

少毛钝绥螨的生物学特性及 rDNA ITS 序列分析

黄建华¹, 孙强², 杨迎青¹, 兰波¹, 李湘民^{1*}

(1. 江西省农业科学院植物保护研究所, 南昌 330200; 2. 中华人民共和国黄岛海关, 青岛 266555)

摘要 少毛钝绥螨 *Proprioseiopsis asetus* 是在国内有分布的一种捕食螨, 其研究尚不深入。为明确其生物学特性, 在 25℃ 室内条件下研究了少毛钝绥螨对芦笋蓟马 1 龄若虫、柑橘全爪螨低龄若螨、椭圆食粉螨 1 龄若螨和丝瓜花粉的食性。结果表明: 少毛钝绥螨可以取食以上 4 种食物, 其中对粉螨和芦笋蓟马的捕食量较大, 对柑橘全爪螨捕食量较小。少毛钝绥螨及其近缘种的 rDNA ITS 序列在 61~85、116~159、177~198、224~254、277~317、531~549、438~445 bp 和 580~594 bp 等 ITS 区段存在差异性碱基。少毛钝绥螨及其近缘种分为两个组群。*Proprioseiopsis*、*Neoseiulus*、*Amblyseius* 聚为一个组群(Group I), 而 *Euseius* 单独聚为一个组群(Group II)。少毛钝绥螨与 *N. womersleyi* 和 *N. agrestis* 亲缘关系较近。

关键词 少毛钝绥螨; 生物学特性; rDNA ITS; 序列分析; 系统发育

中图分类号: S 476 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018533

Biological characteristics and rDNA ITS sequence analysis of *Proprioseiopsis asetus* (Acari: Phytoseiidae)

HUANG Jianhua¹, SUN Qiang², YANG Yingqing¹, LAN Bo¹, LI Xiangmin^{1*}

(1. Institute of Plant Protection, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, China;

2. Huangdao Customs House, P. R. China, Qingdao 266555, China)

Abstract *Proprioseiopsis asetus* (Chant) (Acari: Phytoseiidae) is a widespread predatory mite in China, and it is poorly investigated. We studied the feeding habits of *P. asetus* reared on the first instar nymphs of *Thrips tabaci* Lindeman, *Aleuroglyphus ovatus* Troupeau, *Panonychus citri* McGregor and *Luffa cylindrical* Roem pollen. The results showed that *P. asetus* could feed on the above four foods; *A. ovatus* and *T. tabaci* were the most consumed preys, and *P. citri* was the least consumed. The molecular identification results revealed that its ITS sequence shared an identity of 100% with that of *P. asetus* and it was therefore identified as *P. asetus*. There existed differential bases at the 61–85 bp, 116–159 bp, 177–198 bp, 224–254 bp, 277–317 bp, 531–549 bp, 438–445 bp and 580–594 bp fragments of ITS sequences between *P. asetus* and its related predatory mites. *P. asetus* and its related predatory mites clustered as 2 groups, in which *Proprioseiopsis*, *Neoseiulus* and *Amblyseius* clustered as a group (Group I), while *Euseius* clustered as another group (Group II). *P. asetus* was phylogenetically closer to *N. womersleyi* and *N. agrestis*.

Key words *Proprioseiopsis asetus*; biological characteristics; rDNA ITS; sequence analysis; phylogenetic relationship

少毛钝绥螨 *Proprioseiopsis asetus* (Chant) 由 Chant 于 1959 年首次报道, Fouly 等 1994 年首次描述了其雌雄螨及若螨形态^[1-2]。国内也对其形态进行了描述, 中国经济昆虫志及中国动物志中均有记述^[3-4]。该螨分布广泛, 美国、巴西、墨西哥、牙买加、

