

大豆蚜基因组 DNA 四种提取方法的比较

张 拓, 庞春杰, 韩岚岚, 赵奎军

(东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:以大豆蚜(*Aphis glycines*)为材料,比较分析了氯仿-异戊醇抽提法、盐析法、KAc 法及试剂盒法 4 种基因组 DNA 提取方法。结果表明:在提取大豆蚜基因组 DNA 的纯度上,氯仿-异戊醇抽提法和盐析法较高;提取所用时间由短到长依次为试剂盒提取法、盐析法、氯仿-异戊醇抽提法和 KAc 法。盐析法能够更快速有效地提取大豆蚜基因组 DNA,是一种值得推广应用的基因组 DNA 提取方法,另外 3 种方法也有一定的优势,应根据试验条件和要求选择相应的基因组 DNA 提取方法。

关键词:大豆蚜;基因组 DNA;提取方法

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2013)04-0473-04

Comparison of Four Methods for Genomic DNA Extraction from *Aphis glycines*

ZHANG Tuo, PANG Chun-jie, HAN Lan-lan, ZHAO Kui-jun

(College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Using *Aphis glycines* as material, four genomic DNA extraction method including chloroform-isoamyl alcohol extraction, salting-out method, KAc and genomic DNA kit method were compared and analyzed. The purity of genomic DNA from chloroform-isoamyl alcohol extraction and salting-out method was better than the other two methods. And the total time of extraction in ascending order was genomic DNA kit method, salting-out method, the chloroform-isoamyl alcohol extraction and KAc. Salting-out method acted more quickly and effectively, the other three methods also had some advantages, therefore, the corresponding methods for genomic DNA extraction should be chosen according to the test conditions.

Key words: *Aphis glycines*; Genomic DNA; Extraction method

大豆蚜(*Aphis glycines* Matsumura)是栽培大豆(*Glycine max*)的主要害虫之一^[1]。大豆蚜通常密集于大豆植株的顶叶和生长点等部位为害大豆,引起大豆节间缩短、植株矮化等症状,严重地影响大豆的产量和品质^[2-3]。自 2000 年大豆蚜入侵美国和澳大利亚以来,大豆蚜危害程度连年增加,使其成为一种备受关注的世界性农业害虫^[4-7]。然而,目前对大豆蚜的综合治理仍以化学防治为主。化学农药的使用不仅严重影响了大豆的品质、污染环境、危害人畜安全,而且会使大豆蚜产生抗药性^[8],因而人们开始探索利用大豆蚜天敌进行生物调控的途径控制其危害^[1,9]。利用分子生物学技术评价大豆蚜的生物防治作用,在大豆蚜的防治上起到了很大作用^[10-11]。其中大豆蚜基因组 DNA 的提取方法的优化作为这类研究的基础工作之一,显得尤为重要。研究中不仅要保证大豆蚜基因组 DNA 的高产量、高纯度、结构完整,更重要的是寻求一种步骤简单、耗时少、成本低、安全可靠的基因组 DNA 提取方法。本试验以大豆蚜为试验材料,比较分析了

国内外应用较多的氯仿-异戊醇抽提法、盐析法、KAc 法及试剂盒提取法 4 种提取小型昆虫 DNA 方法。通过基因组 DNA 直接琼脂糖凝胶电泳、紫外分光光度计纯度检测,比较分析了 4 种方法所提取的基因组 DNA 的产量、纯度、结构完整程度以及提取所需时间长短、操作难易程度和所用试剂的毒性大小,旨在为研究大豆蚜寻找一种高效、便捷的 DNA 提取方法,以满足对其进行分子生物学研究的省时、操作简便要求,为进一步开展大豆蚜种群遗传学和生物防治研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫源为大豆蚜(*Aphis glycines* Matsumura),采集地为黑龙江省哈尔滨市东北农业大学香坊实习基地。供试大豆蚜采集后转移到 1.5 mL 离心管中,无水乙醇浸泡,置于 -20℃ 保存。

1.2 主要药品及仪器

蛋白酶 K、dNTP、Taq 酶,购自北京全式金生物

收稿日期:2013-04-06

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-04);公益性行业(农业)专项(201103002)。

