应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2014, 51(1): 299−301. DOI: 10.7679/j.issn.2095−1353.2014.035

捕食性天敌昆虫控害作用定量评价方法*

张桂芬[1, 2] 吕志创[1, 2] 万方浩[1, 2**]

（1. 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；
2. 农业部外来入侵生物预防与控制研究中心，北京 100193）

摘 要 天敌昆虫田间捕食作用与能力的研究，通常采用田间种群数量调查与分析的方法或笼罩试验来评价其控制作用，但往往与实际情况不符，尤其是对可捕食多种猎物的非专食性天敌，很难说明其在田间对某一特定猎物的控制作用究竟有多大，而分子生物学技术为捕食者-猎物关系评价研究提供了新途径。本文系统介绍了基于种特异性 SS-PCR 标记技术和 TaqMan-MGB 实时荧光定量 PCR 技术的捕食性天敌控害作用定量评价方法及其优缺点，旨在为害虫天敌的种类筛选及其保护利用提供技术指导。

关键词 捕食性天敌昆虫，定量评价，控害作用，种特异性标记，TaqMan 实时荧光定量 PCR，MGB 探针

Techniques for quantitative evaluation of predatory insects

ZHANG Gui-Fen[1, 2] LÜ Zhi-Chuang[1, 2] WAN Fang-Hao[1, 2**]

(1. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Center for Management of Invasive Alien Species, Ministry of Agriculture, Beijing 100193, China)

Abstract Field population investigation, dynamic analysis and enclosure studies are usually used to evaluate the predatory ability of the natural enemies of pest insects. However, the results obtained via these methods are always inconsistent with the actual situation, and consequently cannot explain the control efficacy of natural predators with regard to a specific prey species, especially, when the predators are generalists. Nowadays, molecular biological techniques provide a new approach for evaluating relationships between predator and prey. We here introduce a method based on TaqMan real-time PCR (with MGB probe) and species-specific PCR that was developed to quantitatively evaluate the control efficacy of generalist predators, and discuss its advantages and disadvantages. The present method should be useful for the screening, protection and utilization of natural enemies in the field.

Key words predatory insects, quantitative evaluation, control efficacy, species-specific marker, TaqMan real-time fluorescent quantitative PCR, MGB probe

我国地大物博，自然天敌资源丰富且控害能力强，如捕食性天敌瓢虫类、捕食性蝽类、草蛉类、蜘蛛类等对棉田害虫即具有较大的控制作用（郭予元，1998），特别是对小型害虫以及隐蔽取食的害虫的控制作用更是不容忽视。

以往，捕食者-猎物关系的研究多采用室内饲喂观察法、田间直接观察法、天敌消化道解剖法、放射标记法、蛋白电泳法以及酶联免疫吸附法（多克隆/单克隆抗体免疫法）等；然而上述方法，或比较费时，或操作较为繁琐，且难以反映田间实际（Symondson, 2002）。近年来，以 DNA 为基础的分子生物学技术发展迅速，并以

* 资助项目：国家自然科学基金（30971967）；公益性行业（农业）科研专项（201103026）；国家“973”计划项目（2009CB119200）
**E-mail: guifenzhang3@163.com
***通讯作者，E-mail: wanfanghao@caas.cn
收稿日期：2013-11-26，接受日期：2013-12-10

其快速、准确、简便、灵敏、重现性好等诸多优点成为当今科学研究中不可缺少的一种技术，其中基于种特异性（Species-specific PCR）检测标记技术，目前已用于捕食性天敌控害作用定性（Agustí *et al*., 1999, 2000; Zhang *et al*., 2007a; 2014）以及定量（Zhang *et al*., 2007a, 2007b）评价研究。本文就捕食性天敌控害作用的定量评价进行系统介绍，以为田间自然天敌的筛选评价提供技术支撑。

