技术与方法

昆虫蜜露研究方法*

张蓓蓓** 张泽龙 何海芳 李静静 白素芬*** 闫凤鸣

（河南农业大学植物保护学院，郑州 450002）

摘 要 本文在概述昆虫蜜露的分泌节律、组成成分以及生态学意义等的基础上，全面介绍了昆虫蜜露的定性和定量研究方法。详述了显色法、称量法、比色法、油滴法和蜜露钟法的具体步骤、注意事项和实例，并比较了这 5 种检测方法的优缺点，供相关工作者使用时参考。

关键词 昆虫蜜露；昼夜节律；显色法；比色法；蜜露钟

Review of insect honeydew research methods

ZHANG Bei-Bei** ZHANG Ze-Long HE Hai-Fang
LI Jing-Jing BAI Su-Fen*** YAN Feng-Ming

(College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract This paper summarizes the excretion rhythm, components and ecological significance of insect honeydew, and both qualitative and quantitative honeydew research methods, including chromogenic assay, weighing, colorimetry, oil drop measurement and the honeydew-clock. Detailed procedures, key points and examples of these five methods are provided, together with a comparison of their advantages and disadvantages.

Key words insect honeydew; circadian rhythms; chromogenic assay; colorimetry; honeydew-clock

1 昆虫蜜露概述

半翅目昆虫中多数种类为植食性，用刺吸式口器刺入寄主植物韧皮部或木质部吸食汁液。植物韧皮部含有高浓度的糖类，通常是蔗糖和一些低聚糖，以韧皮部为食的昆虫相比于其他营养物质摄入了过量的糖类，为保证虫体内渗透压的平衡，多达 90%的糖类通过肛门排出，而这种富含糖的物质就是蜜露（Honeydew）（Ghaffar，2012）。蜜露分为含氨基酸蜜露和无氨基酸蜜露，前者是昆虫取食韧皮部汁液时分泌的，而无氨基酸的蜜露则是昆虫取食木质部时分泌的（Kimmins，1989）。分泌蜜露的昆虫主要集中在半翅目胸喙亚目（Sternorrhyncha）中的粉虱科（Aleyrodidae）、木虱科（Psyllidae）、棉蚧科（Monophlebidae）、粉蚧科（Pseudococcidae）、胶蚧科（Kerridae）、蚧科（Coccidae = Lecaniidae）、蚜科（Aphididae）；蜡蝉亚目（Fulgoromorpha）的蜡蝉科（Fulgoridae）、飞虱科（Delphacidae）；以及蝉亚目（Cicadomorpha）的蝉科（Cicadellidae）、沫蝉科（Cercopidae）、叶蝉科（Jassidae）等。昆虫分泌的蜜露常覆盖于植物叶片或植株表面，并诱发煤污病，影响植物的光合作用和呼吸作用，是半翅目昆虫危害植物的一个重要方面。

1.1 分泌规律

蜜露分泌与昆虫的取食刺吸行为有着密切

*资助项目 Supported projects：国家自然科学基金项目（31871973，31901886）

**第一作者 First author，E-mail：15225154669@163.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：sfbai68@henau.edu.cn

收稿日期 Received：2019-11-19；接受日期 Accepted：2020-01-09

的关系。取食时，刺吸式昆虫的口器先是刺入植物叶肉组织，然后穿过纤维细胞，最后达到维管束取食。昆虫在韧皮部取食期间会连续分泌蜜露，在口针到达韧皮部之前和在木质部取食期间则很少有蜜露产生。因为木质部导管内的液体压力为负值，使得一般在韧皮部取食的昆虫只有特别需要在补充水分时才会在木质部取食，而且大部分的汁液会留在体内以防止水分散失（Seo *et al.*，2009）。昆虫在韧皮部取食时，蜜露会在昆虫的肠道中累积，当积累到一定程度就会通过肛门以一定的频率喷射，通常每 15-40 min 一次。其中 1 头雌成蚜每隔 30-50 min 排泄一滴蜜露，可连续分泌 5-8 h；柑橘木虱 *Diaphorina citri* 雌成虫每隔 20-30 min 排泄一次，而雄成虫每隔 4 min 或更长时间分泌一次，待多滴蜜露堆积变大后雄成虫就会转移至其它地方取食（Ammar *et al.*，2013）。蜜露滴的大小与消化道的粗细有关，消化道的粗细是伴随虫龄而变化的（张克斌等，1982），随着虫龄的增大，昆虫的排蜜量也逐渐增多。就黑尾叶蝉 *Nephotettix bipunctatus* 而言，其在高龄若虫期和成虫期分泌的蜜露量之和占全世代的 90%左右，且尤以雌成虫分泌的蜜露为多（高明昌和余根中，1989）。此外，蜜露的分泌频率和分泌量还受到昆虫种类、大小和寄主植物等多种因素的影响。