中国均有分布, 模式种产地为美国弗吉尼亚, 其栖息植物有苦苣菜、柑橘、芒果、苹果、沙松、山核桃、多年生杂草、刺柏属植物、凤眼蓝、葡萄柚等^[1-10]。少毛钝绥螨食性较广, 可以捕食蓟马如烟蓟马 *Thrips tabaci* Lindeman、南黄蓟马 *T. palmi* Karny、西花蓟马 *Fran-*

收稿日期: 2018-12-27 修订日期: 2019-01-11

基金项目: 江西省科技支撑计划(20122BBF60103); 公益性行业(农业)科研专项(200903032); 国家自然科学基金(31460456); 江西省杰出青年人才计划(20171BCB23081)

* 通信作者 E-mail: xml1025@aliyun.com

kliniella occidentalis (Pergande),二斑叶螨 *Tetranychus urticae* Koch、东方真叶螨 *Eutetranychus orientalis* (Klein),侧多食跗线螨 *Polyphagotarsonemus latus* (Bank)等有害生物,及多种植物花粉^[11-16]。

2011 年,本项目组从烟蓟马 *T. tabaci* Lindeman 为害的芦笋上分离到一种捕食螨,并成功在室内通过饲喂粉螨建立了种群,该捕食螨经中国农业科学院植物保护研究所徐学农研究员团队鉴定为少毛钝绥螨。少毛钝绥螨的学名有多次变迁,先后归属于盲走螨属和钝绥螨属。少毛钝绥螨生物学习性的研究及系统发育研究相对缺乏,为更好地弄清该螨的生物学习性和分类定位,本文拟研究其食性等基本生物学特性并通过捕食螨 28S rDNA 片段的进化分析,初步明确该捕食螨的生活习性及其在分子进化上的地位,为该捕食螨的鉴定和应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试虫源:少毛钝绥螨采集于江西省农业科学院芦笋创新中心基地,并在室内饲喂粉螨建立种群。

生化试剂:昆虫总 DNA 提取试剂盒购自 OMEGA 公司,LA *Taq* 酶、凝胶回收试剂盒、克隆 T 载体 pMD18-T 购自宝生物(大连)有限公司,其他常用药品均为国产分析纯。

1.2 少毛钝绥螨食性及食量观察

试验装置参照黄建华等^[17]的方法。在食性及食量初步试验的基础上,在 25℃下,随机取用粉螨饲养的少毛钝绥螨雌成螨,每头雌成螨分别用足量烟蓟马 1 龄若虫、椭圆食粉螨低龄若螨、柑橘全爪螨低龄若螨、丝瓜花粉饲喂,24 h 后观察少毛钝绥螨对 3 种猎物的捕食量,及对丝瓜花粉的食性。连续饲养观察 5 d,取平均值。

1.3 分子生物学鉴定

①基因组 DNA 的提取:按照 OMEGA 昆虫 DNA 提取试剂盒使用说明书的方法提取少毛钝绥螨基因组 DNA,提取的 DNA 置于-20℃冰箱中保存备用。② rDNA ITS 通用引物分别为 rD43(5'-gac-ccgcgctgaacttaagcat-3')和 rD13(5'-cgtgttttcaagacgggt-caaataact-3')^[18],对供试材料进行 ITS 区段 PCR 扩增。反应在 25 μL 体系中进行,各组分如下:2.5 mmol/L dNTPs 2 μL、5 U/μL *LA Taq* 酶 0.2 μL、10×PCR buffer

2.5 μL、5 μmol/L 引物 27F 1 μL、5 μmol/L 引物 1500R 1 μL、基因组 DNA 1 μL,加 ddH₂O 至 25 μL。扩增程序:94℃预变性 2 min;94℃变性 15 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,30 个循环;72℃延伸 7 min。4℃保存。④目的片段的克隆与测序:从琼脂糖凝胶上将 ITS 扩增条带切下,将 LB 菌液送交北京六合华大基因科技股份有限公司测序。⑤序列比对与测定:测序后的 rDNA ITS 序列在 NCBI(<http://misuse.ncbi.nih.gov/>)上采用 BLAST 比对,并根据比对结果进行分子鉴定。

