昆虫知识 *Chinese Bulletin of Entomology* 2010,47(6):1248 ~ 1252

技术与方法

绿盲蝽捕食棉铃虫卵的 CO Ⅰ 标记检测方法*

王丽丽 陆宴辉 吴孔明**

(中国农业科学院植物保护研究所 植物病虫害生物学国家重点实验室 北京 100193)

The method of CO Ⅰ marker for detecting predation of *Apolygus lucorum* on *Helicoverpa armigera* eggs.

WANG Li-Li, LU Yan-Hui, WU Kong-Ming** (*State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests*, *Institute of Plant Protection*, *Chinese Academy of Agricultural Sciences*, Beijing 100193, China)

Abstract *Apolygus lucorum* Meyer-Dür, an important insect pest of cotton and other crops in China, feeds on both plants and insects. A PCR was developed by designing a pair of primers using the cytochrome oxidase subunit Ⅰ (CO Ⅰ) gene segment of *Helicoverpa armigera* Hübner and the effectiveness of this in detecting *A. lucorum* predation on *H. armigera* eggs investigated. The results indicate that this pair of primers can specially amplify *H. armigera* DNA in *A. lucorum* that had consumed three *H. armigera* eggs with a half life of 1.77 h. This method provides a valuable platform for further assessment of the ecological function of *A. lucorum* in agricultural systems.

Key words *Apolygus lucorum*, *Helicoverpa armigera* eggs, predation, CO Ⅰ marker

摘 要 绿盲蝽 *Apolygus lucorum* Meyer-Dür 不仅取食棉花等多种农作物,而且还具有一定的捕食行为。利用棉铃虫细胞色素氧化酶Ⅰ(CO Ⅰ)的基因序列,设计了检测绿盲蝽对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* Hübner 卵捕食作用的特异引物。PCR 分析结果表明,该引物可特异性检测绿盲蝽体内棉铃虫卵 DNA 片段,取食 3 粒棉铃虫卵绿盲蝽的检测半衰期为 1.77 h。此检测方法为进一步评价绿盲蝽在农业生态系统中的地位与功能提供了技术平台。

关键词 绿盲蝽,棉铃虫卵,捕食作用,CO Ⅰ 标记

研究昆虫捕食行为的传统方法包括直接观察法[1]、室内观察法、放射性同位素标记法[2]和酶联免疫吸附法[3,4]等,但上述方法分别存在着工作量大、靶标特异性不强和难以用于对自然种群的评估等不足之处[5~7]。近年来,分子标记技术,如 ITS-1、mtDNA、SCAR 和细胞色素氧化酶Ⅱ(CO Ⅱ)基因标记等[6,8~11],已逐步发展成为昆虫捕食行为研究的有效方法,被广泛应用于相关研究。

绿盲蝽 *Apolygus lucorum* Meyer-Dür(半翅目:盲蝽科)是一种重要的农业害虫,能为害棉花、苜蓿、枣树、葡萄等多种作物。成、若虫均以口针刺吸植物汁液,主要造成作物叶片皱缩、花蕾枯死、幼果脱落等危害。近年来,随着 Bt 棉花的大规模种植、农业产业结构的调整和高毒农药的禁用等,绿盲蝽种群发生数量剧增,已成为我国棉花、枣树等多种作物上的主要害虫[12~14]。最近,作者的研究发现,绿盲蝽还具有捕食棉铃虫 *Helicoverpa armigera* Hübner 卵和小型昆虫的行为[15]。本文进一步发展了利用棉铃虫细胞色素氧化酶Ⅰ(CO Ⅰ)基因标记检测绿盲蝽捕食棉铃虫卵的方法,以期为科学评价绿盲蝽在农业生态系统中的地位与功能提供

