA(RAPD)研究黄瓜寄主和棉花寄主的棉蚜遗传多样性,奠定了一定的基础^[2-3]。邹晨辉等采用简单重复序列(SSR)初步研究了不同地理及季节的棉花型棉蚜遗传多样性^[4-6]。国外学者 Fuller 等运用 SSR 技术研究了欧洲、非洲、美洲、亚洲等地区多个国家的棉蚜遗传多样性,这些棉蚜原寄主涉及棉花、葫芦科、棉花、茄子、马铃薯、辣椒、花椒、梨树和柑橘树^[7-9]。枸杞是重要的药用经济作物,棉蚜危害严重,国内外尚缺少对原寄主是枸杞的棉蚜分子生物学方面的研究资料。

微卫星 DNA 是短的碱基重复序列,最早在寄居蟹中被发现^[10],在真核生物中广泛存在,由于点突变、不等交换、基因转换等原因,使其变异速率高,因此具有高的多样性及种特异性^[11]。微卫星分子标记是基于 PCR 的第二代分子标记技术^[12],具有重复性好、多态性高、共显性、所需 DNA 量少、操作简单等优点。正是由于微卫星分子标记是基于 PCR 的,因此优化的 PCR 体系与扩增条件是微卫星分子标记的前提条件。

单因素试验无法考虑到因素之间的交互作用,正交试验无法分析因素的影响趋势,本研究综合以上 2 种方法,弥补不

足,以枸杞棉蚜为材料,对 DNA 用量、*Taq* 聚合酶用量、 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度和引物浓度 5 个因素进行优化,建立枸杞棉蚜 SSR-PCR 试验的最佳反应体系,并在此基础上得到引物的最适退火温度。本试验探讨枸杞棉蚜种群遗传多样性研究中 SSR-PCR 方法的一致性、可靠性和可重复性,为枸杞棉蚜种群遗传多样性分析、生物型鉴定、指纹图谱构建等研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料 材料采于青海诺木洪红枸杞栽培田,采集无翅棉蚜成虫,样品单头分别放于盛有无水乙醇的 1.5 mL 离心管中浸泡,于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.1.2 试剂 试验所用试剂 10 \times PCR Buffer (无 Mg^{2+})、dNTPs (2.5nmol/ μL)、 MgCl_2 (25.0nmol/ μL)、*Taq* DNA 聚合酶 (5.0 U/ μL) 等均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。200 bp DNA Marker, 购自 TaKaRa 公司。SSR 引物采用 Vanlerberghe-Masutti 等于 1999 年设计的棉蚜微卫星引物(表 1)^[13],正交试验所用引物为 Ago66,引物 Ago59 和 Ago89 为体系验证引物,均为生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 SSR 引物序列与来源

引物名称	引物序列(方向为 5'→3')	重复序列	来源
Ago59	F:GCGAGTGGTATTCGCTTAGT;R:GTTACCCCTGACGATTGCGT	(AC) ₁₉ AT(AC) ₅ (GC) ₄	[13]
Ago66	F:TCGGTTTGGCAACGTCGGGC;R:GACTAGGGAGATGCCGGCGA	(TG) ₁ ...(TG) ₄ (TA) ₄	[13]
Ago89	F:GAACAGTGCTCGCAGTCTAT;R:GACAGCGTAAACATCGCGGT	(AC) ₉ AT(AC) ₂ [TC(AC ₂)] ₂₁	[13]

收稿日期:2016-10-17
基金项目:青海省自然科学基金(编号:2014-ZJ-919);青海省科技支撑计划(编号:2012-N-A7、2009-N-108-02);教育部长江学者和创新团队发展计划(编号:IRT13074)。
作者简介:李琳琳(1992—),女,新疆沙雅人,硕士研究生,主要从事枸杞害虫方面的研究。E-mail:nulililinin@sina.com。
通信作者:严 林,博士,教授,主要从事高原昆虫研究。E-mail:870392996@qq.com。

1.2 方法

1.2.1 枸杞棉蚜总 DNA 提取及检测 采用杨子祥等的改进 SDS 法^[14]提取枸杞棉蚜基因组 DNA,用核酸微量测定仪(德国 Eppendorf 公司 BioSpectrometerbasic 型)检测 DNA 的浓度和质量,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性,将提取的 DNA 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 因素设计方案 本试验设定的标准反应体系:反应总体积为 25 μL ,其中含有 80 ng 模板 DNA、2.5 U *Taq* 酶、

