

应用单克隆抗体评价拟环纹豹蛛对褐飞虱的控制作用

赵伟春^{1,2}, 程家安^{1,*}, 张文俊¹

(1. 浙江大学应用昆虫学研究所, 杭州 310029, 2. 浙江中医学院生物工程学系, 杭州 310053)

摘要:应用褐飞虱的单克隆抗体 4B8 研究了 1999 年浙江大学华家池校区农场汕优 63 单季晚稻田中拟环纹豹蛛对褐飞虱的捕食作用。采用盘拍法的调查结果表明,褐飞虱、拟环纹豹蛛种群数量高峰期均在水稻生长后期(9 月中旬),最大种群密度分别为 126 头/丛和 1.83 头/丛。对每次捕获的每头拟环纹豹蛛样品的抗体夹心 ELISA 检测结果表明,拟环纹豹蛛对褐飞虱单克隆抗体的阳性反应率与田间褐飞虱的生物量及拟环纹豹蛛对褐飞虱的占有量显著相关。定量评估结果表明,在此密度条件下,拟环纹豹蛛对褐飞虱的最大捕食率仅为 2.28%。拟环纹豹蛛对褐飞虱的平均捕食量、总捕食量和捕食率与田间褐飞虱的生物量显著相关。总捕食量、捕食率与拟环纹豹蛛种群密度极显著相关。

关键词:褐飞虱;拟环纹豹蛛;单克隆抗体;酶联免疫吸附试验;捕食作用

Evaluation of the control effects of *Pardosa pseudoannulata* on *Nilaparvata lugens* (stål) with a monoclonal antibody

ZHAO Wei-Chun^{1,2}, CHENG Jia-An^{1,*}, ZHANG Wen-Jun¹ (1. Institute of Applied Entomology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; 2. Department of Biological Engineering, Zhejiang College of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(1): 78~82.

Abstract: Field surveys were carried out at five days interval in the single rice-growing season in Hangzhou in 1999. The rice crop were transplanted on June 23 and harvested on October 3. Using a plate inserted at the base of the plants, the numbers of *Nilaparvata lugens* and *Pardosa pseudoannulata* per hill were counted by eye. Counts were taken for 20 samples, 2 hills for each sample. Field investigation showed that the maximal densities of *N. lugens* and *P. pseudoannulata* were 126 /hill and 1.83 /hill, respectively. 10~30 individuals of *P. pseudoannulata* were collected from rice paddy for each survey date. They were tested for the presence of *N. lugens* prey remained in their guts using a double antibodies sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in combination with specific monoclonal antibody, 4B8, against *N. lugens*. The results showed that *P. pseudoannulata* was active predator on *N. lugens*. Correlation analysis based on the field population densities and results of the ELISA indicated that the positive rates of *P. pseudoannulata* on *N. lugens* increased with the increase of the field biomass of *N. lugens* and the occupying prey biomass of each predator. Quantitative assessment were given based on the equation, $R = Q_0 \times d/f (0.1526 + \exp(3.9716 - 0.1347 \times T))$, which was established for the model system of *P. pseudoannulata*-*N. lugens*. Q_0 , d , f , T and R were the prey antigen titer remained in the predator gut, predator density, coefficient of digestion of prey, temperature and total prey captured biomass, respectively. Throughout the whole rice-growing season, the largest prey biomass of *N. lugens* that each *P. pseudoannulata* predated was 0.449mg (0.33 female). The largest predation rates of them were 2.28%. This suggested that the brown planthopper could not be controlled by *P. pseudoannulata*. It was resulted from low population densities of *P. pseudoannulata*. The average prey captured biomass, the total prey captured biomass and the predation rate of *P. pseudoannulata* on *N. lugens* increased with the increase of the field biomass of *N. lugens*. The total predated biomass and the predation rate of *P. pseudoannulata* on *N. lugens* increased with the

基金项目:国家“973”资助项目(G2000016210);Rice IPM Network 资助项目

收稿日期:2003-10-14;**修订日期:**2004-01-20

作者简介:赵伟春(1973~),女,浙江缙云人,博士,主要从事害虫综合治理和分子生物学研究。

* 通讯作者 Author for corresponding. E-mail: jacheng@zju.edu.cn

Foundation item: National Basic Research Priorities Programme of China (No. G2000016210) and Rice IPM Network

Received date: 2003-10-14; **Accepted date:** 2004-01-20

Biography: ZHAO Wei-Chun, Ph. D., mainly engaged in IPM and molecular biology. E-mail: weichunzhao@zjctcm.net

increase of the density of *P. pseudoannulata*. The advantages and limitations of the prey gut content assay (double antibodies sandwich ELISA) were discussed.

Key words: *Nilaparvata lugens* (Stål); *Pardosa pseudoannulata*; monoclonal antibody; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); predation

文章编号:1000-0933(2005)01-0078-05 中图分类号:Q966,Q968 文献标识码:A

在稻田生态系统中,捕食性天敌的种类和数量非常丰富,对稻飞虱起着重要的控制作用。但是,长期大面积施用化学农药,明显削弱了稻田生态系统的自然控制作用,致使褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 猖獗成灾^[1]。由于缺乏准确地定量评价捕食作用的方法,田间特定种捕食性天敌对稻飞虱的确切控制作用及其与其它因子的关系仍有待于研究。

捕食者和猎物间的相互关系问题一直是生态学研究的核心课题之一。许多不同的方法被用来研究这种关系,其中免疫学方法是目前最能获得捕食作用直接证据的方法^[2~4]。单克隆抗体克服了传统的多抗血清的缺点,具有高度的特异性和均质性,近年来开始被应用于捕食作用的研究,获得了较好的结果^[5,6]。赵伟春等^[7,8]选择水稻重要害虫——褐飞虱为对象,在成功地制备了针对褐飞虱的单克隆抗体并建立了免疫学检测方法的基础上,结合田间调查,检测了拟环纹豹蛛 *Pardosa pseudoannulata* 对褐飞虱单克隆抗体的阳性反应率,深入研究了单季晚稻生长期拟环纹豹蛛对褐飞虱的捕食动态变化。

