

显,反应更灵敏的方法还有待进一步的研究。目前我们正沿着以下三方面深入研究:(1)丰富书虱地理种群。本实验所用的书虱地理种群来自国内,所确立的引物和限制性内切酶是否适用于国外地理种群尚需进一步研究。(2)改进基因组 DNA 提取方法。本实验采用多头书虱提取基因组 DNA,今后需进一步探索单头书虱提取基因组 DNA 的方法,使本研究所建立的书虱快速识别更具实际应用意义。(3)探索其它分子鉴定技术用于书虱种类识别的可行性。本研究仅利用 PCR-RFLP 技术对书虱的种类识别进行了初步探索。随着研究的逐步深入可考虑采用其它分子鉴定技术,比如 PCR-SCR、对扩增产物进行测序后设计种特异引物进行特异扩增等等,探讨其针对书虱快速鉴定的可行性。

致谢 承蒙中国粮食科学研究院曹阳老师惠赠标本,感谢国家粮食局李福君先生等对本研究的大力支持和帮助,同时感谢中国农业大学昆

虫学系的彩万志教授审阅全文并提出宝贵意见!

参 考 文 献

- 1 New T R. *Orient. Ins.*, 1987, **21**: 1~109.
- 2 李志红. 北京: 中国农业大学学位论文, 1994.
- 3 白旭光, 曹阳. 中国粮油学报, 1997, **2**(1): 1~3.
- 4 McFarlane J. A. *Trop. Stor. Prod. Infor.*, 1982, **44**: 3~10.
- 5 安榆林. 中国进出境动植检 1997, **2**: 38~39
- 6 陈乃中. 植物保护, 1997, **3**(3): 20~21.
- 7 吴佳教, 胡学难, 赵菊鹏, 梁帆, 梁广勤. 植物检疫, 2005 **19** (1): 2~6.
- 8 Muraji M., Nakahara S. *Insect Mol. Biol.*, 2001, **10**(6): 549~559.
- 9 Muraji M., Nakahara S. *Appl. Entomol. Zool.*, 2002, **37**(3): 437~446
- 10 吴佳教, 梁帆, 胡学难, 赵菊鹏, 梁广勤. 江西农业大学学报, 2004, **26**(5): 770~773.
- 11 丁伟, 王进军, 赵志模. 西南农业大学学报, 2001, **3**(4): 304~308.
- 12 Simons C., Frati F., Bechenback A., Crespi B., Liu H., *et al. Ann. Entomol. Soc. Amer.*, 1994, **7**(6): 651~701.
- 13 龚鹏, 沈佐锐, 李志红. 昆虫知识, 2002, **39**(3): 188~190.
- 14 杜波, 迟德富. 昆虫知识, 2007, **44**(3): 333~336.

一种测定鳞翅目幼虫取食选择的方法 ——叶碟法及其改进和注意事项^{*}

汤清波¹ 王琛柱^{2**}

(1. 河南农业大学昆虫学系 郑州 450002;

2. 农业虫鼠害综合治理研究国家重点实验室 中国科学院动物研究所 北京 100101)

Leaf disc test used in caterpillar feeding preference study. TANG Qing-Bo¹, WANG Chen-Zhu^{2**}(1. *Department of Entomology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China*; 2. *State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*)

Abstract Leaf disc test is a universal method in the study of feeding preference of lepidopteran larvae. In this paper, Jermy-leaf-disc test and its modifications were described. The conditions and limitations of the test were also discussed, including physiological state of the test larvae, the lasting time of larval feeding, the number of discs, and the measurement of disc area.

Key words caterpillar, feeding preference, leaf disc test, glass Petri dish

^{*} 国家自然科学基金项目(30471148)。

^{**} 通讯作者, Email: czwang@ioz.ac.cn

收稿日期: 2007-09-04, 修回日期: 2007-09-13

摘 要 叶碟法是鳞翅目幼虫取食选择实验常用的一个方法。文章以经典的 Jermy 叶碟法为基础, 介绍对其的改进以及实验中应该注意的事项, 如幼虫的选择、幼虫取食的持续时间、叶碟的数目以及叶碟面积的测量等。

关键词 幼虫, 取食选择, 叶碟法, 培养皿

叶碟法 (leaf disc test) 即测定昆虫对不同植物叶碟的取食选择来研究昆虫取食偏好的方法, 由 Jermy 于 1961 年首先提出并于 1968 年在烟草天蛾 *Manduca sexta* (Johanssen) 和美洲棉铃虫 *Heliothis zea* (Boddie) 的取食选择实验进行了详细的阐述^[1], 从这以后, 叶碟法逐渐成为测定鳞翅目幼虫取食选择行为和取食选择行为可塑性经常使用的一个方法。但是, 叶碟法测定昆虫取食选择行为时往往受到诸多客观和主观因素的影响而使测定出现误差; 另外, 一些学者在利用叶碟法测定昆虫行为的实验时在一些细节上不够标准。因此, 本文将介绍经典的 Jermy 叶碟法, 并说明我们对该方法的改进和实验中的注意事项。