1.4 序列差异性分析

将少毛钝绥螨 ITS 序列提交 NCBI(<http://misuse.ncbi.nih.gov/>)GenBank,获得相应的序列登录号。选取其近缘种捕食螨,温氏新小绥螨 *Neoseiulus womersleyi*、*N. agrestis*、黄瓜新小绥螨 *N. cucumeris*、*N. reductus*、东方钝绥螨 *Amblyseius orientalis* 等的 rDNA ITS 序列,用 GeneDoc 软件对其 ITS 序列进行比对。

1.5 系统发育分析

用 MEGA 4.0 软件中的邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统发育树,分析了少毛钝绥螨与其同属近缘种的系统发育关系。

2 结果

2.1 少毛钝绥螨食性食量观察

少毛钝绥螨可捕食烟蓟马、椭圆食粉螨和柑橘全爪螨,并可取食丝瓜花粉,按捕食量大小依次为椭圆食粉螨、烟蓟马、柑橘全爪螨,且对椭圆食粉螨的捕食量显著高于烟蓟马和柑橘全爪螨,对后两者的捕食量无显著差异。少毛钝绥螨取食后,体色变为红色。少毛钝绥螨的捕食量见表 1,形态见图 1。

表 1 少毛钝绥螨对几种猎物的日均捕食量(25℃)¹⁾

Table 1 Consumptions of several preys by *Proprioseiopsis asetus* (25℃)

猎物种类 Kind of prey	捕食量/头 Consumption per predator
椭圆食粉螨 <i>Aleuroglyphus ovatus</i>	(72.2±3.50)a
烟蓟马 <i>Thrips tabaci</i>	(12.5±0.19)b
柑橘全爪螨 <i>Panonychus citri</i>	(10.0±0.24)b
丝瓜花粉 <i>Luffa cylindrical</i> pollen	—

1) 表中数字为平均值±标准误;同列数据后的不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。

Data in the table are means±SE. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference between different kinds of preys at 0.05 level.

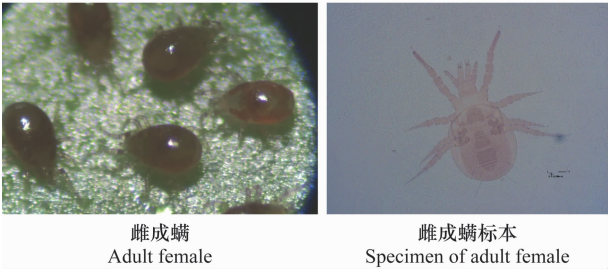


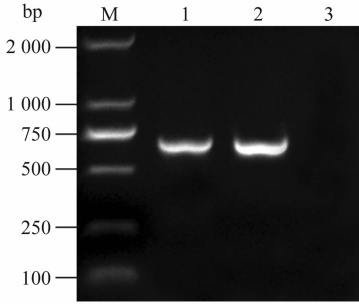
图 1 少毛钝绥螨雌成螨

Fig. 1 Adult females of *Proprioseiopsis asetus*

2.2 少毛钝绥螨 PCR 扩增

用 rDNA ITS 引物对少毛钝绥螨进行 PCR 扩增,得到 650 bp 左右的条带(图 2)。

将 PCR 产物切胶回收,克隆到 *E. coli* DH5 α , 经测序、拼接,获得少毛钝绥螨 *P. asetus* 的 ITS 序列,大小在 600~650 bp 之间。将获得的序列上传 NCBI(<http://misuse.ncbi.nih.gov/>)GenBank, 获得登录号 KJ630509 和 KJ630510。



M: DL2000 DNA Marker; 1-2: *Proprioseiopsis asetus*; 3: ddH₂O

图 2 少毛钝绥螨 rDNA ITS 引物 PCR 扩增

Fig. 2 PCR amplification of *Proprioseiopsis asetus* with rDNA ITS primers

2.3 序列差异性分析

少毛钝绥螨及其近缘种 ITS 序列在 61~85、116~159、177~198、224~254、277~317、531~549、438~445 bp 和 580~594 bp 等 ITS 区段存在差异性碱基,表明少毛钝绥螨及其近缘种的 ITS 序列存在一定分化(图 3)。