150 $\mu\text{mol/L}$ Mg^{2+} 、250 $\mu\text{mol/L}$ dNTPs、1.2 $\text{pmol}/\mu\text{L}$ 引物。为比较不同处理对 SSR 扩增的影响,采用单因素体系优化试验对影响扩增的 Mg^{2+} 、dNTPs、*Taq* 酶、引物分别设置 5 种梯度水平。即当一种成分浓度梯度变化时,其他成分不变。其中 DNA 模板的梯度设计为 20、40、60、80、100 ng; *Taq* 酶的梯度设计为 0.5、1、1.5、2、2.5 U; Mg^{2+} 的梯度设计为 150、175、200、225、250 $\mu\text{mol/L}$; dNTPs 的梯度设计为 100、150、200、250、300 $\mu\text{mol/L}$; 引物的梯度设计为 0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 $\text{pmol}/\mu\text{L}$ 。加 ddH₂O 补足体积为 25 μL 。

1.2.3 正交优化设计 为探讨反应因素间的互作效应,PCR 扩增所设置因素的水平同单因素试验一致,采用 L₂₅(5⁵) 正交试验设计(表 2)。为提高试验准确性,正交试验进行 1 次重复检验。

表 2 正交试验设计

序号	模板 DNA 量 (ng)	<i>Taq</i> 酶量 (U)	Mg^{2+} 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	dNTPs 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	引物浓度 ($\text{pmol}/\mu\text{L}$)
1	10	1.5	225	150	0.5
2	10	2.5	175	200	0.7
3	10	1.0	250	250	0.4
4	10	2.0	200	300	0.6
5	10	0.5	150	100	0.3
6	30	1.5	250	100	0.7
7	30	0.5	175	300	0.5
8	30	1.0	150	200	0.6
9	30	2.5	200	150	0.4
10	30	2.0	225	250	0.3
11	50	2.5	225	100	0.6
12	50	0.5	200	250	0.7
13	50	1.0	175	150	0.3
14	50	1.5	150	300	0.4
15	50	2.0	250	200	0.5
16	70	0.5	225	200	0.4
17	70	1.0	200	100	0.5
18	70	2.0	150	150	0.7
19	70	1.5	175	250	0.6
20	70	2.5	250	300	0.3
21	90	2.0	175	100	0.4
22	90	0.5	250	150	0.6
23	90	1.5	200	200	0.3
24	90	2.5	150	250	0.5
25	90	1.0	225	300	0.7

1.2.4 SSR-PCR 扩增及产物检测 PCR 反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,35 次循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。PCR 扩增产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,用 DL200 Marker 作为标准分子量参照物,恒压 180 V 电泳约 1 h,经固定、银染、显色和漂洗后,数码相机拍照观察。

参照何正文等的方法^[15],依据扩增条带的敏感性和特异性进行计分,分数越高表示扩增带的敏感性、特异性越好。

1.2.5 PCR 扩增程序退火温度的筛选 在确定最佳反应体系的基础上,对引物 Ago66 的退火温度在 T_m 值上下设置 5 个温度梯度进行筛选。

1.2.6 SSR 最佳反应体系的验证 利用引物 Ago59 和

Ago89 验证此反应体系的可行性及稳定性。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取

用改进的十二烷基硫酸钠(SDS)法提取的枸杞棉蚜 DNA 样品浓度在 155 ~ 300 ng/mL, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值在 1.65 ~ 1.88 之间。经琼脂糖电泳检测,点样泳道均检测出明亮清晰的 DNA 条带,说明改进的 SDS 法提取枸杞棉蚜的 DNA 质量较高、完整、无降解,点样孔有微量蛋白质、多糖等杂质(图 1)。结果表明,提取的 DNA 能够满足 SSR-PCR 试验要求。

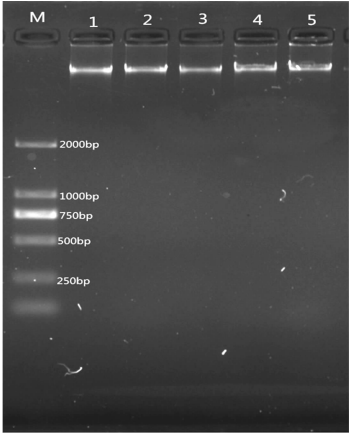


图 1 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果

2.2 单因素优化试验

以枸杞棉蚜为材料,进行单因素优化试验,5 个因素对 SSR-PCR 试验影响见图 2。

单因素优化试验结果表明,DNA 浓度对扩增影响不大,在设定的 DNA 浓度下均能扩增出谱带,随 DNA 用量增加,扩增产物增多,其中 40 ng 扩增条带最清晰;DNA 浓度高于 60 ng/ μL ,扩增产率高,但条带模糊。

