

# 大豆蚜捕食性天敌捕食行为的 COI 基因标记检测

宋新元, 丛 斌, 钱海涛, 董 辉

(沈阳农业大学植物保护学院, 沈阳 110161)

**摘要:** 【目的】探索大豆田捕食性天敌对大豆蚜的捕食作用。【方法】根据基因库 NCBI 中的一段大豆蚜细胞色素氧化酶 I (COI) 的基因序列 (登录号为 AY842503), 设计了 2 对大豆蚜特异引物 A 和 B, 其扩增片段大小分别约为 197 和 253 bp, 应用 DNA 标记方法检测天敌对大豆蚜的捕食行为。【结果】种特异性检验表明, 所设计引物只对大豆蚜 DNA 具有扩增效果, 对与其同域发生的其它种类不具扩增作用; 室内以引物对 A 与 B 分别检测喂食单头大豆蚜的异色瓢虫成虫和大草蛉成虫腹内靶标食物的衰变情况, 结果表明, 异色瓢虫成虫阳性比率的半衰期分别为喂食后 3.371 h 和 2.814 h, 大草蛉成虫分别为喂食后 1.312 h 和 1.032 h; 以 A 作为引物对田间捕食性天敌进行检测, 结果表明, 在所检测的 7 类群 14 种捕食性天敌中, 5 种不同种类或虫态的天敌对大豆蚜的捕食作用检出率高于 50%, 从高到低依次为异色瓢虫幼虫、草蛉成虫、东亚小花蝽若虫、异色瓢虫成虫、东亚小花蝽成虫; 此外, 田间检测表明, 捕食性天敌的阳性比率与大豆蚜的种群密度呈显著正相关。【结论】DNA 标记技术是探索捕食行为的有效方法之一。

**关键词:** 大豆蚜; 细胞色素氧化酶 I 基因; 捕食性天敌; 消化道内容物检测; DNA 标记

## Identification of the Key Predators of *Aphis glycines* Matsumura (Homoptera: Aphididae) Using COI Gene Markers

SONG Xin-yuan, CONG Bin, QIAN Hai-tao, DONG Hui

(College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161)

**Abstract:** 【Objective】In order to understand the key predators of *Aphis glycines* Matsumura (Homoptera: Aphididae) in soybean fields, the COI gene was introduced to mark the aphid captured by the predator. 【Method】COI markers of *A. glycines* were developed to detect the remains of *A. glycines* in the gut of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) and *Chrysopa pallens* (Rambur) (Neuroptera: Chrysopidae) reared in the lab and various predators collected in the soybean fields. Two pairs of sequence-characterized primers (A and B) were designed, primer A amplified single band was about 197 bp and primer B about 253 bp. 【Result】The specificity tests performed with the primers showed the band presented only in *A. glycines*; Using primers A and B, the half-lives of detectability for the DNA from a single *A. glycines* consumed by adult *H. axyridis* was 3.371 h and 2.814 h, the half-life of detectability for the DNA from a single *A. glycines* consumed by adult *C. pallens* was 1.312 h and 1.032 h. Using primer A, the percentage of positive responses of *A. glycines* DNA in the predators collected in fields, such as the larvae of *H. axyridis*, the nymph of *Orius sauteri* (Poppus) (Hemiptera: Anthracoridae), the adult of *H. axyridis*, *O. sauteri* and *Chrysopas*, were over 50%. Moreover, the tests of samples collected from the field showed that the detection rate of predators by using primer A significantly corresponded to the density of *A. glycines* in soybean fields. 【Conclusion】DNA marker technology could be an effective method for the identification of predation.

**Key words:** *Aphis glycines*; Cytochrome oxidase subunit I gene; Predatory natural enemy; Gut content analysis; DNA marker

收稿日期: 2007-05-17; 接受日期: 2007-09-14

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目 (2006BAD08A06)

作者简介: 宋新元 (1980-), 男, 辽宁兴城人, 博士研究生, 研究方向为昆虫生态与害虫防治。E-mail: tianshui1999@sohu.com。通讯作者丛 斌 (1956-), 男, 辽宁丹东人, 教授, 研究方向为害虫生物防治。Tel: 024-88487992; E-mail: cong\_bin@21cn.com

