

## 油茶象甲对油茶果实挥发物的触角电生理和行为反应\*

曾家城<sup>1</sup> 秦长生<sup>2</sup> 赵丹阳<sup>2</sup> 徐金柱<sup>2</sup>  
杨 华<sup>2</sup> 田龙艳<sup>2</sup> 邱华龙<sup>2</sup>

(1. 广东省肇庆市广宁县林业局, 广东 肇庆 526500; 2. 广东省森林培育与保护利用重点实验室/广东省林业科学研究院, 广东 广州 510520)

**摘要** 寄主植物挥发性化合物往往对昆虫搜寻定位寄主及食物选择具有重要的影响, 为了明确油茶 (*Camellia oleifera*) 果实中是否含有引诱油茶象甲 (*Curculio chinensis*) 取食的特定挥发性化合物, 研究利用 GC-EAD 测试了油茶果实挥发物对油茶象甲的触角电位反应, 通过 GC-MS 数据库对活性挥发物进行鉴定, 并采用 Y 型嗅觉仪测试了油茶象甲对活性化合物的行为反应。研究结果表明在 15.05、19.30、21.97 和 22.79 min 4 个出峰时间点的物质能够引起油茶象甲较强的触角反应, 经过质谱鉴定和标准品比对, 确定在 15.05 和 19.30 min 出峰的物质分别为正十八烷和油酸酰胺。Y 型嗅觉仪选择试验结果表明 0.1 和 1 ng/ $\mu$ L 浓度的正十八烷对油茶象甲具有较强的驱避作用, 1 ng/ $\mu$ L 的油酸酰胺对油茶象甲具有较强的引诱作用。研究确定了正十八烷和油酸酰胺对油茶象甲的行为具有调控作用。

**关键词** 油茶象甲; GC-EAD; 行为反应; 植物挥发物; 信息素

中图分类号: S763 文献标志码: A 文章编号: 2096-2053 (2020) 04-0030-05

Electroantennogram and Behavioral Responses of *Curculio chinensis* to Volatiles of *Camellia oleifera* FruitsZENG Jiacheng<sup>1</sup> QIN Changsheng<sup>2</sup> ZHAO Danyang<sup>2</sup> XU Jinzhu<sup>2</sup>  
YANG Hua<sup>2</sup> TIAN Longyan<sup>2</sup> QIU Hualong<sup>2</sup>

(1. Forestry Administration of Guangning County, Zhaoqing, Guangdong 526500, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Silviculture, Protection and Utilization / Guangdong Academy of Forestry, Guangzhou, Guangdong 510520, China)

**Abstract** The volatile compounds of host plants could influence the host plants location and food searching of insects. In order to find out whether there is any volatile compound of *Camellia oleifera* fruits that attract *Curculio chinensis*, in this study, GC-EAD was used to test the electroantennogram response of *C. chinensis* to the volatile compounds of *C. oleifera* fruits, GC-MS was used to identify the active volatile compounds, and Y-olfactometer was used to test the behavioral responses of *C. chinensis* to purchased pure compound. The results showed that at the retention time of 15.05, 19.30, 21.97 and 22.79 min, these four compounds could cause strong antennae reaction of *C. chinensis*. After identifying by mass spectrometry comparing with standard compounds, the peaks at retention time of 15.05 and 19.30 min were determined as n-octadecane and oleamide, respectively. The results of Y-olfactometer showed that 0.1 ng/ $\mu$ L and 1 ng /  $\mu$ L of n-octadecane had strong repellent effect against *C. chinensis*, and 1 ng/ $\mu$ L of oleamide showed significantly attractive effect on *C. chinensis*. In this study, we showed that n-octadecane and oleamide had a regulatory effect on the behavior of *C. chinensis*.