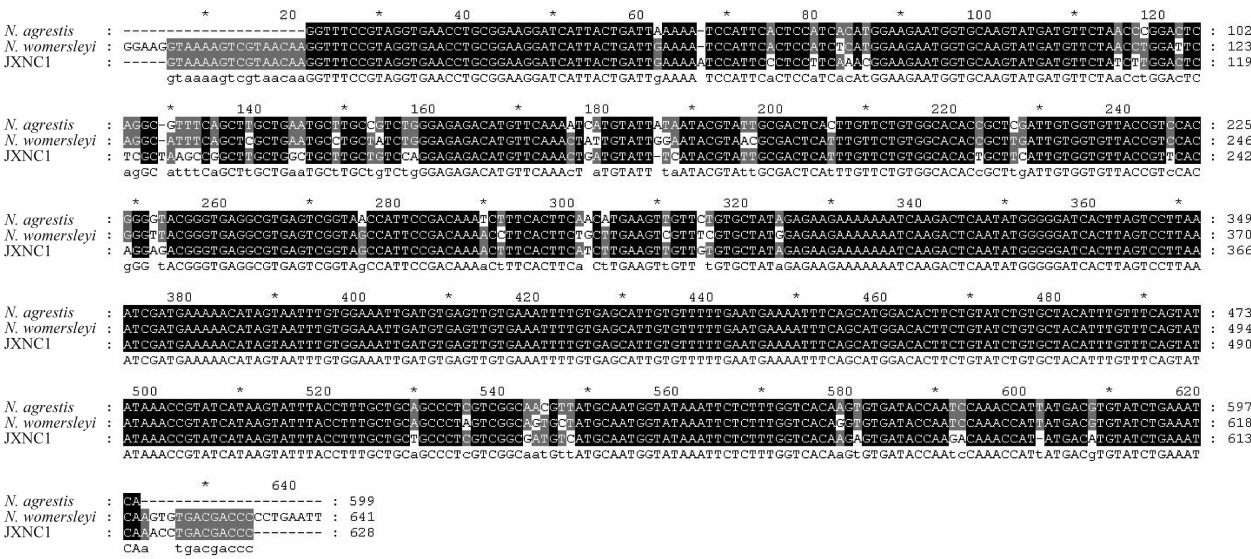


图 3 少毛钝绥螨及其近缘种 rDNA ITS 序列比对

Fig. 3 Alignment of rDNA ITS sequences of *Proprioseiopsis asetus* and other related predatory mites

2.4 系统发育分析

少毛钝绥螨及其近缘种分为两个组群。*Neo-seiulus*、*Amblyseius*、*Proprioseiopsis* 聚为一个组群(Group I),而 *Euseius* 单独聚为一个组群(Group II)。少毛钝绥螨 *P. asetus* 与 *N. womersleyi* 和 *N. agrestis* 亲缘关系较近(图 4)。

3 讨论

本研究通过对少毛钝绥螨对几种猎物的捕食能力的研究,初步明确了少毛钝绥螨可以捕食烟蓟马、椭圆食粉螨、柑橘全爪螨,且对烟蓟马、椭圆食粉螨具有较强的捕食能力,对柑橘全爪螨捕食能力较弱,

原因可能是柑橘全爪螨在本试验装置内容易结网,导致捕食螨捕食困难;对粉螨的捕食量较大与粉螨初孵若螨个体较小有关。少毛钝绥螨性较活跃,其雄螨较雌螨个体小,个体约为雌螨一半。初孵少毛