已有研究发现，昆虫蜜露的分泌行为与昼夜节律有着密切关系，且不同种昆虫的分泌节律存在差异。例如，中国梨木虱 *Psylla chinesis* 若虫在白天分泌 128.33 μg，占昼夜分泌总量的 36.79%；夜间为 220.51 μg，占昼夜分泌总量的 63.21%，夜间的分泌量明显高于白天（盖英萍等，2019）。而棉蚜 *Aphis gossypii* 却与之相反，白天分泌 209.7 μg，占总量的 60%；夜间分泌 144.6 μg，仅占总量的 40%（张克斌等，1982）。这种不同时间段蜜露分泌量的不同表明了昆虫一日之内的活动规律，亦反映了昆虫生活节律与环境的同步关系，有着重要的生态学和生理学意义。

1.2 组成成分

从生理角度来看，蜜露最主要的成分是水（占 95%以上），内含未被昆虫完全吸收的韧皮部（或木质部）汁液中的某些化合物以及昆虫的代谢废物，且蜜露的组成成分受到寄主植物、昆虫种类、种群密度、虫龄等多种因素影响，其中寄主植物和昆虫种类影响较为显著（Byrne *et al.*，1990；刘万学等，2007）。从含量上来说，蜜露中糖类占绝对优势。蔗糖是导致昆虫体内渗透压升高的主要原因，因为肠道内的蔗糖不能穿过细胞膜被细胞吸收（Price and Gatehouse，2014），昆虫为降低或消除体内的高渗透压，将过量摄入的糖类转化成长链寡糖，随着蜜露排出体外。蜜露中还存在含氮物质，主要是氨基酸和一些含氮的代谢废物。在韧皮部汁液中，氨基酸是主要的含氮化合物。但并不是所有摄入的氨基酸都能被昆虫的肠道吸收并同化（同化效率为 60%-99%），未被利用的氨基酸通常以蜜露的形式排出。此外，蜜露中还可能存在微生物，这些微生物有可能来自摄入的韧皮部汁液（并直接通过肠道），也有可能来自昆虫自身的微生物体系。例如，以感染黄矮病毒的植物为食的蚜虫会从韧皮部汁液中摄取病毒颗粒，那些未进入昆虫血淋巴的病毒颗粒会随蜜露排出。昆虫自身携带的植物病毒也可能进入肠道，并从蜜露中排出。

已有研究表明，蜜露中一般包含 14 种糖类，包括蔗糖、果糖、葡萄糖、海藻糖、麦芽糖和甘露糖醇等，蚜虫、木虱和粉虱等昆虫蜜露中糖类成分基本一致（Dhami *et al.*，2011）。氨基酸成分分析表明，蜜露中一般含有 13 种氨基酸，通常是缬氨酸、天冬氨酸、甘氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸等。蜜露中氨基酸的成分大部分与昆虫取食的植物成分相同，但也有昆虫自身所特有的氨基酸。例如，取食健康甜橙的柑橘木虱 *D. citri* 若虫分泌的蜜露中含有羟脯氨酸，而寄主植物汁液中并不存在羟脯氨酸（任素丽，2016）。此外，蜜露中含氮的代谢废物，通常是尿素和氨，含量很低。

1.3 生态学意义

半翅目昆虫分泌蜜露既是一种生理过程，也具有很重要的生态学作用。一是具有促进共生以及增加养分循环等功能（Moir *et al.*，2018）。昆虫分泌的蜜露是蚂蚁、蜜蜂、寄生蜂、蝇类、螨

类以及蛾类等昆虫的重要食物资源之一（Morales，2000；Gautam *et al.*，2018；Sakagami and Sugiura，2018）。以蜜露为纽带，许多蚂蚁与分泌蜜露的昆虫之间发生着复杂的共栖或共生关系（Del-Claro and Oliveira，1996）。而不被其他昆虫食用的蜜露能够促进土壤中微生物及真菌的生长，从而促进营养循环。二是昆虫蜜露作为一种利它素在昆虫-天敌互作中发挥重要作用。因为蜜露中含有的糖、氨基酸和微量元素等物质，可以被一些天敌昆虫用来补充营养，从而提高繁殖力,延长成虫的寿命；由于蜜露与寄主存在的位置有很大的相关性，是天敌搜索猎物的线索，有利于提高天敌寄生或捕食的效率（Wäckers，2000；陆宴辉等，2005）。此外，当蜜蜂取食被真菌感染的蜜露还能使其死亡（Ciro *et al.*，2018）。

