研究论文

异色瓢虫取食棉蚜或棉花花粉后体内棉花 DNA 的降解动态*

包伟方[1,2**] 王 倩[2] 樊 东[1***] 陆宴辉[2***]

（1. 东北农业大学农学院，哈尔滨 150030；2. 植物病虫害生物学国家重点实验室，中国农业科学院植物保护研究所，北京 100193）

摘 要 **【目的】** 在农田中，天敌瓢虫主要捕食植食性害虫，从而间接摄入残留在害虫体内的寄主植物 DNA；也常取食花粉等植物性食物，直接摄入植物 DNA。本文比较研究两种摄入方式下，植物 DNA 在瓢虫体内的降解和残留动态。**【方法】** 以异色瓢虫-棉蚜-棉花为研究对象，利用 PCR 技术检测瓢虫取食棉花上棉蚜、棉花花粉后，体内棉花 DNA 的残留情况，明确摄入方式、消化时间对棉花 DNA 检出率的影响效应。**【结果】** 异色瓢虫成虫取食棉花叶片上的棉蚜，4 h 后体内棉花 DNA 的最大检出率为 16.7%，8 h 后完全检测不到。瓢虫取食棉花花粉，4 h 后体内棉花 DNA 检出率为 70.4%，12 h 后为 51.9%，16 h 后下降为 39.3%，20 h 后检测不到。**【结论】** 异色瓢虫取食棉花花粉后，体内棉花 DNA 残留时间远长于通过捕食棉蚜的摄入方式。这种差异有助于对瓢虫体内由不同方式摄入的植物 DNA 进行区别分析。

关键词 异色瓢虫，棉蚜，棉花，肠道内含物分析，食物谱

Degradation dynamics of cotton DNA in adult *Harmonia axyridis* feeding on cotton aphid or cotton pollen

BAO Wei-Fang[1,2**] WANG Qian[2] FAN Dong[1***] LU Yan-Hui[2***]

(1. College of Agriculture, Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China; 2. State Key Laboratory of Biology of Plant Disease and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract **[Objectives]** Predatory ladybird beetles consume plant DNA indirectly by preying on herbivorous insect pests, but also directly by ingesting plant foods such as pollen . We assessed the degradation of plant DNA consumed by ladybird beetles via both these routes. **[Methods]** A tritrophic system, *Harmonia axyridis* - *Aphis gossypii* - *Gossypium hirsutum*, was used for this study. Cotton plant DNA in ladybird beetles was detected using PCR technology after feeding on *A. gossypii* on cotton leaves, or on cotton pollen, and the effects of digestion time on the DNA detection rate was analyzed. **[Results]** The maximum detection rate of cotton DNA in *H. axyridis* adults that had fed on *A. gossypii* was 16.7% 4 h after feeding. Cotton DNA could not be detected after 8 h. Detection rates of cotton DNA in *H. axyridis* that had fed on cotton pollen were 70.4% after 4 h, 51.9% after 12 h, and 39.3% after 16 h and 0% after 20 h. **[Conclusion]** Cotton DNA was detectable for longer in *H. axyridis* that had fed on cotton pollen than in those that had fed on *A. gossypii*.

Key words *Harmonia axyridis*, *Aphis gossypii*, cotton plant DNA, PCR, gut content analysis, food composition

近年来，植物 DNA 分子追踪技术发展迅速，利用一段较短的 DNA 序列能有效鉴别昆虫摄入体内的植物种类（Jurado-Rivera *et al.*，2009）。如 Wallinger 等（2013）研究发现在金针虫

