

李琳琳, 严 林, 金生英, 等. 提取枸杞棉蚜基因组 DNA 的 9 种方法比较[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(10): 30–34.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.10.008

提取枸杞棉蚜基因组 DNA 的 9 种方法比较

李琳琳¹, 严 林¹, 金生英², 谢久祥¹, 温小成¹

(1. 青海大学农牧学院, 青海西宁 810016; 2. 广东东篱环境股份有限公司, 广东广州 510660)

摘要:为探讨适合枸杞棉蚜基因组 DNA 提取的方法, 采用 9 种方法提取枸杞棉蚜基因组 DNA, 并对每种方法提取的 DNA 样本质量进行综合比较分析。结果表明, 改进十二烷基硫酸钠 (SDS) 法、优化 KAc 法、STE 精提法、Chelex 粗提法、十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法、盐析法均可从枸杞棉蚜中提取总 DNA, 浓度高且所制备出的 DNA 均可成功应用于 mtDNA *CO I* 基因扩增。STE 粗提法、Chelex 精提法、饱和 NaCl 法 II 提取的枸杞棉蚜基因组 DNA 质量低, 不能满足分析要求。改进 SDS 法及 STE 精提法所制备的 DNA 质量较佳、产量较高、实用性强, 是值得推广应用的枸杞棉蚜基因组 DNA 提取方法。盐析法提取 DNA, 试剂成本低、毒性小, 是一种安全有效的枸杞棉蚜基因组 DNA 提取方法。Chelex 粗提法是一种快速的枸杞棉蚜基因组 DNA 提取方法。

关键词:枸杞; 棉蚜; 基因组 DNA; 提取方法

中图分类号: S435.671 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)10-0030-04

枸杞棉蚜 (*Aphis gossypii* Glover) 属同翅目 (Homoptera) 蚜科 (Aphididae) 蚜属 (*Aphis*), 是我国西北地区栽培枸杞 (*Lycium barbarum* L.) 分布地的主要害虫, 短期内可暴发成灾, 引起枸杞果产量和品质严重下降^[1]。棉蚜具有明显的生物型^[2-3], 如棉花型和黄瓜型^[4-5], 而枸杞棉蚜属于何种生物型亟待验证。确定昆虫的生物型, 不仅需要采用传统的生物学特征和生态学参数比较^[4,6-7], 而且需要分子遗传学数据佐证^[2,7-8]。

单头枸杞棉蚜基因组 DNA 提取是开展枸杞棉蚜分子遗传学研究的前提与基础^[9]。由于枸杞棉蚜体型微小, 体表有外骨骼, 其 DNA 提取有一定难度。Black 等通过十二烷基硫酸钠 (SDS) 方法提取蚜虫基因组 DNA, 并通过随机扩增多态性 DNA-PCR (RAPD-PCR) 检测蚜虫多态性^[10]; 龚鹏等在棉蚜 DNA 的提取中采用 STE 精提法, 用简单重复序列 PCR (SSR-PCR) 技术研究了棉花和木槿上棉蚜的多态性^[11]; 安瑞生等对 KAc 法、SDS 法的研磨步骤进行了改进^[12-13]; 张帆对改进后的 KAc 法中加入蛋白酶 K 进行了优化, 并用 mtDNA-*CO I* 技术研究了棉花型、黄瓜型棉蚜的多态性^[14]。目前, 国内最常用的 2 种棉蚜基因组 DNA 提取方法为改进 SDS 法和优化 KAc 法。国外棉蚜基因组 DNA 提取常采用 SDS 法^[2,8], 以及 Chelex 粗提法^[7,15]。

为筛选出适合枸杞上棉蚜基因组 DNA 的提取方法, 本研究借鉴国内外应用较多的提取蚜虫 DNA 的 8 种方法对其稍作改进, 即改进 SDS 法、优化 KAc 法、十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法、盐析法、饱和 NaCl 法 II、STE 粗提法、Chelex 粗提

法、STE 精提法, 并参照 Chelex 粗提法自创了 Chelex 精提法, 对这 9 种方法提取的基因组 DNA 的质量、DNA 提取所需时间、操作难易程度和所用试剂的毒性大小进行综合比较, 为进一步开展枸杞棉蚜遗传结构分析奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