研究昆虫蜜露具有重要的生态学意义。如采用 DNA 宏条形码技术，可以从蜜蜂的蜂蜜中鉴定出分泌蜜露的刺吸式昆虫的组成，从而监测农业和林业生态系统中刺吸式昆虫的变化（Joe *et al.*，2018）；蜜露还可以用于研究气候变化，如二氧化碳升高所产生的影响。CO_2 升高虽对植物产生不利影响，如叶部氨基酸减少，但蚜虫的蜜露分泌量和其中的游离氨基酸总量会显著增加（Sun *et al.*，2009），从而有利于招引更多的蚂蚁（Kremer *et al.*，2018）。CO_2 升高还会改变蚜虫蜜露的组成成分，尤其是挥发性有机化合物，但并未影响天敌昆虫（Antoine *et al.*，2018）；蜜露可以用于转基因生物的安全性评价。取食转基因作物的昆虫，蜜露分泌量减少，且蜜露中可溶性总糖、蔗糖和各种氨基酸的含量会发生变化，但蜜露的组分基本不变。如取食转 Bt 基因水稻的褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 分泌的蜜露与取食非转基因的组分没有明显变化，且对取食该蜜露的寄生蜂的存活及生长繁殖没有影响（Tian *et al.*，2018）；因蜜露量与蚂蚁种群密度呈正相关性，对于入侵害虫阿根廷蚂蚁 *Linepithema humile* 的防治，可通过减少种植易滋生产蜜露昆虫的树种而实现（Seko *et al.*，2018）。此外，蜜露还是一种新型果糖乳酸菌的潜在来源物质（Klaudia *et al.*，2018）。由此可见蜜露的研究价值。

2 蜜露检测方法

很多以刺吸植物韧皮部汁液为食的半翅目昆虫，如蚜虫、粉虱、叶蝉等以蜜露的方式将多余的养分排出体外，排蜜量的多少与昆虫的种类、虫态、虫龄、性别、大小等生理状态，环境的温度、湿度、光照，寄主植物的抗生性和物理状态等多种因素密切相关，因此蜜露检测成为反映昆虫取食行为、鉴定植物抗性水平的重要途径。

蜜露的检测涉及到蜜露的收集和分泌量的测定。可以用 Parafilm 膜、玻璃片和植物油等收集蜜露，之后可分别进行称重、蜜露滴数和蜜露直径的测定，以反映蜜露的分泌量。蜜露的主要成分是糖和氨基酸，可以与溴甲酚绿（蓝）和茚三酮反应变色，因此国内外很多研究学者用溴甲酚绿(蓝)和茚三酮检测蜜露中的糖和氨基酸(周晓静等，2012)。有关蜜露的检测方法较多，本文将对蜜露收集和检测中最常用的显色法中蜜露色斑面积法、称量法、比色法和油滴法加以概述，并介绍蜜露钟法。

2.1 半定量法——蜜露色斑面积法

以往研究表明，半翅目昆虫取食后同化的食物量占总取食量的比例较小，仅为 1%-6%，大部分食物以蜜露的形式排放出去，因此昆虫蜜露的分泌量与取食量呈正比。通过半定量法即测量昆虫取食后分泌蜜露的色斑面积能够反映其取食量的差异。蜜露色斑面积法中主要用茚三酮法、溴甲酚绿（蓝）法进行检测。

2.1.1 茚三酮显色法

2.1.1.1 步骤

1%茚三酮溶液的制备：用电子天平准确称取 1 g 无水茚三酮，用体积分数为 95%乙醇溶液充分溶解并定容至 100 mL，溶液呈淡黄色，即配即用。

显色滤纸的制备：将直径为 9 cm 的滤纸浸渍在 1%茚三酮溶液中，取出置于 75 ℃的烘箱

中烘干或自然晾干，滤纸呈浅黄色。

接虫：挑取一定数量的昆虫接在相应植株材料叶片的背面，并使叶背朝下，在叶片下方的培养皿内铺上 1%茚三酮滤纸，25 ℃恒温培养。

计算色斑面积：昆虫分泌的蜜露滴在滤纸上即变成紫红色，如图 1 所示。一段时间后取出滤纸，用铅笔画出色斑周缘，以防褪色，拍照并用透明的九宫格坐标纸测量滤纸上紫红色斑点面积。

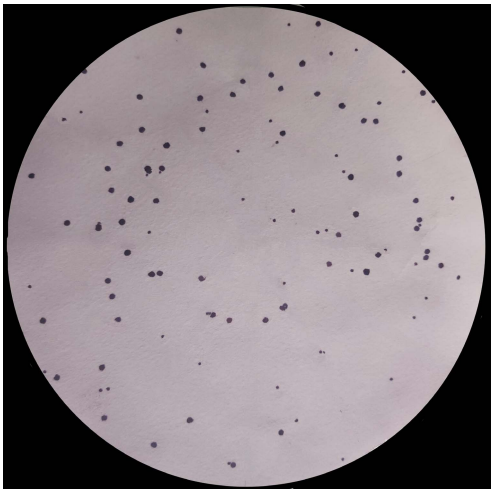

图 1　茚三酮显色法示滤纸上呈紫色的蜜露
Fig. 1　The honeydew drops turned violet on filter paper using ninhydrin