## 0 引言

【研究意义】大豆蚜 (*Aphis glycines* Matsumura) 属同翅目 (Homoptera) 蚜科 (Aphididae) 蚜属 (*Aphis*), 是一种重要的农业害虫, 除吸食植物汁液对作物造成直接危害外, 还能传播多种植物病毒而间接危害作物<sup>[1]</sup>。大豆蚜具有较强的入侵性, 2000 年以前主要发生在中国、菲律宾、泰国、朝鲜、韩国、印度尼西亚和俄罗斯等国家<sup>[2]</sup>, 近年来先后侵入北美洲<sup>[3]</sup>和大洋洲<sup>[4]</sup>等地区, 目前是一种广受关注的世界性害虫。捕食性天敌对蚜虫具有明显的控制能力, 明确田间捕食性天敌对大豆蚜的捕食作用, 对于分析田间食物链营养关系以及筛选害虫功能天敌等具有重要意义。【前人研究进展】研究天敌对害虫捕食作用的方法较多。起初, 主要采用室内观察、田间观察并结合录像技术以及天敌消化道解剖观察等方法<sup>[5]</sup>; 之后, 主要以生化手段研究捕食者与猎物的关系, 如免疫标记 (ELISA)、同位素与放射性同位素标记、同工酶电泳、色素分析、蛋白质电泳分析等<sup>[6-10]</sup>。然而, 上述技术多具有一定的局限性, 如程序复杂、费用较高、缺乏对靶标的特异性等<sup>[10-12]</sup>。近年来, DNA 分子标记技术被证明是探索复杂的农业生态系统中无脊椎动物间营养关系的有效工具之一<sup>[10]</sup>。据不完全统计, 截止到 2005 年国外学者利用 DNA 分子标记技术进行捕食者-猎物关系的研究共计 22 项<sup>[13]</sup>, 其中仅有 5 项涉及了无脊椎动物捕食者在田间的捕食行为<sup>[14-18]</sup>。研究对象包括蚊子 (Dipt. Culicidae)<sup>[12]</sup>、蛾类 (Lep. Noctuidae, Crambidae, Plutellidae)<sup>[11,19]</sup>、粉虱 (Hom. Aleyrodidae)<sup>[20]</sup>、蚜虫 (Hom. Aphididae)<sup>[21]</sup>、木虱 (Hom. Psyllidse)<sup>[22]</sup>、金龟子 (Col. Scarabaeidae)<sup>[23]</sup> 和弹尾目昆虫 (Collembola)<sup>[15]</sup>。中国学者通过 SCAR 标记技术设计出烟粉虱特异片段扩增引物, 定性分析了烟粉虱的天敌谱<sup>[24]</sup>; 通过克隆和测定大豆蚜细胞色素氧化酶 II (CO II) 基因序列, 设计特异引物, 并对实验室内喂饲大豆蚜的 4 种天敌 (大草蛉、异色瓢虫、龟纹瓢虫和小花蝽) 进行了 PCR 鉴定<sup>[25]</sup>。【本研究切入点】基因库丰富的资源以及方便快捷的网络共享为 DNA 标记技术提供了有力的支持, 本研究即利用在基因库 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中检索到的一段大豆蚜细胞色素氧化酶 I (COI) 基因序列 (登录号为 AY842503), 应用 DNASTAR 软件设计大豆蚜特异片段扩增引物 2 对, 用以检测捕食者对大豆蚜的捕食作用。【拟解决的关键问题】在室内条件下研究喂

食单头大豆蚜的异色瓢虫成虫和大草蛉成虫腹内靶标食物的可检测性, 在田间自然状态下研究天敌捕食大豆蚜的阳性比率及阳性比率与大豆蚜种群密度的关系。拟为大豆蚜捕食性天敌谱的研究以及定性、定量研究天敌对害虫的捕食与控制作用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试虫源及 DNA 模板

1.1.1 供试虫源 试验所用试材均采自沈阳农业大学实验田, 常规管理, 期间不施用任何杀虫剂。供试昆虫种类包括: 大豆蚜 *A. glycines*、桃蚜 *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae)、禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi* Linnaeus (Homoptera: Aphididae)、玉米蚜 *Rhopalosiphum Fitch* (Homoptera: Aphididae)、烟蓟马 *Thrips tabaci* Lindeman (Thysanoptera: Thripidae)、豆卷叶野螟 *Sylepta ruralis* Scopoli (Lepidoptera: Pyralidae)、朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) (Acarina: Tetranychidae)、异色瓢虫 *H. axyridis*、龟纹瓢虫 *Propylaea japonica* (Thunberg) (Coleoptera: Coccinellidae)、大草蛉 *C. pallens*、丽草蛉 *Chrysopa formosa* Brauer (Neuroptera: Chrysopidae)、东亚小花蝽 *O. sauteri*、窄姬猎蝽 *Nabis stenoferus* Hsiao (Hemiptera: Nabidae)、大灰食蚜蝇 *Syrphus corollae* Fabricius (Diptera: Syrphidae)、蜘蛛类 Spiders 和步甲类 Carabidae。其中禾谷缢管蚜与玉米蚜采自玉米田, 其余均采自大豆田。

异色瓢虫成虫饥饿处理 48 h 后, 取食 2 头大豆蚜成虫, 然后立即于 -20℃ 冻存, 作为阳性对照; 饥饿处理 48 h 的异色瓢虫成虫、龟纹瓢虫成虫、大草蛉成虫、丽草蛉成虫、东亚小花蝽成虫、大灰食蚜蝇幼虫、窄姬猎蝽成虫、黄褐新圆蛛 *Neoscona doenitzi* (Boesenberg et Strand) (Araneida: Araneidae) 成虫、黑足婪步甲 *Harpalus roninus* Bates (Coleoptera: Carabidae) 成虫和清水作为阴性对照。

1.1.2 DNA 模板制备 模板 DNA 提取采用单头匀浆法。将单头试材装入 1.5 ml 离心管, 灭菌水清洗 1 次, 加入 50 μl 提取缓冲液 [缓冲液配比为: 0.1 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl; 0.02 mol·L<sup>-1</sup> EDTA; 1.4 mol·L<sup>-1</sup> NaCl; 0.2% β-巯基乙醇; 0.05 mol·L<sup>-1</sup> CTAB (pH 8.3)], -20℃ 放置 5 min 后以研磨棒捣碎, 然后用 150 μl 提取缓冲液冲洗研磨棒; 65℃ 水浴 1 h; 加入 500 μl 氯仿/异戊醇 (24 : 1) 反复混匀, 13 000 r/min 离心 15 min, 取上清液; 加入 2 倍体积预冷的无水乙醇, 轻轻混匀,

待出现少量絮状沉淀后于 $-20^{\circ}\text{C}$ 放置 1 h 以上; 13 000 r/min 离心 15 min, 除去上清液;  $37^{\circ}\text{C}$ 干燥; 加入 40  $\mu\text{l}$  无菌双蒸水, 充分溶解沉淀,  $-20^{\circ}\text{C}$ 保存备用。PCR 扩增时每次吸取 2  $\mu\text{l}$  溶液作为 DNA 模板。