* 资助项目:国家科技支撑计划(2006BAD08A07)、财政部农业公益性行业科研专项(200803011)。

收稿日期:2010-04-12,修回日期:2010-06-11

**通讯作者,E-mail: kmwu@ippcaas.cn

技术平台。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

绿盲蝽于 2005 年 7 月至 8 月采自中国农业科学院廊坊科研中试基地,在室内用四季豆(*Phaseolus vulgaris* L.)继代饲养,成虫期补充 10% 蜂蜜水,饲养条件为温度(25 ± 2)℃,湿度 60% ± 5%,光照 L: D = 14: 10[16]。

棉铃虫于 1996 年采自河南省新乡县棉田,在养虫室内用人工饲料饲养,人工饲料配方参照梁革梅等[17],成虫在产卵笼中用 10% 糖水补充营养。饲养环境为温度(26 ± 1) ℃,湿度 60% ~85%,光照 L: D = 16: 8。

其他 19 科 36 种供试昆虫(表 1)中除小菜蛾 *Plutella xylostellat* L.、烟青虫 *Helicoverpa assulta* Guenee、粘虫 *Mythimna separata* Walker 为中国农业科学院植物保护研究所相关课题组

表 1　引物种特异性检验中所用的昆虫种类

目	科	序号	种类
半翅目	蚜科	1	棉蚜 *Aphis gossypii* Glover
		2	大豆蚜 *Aphis glycines* Matsumura
		3	玉米蚜 *Rhopalosiphum maidis* Fitch
	粉虱科	4	烟粉虱 *Bemisia tabaci* Gennadius
	花蝽科	5	小花蝽 *Orius minutus* L.
	长蝽科	6	大眼蝉长蝽 *Geocoris pallidipennis* Costa
	蝽科	7	斑须蝽 *Dolycoris baccarum* L.
		8	茶翅蝽 *Halyomorpha halys* Fabricius
	盲蝽科	9	绿盲蝽 *Apolygus lucorum* Meyer – Dür
		10	中黑盲蝽 *Adelphocoris suturalis* Jakovlev
		11	三点盲蝽 *Adelphocoris fasciaticollis* Reuter
		12	苜蓿盲蝽 *Adelphocoris lineolatus* Goeze
		13	烟盲蝽 *Cyrtopeltis tenuis* Reuter
	叶蝉科	14	叶蝉 *Empoasca biguttula* Ishida
蜱螨亚纲	叶螨科	15	朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* Boisduval
缨翅目	蓟马科	16	西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* Pergande
鳞翅目	菜蛾科	17	小菜蛾 *Plutella xylostellat* L.
	螟蛾科	18	草地螟 *Loxostege sticticalis* L.
		19	玉米螟 *Ostrinia palustralis* Hübner
	夜蛾科	20	甜菜夜蛾 *Laphygma exigua* Hübner
		21	斜纹夜蛾 *Prodenia litura* Fabricius
		22	甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* L.
		23	宽胫夜蛾 *Protoschinia scutosa* Denis *et* Schiffermüller
		24	小地老虎 *Agrotis ypsilon* Rottemberg
		25	烟青虫 *Helicoverpa assulta* Guenee
		26	粘虫 *Mythimna separata* Walker
	尺蛾科	27	大造桥虫 *Ascotis selenaria* Schiffermüller *et* Denis
蜘蛛目	蟹蛛科	28	三突花蛛 *Misumenops tricuspidatus* Fabricius
	微小蛛科	29	草间小黑蛛 *Erigonidium graminicolum* Sundevall
	肖蛸科	30	直伸肖蛸 *Tetragnatha extensa* L.
脉翅目	草蛉科	31	中华草蛉 *Chrysopa sinica* Tjeder
		32	大草蛉 *Chrysopa septempunctata* Wesmael
鞘翅目	瓢虫科	33	异色瓢虫 *Harmonia axyridis* Pallas
		34	龟纹瓢虫 *Propylea japonica* Thunberg
		35	七星瓢虫 *Coccinella septempunctata* L.
	象甲科	36	棉尖象 *Phytoscaphus gossypii* Chao

