

褐飞虱特异引物的设计和评估

施波, 陈少波, 余延锈, 刘春辉, 尤民生*

(福建农林大学应用生态研究所, 福州 350002)

摘要: 研究稻田生态系统中天敌对褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål) 的捕食非常重要, 但很困难。本研究设计褐飞虱的 PCR 特异引物, 并对利用从稻田 66 种稻田常见节肢动物中提取的 DNA 进行了特异性验证, 得到褐飞虱的特异引物 (Lug-F1a/Lug-R1), 在实验室以拟环纹豹蛛 *Pardosa pseudoannulata*-褐飞虱为模式设置试验, 分析消化时间、温度、天敌取食量和天敌性别对褐飞虱特异引物的阳性反应率的影响。结果发现: 捕食者性别对检测阳性反应没有显著影响, 而消化时间、温度和取食量均对引物的检测有显著影响。其中, 检测阳性率随消化时间增加而下降, 两者呈指数函数关系。褐飞虱特异引物的设计和评估, 对下一步在田间应用该引物奠定了基础, 为研究褐飞虱与天敌之间的关系提供了新的工具和思路。

关键词: 褐飞虱; 拟环纹豹蛛; 分子鉴定; 特异引物; 捕食检测; 环境因素

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2011)09-1057-11

Design and evaluation of the species-specific primers of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae)

SHI Bo, CHEN Shao-Bo, YU Yan-Xiu, LIU Chun-Hui, YOU Min-Sheng* (Institute of Applied Ecology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Predation of the brown planthopper (BPH), *Nilaparvata lugens* (Stål) by its predators is particularly important in rice field ecosystem, but its studying is rather difficult. In this study, PCR cross-amplification was initially conducted on DNA extracted from 66 species of arthropods commonly found in rice fields. Only Lug-F1a/Lug-R1 was specific and efficient enough to detect species-specific DNA of *N. lugens* in the gut of wolf spider *Pardosa pseudoannulata*. Then, we assessed how digestion time, temperature, feeding amount of predators and the sex of predators can influence the effectiveness of detecting BPHs in spider guts using Lug-F1a/Lug-R1. The results indicated that digestion time, temperature and feeding amount significantly affected the detection of the primers, while the sex of predators had no significant influence. The detection was significantly and negatively correlated with digestion time and temperature, but positively with the feeding amount. Thus the species-specific primers of *N. lugens* had been successfully identified, which could be effectively used in rice fields. These primers under the conditions tested here provide a new detection tool efficient for studying the relationship between *N. lugens* and its predators.

Key words: *Nilaparvata lugens*; *Pardosa pseudoannulata*; molecular identification; species-specific primers; predation detection; environmental conditions

研究天敌-害虫的捕食关系是生态学中最难的课题之一(Naranjo and Hagler, 2001)。目前已有许多方法(如血清检验法、酶联免疫吸附试验法和单克隆抗体法)被应用于确定天敌与害虫的捕食关系, 但还存在着一些不足之处(庞保平和程家安, 2000; Symondson, 2002; Harwood and Obrycki, 2005; Sheppard and Hardwood, 2005)。近年来迅速发展起来的 PCR 检测的方法(Agustí *et al.*, 1999;

Zaidi *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2007a, 2007b), 被认为是一种有应用前景的方法(King *et al.*, 2008)。它通过设计目标害虫的某个 DNA 片段的特异性引物并将其用于扩增天敌消化道内该害虫的此段核酸, 扩增产物呈阳性便说明天敌消化道存在该害虫的 DNA 片段, 从而说明天敌有捕食该害虫(Agustí *et al.*, 1999; Zaidi *et al.*, 1999)。检测天敌消化道内是否含有害虫残体的方法是判断在自然环境中天

基金项目: 国家“973”计划项目(2006CB102006); 国家科技支撑计划课题(2008BADA5B01); 国家自然科学基金项目(30570309; 30871649)
作者简介: 施波, 男, 1984 年生, 四川崇州人, 硕士, 研究方向为昆虫生态与害虫综合治理, E-mail: shibo10000@126.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: msyou@iae.fjau.edu.cn

收稿日期 Received: 2011-02-28; 接受日期 Accepted: 2011-08-22

敌捕食害虫的最新的方法。这些方法还包括之前的一些分子检测法, 比如单克隆抗体法 (Greenstone and Hunt, 1993; Zhao *et al.*, 2004; Sheppard and Harwood, 2005)。比起单克隆抗体法, 特异引物 PCR 检测法具有经济性和时效性的优点 (Symondson, 2002)。引物设计技术的广泛使用, 特异引物的经济重复利用, 以及许多基因片段可作为目标基因来设计害虫特异引物, 这些都是 PCR 检测的优点 (Cuthbertson *et al.*, 2003; Greenstone and Shufron, 2003; Garipey *et al.*, 2007)。

影响 PCR 检测结果的因素可能有害虫在天敌体内的消化时间 (McMillan *et al.*, 2007)、天敌种类 (Hosseini *et al.*, 2008)、取食量、环境温度和引物目标产物长度 (von Berg *et al.*, 2008) 等, 归根结底影响引物检测结果的因素就是影响害虫 DNA 在天敌消化道内降解的因子。因此, 出于实际应用而设计特异引物, 需要根据试验目的来考虑目标产物的长短, 有必要确定设计出来的引物在特定天敌体内被检出率与消化时间的关系, 还需要阐明温度和取食量对阳性率的影响。

由于线粒体细胞色素氧化酶 I (cytochrome oxidase I, CO I) 基因在物种间的差异性, 它被建议作为鉴定所有动物的通用工具 (Barcodes of life) (Hebert *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2007; Ratnasingham and Hebert, 2007)。CO I 在细胞内是多拷贝的, 总量多, 它在作为目标基因被特异引物扩增时具有高敏感性 (de León *et al.*, 2006) 和捕食关系容易被检测等优点 (Agustí *et al.*, 2003)。

褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål) 是为害水稻最严重的害虫之一, 对水稻生产造成巨大的经济损失 (Dyck and Thomas, 1979)。以前主要是通过室内捕食功能反应来评估天敌对褐飞虱的捕食能力。对于田间天敌对飞虱的捕食检测方法, 先后有血清检验法 (周汉辉, 1986b), 酶联免疫吸附试验法 (ELISA) (张古忍等, 1996, 1997; Lim and Lee, 1999; 刘雨芳等, 2002), 单克隆抗体法 (庞保平和程家安, 2000; Zhao *et al.*, 2004; 赵伟春等, 2005)。这些方法分别逐步提高了评估天敌捕食飞虱的准确性和效率性, 但也存在不足 (庞保平和程家安, 2000; Symondson, 2002; Harwood and Obrycki, 2005; Sheppard and Harwood, 2005)。

本研究以褐飞虱为目标害虫, 设计了以 CO I 为目标基因的特异性引物并对其特异性进行验证; 为了应用该特异引物研究田间天敌对褐飞虱的捕食

作用, 以稻田主要捕食性天敌拟环纹豹蛛 *Pardosa pseudoannulata* (Bösenberg *et Strand*) (Chiu, 1979) 为研究对象, 评价了特异引物检测天敌捕食害虫的阳性反应率与消化时间、温度、取食量和天敌性别等 4 个因素的关系。

1 材料与方法

1.1 试虫

褐飞虱初始虫源来自福建农林大学植物病毒研究所的饲养种群。接入种有 7 日龄水稻苗 (水稻品种为金优 9 号, 由福建农林大学作物学院提供) 的圆柱形透明塑料瓶 (直径 17 cm, 高 25 cm) 里, 瓶口用医用纱布封住, 置于人工气候箱 (温度 $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$; 相对湿度 85%; 光周期 14L:10D)。一般 25 d 之后水稻苗出现枯死, 将褐飞虱转移至有新稻苗的塑料瓶中。连续饲养褐飞虱待用。