1 材料与方法

1.1 田间调查和取样

1999年在浙江大学华家池校区农场调查单季晚稻田中主要节肢动物的种群动态。调查地面积为666.7m²。水稻品种为汕优63(感褐飞虱和白背飞虱)。6月23日移栽,10月3日收获。在整个生长期,不施用任何农药。每天记录田间温度。采用平行线取样法,定期(每5d一次)用盘拍法(35cm×45cm,加煤油)调查稻田节肢动物群落结构。每次取20点,每点2丛。调查时不易分辨的蜘蛛带回实验室镜检。同时随机捕获不同大小拟环纹豹蛛各10~30头,分装于小试管中,迅速带回实验室,于-20℃冰柜内冻死备用。

1.2 样品处理

每头拟环纹豹蛛样品加入100μl的0.01mol/L的PBS(pH=7.2)迅速研磨,待样品成匀浆状后加入900μl的PBS,转移至离心管中5000转下离心10min,分离上清液,在15000转下低温离心15min,取上清液在-20℃下保存备用。将供水饥饿15d的拟环纹豹蛛和供水饥饿1d的褐飞虱雌成虫分别置于-20℃冰箱中冰冻致死。取出计数、称重后加入PBS,使拟环纹豹蛛和褐飞虱的终浓度分别为1头/ml和0.05g/ml,研磨后同上离心,取上清液在-20℃下保存备用。

1.3 ELISA检测

每次调查时捕获的每头拟环纹豹蛛均单独用于检测。采用4B8抗体夹心ELISA进行检测,具体步骤见赵伟春等^[7,8]。其中单克隆抗体4B8稀释1000倍,辣根过氧化物酶标记单克隆抗体HRP-4B8稀释4000倍,每头拟环纹豹蛛样品稀释100倍。同时以1%脱脂奶封闭液作空白对照,以饥饿2周以上的拟环纹豹蛛100倍稀释液作阴性对照,用拟环纹豹蛛100倍稀释液将褐飞虱抗原进行倍比稀释(50~51200倍)作标准曲线。求出阴性对照OD值的平均值 $\bar{N}$ 和标准误 SD ,若样品OD值 $P \geq \bar{N} + 3SD$,则视为阳性反应,否则为阴性反应。计算各样品对褐飞虱单克隆抗体的阳性反应率,并根据抗原标准曲线将检测OD值转换为褐飞虱雌成虫数。

1.4 数据处理

各因子间采用Statistic统计软件进行相关分析。将田间褐飞虱分为1~3龄若虫、4~5龄若虫和成虫进行统计,再根据各年龄阶段的干重将田间的飞虱数转换为生物量。拟环纹豹蛛肠道中残留的褐飞虱个体数亦转换为生物量进行计算。褐飞虱各发育阶段的干重见唐启义^①。

1.5 捕食量估计

根据赵伟春建立的估计拟环纹豹蛛对褐飞虱捕食量的计算公式,将猎物残留生物量、田间调查前3d的温度、捕食者密度代入方程分别估计被拟环纹豹蛛捕食的褐飞虱的生物量,再根据被捕食褐飞虱的生物量及田间褐飞虱的生物量,计算田间褐飞虱的被捕食率,从而比较分析不同时期拟环纹豹蛛对褐飞虱的捕食作用。具体方程如下:

$$t_{DP} = 0.1526 + \exp(3.9716 - 0.1347 \times T)$$

$$P = Q_0 \cdot d / f \cdot t_{DP}$$

式中, t_{DP} 为猎物可测定时间, T 为田间温度, P 为捕食量, Q_0 为猎物残留量, d 为捕食者密度, f 为消化系数。由于猎物在拟环纹

① 唐启义,内部资料

豹蛛肠道中呈指数下降,因此, f 为 0.33。

2 结果与分析

2.1 褐飞虱种群动态分析

1999 年浙江大学华家池校区试验农场单季稻田中褐飞虱的数量动态见图 1。7 月 20 日前后,少量褐飞虱成虫开始迁入并产卵。8 月 24 日左右褐飞虱 1~3 龄若虫的数量急剧上升,9 月上、中旬达到高峰期。4~5 龄若虫的数量在 9 月上旬开始急剧上升,9 月 13 日左右达到高峰。成虫的高峰期在 9 月中、下旬。褐飞虱的最大虫口密度达 126 头/丛,田间最大生物量出现在 9 月 13 日前后,达 52.24 mg/丛。

2.2 拟环纹豹蛛种群数量及猎物占有量的动态分析

拟环纹豹蛛的种群数量在整个水稻生长期均较低(图 2)。在 6 月 30 日~8 月 29 日间维持在 0.5 头/丛的密度水平之下,8 月 29 日后开始上升,9 月 18 日前后达到高峰,但最大密度低于 2 头/丛。相关分析结果表明,拟环纹豹蛛种群数量与褐飞虱生物量相关关系达到极显著水平($R=0.9600$, $F(1,17)=199.84$, $p<0.0000$)。将不同时期褐飞虱生物量与拟环纹豹蛛的种群密度的比值作为每头拟环纹豹蛛占有的生物量。拟环纹豹蛛的平均猎物占有量在 8 月 4 日与 9 月 23 日前后出现两个峰值,与拟环纹豹蛛的种群密度及褐飞虱的生物量间的相关关系不显著。