注:本表中不同种类昆虫的序号与图 1 中相一致。

提供的室内人工饲养种群，其余 33 种均于 2009 年 5 月至 9 月采自中国农业科学院廊坊科研中试基地各种作物田。将昆虫个体按不同大小分别饥饿 6 h、1 d、3 d，让其排清体内的残存食物，随后单头浸泡于盛有 100% 酒精的 2 mL 离心管中，于 -80℃冻存备用。

1.2 DNA 模板制备

各种昆虫的基因组 DNA 用血液/细胞/组织组 DNA 提取试剂盒单头提取，棉叶 DNA 用植物基因组 DNA 试剂盒提取。提取后，将 DNA 溶液储于 -20℃备用，PCR 扩增时吸取 1 μL 溶液作为 DNA 模板。

1.3 PCR 扩增及检测

根据 GenBank 中棉铃虫 CO Ⅰ(AY264944)的一段基因序列，设计一对棉铃虫特异引物，上游 MLCF：5′-GGTGATCCTATTTTATATCAC-3′，下游 MLCR：5′-GAGTATCAATATCTATACCAG-3′，扩增片段长度为 239 bp。PCR 扩增条件：EX Taq 聚合酶 0.25 μL、10 × buffer 2.5 μL、dNTP2 μL、DNA 模板 1 μL、灭菌双蒸水补齐至 25 μL。PCR 扩增程序：94℃预变性 5 min、94℃变性 30 s、55℃退火 30 s、72℃延伸 1 min，共 36 个循环，最后 72℃延伸 10 min。取 10 μL 反应产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶中电泳，最后分析电泳结果。

1.4 种特异性检验

以与棉铃虫同域发生的昆虫种类(表 1)及棉花叶片的 DNA 作为模板，分别以棉铃虫为阳性对照，以清水为阴性对照，应用上述棉铃虫引物进行 PCR 扩增，检验该引物的特异性。

1.5 体内棉铃虫卵成分的检测

将产有棉铃虫卵的纱布剪成 3 cm × 3 cm 大小，挑选带有 25 ~ 30 粒卵的一块纱布片放入指形管，再接入一头绿盲蝽成虫让其取食。将 30 min 内取食 3 粒以上卵的绿盲蝽成虫取出，并立即冻存。提取以上绿盲蝽的 DNA 作为模板，以棉铃虫卵作为阳性对照、未取食棉铃虫卵的绿盲蝽作为阴性对照，利用棉铃虫特异性引物来检测绿盲蝽体内棉铃虫卵成分。

1.6 消化时间对检测效果的影响

试验方法同 1.5。试验前，将绿盲蝽成虫饥饿 3 h 后，再接入指形管中喂食棉铃虫卵，选取 30 min 内取食 3 粒棉铃虫卵的绿盲蝽，于室温下分别饥饿 0、1、3、5 h。期间用湿棉球提供清水，每处理 10 头成虫。之后提取成虫 DNA 对体内的棉铃虫卵成分进行检测。

2 结果与分析

2.1 引物种特异性检验

以棉铃虫卵及供试的其它种类昆虫、棉叶基因组 DNA 为模板，用设计的棉铃虫引物进行 PCR 扩增，检验引物的种特异性。结果表明，该引物只对棉铃虫卵具有扩增作用，且条带明显(约 200 bp)，而其它种类昆虫、棉花叶片及阴性对照没有条带。这说明该引物为棉铃虫卵的特异性引物(图 1)。

2.2 体内棉铃虫卵成分的检测

以取食棉铃虫卵的绿盲蝽成虫 DNA 为模板，用棉铃虫卵的特异引物进行扩增，其扩增所得片段与以棉铃虫 DNA 为模板的扩增片段大小一致，而未取食棉铃虫卵的绿盲蝽成虫没有扩增条带(图 2)。这表明这种方法可以对绿盲蝽成虫体内棉铃虫卵的 DNA 片段进行有效检测。

2.3 消化时间对特异性引物检测效果的影响

取食后立即冻存的绿盲蝽成虫(t = 0)体内均能检测到棉铃虫 DNA 片段，但随取食后消化时间的延长，可检测到的阳性反应数量减少，5 h 后其阳性反应比率为零。应用线性回归分析得出 3 粒棉铃虫卵在绿盲蝽体内的半衰期为 1.77 h(表 2)。