2009 年 3 月下旬于福州稻作区扣捕拟环纹豹蛛雌成蛛, 其中部分已带卵囊。2 龄蛛从卵囊孵出后单头饲养于圆柱形透明塑料瓶内 (直径 8 cm, 高 11 cm), 瓶底放置湿棉花用于保湿和给水。5 龄前喂以果蝇 (用各种时令水果诱集) 作为食物, 根据蜘蛛龄期确定喂食量; 5 龄后喂以家蝇 *Musca domestica* L. (实验室人工饲养种群)。蜘蛛被饲养至成蛛用于试验为止。养虫室的温度为 $25 \sim 28^\circ\text{C}$, 相对湿度为 75% ~ 90%, 光周期为 14L:10D。

供引物的特异性验证试验的 66 种田间常见节肢动物系采用捕虫网、手捕和吸虫器法从武夷山稻田中采集。田间采集的试虫可能会被褐飞虱污染, 而在后续试验中产生假阳性 (Harwood, 2008)。因此植食性昆虫被双蒸水淋洗后于 -20°C 保存, 各种天敌单头放置在试管内, 饥饿 3 ~ 8 d 后双蒸水淋洗, -20°C 保存。

1.2 试虫 DNA 的提取

试虫 DNA 的提取方法参考安瑞生等 (2002) 的方法。取单头虫用去离子水漂洗后放入 1.5 mL 离心管; 加入提取液 A [50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 25 mmol/L NaCl, 25 mmol/L EDTA (pH 8.0), 1% SDS] 20 ~ 200 μL (根据试虫大小确定用量, 以浸没试虫为标准), 用一次性研磨杵将其研磨至匀浆; 用 80 ~ 100 μL 提取液 A 冲洗研磨杵, 收集研磨液至离心管, 至此离心管里有 100 ~ 300 μL 研磨液。将离心管 65°C 水浴 45 min, 其间取出混匀两次。加入等体积提取液 B (3 mol/L KAC, pH

7.2), 置冰上 1 h。12 000 rpm 离心 10 min, 取上清液。加入等体积饱和酚混匀, 12 000 rpm 离心 10 min。取上清液, 加入 2 倍体积预冷无水乙醇, 置于 -20°C 1 h。12 000 rpm 离心 10 min 后弃上清, 用 70% 乙醇洗涤沉淀。所得 DNA 沉淀置于超净台上晾干, 每管用 70 μL TE (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 溶解后保存于 -20°C 冰箱备用。

1.3 PCR 和电泳

PCR 反应体系 20 μL : 0.2 μL Taq DNA 聚合酶, 2 μL 10 \times buffer (Mg²⁺ Plus), 2 μL dNTP_s (0.25 mmol/L) [以上 3 种药品使用 TaKaRa (大连) 的产品], 1 μL 模板 DNA, 0.4 μL 引物 (10 $\mu\text{mol/L}$), 14 μL 无菌双蒸水。PCR 反应的条件为 94°C 预变性 2 min; 然后 94°C 变性 30 s, 53°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 进行 35 个循环; 之后 72°C 延伸 10 min; 最后降温至 4°C 。对照的反应体系中模板 DNA 由无菌双蒸水替代。PCR 在 Eppendorf Mastercycler gradient 上进行。

使用琼脂糖凝胶电泳分离扩增产物, 琼脂糖浓度为 0.5% (通用引物的 PCR 产物电泳) 或 1.5% (特异引物的 PCR 产物电泳), 使用 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 溴化乙锭染色。电泳缓冲液为 0.5 \times TBE (90 mmol/L Tris-borate, 2 mmol/L EDTA), 电泳时间为 45 min, 电泳电压为 7 V/cm。结果在凝胶成像系统中观察拍照分析。

1.4 测序、比对和引物设计

通用引物 C1-J-1718 和 C1-J-1859 与 TL2-N-3014 (Simon *et al.*, 1994) 组成的 2 对引物进行 PCR, 扩增线粒体的 COI 片段, 分别得到褐飞虱 (C1-J-1718/TL2-N-3014)、灰飞虱 *Laodelphax striatellus* (Fallén) (C1-J-1718/TL2-N-3014)、白背飞虱 *Sogatella furcifera* (Horvath) (C1-J-1859/TL2-N-3014) 和黑尾叶蝉 *Nephotettix bipunctatus* (Fabricius) (C1-J-1859/TL2-N-3014) 的 PCR 产物, 送到生工生物工程(上海)有限公司进行双向测序。

使用 Clustal X 比对 4 条测序结果, 找出褐飞虱 3' 端的特异位点, 尽量把目标产物的长度控制在 300 bp 以内 (King *et al.*, 2008), 借助 Primer Premier 5 综合考虑引物的长度、GC 含量和 Tm 值 (Dieffenbach and Dveksler, 1998; Erlandson and Garipey, 2005), 设计褐飞虱的特异性引物, 由生工生物工程(上海)有限公司代为合成。

1.5 褐飞虱特异引物的特异性验证

按照上述方法提取田间常见节肢动物的 DNA。根据试虫体型大小, 2 mm 以下的种类取数头, 2~5 mm 的种类取 1 头, 5 mm 以上的种类取部分组织用于其 DNA 的提取。采用上述 PCR 体系, 使用提取的节肢动物 DNA 作为模板和 COI 的通用引物进行 PCR, 以确定试虫 DNA 可以成功进行 PCR, 以避免在使用褐飞虱特异引物的 PCR 中出现假阴性。

得到确认的节肢动物 DNA 模板和褐飞虱特异引物进行 PCR。采用上述 PCR 反应条件, 但退火温度设置为 62°C 。阴性对照的反应体系中 DNA 模板用灭菌双蒸水代替; 阳性对照的反应体系中的模板是褐飞虱 DNA。

1.6 褐飞虱喂食拟环纹豹蛛

为了评价消化时间、温度、取食量和蜘蛛性别等 4 个因素对褐飞虱特异引物检测拟环纹豹蛛捕食褐飞虱的阳性反应的影响, 随机选取个体大小一致的拟环纹豹蛛雌蛛 (体重 79.10 ± 2.62 mg) 和雄蛛 (体重 44.56 ± 1.50 mg) 共 760 头。蜘蛛被喂食 1 头家蝇后, 接着饥饿 48 h, 然后分别投喂 1 头或 4 头实验室饲养的褐飞虱雌成虫。蜘蛛取食完 1 头或 4 头飞虱后, 分别置于数个人工气候箱 (14L: 10D) 中, 温度设置为 15°C , 25°C 和 35°C 3 个梯度。逐次于 0, 6, 12, 24, 48, 96 和 192 h 处理后, 每种取食量 (1 或 4 头) 分别取出雌蛛和雄蛛各 10 头保存于 -80°C 。试验过程中自然死亡 66 头, 最后得到 694 头蜘蛛用于下一步的试验。接下来按照上述 1.2 的方法, 单头提取这 694 头蜘蛛的 DNA。使用设计的褐飞虱特异引物对得到的 DNA 模板分别进行 PCR、电泳、拍照和记录结果。

1.7 数据统计与分析

为了评价消化时间、温度、取食量和豹蛛性别等 4 个因素对拟环纹豹蛛捕食褐飞虱检测阳性反应的影响, 将检测结果 (阳性或者阴性) 作为因变量, 试验设置的温度 (15°C , 25°C 和 35°C)、时间 (0, 6, 12, 24, 48, 96 和 192 h)、取食量 (1 和 4 头) 和豹蛛性别 (雌蛛和雄蛛) 作为自变量, 运用二项 logistic 回归分析:

$$\pi = \frac{1}{1 + e^{-(b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_kx_k)}}$$

