

柑橘大实蝇信息素鉴定及 EAG 测试*

李 可^{1**} 李 凡¹ 陈 楠² XIA Yu-Lu³ 樊永亮^{1***} 刘同先^{1***}

(1. 西北农林科技大学旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 农业部西北黄土高原作物有害生物综合治理重点实验室, 杨凌 712100; 2. 华南师范大学生命科学学院, 广东省昆虫发育生物学与应用技术重点实验室, 广州 510631; 3. North Carolina State University-Center for Integrated Pest Management, Raleigh 27695, USA)

摘 要 【目的】分析和鉴定柑橘大实蝇 *Bactocera (Tetradacus) minax* (Enderlein) 信息素。【方法】采用顶空固相微萃取方法 (HS-SPME) 收集不同时间段柑橘大实蝇成虫挥发物, 进一步结合气相色谱质谱联用技术 (GC-MS) 鉴定分析和触角电位技术 (EAG) 进行行为测试。【结果】N-(3-甲基丁基)乙酰胺为柑橘大实蝇成虫合成的一种挥发性化合物, 且雌雄成虫都可以释放该化合物。触角电位技术测定不同日龄柑橘大实蝇成虫对 1、10、100 和 1 000 μg 4 种不同剂量 N-(3-甲基丁基)乙酰胺的触角电位反应结果表明, 柑橘大实蝇成虫对 N-(3-甲基丁基)乙酰胺具有显著的触角电位反应, 触角电位反应最适含量范围为大于 100 μg , 剂量以及剂量 $\times$ 性别会导致柑橘大实蝇显著的触角电位反应差异。【结论】N-(3-甲基丁基)乙酰胺可能为柑橘大实蝇信息素, 这一结果可为柑橘大实蝇化学通讯研究和生物防治应用提供一定的理论基础。

关键词 柑橘大实蝇; 信息素; 触角电位; N-(3-甲基丁基)乙酰胺; 挥发物

Electroantennographical response of *Bactrocera minax* to pheromones

LI Ke^{1**} LI Fan¹ CHEN Nan² XIA Yu-Lu³ FAN Yong-Liang^{1***} LIU Tong-Xian^{1***}

(1. State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, Key Laboratory of IPM of Crop Pests on the Northwest Loess Plateaus of Ministry of Agriculture, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Insect Developmental Biology and Applied Technology, School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631; 3. North Carolina State University-Center for Integrated Pest Management, Raleigh 27695, USA)

Abstract 【Objectives】To analyze and identify the pheromones of *Bactrocera (Tetradacus) minax* (Enderlein). 【Methods】Volatiles from male and female adults were collected at various times by Headspace-Solid Phase Micro Extraction (HS-SPME), and identified chemically by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and behaviorally by Electroantennography (EAG). 【Results】GC-MS identified N-(3-methyl-butyl) acetamide as a volatile released by both adult male and female *B. minax*. The EAG responses of 3-day-old and 15-day-old *B. minax* to 1, 10, 100 and 1 000 μg of N-(3-methyl-butyl) acetamide were measured. Adults had a strong EAG response to N-(3-methyl-butyl) acetamide. The optimum concentration for EAG was from 100 to 1 000 μg . EAG response varied with dose and dose $\times$ sex. 【Conclusion】N-(3-methyl-butyl) acetamide could be a pheromone of *B. minax*. The results provide information useful for further study of chemical communication in *B. minax* and the biological control of this pest.

Key words *Bactrocera minax*; pheromone; electroantennogram; N - (3-methyl-butyl) acetamide; volatile

柑橘大实蝇 *Bactrocera (Tetradacus) minax* (Enderlein) (陈世襄和谢蕴贞, 1955) 主要分布于东南亚一带, 在各地都是 1 年发生 1 代, 每年 10 月底以老熟幼虫在土中化蛹进入滞育越冬, 来年 3-4 月份期间成虫开始逐渐羽化出土, 约 15 d 以后达到性成熟状态并在柑橘青果上进行

*资助项目 Supported projects: 本项目受到了美国北卡州立大学部分经费资助 No.2018-0625-01 This research was partially funded by North Carolina State University, grant number 2018-0625-01