**Key words** *Curculio chinensis*; GC-EAD; behavioral regulation; plant volatiles; pheromone

\* 基金项目: 广东省自然科学基金 (2018A030310690); 广东省地方标准制定项目 (2018-DB-01)。

第一作者: 曾家城 (1978—), 男, 工程师, 主要从事林业有害生物防控工作, E-mail: 505739969@qq.com。

通信作者: 邱华龙 (1988—), 男, 副研究员, 主要从事林业有害生物综合防治工作, E-mail: qiuhualong2008@163.com。

油茶 (*Camellia oleifera*) 是世界四大木本油料之一, 是中国特有的一种纯天然高级油料, 在林业、农渔、食疗、医药、化工、日化、轻纺等方面具有广泛的应用价值<sup>[1]</sup>。利用油茶果压榨出的茶油健康营养, 气味清香, 不仅不含芥酸、胆固醇、黄曲霉素等对人体有害的物质, 而且具有抵抗紫外、延缓衰老、美容养颜、促进伤口愈合等诸多功效, 被外界称赞为“世界上最好的食用油”<sup>[2-3]</sup>。随着茶油深加工技术的快速成熟发展, 我国油茶种植、生产、深加工一体化全产业链体系正逐步形成并初具规模。根据国家林业局编制的《全国油茶产业发展规划(2009-2020)》, 至2020年全国油茶林面积将达到467万hm<sup>2</sup>。随着油茶林面积和规模不断扩大, 油茶病虫害的发生与危害也成日趋严重的态势, 严重影响油茶的产量和品质, 对山区油茶产业经济的健康发展和全面实现小康造成巨大威胁<sup>[4-6]</sup>。

油茶专性蛀果害虫油茶象甲 (*Curculio chinensis*) 的发生和危害是造成油茶低产低质的重要原因之一<sup>[7]</sup>。油茶象甲属于鞘翅目象甲科, 广泛分布于我国云、贵、桂、浙、湘、赣、粤等油茶主产区, 其虫态和危害状如图1所示。油茶象甲成虫将卵产在油茶幼果的果仁内, 卵孵化为幼虫后, 幼虫蛀食果仁, 果仁被食一空, 导致油茶果早衰和落果。油茶象甲不仅产卵量较多, 平均单头雌虫可产卵163粒, 而且为害期长, 平均每年发生

危害长达200天左右<sup>[7]</sup>。油茶象甲幼虫隐藏在油茶果内部蛀食果仁, 当油茶果显示出症状时已暴发成灾, 而化学药剂不容易渗透到果实内部, 只有加大药剂使用量才能勉强提高防效。油茶作为木本油料树种, 为社会提供健康营养的食用油料, 大量使用化学药剂势必将危害人类的身体健康。因此, 研究并应用更为安全、高效、无残留的油茶象甲防治技术势在必行。

在昆虫与寄主植物的关系中, 昆虫主要通过密布在触角上的化学感受器接收和识别植物源气味进行取食、寄主定位或产卵选择<sup>[8]</sup>。利用昆虫与植物的化学通讯机制进行害虫的预测预报及防治策略已在农林生产中得到应用: 例如马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 拉丁名释放的挥发物  $\alpha$ -蒎烯、 $\alpha$ -石竹烯、 $\beta$ -石竹烯、柠檬烯、月桂烯和烟碱对马铃薯块茎蛾 (*Phthorimaea operculella*) 的产卵具有显著的引诱作用, 并依据该特性成功研发出马铃薯块茎蛾植物源高效引诱剂<sup>[9]</sup>。目前尚未见有关油茶象甲通过挥发物定位识别寄主植物的报道, 因此, 本研究分析了油茶果实挥发物对油茶象甲的电生理和行为反应, 为油茶象甲引诱剂的开发提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 油茶象甲采集与饲养