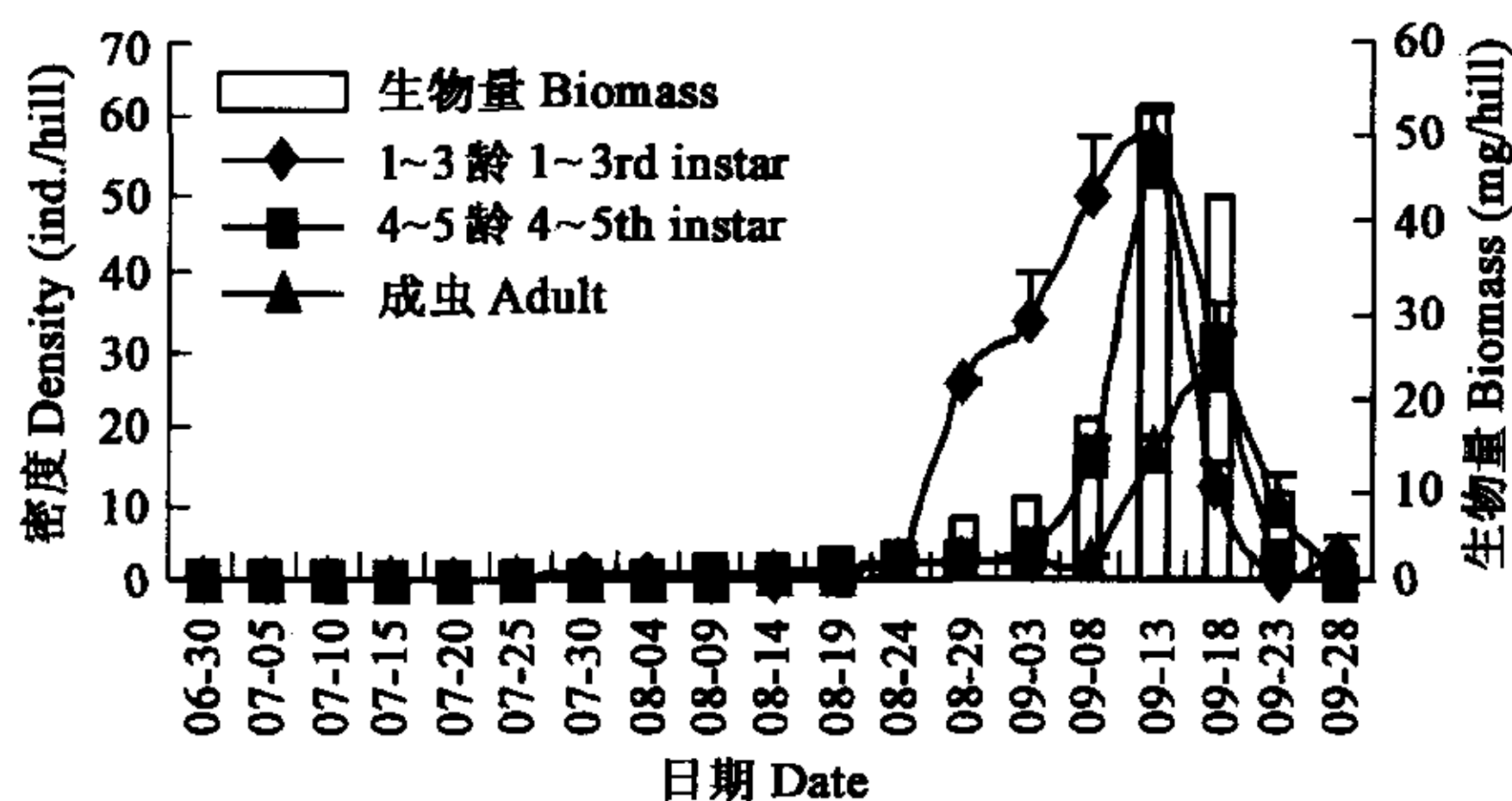


图 1 褐飞虱的种群动态(杭州,1999 年)

Fig. 1 Population dynamics of *N. lugens* (Hangzhou, 1999)