于 2015 年 7—8 月在青海诺木洪枸杞主产区蚜虫发生较重的栽培枸杞田, 采集无翅蚜虫成虫, 每株枸杞采集 1 头试虫, 每头试虫所在植株至少间隔 5 m, 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 4 ℃ 低温采样箱内保存, 带回实验室后, 于 -40 ℃ 超低温冰箱保存备用。试验时随机抽取。

1.2 基因组 DNA 的提取方法

改进 SDS 法: 参照杨子祥等的改进 SDS 法^[16], 稍作改进。具体方法: 将单头蚜虫在双蒸水中漂洗, 滤纸吸干后转入 1.5 mL 离心管中, 加入 100 μL 匀浆液 (按 A 液: B 液: C 液体积比 25: 3: 2 配制。其中 A 液: Tris-HCl 10 mol/L, NaCl 0.1 mol/L, EDTA 1 mol/L, pH 值为 8.0; B 液: 10% SDS; C 液: 蛋白酶 K 10 mg/mL)。用灭菌玻璃研磨棒对蚜虫进行研磨。并用 500 μL 匀浆液冲洗研磨棒, 56 ℃ 水浴 4 h (若裂解液未透明, 水浴时间延长至 8 h), 其间摇匀 3~4 次。加入 600 μL Tris 饱和酚, 在摇床上缓慢摇匀 20 min 后, 7 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。加入 600 μL 三氯甲烷: 异戊醇 (体积比为 24: 1), 在摇床上缓慢摇匀 20 min 后, 7 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。加入 600 μL 无水乙醇 (-20 ℃ 预处理), 混匀, -20 ℃ 冰箱内放置 1 h 以上。12 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液。加入 600 μL 70% 乙醇 (-7 ℃ 预处理), 12 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液。自然干燥后, 加入 20 μL ddH₂O 溶解, -20 ℃ 保存。

优化 KAc 法: 参照张帆的优化 KAc 法^[14]。

STE 粗提法: 参照 Gomi 等的 STE 粗提法^[17], 挑取蚜虫方

收稿日期: 2016-10-14

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)。

作者简介: 李琳琳 (1992—), 女, 新疆阿克苏人, 硕士研究生, 主要从事枸杞害虫方面的研究。E-mail: nuliilinlin@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。

法同改进 SDS 法中的挑取方法,加入 20 μL STE 缓冲液 (100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 值为 8.0), 用玻璃研磨棒研磨, 加入 1.6 μL 蛋白酶 K (10 mg/mL); 简单离心后, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 初始变性 5 min; 简单离心后, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

Chelex 粗提法:参照 Carletto 等的 Chelex 粗提法^[7,15], 蚜虫在 0.65% (质量分数) NaCl 溶液中洗 2 次; 将蚜虫放入 1.5 mL 离心管中, 管内放有 55 μL 5% (质量分数) Chelex 树脂溶液, 用玻璃研磨棒研磨; 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min, 在 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 7 min; 5 000 r/min 离心 1 min, 取上清液, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

STE 精提法:参照龚鹏等的 STE 精提法^[11], 在 STE 粗提法的基础上进行改进, 挑取单头蚜虫置于 1.5 mL 离心管内分别加入 200 μL STE 缓冲液 (100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 值为 8.0), 用玻璃研磨棒研磨, 分别向离心管内再加入 500 μL 匀浆液、1.6 μL 蛋白酶 K (10 mg/mL), 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 4 h; 剩余步骤参照改进 SDS 法进行酚-三氯甲烷抽提, 无水乙醇沉淀 DNA, 溶解保存。

Chelex 精提法:在 Chelex 粗提法的基础上进行改进, 蚜虫在 0.65% (质量分数) NaCl 溶液中洗 2 次; 将蚜虫放入 1.5 mL 离心管中, 管内放有 100 μL 5% (质量体积比) Chelex 树脂溶液, 研磨; 分别向离心管内再加入 500 μL 匀浆液、2 μL 蛋白酶 K (10 mg/mL), 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 4 h; 剩余步骤参照改进 SDS 法进行酚-三氯甲烷抽提, 无水乙醇沉淀 DNA, 溶解保存。