式中: π 表示阳性的发生概率; x 为被评价因素, 其系数 b_1, b_2, \dots, b_k 的显著性采用 Wald 检验。运用 T 测验比较 3 个温度之间捕食阳性反应率的差异。

在温度和取食量相同的情况下, 消化时间和捕

食阳性反应率的关系使用指数函数拟合, 回归系数的假设性检验采用方差分析(ANOVA)。为了估计该引物分别在 3 个温度条件下的检测效率, 利用拟合的方程求出 50% 阳性反应率对应的时间 (T_{50} , detectability half-life) 作为评价引物的检出效率 (Greenstone and Hunt, 1993) 的指标。

2 结果与分析

2.1 褐飞虱特异引物的设计

得到 4 条核酸序列, GenBank 登录号分别为: 褐飞虱 JN391181, 灰飞虱 JN391182, 白背飞虱 JN391183, 黑尾叶蝉 JN391184。比对 4 条测序结果, 根据找到的 7 处褐飞虱 3 端的特异位点, 4 对拟设计的褐飞虱特异引物见表 1。所有引物的 PCR 反应退火温度设置为 62℃。4 对引物均可从褐飞虱的 DNA 模板中有效地扩增出目标片段, 如图 1 和图 2 中的泳道 1, 图 3 的泳道 11~13 以及图 4 和 5 所示。

表 1 在线粒体 CO I 上设计的褐飞虱特异引物

Table 1 Potential species-specific primers of *Nilaparvata lugens* designed from CO I and the size of amplified fragments

| 引物名称 Primer name | 引物序列(5'-3') Primer sequence | 产物长度(bp) Fragment size |
|---------------------|--------------------------------|---------------------------|
| Lug-F1a | CATCCCATTCCGGACCATCT | 209 |
| Lug-R1 | TGCTCCAGCTAGAACAGGAAGG | |
| Lug-F1b | CGCAGGGTTAGATCAATTATAGGT | 160 |
| Lug-R1 | TGCTCCAGCTAGAACAGGAAGG | |
| Lug-F2 | GGTATAGATAATTGATACCCGAGCC | 294 |
| Lug-R2 | AAATCTAGCCATAATGCTGAATACT | |
| Lug-F3 | GGCTCATTTTCACTATGTCCTTTCC | 367 |
| Lug-R3 | TATTTTTCATTCAATTGATGAGGTTG | |

2.2 褐飞虱特异引物的特异性验证

提取稻田常见的 66 种节肢动物(隶属于 2 纲, 10 目, 37 科)的 DNA。为避免反应结果为假阴性, 使用 CO I 的通用引物 PCR, 确定每种的 DNA 模板皆可以成功进行 PCR。通过对 66 种节肢动物的验证, 发现 Lug-F1b/Lug-R1 和 Lug-F2/Lug-R2 除了褐飞虱以外, 还分别可以从数种其他节肢动物的 DNA 模板中扩增出与目标片段相同长度的产物[图 1 (A)和(B)], 说明这两对引物对褐飞虱不具有特异性。Lug-F3/Lug-R3 不能从褐飞虱 DNA 以外的所有 66 种节肢动物 DNA 中扩增出目标片段(图 2), 说明它在试验涉及的物种范围内具有对褐飞虱

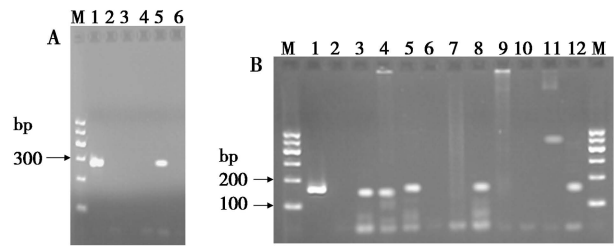


图 1 引物 Lug-F2/Lug-R2 (A) 和 Lug-F1b/Lug-R1 (B) 的特异性验证 PCR 产物电泳图

Fig. 1 PCR amplification of some species in paddy fields using primer Lug-F2/Lug-R2 (A) or Lug-F1b/Lug-R1 (B)

1: 褐飞虱 *Nilaparvata lugens*; 2: 阴性对照 Negative control; 3: 黑头菱稻虱 *Oliarus apicalis*; 4: 大白叶蝉 *Tettigoniella spectra*; 5: 稻斑叶蝉 *Deltocephalus oryzae*; 6: 二化螟 *Chilo suppressalis*; 7: 灰飞虱 *Laodelphax striatellus*; 8: 东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis*; 9: 稻红瓢虫 *Verania discolor*; 10: 微菱头蛛 *Bianor aurocinctus*; 11: 蚊科待种 *Culicidae sp.*; 12: 稗飞虱 *Sogatella panicicola*; M: DNA marker I. 图 2 和 4 同 The same for Figs. 2 and 4.

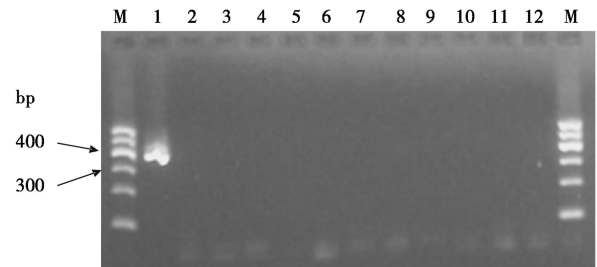


图 2 引物 Lug-F3/Lug-R3 特异性验证的 PCR 产物电泳图
Fig. 2 PCR amplification of some species in paddy fields using primer Lug-F3/Lug-R3

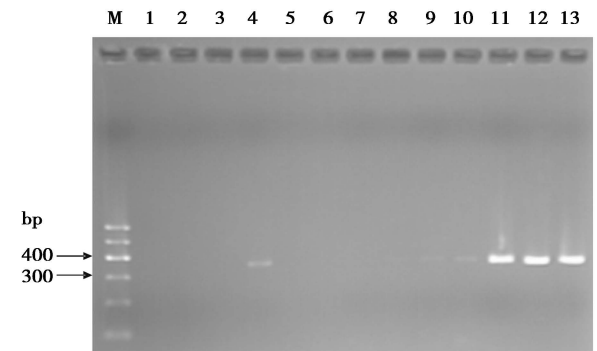


图 3 引物 Lug-F3/Lug-R3 检测取食褐飞虱的拟环纹豹蛛 PCR 产物电泳图

Fig. 3 Detection of *Nilaparvata lugens* in the gut of *Pardosa pseudoannulata* by using primers Lug-F3/Lug-R3

1: 阴性对照 Negative control; 2-5: 取食 4 头飞虱 0 h 的豹蛛 *P. pseudoannulata* fed on four *N. lugens* individuals for 0 h; 6-10: 取食 4 头飞虱 6 h 的豹蛛 *P. pseudoannulata* fed on four *N. lugens* individuals for 6 h; 11: 1 头褐飞虱的 DNA DNA extracted from one single *N. lugens*; 12: 2 头褐飞虱的 DNA DNA extracted from two *N. lugens* individuals; 13: 4 头褐飞虱的 DNA DNA extracted from four *N. lugens* individuals; M: DNA Marker I.