### 1.2 大豆蚜特异引物设计、PCR 反应体系建立及扩增产物检测

根据大豆蚜细胞色素氧化酶 I (COI) 基因序列 (登录号为 AY842503), 应用 DNASTAR 软件设计特异片段扩增引物, 筛选 2 对。引物对 A: 上游引物: 5'-ATCATTGCTATTCCTACAG-3', 下游引物: 5'-TGGGCTACTACATAATAAG-3'; 引物对 B: 上游引物: 5'-AATTGGAATAGACGTTGATACA-3', 下游引物: 5'-GTGGAAATGGGCTACTACA-3'。PCR 扩增反应体系 20  $\mu\text{l}$ : Taq 酶 (5 U $\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) 0.2  $\mu\text{l}$ ; dNTP (10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ ) 0.5  $\mu\text{l}$ ; 10 $\times$ buffer 2  $\mu\text{l}$ ;  $\text{MgCl}_2$  (25 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ ) 2  $\mu\text{l}$ ; 上游引物 (20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 0.5  $\mu\text{l}$ ; 下游引物 (20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 0.5  $\mu\text{l}$ ; DNA 模板 2  $\mu\text{l}$ ; ddH<sub>2</sub>O 12.3  $\mu\text{l}$ 。PCR 扩增反应在 MJ-PTC200 基因扩增仪中进行, 扩增程序为:  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 然后  $94^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $55^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 扩增 35 个循环; 最后  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min; 扩增产物于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。在含有 EB (0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) 的琼脂糖凝胶 (1.2%) 上进行电泳检测, 80 V 电压电泳 1 h, 点样量为 3  $\mu\text{l}$ , 电泳缓冲液为 1 $\times$ TBE, 以标准分子量 Marker 作为参照物检测扩增结果。

### 1.3 种特异性检验

与大豆蚜同域发生的节肢动物 (其中害虫包括: 桃蚜、禾谷缢管蚜、玉米蚜、烟蓟马、豆卷叶野螟、朱砂叶螨; 天敌包括: 异色瓢虫成虫、龟纹瓢虫成虫、大草蛉成虫、丽草蛉成虫、东亚小花蝽成虫、窄姬猎蝽成虫、大灰食蚜蝇幼虫、黄褐新圆蛛成虫、黑足婪步甲成虫, 各种天敌饥饿 48 h) 的 DNA 作为模板, 以取食 2 头大豆蚜成虫的异色瓢虫成虫作为阳性对照、清水作为阴性对照, 分别以引物对 A 和 B 进行扩增, 检验 COI 引物的种特异性。PCR 反应体系与程序同上。

### 1.4 消化时间对检测效果的影响

将田间采集的异色瓢虫成虫与大草蛉成虫饥饿 48 h 后, 每头饲喂大豆蚜成蚜 1 头。选取 10 min 内具有取食行为的天敌, 于  $25^{\circ}\text{C}$  恒温分别放置不同时间, 期间不提供任何食物, 仅提供少量清水。异色瓢虫取食后分别放置 0、2、4、6 h, 大草蛉分别放置 0、1、2、3 h, 于  $-20^{\circ}\text{C}$  单头冻存待测, 每处理 10 头重复。然后以引物对 A 与 B 分别对天敌腹内的大豆蚜成分进

行检测。

### 1.5 田间捕食行为的 COI 标记检测

于 2006 年 7 月 30 日至 8 月 14 日大豆蚜盛发期每 5 d 调查 1 次 50 株大豆上大豆蚜数量及捕食性天敌的种类与数量。同时在样田内随机采集捕食性天敌, 单头分装, 1 h 内带回实验室, 立即于  $-20^{\circ}\text{C}$  冻存待测。步甲类的采集为干陷阱诱捕法, 陷阱诱捕器于调查前一日 20: 00 设置, 次日 8: 00 收集诱捕到的步甲, 并立即带回实验室于  $-20^{\circ}\text{C}$  冻存待测。以引物对 A 检测捕食性天敌对大豆蚜的捕食作用。

## 2 结果与分析

### 2.1 引物种特异性检验

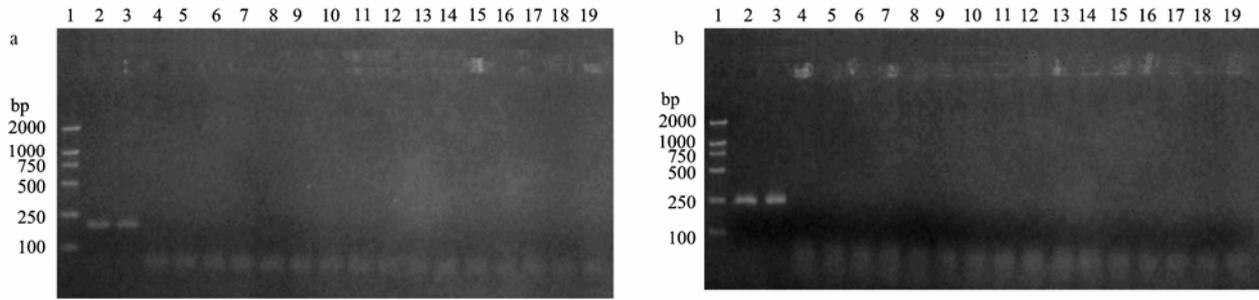
以大豆蚜及与大豆蚜同域发生的主要害虫与天敌的 DNA 为模板, 分别以 A 和 B 引物进行 PCR 扩增, 检验引物的种特异性。结果表明, 2 对引物对大豆蚜及取食 2 头大豆蚜的异色瓢虫成虫 (阳性对照) 均具有明显的扩增效果, 且条带明显。所扩增片段大小分别约为 197 和 253 bp。同时, 引物对 A 和 B 对其它种类无扩增作用, 种特异性强, 因此可用于进一步试验 (图 1)。