表 2 消化时间对绿盲蝽成虫体内棉铃虫卵成分检测效果的影响

消化时间(h)	检测数量	阳性反应数量	阳性反应比率(%)	半衰期(h)
0	10	10	100	1.77
1	10	4	40	
3	10	2	20	
5	10	0	0	

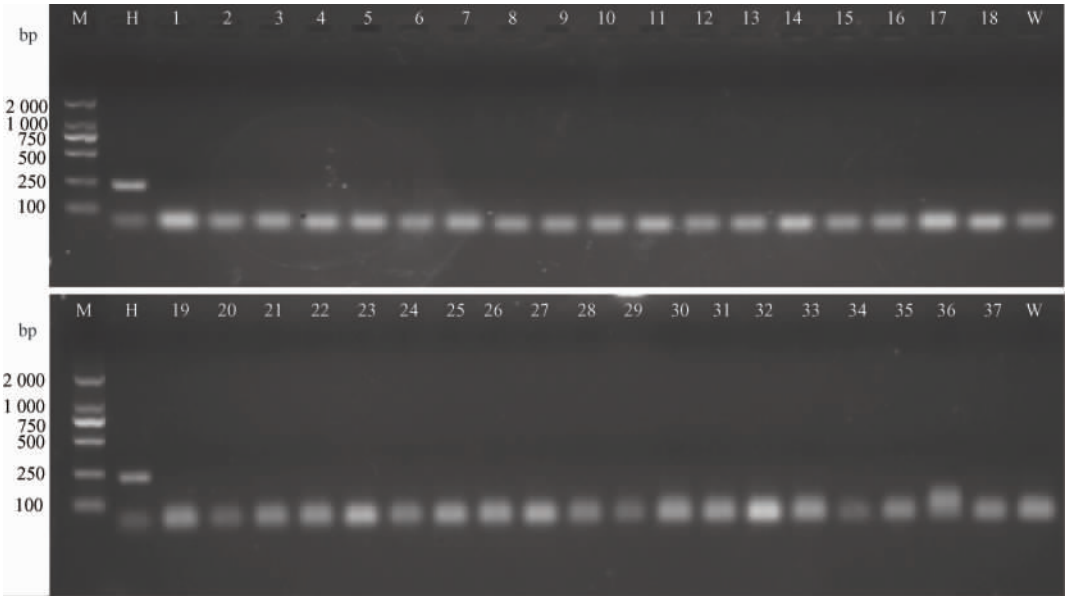

图 1　棉铃虫引物种特异性检验结果

M:分子标准量;H:棉铃虫卵;1 ~ 36:其他昆虫,具体种类详见表 1;37:棉叶;W:清水

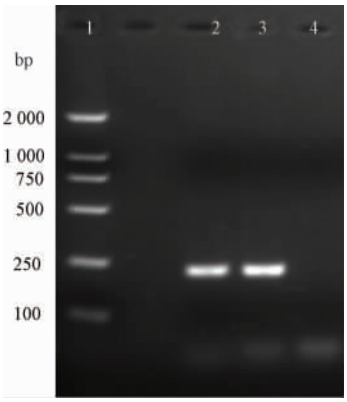

图 2　绿盲蝽体内棉铃虫卵 DNA 的检测

1:标准分子量;2:棉铃虫卵;3:取食棉铃虫卵的绿盲蝽成虫;4:未取食棉铃虫卵的绿盲蝽成虫

3　讨论

本研究根据棉铃虫 CO Ⅰ 基因序列成功设计了一对棉铃虫卵特异引物,并利用这一特异性引物成功检测到了绿盲蝽成虫体内残存的棉铃虫卵 DNA 片段。结果表明,这种分子标记检测方法适用于绿盲蝽对棉铃虫卵捕食作用的研究评估。

