

# 亚洲柑橘木虱的刺吸电位图谱研究

杨成良, 岑伊静, 梁广文, 陈华燕

(华南农业大学 昆虫生态研究室, 广东 广州 510642)

**摘要:**利用刺吸电位图谱(EPG)技术对亚洲柑橘木虱 *Diaphorina citri* Kuwayama 在寄主植物酸橙 *Citrus reticulata* Blanco 上的刺探取食行为进行了测定,获得柑橘木虱取食出现的波形,初步确定了取食波形与其行为之间的关系.结果表明,亚洲柑橘木虱在酸橙上产生8种主要的取食波形,依次为非刺探波(np波)、路径波(A波、B波、C波)、D波、韧皮部分泌唾液波(E1波)、韧皮部被动吸食波(E2波)以及木质部主动吸食波(G波).其中,D波是首次发现在刺吸式口器昆虫的取食波,推测为柑橘木虱口针刺探筛管相关的波形.G波仅在所测定20头木虱中的3头上出现,说明木虱很少在木质部吸食.E2波持续时间最长,表明刺探过程中木虱口针在韧皮部吸食的时间最长.

**关键词:**刺吸电位图谱;亚洲柑橘木虱;黄龙病;酸橙

中图分类号:Q968.1

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2011)01-0049-04

## Study on the Electrical Penetration Graph of *Diaphorina citri*

YANG Cheng-liang, CEN Yi-jing, LIANG Guang-wen, CHEN Hua-yan

(Laboratory of Insect Ecology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** The stylet penetration activities of *Diaphorina citri* Kuwayama on seedlings of *Citrus reticulata* Blanco (Rutaceae) were investigated by using the electrical penetration graph (EPG-DC system) technique, and the relationship between the feeding behavior and the waveforms was analysed. Eight EPG waveforms were described for adult female *D. citri* feeding on *C. reticulata* leaves during 8 hours: Non-penetration waveform (waveform np), pathway waveforms (waveform A, B and C), first contact with phloem (waveform D), saliva secretion on phloem (waveform E1), phloem sap ingestion (waveform E2), and xylem sap ingestion (waveform G). Among these, waveform D, which always occurred between waveform C and waveform E1, was firstly found in insect with piercing mouthparts. Waveform G only occurred on 3 of the 20 tested psyllids, implying the psyllids seldom feed in the xylem. Waveform E2 lasted longest, indicating the psyllids spent the most of time in phloem sap ingestion during the feeding activity.

**Key words:** electrical penetration graph; *Diaphorina citri*; Huanglongbing; *Citrus reticulata*

亚洲柑橘木虱 *Diaphorina citri* Kuwayama 属同翅目木虱科,是柑橘黄龙病亚洲种和美洲种唯一的传播媒介<sup>[1-5]</sup>.刺吸电位图谱(Electrical penetration graph, EPG)技术是一种用于研究植食性刺吸式口器昆虫在寄主植物上刺探和取食行为的电生理技术,由美国加利福尼亚大学的 Mclean 和 Kinsey<sup>[6]</sup>于1964年设计发明,最初应用于蚜虫取食监测,后来随

着应用领域的不断拓宽,这一技术在实践中得到了多次改进<sup>[6-7]</sup>.特别是荷兰学者 Tjallingii<sup>[8]</sup>采用直流回路系统和高值输入抗阻( $10^9 \Omega$ )后,使其发展为一项成熟的技术,可将生物体内的微电流(mV)放大50~5000倍输出,获得更准确、更细致而复杂性更高的波谱图.运用 EPG 技术目前已建立起50余种刺吸式口器昆虫的 EPG 波形,特别是对蚜虫、粉虱和叶蝉

收稿日期:2010-08-12

作者简介:杨成良(1984—),男,硕士;通信作者:岑伊静(1966—),女,副教授,博士,E-mail:cenyj@scau.edu.cn

基金项目:中澳科技合作特别基金“以黄龙病为重点的柑橘病虫害生态控制研究”(2007—2009);公益性行业(农业)科研专项(201003067-01)

研究得较为透彻<sup>[9]</sup>,这些发现在研究昆虫与植物的关系中起到了关键的作用,例如,EPG技术在寄主植物抗性机制方面的研究<sup>[10-12]</sup>和刺吸式口器昆虫传病方面的研究<sup>[13-14]</sup>.