Taq DNA 聚合酶直接影响 PCR 扩增效率,0.5 U 反应不能扩增出目的条带,含量高于 2.5 U 反应时,反而抑制扩增,使扩增条带弥散。

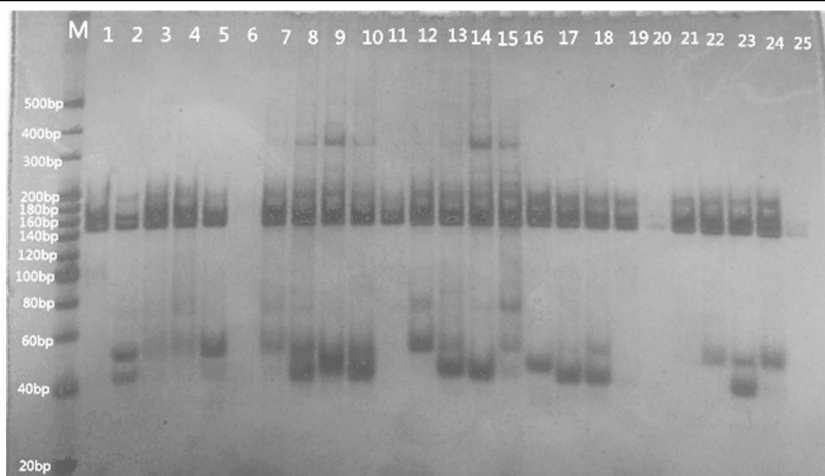
设定的 Mg^{2+} 浓度不同,扩增效果不同,150 ~ 250 $\mu\text{mol/L}$ 均能扩增出目的条带。 Mg^{2+} 作为 *Taq* 酶的激活剂,浓度高于 175 $\mu\text{mol/L}$ 时有非特异性扩增, Mg^{2+} 浓度升高时,会使 PCR 扩增产物背景加深。

dNTPs 是 PCR 扩增中磷酸基团的来源,低浓度易使其过早消耗,扩增效果差,多为扩增单链;高浓度的 dNTPs,导致 *Taq* 酶错误掺入,引起错配,产生非特异性扩增,浓度大于 300 $\mu\text{mol/L}$ 时,过量的 dNTPs 会与聚合酶结合抑制 PCR 反应。

引物作为 PCR 扩增的原料,引物成功与模板 DNA 结合,便可扩增出有效片段,0.3 ~ 0.6 $\text{pmol}/\mu\text{L}$ 引物模板均能与 DNA 模板有效结合,都能扩增出条带,引物模板浓度高于 0.7 $\text{pmol}/\mu\text{L}$,引物易与自身结合并扩增,形成引物二聚体。

2.3 正交优化试验

由图 3 可见,重复 1 中有 5 个组合没有扩出条带,另有 2 个组合条带很弱;重复 2 中有 1 个组合没有扩增条带,说明正交试验所设计的各个试验因素浓度梯度均没有偏离最适范