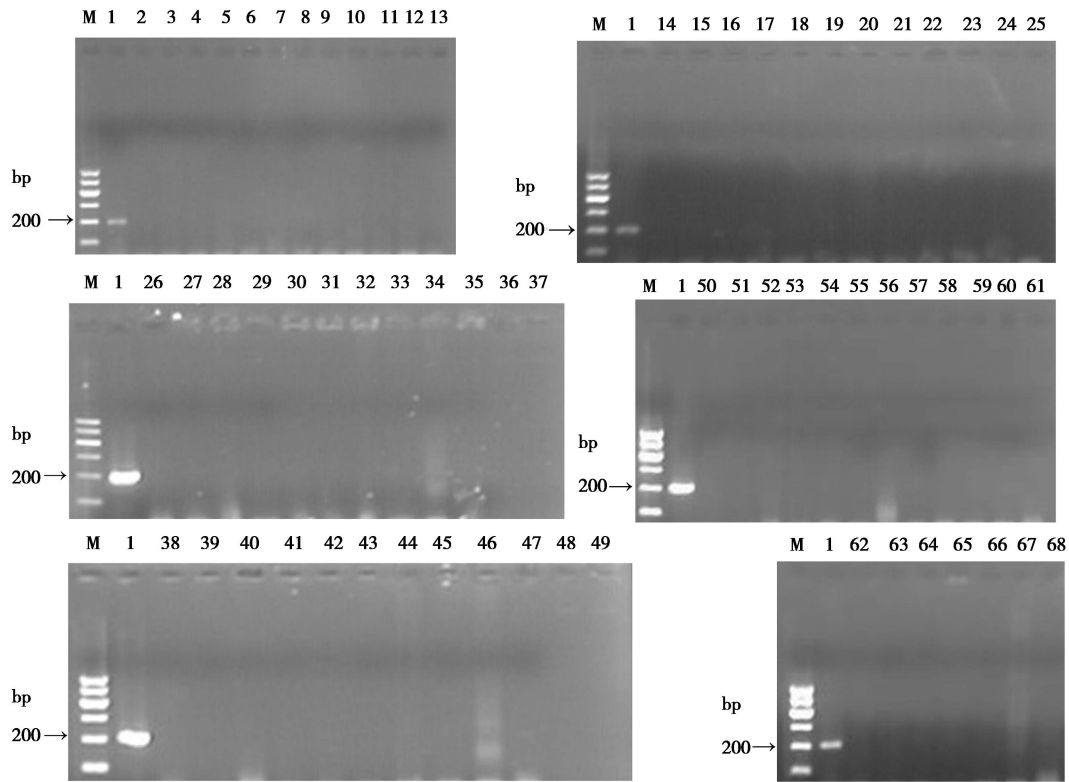


图 4 引物 Lug-F1a/Lug-R1 特异性验证的 PCR 产物电泳图

Fig. 4 PCR amplification of some species in paddy fields using primers Lug-F1a/Lug-R1

13: 稻蛛缘蝽 *Leptocoris acuta*; 14: 稻棘缘蝽 *Cletus punctiger*; 15: 缘蝽科待定种 *Coreidae* sp.; 16: 中华象蜡蝉 *Dictyophara sinica*; 17: 小长蝽 *Nysius ericae*; 18: 细毛蝽 *Dolycoris baccarum*; 19: 黄肩绿蝽 *Nezara biridula formatorquata*; 20: 直纹稻苞虫 *Parnara guttata*; 21: 稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis*; 22: 螫蜂黄分盾细蜂 *Ceraphronid* sp.; 23: 稻纵卷叶螟大斑黄小蜂 *Stenomiesius* sp.; 24: 日本弓背蚊 *Camponotus japonicus*; 25: 姬蜂科待定种 1 *Ichneumonidae* sp. 1; 26: 姬蜂科待定种 2 *Ichneumonidae* sp. 2; 27: 水稻负泥虫 *Oulema oryzae*; 28: 象甲科待定种 1 *Curculionidae* sp. 1; 29: 象甲科待定种 2 *Curculionidae* sp. 2; 30: 双翅目待定种 1 *Diptera* sp. 1; 31: 双翅目待定种 2 *Diptera* sp. 2; 32: 摇蚊科待定种 *Chironomidae* sp.; 33: 微小沼摇蚊 *Limnophyes minimus*; 34: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*; 35: 果蝇科待定种 *Drosophilidae* sp.; 36: 水蝇科待定种 *Ephydriidae* sp.; 37: 家蝇 *Musca domestica*; 38: 稻芒蝇 *Atherigona oryzae*; 39: 虻科待定种 *Tabanidae* sp.; 40: 粉白飞虱 *Nisia atrovonosa*; 41: 白背飞虱 *Sogatella furcifera*; 42: 麦长管蚜 *Macrosiphum granarium*; 43: 二点叶蝉 *Cicadula fasciifrons*; 44: 黑尾叶蝉 *Nephotettix bipunctatus*; 45: 稻蓟马 *Chloethrips oryzae*; 46: 日本蚱 *Tetrix japonica*; 47: 武夷山拟台蚱 *Formosatettixoides humanensis*; 48: 蟋蟀科待定种 *Gryllidae* sp.; 49: 等节跳虫 *Isotoma monochaeta*; 50: 长跳属待定种 *Entomobrya* sp.; 51: 圆跳虫科待定种 *Sminthuridae* sp.; 52: 黄褐新园蛛 *Neoscona doenitzi*; 53: 角园蛛 *Araneus cornutus*; 54: 茶色新园蛛 *Neoscona theisi*; 55: 园蛛科待定种 1 *Araneidae* sp. 1; 56: 园蛛科待定种 2 *Araneidae* sp. 2; 57: 长腹蝇狮 *Marpissa elongata*; 58: 蝇虎属待定种 *Menemerus* sp.; 59: 卡氏金蝉 *Phintella cavalieriei*; 60: 跳蛛科待定种 *Salticidae* sp.; 61: 四斑锯螯蛛 *Dyschiriognatha quabrimaculata*; 62: 前齿肖蛸 *Tetragnatha praedonia*; 63: 夹尾肖蛸 *Tetragnatha caudicula*; 64: 八斑球腹蛛 *Theridion octomaculatum*; 65: 食虫瘤胸蛛 *Oedothorax insecticeps*; 66: 拟环纹豹蛛 *Pardosa pseudoannulata*; 67: 环豹蛛 *Pardosa armillata*; 68: 拟水狼蛛 *Pirata subparaticus*.

的特异性,但在后来的试验中发现,它不能有效地从取食了褐飞虱的拟环纹豹蛛的 DNA 中扩增出目标片段(图 3)。只有 Lug-F1a/Lug-R1 既具有对褐飞虱的特异性(图 4),又能有效地检测出拟环纹豹蛛对褐飞虱的捕食(图 5),因此 Lug-F1a/Lug-R1 最终被选定为本试验的褐飞虱特异引物。

2.3 引物阳性反应与消化时间、温度、取食量和蜘蛛性别的关系

使用特异性引物对取食了褐飞虱的拟环纹豹蛛

进行检测,将阳性反应与消化时间、温度、取食量和蜘蛛性别的关系进行二项 logistic 回归分析,结果表明,阳性反应分别受到消化时间、温度和取食量的显著影响(表 2),但不受拟环纹豹蛛性别的影响。