本文研究亚洲柑橘木虱在芸香科柑橘属寄主植物酸橙 *Citrus reticulata* Blanco 上的刺吸电位图谱,分析图谱中各种波形与木虱取食行为的关系,为进一步揭示其获“毒”和传“毒”机制,以及通过干扰取食行为从而进一步阻止其对黄龙病传播提供理论依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

酸橙 *Citrus reticulata* Blanco:为博罗县杨村柑橘研究所苗圃培育的砧木苗.

亚洲柑橘木虱 *Diaphorina citri* Kunayana:从华南农业大学校园内九里香上采集成虫,转移到网室盆栽的九里香上繁育多代,并在试验前饥饿4 h.

EPG信号放大器是由荷兰 Wageningen 大学昆虫实验室研制的 Giga-4 型直流放大器,实验用水基银胶、铜钉、铜丝、金丝(直径20 μm)均为购买仪器附带.刺探电位波形的电信号通过转换器(DI-158U, DATAQ INSTRUMENTS)转换为数字信号,由计算机接收并保存在硬盘上,采集和分析支持软件为 Probe 3.4.

### 1.2 方法

1.2.1 EPG测定方法 选择新梢刚展开的叶片作为木虱取食部位,测定所用亚洲柑橘木虱均为雌成虫,在更换植物苗木的同时更换木虱.每头测定时间为8 h,重复20次.测定步骤如下.(1)准备工作:将铜丝焊接在铜钉上.剪取一段长2~3 cm的金丝,尽量拉直金丝以免影响木虱活动,用银胶粘在铜丝上;(2)固定木虱:木虱成虫采用真空吸泵法进行固定,即使用负压装置,将其固定在移液枪的枪头,背部朝上,然后将金丝快速地粘到木虱背部;(3)粘连木虱:将固定了的木虱置于12倍双目体式显微镜下,使木虱位于视野中央.用昆虫针挑取银胶,蘸一滴银胶置于木虱的中胸背板上,然后小心地将金丝末端插入银胶滴中.粘连好后,静置1 min,移出木虱.在粘连过程中避免金丝粘在木虱头部或翅基部,以免木虱不能正常行走、取食;(4)放置方法:木虱喜好在柑橘叶片背脉取食,因此粘连好后,将叶片翻转,利用微量调节器调整叶片上方的木虱与叶背脉接触.叶片翻转后,用细棉线或夹子固定,使木虱不至于从叶片上掉落;(5)将植物电极插在土壤中,整个装置置于铜网罩中,屏蔽外界电磁波的干扰.利用微量调节器调整叶片上方的木虱与叶背脉接触,启动记

录软件.

1.2.2 EPG波形分析方法 亚洲柑橘木虱属于在植物韧皮部吸食的类型,其口针在不同植物组织内所对应的EPG波形特征不同.木虱EPG波形与其行为的对应关系分析参见 Tjallingii<sup>[8,14]</sup>研究的蚜虫EPG各种波形特征对应的生物学意义.

## 2 结果与分析

### 2.1 亚洲柑橘木虱取食出现的EPG波形及生物学意义

亚洲柑橘木虱在酸橙叶片上主要产生非刺探波和7种不同的刺探取食波形(图1),即非刺探波(np波)、路径波(A波、B波、C波)、D波、韧皮部分泌唾液波(E1波)、韧皮部被动吸食波(E2波)、主动吸食波(G波).其中G波仅在3头木虱上出现,其余波形在测试的全部20头木虱上都出现,D波为一种尚未报道过的波形.

亚洲柑橘木虱各种波形特征及已知的生物学意义如下.

A波:发生在木虱取食的最初阶段,主频为0.4 Hz,持续时间5~20 s,不稳定,变化幅度很大,是木虱口针与植物表面接触导电状态的反映,中断频率较高,此阶段总伴随着水溶性唾液的分泌.

B波:紧随A波之后,峰值较高,主频为0.5 Hz,每隔5~8 s有1次波峰重叠,持续时间30 s左右.B波伴随着凝胶型唾液的分泌,凝胶型唾液能形成保护口针的唾液鞘,此时口针位于表皮及薄壁组织内.

C波:波形较为稳定,频率为15~19 Hz,主频为17.5 Hz,持续时间较长,反映的是胞外电势水平.此时口针位于表皮与维管束之间,在细胞间穿刺寻找取食位点.

由于A、B、C3种波形出现于口针经过叶表皮至吸食部位(韧皮部)的途中,常被看成是一种波形,在统计时将A波、B波也归入C波中,统称为路径波(Pathway waveform).