1 特异性定性检测评价

1.1 DNA 模板提取

模板 DNA 提取采用单头昆虫匀浆法。将标本置于 1.5 mL 离心管中加液氮破碎研磨，以 50 μL 提取缓冲液（50 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA、1% SDS、20 mmol/L NaCl，pH 8.0）研磨匀浆，并以 50 μL 缓冲液清洗研棒 3 次，合并混匀；然后，在匀浆液中滴加 5 μL 蛋白酶 K（20 mg/mL），充分混匀，60℃水浴 2 h（中途混匀 1 次）；100℃沸水浴 5 min 后加入 200 μL KAC（3 mol/L）抽提 2 次，每次冰浴 1 h，4℃、12 000 r/min、离心 15 min，取上清液。2 倍体积预冷无水乙醇冰浴沉淀上清液 2 h 以上、离心，小心弃去上清液；2 倍体积预冷 75%乙醇洗涤、离心，小心弃去上清液；然后倒扣于洁净滤纸上自然干燥沉淀，以 30 μL 超纯水进行溶解，水溶液于－20℃保存备用。PCR 扩增时吸取 2 μL 水溶液作为 DNA 模板。

1.2 靶标种特异片段扩增引物设计及检验分析

以靶标种猎物及其相关种（包括同域发生的其他种猎物及天敌昆虫）DNA 为模板，以昆虫 DNA 通用型引物（RAPD 引物或 CO Ⅰ引物）进行 PCR 扩增，筛选出靶标种特有的基因片段。然后，根据电泳分离结果，对靶标种特异性条带进行切胶、回收与纯化、载体连接、感受态细胞转化、阳性克隆鉴定及质粒 DNA 提取，并通过 PCR 扩增以及电泳检测克隆效果。然后取与阳性克隆相应的、在甘油中保存的菌液，穿刺冷冻后由公司协助完成碱基序列测定。根据测序结果，设计靶标种特异片段扩增引物，确定扩增片段的大小。然后，以与靶标种同域同时发生的其他种类的猎物和天敌的 DNA 为模板，进行特异性检验。反应体系为 20 μL，其中模板 DNA 2 μL；PCR 扩增时的退火温度为 61℃ 60 s，72℃延伸 5 min。

1.3 田间定性检测与结果判定

以田间捕食性天敌 DNA 为靶标，以靶标种猎物为阳性对照，饥饿 48 h 以上的捕食性天敌为阴性对照，以特异性引物进行 PCR 扩增。然后根据电泳检测结果进行判定，检测到靶标片段的记为阳性，反之为阴性。

2 TaqMan 实时荧光定量检测评价

2.1 标准样品的制备和标准曲线制作

以抽提的质粒 DNA 作为标准样品，以紫外分光光度计测定质粒 DNA 的浓度，然后以 10 倍进行递减梯度稀释成 5 个浓度，折合成 DNA 拷贝数，然后根据 DNA 拷贝数和 C_t 值制作标准曲线及其相关关系式，要求 R^2 值在 0.98 以上。

2.2 TaqMan 探针和引物的设计与合成

根据特异性片段的碱基序列，应用生物信息学分析软件设计靶标种猎物的 TaqMan-MGB 荧光探针和引物，探针和引物由公司协助合成。

2.3 反应体系与扩增条件

定量 PCR 扩增反应以 96 孔光学板在荧光定量 PCR 扩增仪上进行，反应体系为 25 μL，其中模板 DNA 为 2 μL。定量 PCR 扩增时的退火温度为 60℃ 30 s，95℃延伸 10 min。

2.4 荧光引物和探针的种特异性检验

以田间常见的与靶标种同域同期发生的其他种类的害虫和捕食性天敌 DNA 为靶标，质粒 DNA 为阳性对照，超纯水为阴性对照，以 TaqMan 实时荧光定量 PCR 引物和探针进行特异性检验，发出强烈荧光信号者为靶标种。

2.5　靶标种的定量检测

以不同虫态和性别的单头/粒靶标种猎物 DNA 为模板，超纯水为阴性对照，梯度稀释的质粒 DNA 为标准曲线，以实时荧光定量 PCR 引物和探针进行扩增检测，得出靶标种各虫态的 DNA 拷贝数。