钝绥螨与成熟少毛钝绥螨体色有较大差异,初孵螨体色淡褐色,成熟螨,尤其是取食产卵后,体色为暗红色,研究结果与 Denmark 和 Muma^[7]的结果基本一致。

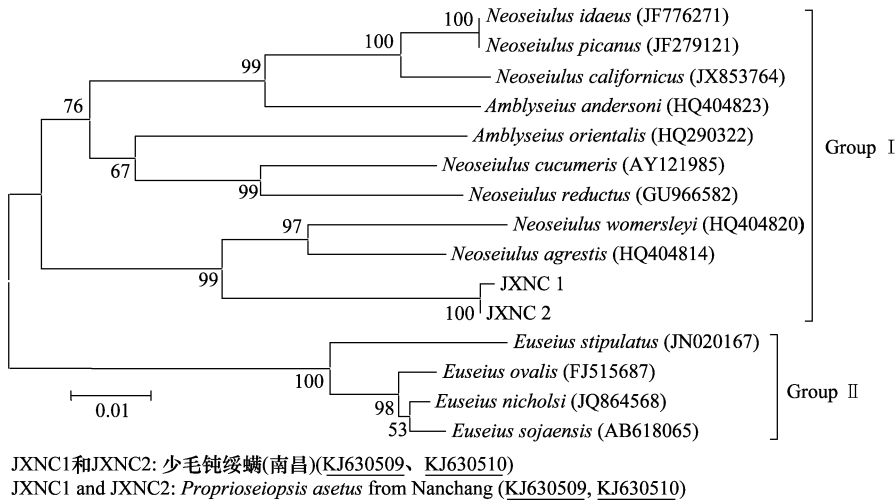


图 4 少毛钝绥螨及其近缘种 ITS 序列系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on ITS sequences of *Proprioiseiopsis asetus* and other related predatory mites

通过系统发育树研究,温氏新小绥螨 *N. womersleyi* 和 *N. agrestis* 亲缘关系较近,可组成同一个类群,以上两种螨均为小新绥螨属。通过捕食螨学名命名变迁可以了解到,钝绥螨与小新绥螨亲缘关系较近,本文研究的少毛钝绥螨与以上两种螨在 28S rDNA 进化上的亲缘关系最近。因此以捕食螨的 rDNA ITS 序列为依据判断其亲缘关系是有意义的。

少毛钝绥螨作为一种从芦笋田分离出的捕食螨,其自然捕食猎物为芦笋烟蓟马,该螨可以在室内通过用麦麸饲养粉螨来饲养,这有助于该捕食螨的规模化繁殖。本文进行的生物学观察及分子进化研究,有助于在系统分类上明确该捕食螨的分类地位,为捕食螨的基础研究提供参考。

参考文献

[1] CHANT D A. Phytoseiid mites (Acarina: Phytoseiidae) Part I. Bionomics of seven species in Southeastern England. Part II. A taxonomic review of the family Phytoseiidae, with descriptions of 38 new species [J]. Canadian Entomologist, 1959, 91(S12): 1-166.

[2] FOULY A H, DENMARK H A, CHILDERS C C. Description of the immature and adult stages of *Proprioiseiopsis rotundus* (Muma) and *Proprioiseiopsis asetus* (Chant) from Florida (Acari: Phytoseiidae) [J]. International Journal of Acarology, 1994, 20(3): 199-207.

[3] 吴伟南,梁来荣,蓝文明. 中国经济昆虫志第五十三册蜱螨亚

纲植绥螨科[M]. 北京:科学出版社, 1997: 62-63.

[4] 吴伟南,欧剑锋,黄静玲. 中国动物志无脊椎动物第四十七卷蜱形纲蜱螨亚纲植绥螨科[M]. 北京:科学出版社, 2008: 176-178.

[5] 方小端,吴伟南,李健雄. 广州市植绥螨调查名录[J]. 昆虫天敌, 2007, 29(3): 138-141.

[6] MUMA M H, DENMARK H A. Arthropods of Florida and neighboring lands areas. Vol. 6. Phytoseiidae of Florida [M]. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, 1970: 44-45.