不同温度之间检测阳性率的 *T* 检验比较见表 3,结果显示 15℃ 与 25℃ 之间没有显著差异,35℃ 分别与 15℃ 和 25℃ 差异显著。

由于雌雄豹蛛之间检出率没有差异,将雌雄蛛

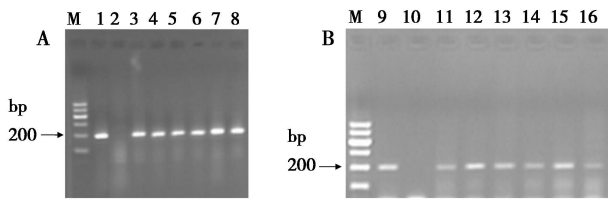


图5 特异引物 Lug-F1a/Lug-R1 扩增各龄褐飞虱的 PCR 产物(A)和检测取食了褐飞虱的拟环纹豹蛛的 PCR 产物(B)的电泳图

Fig. 5 PCR amplification of *Nilaparvata lugens* using primers Lug-F1a/Lug-R1 (A) and detection of *N. lugens* in the gut of *Pardosa pseudoannulata* by using primers Lug-F1a/Lug-R1 (B) 1: 褐飞虱雌成虫 Female adult *N. lugens*; 2, 10: 阴性对照 Negative control; 3: 褐飞虱雄成虫 Male adult *N. lugens*; 4: 1 龄褐飞虱若虫 1st instar nymph of *N. lugens*; 5: 2 龄褐飞虱若虫 2nd instar nymph of *N. lugens*; 6: 3 龄褐飞虱若虫 3rd instar nymph of *N. lugens*; 7: 4 龄褐飞虱若虫 4th instar nymph of *N. lugens*; 8: 5 龄褐飞虱若虫 5th instar nymph of *N. lugens*; 9: 阳性对照 Positive control; 11, 12: 取食了 4 头褐飞虱 6 h 的雌蛛 Female *P. pseudoannulata* fed on four *N. lugens* individuals for 6 h; 13, 14: 取食了 2 头褐飞虱 6 h 的雌蛛 Female *P. pseudoannulata* fed on two *N. lugens* individuals for 6 h; 15, 16: 取食了 1 头褐飞虱 6 h 的雌蛛 Female *P. pseudoannulata* fed on one *N. lugens* individual for 6 h; M: DNA Marker I.

的数据合在一起求平均值后拟合阳性反应率和消化时间的回归关系,运用指数方程得到了很好的拟合(图6)。从图中可以看出,随着时间的推移,阳性反应率不断下降。阳性反应率为 50% 时对应的时间(h)被叫作检出中时间(T_{50}),其用于评估引物的检测时长。15℃ 时,取食 1 头和 4 头飞虱的豹蛛的检出中时间 T_{50} 分别为 30.17 和 33.87 h; 25℃ 时,取食 1 头和 4 头飞虱的豹蛛的检出中时间 T_{50} 分别为 28.20 和 33.63 h; 35℃ 时,取食 1 头和 4 头飞虱的豹蛛的检出中时间 T_{50} 分别为 4.71 和 22.32 h。

表2 消化时间、温度、取食量和蜘蛛性别对拟环纹豹蛛捕食褐飞虱检测阳性反应的影响($n = 774$)

Table 2 Logistic regression for the effect of digestion time, temperature, feeding amount and sex on positive amplification rate in DNA detection of *Nilaparvata lugens* fed by *Pardosa pseudoannulata* ($n = 774$)

| 因素 Factors | Wald χ^2 | P |
|---------------------|---------------|--------|
| 消化时间 Digestion time | 142.960 | <0.001 |
| 温度 Temperature | 15.850 | <0.001 |
| 取食量 Feeding amount | 12.353 | <0.001 |
| 蜘蛛性别 Sex | 0.034 | ns |

ns: 不显著 Not significant. 表3 同 The same for Table 3.

表3 不同温度之间拟环纹豹蛛捕食褐飞虱检测阳性反应率的比较(T 测验, $n = 56$)

Table 3 Comparison of positive amplification rate in DNA detection of *Nilaparvata lugens* fed by *Pardosa pseudoannulata* at three different temperatures (T-test, $n = 56$)

| Temperature | 阳性率平均值差值(%) Average difference value of positive rate | P |
|-------------|--|--------|
| 15℃ vs. 25℃ | 2.76 ± 0.10 | ns |
| 15℃ vs. 35℃ | 13.30 ± 0.15 | <0.001 |
| 25℃ vs. 35℃ | 10.54 ± 0.15 | 0.001 |

3 讨论

3.1 特异引物的设计和验证

比较 Lug-F1a/R1 与 Lug-F3/R3 两对引物,后者与前者具有较长的目标 PCR 产物(表1, 367 bp)。在相同的时间内较短的目标产物比较长的目标产物更容易被检测到(von Berg *et al.*, 2008)。正如取食 0 h 后,特异引物 HcF6/R9 (166 bp) 比 HcF5/R7 (302 bp) 更容易检测到草蛉对 *Homalodisca coagulate* 的取食,后者甚至不能检测甲虫对 *H. coagulate* 的取食(de León *et al.*, 2006)。较长的核酸片段在天敌消化道内更容易被降解成更短的片段。Agustí 等(1999)设计出棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 的特异引物 H1-F/H1-R (1 100 bp),却不能检测到 *Dicyphus tamaninii* 对棉铃虫的取食,而目标产物较短的引物 H1-F/H3-R (254 bp) 却可以在 4 h 之后全部成功检测。因此认为 Lug-F3/R3 不能有效地检测出拟环纹豹蛛对褐飞虱的取食是因为目标核酸片段较长且很快被降解了。King 等(2008)在总结前人研究的基础上建议,为了有效地扩增出目标核酸片段,特异引物的目标产物最好是小于 300 bp。但是目标产物长度超过 300 bp 的引物有时候也可以有效地检测出天敌对害虫的取食,比如 ClaCOII F1/ClaCOII R3 (339 bp) 检测瓢虫 *Hippodamia convergens* 和草蛉 *Chrysoperla plorabunda* 对玉米蚜 *Rhopalosiphum maidis* 的捕食(Chen *et al.*, 2000)。

拟环纹豹蛛是广食性天敌,因此在对引物特异性验证的试验中,对褐飞虱以外的物种检测得越多越好。对于引物特异性验证的物种数的问题,包括文献报道过的目标天敌的猎物和其他大类群中的代表种(King *et al.*, 2008)。由于寄生性天敌会被捕