**第一作者 First author, E-mail: lkk1206@nwfufu.edu.cn

***共同通讯作者 Co-corresponding authors, E-mail: yfan@nwsuaf.edu.cn; txliu@nwfufu.edu.cn

收稿日期 Received: 2021-04-31; 接受日期 Accepted: 2021-05-31

交配产卵(尤克西等, 2012; 诸凤丹和杨鸿, 2015; Xia *et al.*, 2018)。

柑橘大实蝇雌虫通常将卵产于芸香科柑橘属(*Citrus*)果实内皮层。初孵幼虫在果实内进行取食, 造成果实内部腐烂变为蛆柑(王小蕾和张润杰, 2009)。柑橘大实蝇在我国地理分布广泛, 对柑橘属植物具有极大的破坏性, 严重时给我国农户及消费者都带来严重的影响, 也对我国柑橘出口欧美构成了严重的威胁(周华众等, 2009)。为了减少柑橘大实蝇对柑橘产业造成的经济损失, 对柑橘大实蝇进行有效的预测预报和防治是当前柑橘保护面临的迫切问题之一。

昆虫信息素具有高效、无毒、环境友好、保护益虫等优点, 作为一种重要的生物防治方法已在害虫预测预报和防治方面越来越受到重视。柑橘大实蝇成虫白天出来活动, 刚出土的成虫可以在橘园以外觅食, 但是成虫性成熟后只在柑橘园交配和在柑橘幼果上产卵(杜田华等, 2018), 橘大实蝇成虫是否产生性信息素及其是否利用性信息素来吸引异性还不清楚。目前有一些关于柑橘大实蝇性信息素的初步研究。鲁红学等(1998)发现柑橘大实蝇雌成虫释放信息物质, 并获得了具有性信息素活性的提取液混合物, 但并未对性信息素化学成分进行最终鉴定。肖伟等(2013)从柑橘大实蝇雌性直肠粗提物中发现含有能够吸引雌性和雄性个体的一些生物活性物质, 其具体活性成分的化学性质到目前为止尚未被鉴定。张宏宇(2015)研究报道(R)-(+)-柠檬烯为柑橘大实蝇性信息素, 然而, 从那时到现在已过去了6年, 作者也还未见任何关于柑橘大实蝇可以合成柠檬烯的报道, (R)-(+)-柠檬烯能否被划分为橘大实蝇的信息素值得商榷。周琼等(2014)利用乙醚提取柑橘大实蝇腹部的一种囊状腺体, 分析鉴定结果表明柑橘大实蝇主要性信息素的化学成分为十一醇, 但很遗憾也未见有任何大田试验的田间实验结果报道。总之, 针对柑橘大实蝇性信息素物质的研究尚不全面, 还有许多未解决的科学问题。此外, 一般发育期及性别对昆虫信息素会产生影响, 柑橘大实蝇不同发育期和性别对信息素物质的影响也需要进一步研

究(Harris *et al.*, 1976)。

顶空-固相微萃取(Headspace-Solid Phase Micro Extraction, HS-SPME)收集待鉴定物质时不需要使用有机溶剂, 相较于常规溶剂洗脱的方法, HS-SPME具有灵敏度高、成本低廉、不破坏样本及较好的去除了溶剂在分离和鉴定中的影响(Rochat *et al.*, 2000)。现阶段尚未有运用HS-SPME结合触角电位技术研究柑橘大实蝇信息素的报导, 柑橘大实蝇性信息素的研究手段多采用有机溶剂提取。触角电位(Electroantennogram, EAG)技术是依据测定昆虫触角上各种感受器对不同化合物产生的电位总和来对昆虫信号化合物进行筛选(田厚军等, 2011), EAG在化学生态学研究上应用非常广泛。肖伟等(2013)对柑橘大实蝇直肠粗提物对成虫引诱的活性进行过EAG反应测定, 提出来几种可能是橘大实蝇性信息素的候选物质。宫庆涛等(2014)测定了10种物质和几种改进物质配方对柑橘大实蝇成虫的EAG电生理反应, 但是也未确定大实蝇的信息素成分。

本研究旨在通过固相微萃取-顶空收集技术并结合气质谱联用技术对柑橘大实蝇信息素进行收集鉴定, 并利用触角电位技术分析不同日龄和性别的柑橘大实蝇成虫对鉴定物质的剂量反应曲线, 进一步鉴定橘大实蝇的性信息素, 最终为柑橘大实蝇引诱剂研发奠定科学基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