### 2.2 消化时间对天敌捕食作用阳性比率的影响

研究表明, 取食后立即 ( $t=0$ ) 进行冷冻处理的异色瓢虫成虫和大草蛉成虫腹内均能检测到大豆蚜成分, 但随消化时间的延长, 扩增效果降低 (图 2), 阳性比率下降, 6 h 或 3 h 后其阳性比率均为零。应用 Probit 模型模拟异色瓢虫成虫阳性比率与消化时间的关系, 以引物对 A 进行检测, 拟合良好 (Chi-Square=2.468,  $P=0.291$ ), 半衰期为 3.371 h, 以引物对 B 进行检测, 拟合良好 (Chi-Square=3.672,  $P=0.159$ ), 半衰期为 2.814 h, 两者差异不显著; 模拟大草蛉成虫阳性比率与消化时间的关系, 以引物对 A 进行检测, 拟合良好 (Chi-Square=0.795,  $P=0.672$ ), 半衰期为 1.312 h, 以引物对 B 进行检测, 拟合良好 (Chi-Square=1.465,  $P=0.481$ ), 半衰期为 1.032 h, 两者差异不显著 (表 1、表 2)。

### 2.3 田间天敌猎物中大豆蚜的 COI 基因检测

2.3.1 天敌腹内食物大豆蚜 COI 基因呈阳性的比率 以大豆田间采集的各种捕食性天敌为对象, 应用引物对 A 单头检测其对大豆蚜的捕食作用。结果表明, 在所检测的 7 类群 14 种捕食性天敌中, 瓢虫 (包括异色瓢虫和龟纹瓢虫)、草蛉 (包括大草蛉和丽草蛉)、大灰食蚜蝇、东亚小花蝽、窄姬猎蝽等天敌均具有捕



a: 引物对 A; b: 引物对 B; 1: 标准分子量; 2: 大豆蚜; 3: 阳性对照 (喂食 2 头大豆蚜成虫的异色瓢虫); 4: 桃蚜; 5: 禾谷缢管蚜; 6: 玉米蚜; 7: 烟蓟马; 8: 豆卷叶野螟; 9: 朱砂叶螨; 10: 异色瓢虫; 11: 龟纹瓢虫; 12: 大草蛉; 13: 丽草蛉; 14: 东亚小花蝽; 15: 窄姬猎蝽; 16: 大灰食蚜蝇; 17: 黄褐新圆蛛; 18: 黑足婪步甲; 19: 清水  
 a: Primers A; b: Primers B; 1: DNA marker; 2: *Aphis glycines*; 3: Positive control (*Harmonia axyridis* fed two *Aphis glycines* adults); 4: *Myzus persicae*; 5: *Rhopalosiphum padi*; 6: *Rhopalosiphum maidis*; 7: *Thrips tabaci*; 8: *Sylepta ruralis*; 9: *Tetranychus cinnabarinus*; 10: *Harmonia axyridis*; 11: *Propylaea japonica*; 12: *Chrysopa pallens*; 13: *Chrysopa Formosa*; 14: *Orius sauteri*; 15: *Nabis stenoferus*; 16: *Syrphus corollae*; 17: *Neoscona doenitzi*; 18: *Harpalus roninus*; 19: Water

图 1 引物 A (a) 和 B (b) 对大豆蚜 DNA 的扩增效果及种特异性检验

Fig. 1 PCR amplification and species-specificity test using primers A (a) and B (b)

表 1 消化时间对异色瓢虫成虫捕食大豆蚜阳性比率的影响

Table 1 Effects of time post feeding on positive responses of *Harmonia axyridis* consumed one *Aphis glycines* adult

消化时间 Time post feeding (h)	引物对 A Primers A			引物对 B Primers B		
	检测数量 No. of tested	阳性反应数量 No. of positive	阳性反应比率 Percentage of positive (%)	检测数量 No. of tested	阳性反应数量 No. of positive	阳性反应比率 Percentage of positive (%)
0	10	10	100	10	10	100
2	10	7	70	10	5	50
4	10	5	50	10	4	40
6	10	0	0	10	0	0
半衰期 Half life(h)	3.371 aA			2.814 aA		

数据后标相同小 (大) 写字母者表示经 Duncan 氏新复极差检验, 在  $P_{0.05}$  ( $P_{0.01}$ ) 水平上差异不显著。下同

Date by the same small/capital letter are not significantly different at  $P_{0.05}/P_{0.01}$  level by multiple range test, respectively. The same as below

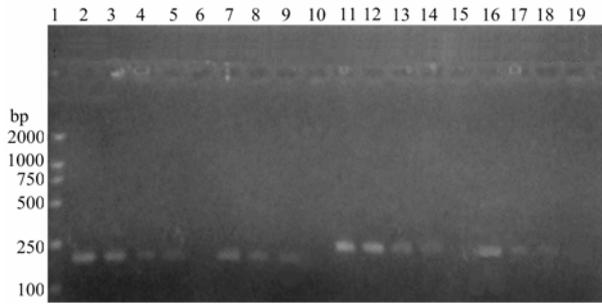
表 2 消化时间对大草蛉成虫捕食大豆蚜阳性比率的影响

Table 2 Effects of time post feeding on positive responses of *Chrysopa pallens* consumed one *Aphis glycines* adult