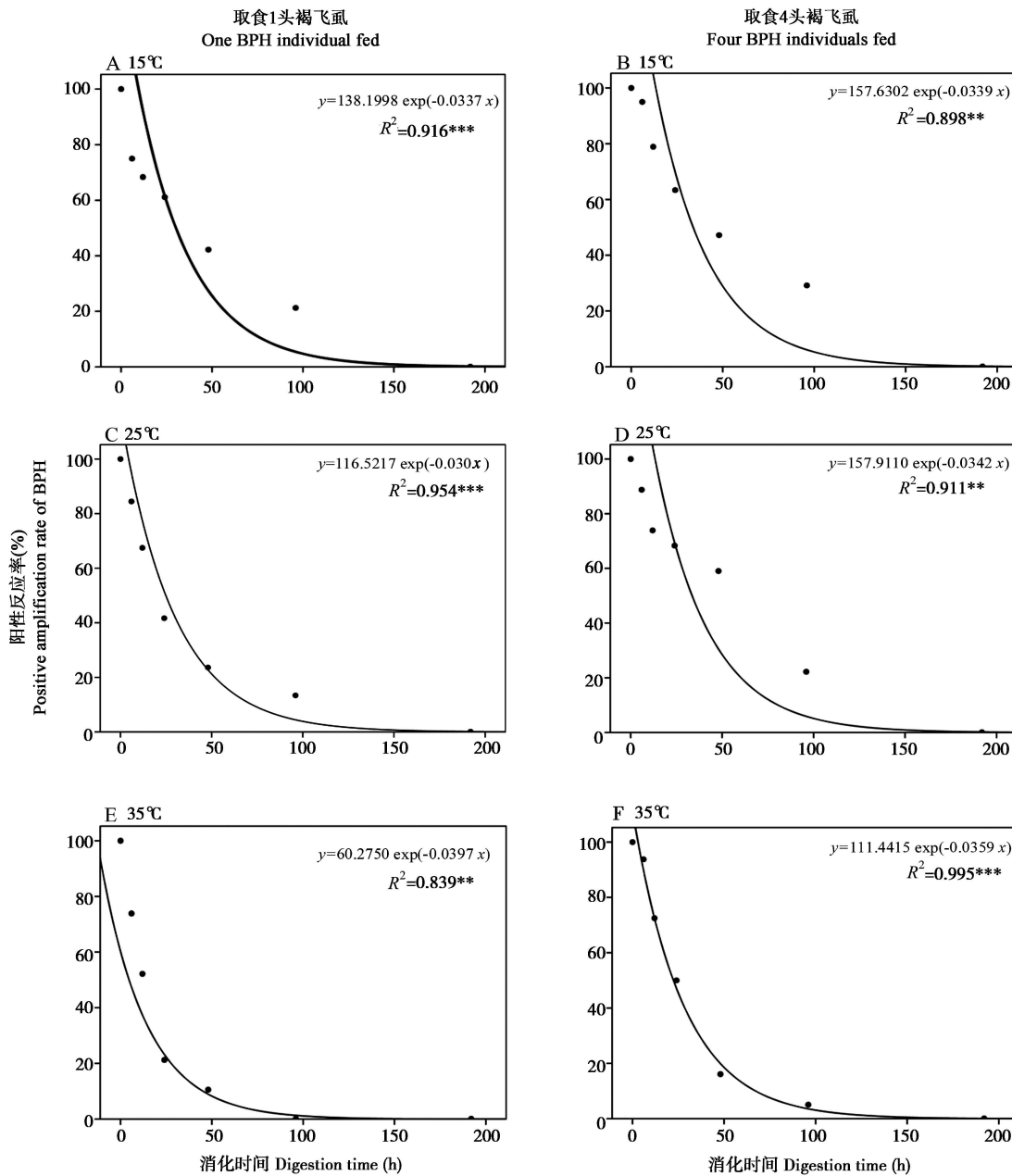


图 6 利用特异性引物检测拟环纹豹蛛对褐飞虱捕食的阳性反应率与消化时间的关系

Fig. 6 Fitted lines of digestion time to positive amplification rate in DNA detection of *Nilaparvata lugens* fed by *Pardosa pseudoannulata* at three different temperatures $n = 7$; $*** P \leq 0.001$, $** P \leq 0.01$, $* P \leq 0.05$ (ANOVA).

食性天敌在取食害虫的时候一起吞进消化道，作者认为寄生性天敌也应该考虑在引物特异性验证的物种范围内。本试验中稻纵卷叶螟大斑黄小蜂 *Stenomesus* sp.、螯蜂黄分盾细蜂 *Ceraphronid* sp. 和 2 种姬蜂被用于验证褐飞虱引物的特异性，除了它们在试验田种群量大以外，还因为其可能进入到天敌的消化道内产生假阳性。

3.2 取食时间的影响

评估 4 个因素对褐飞虱特异引物的影响是为了

更好地解释田间的结果。其中，时间最关键。PCR 检测基于天敌消化道内的猎物核酸片段的存 在与否和量的大小。核酸片段必然是随着天敌对猎物消化的进行而降解或者被排泄到体外。因此，知道引物的检测时限就可以推测出猎物在田间被捕食的时间范围。以往的研究都显示，随着消化时间的进行引物检测阳性率不断下降，有的呈线性关系 (Sheppard *et al.*, 2005)，有的呈二次函数关系 (Hoogendoorn and Heimpel, 2001)，有的呈逻辑斯

蒂曲线 (Hosseini *et al.*, 2008), 有的阳性率的对数与消化时间呈线性关系 (Harper *et al.*, 2006)。有些引物被设计出来后没有拟合检出率-时间的函数 (Ma *et al.*, 2005; Juen and Traugott, 2005, 2007; de León *et al.*, 2006; Fournier *et al.*, 2008), 总之两者呈负相关。褐飞虱的 DNA 在蜘蛛体内不断被降解, 试验中使用指数函数很好地拟合了阳性率与时间的关系 (图 6), 说明检测具有时限性。算出检出中时间 T_{50} 用以衡量褐飞虱引物的检出时限, 多种条件下我们的检出中时间为 30 h 左右, 除了在 35°C 情况下偏短。拟环纹豹蛛对飞虱的捕食行为在 30 h 以内可以被检测到, 换句话说我们可以得知被检豹蛛在 30 h 以内是否有捕食过褐飞虱。

检测两种天敌对蚜虫的捕食, 3 对引物的检出中时间从 2.56 ~ 8.78 h 不等 (Chen *et al.*, 2000)。用小菜蛾的引物检测两种天敌对它的捕食, 狼蛛 *Lycos sp.* 的检测中时间为 95.9 h, 而螯 *Nabis kinbergii* 只有 17.5 h (Ma *et al.*, 2005)。进行捕食动态如某种天敌在 24 h 内对害虫的捕食节律的研究时, 检出时限太长可能高估捕食频率, 太低又可能低估捕食频率 (McMillan *et al.*, 2007)。用于建立食物网关系的时候或者用于确定某种害虫的天敌种类的时候, 检测的时间可以长一些, 以免漏掉一些对目标害虫取食较少的天敌。因此需要根据具体的试验目的来考虑。

3.3 关于环境温度

环境温度会影响到检测阳性率。特异引物分别在 12°C, 16°C 和 20°C 检测步甲 *Pterostichus melanarius* 取食麦长管蚜 *Sitobion avenae*, 结果显示, 在相同时间内检出率与温度呈负相关, 最高温度 20°C 的检出率最低 (von Berg *et al.*, 2008)。多异瓢虫 *Hippodamia variegata* 取食小菜蛾 *Plutella xylostella* 的检测受到温度的显著影响 (Hosseini *et al.*, 2008)。但阳性反应率受温度影响并不是绝对的, 如步甲 *Nebria brevicollis* 取食 *S. avenae* 的检出率在 12°C 与 16°C 之间没有差异 (von Berg *et al.*, 2008)。引物 BcoaCO II F1/BcoaCO II R1 检测二星瓢虫 *Adalia bipunctata* 对禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi* 的捕食并不受温度 (14°C 和 21°C) 的影响 (McMillan *et al.*, 2007)。温度对狼蛛 *Venator spenceri* 取食小菜蛾 *P. xylostella* 的检测不受温度的影响 (Hosseini *et al.*, 2008)。在本试验中拟环纹豹蛛取食褐飞虱的捕食检测受到了温度的影响, 但不是各个温度梯度间的差异都显著, 仅 35°C 分别与

25°C 和 15°C 之间有差异。说明温度对引物的阳性反应率确有影响但不会非常明显, 在同一片自然生境, 相同时间内小区之间的自然温度差异一般不会很大, 因此在应用特异引物研究田间捕食情况时可以根据实际情况不考虑环境温度的因素, 从而排除温度作为影响因素 (Sheppard and Harwood, 2005) 的影响。

3.4 关于取食量

关于取食量是否会影响到阳性检测率的问题, 多数报道称取食量不会影响到 PCR 检测的阳性反应率 (Zaidi *et al.*, 1999; Hoogendoorn and Heimpel, 2001; Juen and Traugott, 2005)。这 3 个试验里面, 天敌都分别对猎物任意取食, 然后区别不同取食量的阳性反应率, 由于天敌个体间的差异必定导致取食猎物的数目不同, 而以记录的被取食的猎物作为变量分析, 其实并未真正设置出处理个体的不同取食量水平。对于同是以检测天敌消化道内残体为基础的捕食检测方法 ELISA 法被用于检测捕食关系时, 阳性率是否受到取食量的影响存在争议, 有些试验结果显示取食量会受到显著影响 (Hagler and Narajo, 1997; 庞保平等, 2000)。本试验中取食 1 头与 4 头褐飞虱的拟环纹豹蛛的阳性反应率有显著差异, 说明取食量对检出率有影响, 在相同消化时间段内取食 4 头飞虱的豹蛛更容易被检测出来。