2.1.1.2　示例　棉蚜在不同转基因棉上蜜露分泌量的测定（周晓静等，2012）

挑取 5 头初产仔蚜作为初始蚜分别接在棉 12、棉 8009、中棉 41、中棉 H2、苏 011、中棉 23、中棉 8008、苏 006、晋棉 34 和太 8 这 10 个棉花材料叶片的背面，当若蚜发育至 3 龄或 4 龄时，在棉叶下方的培养皿内铺上经质量分数为 1%的茚三酮浸泡并烘干的滤纸，24 h 后取出滤纸，用标准计算纸测量滤纸上紫红色斑点面积，即得到取食不同转基因棉后棉蚜分泌蜜露的色斑面积。

经测量并比较色斑面积的大小得到如下结果：棉 12>棉 8009>中棉 41>中棉 H2>苏 011>中棉 23>中棉 8008>苏 006>晋棉 34>太 8。说明供试的 10 个棉花材料对棉蚜的取食产生不同的影响，反映在棉蚜蜜露的色斑面积存在差异，其中棉 12 最适合棉蚜的取食，蜜露色斑面积最大；太 8 对棉蚜取食有一定的抑制作用，色斑面积最小。

2.1.2　溴甲酚绿显色法

步骤　0.1%溴甲酚绿溶液的制备：用电子天平准确称取 0.1 g 溴甲酚绿，用体积分数为 95%乙醇溶液充分溶解并定容至 100 mL，密封干燥保存。

溴甲酚绿滤纸的制备：将直径为 9 cm 的滤纸浸渍在 0.1%的溴甲酚绿溶液里，取出置于 75 ℃的烘箱中烘干或自然晾干，滤纸呈鲜桔黄色。

接虫：挑取一定数量的虫子接在相应植株材料叶片的背面，并使叶背朝下，在叶片下方干燥的培养皿内铺上 0.1%的溴甲酚绿滤纸，25 ℃恒温培养。

计算色斑面积：昆虫分泌的蜜露滴在滤纸上即变成孔雀蓝色，如图 2 所示。一段时间后取出滤纸，用铅笔画出色斑的周缘，以防褪色，拍照并用透明的九宫格坐标纸测量滤纸上蓝绿色斑点面积。

图 2　溴甲酚绿显色法示滤纸上呈兰色的蜜露
Fig. 2　The honeydew drops turned blue on filter paper using bromocresol green

2.2　定量法——称量法

2.2.1　试验方法

方法一　挑取一定数量的昆虫，经饥饿处理后用毛刷接在相应植株材料叶片的背面，并使叶背朝下，在叶片下方的培养皿内放置已称重的 Parafilm 膜，一段时间后取出膜，用电子天平称重（精确度 0.000 1g），2 次膜质量的差值即为昆虫取食该植物材料后排泄的蜜露量。

方法二 将一定数量的虫子经饥饿处理后放进已称重的 Parafilm 小袋内，将小袋连同虫子一起挂在植物材料上。待虫子取食一段时间后，取出虫子，只留 Parafilm 小袋。在电子天平上再次称量（精确度 0.000 1g）Parafilm 小袋的质量，蜜露量即为称量前后的重量之差。

2.2.2 注意事项

（1）应保证蜜露量达到天平的检测范围，若所选昆虫个体较小，蜜露分泌量较少，则需要相对较长的接虫时间或较大的虫口密度；

（2）方法一中应选择有较大叶片的植株材料，喜好在叶片背面取食且行动能力较弱的供试昆虫，如蚜虫；方法二中应选择喜好在植物茎秆取食或行动能力较强的有翅昆虫，如褐飞虱；

（3）整个试验应在恒温下进行，温度的变化会影响昆虫的取食行为，从而影响蜜露分泌量。

2.2.3 示例 水分胁迫水稻对褐飞虱蜜露分泌量影响的研究（谭椰，2014）

试验前分别用 15%浓度和 20%浓度的 PEG-6000（以下简称 P）处理健康水稻 2、3 和 5 d。然后将 1 头褐飞虱 5 龄若虫放置进已称重的 Parafilm 小袋中，将小袋连同褐飞虱一起挂在已处理过的试验水稻茎秆上（距根部 8 cm 处）。待褐飞虱取食 24 h 后，取出虫子。在电子天平上再次称量 Parafilm 小袋的重量，蜜露量即为称量前后的重量之差。结果如下，若虫蜜露分泌量不同处理均呈现 5 d>3 d>2 d，且 CK 与 15% P 差异不显著（P>0.05），而与 20%P 差异达显著水平（P<0.05），说明褐飞虱在 CK 和 15% P 胁迫中取食比在 20% P 下更有利。