CTAB 法:参照韩玉翠等的 CTAB 法^[18], 稍作改进。具体步骤如下: 挑取蚜虫于离心管中, 加入 50 μL CTAB 缓冲液 [2% CTAB, 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 值为 8.0), 0.02 mol/L EDTA, 1.4 mol/L NaCl, 0.2% β -巯基乙醇], 用灭菌玻璃研磨棒对蚜虫进行研磨。并用 150 μL CTAB 缓冲液冲洗研磨棒; 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h; 取出后加入 1 U RNA 酶, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中 1 h; 取出后加入 500 μL 三氯甲烷-异戊醇 (体积比为 24:1), 缓慢摇动混匀, 13 000~15 000 r/min 离心 15 min; 取上清液 (约 150 μL), 加入 2 倍体积的冰无水乙醇, 约 1/10 体积 NaAc (3 mol/L, pH 值为 5.2), 混匀后置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 3 h 以上; 13 000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 用 70% 乙醇 (-20 $^{\circ}\text{C}$ 预处理) 清洗 2 次; 室温干燥, 加入 20 μL TE 缓冲液溶解, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

盐析法:参照 Sunnucks 等的盐析法^[19], 稍作改进。具体步骤如下: 挑取蚜虫于离心管中, 加入 20 μL TNES 提取缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 值为 7.5, 400 mmol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 0.5% SDS), 用灭菌玻璃研磨棒对蚜虫进行研磨, 并用 200 μL TNES 冲洗研磨棒; 再加入 5 μL 蛋白酶 K (20 mg/mL), 轻摇混匀, 于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h (中间取出摇匀 1 次); 加入 80 μL 5 mol/L NaCl, 用力摇动 15 s, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、14 000 r/min 离心 5 min, 取上清液; 加入 300 μL 预冷的无水乙醇轻轻混匀, -20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 、14 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液; 加入 300 μL 75% 乙醇 (-20 $^{\circ}\text{C}$ 预处理) 洗涤, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、14 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液; 在室温下干燥, 然后加 20 μL 灭菌 ddH₂O, 充分溶解后 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

饱和 NaCl 法 II:参照马丽滨等挑取蚂蚁的饱和 NaCl 法 II^[20]。

1.3 基因组 DNA 纯度及浓度检测

对 9 种方法提取的 DNA 浓度和纯度进行检测。用 Biowave DNA 型蛋白核酸分析仪测定 DNA 纯度和浓度。纯度由 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值确定, 该值介于 1.7~1.9 之间时 DNA 纯度较好, 以测量值为参数确定 DNA 浓度。

1.4 基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测

采用 1% 琼脂糖凝胶 (添加了 0.01% GoldView I 型核酸染色剂) 电泳, 将 8.0 μL DNA、2 μL 6 \times Loading Buffer 混匀后上样, 电泳条件为 140 V, 30 min, 经 Gel Doc 凝胶成像系统 (购自美国 BIO-RAD 公司) 照相和分析。DNA 的条带无拖尾、无 RNA 污染, 点样孔无酚、蛋白质残留, 可用于 mt-DNA *CO I* 扩增研究。

1.5 PCR 扩增及检测

参照张帆使用的棉蚜 *CO I* 引物^[14], 上游引物为 CAL: 5'-TAATAACGAACAGGAACAG-3', 下游引物为 CAR: 5'-TAGTTGCTGATGAAGTAG-3', 委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。扩增体系为 50 μL : 25 μL Premix TaqTM (TaKaRa TaqTM Version 2.0 plus dye), 1 μL 上游引物, 1 μL 下游引物, 1 μL DNA, 22 μL ddH₂O。扩增程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min。PCR 产物于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶 (添加了 0.01% GoldView I 型核酸染色剂) 电泳检测 (140 V, 30 min), 上样量为每孔 10 μL , 经 Gel Doc 凝胶成像系统照相和分析。其中 *CO I* 基因在电泳中检测到目标片段后, 将 40 μL 扩增产物送往生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序, 以 PCR 引物为测序引物, 在 ABI3730 测序仪上进行正向测序。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 纯度及浓度检测