食性研究对探索昆虫的进化机制具有重要意义,同时能为评价其在生态系统中的地位和功能提供必要的依据。盲蝽科昆虫的食性比较复杂,除了典型的植食性和肉食性种类以外,相当一部分种类为杂食性,即兼有植食性与肉食性。国内外在盲蝽食性及相应的生态功能方面有不少研究,如:美国牧草盲蝽 *Lygus lineolaris* Palisot de Beauvois 是美国棉花上的主要害虫,但它还取食秋黏虫 *Spodoptera frugiperda* Smith 卵块、马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* Say 幼虫、烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* F. 幼虫等[18,19],可作为这些害虫的天敌资源加以利用。豆荚草盲蝽 *L. hesperus* Knight 也是一种重要的棉花害虫,但同时发现还是棉田烟粉虱 *Bemisia tabaci* Gennadius 的重要天敌,对田间烟粉虱种群具有很好的控制作用[20~22]。中华微刺盲蝽 *Campylomma chinensis* Schuh 能危害多种果树、观赏植物,但同时也可捕食蓟马、粉虱、蚜虫、螨类及鳞翅目和同翅目昆虫的卵[23~25]。烟盲蝽 *Nesidiocoris tenuis* Reuter 除危害烟草、芝麻等多种植物之外,还是温室白粉虱 *Trialeurodes vaporariorum* Westwood、斜纹夜蛾 *Prodenia litura* Fabricius、烟蚜 *Myzus persicae*

Sulzer 等害虫的有效天敌[26]。上述各项研究清楚表明，盲蝽食性特征将直接影响到生产上这类昆虫的科学防治或合理利用工作。因此，绿盲蝽在田间对其他昆虫的捕食作用及其相应的生态功能有待进一步探索研究。

本试验发展的 CO Ⅰ 标记检测方法成功检测到绿盲蝽体内棉铃虫的 DNA 片段，为进一步评估田间绿盲蝽对棉铃虫卵捕食作用提供了必要的技术支撑，同时为深入了解绿盲蝽在农田生态系统中的地位以及与其他种类昆虫之间的食物关系奠定了基础。

参 考 文 献

1 Munyaneza J., Obrycki J. J. Searching behavior of *Coleomegilla maculate* larvae feeding on Colorado potato beetle eggs. *Biol. Control*, 1998, **13**(2): 85 ~ 90.

2 McDaniel S. G., Keeley L. L., Sterling W. L. Radiolabeling *Heliothis virescens* eggs by ^{32}P injection of adult females. *Ann. Entomol. Soc. Amer.*, 1978, **71**(3): 432 ~ 434.

3 刘雨芳，张古忍，古德祥，等. 用 ELISA 方法研究稻田节肢动物的食物关系. 昆虫学报，2002，**45**(3): 352 ~ 335.

4 James R. H., Steven E. N. Use of a gut content ELISA to detect whitefly predator feeding activity after field exposure to different insecticide treatments. *Biocontrol Sci. Technol.*, 2005, **15**(4): 321 ~ 339.

5 Symondson W. O. C. Molecular identification of prey in predator diets. *Mol. Ecol.*, 2002, **11**(4): 627 ~ 641.

6 Agusti N., de Vicente M. C., Gabarra R. Development of sequence amplified characterized region (SCAR) markers of *Helicoverpa armigera*: a new polymerase chain reaction-based technique for predator gut analysis. *Mol. Ecol.*, 1999, **8**(9): 1 467 ~ 1 474.

7 Zaidi R. H., Jaal Z., Hawkes N. J., *et al*. Can the detection of prey DNA amongst the gut contents of invertebrate predators provide a new technique for quantifying predation in the field? *Mol. Ecol.*, 1999, **8**(12): 2 081 ~ 2 087.

8 Hoogendoom M., Heimpel G. E. PCR-based gut content analysis of insect predators: using ribosomal. ITS-1 fragments from prey to estimate predation frequency. *Mol. Ecol.*, 2001, **10**(8): 2 059 ~ 2 068.