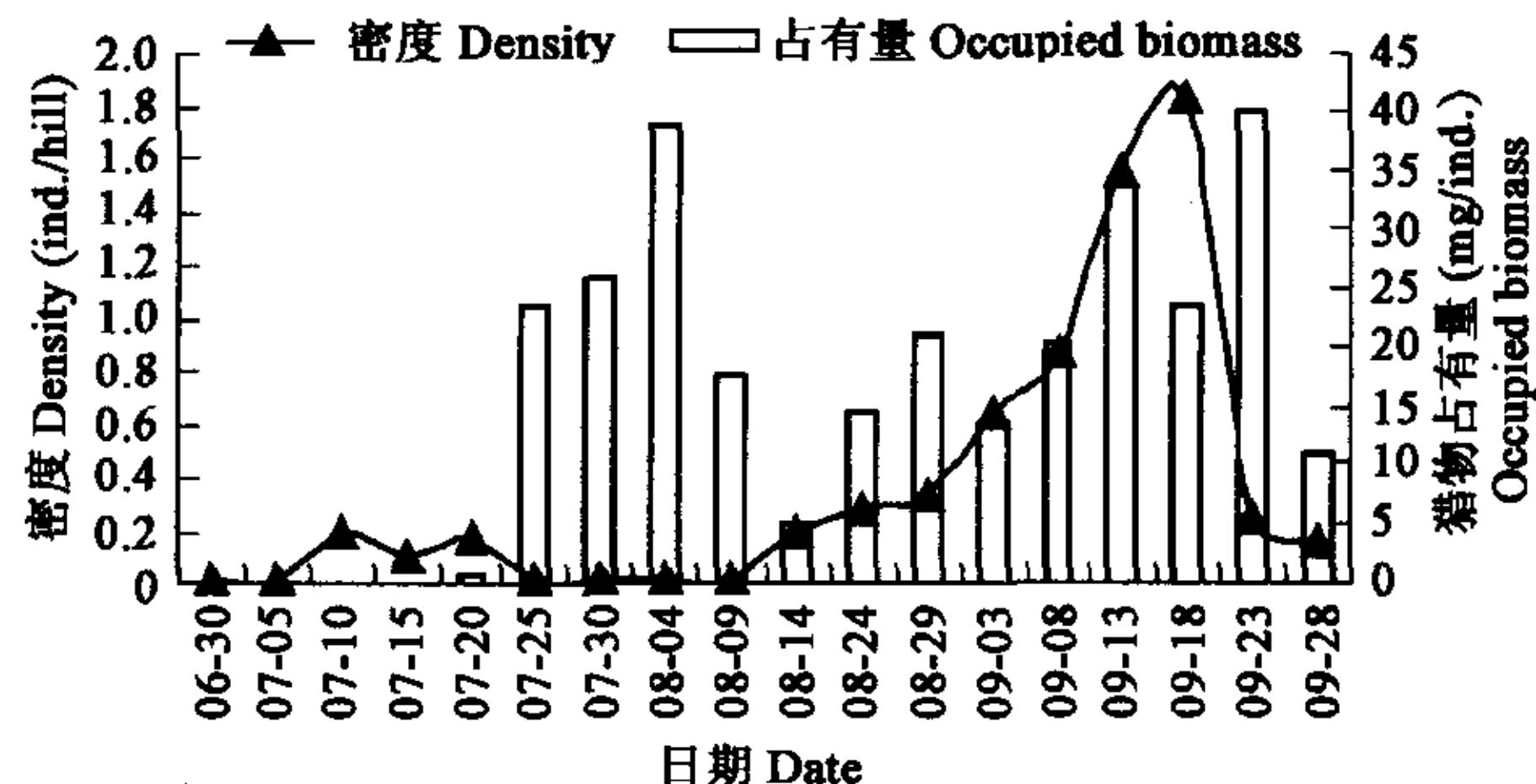


图 2 拟环纹豹蛛的种群数量及猎物占有量的动态变化

Fig. 2 Dynamics of the population of *P. pseudoannulata* and the biomass of *N. lugens* for each *P. pseudoannulata*

2.3 拟环纹豹蛛对褐飞虱单克隆抗体阳性反应率的动态变化

拟环纹豹蛛对 4B8 的阳性反应率在 8 月 4 日前后逐渐上升,最高阳性反应率在 9 月 23 日左右,达到 66.67%(图 3)。其阳性反应率与褐飞虱生物量之间相关关系极显著($R=0.6237$, $F(1,17)=10.184$, $p<0.00568$),与拟环纹豹蛛的猎物占有量相关关系显著($R=0.4727$, $F(1,17)=4.6030$, $p<0.04761$)。

2.4 拟环纹豹蛛肠道中残留褐飞虱量的动态变化

拟环纹豹蛛肠道中残留褐飞虱量的动态变化见图 4。在水稻生长后期(9 月 3 日~9 月 28 日),拟环纹豹蛛肠道中的残留生物量较高,与褐飞虱生物量及拟环纹豹蛛的猎物占有量均极显著相关($R=0.8220$, $F(1,17)=35.436$, $p<0.00002$; $R=0.8282$, $F(1,17)=37.136$, $p<0.00001$)。