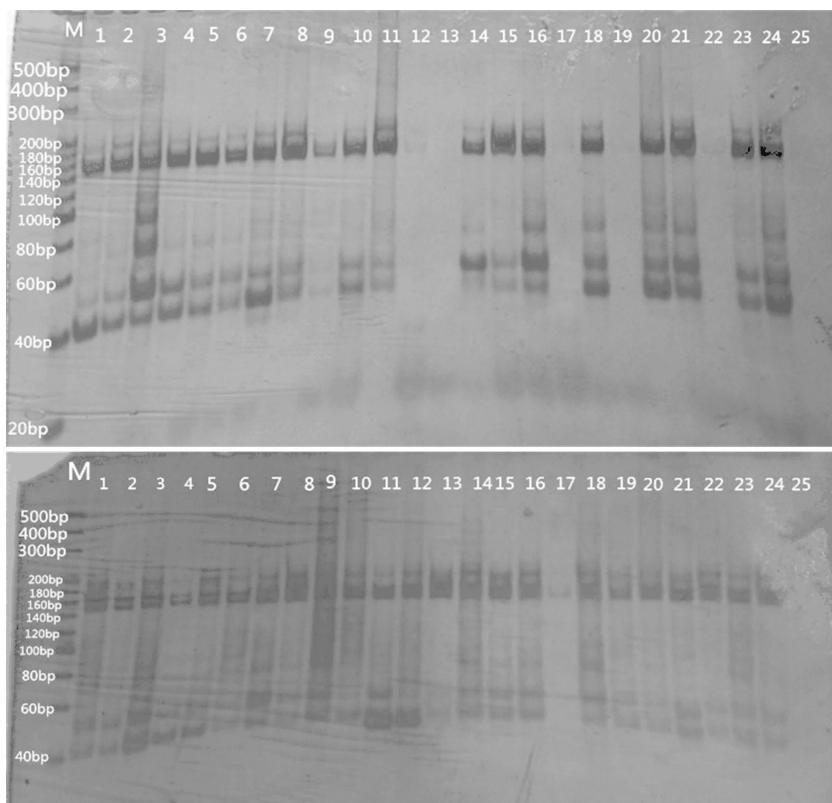
M—DL 200 bp Marker; 1~5—DNA用量 10、30、50、70、90ng; 6~10—*Taq* DNA聚合酶用量 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 U; 11~15— Mg^{2+} 浓度 150、175、200、225、250 $\mu\text{mol/L}$; 16~20—dNTPs 浓度 100、150、200、250、300 $\mu\text{mol/L}$; 21~25—引物浓度 0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 $\text{pmol}/\mu\text{L}$

图2 单因素优化试验电泳结果

围。依照评分标准,对各处理进行等级评分,依据条带强弱及杂带多少,2次处理评分结果分别为 7、6、6、6、4、4、6、2、6、8、6、6、7、5、5、3、2、2、6、6、8、6、1、3、1、3、2、4、6、6、6、7、1、1、6、3、1、6、4、6、5、6、1、4、6、5、5、6、1、1。其中处理 14 重复性好,分值均较高,对比单因素试验结果,选择处理 14 作为最佳反应体系(50 ng 模板 DNA,1.5 U *Taq* DNA 聚合酶,150 $\mu\text{mol/L}$ Mg^{2+} ,300 $\mu\text{mol/L}$ dNTPs,0.4 $\text{pmol}/\mu\text{L}$ 引物)。

本研究首先根据电泳平均得分求出每个因素下各水平的和 T_i ,然后求出每个因素下各水平的均值 k_i ;最后求出同一因

素 k_i 的极差 R 。 R 越大,影响越大。极差分析结果(表 3)表明,各因素影响大小排序为 dNTPs > Mg^{2+} > 引物 > *Taq* DNA 聚合酶 = DNA。因极差分析不能估计试验误差,无法确定分析的精度,为了判断各因素对棉蚜 SSR-PCR 反应的影响是否显著,笔者利用 SPSS 17.0 对结果进一步进行方差分析,与极差分析结果一致,由 III 型平方和比较可知,对扩增的影响排序为 dNTPs > Mg^{2+} > 引物 > *Taq* DNA 聚合酶 = DNA。dNTPs、 Mg^{2+} 、引物对棉蚜 SSR-PCR 反应的影响极显著,*Taq* DNA 聚合酶、DNA 对棉蚜 SSR-PCR 反应的影响显著(表 4)。



M—DL 200 bp Marker; 1~25 分别代表 1~25 号处理

图3 正交试验优化结果

表 3 正交优化极差分析结果

处理	模板 DNA 浓度	<i>Taq</i> 酶 浓度	Mg ²⁺ 浓度	dNTPs 浓度	引物 浓度
T ₁	27.5	26.0	18.5	25.0	23.0
T ₂	24.0	20.5	20.0	30.5	18.0
T ₃	20.5	22.0	22.0	19.5	21.5
T ₄	20.5	18.5	20.5	16.5	24.0
T ₅	20.0	25.5	31.5	21.0	26.0
k ₁	5.5	5.2	3.7	5.0	4.6
k ₂	4.8	4.1	4.0	6.1	3.6
k ₃	4.1	4.4	4.4	3.9	4.3
k ₄	4.1	3.7	4.1	3.3	4.8
k ₅	4.0	5.1	6.3	4.2	5.2
R	1.5	1.5	2.6	2.8	1.6