第一作者简介:张拓(1987-),男,在读硕士,主要从事农业昆虫与害虫防治研究。E-mail:ppmm123ppmm@126.com。

通讯作者:赵奎军(1960-),男,教授,博士生导师,主要从事农业昆虫与害虫防治研究。E-mail:kjzhao@163.com。

技术(TransGen Biotech)有限公司;Tris(三羟甲基氨基甲烷)为超级纯、EDTA(乙二胺四乙酸)、蔗糖、SDS(十二烷基硫酸钠)为生物技术级,购自美国AMRESCO公司;Tris饱和酚为分析纯,购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司;氯仿、异戊醇、醋酸钾、无水乙醇为分析纯,购自天津市科密欧化学药品有限公司;双蒸水为实验室自制;凝胶成像分析系统(Alphamager EP),购自美国GENE公司;PCR仪(EDC-810),购自东胜创新生物科技有限公司;高速冷冻离心机(TGL-16G-A),购自上海安亭科学仪器厂;离心机(1-14),购自德国SIGMA有限公司;恒温振荡器(THE-C),购自江苏太仓市试验设备厂;恒温数显水浴锅(HWS26),购自上海一恒科学仪器公司;电子天平购自A&D company limited Tokoy Japan;低温冰箱(BCD-219D),购自青岛海尔股份有限公司;紫外分光光度计(754P),购自上海光谱仪器有限公司。

1.3 大豆蚜基因组DNA提取

将大豆蚜置于无水乙醇、双蒸水中分别漂洗一次,吸水纸吸干,然后按下列方法提取。每种方法均重复5次。

1.3.1 氯仿-异戊醇抽提法 参照安瑞生等^[12]的方法,部分步骤有改进。

(1)将单头大豆蚜转入1.5 mL离心管中,加入200 μL 抽提液($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH = 9.1, $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, pH = 8.0, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, 1% SDS),用灭菌后的枪头充分研磨,直至虫体完全破碎。

(2)迅速捣碎大豆蚜后,放置于65℃的水浴中,温浴30 min。12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min。

(3)取上清液于一1.5 mL离心管中,加入等体积的Tris饱和酚,12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min。

(4)取上清液于一1.5 mL离心管中,加入等体积氯仿,12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min。

(5)取上清液于一1.5 mL离心管中,加入等体积预冷的异戊醇,置于-20℃ 30 min,12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、-4℃离心15 min。

(6)倾去上清液,保留沉淀物,加入100 mL 90%乙醇,13 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、-4℃离心10 min。再用无水乙醇100 mL洗涤,13 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min。倾去上清液,晾干沉淀后,加入30 mL双蒸水充分溶解后,-20℃保存备用。

1.3.2 盐析法 参照滕希等^[13]的方法,部分步骤有改进。

(1)将单头大豆蚜转入1.5 mL离心管中,加入

200 μL 抽提液($0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH = 7.5, $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, pH = 8.0, $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 0.5% SDS),用灭菌后的枪头充分研磨,直至虫体完全破碎。

(2)加入5 μL 蛋白酶K($20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)轻摇混匀,处理一:在37℃温育3~18 h(期间混匀2~3次);处理二:放置于65℃的水浴中,温浴1 h。加入80 μL $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl,用力摇匀15 s。14 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、-4℃离心5 min。

(3)取上清液于一1.5 mL离心管中,加入300 μL 预冷无水乙醇,轻摇混匀,置于-20℃ 30 min。14 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、-4℃离心5 min。

(4)加入400 μL 预冷75%乙醇洗涤。12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、-4℃离心15 min。

(5)小心倾去上清液。晾干沉淀后,加入30 mL双蒸水充分溶解后,-20℃保存备用。

1.3.3 KAc法 参照赵丽娟等^[14]的方法,部分步骤有改进。

(1)将单头大豆蚜转入1.5 mL离心管中,加入200 μL 抽提液($0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH = 8.0, $0.025 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, pH = 8.0, $0.025 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 1% SDS),用灭菌后的枪头充分研磨,直至虫体完全破碎。

(2)放置于65℃的水浴中,温浴45 min(期间摇匀2次)。加入100 μL $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸钾(pH = 7.2),沉淀显现,冰上放置1 h。12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、-4℃离心10 min。

(3)取上清液于一1.5 mL离心管中。加入600 μL 预冷无水乙醇,充分混匀,置于-20℃ 1 h。12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、-4℃离心15 min。

(4)小心倾去上清液。加入400 μL 预冷的75%乙醇洗涤。12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、离心15 min。