于2018年4—8月在广东省韶关市曲江区小

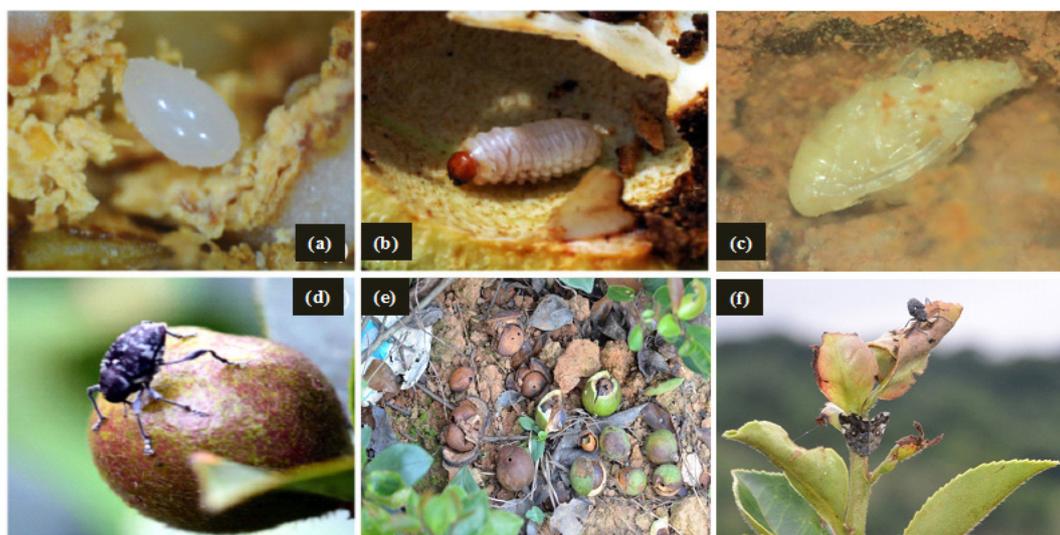


图1 油茶象甲虫态及发生危害示意

Fig. 1 Schematic diagrams of developmental states and its damaging phenomenon of *Curculio chinensis*

注: (a) 卵, (b) 幼虫, (c) 蛹, (d) 成虫, (e) 和 (f) 危害状。

Note: (a) egg, (b) larva, (c) pupa, (d) adult, (e) and (f) damaging phenomenon.

坑林场和乐昌市龙山林场采集油茶象甲。利用油茶象甲成虫假死性的特征,采用振落法捕捉油茶象甲成虫。首先在进油茶树下平铺一层白色的细纱网,然后摇晃油茶树,待油茶象甲掉落到细纱网上,将其放入养虫笼中并带回实验室。饲养条件为温度(25±1)℃、相对湿度80%左右、光周期L:D=12h:12h,隔天喂食洗净的油茶鲜果。

### 1.2 油茶象甲对油茶果实挥发物的触角电位测试

将表面洗净晾干的油茶果实(赣州油茶,果实长度3~5cm,宽度2~4cm)放在色谱纯的正己烷中浸泡10min收集油茶果实的挥发性物质,加入正十八烷作为内标,用无水硫酸钠去除多余水分后,用带过滤膜的移液器将样品转移到2mL样品瓶内,并用氮吹仪浓缩到适合的浓度,保存在-20℃冰箱内待用。用GC-EAD方法测试油茶象甲触角对油茶果实挥发物的触角电生理反应。气相色谱型号为安捷伦7890B,色谱条件为:HP-5(30m,0.25mm内径,0.25μm膜厚)毛细管色谱柱,载气为高纯氮气,进样口温度250℃,检测器280℃,柱箱升温程序为40℃保留3min、10℃/min升至250℃并保留5min。利用荷兰Syntech公司的EAG昆虫触角电位记录仪测定挥发物引起昆虫的触角电生理反应大小。沿油茶象甲触角基部将触角剪下,并在触角尖部切开0.5mm,然后将触角连接到触角电位仪的两个蘸有导电胶的电极上。GC和EAG的样品分流比为1:1。采用手动不分流进样模式进样1μL,测试油茶象甲的触角电位反应。每次实验重复5根触角以上。