通过 9 种方法提取单头枸杞蚜虫样品, 检测 DNA 的浓度和纯度, 如表 1 所示, 改进 SDS 法、STE 精提法、Chelex 粗提法提取 DNA 样品浓度的平均值分别为 264.33、225.00、256.67 ng/mL, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 平均值分别为 1.73、1.84、1.73, 均为高质量 DNA; CTAB 法、盐析法、饱和 NaCl 法 II 提取 DNA 样品浓度的平均值分别为 316.67、456.67、216.67 ng/mL, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 平均值分别为 1.94、1.94、1.90, 可见 DNA 中有少量 RNA 的污染; Chelex 精提法提取 DNA 样品浓度的平均值为 36.67 ng/mL, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 平均值为 2.13, 说明 DNA 中有大量 RNA 的污染, DNA 浓度过低; 优化 KAc 法提取 DNA 样品浓度的平均值为 318.33 ng/mL, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 平均值为 1.63, 说明 DNA 中有蛋白质或酚的污染; STE 粗提法提取 DNA 样品浓度的平均值为 834.67 ng/mL, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 平均值为 1.46, 说明 DNA 中有大量蛋白质或酚的污染。

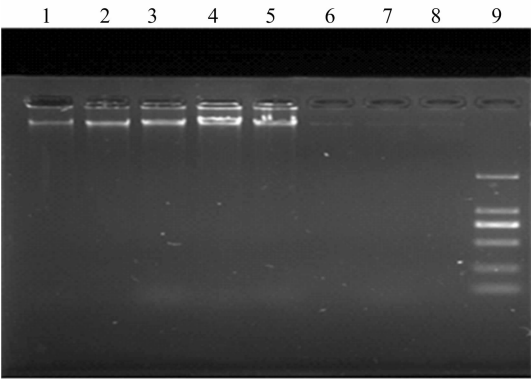
2.2 基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测

9 种提取枸杞棉蚜基因组 DNA 方法的电泳检测结果如图 1、图 2 所示, 改进 SDS 法、STE 精提法、CTAB 法、盐析法显示 DNA 主带明显, 其中改进 SDS 法、STE 精提法中有 RNA 条带; 饱和 NaCl 法 II 条带暗, 说明浓度低; 优化 KAc 法 DNA 主带不明显, DNA 不完整, 有降解; STE 粗提法、Chelex 粗提法、Chelex 精提法均无 DNA 条带, 说明 STE 粗提法、Chelex 粗提

表 1 DNA 的浓度和纯度测量结果

提取方法	DNA 浓度 (ng/mL)	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值	平均总耗 时 (min)	<i>CO I</i> 扩 增效果
改进 SDS 法	264.33	1.73 ± 0.06	360	+
优化 KAc 法	318.33	1.63 ± 0.07	300	+
STE 粗提法	834.67	1.46 ± 0.18	40	-
Chelex 粗提法	256.67	1.73 ± 0.10	42	+
STE 精提法	225.00	1.84 ± 0.06	360	+
Chelex 精提法	36.67	2.13 ± 0.27	360	-
CTAB 法	316.67	1.94 ± 0.03	180	+
盐析法	456.67	1.94 ± 0.03	150	+
饱和 NaCl 法 II	216.67	1.90 ± 0.35	930	-

注:表中数据为 3 次重复的平均值;“+”表示得到较好扩增,“-”表示没有得到有效扩增。



1~2—CTAB法; 3~5—盐析法; 6~8—饱和 NaCl 法 II;
9—DL2000 DNA Ladder

图2 3种提取枸杞棉蚜基因组 DNA 方法的电泳检测结果

法提取的 DNA 含大量杂质,无法检测出 DNA 主条带,Chelex 精提法提取的 DNA 浓度极低,因而无法检测出 DNA 条带。

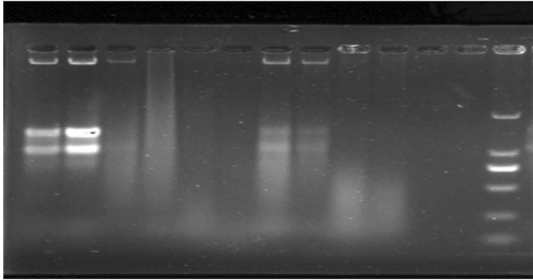
2.3 PCR 扩增及检测

按照“1.5”节中的方法进行 *CO I* 引物的特异性扩增,结果显示,STE 粗提法、Chelex 精提法、饱和 NaCl 法 II 没有扩增到特异性条带,而其余 6 个方法均扩增到目的条带,且目的条带清晰,如图 3、图 4 所示。

2.4 测序结果分析

以改进 SDS 法、优化 KAc 法、STE 精提法、Chelex 粗提法、CTAB 法、盐析法提取的枸杞蚜虫的基因组 DNA 为模板,以 *CO I* 引物扩增的产物均能达到测序要求,获得成功测序,