(5)小心倾去上清液。晾干沉淀后,加入30 mL双蒸水充分溶解后,-20℃保存备用。

1.3.4 试剂盒提取法 采用康为世纪公司生产的DNA提取试剂盒,参照动物组织细胞DNA的提取步骤并稍作修改。

(1)将单头大豆蚜转入1.5 mL离心管中,加入180 μL Buffer GTL,用灭菌后的枪头充分研磨,直至虫体完全破碎。

(2)加入20 μL 蛋白酶K,充分摇匀。放置于56℃的水浴中,温浴1 h(期间混匀2次)。加入200 μL Buffer GL,充分震荡混匀。加入200 μL 无水乙醇。充分震荡混匀。将所得溶液全部加入到已装入收集管的吸附柱中。10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心1 min。

(3)倒掉收集管中的废液,将吸附柱重新放回收集管中。向吸附柱中加入 500 μL Buffer GW1(事先加入无水乙醇),10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 min。

(4)倒掉收集管中的废液,将吸附柱重新放回收集管中。向吸附柱中加入 500 μL Buffer GW2(事先加入无水乙醇),10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 min。

(5)倒掉收集管中的废液,将吸附柱重新放回收集管中。12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 2 min,倒掉收集管中的废液。将吸附柱置于室温数分钟,以彻底晾干。

(6)将吸附柱置于另一离心管中,向吸附柱的中间部位悬空加入 50 ~ 200 μL Buffer GE 或灭菌水,室温放置 2 ~ 5 min,10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 min,收集 DNA 溶液, -20°C 保存备用。

1.4 大豆蚜 DNA 纯度检测

紫外分光光度计检测:吸取 5 μL 的 DNA 样品,加 TE 缓冲液至 1 000 μL ,充分混匀,分光光度计先用 TE 缓冲液校正零点,而后将待测液转入比色皿中,测定待测样品在 260 nm 和 280 nm 处的消光值(OD 值),通过 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 计算 DNA 样品的纯度。

1.5 PCR 扩增

在试验前期,筛选了 3 种适于大豆蚜基因组 DNA 进行 PCR 扩增的微卫星引物(33.5 核心引物、 $(\text{CAC})_5$ 和 $(\text{GATA})_4$),最终选用扩增条带最为稳定、清晰的微卫星 33.5 核心引物($5'$ -AGAGGTGGGCAGGTG- $3'$)^[15] 对所提取的基因组 DNA 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系:单个样品的扩增体积为 25 μL ,所用试剂包括 Buffer 2.5 μL ,引物 2 μL ,模板 DNA 1 μL ,dNTP 2 μL ,Taq 酶 0.3 μL ,用无菌水定容至 25 μL 。扩增的条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min,共 40 个循环,最后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 充分延伸 10 min,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。

1.6 凝胶电泳检测 PCR 扩增产物

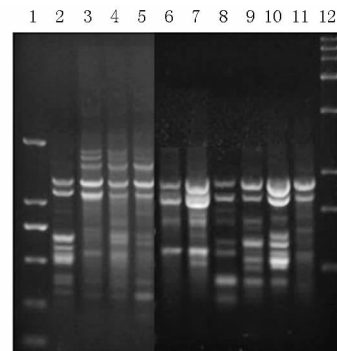
将梳子放入电泳胶槽中使其放平摆好,然后按所需浓度(1.2%)称取琼脂糖(1.2 g)放入三角锥形瓶中,用 1 \times TAE 定容至 100 mL,将装有琼脂糖溶液的锥形瓶放入微波炉中加热 3 min 拿出,待胶冷却至 60 $^{\circ}\text{C}$ 左右时,加入 0.6 μL EB,充分混匀,将胶倒入胶槽中,常温下冷却 10 ~ 20 min,待胶凝固后拔去梳子,将凝胶放入电泳槽中。取 6 \times Loading buffer 4 μL 与 6 μL 的 PCR 扩增样品,用移液器充分混匀以后点入胶孔中。而后将胶放入装有 1 \times TAE 的电泳槽中,胶孔朝向负极,液面约淹没胶面 1 mm,在输出电压 80 V 下电泳 120 min,最后在凝

胶成像分析系统中观察并记录结果。

2 结果与分析

由表 1 可知,利用氯仿-异戊醇抽提法提取的大豆蚜 DNA 样品的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 为 1.8 ~ 2.0,说明样品 DNA 内可能含有未除尽的 RNA 污染;利用盐析法提取的大豆蚜 DNA 样品的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 为 1.7 ~ 1.9,说明样品 DNA 纯度较高;利用 KAc 法提取的大豆蚜 DNA 样品的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 为 1.4 ~ 1.6,说明样品 DNA 内可能含有蛋白质、多糖等杂质,纯度不高;利用试剂盒提取的大豆蚜 DNA 样品的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 为 1.5 ~ 1.6,说明样品 DNA 内可能含有蛋白质、多糖等杂质,纯度不高。