### 1.3 活性挥发物的鉴定

用安捷伦气相质谱(GC-MS:7890B-5977B)对油茶果实中对油茶象甲具有电生理活性的挥发物进行鉴定。GC的进样口温度、升温条件、色谱柱规格、柱流量等色谱条件和GC-EAD实验中的相同,进样分流比为30:1。MS条件为:传输线温度250℃,离子源温度230℃,四级杆温度150℃,溶剂延迟3min,离子扫描范围50~300。根据NIST17普库中的特征离子片段对化合物进行鉴定,同时购买标准品对鉴定结果进行确认。

### 1.4 油茶象甲对活性挥发物的行为反应测试

利用Y型嗅觉仪测试单头油茶象甲对鉴定的挥发物的行为反应。在实验中,分别测试雌油茶象甲对0.1、1、10和100ng/μL正十八烷和油酸酰胺(溶于正己烷当中)的反应。实验过程中,

在Y型嗅觉仪的一个臂中加入蘸有活性物质的滤纸作为处理,另一臂中加入蘸有正己烷的滤纸作为对照。实验过程中保持气流流速为1.2L/min。雌虫放入Y型管中观察5min,当雌虫进入Y型管一侧超过3cm且停留时间超过1min则记为一个有效选择。实验过程中只统计有效选择的虫数。在进行5个有效重复后,将装置拆解用酒精进行冲洗并烘干,然后再进行重复实验,每组实验记录20个有效重复。实验中将整个装置用不透光的黑布罩住,防止光源对实蝇的选择造成影响。

### 1.5 数据分析

利用SPSS(version 20)中的卡方检验( $P < 0.05$ )分析Y型嗅觉仪中处理与对照间差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 油茶果实中对油茶象甲具有生理活性挥发物的筛选和鉴定

GC-EAD实验结果表明,在15.05、19.30、21.97和22.79min 4个出峰时间点,挥发物能够引起油茶象甲较强的触角电生理反应(图2)。因此,将这4个物质作为备选活性物质。通过GC-MS分析和NIST谱库比对发现,在15.05min出峰时间的物质,判定为正十八烷,在19.30min出峰的物质判定为油酸酰胺,另外两个出峰时间的物质由于比对相似性较低,暂时无法鉴定。正十八烷和油酸酰胺标准品的GC出峰时间分别为15.04和19.28min,和GC-EAD中测试的出峰时间基本一致。通过GC-MS质谱图比较分析,确定这两个时间出峰的物质为正十八烷和油酸酰胺(图3)。

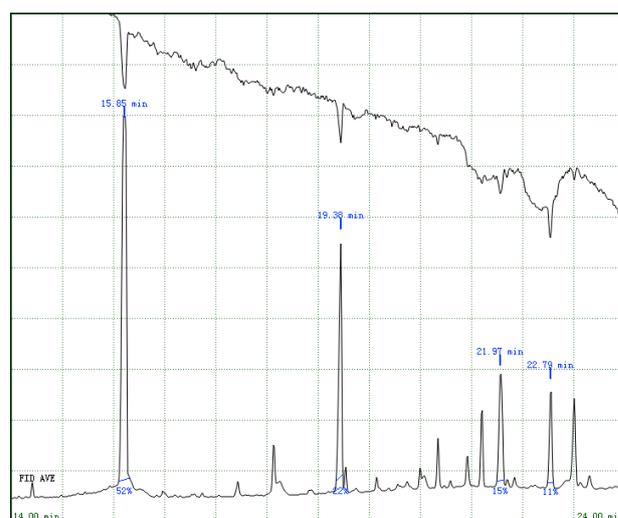


图2 油茶果实挥发物对油茶象甲的触角GC-EAD反应图

Fig. 2 Electroantennogram of antennae of *Curculio chinensis* to volatiles of *Camellia oleifera* fruits