消化时间 Time post feeding (h)	引物对 A Primers A			引物对 B Primers B		
	检测数量 No. of tested	阳性反应数量 No. of positive	阳性反应比率 Percentage of positive (%)	检测数量 No. of tested	阳性反应数量 No. of positive	阳性反应比率 Percentage of positive (%)
0	10	10	100	10	10	100
1	10	6	60	10	4	40
2	10	2	20	10	1	10
3	10	0	0	10	0	0
半衰期 Half life(h)	1.312 aA			1.032 aA		

食大豆蚜的能力。此外, 检测结果还显示, 不同的天敌种类与虫态对大豆蚜的捕食作用存在差异。在所检测的捕食性天敌类群中有 5 种不同种类与虫态的天敌

检出率高于 50%, 从低到高依次为异色瓢虫幼虫 80.00%、草蛉成虫 78.57%、东亚小花蝽若虫 62.50%、异色瓢虫成虫 61.90%、东亚小花蝽成虫 57.14%。检



1: 标准分子量 DNA marker; 2~10: 引物 A; 11~19: 引物 B; 2、11: 阳性对照 (大豆蚜); 3~6, 12~15: 喂食单头大豆蚜的异色瓢虫; 3、12: 0 h; 4、13: 2 h; 5、14: 4 h; 6、15: 6 h; 7~10, 16~19: 喂食单头大豆蚜的大草蛉; 7、16: 0 h; 8、17: 1 h; 9、18: 2 h; 10、19: 3 h  
 1: DNA marker; 2-10: using primer pair A; 11-19: using primer pair B; 2, 11: Positive control (*Aphis glycines*); 3-6, 12-15: *Harmonia axyridis* fed one *Aphis glycines*; 3, 12: 0 h post feeding; 4, 13: 2 h post feeding; 5, 14: 4 h post feeding; 6, 15: 6 h post feeding; 7-10, 16-19: *Chrysopa pallens* fed one *Aphis glycines*; 7, 16: 0 h post feeding; 8, 17: 1 h post feeding; 9, 18: 2 h post feeding; 10, 19: 3 h post feeding

图 2 引物 A 和 B 的扩增效果随消化时间的改变  
 Fig. 2 The changes of PCR amplification of primers A and B with time post feeding

测结果还显示, 田间草蛉幼虫的阳性比率很低, 只有 4.45%, 此外, 未能检测到田间 2 种蜘蛛和 5 种步甲对大豆蚜的捕食作用 (表 3), 这有可能是由于天敌的消化作用或者田间大豆蚜种群密度较低时其它可选择的食物吸引了天敌的攻击等原因, 有待于进一步研究。

2.3.2 田间大豆蚜、捕食性天敌类群密度与天敌阳性比率的关系 田间捕食性天敌检测结果表明, 当田间大豆蚜种群密度较高时, 天敌类群的密度亦较高, 且天敌的阳性比率随之增加, 反之亦然 (表 4)。不同时期大豆蚜种群密度与捕食性天敌类群密度间的相关系数  $r$  为  $0.9846 > r_{0.05,2}$ , 二者间显著相关; 天敌阳性比率与大豆蚜种群密度间的相关系数  $r$  为  $0.9946 > r_{0.01,2}$ , 达到极显著相关; 天敌阳性比率与捕食性天敌类群密度间的相关系数  $r$  为  $0.9952 > r_{0.01,2}$ , 亦达到极显著相关。

表 3 田间捕食性天敌对大豆蚜捕食作用的 COI 检测

Table 3 Detection of predators of *Aphis glycines* using COI primer pair A in soybean fields

天敌种类 Predator species		检测数量 Number of tested	阳性反应数量 Number of positive	阳性反应比率(%) Percentage of positive
异色瓢虫 <i>Harmonia axyridis</i>	成虫 Adult	42	26	61.90 aA
	幼虫 Larva	10	8	80.00 abcA
龟纹瓢虫 <i>Propylaea japonica</i>	成虫 Adult	8	4	50.00 abcA
	幼虫 Larva	6	2	33.33 abcA
草蛉类 <i>Chrysopa</i> <sup>1)</sup>	成虫 Adult	28	22	78.57 abcA
	幼虫 Larva	44	2	4.55 bcA
东亚小花蝽 <i>Orius sauteri</i>	成虫 Adult	28	16	57.14 abA
	若虫 Nymph	16	10	62.50 abcA
窄姬猎蝽 <i>Nabis stenoferus</i>	成虫 Adult	12	2	16.67 abcA
大灰食蚜蝇 <i>Syrphus corollae</i>	幼虫 Larva	4	2	50.00 abcA
蜘蛛类 Spiders <sup>2)</sup>	成虫 Adult	12	0	0.00 cA
步甲类 Carabidae <sup>3)</sup>	成虫 Adult	40	0	0.00 cA
	幼虫 Larva	8	0	0.00 cA

1): 草蛉类包括大草蛉和丽草蛉; 2): 蜘蛛类包括草地逍遥蛛和黄褐新圆蛛; 3): 步甲类包括黑足婪步甲、丝青步甲、麻青步甲、短鞘步甲和赤胸步甲  
 1): Including *Chrysopa pallens* and *Chrysopa formosar*; 2): Including *Philodromus cespitum* and *Neoscona doenitzi*; 3): Including *Harpalus roninus*, *Chlaenius sericimicans*, *Chlaenius juncaus*, *Pheropsophus jessoensis* and *Dolichus halensis*

表 4 不同时期大豆蚜种群密度、捕食性天敌类群密度及天敌阳性比率

Table 4 Density of *Aphis glycines* and predators in soybean fields and positive responses of *Aphis glycines* DNA