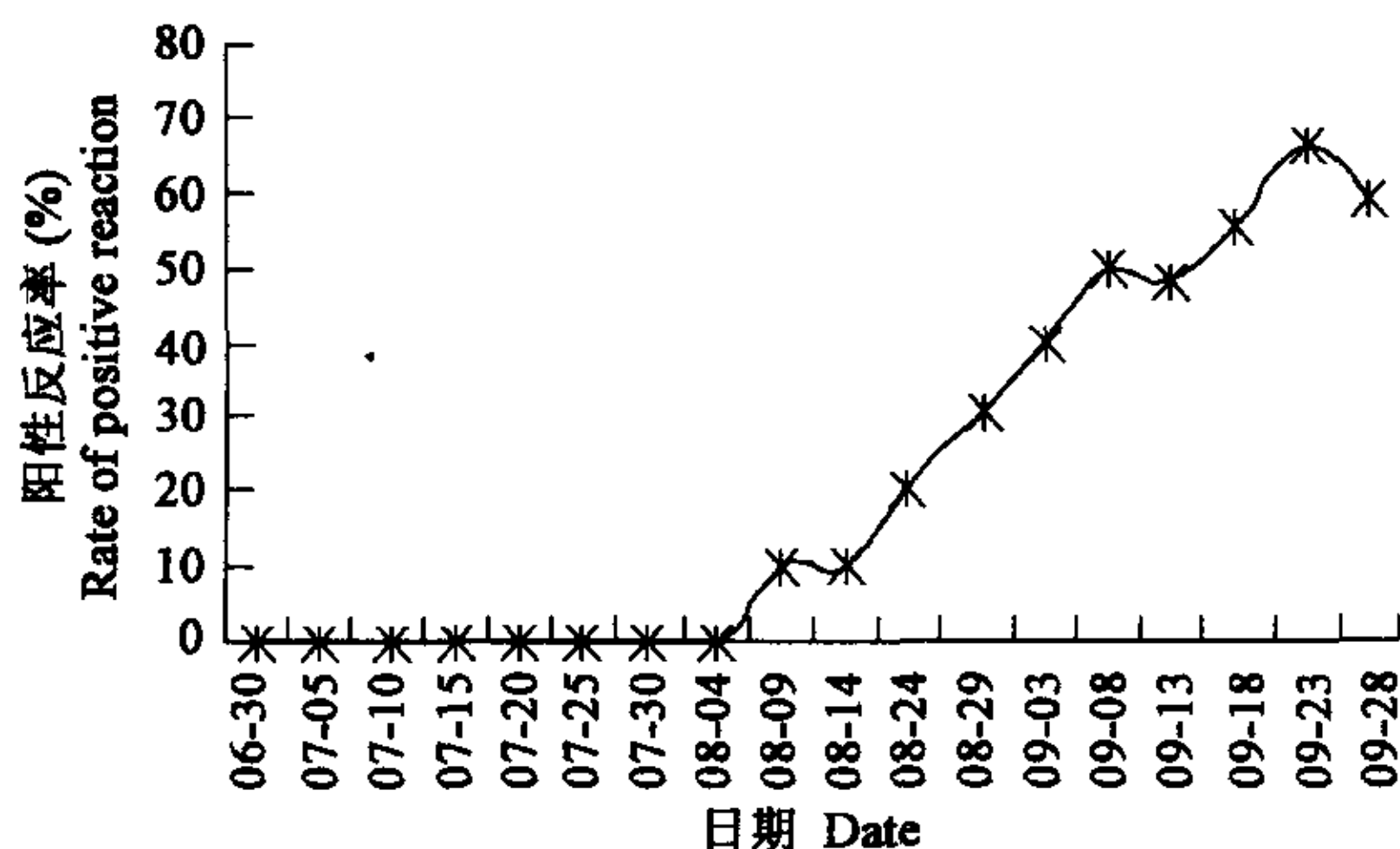


图 3 拟环纹豹蛛对 4B8 阳性反应率的动态变化

Fig. 3 Dynamics of the positive rates of *P. pseudoannulata* to 4B8

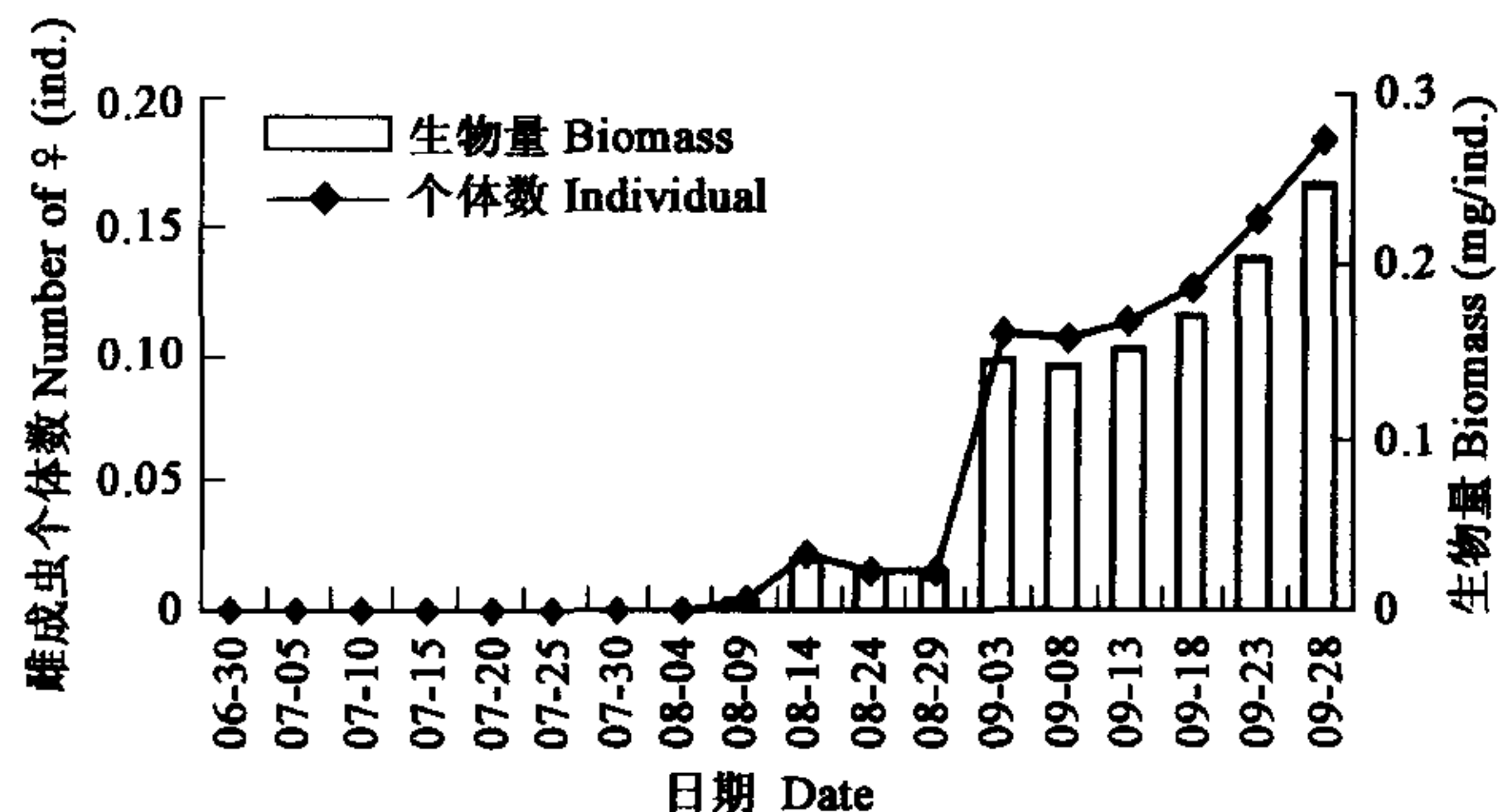


图 4 拟环纹豹蛛肠道中残留褐飞虱量的动态变化

Fig. 4 Dynamics of *N. lugens* antigens remained in the gut of *P. pseudoannulata*

