

用 ELISA 检测稻飞虱的捕食性天敌^{*}

张古忍 张文庆 古德祥

(中山大学昆虫学研究所, 广州 510275)

摘 要 利用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 方法测定了不同种类的捕食性天敌的阳性反应率。发现稻飞虱不同发育阶段的蛋白质组成一致, 所有捕食性天敌种类中以食虫沟瘤蛛、拟水狼蛛的阳性反应率最高。

关键词 ELISA, 检测, 捕食者, 稻飞虱

分类号 Q 968.1

近 20 年来, 血清学方法得到进一步的完善和发展, 其中以酶联免疫吸附试验 (ELISA) 最有应用前景, 它将抗原、抗体的免疫反应和酶的高效催化作用有机地结合, 不仅大大提高了测试的敏感性, 而且操作简便, 检测迅速。目前, 国外应用 ELISA 来评价捕食性天敌作用的工作已有报道^[1-3]。而国内除黄葵^[4]等用 ELISA 研究了粘虫的捕食性天敌外, 还未见其它报道。本文在建立 ELISA 方法的基础上, 检测了稻飞虱 (包括白背飞虱 *Sogatella furcifera* 和褐飞虱 *Nilaparvata lugens*) 的捕食性天敌, 以期鉴定稻飞虱的捕食性天敌种类。

1 材料与方法

1.1 稻飞虱的养殖 将从田间采回的稻飞虱接入装有秧苗的养虫笼中饲养, 待成虫羽化后, 分离褐飞虱和白背飞虱, 并分别接入养虫笼中, 进行隔离饲养, 然后逐步收集稻飞虱成虫和若虫, 并将若虫分为低龄 (1~2 龄) 和高龄 (3~5 龄)。收集到的稻飞虱虫体在室温下供水饥饿 24 h 后移入 -20℃ 冰箱中保存。

1.2 抗原的提取 将冰箱中保存的稻飞虱取出后称重, 倒入匀浆管中, 并加入适量的磷酸缓冲液 (0.05 mol/L, pH7.4)。在匀浆液中加入过量的磷酸缓冲液, 在 4℃ 下搅拌 24 h, 然后离心 (4 000~5 000 r/min, 20 min), 分离上清液。残渣重复抽提一次。将两次所得的上清液混合后, 置于 4℃ 下更换多次冷盐水透析 24 h 或 48 h。透析液用冰冻干燥法或用聚乙二醇 (polyethylene glycol, 分子量 6 000) 3% 溶液反透析法进行浓缩。浓缩液再在 4℃ 下透析 24 h, 然后用紫外分光光度计测定透析液的蛋白质含量, 即为抗原。

1.3 抗血清的制备 从市场上买回的健康雄性新西兰大白兔, 编号饲养 15~20 d。采用耳缘静脉注射法, 用适当浓度的抗原进行免疫。第三次注射后 2~3 d 采少量血并用试管沉淀法测效价, 当效价达到 1:2⁹ 时, 即可放血; 否则, 继续免疫。收集到的血液成斜面放置在 37℃ 温箱或室温下 2 h, 然后置于 4℃ 冰箱过夜。次日用滴管吸取血清, 用离心法 (3 500 r/

* 国家自然科学基金和广东省自然科学基金资助项目
收稿日期: 1995-09-18 张古忍, 男, 34 岁, 博士后

min, 20min)去掉沉淀物,即得抗血清,然后测效价。

1.4 酶联抗体的制备与 ELISA 检测 酶联抗体的制备采用戊二醛简易法;检测采用双抗体法^[5],以 PBS-Tween作空白对照,饥饿 48 h 以上的其它各种害虫和饥饿 15 d 的各种天敌为阴性对照,饲喂稻飞虱的天敌为阳性对照。

1.5 捕食者的收集 每次野外调查中,从保护区内采集捕食性天敌,分装入小试管中,再放入装有冰块的保温瓶内冷冻保存。带回实验室后迅速移入 -20°C 冰箱中低温保存,待检。每头天敌同时检测两种稻飞虱的捕食情况。

2 结果与分析

2.1 敏感性 捕食者胃内蛋白质含量的可测出与否取决于 ELISA 检测的敏感性。通过对抗原溶液的系列稀释检测表明,抗原的最低可测出浓度为 0.005 g/L (图 1)。以稻飞虱高龄若虫换算约为 0.01 头。可检测出的抗原绝对量取决于实验的条件,特别是抗血清的效价和过氧化物酶结合物的浓度。

图 1 ELISA 检测的系列稀释抗原的吸光度

Fig. 1 A of ELISA for dilutions of homogenised rice planthoppers

为确定稻飞虱不同发育阶段的蛋白质差异,交叉检验表明,它们之间的吸光度 (A) 无明显的差异,说明不同发育阶段的稻飞虱体内的蛋白质组成是一致的。

2.2 特异性 交叉检验表明:① 不同稻飞虱种类之间无交叉反应;② 抗血清与各种待测天敌(阴性对照)无交叉反应;③ 与稻田内的其它害虫无交叉反应;④ 在检测浓度范围内,阴性对照的最大吸收值不超过 0.6,因此以 0.6 为阴性标准,可以满足稻飞虱抗原的专一性检测;⑤ 抗血清与秧苗提取液无检测反应。