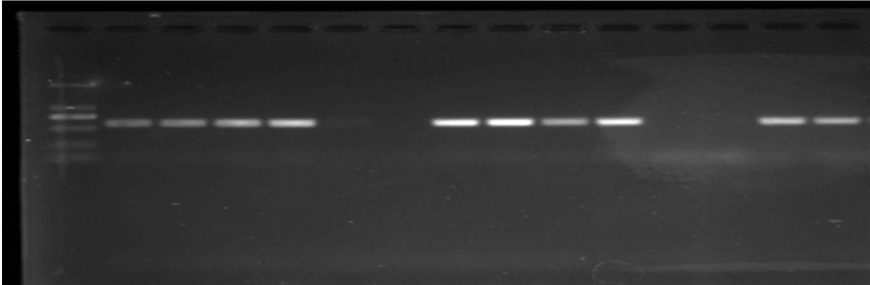
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



1~2—改进SDS法; 3~4—优化KAc法; 5~6—STE粗提法;
7~8—STE精提法; 9~10—Chelex粗提法; 11~12—Chelex精
提法; 13—DL2000 DNA Ladder

图1 6种提取枸杞棉蚜基因组 DNA 方法的电泳检测结果

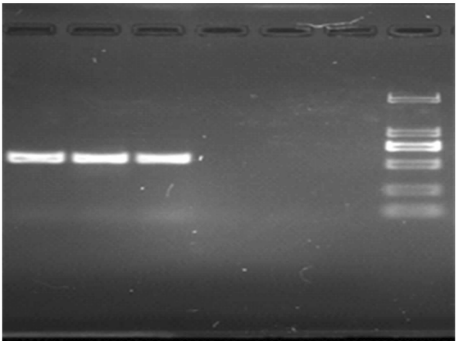
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



1—DL2000 DNA Ladder; 2~3—改进SDS法; 4~5—优化KAc法; 6~7—STE粗提法;
8~9—STE精提法; 10~11—Chelex粗提法; 12~13—Chelex精提法; 14~15—CTAB法

图3 7种方法的枸杞棉蚜 mt-DNA *CO I* 扩增结果

1 2 3 4 5 6 7



1~3—盐析法; 4~6—饱和 NaCl 法 II; 7—DL2000
DNA Ladder

图4 2种方法的枸杞棉蚜 mt-DNA *CO I* 扩增结果

部分测序结果如图 5 所示。将所测定的蚜虫 *CO I* 基因序列在 GenBank 数据库中进行比对,根据结果判定为棉蚜。

3 讨论与结论

本研究首次采用国内外 9 种方法对枸杞棉蚜基因组 DNA 提取进行了比较试验。结果表明,改进 SDS 法、STE 精提法、Chelex 粗提法、CTAB 法、盐析法均可有效地提取枸杞棉蚜基因组 DNA,并成功应用于 mtDNA *CO I* 基因的扩增;饱和 NaCl 法 II 可以提取枸杞棉蚜 DNA,但质量较低,在 *CO I* 扩增中不能显示出 DNA 条带;STE 粗提法、Chelex 精提法提取的枸杞棉蚜基因组 DNA 质量低,不能满足分析的需求。

杨子祥等认为改进 SDS 法优于 KAc 法^[13],本试验的结果与之一致。在用改进 SDS 法提取棉蚜 DNA 过程中,采用

瞿印权,徐 雯,沈 露,等. 大头典竹 ISSR 反应体系建立与优化[J]. 江苏农业科学,2017,45(10):34-39.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.10.009

大头典竹 ISSR 反应体系建立与优化

瞿印权¹,徐 雯¹,沈 露¹,何天友²,魏建文³,荣俊冬¹,郑郁善¹

(1. 福建农林大学林学院,福建福州 350002;

2. 福建农林大学艺术学院园林学院,福建福州 350002; 3. 福建省东山赤山国有防护林场,福建东山 363400)