*资助项目 Supported projects：国家自然科学基金（31572019，31621064）

**第一作者 First author，E-mail：weifangbao123@163.com

***共同通讯作者 Co-corresponding authors，E-mail：dnfd@163.com; yhlu@ippcaas.cn

收稿日期 Received：2017-01-24，接受日期 Accepted：2017-04-07

Elateridae leach 取食后 72 h，体内仍能检测到黑麦草 *Lolium perenne*、红车轴草 *Trifolium pratense*、长叶车前 *Plantago lanceolata*、蒲公英 *Taraxacum officinale*、千叶蓍 *Achillea millefolium*、白三叶 *Trifolium repens* 和大茴芹 *Pimpinella major* 的 DNA。Wallinger 等（2015）研究发现红婪步甲 *Harpalus rufipes* 成虫取食黑麦草 *Lolium perenne* 和蒲公英 *Taraxacum officinale* 的种子，消化 72 h 后在该甲虫的反刍物中仍能检测植物的 DNA。昆虫体内植物 DNA 信息的残留以及相关分子追踪技术的发展，为追溯研究昆虫的食物谱、食物或生境选择偏好行为等生物学与生态学习性提供了可能性与途径（王倩等，2016）。

捕食性瓢虫是蚜虫、粉虱、介壳虫和螨类等多种害虫的一类主要天敌（Obrycki and Kring，1998；Dixon，2000）。除捕食猎物外，瓢虫也可取食花粉、果实等植物性食物（Lundgren，2009）。也就是说，瓢虫可以通过捕食植食性猎物这种间接方式、以及通过直接取食植物组织的方式，将植物 DNA 摄入体内。因此，利用 DNA 分子追踪技术将可能获取瓢虫体内的植物 DNA 信息，有助于深入分析瓢虫的食物来源、活动生境等重要信息，为其行为习性研究提供直接科学证据。本研究以异色瓢虫 *Harmonia axyridis*-棉蚜 *Aphis gossypii* -棉花 *Gossypium hirsutum* 为研究对象，利用 PCR 检测技术评价对直接取食和间接摄入两种方式下，植物 DNA 在瓢虫体内的降解和残留动态。

1 材料与方法

1.1 供试植物与虫源

棉花品种为石远 321，种植在中国农业科学院植物保护研究所河北廊坊科研中试基地试验田，常规管理，全生育期不使用化学农药。

异色瓢虫和棉蚜均为室内种群，异色瓢虫用蚕豆蚜 *Acythosiphon pisum* 饲养，棉蚜用 5-8 叶期盆栽棉苗饲养，温度为（25±1）℃，湿度为 65%-75% RH 以及光照为 L：D= 16：8。

1.2 试验方法

1.2.1 异色瓢虫取食棉花叶片上的棉蚜 将一张棉花嫩叶平铺在一个培养皿中（2.6 cm 直径，10 cm 高），用小毛笔在每张叶片上接入 1 头棉蚜 4 龄若虫。3 h 之后，用小毛笔将棉蚜移至 1.5 mL 的离心管中，每管放 1 头棉蚜，在室温下进行不同时间（0、2、4、8 h）的饥饿处理。将棉蚜饥饿处理后，随即将一头棉蚜移至放有一头异色瓢虫成虫的离心管中，供瓢虫取食。取食前 48 h，将瓢虫单头放入 1.5 mL 离心管中，期间提供湿润棉球而不提供其他食物，进行饥饿处理。棉蚜放入 10 min 后，将已捕食完棉蚜的瓢虫个体，再分别在室温下放置 0、2、4 或 8 h，随后将瓢虫成虫用液氮冻死，浸泡于 75%酒精中，－80 ℃贮存以备检测。每个处理各检测瓢虫个体 30 头。

1.2.2 异色瓢虫取食棉花花粉 在田间轻敲棉花花柄处，将花粉敲下平铺在培养皿中，之后将已饥饿 24 h 的棉蚜 4 龄若虫放置在花粉上（预实验表明饥饿 24 h 后棉蚜体内检测不到棉花 DNA），将体表沾满花粉的棉蚜用小毛笔取出，单头放置在 1.5 mL 的离心管中。再将饥饿处理 48 h 的一头异色瓢虫成虫转移至离心管中，10 min 后将已捕食完棉蚜的瓢虫个体移出，在显微镜下用小毛笔清除体表残留的棉花花粉，再移至一个干净离心管，分别在室温下放置 0、4、8、12、16、20 或 24 h。处理后，将异色瓢虫成虫用液氮冻死，浸泡于 75%酒精中，－80 ℃贮存以备检测。每个处理设 30 个重复。