2.5 拟环纹豹蛛对褐飞虱捕食量的动态变化

在 6~10 月份,稻田日平均温度在 20~31℃ 间变动,在此温度范围内,拟环纹豹蛛捕食了 1 头褐飞虱怀卵短翅型雌成虫后猎物的可测定时间在 1~3d 左右变动,因此将每次田间调查前 3d 的平均温度作为猎物的消化温度。再代入至猎物可测定时间的计算公式,得出不同时期猎物的可测定时间。将不同时期猎物的可测定时间、平均残留生物量及田间拟环纹豹蛛种群密度代入捕食量计算公式,得不同时期拟环纹豹蛛对褐飞虱的平均捕食量和总捕食量(图 5)。在整个单季晚稻生长期中,平均每头拟环纹豹蛛的最大捕食量为 0.449mg,相当于 0.33 头褐飞虱短翅型怀卵雌成虫,最大总捕食量为 0.696mg,相当于 0.51 头褐飞虱短翅型怀卵雌成虫。拟环纹豹蛛对褐飞虱的平均捕食量和总捕食量随着褐飞虱生物量的增加而增加,相关关系均极显著($R=0.8344, F(1,17)=36.658, p<0.00002$; $R=0.9871, F(1,17)=609.27, p<0.00000$),与猎物占有量相关关系不显著。最高平均捕食量和总捕食量均在 9 月 13 日左右。总捕食量与拟环纹豹蛛的种群密度极显著相关($R=0.9823, F(1,17)=41.02, p<0.00000$),与阳性反应率极显著相关($R=0.6108, F(1,17)=10.115, p<0.00547$)。

2.6 拟环纹豹蛛对褐飞虱捕食率的动态变化

拟环纹豹蛛对褐飞虱的捕食率在褐飞虱的发生期内存在较大的波动(图 6)。其中分别在 8 月 14 日、9 月 3 日和 9 月 23 日出现峰值,但最大捕食率在 2.3% 以下。捕食率的动态变化与褐飞虱生物量相关关系显著($R=0.4746, F(1,17)=4.6527, p<0.04656$),与拟环纹豹蛛种群密度极显著相关($R=0.9997, F(1,17)=25607, p<0.00000$),与拟环纹豹蛛平均猎物占有量之间相关关系不显著,与阳性反应率极显著相关($R=0.6263, F(1,17)=10.974, p<0.00412$)。