D波:出现在C波和E1波之间,频率为1~6 Hz,主频为2 Hz,持续时间15 s左右.电势与C波处在同一水平上,反映的是胞外电势水平,是一种尚未报道过的波形,可能与口针接触和刺探筛管壁的活动有关.

E波:电势水平较低,是胞内电势水平,反映了口针刺探韧皮部筛管的过程,持续时间较长.分为E1和E2共2个亚波,E1波频率为5~10 Hz,主频在7.5 Hz,波峰朝上,与木虱主动分泌水溶性唾液到筛管中有关;E2波频率为4~9 Hz,波峰朝下,与木虱

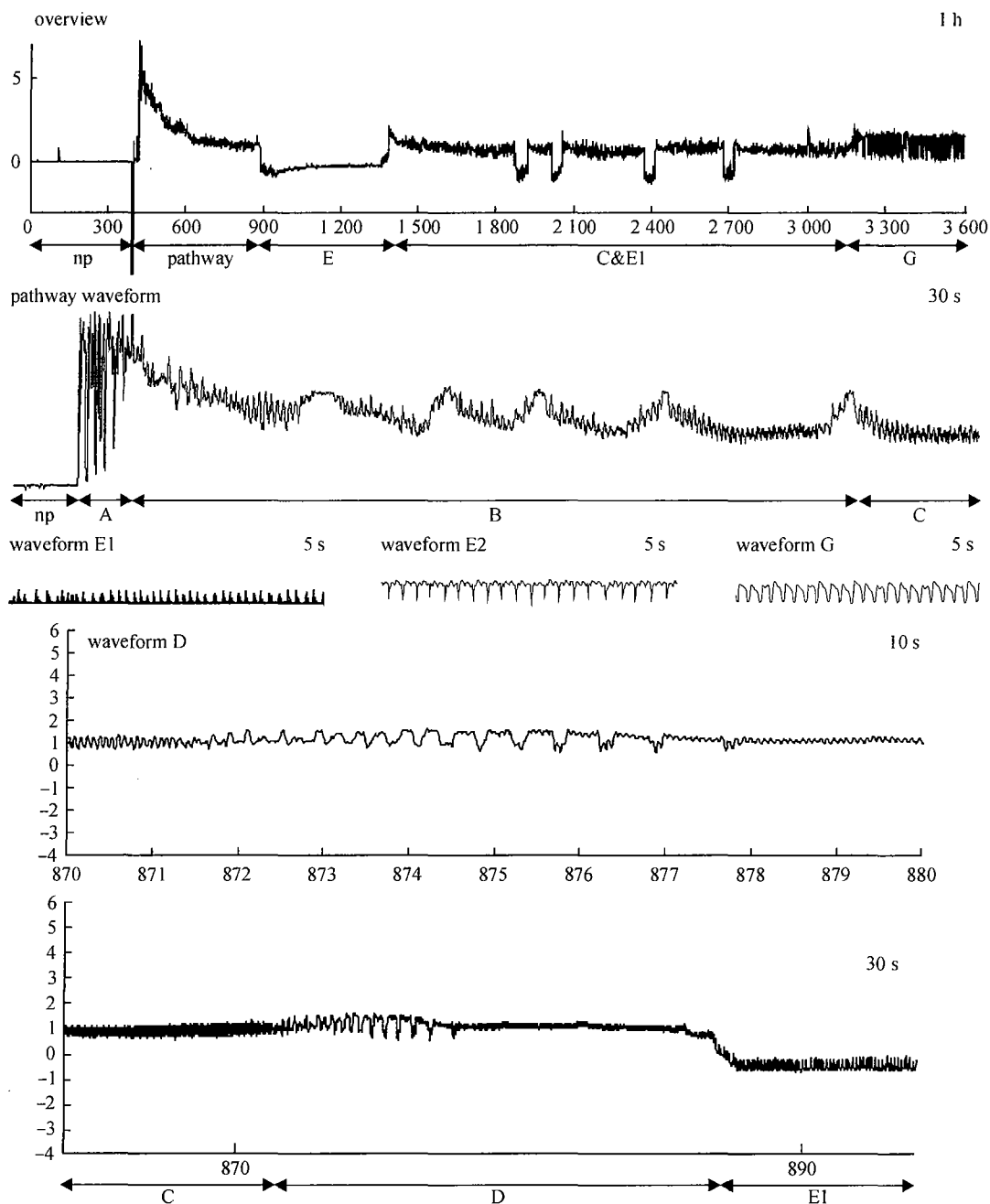


图 1 亚洲柑橘木虱取食基本波形

Fig. 1 EPG waveforms of Asian citrus psyllid

在筛管中被动吸食有关, E2 大于 10 min 表示昆虫在韧皮部筛管持续吸食。

G 波: 电势与 C 波持平, 但振幅在几种取食波中最大, 很容易分辨, 反映的是胞外电势水平, 频率为 7 Hz, 与木质部主动吸食有关。

### 2.2 亚洲柑橘木虱 EPG 参数分析

亚洲柑橘木虱首次非刺探波持续时间都很短, 第 1 次刺探时间平均出现在 6 min 后, 表明口针一接触酸橙很快就进入刺探取食过程 (表 1)。20 头木虱雌成虫中, 全部个体均出现 E1 和 E2 波, 即所有个体均在酸橙韧皮部分泌唾液和吸食。在韧皮部第 1 次

分泌唾液、第 1 次持续吸食分别发生在第 43 和 82 min。在测定的 480 min 过程中, 非刺探波 (np 波)、路径波 (A、B、C 波)、韧皮部分泌唾液波 (E1 波)、韧皮部吸食波 (E2 波) 分别持续 46.6、107.1、4.5 和 317.7 min, 表明分泌唾液时间很短, 即木虱在韧皮部仅需要分泌很少唾液即可持续吸食。E2 波持续时间最长, 约占全部刺探时间的 74%, 说明刺探过程中木虱口针大部分时间都在韧皮部取食。E2 波持续时间的长短是判断植物适合度的重要指标, 测定结果说明酸橙是亚洲柑橘木虱的适合寄主。

测定时还发现有 3 头木虱出现 G 波, 即在木质

部吸食,平均持续时间为每头 27.5 min. 其余 17 头均未发现在木质部吸食.

表 1 亚洲柑橘木虱在酸橙上吸食各种 EPG 波形出现次数、持续总时间及首次出现时间