1.2.3 棉花 **DNA** 提取与检测方法 将镊子用酒精润洗后用酒精灯灼烧，待冷却后，将单头保存在酒精中的待用瓢虫转移到新的 1.5 mL 离心管中，往离心管中加入 1 mL 的去离子水进行彻底洗涤，防治瓢虫体表携带花粉与植物残渣对实验结果的干扰，洗涤后用干净的镊子再次将瓢虫转移到另一新离心管中，并开盖晾干 2-3 min。镊子每次使用时都需要重复灼烧与冷却，保证样品之间无交叉污染。烧制研磨棒将其磨碎，利用 CTAB 法提取 DNA（Wallinger *et al.*，2013）。

DNA 提取时，每 24 个样中设置两个阴性对照，防止 DNA 提取中的交叉污染。

利用棉花的特异性引物 F：5′-GTTGAAG-AAAGAATCGAATAGAATAG-3′和 R：5′-ATA-GACAGCAAACGGGCTTT-3′和棉蚜的特异性引物 AgF：5′-TCAGTAGACTTAACTATTTTTTCC-3′和 AgR:5′-AAATGTTGATAAAGAATAGGG-3′进行扩增。PCR 反应体系如下：dNTP Mixture（2.5 mmol/L）2 μL，EasyTaq 0.25 μL，10×EasyTaq Buffer 2.5 μL，Primer-F 0.75 μL，Primer-R 0.75 μL，DNA 模板 4 μL，ddH_2O 14.75 μL，总体积 25 μL。PCR 反应按照以下的反应条件进行：预变性 94 ℃，4 min；变性 94 ℃ 30 s；退火 57 ℃ 30 s；延伸 72 ℃ 1 min；再延伸 72 ℃ 10 min；4 ℃保存，变性到延伸进行 40 个循环。

PCR 产物经电泳放在凝胶成像仪下鉴定，电泳电压 180 V，凝胶浓度为 2%。每次 PCR 设置两个阴性对照（用 ddH_2O 代替 DNA 模板）和两个阳性对照（棉花 DNA 模板）分别确定 DNA 的交叉污染和 PCR 成功扩增。

1.3　数据分析

植食者摄入植物组织后，植物 DNA 在其体内逐步消化和降减。从植食者完成植物摄入开始，到 50%个体体内能检出靶标植物 DNA 残留，这一时间被称为检测能力半衰期（DS_{50}）（Greenstone *et al.*，2007）。对棉花 DNA 检出率随时间变化关系进行逻辑斯蒂回归分析（PROC GENMOD），并计算 DS_{50} 值。利用 *t*-检验比较取食棉蚜或花粉后异色瓢虫体内棉花 DNA 的 DS_{50}，统计软件为 SAS 9.2。

2　结果与分析

2.1　取食棉蚜后异色瓢虫体内棉花 DNA 的检出率

异色瓢虫捕食了棉花叶片上的棉蚜，若不经消化（0 h 后），瓢虫体内棉花 DNA 的检出率为 93.33%；消化 4 h 后，有 16.67%瓢虫中检测到棉花 DNA；消化 8 h 后，瓢虫体内检测不到棉花 DNA。棉蚜从棉叶上取下后先单独放置（消化）1 h，随后再被瓢虫捕食。如瓢虫立即用于检测，体内棉花 DNA 的检出率为 60%；瓢虫消化 4 h 后，检出率下降为 10%；之后检测不到棉花 DNA。如棉蚜从棉叶上取下后先消化 2 h，再被异色瓢虫捕食，随即检测棉花 DNA 的检出率为 50%；瓢虫消化 2 h 后，检出率为 20%；消化 4 h 后，检出率为 0。如瓢虫取食了先消化 4 h 或 8 h 的棉蚜个体，体内均不能检测到棉花 DNA。以棉蚜取食棉花后 0 h 处理为例，计算半衰期 DS_{50}。瓢虫体内棉花 DNA 检出率（*y*）与瓢虫取食后的消化时间（*x*）之间的关系式为 $y=100\%\times e^{(3.16-1.9x)}/(1+e^{(3.16-1.9x)})$，瓢虫体内棉花 DNA 的 DS_{50} 为 1.98 h（表 1）。