1 经典的 Jermy 叶碟法

经典的 Jermy 叶碟法^[1] 是在一个直径 9.5 cm、高 8 cm 的圆形纸筒中放置一个厚度约 1 ~ 1.5 cm 的石蜡盘, 石蜡盘表面覆盖一片湿润的滤纸以保持装置内的湿度, 滤纸上面再放置一层细网以避免昆虫取食石蜡。而叶碟则用昆虫针固定在石蜡盘上, 叶碟和细网平面之间的距离约 5 mm (根据幼虫体型可以放大或缩小距离) 以便幼虫能够轻松取食植物叶碟。植物叶片用打孔器制成直径为 1 cm 或 1.5 cm 的叶碟 (根据昆虫的体型和取食量制作合适直径的叶碟), 不论对 2 种植物或者多种植物叶碟的取食选择, 每个装置中每种植物的叶碟为 4 片, 不同植物的叶碟交替均匀固定在蜡盘的四周。如果幼虫对 2 种植物进行取食选择, 则每个装置中共有 8 个叶碟, 其放置顺序为 ABABABAB。

实验开始时, 1 头幼虫放置在细网的中心纸筒内, 然后每隔 1 h 左右检查昆虫取食的情况。对于一个装置中的幼虫取食选择, 当幼虫首先取食任一种植物约 50% 的叶碟总面积 (约

2 片叶碟) 的时间称为 T_{50} , 这时停止该幼虫的取食选择, 测量在 T_{50} 内每种植物被取食的叶碟面积。这种方法确保幼虫在 T_{50} 时间段内取食约 2 片第一种植物叶碟 (该植物叶碟总面积的 50%) 的同时也接触或者取食了其它植物叶碟, 并且这种取食不是由于简单的饥饿和偶然因素造成的。

由于不同种植物的叶碟厚度可能相差很大, Jermy 用下列公式来统一不同厚度的植物叶片: 即在取食选择前, 先称量每种植物的叶碟重量, 在取食选择结束后植物 X 叶碟的取食指数 (取食面积百分比) 为:

$$\% \text{ at } T_{50} = (\text{植物 X 的叶碟重量}) (T_{50} \text{ 时间内植物 X 叶碟被取食的百分比}) / (\text{首先被取食 } 50\% \text{ 叶碟面积的植物叶碟重量})。$$

2 Jermy 叶碟法的改进

Jermy 叶碟法中的取食选择装置相对复杂并且幼虫容易逃逸, 我们对该方法和装置进行改进和简化, 使其更加容易操作和观察。首先, 我们用玻璃培养皿来代替圆纸筒, 即在一个直径约 12 cm 的培养皿 (根据实验要求培养皿直径可以变动) 中间放置一个滤纸片, 其大小应该刚好盖住培养皿底部, 用蒸馏水湿润滤纸以防止叶碟干燥, 按照 Jermy 叶碟法交替把叶碟直接放置在滤纸上, 并标记方位, 然后把供试幼虫放置到湿润滤纸片的中央, 盖好培养皿的盖子然后放置在一定的温度、湿度和光照条件下, 定期观察其取食选择, 在幼虫取食任一种植物约 50% 的叶碟总面积 (约 2 片叶碟) 时停止该幼虫的取食选择, 然后测定各叶碟的被取食面积。在这个改进的装置中, 需要作预实验以测定昆虫是否取食滤纸片, 如果昆虫大量取食滤纸片, 则这种改进对该昆虫不可行; 另外供试植物叶片的厚度应相当, 否则需要用 Jermy 的方法校