Tab. 1 The appearance time, total duration and the first appearing time of different EPG waveform of Asian citrus psyllid feeding on *Citrus reticulata*

波形名称	出现次数/ (次·头 <sup>-1</sup> )	持续总时间/ (min·头 <sup>-1</sup> )	首次出现时间/ min
非刺探波 (np 波)	3.1 ± 0.43	46.60 ± 9.59	0
路径波 (A、B、C 波)	9.35 ± 1.38	107.12 ± 10.38	6.26 ± 1.26
韧皮部分泌唾液波 (E1 波)	2.20 ± 0.21	4.48 ± 0.65	42.67 ± 8.13
韧皮部吸食波 (E2 波)	2.30 ± 0.22	317.66 ± 12.57	81.67 ± 16.51
木质部吸食波 (G 波)		27.50 ± 11.53	

1) 表中数据为平均值 ± 标准误,除 G 波 ( $n=3$ ) 外,其他均为  $n=20$ .

### 3 讨论

本研究结果表明,亚洲柑橘木虱在寄主植物酸橙上的 EPG 波形主要有非刺探波 (np 波)、路径波 (A 波、B 波、C 波)、韧皮部分泌唾液波 (E1 波)、韧皮部被动吸食波 (E2 波) 以及木质部主动吸食波 (G 波). 此外,还发现在其他胸喙亚目刺吸式口器昆虫刺探取食波中没有的 D 波,与 Bonani 等<sup>[15]</sup> 2010 年应用 DC-EPG 研究的亚洲柑橘木虱在甜橙叶片上取食波形一致.

D 波总是位于 C 波和 E1 波之间,是路径波 (C 波) 向韧皮部分泌唾液波 (E1 波) 转换的波形,电势水平高于韧皮部 E1 波和 E2 波,与 C 波持平,没有电势降落出现,表明 D 波为胞外电势水平,随后电势降落波形转换为 E1 波,据此推测 D 波可能与口针接触和刺探筛管壁的活动有关. 胡想顺等<sup>[16]</sup> 在研究麦蚜取食行为时发现,麦蚜在某些寄主抗性品系刺探过程中, E1 之前常有一段约小于 10 s 电势波动很小的波形,称为“E0 波”,推测为蚜虫口针即将到达韧皮部时短暂的判断、休息和适应的过程. 然而, D 波是亚洲柑橘木虱独有的波形,其他胸喙亚目刺吸式口器昆虫取食波没有与此相似的波形. 在其他木虱科昆虫如梨木虱取食波也没有发现与 D 波相似的波形<sup>[17]</sup>.