2.3 溴甲酚（蓝）绿比色法

2.3.1 步骤

溴甲酚（蓝）绿溶液的配制：用电子天平称取 BCG（分析级，Mr 720.02 k）0.1 g，溶于 100 mL 的蒸馏水中得到 0.001 g·mL^{-1} 溴甲酚绿水溶液。

氨基酸最大吸收峰的确定：称 2.879 mg 脯氨酸溶于 300 μL 溴甲酚（蓝）绿，再加 3 mL 体积分数为 95%乙醇后加上塞充分摇匀，用 Spectrum756 型紫外可见分光光度计在 570-700 nm 波长范围内比色，以确定氨基酸最大吸收峰的波长。

昆虫排蜜量的测定：挑取一定数量的昆虫接在相应植株材料叶片的背面，并使叶背朝下，在叶片下方的培养皿内放置 Parafilm 膜，25 ℃恒温培养一定的时间后取出膜，用 300 μL 溴甲酚（蓝）绿分 2 次在膜上收集蜜露再转移到试管中，再用 3.4 mL 体积分数为 95%乙醇分 2 次洗脱后集中在试管中，用紫外可见分光光度计测其在最大吸收峰波长下的吸光度值。

2.3.2 溴甲酚绿显色反应的影响因素 溴甲酚（蓝）绿与脯氨酸的显色反应灵敏度高、稳定性好，但同时也受到多种因素的影响。当试验条件控制不好时，会造成试验数据的较大偏离，从而产生较大的误差。此显色反应的影响因素主要有以下几方面。

（1）脯氨酸浓度的影响：随脯氨酸浓度变大，显色逐渐变深。当浓度过大时，所显颜色过深且其光密度值超出量程。因此应将脯氨酸浓度控制在一合适的范围内时，保证颜色变化明显且显色稳定。

（2）pH 值的影响：显色反应随 pH 的不同颜色有明显的变化。当 pH 在 3.8 以下时呈黄色，而 pH 在 3.6-5.2 时，颜色变化明显，由黄色变为蓝绿色，pH 在 5.4 以上呈蓝绿色。但因为溴甲酚（蓝）绿的水溶液在碱性条件下溶液本身呈的淡黄色，因此 pH 选定在 4.0 左右较好，此时基本无颜色干扰且显色稳定。

（3）温度和反应时间的影响：温度和反应时间对此显色反应的影响也很大。在较低的温度下进行显色反应，有可能无颜色变化。反应时间主要根据具体的颜色变化而定。反应时间太短，反应不完全，颜色变化就会不明显。

（4）其它影响因素：因为蜜露中含有其它氨基酸，也可与溴甲酚（蓝）绿发生显色反应，从而影响测定结果。

总之，溴甲酚（蓝）绿比色法作为蜜露分泌量的定量检测方法，具有准确度高、稳定性好、简单方便、成本低的优点，只要控制好试验条件，就能取得较好的测量结果。

2.3.3 示例 蚜口密度与棉蚜蜜露分泌量相关

性的测定（周晓静等，2012）

试验前先用 Spectrum756 型紫外可见分光光度计测定出氨基酸的最大吸收峰再进行蜜露的测定。因为脯氨酸最大吸收峰时的波长为 628 nm，故选择 628 nm 为测定波长。

分别接 50、80 和 110 头 3 龄若蚜于中棉 12 的棉叶上，在棉叶下方铺 Parafilm 膜，48 h 后取出膜，用 300 μL 溴甲酚绿分 2 次在膜上收集蜜露再转移到试管中，再用 3.4 mL 体积分数为 95% 乙醇分 2 次洗脱后集中在试管，用紫外可见分光光度计测得其在 628 nm 下的吸光度值。结果显示，二者成显著的正相关，且相关系数达 0.998 8，说明比色法可检测棉蚜取食不同棉花材料或转基因棉后，蚜口密度的增长情况，蜜露分泌量大，则相应的蚜口密度高；相反，则蚜口密度低。

2.4　油滴法

2.4.1　植物油收集蜜露过程　挑取 1 头昆虫接在相应植株材料叶片的背面，并使叶背朝下，在叶片下方放置盛有植物油的培养皿接收蜜露，油中事前放有测微尺，蜜露落入油中即成为椭球体，立即将培养皿移至立体显微镜下测量其长、短径，计算蜜露体积（韩宝瑜和周成松，2007）。收集过程中，用秒表记录昆虫蜜露分泌的时间间隔，测出分泌频率，昆虫蜜露的分泌频率和分泌量可以作为其取食的速率和消化量的标志（Ajayi and Dewar，1982）。