正。取食指数我们采取了和 Jemy 不同的计算方法: 例如我们测试了棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 5 龄幼虫对棉花和辣椒叶片的取食选择, 用取食选择指数来衡量幼虫对棉花和辣椒叶碟的取食选择, 即幼虫对一种植物叶碟的取食面积占所有叶碟取食面积总和的百分比作为该植物的取食选择指数^[2-3]。这样取食选择指数将介于 0~1 之间, 0.5 则表示对二者没有取食偏好。如对棉花叶碟的取食选择指数 P_c (preference index to cotton) 为:

$$P_c = \frac{\text{棉花叶碟的取食面积}}{\text{棉花叶碟的取食面积} + \text{辣椒叶碟的取食面积}}$$

我们用这种改进的方法测定棉铃虫和烟青虫 *Helicoverpa assulta* (Guerée) 及其杂交后代 5 龄幼虫对棉花和辣椒叶碟的取食选择, 发现棉铃虫雌性幼虫对棉花和辣椒叶碟的取食选择指数平均数分别为 0.89 和 0.11, 而烟青虫雌性幼虫和棉铃虫相反, 对棉花和辣椒的取食选择指数平均数分别为 0.10 和 0.90, F₁、F₂ 和回交代幼虫对这 2 种植物的取食选择指数则位于 2 个亲本之间(图 1)^[3]。

3 取食选择实验中的注意事项

3.1 试虫的选择和饥饿

一般先随机选择蜕皮前状态的幼虫, 然后在蜕皮进入下一龄后饥饿 5 h 左右进行取食选择。这是由于蜕皮后的幼虫生理状态比较一致, 需要大量进食, 这样可以减小幼虫发育不一致而引起的误差。对幼虫进行 5 h 左右的饥饿锻炼则能够使幼虫前一龄的取食经历对取食选择行为的影响最小化, 同时由于饥饿可以缩短幼虫的 T_{50} , 降低由于取食持续时间过长而导致叶碟变质引起的实验误差。但是, 饥饿的时间可能要因虫而异, 饥饿时间太久有可能导致昆虫饥不择食。

3.2 叶碟的大小和数目

由于不同的鳞翅目昆虫幼虫的体型大小可能存在差异, 而同种昆虫幼虫在不同的龄期体型也相差甚远, 所以植物叶碟直径要根据供试幼虫体型的大小进行设定。如测定体型较大的

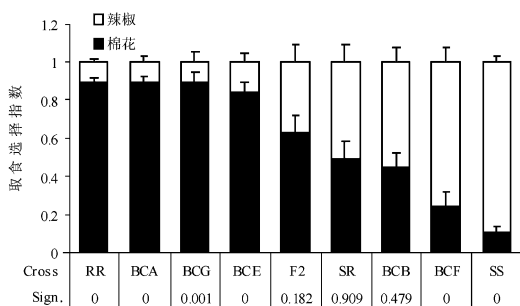


图 1 棉铃虫、烟青虫及其 F₁、F₂ 和回交代雌性幼虫对棉花和辣椒叶碟的取食选择

柱状体表示幼虫对棉花叶碟(黑色)和辣椒叶碟(白色)取食选择指数的平均数±标准误。Cross 表示昆虫亲本及杂交后代不同组合的符号(RR: *H. armigera*, SS: *H. assulta*, SR: SR ♀×RR ♂, F₂: SR ♀×SR ♂, BCA: RR ♀×RS ♂, BCE: RR ♀×SR ♂, BCG: SR ♀×RR ♂, BCB: SS ♀×RS ♂, BCF: SR ♀×SS ♂)。Sign. 表示每个组合幼虫对棉花叶碟和辣椒叶碟取食选择指数平均数的差异显著性(双尾 Wilcoxon-paired Test, $P < 0.05$) (数据原自[3])。

烟草天蛾 5 龄幼虫时叶碟直径可以为 1.7 cm^[1], 而棉铃虫和烟青虫 5 龄幼虫对棉花和辣椒叶片取食选择时叶碟直径为 1 cm 较为适宜^[3]。植物叶碟直径过大则取食耗时太久, 而叶碟太小则容易氧化和变质。所以我们建议在做取食选择前最好设置几组不同直径的叶碟进行预实验, 以确定最佳叶碟直径。

在已经报道的不少幼虫取食选择实验中, 每种植物叶碟的数目设置为 2 个。我们经比较, 认为每种植物的叶碟设置 4 片较为合理, 因为在幼虫取食选择时常常出现由于幼虫饥饿而取食第 1 个随机遇到的叶碟, 但是在取食完第 1 片叶碟后幼虫可能选择取食其它偏好的植物叶碟。这对于那些爬行不活跃的幼虫尤为重要。

3.3 取食选择的持续时间

取食选择持续的时间也是幼虫取食选择测定中的一个重要因素, 这是由于不同种类供试幼虫的体型和取食量可能相差甚大, 其对植物叶碟取食选择的持续时间也可能长短不一; 而同种昆虫不同幼虫个体之间的 T_{50} 也可能有一定的差异。所以在取食选择时要根据单个幼虫的 T_{50} 来决定该幼虫取食选择的中断, 不能用一个单一的 T_{50} 来衡量一个处理中所有幼虫的取