E1 波和 E2 波是柑橘木虱口针在韧皮部活动的波形,分别与主动向筛管中分泌水溶性唾液和被动吸食有关<sup>[10]</sup>. E1 波有 2 种类型即有 E2 波跟随的 E1 波和没有 E2 波跟随的 E1 波. 韧皮部持续吸食波 (E2 > 10 min) 的长短是寄主植物筛管适合度的重要

指标. 在测定的 8 h 中, E2 波持续的时间最长,说明刺探过程中亚洲柑橘木虱口针在韧皮部吸食的时间最长. 黄龙病为韧皮部限制性细菌<sup>[18]</sup>, E1、E2 波的出现可能是亚洲柑橘木虱能传播和获得病原的主要原因,而木虱长时间在韧皮部吸食可能提高其获得病原的机会. G 波在亚洲柑橘木虱取食酸橙过程中很少出现,说明木质部不是其主要取食的部位.

目前,绝大多数的 EPG 研究已不再局限于建立不同种昆虫的刺探和取食行为波形,而是建立在波形基础上的刺吸式口器昆虫对寄主植物的选择性、昆虫传播植物病毒的机制、植物的抗虫机制以及内吸性农药的测定等行为生态学领域,并已成为昆虫生理学研究的热点之一. EPG 技术在柑橘木虱行为生态学领域的研究将发挥更大的作用.

致谢:本研究得到澳大利亚西悉尼大学 G. Andrew C. Beat-tie 教授、Paul Holford 教授和华南农业大学邓晓玲教授的耐心指导和帮助,在木虱波形分析中得到了荷兰瓦赫宁根大学 Tjallingii W F 教授和北京大学阎凤鸣教授的热心帮助,在此表示衷心感谢!

#### 参考文献:

- [1] TIRTAWIDJAJA S, LASHEEN A M. Citrus vein-phloem degeneration virus, a possible cause of citrus chlorosis in Java [J]. Proceedings of American Society for Horticultural Science, 1965, 86: 235-243.
- [2] CAPOOR S P, RAO D G, VISWANATH S M. *Diaphorina citri* Kuway., a vector of the greening disease of citrus in India [J]. The Indian Journal of Agricultural Science, 1967, 37: 572-576.
- [3] MARTINEZ A L, WALLACE J M. Citrus leaf mottle yellows disease in the Philippines and transmission of the causal virus by a psyllid, *Diaphorina citri* [J]. Plant Disease Reporter, 1967, 51: 692-695.
- [4] 华南农学院植保系植保教研组. 柑橘木虱传递柑橘黄龙病试验初报 [J]. 广东农业科学, 1977 (6): 50-53.
- [5] 广西黄龙病研究小组. 柑橘木虱和柑橘黄龙病 [J]. 柑橘科技通讯, 1977 (3/4): 23-24.
- [6] MCLEAN D L, KINSEY M G. A technique for electronically recording of aphid feeding and salivation [J]. Nature, 1964, 202: 1358-1359.
- [7] TJALLINGII W F. Electrical nature of recorded signals during stylet penetration by aphids [J]. Entomologia Experimentalis et Applicata, 1985, 38: 177-186.
- [8] TJALLINGII W F. Electronic recording of penetration behaviour by aphids [J]. Entomologia Experimentalis et Applicata, 1978, 24: 521-530.

(下转第 56 页)

心苗期和生长期的防治指标. 再者, 黄曲条跳甲成虫活泼, 善于跳跃<sup>[2,13]</sup>, 在短时间内准确调查出其数量存在一定的难度. 因此, 考虑到田间的可操作性, 本研究还以孔洞数为标准, 制定了黄曲条跳甲的防治指标. 在黄曲条跳甲综合治理中可根据实际情况采用相应的防治指标.

防治指标是一个动态指标, 它受农产品产量、价格、防治费用、防治水平等因素影响, 随地域、时间的变化而变化<sup>[14]</sup>. 本研究所制定的黄曲条跳甲防治指标存在一定的局限性, 使用时应根据各地菜心市场行情、防治费用和产量等参数进行校正和调整, 以保证黄曲条跳甲的有效防治, 减少由该虫引起的经济损失.