不同方法提取大豆蚜基因组 DNA 的 PCR 扩增结果见图 1。采用氯仿-异戊醇抽提法和盐析法提取大豆蚜 DNA 样品的扩增条带整齐清晰,可见所提取的 DNA 质量较好,PCR 扩增结果稳定。而采用 KAc 法和试剂盒提取大豆蚜 DNA 样品的扩增条带有时会出现拖尾现象而且条带有些弱,说明此法提取的 DNA 量较少,纯度不高,含有较多的蛋白质、多糖等杂质。



1: DL-2000 marker; 2: 氯仿-异戊醇抽提法; 3: KAc 法; 4, 5: 试剂盒提取法; 6, 7: 氯仿-异戊醇抽提法; 8, 9: 盐析法(处理一); 10, 11: 盐析法(处理二); 12: DL-15000 marker

1: DL-2000 marker; 2: Chloroform-isoamyl alcohol extraction method; 3: KAc extraction method; 4, 5: Kit extraction method; 6, 7: Chloroform-isoamyl alcohol extraction method; 8, 9: Salting-out method(treatment 1); 10, 11: Salting-out method(treatment 2); 12: DL-15000 marker

图 1 利用 PCR(引物 33.5 核心序列)技术比较 4 种提取大豆蚜基因组 DNA 方法的效果

Fig. 1 Amplification pattern of genomic DNA from *Aphis glycines* using the primer pairs of 33.5 by 4 methods

按照 4 种提取方法所用时间由短到长排序为:试剂盒提取法、盐析法、氯仿-异戊醇抽提法、KAc 法(表 1)。

表 1 大豆蚜基因组 DNA 四种提取方法比较

Table 1 Comparison and analysis of four methods for the extraction genomic DNA from *Aphis glycines*

| 方法 Method | OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀ | 主要杂质 Major impurity | DNA 纯度 DNA purity | DNA 结构 DNA structure | 平均总耗时 Total time/min | PCR 效果 Result of PCR |
|--|--------------------------------------|------------------------|----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 氯仿-异戊醇抽提法 Chloroform-isoamyl alcohol extraction | 1.8 ~ 2.0 | RNA | 中 | 较完整 | 210 | 好 |
| 盐析法 Salting-out method | 1.7 ~ 1.9 | 极少 | 高 | 完整 | 120 | 很好 |
| KAc 法 KAc method | 1.4 ~ 1.6 | 蛋白质、多糖等 | 低 | 不完整 | 230 | 差 |
| 试剂盒提取法 Kit method | 1.5 ~ 1.6 | 蛋白质、多糖等 | 中 | 较完整 | 105 | 好 |

3 结论与讨论

试验比较分析了 4 种大豆蚜基因组 DNA 提取方法,其中氯仿-异戊醇抽提法获得的大豆蚜基因组 DNA 含量较高、质量较好,但操作步骤较多,若试验时间充裕,可以选择该方法;盐析法虽然耗时亦较长,但是操作简单连贯,省去了复杂的抽提纯化过程,获得了较好质量的大豆蚜基因组 DNA,并且减少了苯酚、氯仿及异戊醇等有毒试剂的使用,是一种值得推广应用的基因组 DNA 提取方法;KAc 法提取大豆蚜基因组 DNA 操作简单,对试剂设备要求较低,但大豆蚜基因组 DNA 的获得量也相对较低;试剂盒法耗时短,操作简单,但大豆蚜基因组 DNA 获得量较低,成本较高。因此,可以根据试验条件和要求选择相应的基因组 DNA 提取方法。

在 DNA 的提取过程中,提取前对大豆蚜虫体的漂洗要充分,避免虫体上附着的杂质对基因组 DNA 的纯度造成影响;大豆蚜虫体的破碎要迅速、充分,可用灭菌后的移液器枪头对其进行充分研磨,至虫体内组织均匀分散于抽提液后,方可停止研磨。

随着分子生物学技术在昆虫学领域的应用和发展,对大豆蚜等小型昆虫基因组 DNA 的提取工作要求也会越来越精细,有的试验强调单头提取,甚至是虫体某个部位的提取^[16],这就要求在提取方法的设计上必须具有针对性,应根据实际情况选择适宜的提取方法。