2.2 油茶象甲对不同浓度活性挥发物的行为选择

Y型嗅觉仪选择实验结果表明, 0.1 和 1 ng/μL 的正十八烷对油茶象甲具有较强的驱避作用 (0.1 ng/μL:  $c^2=9.29$ ,  $P=0.007$ ; 1 ng/μL:  $c^2=14.23$ ,  $P<0.001$ ), 但是油茶象甲对 10 ng/μL 和 100 ng/μL 浓

度的十八烷没有显著趋性 ( $P>0.05$ , 图 4)。1 ng/μL 的油酸酰胺对油茶象甲具有较强的吸引作用 ( $c^2=15.52$ ,  $P<0.001$ ), 其它 3 个浓度多油茶象甲无显著引诱作用 ( $P>0.05$ , 图 4)。

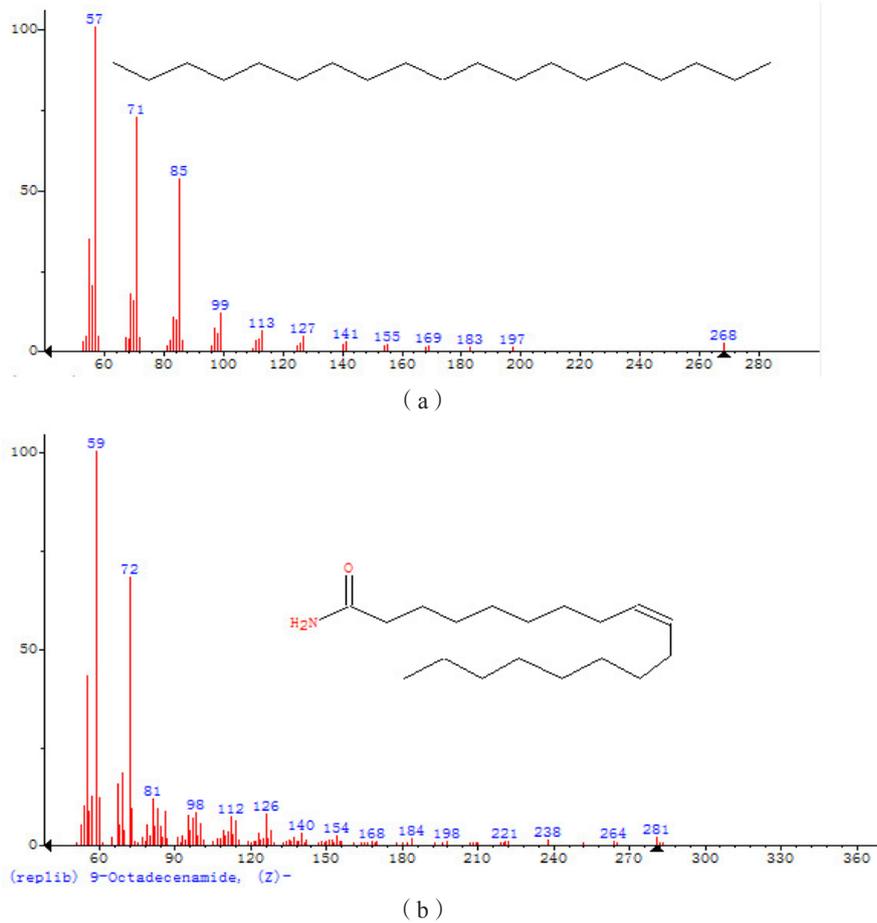
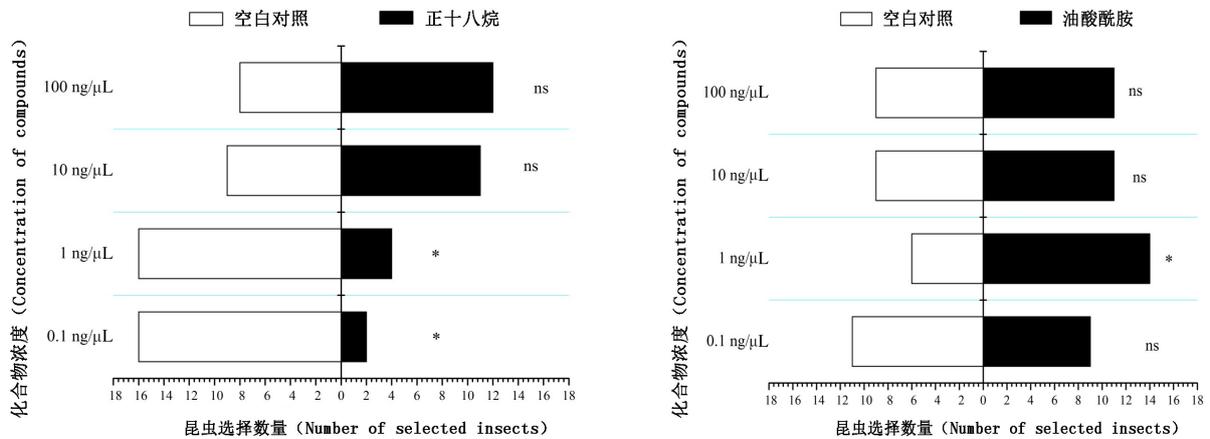