2.4.2　注意事项

（1）昆虫最好选取高龄若虫或成虫，试验前可以对昆虫进行饥饿处理，保证有较大的取食量，从而分泌相对较多的蜜露；

（2）如果要探究昆虫昼夜蜜露的分泌节律，应观察某一昆虫 24 h 的分泌情况，且试验应在恒温条件下进行；

（3）由于不同目镜、物镜组合的放大倍数不相同，因此目镜测微尺测量蜜露的长、短径时，须先用置于镜台上的测微尺校正，以求出在一定放大倍数下，目镜测微尺每小格所代表的相对长度；

（4）蜜露中含有一些烃类物质和一些有机化合物，可以溶解在植物油中，因此蜜露落入油中应立刻进行测量，否则蜜露部分溶解，测得的体积不准确；

（5）一叶或一苗接一头虫，保证只有一头虫分泌的蜜露可以落入植物油中，如果同时接几头会来不及测量。

2.5　蜜露钟法

蜜露钟（Honeydew-clock）是一个长为 15 cm、宽为 10 cm、高度为 5 cm 的中空铝质长方体，内部附有 12 h 制的石英钟，上方是一个直径为 12 cm 的透明圆盘，接通电源，打开开关，圆盘开始缓缓转动，12 h 为一个周期，如图 3 所示。

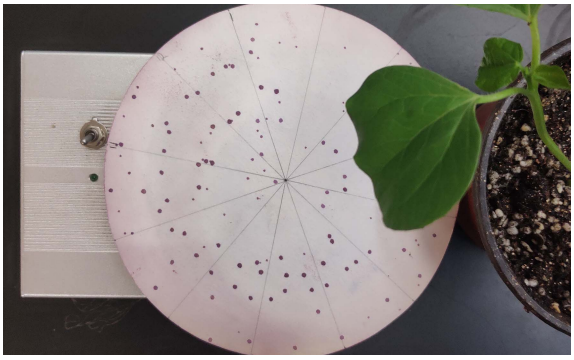

图 3　蜜露钟法示滤纸上呈紫色的蜜露
Fig. 3　The honeydew drops turned violet on filter paper using honeydew-clock

色斑数代表昆虫 12 h 分泌的蜜露滴数。
The number of color spots represents the drops of honeydew excreted by aphids during 12 h period.

2.5.1　步骤

仪器的准备：将直径为 12 cm 的滤纸用记号笔等分成 12 份后浸渍在质量分数为 2%茚三酮溶液中，取出置于 75 ℃的烘箱中烘干或自然晾干，然后将滤纸用双面胶粘在蜜露钟上的透明圆盘表面，即可。

蜜露的收集：挑取一定数量的昆虫用小毛笔接在相应植株材料叶片的背面，并使叶背朝下，在昆虫正下方放置蜜露钟，接通电源，打开开关，并记录开始的时刻。昆虫分泌的蜜露落在滤纸上变成紫红色，滤纸随时间的推移开始缓缓转动。12 h 后关闭开关。

色斑面积的计算：滤纸上所有紫红色斑代表昆虫 12 h 内的蜜露分泌情况，每一小扇形区域

的紫红色斑表示昆虫每小时内分泌的蜜露。取下滤纸，计算蜜露滴数并用九宫格坐标纸测量滤纸上每一部分的色斑面积（mm^2），即可得到昆虫每小时的蜜露分泌情况。

2.5.2 注意事项

（1）在试验操作过程中，最关键的就是确定昆虫的位置，这直接影响了蜜露落在滤纸上的位置，既要保证蜜露可以落在滤纸上，又要求蜜露滴不能太靠近中间。如果太靠近中间，蜜露滴可能重叠，将无法区分每个时间段的蜜露分泌情况；

（2）接虫时，昆虫数量不宜过多且应将昆虫集中在一起，虫子之间的距离不宜过大，否则昆虫分泌的蜜露会散漫的落在滤纸上，不能集中在同一个区域，就无法得到昆虫蜜露的分泌规律；

（3）试验过程中注意观察昆虫数量，若出现移走或死亡情况，应重新接上新虫，保证昆虫数量变动幅度不大；

（4）叶片到滤纸的距离不宜过高，最好不要超过 10 cm，使蜜露在空中停留较短的时间；

（5）不能用手直接接触用茚三酮溶液处理过的滤纸，否则手上的氨基酸会和茚三酮反应，污染滤纸；

（6）最好在人工气候箱中进行，保证温度、湿度、光照等外界环境条件的恒定；

（7）如果要测定昆虫昼夜的蜜露分泌节律，12 h 后需更换滤纸，最好在 8:00-20:00 和 20:00-次日 8:00 这两个时间段测定，这样可以分别得到昆虫在白天和夜间的蜜露分泌规律。