表 4 正交优化方差分析结果

变异来源	自由 度	Ⅲ型 平方和	均方	F 值	P 值
DNA 浓度	4	8.300	2.075	10.375	<0.05
<i>Taq</i> DNA 聚合酶浓度	4	8.300	2.075	10.375	<0.05
Mg ²⁺ 浓度	4	21.500	5.375	26.875	<0.01
dNTPs 浓度	4	23.500	5.875	29.375	<0.01
引物浓度	4	15.600	3.900	19.500	<0.01
误差	4	0.800	0.200		
总变异	25	584.250			

2.4 PCR 反应退火温度的筛选

退火温度决定 PCR 的特异性,引物退火温度在理论退火温度基础上进行设置,共设置 5 个温度梯度,依次为 58、61、64、67、70 ℃。图 4 结果表明,PCR 试验不同退火温度的条带特异性和敏感度均比较好,泳道的背景颜色随着退火温度升高而加深,其中 58 ℃的条带特异性最优。

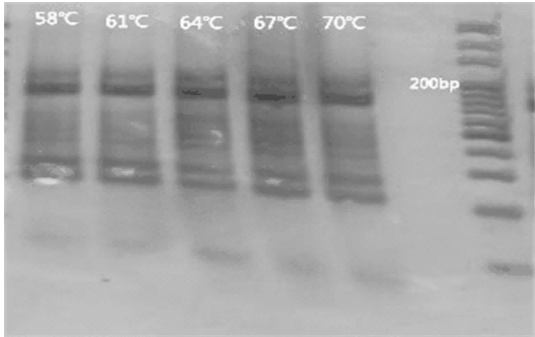


图 4 退火温度筛选结果

2.5 最佳反应体系的验证

利用获得的最佳体系,用引物 Ago53、Ago89 对反应体系的验证结果(图 5)表明,2 对引物条带清晰,重复性好。

3 结论和讨论

利用单因素试验结果分别分析 5 个因素对 PCR 反应的影响趋势,并利用正交优化试验研究 5 个因素对 PCR 反应的综合影响。综合单因素试验和正交设计试验结果,同时考虑到试剂成本,最终获得枸杞棉蚜 SSR-PCR 最优组合:枸杞棉蚜 SSR-PCR 的优化体系总体积为 25 μL,包括 50 ng 模板

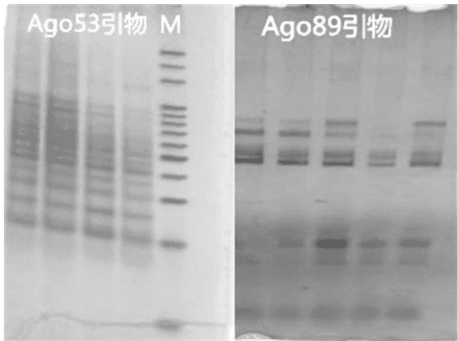


图 5 引物 Ago53、Ago89 PCR 结果

DNA、1.5 U *Taq* DNA 聚合酶、150 μmol/L Mg²⁺、300 μmol/L dNTPs、0.4 pmol/μL 引物 PCR;适宜扩增程序为 94 ℃ 5 min, 94 ℃ 60 s、58 ℃ 60 s、72 ℃ 30 s、35 次循环,72 ℃ 5 min。

单因素试验表明,模板 DNA、*Taq* DNA 聚合酶、Mg²⁺、dNTPs、引物浓度 5 个因素均具有促进或抑制 SSR-PCR 扩增的影响。同刘永刚等利用单因素研究的桃蚜 SSR 最优反应体系^[16]相比,枸杞棉蚜 SSR 研究所用 *Taq* 酶及 DNA 的量较少,说明 *Taq* DNA 聚合酶及 DNA 对 SSR-PCR 影响较小,少量即可满足枸杞棉蚜 SSR-PCR,优化后的体系更为经济。正交试验表明,5 个因素的影响大小排序为 dNTPs > Mg²⁺ > 引物 > *Taq* DNA 聚合酶 = DNA。这一结果同谢家楠等研究的白背飞虱简单重复序列区间(ISSR)反应体系结果^[17]基本一致,同张敏哲等研究的宽翅曲背蝗 SSR 反应体系结果相比,影响因素大小排序完全相反^[18],这可能是由于材料物种的差异造成的。