图 3 对油茶象甲具有电生理活性的两种挥发物 (a 正十八烷; b 油酸酰胺) 的质谱图

Fig. 3 Mass spectrograms of (a) n-Octadecane and (b) Oleamide that induce antennae response of *Curculio chinensis*



注: ns, 差异不显著,  $P < 0.05$ ; Note: ns, no difference,  $P < 0.05$

图 4 油茶象甲对不同浓度正十八烷和油酸酰胺的选择行为

Fig. 4 Selection of *Curculio chinensis* to different concentration of n-Octadecane and Oleamide

### 3 讨论

本研究发现油茶果实中有4种化合物能够引起油茶象甲的触角电生理反应,通过GC-MS分析和购买标准品,确定了其中两种化合物正十八烷和油酸酰胺。本研究首次报道了油茶果实挥发物和油茶象甲选择行为之间的关系,对进一步认识油茶象甲虫对寄主进行取食产卵的行为具有重要意义。

研究结果表明,中浓度的油酸酰胺对油茶象甲产卵具有引诱效果,而在低浓度和高浓度下这种引诱效果减弱或消失,这说明油茶象甲对油酸酰胺的嗅觉反应强弱取决于化合物浓度大小。这种挥发物对昆虫行为的浓度剂量效应在其它昆虫中也有报道。例如,低浓度的 $\beta$ -石竹烯能够引诱斑翅果蝇(*Drosophila suzukii*)雌成虫进行产卵,而高浓度下则表现为产卵驱避效果,并且随着浓度升高,斑翅果蝇的产卵量逐渐降低<sup>[10]</sup>。已有研究表明许多植物的挥发物中含有油酸酰胺,例如金线兰(*Anoectochilus roxburghii*)、燕麦(*Avena sativa*)、虎舌红(*Ardisia mamillata*)、茭白(*Zizania latifolia*)等<sup>[11-14]</sup>,表明油酸酰胺是一类广泛存在植物当中的挥发物,可能对多种昆虫具有一定的生理活性。

有研究报道瓜蚜(*Aphis gossypii*)为害黄瓜后会诱导植株释放正十八烷<sup>[15]</sup>,被黑条矮缩病毒危害的稻株会诱导释放出正十八烷<sup>[16]</sup>。然而,这些虫害或者病害诱导释放的挥发物是否能够驱避害虫继续为害或者引诱害虫天敌,目前还不清楚。本研究中的中低浓度正十八烷对油茶象甲具有较强的驱避作用,说明正十八烷可能是植物用来防御害虫取食危害的一种手段。由于本研究中是用正己烷浸提的办法提取化合物,因此,油菜果实在虫害或机械损伤下能否诱导还不清楚。因此,在接下来的研究中,将探索更合适的方法,例如通过固相微萃取等技术,比较研究油茶在健康、虫害及机械损伤等条件下的挥发物差异。