表 1　异色瓢虫捕食棉蚜后体内棉花 DNA 的检出情况
Table 1　Positive detection of *Gossypium hirsutum* DNA in *Harmonia axyridis* gut after preying on *Aphis gossypii*

消化时间 Digestion time		步骤Ⅱ：异色瓢虫取食棉蚜后 Step Ⅱ: Aphids eaten by beetles				
		0 h	1 h	2 h	4 h	8 h
步骤Ⅰ：棉蚜取食棉花后 Step Ⅰ: Aphids fed on cotton	0 h	93.33%	80%	30%	16.67%	0
	1 h	60%	60%	30%	10%	0
	2 h	50%	30%	20%	0	0
	4 h	0	0	0	0	0
	8 h	0	0	0	0	0

2.2　取食花粉后异色瓢虫体内棉花 DNA 的检出率

刚取食棉花花粉后，异色瓢虫体内棉花 DNA 的检出率为 93.75%。瓢虫消化 4 h 后，体内棉花 DNA 检出率为 70.37%；8 h 后，检出率为 55.17%；12 h 后，检出率为 51.85%；16 h 后，检出率下降到 39.29%；经过消化 20 h 与 24 h 后，瓢虫体内均未检测到棉花 DNA。瓢虫体内棉花 DNA 检出率（*y*）与瓢虫取食后的消化时间（*x*）之间的关系式为 $y=100\%\times e^{(2.25-0.19x)}/(1+e^{(2.25-0.19x)})$。基此计数获得，瓢虫体内棉花花粉 DNA 的半衰期 DS_{50} 为 10.87 h（图 1），显著长于取食棉蚜后异色瓢虫体内棉花 DNA 半衰期 DS_{50}（t=11.28，df=1，4，P=0.0004）。

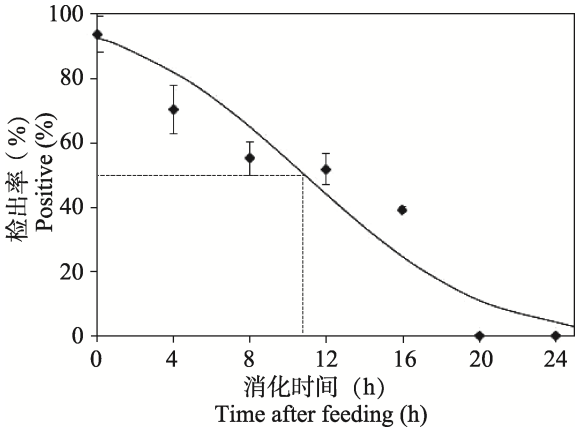

图 1 异色瓢虫取食花粉后体内棉花 **DNA** 的检出情况
Fig. 1 Positive detection of *Gossypium hirsutum* DNA in *Harmonia axyridis* gut after feeding on cotton pollen

3 讨论

昆虫体内植物 DNA 的分子追踪技术已成为植食性昆虫与寄主植物之间食物营养关系研究的重要手段，但已有研究主要集中在植食性害虫上（王倩等，2016）。本研究以捕食性天敌异色瓢虫为研究对象，比较了取食棉花花粉、捕食棉花叶片上棉蚜，从而直接、间接摄入棉花 DNA 后，体内棉花 DNA 的降解和残留动态。结果清楚表明，直接取食棉花花粉的瓢虫体内棉花 DNA 的残留时间达 16 h 以上，远长于通过捕食棉蚜的间接摄入方式。这两者之间的差异有助于分别解析直接取食、间接摄入两种方式下瓢虫体内的植物 DNA 信息，从而进一步解析瓢虫的取食习性与食物谱。