食选择持续时间。总的来说,昆虫取食时间不宜太久,否则随着时间的推移,叶碟会逐渐失水甚至变质,这样获得的数据自然是不能用的。

3.4 叶碟面积的测定

叶碟面积的测定有不同的方法,如目测估计法、仪器测量法、扫描法以及自制工具测量等方法。仪器测量法可以用美国 CID 公司的 CI-203 叶面积仪、北京渠道科学器材公司的 SHY-150 型扫描式活体面积测量仪和英国 ADC 公司的 AM-300 手持式叶面积仪等测量仪。扫描法可以把昆虫取食后的叶片用扫描仪进行扫描,然后用专门的软件对面积进行分析^[4]。我们制作了一种简单易行的工具测量叶面积,即先在 1 张白纸上用绘图笔画出 1 个和所用叶碟面积一致的圆,然后再利用直尺把圆分解为多个面积一致的正方形小格,小格边长为 1 mm,然后利用复印机把图纸中带有小格的叶碟图案复印到一个透明的投影胶片上,再把这个胶片中的叶碟区域剪下来用作测量工具。测量时,把胶片中的叶片圆形区域放置在取食后的植物叶碟上,利用胶片中相对应叶碟被取食或者未被取食部分的小方格数目则可以推测出相应的面积^[3]。如果叶碟直径为 10 mm,则胶片中 1 个叶碟中的小格子数目约为 78 个。

3.5 应用叶碟法需注意的其他问题

鳞翅目幼虫的取食选择行为还可能受到其它多种因素的影响,例如幼虫的取食经历、温度、湿度、光源方位和强度、光周期以及叶片的采集部位和新鲜程度等。所以在实验时应综合考虑多方面的因素,尽量使各种条件一致化或者外部因素影响达到最小。特别值得注意 2 个问题:(1)离体叶片的生理变化对幼虫取食选择的影响;(2)幼虫趋光性对取食选择的影响。任何叶片在离体后都会发生生理变化,变化的大小取决于植物种类以及离体叶片所处的环境条件和放置的时间长短,而叶片生理变化越大,对鳞翅目幼虫取食可能产生的影响也越大。因此实验不宜在温度过高的环境中进行,同时要在器皿内保持一定的湿度,更重要的是叶片离体的时间不宜过长,必要时需要首先进行预试验,

定量测定叶片在离体后不同时间对幼虫取食选择的影响,若在试验时间内影响很大则不能采用叶碟法。一般鳞翅目幼虫都有正趋光的习性,因此光源的方位常常会影响幼虫的取向。要减免这种影响,试验环境最好采用均一的光线,还可利用设置对照、在方位上随机放置器皿和增加试验重复数等方法,也可把器皿放在全黑的环境中进行试验。而供试幼虫数量和龄期的选择、取食选择参数的计算以及叶碟面积测量等方法的选择,则可以根据各个实验的目的、要求等进行相应的变动。

选择取食实验适用于昆虫对植物的味觉反应,除了研究对不同植物的取食选择外,测试幼虫对化合物的取食选择反应,方法与前类似,只是在同一种植物的叶碟上面涂抹不同的化合物^[5]。但是,叶碟法的装置内通风性能不好,因此不适用于测试昆虫的嗅觉反应。另外对于刺吸式口器的昆虫,叶碟法也不适用,因为离体的叶片内细胞的渗透压会很快发生改变,这种变化一般都对刺吸式口器昆虫的取食有抑制作用。

参 考 文 献

1 Jemy T., Hanson F. E., Dethier V. G. *Entomol. Exp. Appl.*, 1968, **11**: 211~230.
2 Wang C. Z., Dong J. F., Tang D. L., Zhang J. H., Li W., Qin J. D. *Prog Nat. Sci.*, 2004, **14**(10): 880~884.
3 Tang Q. B., Jiang J. W., Yan Y. H., van Loon J. J. A., Wang C. Z. *Entomol. Exp. Appl.*, 2006 **118**(3): 221~228.
4 李宝光,陶秀花,倪国平,黄冬华,宋小民. *江西农业学报*, 2006, **18**(3): 78~81.
5 van Loon J. J. A., Wang C. Z., Nielsen J. K., Gols R., Qiu Y. T. *Entomol. Expl. Appl.*, 2002, **104**: 27~34.

供应包装昆虫标本用的
格拉辛纸制的三角纸

规格	大	中	小
元/包(100 个)	30	24	16

邮费另计,要求最低订购金额每次 150 元以上(含邮费)。

联系地址:辽宁省丹东市 019 号信箱 118000

联系人:唐玮,李启明

E-mail: tangdorcus @yahoo. com. cn

业成贸易有限公司