dNTPs 是影响枸杞棉蚜 SSR-PCR 的最主要因素,为扩增时的 4 种核苷酸原料,低浓度使其过早消耗,扩增效率低。高浓度的 dNTPs 导致 *Taq* 酶错误掺入,引起错配,产生非特异性扩增,而浓度过高则会与 *Taq* DNA 聚合酶竞争性结合 Mg²⁺,使酶反应活性降低,从而降低扩增效率。单因素扩增表明,dNTPs 浓度为 300 μmol/L 时,过量的 dNTPs 会与聚合酶结合而抑制 PCR 反应;但是,由于存在 5 个因子的互作用,在正交试验中,优化的体系中 dNTPs 浓度为 300 μmol/L。Mg²⁺是影响枸杞棉蚜 SSR-PCR 的主要因素,它作为 *Taq* DNA 聚合酶的催化剂,当浓度高于 175 μmol/L 时,能抑制 *Taq* DNA 聚合酶的活性,有非特异性扩增,Mg²⁺离子浓度升高时,会使 PCR 扩增产物背景加深。本研究单因素试验与正交试验结果表明,150 μmol/L Mg²⁺是最适浓度。引物对 SSR-PCR 影响也较大,单因素试验表明,作为结合模板 DNA 的原料的引物,引物浓度过高易产生引物二聚体或抑制扩增,并且正交试验结果也表明,适合的引物浓度为 0.4 pmol/μL。本研究中 *Taq* DNA 聚合酶、模板 DNA、引物的退火温度对 SSR-PCR 的影响较小,少量的 *Taq* DNA 聚合酶、模板 DNA 和低的退火温度即可获得明亮清晰的特异性条带。

参考文献:

[1] 杨子祥,冯颖,陈晓鸣. 分子遗传标记技术在蚜虫研究中的应用[J]. 西部林业科学,2005,34(4):99-104.
[2] 孟玲,李保平. 新疆棉蚜生物型的研究[J]. 棉花学报,2001,13(1):30-35.

武 慧,宋明霞,宁思淇,等. 紫花苜蓿的抗菌肽基因 *Rev4* 遗传转化[J]. 江苏农业科学,2017,45(7):44-46.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.07.010

紫花苜蓿的抗菌肽基因 *Rev4* 遗传转化

武 慧,宋明霞,宁思淇,武翠玲,周晓馥

(吉林师范大学植物资源科学与绿色生产吉林省重点实验室,吉林四平 136000)

摘要:抗菌肽是机体先天免疫的重要组成成分,是许多生物体抵抗外来致病菌侵袭的第 1 道屏障。Indolicidin 是一个 13 氨基酸残基肽,从牛的嗜中性粒细胞的胞浆小颗粒分离而来,具有广谱抗菌性,*Rev4* 是其人工设计的反向序列。利用经典叶盘法,以根癌农杆菌 A. GV3850 介导紫花苜蓿遗传转化,GUS 瞬时表达检测转化体系建立成功;压力筛选后叶片基因组 DNA 的 PCR 成功检测到抗菌肽基因条带,PCR 产物回收测序得到 13 株转化紫花苜蓿。

关键词:紫花苜蓿;抗菌肽;遗传转化

中图分类号: Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)07-0044-03

紫花苜蓿 (*Medicago sativa* L.) 为四倍体异花授粉的多年生草本植物,属于豆科苜蓿属,基因组大,是很好的水土保持植物与绿肥植物,在世界范围内广泛种植,以“牧草之王”著称^[1]。长期以来,人们围绕经济有效地提高紫花苜蓿产量和品质两大目标进行了不懈的努力^[2-3],但由于传统的紫花苜蓿育种方法时间长、成本高且可利用的种质资源有限,基因工程的方法更具有科学性和准确性^[4]。

抗菌肽 (antimicrobial peptides, AMPs) 是生物体天然免疫的重要组成部分,是机体抵御外源致病菌的第 1 道屏障,由于

其独特且多样的生物学功能和作用机制,引起了科学界的广泛关注和研究^[5]。抗菌肽是自然进化的产物,它可以干扰病原微生物,使其细胞膜结构发生改变,通透性增加,进而起到杀菌作用,又因病原体不易对其产生抗药性,因此成为新型高效的抗生素替代品^[6]。目前,人们一方面研究抗菌肽在先天免疫中发挥作用的机制,一方面设计新型抗菌、抗感染的抗菌肽制剂^[7],抗菌肽研究前景非常广阔。