调查日期(M-D) Date (Month-day)	大豆蚜数量/株(标准误差) No. of aphids / plant (SE)	捕食性天敌数量/株(标准误差) No. of predators / plant (SE)	阳性反应比率(标准误差) Percentage of positive (SE)
7-30	63.60(24.32) aA	3.56(1.25) aA	35.25(30.41) aA
8-4	82.20(27.68) bB	4.26(2.10) bB	38.68(25.23) bAB
8-9	129.00(58.94) cB	6.40(2.14) bB	52.63(22.84) bB
8-14	27.04(18.43) dC	2.74(1.17) cC	27.27(22.36) bB

### 3 讨论

#### 3.1 DNA 分子标记技术是研究田间捕食行为的有效方法

明确农田生态系统的营养关系是对害虫进行生态管理的基础,然而由于一些捕食者食性广泛又具有一定的选择性,加之行动迅速、活动隐蔽、昼伏夜出等特性,因此明确捕食者-猎物间的关系一直是生态学研究中的难点之一。随着分子生物学的发展,DNA 分子标记技术为研究捕食者-猎物关系提供了更为有效、准确的方法。此方法的基础是根据已知相关生物种的序列信息,寻找靶标种不同于其它种的独特区域<sup>[11]</sup>。NCBI 等基因库丰富的资源以及方便快捷的网络共享为这种技术提供了有力的支持。当基因库中缺乏靶标资源或现有资源难以满足研究所需时,已有研究多利用通用引物扩增出靶标物种的一段较长的基因序列(500~1 000 bp),然后对其进行克隆与测序,设计针对靶标物种的特异引物。本研究以基因库中已知的大豆蚜细胞色素氧化酶 I(COI)基因为目标序列,设计特异引物,用以检测天敌对大豆蚜的捕食作用及其可检测性,并在室内生测和田间试验中得到了进一步验证。进而表明,只要引物设计恰当、PCR 反应条件合理,此方法切实可行。

#### 3.2 靶标片段大小对检测效果的影响

研究表明,捕食者腹内食物的可检测性与所选取的靶标片段的长短密切相关。Agustí 等<sup>[20]</sup>利用 SCAR 标记技术于室内研究了盲蝽 *Dicyphus tamaninii* (Wagner) (Hemiptera: Miridae) 对温室粉虱的捕食作用,结果表明,当所扩增的目的片段比较短时(310 bp),可成功地检测到 *D. tamaninii* 对温室粉虱的捕食作用,而当靶标片段较长时(2 100 bp),即使在盲蝽进食后立即进行处理也无法检测到猎物成分;Hoogendoorn 和 Heimpel<sup>[14,19]</sup>在瓢虫 *Coleomegilla maculate* De Geer (Coleoptera: Coccinellidae) 捕食欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) 卵的研究中发现,4 条不同长短的目标片段(分别为 492、369、256 和 150 bp)中,最短的片段(150 bp)可检测时期最长;Chen 等<sup>[21]</sup>利用 339、246 和 198 bp 3 条靶标片段研究喂食玉米蚜的瓢虫 *Hippodamia convergens* Guerin (Coleoptera: Coccinellidae) 与草蛉 *Chrysoperla plorabunda* (Fitch) (Neuroptera: Chrysopidae),结果表明,3 条不同大小的片段对 *H. convergens* 阳性比率半衰期的影响差异

不显著,而 246 bp 和 198 bp 的片段检测到的 *C. plorabunda* 阳性比率半衰期显著长于 339 bp 的片段;Sheppard<sup>[26]</sup>在夏威夷进行的瓢虫 *Halmus chalybeus* (Boisduval) (Coleoptera: Coccinellidae) 捕食鳞翅目卵的试验中亦发现,利用靶标为 140 bp 和 151 bp 的片段所检测到的田间天敌的阳性比率高于 170 bp 的片段。在本试验中靶标为 197 bp 与 253 bp 的片段对喂食大豆蚜的异色瓢虫与大草蛉成虫阳性比率半衰期的影响差异不显著。可见捕食者体内食物的可检测性与靶标片段长短的关系及其影响因素尚有待进一步研究。

#### 3.3 田间天敌阳性比率与害虫密度的关系

本研究中田间天敌类群总的阳性比率与大豆蚜的种群密度达到极显著的正相关,这可能是由于田间高密度的大豆蚜种群会吸引更多的天敌,在一定的空间内害虫与天敌种群数量均有所增加,自然会提高天敌与害虫的相遇机率;同时高密度的害虫刺激了天敌的功能反应,使其取食量增加;捕食机率与取食量两个方面的提高,自然提高了田间天敌的阳性比率。此外 2006 年试验田中大豆蚜发生较轻,8 月 9 日高峰时,单株蚜量仅为 129.00 头,天敌类群总的阳性比率也维持在较低水平,高峰时仅为 52.63%,也就是说此种情况下田间大部分天敌处于半饥饿状态或取食大豆蚜以外的其它食物,所以笔者认为此时群落中的天敌类群对大豆蚜还有很大的控制潜力,防止其爆发。

#### 3.4 DNA 分子标记技术的发展方向

在害虫生物防治的研究和实践中,需要客观评价天敌的控害作用。天敌控害作用的评价分为定性和定量 2 个方面,定性评价是明确天敌是否具有寄生或捕食某种害虫的能力;而定量评价则是要明确该天敌对靶标害虫控制能力的大小。因此,采用实时荧光定量 PCR (FQ-PCR) 技术定性乃至定量研究天敌对害虫的控制能力是今后的发展方向。如 Harper 等<sup>[18]</sup>利用多重实时荧光定量 PCR 体系对捕食者的取食进行了研究,发现步甲能取食蚜虫、象鼻虫、蚯蚓和一些软体动物,其中蚯蚓和软体动物是其主要食物。如何精确定量天敌腹内不同食物的含量,并且利用定量分析的结果拟合各种影响因素,尽最大可能反映田间实际发生的捕食行为及评价不同天敌类群对害虫的控制作用亦将是研究的重点,相关研究少有报道。笔者认为评估天敌对害虫的控制能力重要的是考核各种天敌类群在田间对害虫实际发生的捕食量。而目前有关捕食量的研究多为实验室结果,由于存在空间异质性,因此并不能准确反映田间的实际情况。评估田间天敌对害虫的控制