摘要:以大头典竹叶片为材料,采用单因素分析法和正交设计直观分析法,对影响 PCR 扩增效果的 Mg^{2+} 、dNTPs、TaqDNA 聚合酶、引物、模板 DNA 含量这 5 个 PCR 反应体系主要成分以及退火温度和循环次数进行筛选。通过研究建立了适合大头典竹的 ISSR-PCR 反应体系:20 μ L 反应液中含 2.5 mmol/L Mg^{2+} ,0.25 mmol/L dNTPs,1.25 U TaqDNA 聚合酶,0.6 μ mol/L 引物,10 ng 模板 DNA,2 μ L 10 \times Buffer,10.55 μ L ddH₂O。相应反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,54.5 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。应用建立的优化反应体系成功地筛选出 16 条多态性较高的引物,表明该体系具有较高稳定性、重现性、适用性,可较好地应用于大头典竹不同地理种源间的遗传多样性研究。

关键词:大头典竹;ISSR;反应体系;优化

中图分类号: S795.901 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)10-0034-06

地球上的竹类植物共有 88 属 1 400 多种,主要分布在亚太区、美洲区、非洲区^[1]。中国竹类主要分布于长江中下游,其中以福建、浙江、江西、湖南 4 省最多,占全国竹林面积的 60.7%^[2]。大头典竹 [*Dendrocalamopsis beecheyana* var. *pubescens* (P. F. Li) Keng f.] 属于竹亚科 (Bambusoideae) 绿竹属 [*Dendrocalamopsis* (Chia et H. L. Fung) Keng f.] 的丛生竹,别称新竹、荣竹,具有繁殖生长快、根系发达、适应性广等特点。目前,在我国关于大头典竹在分子生物方面的研究较少。

近年来,随着现代分子生物学的快速发展,分子标记技术被广泛应用于遗传多样性以及指纹图谱构建的研究^[3-5]。目

前应用最为广泛的分子标记技术主要有 RFLP、RAPD、AFLP、ISSR、SRAP 等^[6]。其中 SSR 序列广泛分布在高等生物的染色体上,因此利用该简单重复序列标记 (inter simple sequence repeat, ISSR) 技术可以获得较多的分子标记。ISSR 的引物长度较 RAPD 引物长,因此 ISSR 具有重现性的特点,可以获得较可靠的遗传多样性信息,有利于植物种间及种内的鉴别^[7]。已有研究表明,竹亚科植物不同地理种源间的遗传变异较丰富^[8],为了进一步证实上述观点,本试验采用 ISSR 方法对大头典竹的种群差异进行研究,旨在建立 ISSR-PCR 最佳反应体系,为其地理种源的遗传多样性分析和亲缘关系的鉴定奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试的材料来源于福建省东山国有赤山林场的大头典竹地理种源试验样地。采摘洗净的竹叶 3~5 张,放入自封袋并冰袋保存,尽快转移至 -80 $^{\circ}$ C 冰箱,以备 DNA 的提取。

1.2 试剂与仪器

主要试剂:ISSR 引物都参考哥伦比亚大学公布的 100 条

Molecular Ecology,1999,8(4):693-695.

[16] 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.

[17] Gomi K, Gotoh T, Noda H. Wolbachia having no effect on reproductive incompatibility in *Tetranychus kanzawai* Kishida (Acari: Tetranychidae)[J]. Applied Entomology and Zoology,1997,32(3):485-490.

[18] 韩玉翠,吕 芃,侯升林,等. 2 种蚜虫 DNA 提取方法的比较与改进研究[J]. 中国农学通报,2014,30(16):272-277.

[19] Sunnucks P, England P R, Taylor A C, et al. Microsatellite and chromosome evolution of parthenogenetic sitobion aphids in Australia[J]. Genetics,1996,144(2):747-756.

[20] 马丽滨,许升全. 蚂蚁 DNA 提取方法的研究[J]. 陕西师范大学学报,2006,34(1):85-87.

[21] 张 拓,庞春杰,韩岚岚,等. 大豆蚜基因组 DNA 四种提取方法的比较[J]. 大豆科学,2013,32(4):473-476.

[22] 张 烨,李克斌,尹 姣,等. 几种适合蚜虫基因组 DNA 提取方法的比较研究[C]//中国植物保护学会. 中国植物保护学会 2008 年学术年会论文集. 北京:中国农业科学技术出版社,2008:658-661.

[23] 滕 希,武 强,万方浩. 盐析法提取烟粉虱基因组 DNA[J]. 生物技术通报,2009(8):166-168.

[24] 胡尊瑞,吴晓云,张翌楠,等. 桃蚜 DNA 提取方法的研究[J]. 安徽农业科学,2013,41(33):12823-12825.