参考文献

- [1] Liu J, Wu K M, Hopper K R, et al. Population dynamics of *Aphis glycines* (Homoptera: Aphididae) and its natural enemies in soybean in Northern China[J]. Annals of the Entomological Society of America, 2004, 97(2): 235-239.
- [2] 王素云, 暴祥致, 孙雅杰, 等. 大豆蚜虫对大豆生长和产量影响的试验[J]. 大豆科学, 1996, 15(3): 243-247. (Wang S Y, Bao X Z, Sun Y J, et al. Study on effect of population dynamics of soybean aphid (*Aphis glycines*) on both growth and yield of soybean [J]. Soybean Science, 1996, 15(3): 243-247.)
- [3] Wu T L, Ma X H, Yao L M, et al. Identification of soybean resources of resistance to aphids[J]. Agricultural Sciences in China, 2009, 8(8): 979-984.
- [4] Ragsdale D W, Voegtlin D J, O'Neil R J. Soybean aphid biology in North America[J]. Annals of the Entomological Society of America, 2004, 97(2): 204-208.
- [5] 苗进, 吴孔明, 李国勋. 大豆蚜的研究进展[J]. 大豆科学, 2005, 24(2): 135-138. (Miao J, Wu K M, Li G X. Advances in research on soybean aphids, *Aphis glycines* [J]. Soybean Science, 2005, 24(2): 135-138.)
- [6] Hill C B, Li Y, Hartman G L. Soybean aphid resistance in soybean Jackson is controlled by a single dominant gene[J]. Crop Science, 2006, 46: 1606-1608.
- [7] 刘健, 赵奎军. 大豆蚜的生物学防治技术[J]. 昆虫知识, 2007, 44(2): 179-185. (Liu J, Zhao K J. Biology and control techniques of soybean aphid, *Aphis glycines* [J]. Chinese Bulletin of Entomology, 2007, 44(2): 179-185.)
- [8] 杨帅, 王玲, 赵奎军, 等. 大豆蚜羧酸酯酶基因 *AgCarE* 的克隆、表达及活性分析[J]. 中国农业科学, 2012, 45(18): 3755-3763. (Yang S, Wang L, Zhao K J, et al. Cloning, expression and activity analysis of carboxylesterase gene from *Aphis glycines* (Hemiptera: Aphididae) [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(18): 3755-3763.)
- [9] 戴长春, 刘健, 赵奎军, 等. 大豆田中大豆蚜天敌昆虫群落结构分析[J]. 昆虫知识, 2009, 46(1): 82-85. (Dai C C, Liu J, Zhao K J, et al. Community structure of natural enemies of the soybean aphid in soybean field [J]. Chinese Bulletin of Entomology, 2009, 46(1): 82-85.)
- [10] 高红秀, 韩岚岚, 赵奎军, 等. 大豆蚜细胞色素氧化酶 II 基因的克隆及在天敌昆虫鉴定中的应用[J]. 昆虫学报, 2006, 49(5): 754-758. (Gao H X, Han L L, Zhao K J, et al. Cloning and sequencing of cytochrome oxidase II gene of *Aphis glycines* and its application in detecting natural enemies [J]. Acta Entomologica Sinica, 2006, 49(5): 754-758.)
- [11] 高红秀, 韩岚岚, 赵奎军. 应用分子方法进行捕食者中肠分析的研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2007, 38(2): 253-257. (Gao H X, Han L L, Zhao K J. Advance in gut analysis of predators with molecular methods [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2007, 38(2): 253-257.)
- [12] 安瑞生, 谭声江, 陈晓峰. 小型昆虫 DNA 提取时匀浆方法的改进[J]. 昆虫知识, 2002, 39(4): 311-312. (An R S, Tan S J, Chen X F. Improvement in grinding tissue during extracting DNA from small insects [J]. Entomological Knowledge, 2002, 39(4): 311-312.)
- [13] 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. (Teng X, Wu Q, Wan F H. A Salting-out method for genomic DNA extraction from *Bemisia tabaci* (Gennadius) [J]. Biotechnology Bulletin, 2009(8): 166-168.)
- [14] 赵丽娟, 漆永红, 刘永刚, 等. 优化醋酸钾 (KAC) 法提取蚜虫基因组 DNA [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(10): 4394-4395, 4398. (Zhao L J, Qi Y H, Liu Y G, et al. Extraction of genome DNA of aphid by optimized potassium acetate (KAC) [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2009, 37(10): 4394-4395, 4398.)
- [15] 王韶辉. 利用微卫星标记对蚜虫种群遗传多样性的初步研究 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2003. (Wang S H. Studies on the population diversity of aphids using microsatellite marker [D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2003.)
- [16] 张烨. 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 2008 年学术年会. (Zhang Y. Comparison of methods for genomic DNA extraction from aphids [C]. China Society of Plant Protection, 2008.)