9 Andrew G. S. C., Colin C. F., Archie K. M. Detection of *Rhopal osiphum insertum* (apple-grass aphid) predation by the predatory mite *Anystis baccarum* using molecular gut analysis. *Agri. Forest Entomol.*, 2003, **5**(3): 219 ~ 225.

10 Agusti N., de Vicente M. C., Gabarra R. Developing SCAR markers to study predatoron *Trialeurrodes vaporariorun*. *Insect Mol. Biol.*, 2000, **9**(3): 263 ~ 268.

11 高红秀，韩岚岚，赵奎军，等. 大豆蚜细胞色素氧化酶Ⅱ基因的克隆及其在捕食性天敌昆虫鉴定中的应用. 昆虫学报，2006，**49**(5): 754 ~ 758.

12 Wu K., Li W., Feng H., *et al*. Seasonal abundance of the mirids, *Lygus lucorum* and *Adelphocoris* spp. (Hemiptera: Miridae) on Bt cotton in northern China. *Crop Prot.*, 2002, **21**(10): 997 ~ 1 002.

13 Lu Y. H., Qiu F., Feng H. Q., *et al*. Species composition and seasonal abundance of pestiferous plant bugs (Hemiptera: Miridae) on Bt cotton in China. *Crop Prot.*, 2008, **27**(3/5): 465 ~ 472.

14 陆宴辉，吴孔明，姜玉英，等. 棉花盲蝽的发生趋势与防控对策. 植物保护，2010，**36**(2): 150 ~ 153.

15 陆宴辉，吴孔明. 棉花盲椿象及其防治. 金盾出版社，2009.

16 陆宴辉，吴孔明，蔡晓明，等. 利用四季豆饲养盲蝽的方法. 植物保护学报，2008，**35**(3): 215 ~ 219.

17 梁革梅，谭维嘉，郭予元. 人工饲养棉铃虫技术的改进. 植物保护，1999，**25**(2): 15 ~ 17.

18 Cleveland T. C. Hibernation and host plant sequence studies of tarnished plant bugs, *Lygus lineolaris*, in the Mississippi delta. *Environ. Entomol.*, 1982, **11**(5): 1 049 ~ 1 052.

19 Bugg R. L., Wilson L. T. *Ammi visnaga* (L.) Lamarck (Apiaceae): associated beneficial insects and implications for biological control, with emphasis on the bell-pepper agroecosystem. *Biol. Agric. Hortic.*, 1989, **6**(3): 241 ~ 268.

20 Hagler J. R., Naranjo S. E. A new approach to evaluate augmentative biological control agents. In: Richter D., Armour J. (eds.). Proc. Beltwide Cotton Conf. National Cotton Council, Memphis, TN. 1997. 1 320.

21 Hagler J. R., Brower A. G., Tu Z., *et al*. Use of a monoclonal antibody to detect predation of the sweet potato whitefly *Bemisia tabaci* (Gem.). *Entomol. Exp. Appl.*, 1993, **68**(3): 231 ~ 236.

22 Hagler J. R., Narajo S. E. Using gut content immunoassays to evaluate predaceous biological control agents: a case study. In: Symondson W. O. C., Liddell J. E. (eds.). The Ecology of Agricultural Pests. Biochemical Approaches. London: Chapman Hall. 1996. 384 ~ 399.

23 陈仁，陈群航，林治良，等. 中华微刺盲蝽捕食菜青虫卵试验初报. 上海农业学报，2005，**21**(4): 42 ~ 44.

24 Wang C. T. The predacious capacity of two natural enemies of *Thrips palmi* Karny, *Campylimma chinensis* Schuh (Hemiptera: Miridae) and *Orius sauteri* (Poppius) (Hemiptera: Anthocoridae). *Plant Prot. Bull.*, 1994, **36**(2): 141 ~ 154.

25 秦玉洁，吴伟坚，梁广文. 节瓜蓟马的新天敌—中华微刺盲蝽. 昆虫天敌，2001，**23**(3): 115 ~ 118.

26 吴伟坚，于金咏，梁广文. 盲蝽科昆虫的食性. 昆虫知识，2003，**40**(2): 108 ~ 111.