柑橘大实蝇蛹由长江大学农学院桂连友教授提供, 虫果或蛹采集于湖北省松滋市(N30°10'13.16", E111°46'2.75")未采取任何管理措施的柑橘果园。秋天待老熟幼虫在土中化蛹后, 将滞育蛹带回陕西杨凌示范区西北农林科技大学应用昆虫学实验室, 埋在盛有无菌河沙(厚度3-7 cm)的塑料花盆(14 cm×12 cm)中, 保持土壤湿度10%-15%。待柑橘大实蝇羽化后, 成虫按性别和羽化时间分别饲养于环境条件为(25±1)℃, 70%±10% RH和14 L: 10 D的养

虫笼中 (30 cm×30 cm×30 cm), 期间以 1 : 3 的质量比混匀的酵母菌浸粉 (分析纯, Oxoid Ltd, England) 和蔗糖 (分析纯, 广东光华科技有限公司) 混合物以及蘸水的棉球作为食物来源。成虫笼每天晚上喷一次清水。

1.2 信息素 HS-SPME 收集

柑橘大实蝇信息素的研究采用 HS-SPME 方法收集, 设置日龄、性别和时间作为变量。实验时, 选取性成熟的 15 日龄成虫, 根据性别 (雄性或雌性) 和收集时间 (日间或夜间) 的不同, 设置 6 个实验组合依次分别记做雌虫 (单头) - 日间、雄虫 (单头) - 日间、雌+雄虫 (各 1 头) - 日间、雌虫 (单头) - 夜间、雄虫 (单头) - 夜间和雌+雄虫 (各 1 头) - 夜间。固相微萃取萃取头采用表层涂有二乙烯基苯/聚二甲基硅氧烷共聚物的 65 μm DVB/PDMS 萃取头 (Supelco, Bellefonte, PA, USA), 萃取头首次使用前根据说明书要求在 GC 气相色谱仪后进样口 250 $^{\circ}\text{C}$ 老化 30 min (Anderbrant *et al.*, 2005)。随后, 将柑橘大实蝇放入 25 mL 三角瓶中, 用昆虫针扎一个通气孔, 将萃取头穿过干净的铝箔纸插入三角瓶中, 分别于日间 (9:00 am-22:00 pm) 和夜间 (22:00 pm-9:00 am) 收集待测物, 随后立即插入气相色谱仪前进样口解吸附 5 min。收集柑橘大实蝇信息素前, 25 mL 三角瓶先后用无水乙醇 (分析纯, 广东光华科技有限公司)、正己烷 (色谱级, 天津市科密欧化学试剂有限公司) 淋洗, 随后与锡箔纸一起放入 200 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱烘烤 2 h。每次信息素收集前, 用萃取头在相同的条件下对不含柑橘大实蝇的空白玻璃瓶进行取样, 以排除背景峰的干扰。实验重复 3 次。

1.3 GC-MS 色谱

待分析化学物质的化合物分析和鉴定是由气相色谱 TRACE 1310 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) 来分析。所用气相色谱色谱柱为 TR-5MS UI (30 m×0.25 mm×0.25 μm , Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)。进样口温度设置为 260 $^{\circ}\text{C}$, 进样时采用无分流进样方式。气谱的载气为高纯度 (99.999%) 氮气,

载气流速为 1.0 mL/min, 柱头压为 1.45 psi。设置色谱起始柱温温度为 80 $^{\circ}\text{C}$, 并在 80 $^{\circ}\text{C}$ 下保持 2 min, 再升温以每分钟 8 $^{\circ}\text{C}$ 升至 300 $^{\circ}\text{C}$, 在 300 $^{\circ}\text{C}$ 下保持 5 min。质谱使用 ISQ 单四级杆质谱仪, 用 Xcalibur2.2 软件分析。质谱条件: 质谱端接口温度和质谱的离子源温度均设置为温度 280 $^{\circ}\text{C}$, 设置质量扫描波长范围为 45-500 m/z, 扫描速率为每秒 5 次, 使用 EI 离子源, 电子能量为 70 eV, 发射电流为 25 μA , 扫描波长为 45-500 amu, 扫描速率为每秒 5 次。信息素收集和信息素标品自动进样分析都采用以上色谱条件。标品自动进样过程中, 采取自动进样器 ISQ 四级杆 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) 进样。以正己烷为清洗溶剂, 用正己烷为溶剂配制 10 $\mu\text{g/mL}$ N-(3-甲基丁基) 乙酰胺标品 (Boc science, USA), 随后每次进 1 微升 N-(3-甲基丁基) 乙酰胺标准样品进行分析。