3 总结

茚三酮显色法或溴甲酚绿显色法、蜜露钟法、称量法、比色法和油滴法均能反映昆虫取食量的差异，但各具特点。下面是这 5 种方法的优缺点，供大家选择检测方法时参考。

采用茚三酮显色法或溴甲酚绿显色法和蜜露钟法时会发现即使面积相同，色斑深浅却不同，这说明忽略了含量的差异；采用茚三酮显色法或溴甲酚绿显色法时，数滴蜜露可能会在滤纸上叠加，导致只出现一个色斑的情形。而蜜露钟法能很好的避免上述情况的发生，由于滤纸一直随着蜜露钟转动，昆虫分泌的蜜露就不会落在同一位置上，但前提是昆虫位移要小；蜜露钟法还能很好的反映昆虫的蜜露分泌节律，相比于其他方法更加简单方便，无须频繁更换滤纸或 Parafilm 膜，就能得到每个时段的蜜露分泌情况；称量法则需达到天平的检测范围，这需要相对较长的接虫时间或较大的昆虫密度；油滴法相比于其他方法较为繁琐，而且在测量过程中会发现蜜露并不是规则的椭球体，因此测得的体积不准确，但油滴法可以测得昆虫蜜露的分泌频率，进而可以衡量昆虫的取食速率；而比色法具有准确度高、稳定性好、简单方便等优点，而且用该法还能反映昆虫分泌量与昆虫虫口密度的关系，但需要控制好试验条件，否则会影响试验结果。

参考文献 (References)

Ajayi O, Dewar AM, 1982. The effect of barley yellow dwarf virus on honeydew production by the cereal aphids, *Sitobion avenae* and *Metopolophium dirhodum*. *Annals of Applied Biology*, 100(2): 1–11.

Ammar ED, Alessandro R, Shatters RG, 2013. Behavioral, ultrastructural and chemical studies on the honeydew and waxy secretions by nymphs and adults of the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *PLoS ONE*, 8(6): 38–49.

Antoine B, Blanchard Sol è ne, Francis Fr é d é ric, Francois V, 2018. Elevated CO_2 concentrations impact the semiochemistry of aphid honeydew without having a cascade effect on an aphid predator. *Insects*, 9(2): 47–60.

Byrne DN, Miller WB, 1990. Carbohydrate and amino acid composition of phloem sap and honeydew produced by *Bemisia tabaci*. *Journal of Insect Physiology*, 36(6): 433–439.

Ciro I, Enrique N, Pablo J, Estela S, Daniela A, Belen B, Yamandu m, Karina A, 2018. *Epormenis cestri* secretions in *Sebastiania schottiana* trees cause mass death of honey bee *Apis mellifera* larvae in Uruguay. *PLoS ONE*, 13(1): e0190697.

Del-Claro K, Oliveira PS, 1996. Honeydew flicking by treehoppers provides cues to potential tending ants. *Animal Behaviour*, 51(5): 1071–1075.

Dhami MK, Weir BS, Taylor MW, Beggs JR, 2013. Diverse honeydew-consuming fungal communities associated with scale insects. *PLoS ONE*, (8): e70316.

Gai YP, Yi HC, Li JH, Wan P, 2019. Effect of temperature on honeydew secretion amount and body weight of *Saccharosydne procerus*. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 30(10): 83–87. [盖英萍, 尹海辰, 李建洪, 万鹏, 2019. 温度对长绿飞虱蜜露分泌

量及体质量的影响. 浙江农业学报, 30(10): 83–87.]

Gao MC, Yu GZ, 1989. Honeydew excretion and its diurnal cycle of black-tailed leafhopper. *Entomological Knowlegdge*, 26(2): 68–69. [高明昌, 余根中, 1989. 黑尾叶蝉（*Nephotettix bipunctatus*）蜜露排泄量及其日周期变化. 昆虫知识, 26(2): 68–69.]

Gautam SG, Ouyang Y, Gu P, Cardwell GE, 2018. Food suitability and population dynamics of *Lorryia formosa* (Acari: Tydeidae). *Environmental Entomology*, 47(3): 511–518.

Ghaffar MBAB, 2012. Transcriptomics analysis of phloem-feeding insect resistance in rice germplasm. Doctoral dissertation. Birningham: University of Birmningham.

Han BY, Zhou CS, 2019. Rhythm of honeydew excretion by the tea aphid and its attraction to various natural enemies. *Acta Ecologica Sinica*, 27(9): 3637–3643. [韩宝瑜, 周成松, 2007. 茶蚜(*Toxoptera aurantii*)蜜露分泌节律及对多种天敌的引诱效应. 生态学报, 27(9): 3637–3643.]

Joe UV, Giuseppina S, Anisa R, Silvia T, Francesca B, Samuele B, 2018. Entomological signatures in honey: An environmental DNA metabarcoding approach can disclose information on plant-sucking insects in agricultural and forest landscapes. *Scientific Reports*, 8(1): 9996–1009.

Kimmins FM, 1989. Electrical penetration graphs from *Nilaparvata lugens* on resistant and susceptible rice varieties. *Entomologi a Experimentalis et Applicata*, 50(1): 69–79.