[7] DENMARK H A, MUMA M H. Phytoseiidae of Jamaica, an annotated list (Acari: Mesostigmata) [J]. International Journal of Acarology, 1978, 4(1): 1-22.

[8] CHILDERS C C, ENNS W R. Predaceous arthropods associated with spider mites in missouri apple orchards [J]. Journal of the Kansas Entomological Society, 1975, 48(4): 453-471.

[9] MUMA M H. Phytoseiidae of sand-pine litter [J]. Florida Entomologist, 1968, 51(1): 37-44.

[10] TUTTLE D M, MUMA M H. Phytoseiidae (Acarina: Mesostigmata) inhabiting agricultural and other plants in Arizona. Technical bulletin, vol. 208 [M]. Tucson, AZ: Agricultural Experiment Station, University of Arizona, 1973: 8-9.

[11] EMMERT C J, MIZELL R F, ANDERSEN P C, et al. Diet effects on intrinsic rate of increase and rearing of *Proprioiseiopsis asetus* (Acari: Phytoseiidae) [J]. Annals of the Entomological Society of America, 2008, 101(6): 1033-1040.

[12] EMMERT C J, MIZELL R F, ANDERSEN P C, et al. Effects of contrasting diets and temperatures on reproduction and prey consumption by *Proprioiseiopsis asetus* (Acari: Phytoseiidae) [J]. Experimental and Applied Acarology, 2008, 44(1): 11-26.

本研究发现,供试的 29 个马铃薯品种中,抗病基因组成类型多样,不同品种所含的抗病基因组成不同,每个品种平均含有 4 个抗病基因。‘陇薯 6 号’含抗病基因数量最多,含有测试的 8 个抗病基因中的 7 个,在马铃薯室内抗性水平测定中表现中抗;‘GS-3’仅含一个抗病基因 R1,在马铃薯室内抗性水平测定中表现中感;‘HB-5’未检测到供试的 8 个抗病基因,在马铃薯室内抗性水平测定中表现高感;在马铃薯室内抗性水平测定中表现免疫的品种‘HB-2’本次检测只发现 6 个抗性基因,说明‘HB-2’可能还含有我们没有检测到的抗性基因;其他品种(品系)含有 3~6 个抗病基因。我们通过分析马铃薯品种(品系)室内的抗性水平和抗病基因数量间的关系(图 5)发现,供试的马铃薯品种(品系)中所含抗性基因的数量和品种抗性水平呈显著正相关($r=0.9156$, $P=0.0291$),表明品种中抗病基因的增加可以提高品种的抗病性。马红梅^[10]和尹军良^[11]同样也发现马铃薯品种抗病基因数量和病情指数呈显著负相关,表明聚合抗病基因越多的品种田间抗病表现越好。因此,在抗病育种工作中可通过向马铃薯品种中聚合更多的抗病基因来提高品种的抗性水平。该结果从抗病基因水平证明了基因聚合在马铃薯抗病育种中的必要性及对晚疫病防治工作的重要意义。

参考文献

- [1] BIRCH P R J, BRYAN G, FENTON B, et al. Crops that feed the world 8: Potato: are the trends of increased global production sustainable [J]. Food Security, 2012, 4(4): 477–508.
- [2] 卢肖平. 马铃薯主粮化战略的意义、瓶颈与政策建议[J]. 华中农业大学学报(社会科学版), 2015(3): 1–7.
- [3] ZHU Suxian, VOSSSEN J H, BERGERVOET M, et al. An updated conventional- and a novel GM potato late blight *R* gene differential set for virulence monitoring of *Phytophthora infestans* [J]. Euphytica, 2015, 202(2): 219–234.
- [4] 邱仍, 陶刚, 李奇科, 等. 农杆菌渗入法介导的基因瞬时表达技术及应用[J]. 分子植物育种, 2009, 7(5): 1032–1039.