3.5 关于天敌性别

天敌性别对 PCR 检测的阳性反应率没有影响。试验中, 雌雄拟环纹豹蛛分别取食 1 头或者 4 头褐飞虱, 分析特异引物的检测结果发现阳性反应率并未受到豹蛛性别的影响, 结论与大多数研究类似。雌雄瓢虫 *Coleomegilla maculata* 对欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis* 的阳性反应率没有差异 (Hoogendoorn and Heimpel, 2001)。雌雄多异瓢虫 *H. variegata* 取食小菜蛾的检出率没有差异 (Hosseini *et al.*, 2008)。步甲 *P. melanarius* 对麦长管蚜 *S. avenae* 的捕食检测不受性别的影响 (Sheppard *et al.*, 2005)。本试验中的结论说明不同的豹蛛性别并不会导致褐飞虱 DNA 的不同检出率, 在实际应用该特异引物时不必考虑性别会带来差异。

3.6 褐飞虱捕食检测的发展

以往关于稻田害虫的捕食检测研究方法血清学法 (周汉辉和汤鉴球, 1982; 周汉辉, 1986a, 1986b, 1989; 张古忍等, 1996, 1997) 可以说明田间是否发生过捕食行为, 但并未指出检测会受到哪

些环境因素的影响,因而在实际应用时对田间数据的解释存在困难。之后的方法研究更进一步,开始关注环境因素对捕食检测的影响。如 ELISA 方法可以检测到拟水狼蛛 *Pirata subpiraticus* 对褐飞虱的捕食,在 27℃ 的环境中取食 3 头褐飞虱后抗体的最长检测时间为 6 h (Lim and Lee, 1999)。庞保平等 (2000) 利用单克隆抗体研究白背飞虱在拟环纹豹蛛体内的可测时间与温度和捕食量的关系,结果显示猎物在捕食者体内随时间呈指数下降,随着温度的上升可测定时间不断缩短,取食量对猎物的可测定时间有显著的影响。Zhao 等 (2004) 设计了褐飞虱的单克隆抗体,并指出利用抗体在 25℃ 的环境中可以在 2.13 d 以内检测到拟环纹豹蛛取食的 1 头褐飞虱。虽然单克隆抗体作为检测天敌捕食褐飞虱的工具具有可行性和优点 (庞保平等, 2000; Zhao *et al.*, 2004), 但是特异引物 PCR 作为检测天敌捕食褐飞虱的工具具有许多优势,如试验费用低,试验操作简单,可实现 1 头天敌捕食多种猎物的同时检测,通量大,方便快捷等。

3.7 总结

本试验得到 1 对特异引物 (Lug-F1a/Lug-R1) 作为天敌对褐飞虱捕食的检测工具。研究了消化时间、取食量、环境温度和天敌性别等 4 个因素对应用该引物的影响。本试验的结果力图使能够在田间应用该对引物,通过试验的设计,试验目的的控制,从而进行稻田生态系统中拟环纹豹蛛与褐飞虱的捕食关系研究。

致谢 本研究在农业部亚热带农业生物灾害与治理重点开放实验室、福建省昆虫生态重点实验室、福建省高等学校农业生物多样性与生态安全重点实验室完成。

参 考 文 献 (References)

- Agustí N, de Vicente M C, Gabarra R, 1999. Development of sequence amplified characterized region (SCAR) markers of *Helicoverpa armigera*; a new PCR-based technique for predator gut analysis. *Molecular Ecology*, 8: 1467–1474.
- Agustí N, Shayler SP, Harwood JD, Vaughan IP, Sunderland KD, Symondson WOC, 2003. Collembola as alternative prey sustaining spiders in arable ecosystems: prey detection within predators using molecular markers. *Molecular Ecology*, 12: 3467–3475.
- An RS, Tan SJ, Chen XF, 2002. Improvement in grinding tissue during extracting DNA from small insects. *Entomological Knowledge*, 39 (4): 311–312. [安瑞生, 谭声江, 陈晓峰, 2002. 小型昆虫 DNA 提取时匀浆方法的改进. 昆虫知识, 39(4): 311–312]
- Chen Y, Giles kL, Payton ME, Greenstone MH, 2000. Identifying key cereal aphid predators by molecular gut analysis. *Molecular Ecology*, 9: 1887–1898.
- Chiu SC, 1979. Biological control of the brown planthopper. In: Brady NC ed. *Brown Planthopper: Threat to Rice Production in Asia*. International Rice Research Institute, Manila, Philippines. 335–355.
- Costa FO, deWaard JR, Boutillier J, Ratnasingham S, Dooh RT, Hajibabaei M, Hebert PD, 2007. Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 64: 272–295.
- Cuthbertson AGS, Fleming CC, Murchie AK, 2003. Detection of *Rhopalosiphum insertum* (apple-grass aphid) predation by the predatory mite *Anystis baccarum* using molecular gut analysis. *Agricultural and Forest Entomology*, 5: 219–225.
- de León JH, Fournier V, Hagler JR, Daane KM, 2006. Development of molecular diagnostic markers for sharpshooters *Homalodisca coagulata* and *Homalodisca liturata* for use in predator gut content examinations. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 119: 109–119.
- Dieffenbach CW, Dveksler GS (Translated by Huang PT, Yu WY, Chen TM), 1998. PCR Primer: A Laboratory Manual. Science Press, Beijing. 88–95. [Dieffenbach CW, Dveksler GS (黄培堂, 俞炜源, 陈添弥译), 1998. PCR 技术实验指南. 北京: 科学出版社. 88–95]
- Dyck VA, Thomas B, 1979. The brown planthopper problem. In: Brady NC ed. *Brown Planthopper: Threat to Rice Production in Asia*. International Rice Research Institute, Manila, Philippines. 3–17.
- Erlandson M, Garipey T, 2005. Developing species-specific PCR primers for insect identification. *Bulletin of the Entomological Society of Canada*, 37(2): 76–82.
- Fournier V, Hagler J, Daane K, de León J, Groves R, 2008. Identifying the predator complex of *Homalodisca vitripennis* (Hemiptera: Cicadellidae): a comparative study of the efficacy of an ELISA and PCR gut content assay. *Oecologia*, 157: 629–640.
- Garipey TD, Kuhlmann U, Gillott C, Erlandson M, 2007. Parasitoids, predators and PCR: the use of diagnostic molecular markers in biological control of arthropods. *Journal of Applied Entomology*, 131 (4): 225–240.
- Greenstone MH, Hunt JH, 1993. Determination of prey antigen half-life in *Polistes metricus* using a monoclonal antibody-based immunodot assay. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 68: 1–7.
- Greenstone MH, Shufran KA, 2003. Spider predation: species-specific identification of gut contents by polymerase chain reaction. *Journal of Arachnology*, 31(1): 131–134.
- Hagler JR, Naranjo SE, 1997. Measuring the sensitivity of an indirect predator gut content ELISA: detectability of prey remains in relation to predator species, temperature, time, and meal size. *Biological Control*, 9(2): 112–119.
- Harper GL, Sheppard SK, Harwood JD, Read DS, Glen DM, Bruford MW, Symondson WOC, 2006. Evaluation of temperature gradient gel electrophoresis for the analysis of prey DNA within the guts of

