

附录1 DNA条形码鉴定蚜虫的具体步骤

Appendix 1 Steps of aphid identification by DNA barcoding

本研究采用DNA条形码方法对蚜虫物种进行分子鉴定, 具体方法如下:

1. 总DNA提取: 我们从每一管野外采集到的蚜虫样品中各选取1只饱满的蚜虫个体, 使用天根生化科技(北京)有限公司的TIANamp Genomic DNA Kit试剂盒, 按照操作步骤提取得到蚜虫总基因组DNA, 于-20°C保存。

2. 目的基因片段扩增: 选取蚜虫线粒体基因中的细胞色素氧化酶亚基I基因(cytochrome *c* oxidase subunit I, COI)部分序列作为基因标记, 使用通用引物COI-LepF (5'-ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG-3')和COI-LepR (5'-TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA-3')进行扩增(Hebert et al, 2003; Footitt et al, 2008)。PCR反应体系为30 μL, 包含17.2 μL双蒸水, 1 μL dNTPs, 2.5 μL 10×EasyTaq DNA Polymerase Buffer, 正向引物与反向引物各0.5 μL, 0.3 μL Taq DNA聚合酶, 以及3 μL DNA模板。PCR在以下条件下进行: 95°C预变性5 min, 95°C变性30 s, 52°C退火30 s, 72°C延伸1 min, 40个循环; 最后72°C终延伸10 min。PCR反应结果利用1%的琼脂糖凝胶电泳检测, PCR产物于-4°C保存。

3. 测序: 由生工生物工程(上海)股份有限公司对PCR产物进行双向测序。

4. 序列分析: 通过SeqMan II (DNASTar, Madison, WI, U.S.A.)软件进行双向测序结果的拼接与校对。为了得到最终的鉴定结果, 所有拼接结果均在NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中利用BLAST进行同源性比对(Altschul et al, 1990)。

参考文献

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403–410.
- Footitt RG, Maw HE, CD VOND, Hebert PD (2008) Species identification of aphids (Insecta: Hemiptera: Aphididae) through DNA barcodes. *Molecular Ecology Resources*, 8, 1189–1201.
- Hebert PD, Ratnasingham S, deWaard JR (2003) Barcoding animal life: Cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270, S96–S99.