(上接 211 页)

- [13] FOULY A H. Effects of prey mites and pollen on the biology and life tables of *Proprioseiopsis aetus* (Chant) (Acari, Phytoseiidae) [J]. Journal of Applied Entomology, 1997, 121(1–5): 435–439.
- [14] HUANG J H, FREED S, WANG L S, et al. Effect of temperature on development and reproduction of *Proprioseiopsis aetus* (Acari, Phytoseiidae) fed on asparagus thrips, *Thrips tabaci* [J]. Experimental and Applied Acarology, 2014, 64(2): 235–244.
- [15] 何琦琛, 陈文华. 马氏捕植螨及少毛捕植螨捕食南黄蓟马之生活史和捕食量[J]. 台湾昆虫, 2001, 21(4): 321–328.

- [5] DU Juan, RIETMAN H, VLEESHOUWERS V G AA. Agroinfiltration and PVX agroinfection in potato and *Nicotiana benthamiana* [J/OL]. Journal of Visualized Experiments, 2014, 83: e50971.
- [6] RIETMAN H, BIJSTERBOSCH G, CANO L M, et al. Qualitative and quantitative late blight resistance in the potato cultivar Sarpo Mira is determined by the perception of five distinct RXLR effectors [J]. Molecular Plant-microbe Interactions, 2012, 25(7): 910–919.
- [7] KIM H J, LEE H R, JO K R, et al. Broad spectrum late blight resistance in potato differential set plants MaR8 and MaR9 is conferred by multiple stacked *R* genes [J]. Theoretical & Applied Genetics, 2012, 124(5): 923–935.
- [8] 王洪洋, 秦丽娟, 唐唯, 等. 致病疫霉 RXLR 效应蛋白相关研究进展[J]. 生物技术通报, 2018, 34(2): 102–111.
- [9] 周晶, 张子莹, 路远, 等. 利用晚疫病菌无毒基因瞬时表达技术鉴定马铃薯抗病基因[J]. 中国马铃薯, 2014(4): 217–224.
- [10] 马红梅. 西北地区部分马铃薯主栽品种晚疫病抗性鉴定和抗病基因组成分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
- [11] 尹军良. 西北地区马铃薯主栽品种的抗晚疫病性评价及致病疫霉菌候选核心 RXLR 效应基因的鉴定[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
- [12] 齐明星. 致病疫霉线粒体单倍型 PCR 检测方法的建立及应用[D]. 保定: 河北农业大学, 2014.
- [13] FLOR H H. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini* [J]. Phytopathology, 1942, 32: 653–669.
- [14] VLEESHOUWERS V G A A, OLIVER R P. Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic plant pathogens [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2014, 27(3): 196–206.
- [15] SONG Junqi, BRADEEN J M, NAESS S K, et al. Gene *RB* cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight [J]. Proceedings of National Academy Sciences of United States America, 2003, 100(16): 9128–9133.
- [16] VLEESHOUWERS V G AA, RAFFAELE S, VOSSSEN J H, et al. Understanding and exploiting late blight resistance in the age of effectors [J]. Annual Review of Phytopathology, 2011, 49(1): 507–531.
- [17] JONES J D G, WITEK K, VERWEIJ W, et al. Elevating crop disease resistance with cloned genes [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Science, 2014, 369(1639): 20130087.

(责任编辑: 杨明丽)

- [16] 王丽思, 陈洪凡, 黄建华, 等. 丝瓜花粉对少毛钝绥螨发育和繁殖的影响[J]. 植物保护, 2016, 42(5): 110–112.
- [17] 黄建华, 王丽思, 秦文婧, 等. 一种捕食螨饲养观察装置[J]. 应用昆虫学报, 2015, 52(3): 776–779.
- [18] SONODA S, KOHARA Y, SIQINGERILE, et. al. Phytoseiid mite species composition in Japanese peach orchards estimated using quantitative sequencing [J]. Experimental and Applied Acarology, 2012, 56(1): 9–22.

(责任编辑: 田 喆)