作用应综合考虑天敌数量、天敌阳性比率、天敌腹内食物中目标害虫的含量及目标害虫在天敌腹内的衰变速率等 4 个因素, 建议参考下列公式:

$$R_{ab} = \sum n_i \times v_i \times m_i \times u_{ab}$$

其中,  $R_{ab}$  为天敌 a 对害虫 b 的控制作用指数,  $n_i$  为 i 时期天敌 a 的种群数量,  $v_i$  为 i 时期田间天敌 a 的阳性比率,  $m_i$  为 i 时期阳性天敌 a 其腹内目标害虫 b 的 DNA 平均含量,  $u_{ab}$  为定量研究中靶标害虫 b 在天敌 a 腹内随时间的衰变速率。

### 3.5 DNA 分子标记技术的局限性

**3.5.1 食腐行为对捕食作用研究的干扰** 利用分子生物学技术研究天敌的捕食作用, 通常以通过捕食行为进入捕食者消化道的猎物作为依据<sup>[27]</sup>。然而, 由于饥饿或当猎物缺乏时, 一些捕食者也会取食已经死亡的猎物。如 Juen 和 Traugott<sup>[23]</sup>在以 COI 标记技术研究 *Poecilus versicolor* (Coleoptera: Carabidae) 与 *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae) 的营养关系时发现, 猎物尸体与活体的 DNA 具有同样的扩增效果。因此, 在评价田间捕食性天敌对靶标害虫的控制作用时, 食腐行为不容忽视。

**3.5.2 间接捕食对天敌捕食作用研究的干扰** 自然生态系统中, 广食性捕食者不仅取食同一个营养阶层的猎物<sup>[28]</sup>, 因此猎物可通过间接捕食作用而进入高级捕食者消化道。例如高级捕食者 A 猎取低级捕食者 B, A 消化道内就可能含有低级捕食者 B 捕食的猎物 C, 但是 A 与 C 之间不一定存在捕食关系<sup>[7,29,30]</sup>。因此, 应用 DNA 标记法研究田间捕食关系和捕食性天敌对害虫的控制作用时, 间接捕食作用亦应予以考虑。

**3.5.3 消化作用对捕食作用研究的干扰** DNA 标记法试图通过检测天敌腹内食物来确定捕食关系, 所以天敌的消化行为必将影响捕食对象基因的检测。在田间天敌腹内检测到捕食对象的基因可说明捕食关系存在, 未检测到捕食对象的基因也可能是由于捕食对象完全被天敌所消化。所以应用 DNA 标记法研究捕食关系的同时也应综合田间观察、实验室喂饲等其它方法才能得到更准确的结论。

## 4 结论

本研究采用 DNA 标记法成功地设计大豆蚜特异片段扩增引物 2 对, 扩增片段分别约为 197 和 253 bp, 且所设计引物对大豆田中其它相关种类不具有扩增能力。室内喂食试验表明, 靶标序列的可检测性随消化时间的延长而降低。田间检测结果表明, 5 种不同种

类或虫态的天敌对大豆蚜捕食作用的阳性比率较高, 检出率高于 50%, 从高到低依次为异色瓢虫幼虫、草蛉成虫、东亚小花蝽若虫、异色瓢虫成虫、东亚小花蝽成虫。此外, 田间检测也表明, 捕食性天敌的阳性比率与大豆蚜的种群密度呈显著正相关。综合各种因素, 尽管 DNA 标记技术具有一定的局限性, 如农田生态系统群落组成的影响、环境生态因素的影响和捕食者消化作用的影响等, 但该技术对研究天敌所猎食的食物种类及数量、分析田间食物链营养关系以及筛选害虫功能天敌等均具有重大意义。

## References

- [1] 李尉民, 濮祖芹. 南京地区夏大豆田蚜虫的消长与大豆花叶病毒 (SMV) 病的流行. 植物保护学报, 1991, 18(2): 123-126.  
Li W M, Pu Z Q. Studies on the fluctuation of aphid and the epidemic of soybean mosaic virus in *Glycine max* planted in summer in Nanjing area. *Acta Phytologica Sinica*, 18(2): 123-126. (in Chinese)
- [2] 苗进, 吴孔明, 李国勋. 大豆蚜的研究进展. 大豆科学, 2005, 24(2): 135-138.  
Miao J, Wu K M, Li G X. Advances in research on soybean aphid. *Soybean Science*, 2005, 24(2): 135-138. (in Chinese)
- [3] Ragsdale D W, Voegtlin D J, O'Neil R J. Soybean aphid biology in north America. *Annals Entomological Society Amerasian*, 2004, 97(2): 204-208.
- [4] Fletcher M J, Desborough P. The soybean aphid, *Aphis glycines*, present in Australia, 2002. <http://www.agric.nsw.gov.au/Hort/ascu/insects/aglycin.htm>.
- [5] Hengeveld R. Qualitative and quantitative aspects of the food of ground beetles (Coleoptera: Carabidae): a review. *Netherlands Journal of Zoology*, 1980, 30(4): 555-563.
- [6] Sunderland K D. Quantitative methods for detecting invertebrate predation occurring in the field. *Annals of Applied Biology*, 1988, 112: 201-224.
- [7] Sunderland K D. Progress in quantifying predation using antibody techniques. In: Symondson W O C. *The Ecology of Agricultural Pests: Biochemical Approaches*. London: Chapman and Hall, 1996: 419-455.
- [8] Pierce G J, Boyle P R. A review of methods for diet analysis in piscivorous marine mammals. *Oceanography and Marine Biology*, 1991, 29: 409-486.
- [9] Greenstone M H. Serological analysis of arthropod predation: past, present and future. In: Symondson W O C. *The Ecology of Agricultural Pests: Biochemical Approaches*. London: Chapman and Hall, 1996: 265-300.