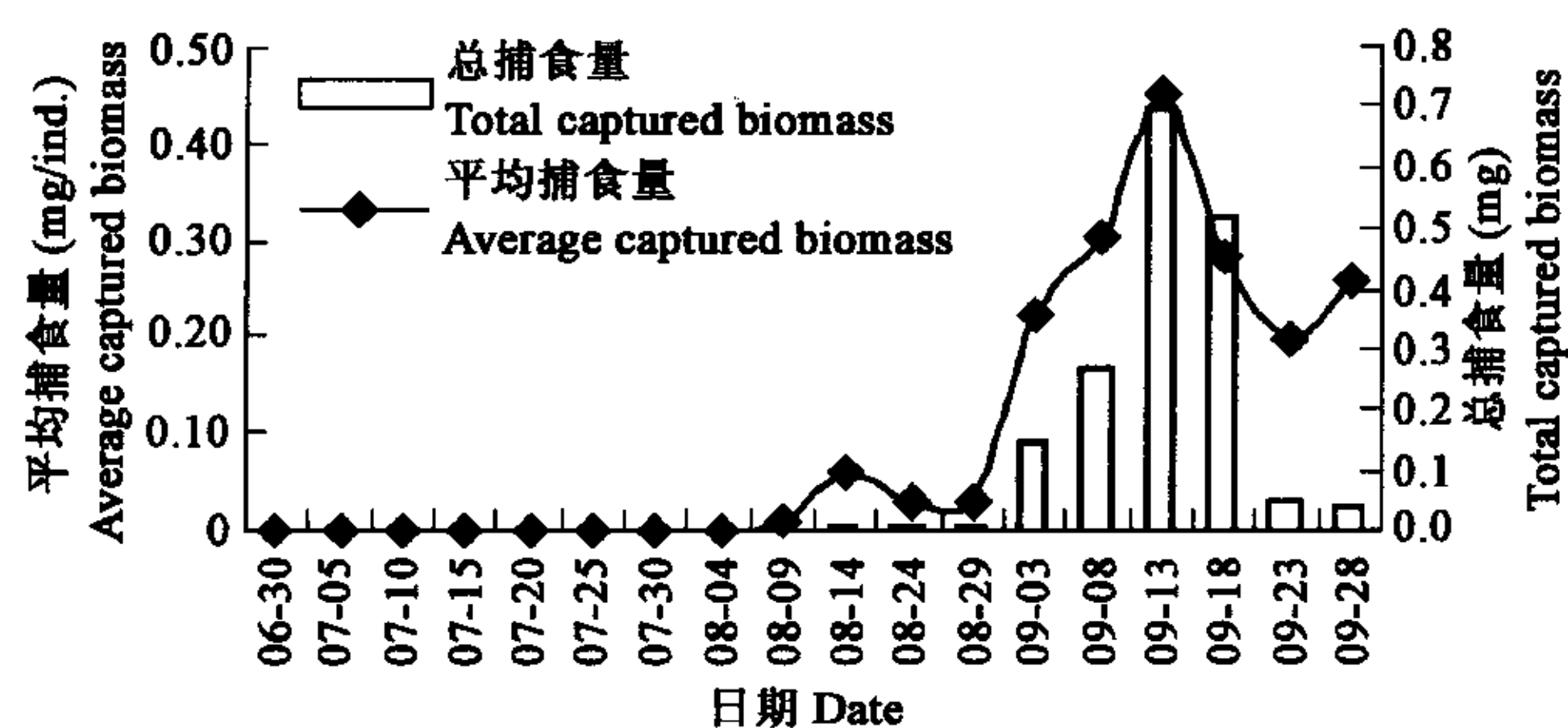


图 5 拟环纹豹蛛对褐飞虱捕食量的动态变化

Fig. 5 Dynamics of the biomass of *N. lugens* predated by *P. pseudoannulata*

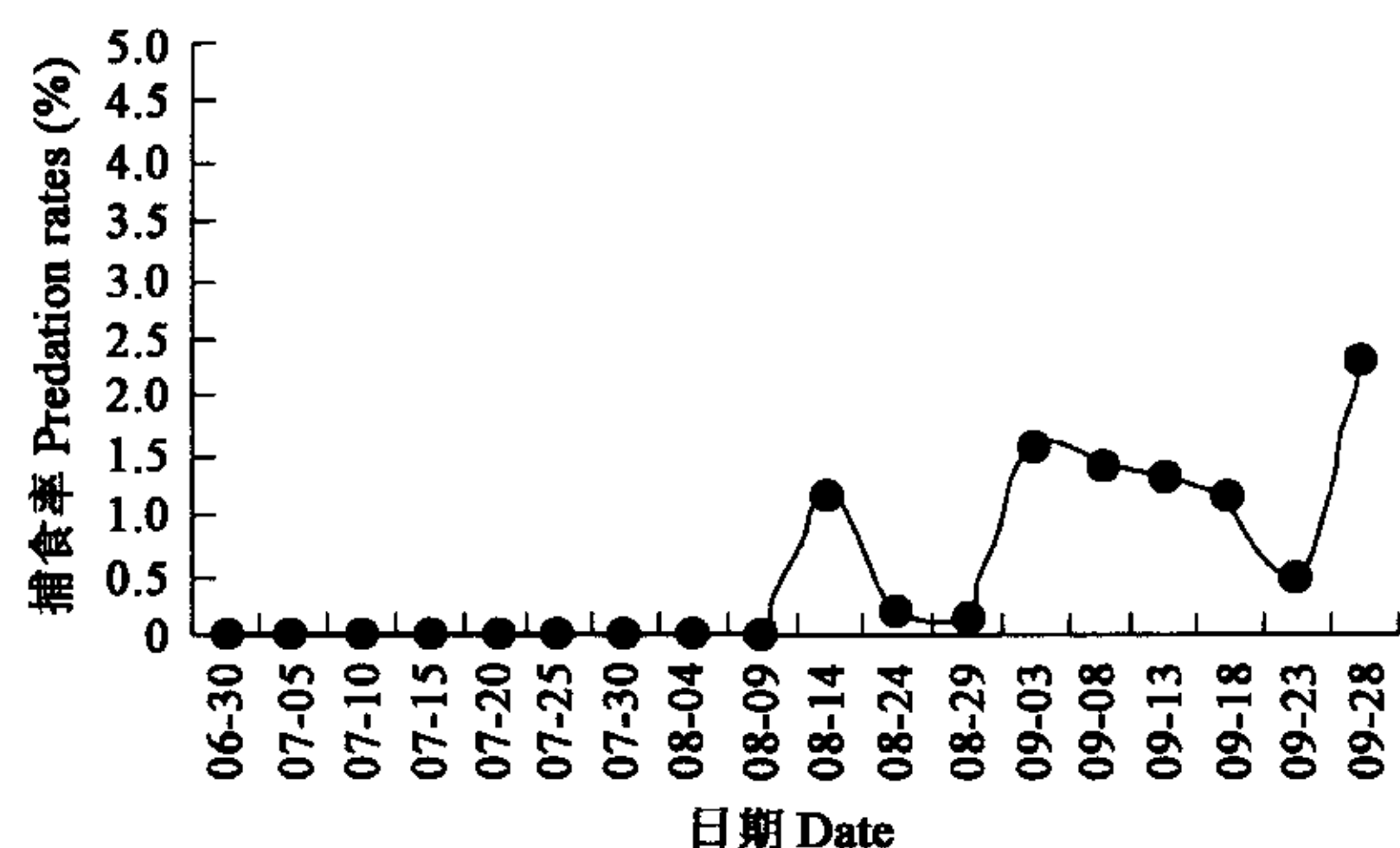


图 6 拟环纹豹蛛对褐飞虱捕食率的动态变化

Fig. 6 Dynamics of the predated rates of *N. lugens* by *P. pseudoannulata*

3 讨论

已有的室内研究表明,拟环纹豹蛛无卵囊、有卵囊雌成蛛和雄成蛛平均日捕食褐飞虱 5 龄若虫量分别为 25、14.3 和 23.8 头^[9]。但本试验结果表明,田间每头拟环纹豹蛛对褐飞虱的日平均捕食量较低,最大仅为 0.449mg,相当于 0.33 头褐飞虱怀卵雌成虫,显著低于室内研究的结果^[9]。这主要由于拟环纹豹蛛为杂食性节肢动物,室内功能反应排除了其它生物的影响,而且捕食者和猎物被限制在一定的空间内,有利于成功捕食。而在田间未施农药的条件下,其它植食性昆虫如黑尾叶蝉、稻纵卷叶螟等的大量存在,分散了其褐飞虱的捕食作用。因此,本试验的研究不仅反映了室内功能反应的局限性,也充分证明了利用单克隆抗体结合 ELISA 的检测技术排除了人为因素干扰的优越性,更真实地反映了田间的捕食情况。