在通过调控昆虫行为进行害虫防治的方法中有一种叫做推拉策略,“推”是指在林地或作物田内,利用行为驱避剂驱离害虫;“拉”是指在林地外缘或作物田边,利用害虫引诱剂吸引害虫,并将害虫集中消灭<sup>[17]</sup>。油茶象甲对不同浓度正十八烷和油酸酰胺表现出的驱避和引诱的不同行为反

应则为利用推拉策略防治油茶象甲提供了一种新的思路,但该推拉策略还需要进一步野外实验验证。

### 参考文献

- [1] 王斌,王开良,童杰洁,等.我国油茶产业现状及发展对策[J].林业科技开发,2011,25(2):11-15.
- [2] 陈健,戚辉,易燕群.油茶活性成分作为护肤因子在化妆品领域的研究进展[J].中国美容医学,2013,2(1):223-225.
- [3] 罗晓岚,朱文鑫.油茶籽油加工和油茶资源综合利用[J].中国油脂,2010,35(9):13-17.
- [4] 赵丹阳,廖仿炎,秦长生.广东省油茶病虫害发生规律[J].广东农业科学,2013,40(12):86-89;98.
- [5] 廖仿炎,赵丹阳,秦长生,等.油茶枝干病虫害研究现状及防治对策[J].广东林业科技,2015,31(2):118-128.
- [6] 赵丹阳,秦长生,徐金柱,等.油茶象甲成虫对油茶寄主选择性研究[J].中国农学通报,2015,31(17):100-104.
- [7] 赵丹阳,秦长生,徐金柱,等.油茶象甲形态特征及生物学特性研究[J].环境昆虫学报,2015,37(3):217-220.
- [8] 王振华,赵晖,李金甫,等.植物源挥发物对昆虫信息素的增效作用及其增效机制[J].应用生态学报,2008,25(11):209-213.
- [9] 马艳粉,胥勇,肖春.10种寄主植物挥发物对马铃薯块茎蛾产卵的引诱作用[J].中国生物防治学报,2012,28(3):448-452.
- [10] 刘燕,谢冬生,胡纯华,等. $\beta$ -石竹烯对斑翅果蝇雌成虫行为的影响[J].环境昆虫学报,2017,40(3):684-689.
- [11] 林碧霞.金线莲挥发油成分的提取及体外免疫活性研究[D].福州,福建医科大学,2017.
- [12] 孙培培,黄明泉,孙宝国,等.同时蒸馏萃取-气质联机分析燕麦片挥发性成分的研究[J].食品工业科技,2011,24(12):479-483.
- [13] 杨海宽,江香梅,赵玲华,等.虎舌红不同部位挥发性成分差异研究[J].江西农业大学学报,2013,6(5):98-103.
- [14] 张海,陈珍娥,田真辅.GC-MS法对金线兰挥发油化学成分的分析[J].湖北农业科学,2015,12(18):207-210.
- [15] 李艳艳,周晓榕,庞保平,等.多异瓢虫对瓜蚜为害后植物挥发物的行为反应及挥发物成分分析[J].昆虫学报,2013,56(2):153-160.
- [16] 王璐丰.SRBSDV诱导水稻挥发物的变化及其对白背飞虱寄主选择行为的影响[D].长沙,湖南农业大学,2017.
- [17] COOK M S, KHAN Z R, et al. The use of push-pull strategies in integrated pest management [J]. Annual Review of Entomology, 2007, 8 (52): 375-400.