- invertebrate predators. *Bulletin of Entomological Research*, 96: 295–304.
- Harwood JD, 2008. Are sweep net sampling and pitfall trapping compatible with molecular analysis of predation? *Environmental Entomology*, 37(4): 990–995.
- Harwood JD, Obrycki JJ, 2005. Quantifying aphid predation rates of generalist predators in the field. *European Journal of Entomology*, 102: 335–350.
- Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, de Waard JR, 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 270: 313–321.
- Hoogendoorn M, Heimpel G, 2001. PCR-based gut content analysis of insect predators; using ribosomal ITS-1 fragments from prey to estimate predation frequency. *Molecular Ecology*, 10: 2059–2067.
- Hosseini R, Schmidt O, Keller MA, 2008. Factors affecting detectability of prey DNA in the gut contents of invertebrate predators: a polymerase chain reaction-based method. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 126: 194–202.
- Juen A, Traugott M, 2005. Detecting predation and scavenging by DNA gut-content analysis: a case study using a soil insect predator-prey system. *Oecologia*, 142: 344–352.
- Juen A, Traugott M, 2007. Revealing species-specific trophic links in soil food webs; molecular identification of scarab predators. *Molecular Ecology*, 16: 1545–1557.
- King RA, Read DS, Traugott M, Symondson WOC, 2008. Molecular analysis of predation: a review of best practice for DNA-based approaches. *Molecular Ecology*, 17: 947–963.
- Lim UT, Lee JH, 1999. Enzyme-linked immunosorbent assay used to analyze predation of *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) by *Pirata subpiraticus* (Araneae: Lycosidae). *Environmental Entomology*, 28(6): 1177–1182.
- Liu YF, Zhang GR, Gu DX, Wen RZ, 2002. Enzyme-linked immunosorbent assay used to detect the food relationships of the arthropods in paddy fields. *Acta Entomologica Sinica*, 45(3): 352–358. [刘雨芳, 张古忍, 古德祥, 温瑞贞, 2002. 用ELISA方法研究稻田节肢动物的食物关系. 昆虫学报, 45(3): 352–358]
- Ma J, Li D, Keller M, Schmidt O, Feng X, 2005. A DNA marker to identify predation of *Plutella xylostella* (Lep., Plutellidae) by *Nabis kinbergii* (Hem., Nabidae) and *Lycosa* sp. (Araneae, Lycosidae). *Journal of Applied Entomology*, 129(6): 330–335.
- McMillan S, Kuusk AK, Cassel-Lundhagen A, Ekbohm B, 2007. The influence of time and temperature on molecular gut content analysis: *Adalia bipunctata* fed with *Rhopalosiphum padi*. *Insect Science*, 14: 353–358.
- Naranjo SE, Hagler JR, 2001. Toward the quantification of predation with predator gut immunoassays: a new approach integrating functional response behavior. *Biological Control*, 20: 175–189.
- Pang BP, Cheng JA, 2000. Monoclonal antibody and its application in studying arthropod predation. *Chinese Journal of Ecology*, 19(3): 32–35. [庞保平, 程家安, 2000. 单克隆抗体及其在节肢动物捕食作用研究中的应用. 生态学杂志, 19(3): 32–35]
- Pang BP, Cheng JA, Mao XQ, 2000. On the relationships among the detectable time and taken amount of prey in predator and temperature. *Acta Phytophylacica Sinica*, 27(1): 7–11. [庞保平, 程家安, 毛雪琴, 2000. 猎物可测定时间与捕食量和温度的关系. 植物保护学报, 27(1): 7–11]
- Ratnasingham S, Hebert PDN, 2007. Barcoding BOLD: the Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes*, 7: 355–364.
- Sheppard SK, Bell J, Sunderland KD, Fenlon J, Skervin D, Symondson WOC, 2005. Detection of secondary predation by PCR analyses of the gut contents of invertebrate generalist predators. *Molecular Ecology*, 14: 4461–4468.
- Sheppard SK, Harwood JD, 2005. Advances in molecular ecology: tracking trophic links through predator-prey food-webs. *Functional Ecology*, 19: 751–762.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P, 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87: 651–670.
- Symondson WOC, 2002. Molecular identification of prey in predator diets. *Molecular Ecology*, 11: 627–641.
- von Berg K, Traugott M, Symondson WOC, Scheu S, 2008. The effects of temperature on detection of prey DNA in two species of carabid beetle. *Bulletin of Entomological Research*, 98: 263–269.
- Zaidi RH, Jaal Z, Hawkes NJ, Hemingway J, Symondson WOC, 1999. Can multiple-copy sequences of prey DNA be detected amongst the gut contents of invertebrate predators? *Molecular Ecology*, 8: 2081–2087.
- Zhang GF, Lü ZC, Wan FH, 2007a. Detection of *Bemisia tabaci* remains in predator guts using a sequence-characterized amplified region marker. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 123: 81–90.
- Zhang GF, Lü ZC, Wan FH, Lovei GL, 2007b. Real-time PCR quantification of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) B-biotype remains in predator guts. *Molecular Ecology Notes*, 7: 947–954.
- Zhang GR, Zhang WQ, Gu DX, 1996. Detection of rice planthopper remains in predatory insects and spiders by ELISA. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 35(5): 119–112. [张古忍, 张文庆, 古德祥, 1996. 用ELISA检测稻飞虱的捕食性天敌. 中山大学学报(自然科学版), 35(5): 119–112]
- Zhang GR, Zhang WQ, Gu DX, 1997. Application of ELISA method for determining control effects of predatory arthropods on rice planthoppers in rice field. *Acta Entomologica Sinica*, 40(2): 171–176. [张古忍, 张文庆, 古德祥, 1997. 用ELISA研究稻田节肢类捕食者对稻飞虱的捕食作用. 昆虫学报, 40(2): 171–176]
- Zhao WC, Cheng JA, Chen ZX, 2004. Development of a monoclonal antibody to detect predation of the brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål). *International Journal of Pest Management*, 50(4): 317–321.
- Zhao WC, Cheng JA, Zhang WJ, 2005. Evaluation of the control effects

- of *Pardosa pseudoannulata* on *Nilaparvata lugens* (Stål) with a monoclonal antibody. *Acta Ecologica Sinica*, 25(1): 78-82. [赵伟春, 程家安, 张文俊, 2005. 应用单克隆抗体评价拟环纹豹蛛对褐飞虱的控制作用. *生态学报*, 25(1): 78-82]
- Zhou HH, 1986a. A serological method for studying ecology of insects. *Entomological Knowledge*, 23(1): 44-45. [周汉辉, 1986a. 研究昆虫生态学的一种血清学检验法. *昆虫知识*, 23(1): 44-45]
- Zhou HH, 1986b. Precipitin determination of spider predation on rice planthoppers in Guangdong province. *Chinese Journal of Biological Control*, 2(4): 155-157. [周汉辉, 1986b. 用血清检验法评价稻田昆虫天敌对飞虱的捕食作用. *生物防治通报*, 2(4): 155-157]
- Zhou HH, 1989. A study on predation of natural enemies to three rice pest in sects by serological method. *Acta Phytophylacica Sinica*, 16(1): 7-11. [周汉辉, 1989. 血清法探讨天敌对三种稻田昆虫的抑制作用. *植物保护学报*, 16(1): 7-11]
- Zhou HH, Tang JQ, 1982. Detection of prey species fed by enemies in rice field by applying serological method (preliminary study). *Natural Enemies of Insects*, 4(4): 40-41. [周汉辉, 汤鉴球, 1982. 应用血清学方法检验水稻害虫天敌的捕食种类(初报). *昆虫天敌*, 4(4): 40-41]

(责任编辑: 赵利辉)