在拟环纹豹蛛-褐飞虱的系统中,拟环纹豹蛛对褐飞虱的总捕食量和捕食率与每头拟环纹豹蛛所占有的猎物数无显著相关性,而与拟环纹豹蛛的种群密度极显著相关。这一结果表明,拟环纹豹蛛对褐飞虱的捕食作用主要受拟环纹豹蛛种群数量的影响。同时表明捕食性天敌对害虫的控制作用是群体作用,仅单一种群常常难以完全控制一种害虫。在本试验的田块中,由于农场实施精耕细作,清除了田埂和大田中的杂草,破坏了蜘蛛等捕食性天敌的栖境和越冬场所,使捕食性天敌的初始数量很低。加上拟环纹豹蛛 1 年仅发生 1~2 代,种群数量长期维持在极低水平(图 2),而褐飞虱是迁飞性害虫,具有世代历期短、繁殖力强的特点,在不施用杀虫剂且是感虫品种的条件下,种群增长迅速(图 1),加上天敌无法控制害虫种群的增长,这是造成 1999 年浙大华家池校区单季稻田大面积“虱烧”的主要原因之一。因此,在利用天敌的生物防治实践中,应积极创造有利于捕食性天敌种群增长的因素,减少其它共存替换食料的数量,从而增强捕食性天敌对褐飞虱的控制作用。

捕食作用的定量评价一直是生态学研究的核心问题之一。尽管人们已经提出许多公式来定量评价节肢动物的捕食作用,但准确地定量评价捕食作用仍然非常困难。试验结果表明,在本检测系统下,拟环纹豹蛛个体大小对检测结果的影响小于 5%^[7],不同大小蜘蛛对猎物消化速率的差异不显著。此外,对 Sopp 等^[10]和庞保平等的方法作了进一步改进,不仅将温度(T)引入了猎物可测定时间,而且根据各龄期的干重将田间的褐飞虱数量统一转换为生物量,使估计捕食率更准确。但是,猎物可测定时间不仅受到温度的影响,而且受捕食量和饥饿状态等的影响,相同生物量不同发育阶段或虫态的猎物的抗原量不同,捕食者对不同

年龄猎物的偏好性也可能不同,此外,有些捕食者种类还存在食腐现象和群内群食现象,因此,准确地定量评价节肢动物的捕食作用仍然非常困难,有待于进一步的研究。

根据捕食者-猎物田间数量动态相关分析结果推断,拟环纹豹蛛可能是褐飞虱的重要捕食性天敌。这一结果与以往的研究结果一致^[11],与用单克隆抗体检测的结果也一致。但是,田间的捕食情况十分复杂,捕食者可能主要捕食的是其它的猎物种类,而其种群的消长与本研究的目标昆虫的种群消长一致。因此,不能简单的依靠种群消长的相关性来确定昆虫的主要天敌种类。

相关分析结果表明,拟环纹豹蛛对褐飞虱的总捕食量和捕食率与拟环纹豹蛛对褐飞虱单克隆抗体的阳性反应率均极显著相关,因此,阳性反应率的大小能在一定程度上反映捕食作用的强弱,但对于不同的捕食者与猎物系统而言,则有待深入研究。

References:

- [1] Cheng J A. *The rice insect pest*. Beijing: Chinese Agricultural Press, 1996.
- [2] Sunderland K D. Quantitative methods for detecting invertebrate predation occurring in the field. *Ann. Appl. Biol.*, 1988, **112**: 201~224.
- [3] Zhou H H. A study on predation of natural enemies to three rice pest insects by serological method. *Acta Phytophylacica Sinica*, 1989, **16** (1): 7~11.
- [4] Zhang G R, Zhang W Q, Gu D X. Detection of rice planthopper remains in predatory insects and spiders by ELISA. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 1996, **35**(5): 119~122.
- [5] Sunderland K D. Progress in quantifying predation using antibody techniques. In: Symondson W O C, Liddell T E. eds., *the Ecology of Agricultural Pests: Biochemical Approaches*. Chapman and Hall, London, 1996. 419~455.
- [6] Pang B P, Cheng J A, Chen Z X, et al. Development and characterization of monoclonal antibodies to the white-backed planthopper *Sogatella furcifera*. *Acta Entomologica Sinica*, 2001, **44**(1): 21~26.
- [7] Zhao W C, Cheng J A, Chen Z X, et al. Development and application of monoclonal antibodies to the brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2002a, **10**(1): 46~49.
- [8] Zhao W C, Cheng J A, Chen Z X. Calibration of a suitable enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for *Nilaparvata lugens* (Stål) antigen detection. *Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.)*, 2002b, **28**(6): 629~634.
- [9] Li R D, Ding J H, Hu G W, et al. *The brown planthopper and its population management*. Shanghai: Fudan University Press, 1996.
- [10] Sopp P I, Sunderland K D, Felon J S, et al. An improved quantitative method for estimating invertebrate predation in the field using an ELISA. *J. Appl. Ecol.*, 1992, **29**: 295~302.
- [11] Cook A G, Perfect T J. The population characteristics of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* in the Philippines. *Ecol. Entomol.*, 1989, **14**: 1~9.

参考文献:

- [1] 程家安. 水稻害虫. 北京:中国农业出版社, 1996.
- [3] 周汉辉. 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, 1989, **16**(1): 7~11.
- [4] 张古忍,张文庆,古德祥. 用 ELISA 检测稻飞虱的捕食性天敌. 中山大学学报(自然科学版), 1996, **35**(5): 119~122.
- [6] 庞保平,程家安,陈正贤,等. 白背飞虱单克隆抗体的制备及其特性的研究. 昆虫学报, 2001, **44**(1): 21~26.
- [7] 赵伟春,程家安,陈正贤,等. 褐飞虱单克隆抗体的制备及其在捕食作用研究中的初步应用. 农业生物技术学报, 2002a, **10**(1): 46~49.
- [8] 赵伟春,程家安,陈正贤. 褐飞虱抗原检测最佳 ELISA 条件的建立. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2002b, **28**(6): 629~634.
- [9] 李汝铎,丁锦华,胡国文,等主编. 褐飞虱及其种群管理. 上海:复旦大学出版社, 1996.