- [10] Symondson W O C. Molecular identification of prey in predator diets. *Molecular Ecology*, 2002, 11: 627-641.
- [11] Agustí N, de Vicente M C, Gabarra R. Development of sequence characterized amplified region (SCAR) markers of *Helicoverpa armigera*: a new polymerase chain reaction-based technique for predator gut analysis. *Molecular Ecology*, 1999, 8: 1467-1474.
- [12] Zaidi R H, Jaal Z, Hawkes N J, Hemingway J, Symondson W O C. Can multiple-copy sequences of prey DNA be detected amongst the gut content of invertebrate predators? *Molecular Ecology*, 1999, 8: 2081-2087.
- [13] Sheppard S K, Harwood J D. Advances in molecular ecology: tracking trophic links through predator-prey food-webs. *Functional Ecology*, 2005, 19: 751-762.
- [14] Hoogendoorn M, Heimpel G E. PCR-based gut content analysis of insect predators: using ITS-I fragments from prey to estimate predation frequency. In: Van Dreische R G. *Proceedings of the 1st International Symposium on Biological Control of Arthropods, Honolulu, Hawaii. January 2002*. USDA, Morgantown, WV. 2002: 91-97.
- [15] Agustí N, Shayler S P, Harwood J D, Vaughan I P, Sunderland K D, Symondson W O C. *Collembola* as alternative prey sustaining spiders in arable ecosystems: prey detection within predators using molecular markers. *Molecular Ecology*, 2003, 12: 3467-3475.
- [16] Dodd C S. Development and optimization of PCR-based techniques in predator gut analysis. PhD Thesis, Cardiff University, Cardiff, 2004.
- [17] Kaspar M L, Reeson A F, Cooper S J B, Perry K D, Austin A D. Assessment of prey overlap between a native (*Polistes humilis*) and an introduced (*Vespula germanica*) social wasp using morphology and phylogenetic analysis of 16S rDNA. *Molecular Ecology*, 2004, 13: 2037-2048.
- [18] Harper G L, King R A, Dodd C S, Harwood J D, Glen D M, Bruford M W, Symondson W O C. Rapid screening of invertebrate predators for multiple prey DNA targets. *Molecular Ecology*, 2005, 14: 819-828.
- [19] Hoogendoorn M, Heimpel G E. PCR-based gut content analysis of insect predators: using ribosomal ITS-I fragment from prey to estimate predation frequency. *Molecular Ecology*, 2001, 10: 2059-2067.
- [20] Agustí N, de Vicente M C, Gabarra R. Developing SCAR markers to study predation on *Trialeurodes vaporariorum*. *Insect Molecular Biology*, 2000, 9: 263-268.
- [21] Chen Y, Giles K L, Payton M E, Greenston M H. Identifying key cereal aphid predators by molecular gut analysis. *Molecular Ecology*, 2000, 9: 1887-1898.
- [22] Agustí N, Unruh T R, Welter S C. Detecting *Cacopsylla pyricola* (Hemiptera: Psyllidae) in predator guts by using COI mitochondrial markers. *Bulletin of Entomological Research*, 2003, 93: 179-185.
- [23] Juen A, Traugott M. Detecting predation and scavenging by DNA gut-content analysis: a case study using a soil insect predator-prey system. *Oecologia*, 2005, 142: 244-252.
- [24] 吕志创, 张桂芬, 万方浩, 邓国荣. 天敌对烟粉虱捕食作用的 SCAR 标记检测. *中国农业科学*, 2005, 38(6): 1167-1173.
- Lü Z C, Zhang G F, Wan W H, Deng G R. Detection of predation on *Bemisia tabaci* by using SCAR markers. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38(6): 1167-1173. (in Chinese)
- [25] 高红秀, 韩岚岚, 赵奎军, 樊东, 刘健. 大豆蚜细胞色素氧化酶 II 基因的克隆及其在捕食性天敌昆虫鉴定中的应用. *昆虫学报*, 2006, 49(5): 754-758.
- Gao H X, Han L L, Zhao K J, Fan D, Liu J. Cloning and sequencing of cytochrome oxidase II gene of *Aphis glycines* and its application in detecting natural enemies. *Acta Entomologica Sinica*, 2006, 49(5): 754-758. (in Chinese)
- [26] Sheppard S K, Henneman M L, Memmott J, Symondson W O C. Infiltration by alien predators into invertebrate food webs in Hawaii: a molecular approach. *Molecular Ecology*, 2004, 13: 2077-2088.
- [27] Mills N. Techniques to evaluate the efficacy of natural enemies. In: Dent D R. *Methods in Ecological and Agricultural Entomology*. CAB International, Wallingford, UK. 1997: 271-291.
- [28] Pimm S L, Lawton J H. On feeding on more than one trophic level. *Nature*, 1978, 275: 542-544.
- [29] Polis G A, Myers C A, Holt R D. The ecology and evolution of intraguild predation: potential competitors that eat each other. *Annual Reviews of Ecology and Systematics*, 1989, 20: 297-330.
- [30] Polis G A, Holt R D. Intraguild predation: the dynamics of complex trophic interactions. *Trends in Ecology and Evolution*, 1992, 7: 151-154.

(责任编辑 赵利辉, 毕京翠)