很多种类瓢虫具有很强的飞行扩散能力、甚至迁飞能力。本课题组在位于渤海内距大陆约 40-60 km 的北隍城岛上，每年均能诱捕到大量的从大陆飞来的异色瓢虫、龟纹瓢虫 *Propylea japonica* 等瓢虫成虫（程登发等，2005）。在昆虫迁飞路线及其规律的研究中，昆虫体表附有的植物花粉是一个重要的信息（刘永强，2015）；但昆虫体表的花粉在迁飞过程中容易脱落，同时在样本采集等工作中常因昆虫个体间接触而导致花粉转移，从而在一定程度上影响了数据的科学性和准确性。瓢虫具有取食花粉习性，而且花粉 DNA 在瓢虫体内残留时间长，并显著长于捕食害虫而摄入的植物 DNA，这为瓢虫迁飞行为及其规律研究提供了一个新的科学方法。

昆虫体内植物 DNA 的消解速率会受昆虫与植物种类、昆虫活动状态等多种因素的影响（Wallinger*et al.*，2013；王倩等，2016）。因此，有待针对其他种类瓢虫、植物等重要对象进行比较研究，并进一步在自然环境进行检测评估。

参考文献 (References)

Cheng DF, Feng HQ, Wu KM, 2005. Scanning Entomological Radar and Radar Observation for Insect Migration. Beijing: Science Press. 1–228. [程登发, 封洪强, 吴孔明, 2005. 扫描昆虫雷达与昆虫迁飞监测. 北京: 科学出版社. 1–228.]

Dixon AFG, 2000. Insect Predator-prey Dynamics: Ladybird Beetles and Biological Control. Cambridge : Cambridge University Press. 1–268.

Greenstone MH, Rowley DL, Weber DC, Payton ME, Hawthorne DJ, 2007. Feeding mode and prey detectability half-lives in molecular gut-content analysis: an example with two predators of the Colorado potato beetle. *Bull. Entomol. Res.*, 97(2): 201–209.

Jurado-Rivera JA, Vogler AP, Reid CAM, Petitpierre E, Gómez-Zurita J, 2009. DNA barcoding insect-host plant associations. *P. Roy. Soc. B-Biol. Sci.*, 276(1657): 639–648.

Liu YQ, 2015. Migration and natal origins of *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera; Noctuidae) over the Bohai sea. Doctor dissertation. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. [刘永强, 2015. 小地老虎跨海迁飞规律与虫源地分析. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院.]

Lundgren JG, 2009. Nutritional aspects of non-prey foods in the life histories of predaceous Coccinellidae. *Biol. Control*, 51(2): 294–305.

Obrycki JJ, Kring TJ, 1998. Predaceous coccinellidae in biological control. *Annu. Rev. Entomol.*, 43: 295–321.

Wallinger C, Sint D, Baier F, Schmid C, Mayer R, Traugott M, 2015. Detection of seed DNA in regurgitates of granivorous carabid beetles. *Bull. Entomol. Res.*, 105(6): 1–8.

Wallinger C, Staudacher K, Schallhart N, Peter E, Dresch P, Juen A, Traugott M, 2013. The effect of plant identity and the level of plant decay on molecular gut content analysis in a herbivorous soil insect. *Mol. Ecol. Res.*, 13(1): 75–83.

Wang Q, Bao WF, Zeng Q, Yang YZ, Lu YH, 2016. Tracking the trophic relationship between herbivorous insects and host plants by DNA-based technology. *Acta Entomol. Sin.*, 59(4): 472–480. [王倩, 包伟方, 曾娟, 杨益众, 陆宴辉, 2016. 昆虫与寄主植物营养关系的 DNA 分子追踪. 昆虫学报, 59(4): 472–480.]