Indolicidin 是一个 13 残基肽 (IL-PWKWPWWPWRR-NH₂),从牛的嗜中性粒细胞的胞浆小颗粒分离而来,具有广谱的抗菌和抗病毒活性^[8]。针对外源抗菌肽基因转入植物体内容易被消化分解的不足,有人设计了抗菌肽 Indolicidin 的反向序列 *Rev4*,合成的反向肽仍然有高的抗菌活性,且相比其他的抗菌肽,对植物蛋白酶的稳定性更高^[9]。本研究利用经典叶盘法,以根癌农杆菌 A. GV3850 介导紫花苜蓿遗传转化,GUS 瞬时表达检测转化体系建立成功;压力筛选后叶

收稿日期:2016-02-15

基金项目:国家自然科学基金(编号:31070224)。

作者简介:武 慧(1986—),女,吉林长春人,硕士,助理实验师,从事植物分子生物学方向研究。E-mail: sunflower329@163.com。

通信作者:周晓馥,博士,教授,博士生导师,从事植物基因工程方向研究。E-mail: zhouxiaofu@jlnu.edu.cn。

[3]郑彩玲. 棉蚜寄生专化性及其形成机制的研究[D]. 南京:南京农业大学,2007:47-59.

[4]邹晨辉,杨效文,陈晓峰,等. 不同冬夏寄主棉蚜种群重复序列引物 DNA 多态性分析[J]. 应用与环境生物学报,2000,6(6):560-564.

[5]龚 鹏,杨效文,张孝羲,等. 棉蚜 (*Aphis gossypii*) 种群寄生分化和季节分化的微卫星引物 PCR 研究[J]. 生态学报,2001,21(5):765-771.

[6]杨效文,张广学,陈晓峰. 棉蚜微卫星 DNA 的克隆及其多态性检测[J]. 昆虫学报,2001,44(4):586-589.

[7]Fuller S,Chavigny P,Lapchin L,et al. Variation in clonal diversity in glasshouse infestations of the aphid, *Aphis gossypii* Glover in southern France[J]. Molecular Ecology,1999,8(11):1867-1877.

[8]Carletto J,Lombaert E,Chavigny P,et al. Ecological specialization of the aphid *Aphis gossypii* Glover on cultivated host plants[J]. Molecular Ecology,2009,18(10):2198-2212.

[9]Thomas S,Boissot N, Vanlerberghe - Masutti F. What do spring migrants reveal about sex and host selection in the melon aphid? [J]. BMC Evolutionary Biology,2012,12(1):47.

[10]Skinner D,Beattie W,Blattner F,et al. The repeat sequence of a

hermit crab satellite deoxyribonucleic acid is (- T - A - G - G -)_n - (- A - T - C - C -)_n [J]. Biochemistry,1974,13(19):3930-3937.

[11]彭建新,杨 红,洪华珠. 昆虫分子遗传学[M]. 武汉:华中师范大学出版社,2006:142.

[12]张 羽. 分子标记技术的产生与引物设计[J]. 江苏农业科学,2014,42(6):47-51.

[13]Vanlerberghe - Masutti F,Chavigny P,Fuller S. Characterization of microsatellite loci in the aphid species *Aphis gossypii* Glover[J]. Molecular Ecology,1999,8(4):693-695.

[14]杨子祥,冯 颖,陈晓鸣. 一种有效的蚜虫基因组 DNA 提取方法[J]. 林业科学研究,2005,18(5):641-643.

[15]何正文,刘运生,陈立华,等. 正交设计直观分析优化 PCR 条件[J]. 湖南医科大学学报,1998,23(4):403-404.

[16]刘永刚,漆永红,赵丽娟,等. 桃蚜基因组 DNA 提取及 SSR 反应体系优化和应用[J]. 植物保护,2009,35(4):96-100.

[17]谢家楠,郭建军,金道超. 白背飞虱 ISSR-PCR 反应体系构建的正交设计优化[J]. 植物保护,2014,40(2):109-112.

[18]张敏哲,庞保平,周晓榕. 宽翅曲背蝗 SSR 反应体系的优化[J]. 内蒙古农业大学学报,2013,34(3):26-31.