2.3 不同捕食者种阳性反应率的比较 不同捕食者种对白背飞虱和褐飞虱的捕食作用是不同的。表 1 列出了对 1993 年野外调查期间所采集的捕食性天敌所做的 ELISA 检测的阳性反应率,从中可以看出,拟水狼蛛、食虫沟瘤蛛、管巢蛛和跳蛛的阳性率最高,这与它们的生态位关系密切相关^[6]。据此可以知道,以茎秆层为主要活动场所的食虫沟瘤蛛、拟水狼蛛、拟环纹豹蛛、跳蛛、隐翅虫、步甲和管巢蛛的阳性率明显高于主要活动于叶面的肖蛸、园蛛、猫蛛和稻红瓢虫等。同时,还可以知道,早稻群落中的阳性率明显高于晚稻。这可能是

早稻群落中稻飞虱的种群密度远高于晚稻群落。早稻群落中捕食性天敌所能捕获的稻飞虱远多于晚稻群落,晚稻群落中天敌用于搜索猎物所花费的时间远多于早稻群落,此种群落中的捕食性天敌多处于半饥饿状态。

表 1 不同捕食者种的阳性反应率

Tab. 1 Percentage positive of different predator species examined by ELISA

捕食者种	早 稻			晚 稻		
	检测虫数	阳性率 %		检测虫数	阳性率 %	
		白背飞虱	褐飞虱		白背飞虱	褐飞虱
食虫沟瘤蛛	57	47.37	49.12	11	27.27	36.36
拟水狼蛛	48	45.83	66.67	23	30.47	17.39
拟环纹豹蛛	13	23.08	30.77	8	37.5	25.00
跳 蛛	5	60.00	20.00	9	22.22	22.22
肖 蛛	29	10.34	20.69	6	0	0
园 蛛	9	44.44	22.22	12	0	8.33
猫 蛛	9	22.22	22.22	7	0	0
管巢蛛	7	57.14	42.86	6	16.67	0
隐翅虫	9	22.22	22.22	5	40.00	40.00
步 甲	7	28.57	28.57	4	50.00	50.00
稻红瓢虫	21	19.05	9.52	3	0	0

3 小结与讨论

根据研究结果,首先可知稻飞虱不同发育阶段的蛋白质组成一致,经两种稻飞虱不同虫期的 ELISA 交叉检测,它们之间的 A 并无明显的差异。其次,ELISA 方法的特异性可以满足检测的需要。第三,所有的捕食性天敌种类中,水狼蛛和食虫沟瘤蛛的阳性反应率最高。

用血清学方法研究节肢类捕食性天敌的捕食作用汤鉴球、周汉辉已作报道。但用 ELISA 研究对稻飞虱的捕食作用还未见报道。尽管 ELISA 方法本身很敏感,但血清学检测的质量首先还要依赖于高效价、特异性强的抗血清,因此,制备高效价特异性强的抗血清成为 ELISA 方法成功的关键所在,抗血清的制备受到许多因素如抗原的提取、免疫方法等的影响。同时,ELISA 的研究结果与影响取食和消化的因子有关,如消化速率、取食频率、田间取样频率及环境因子如温度等的影响等在不同种类的天敌中反应不一样。本文仅是一个初步的研究结果,在下一步的研究中,将结合田间调查结果对捕食作用进行深入研究,并尝试进行捕食作用的定量评价。

参 考 文 献

- 1 Crook N E, Sunderland K D. Detection of aphid remains in predatory insects and spiders by ELISA. *Ann Appl Biol*, 1984, 105 413~ 422
- 2 Lovei G L, Sopp P I, Sunderland K D. Digestion rate in relation to alternative feeding in three species of polyphagous predators. *Ecol Entomol*, 1990, 15 293~ 300
- 3 Sunderland K D, Crook N E, Stacey D L. A study of feeding by polyphagous predators on cereal

aphids using ELISA and gut dissection. J Appl Ecol, 1987, 24: 907-933

- 4 黄葵,郭予元,谢云陆.应用酶联免疫吸附试验(ELISA)鉴定粘虫的捕食性天敌.植物保护学报, 1992, 19(3): 207-212
- 5 朱培坤.免疫酶技术.济南:山东科技出版社.1983
- 6 张文庆,张古忍,古德祥.稻飞虱及其节肢类捕食者的生态位关系研究.中山大学学报论丛, 1995 (2): 21-26

Detection of Rice Planthopper Remains in Predatory Insects and Spiders by ELISA

Zhang Guren* Zhang Wenqing Gu Dexiang

Abstract An ELISA which was used to detect and quantify ingested rice planthoppers in arthropod predators collected from paddy fields was developed. The detection limit of the assay was about one hundredth of an homogenised adult or 3-5th instar nymph rice planthopper. Tests with 2 species of rice planthopper (*Sogatella furcifera* and *Nilaparvata lugens*) showed that those which had been used as the principal immunogens reacted most strongly in the assay and no evidence of significant cross-reaction was found with each other or with any other species and with rice material. Among tested predatory species, *Umelia insecticeps*, *Pirata subpiraticus*, clubionid, and salticid had the highest positive reaction rates.

Keywords detection, rice planthopper, predator, ELISA

* Institute of Entomology, Zhongshan University, Guangzhou 510275