#### 参考文献:

- [1] 陈世襄, 龚韵清. 中国黄曲条跳甲记述[J]. 昆虫学报, 1955, 5(3): 317-332.
- [2] 张维球. 农业昆虫学: 下册[M]. 北京: 中国农业出版社, 1990.
- [3] BURGESS L. Flea beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) attacking rape crops on the Canadian Prairie Provinces[J]. The Canadian Entomologist, 1977, 109: 21-32.
- [4] 陈庆忠, 施季芳, 柯文华. 黄条叶蚤 [*Phyllotreta striolata* (Fab.)] 之生态及防治研究: II: 发育期及田间族群消长[J]. 植保会刊, 1991, 33: 354-363.
- [5] 吴伟坚. 黄曲条跳甲食性的研究[J]. 生态学杂志, 2002, 21(11): 32-34.
- [6] 张茂新, 凌冰, 梁广文. 十字花科蔬菜上黄曲条跳甲种群动态调查与分析[J]. 植物保护, 2000, 26(4): 1-3.
- [7] 张茂新, 凌冰. 黄曲条跳甲防治技术研究新进展[J]. 植物保护, 2000, 26(6): 31-33.
- [8] 朱芳枝, 朱骏, 彭友林, 等. 十字花科蔬菜虫害经济阈值研究概况及其分析[J]. 长江蔬菜, 2008(8): 9-13.
- [9] 盛永发. 害虫经济阈值的研究进展[J]. 昆虫学报, 1980, 32(4): 492-499.
- [10] 盛永发. 经济阈值定义的商榷[J]. 生态学杂志, 1984(3): 52-54.
- [11] 张茂新, 梁广文, 庞雄飞. 黄曲条跳甲自然种群生命表的组建与分析[J]. 华南农业大学学报, 2000, 21(2): 21-24.
- [12] 关佩聪, 刘厚诚, 陈日远, 等. 菜薹(菜心) 生长动态与花茎形成[J]. 中国蔬菜, 2005(2): 12-14.
- [13] 张茂新. 黄曲条跳甲种群动态及控制的研究[D]. 广州: 华南农业大学资源环境学院, 1999.
- [14] 吕欣, 陆永跃, 曾玲, 等. 杨桃园桔小实蝇的防治指标[J]. 植物保护学报, 2007, 34(5): 471-474.
- [9] GARZO E, SORIA C, GOMEZ-GUILAMMON M L, et al. Feeding behavior of *Aphis gossypii* on resistant accessions of different melon genotypes, *Cucumis melo*[J]. Phytoparasitica, 2002, 30(2): 129-140.
- [10] PRADO E, TJALLINGII W F. Aphid activities during sieve element punctures[J]. Entomologia Experimentalis et Applicata, 1994, 72: 157-165.
- [11] ALVAREZ A E, TJALLINGII W F, GARZO E, et al. Location of resistance factors in the leaves of potato and wild tuber-bearing *Solanum* species to the aphid *Myzus persicae* [J]. Entomologia Experimentalis et Applicata, 2006, 121: 145-157.
- [12] AMELINE A, COUTY A, DUGRAVOT S, et al. Immediate alteration of *Macrosiphum euphorbiae* host plant-selection behaviour after biotic and abiotic damage inflicted to potato plants[J]. Entomologia Experimentalis et Applicata, 2007, 123: 129-137.
- [13] MARTIN B, COLLAR J L, TJALLINGII W F, et al. Intracellular ingestion and salivation by aphids may cause the acquisition and inoculation of non-persistently transmitted plant viruses[J]. Journal of General Virology, 1997, 78, 2701-2705.
- [14] TJALLINGII W F. Electrical recording of stylet penetration activities[M] // MINKS A K, HARREWIJN P. Aphids, their biology, natural enemies and control. Amsterdam: Elsevier Science Publ, 1988: 95-108.
- [15] BONANI J P, FERERES A, GARZO E, et al. Characterization of electrical penetration graphs of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in sweet orange seedlings[J]. Entomologia Experimentalis et Applicata, 2010, 134: 35-49.
- [16] 胡想顺, 赵惠燕, HEIMBACH U, 等. 麦蚜取食行为特殊刺探电位波形图 (EPG) 研究初报[J]. 西北农林科技大学报, 2003, 31(S1): 22-24.
- [17] ULLMAN D E, MCLEAN D L. The probing behavior of the summer-form pear psylla[J]. Entomologia Experimentalis et Applicata, 1988, 47: 115-125.
- [18] YANG Y P, HUANG M D, BEATTIE G A C, et al. Distribution, biology, ecology and control of the psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama, a major pest of citrus: A status report for China[J]. International Journal of Pest Management, 2006, 52: 343-352.

【责任编辑 周志红】

【责任编辑 周志红】

(上接第 52 页)