2.6　消化时间对定量检测效果的影响

以初羽化或饥饿 48 h 以上取食同一数量靶标种猎物的捕食性天敌昆虫的成虫为检测对象，以 2 倍递增设置 5 个以上时间梯度，于适温条件下进行消化。然后，进行实时荧光定量 PCR 检测以及消化时间与定量检测相关关系分析。

2.7　取食数量对定量检测效果的影响

以初羽化或饥饿 48 h 以上取食一定数量靶标种猎物的捕食性天敌昆虫的成虫为检测对象，以 2 倍递增设置 5 个以上取食数量梯度，于适温条件下消化 1 h。然后，进行实时荧光定量 PCR 检测以及取食数量与定量检测相关关系分析。

2.8　田间定量检测

以田间捕食性天敌为检测靶标，以饥饿 48 h 以上的捕食性天敌为阴性对照，梯度稀释的质粒 DNA 为标准曲线，以实时荧光定量 PCR 引物和 MGB 探针进行检测，得出田间各种捕食性天敌昆虫取食靶标种猎物的数量。

3　讨论

利用 SS-PCR 标记技术设计靶标种猎物特异性引物和 MGB 探针，简便、易行、专一性强，且不会与其他近缘种类的害虫及天敌发生交叉反应。定量评价体系一旦获得便可用于检测与靶标种猎物同域同期发生的所有捕食性天敌类群、及时有效地确定主要天敌类群和优势种类，并实时检测不同地域、不同生境的捕食性天敌对靶标种害虫控制作用的季节动态，对充分保护利用自然天敌持续控制害虫的发生与为害具有重要指导意义。基于分子生物学技术的捕食性天敌定量评价在技术上是一种新方法，在应用上较以往通过田间调查评价捕食性天敌的控制作用，科学性更严谨、量化指标更精确。然而，捕食性天敌常常以多种猎物为食（Harper *et al*., 2005），鉴于此，目前我们正在探索建立针对田间主要害虫的多重 PCR 检测技术（Zhang *et al*., 2014），并已取得一定进展。

参考文献 **(References)**

Agustí N, de Vicente MC, Gabarra R, 1999. Development of sequence amplified characterized region (SCAR) markers of *Helicoverpa armigera*: a new PCR-based technique for predator gut analysis. *Mol. Ecol.*, 8(9): 1467–1474.

Agustí N, de Vicente MC, Gabarra R, 2000. Developing SCAR markers to study predation on *Trialeurodes vaporariorum*. *Insect Mol. Biol.*, 9(3): 263–268.

Harper GL, King RA, Dodd CS, Harwood DJ, Glen DM, Bruford MW, Symondson WOC, 2005. Rapid screening of invertebrate predators for multiple prey DNA targets. *Mol. Ecol.*, 14(3): 819–827.

Symondson WOC, 2002. Molecular identification of prey in predator diets. *Mol. Ecol*., 11(4): 627–641.

Zhang GF, Lü ZC, Wan FH, 2007a. Detection of *Bemisia tabaci* remains in predator guts using a sequence characterized amplified region marker. *Entomol. Exp. Appl*., 123(1): 81–90.

Zhang GF, Lü ZC, Wan FH, Lövel GL, 2007b. Real-time PCR quantification of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) B-biotype remains in predator guts. *Mol. Ecol. Notes*, 7(6): 947–954.

Zhang GF, Wu X, Zhou ZX, Meng XQ, Wan FH, 2014. A one-step, single tube, duplex PCR to detect predation by native predators on invasive *Bemisia tabaci* MEAM1 and *Frankliniella occidentalis*. *Entomol. Exp. Appl.*, 150(1): 66–73.

郭予元, 1998. 棉铃虫自然种群生命表及天敌的控制作用 // 郭予元主编. 棉铃虫的研究. 北京: 中国农业出版社. 168–239.