Klaudia G, Magdalena M, Magdalena PB, Adam W, 2018. Isolation and characterization of a new fructophilic *Lactobacillus plantarum* FPL strain from honeydew. *Annals of Microbiology*, 68(7): 459–470.

Kremer JM, Nooten SS, Cook JM, Ryalls JM, Barton CV, Johnson SN, 2018. Elevated atmospheric carbon dioxide concentrations promote ant tending of aphids. *Journal of Animal Ecology*, 87(5): 1475–1483.

Liu WX, Yang Y, Wan FH, Jin DC, 2007. Comparative analysis of carbohydrates, amino acids and volatile components of honeydew produced by two whiteflies *Bemisia tabaci* B-biotype and *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) feeding cabbage and cucumber. *Acta Entomologica Sinica*, 50(8): 850–857. [刘万学, 杨勇, 万方浩, 金道超, 2007. 甘蓝与黄瓜寄主上 B 型烟粉虱和温室白粉虱蜜露糖分、氨基酸和挥发物组分的比较分析. 昆虫学报, 50(8): 850–857.]

Lu YH, Shi XL, Zhong CX, Wang H, Chen J, Yu YS, Yang YZ, 2005. Impacts of honeydew on the growth, fecundity and foraging behavior of natural enemies. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 42(4): 379–385. [陆宴辉, 史晓利, 仲崇翔, 王红, 陈建, 余月书, 杨益众, 2005. 蜜露对天敌昆虫生长繁殖及搜寻行为的影响. 应用昆虫学报, 42(4): 379–385.]

Moir ML, Renton M, Hoffmann BD, 2018. Development and testing of a standardized method to estimate honeydew production. *PLoS ONE*, 45(2): 256–264.

Morales MA, 2000. Survivorship of an ant-tended membracid as a function of ant recruitment. *Oikos*, 90(3): 469–476.

Price DR, Gatehouse JA, 2014. Genome-wide annotation and functional identification of aphid GLUT-like sugar transporters. *BMC Genomics*, 15(1): 2–12.

Ren SL, 2016. Study on the interaction of citrus plant-*Candidatus* liberibacter asiaticus-*Wolbachia*-*Diaphorina citri*. Doctoral dissertation. Guangzhou: South China Agricultural University. [任素丽, 2016. 柑橘-黄龙病菌- Wolbachia-柑橘木虱互作关系的研究. 博士学位论文. 广州: 华南农业大学.]

Sakagami K, Sugiura S, 2018. A diverse assemblage of moths feeding on aphid honeydew. *Journal of Asia Pacific Entomology*, 21(1): 413–416.

Seko Y, Hayasaka D, Nishino A, Uchida T, Bayo F, Sawahata T, 2018. Host-tree selection by the invasive argentine ant (Hymenoptera: Formicidae) in relation to honeydew-producing insects. *Journal of Economic Entomology*, 111(1): 319–326.

Seo BY, Kwon YH, Jung JK, 2009. Electrical penetration graphic waveforms in relation to the actual positions of the stylet tips of *Nilaparvata lugens* in rice tissue. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 12(2): 89–95.

Sun YC, Jing BB, Ge F, 2009. Response of amino acid changes in *Aphis gossypii* (Glover) to elevated CO_2 levels. *Journal of Applied Entomology*, 133(3): 189–197.

Tan Y, 2014. Feeding behaviour and its physiological analyses of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, in response to water-stressed rice. Master dissertation. Hangzhou: China Jiliang University. [谭椰, 2014. 水稻水分胁迫对褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 取食行为影响及其生理研究. 硕士学位论文. 杭州: 中国计量大学.]

Tian JC, Wang GW, Han HL, Gong YY, Mao CX, Zhong XL, 2018. The rice planthopper parasitoid *Anagrus nilaparvatae* is not at risk when feeding on honeydew derived from Bt rice. *Pest Management Science*, 74(8): 1854–1860.

Wäckers FL, 2000. Do oligosaccharides reduce the suitability of honeydew for predators and parasitoids? A further facet to the function of insect-synthesized honeydew sugars. *Oikos*, 90(1): 197–201.

Zhang KB, Liu HX, Wang LL, 1982. Study on honeydew of *Aphis gossypii*. *Journal of Northwest A&F University* (*Natural Science Edition*), 2(1): 52–53. [张克斌, 刘惠霞, 王玲莉, 1982. 棉蚜蜜露研究初报. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2(1): 52–53.]

Zhou XJ, Bai SF, LI X, Yan FM, 2012. Application of honeydew colormetry in determining indexes of aphid resistance of transgenic insect resistant cottons. *Journal of Henan Agricultural University*, 46(1): 53–57. [周晓静, 白素芬, 李欣, 闫凤鸣, 2012. 蜜露检测法在转基因棉抗蚜性指标中的应用. 河南农业大学学报, 46(1): 53–57.]