1.4 EAG 记录

触角电位仪 (Syntech, Kirchzarten, Germany) 分别由智能化数据控制器 IDAC-4、刺激气流控制器 CS-55、气相连接系统 (GC/EAD) TC-02、探测器 Probes 及 Syntech 软件处理系统五部分组成。使用 SUTTER 拉针仪仪器制作玻璃电极 (O.D. 1.5 mm, I.D. 0.86 mm, Sutter Instrument Company, Novato, CA, USA), 用陶瓷刀片去掉玻璃电极尖端一部分以适合柑橘大实蝇触角大小, 吸取 0.1 mol·L⁻¹ 氯化钾溶液至玻璃电极 3/4 高度处。取 3 日龄和 15 日龄柑橘大实蝇雌雄虫, 随后使用解剖剪将触角从昆虫基部切下, 小心的将触角基部滑入到玻璃电极里, 置于实体显微镜的视野下, 将固定有玻璃电极的三位操作台向触角进行移动连接。选定触角电位仪的 Y-Ampl 值为 0.5 mV, time base 值为 15 s, 刺激气流为每分钟 300 mL, 连续气流为每分钟 600 mL, 每次测定时间间隔 1 min。选用液体石蜡油 (Sigma-Aldrich, Hamburg, Germany) 为对照, 利用液体石蜡油为溶剂配置 0.1、1、10、100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 浓度梯度的 N-(3-甲基丁基) 乙酰胺样品。将 1 cm×2.5 cm 的滤纸折成之字形放入 1 000 μL Eppendorf 枪头, 随后加入 10 μL 不同梯度剂量

N-(3-甲基丁基)乙酰胺样品在滤纸上, 此时所用样品管中最终样品含量分别为1、10、100和1 000 μg 。待基线稳定后于5-10 s时间段给予一次刺激。按动送气泵开关, 滤纸条上的挥发性物质被吹入气味混合管与电极上触角接触, 刺激触角产生神经脉冲信号, 由EAG软件记录其触角电位反应值。为了消除触角适应导致的系统和偶然偏差, 测试前后均用石蜡油溶剂刺激触角作为刺激的空白对照。试验中, 每个处理都在同一根触角的重复测试3次, 空白对照在测试前后各测试1次。每组处理连续测试了4根触角。

1.5 数据分析

计算触角电位相对值的计算公式如下:
$$V=2R/(C_1+C_2)$$
。其中, V 为触角电位反应相对值; R 为刺激气味化合物的触角电位反应平均值; C_1 和 C_2 为刺激前后2个溶剂空白对照触角电位反映值。触角电位反应相对值在单变量两组和多组之间的差异分别采用 t -检验和单因素方差分析(LSD, Dunnett T3)。多个变量采用多因素方差分析。上述统计分析均采用IBM SPSS Statistics v.20.0 SPSS 软件分析, 图片采用Sigmaplot 12.0 软件绘制。

2 结果与分析

2.1 不同时间段信息素 HS-SPME 的收集

收集柑橘大实蝇在不同时间段释放的挥发性化合物, 根据气质谱联用仪分析鉴定此挥发物的化学成分。结果表明, 一种化合物稳定存在于柑橘大实蝇雌虫、雄虫、雌雄虫组合的不同时间段, 质谱图谱和标品比对确定该信息素物质为N-(3-甲基丁基)乙酰胺(m/z : 129, 114, 86, 73, 72, 60), 且离子源相对丰度介于 10^8 - 10^9 , 气谱上保留时间为6.51 min (图1, 图2)。总离子色谱图显示其它峰也稳定存在(表1)。质谱鉴定保留时间8.05 min的峰可能是[Ethanone, 1-(6-methyl-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-1-yl)-; 保留时间10.72 min的峰可能是1,1'-(4-Methyl-1,3-phenylene) bis[3-(5-benzyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)urea]; 保留时间10.80 min的峰可能是3-Cyclopentylpropionic

acid, 2-pentadecyl ester。从搜库结果得到的这些化合物可能也是信息素成分之一, 但由于技术限制, 我们无法购买到这些化合物的标品, 所以对其化学结构还不能最后确定, 此结果可供后期研究参考(表1)。

2.2 不同日龄的柑橘大实蝇对 N-(3-甲基丁基)乙酰胺的 EAG 反应

对柑橘大实蝇性别差异对N-(3-甲基丁基)乙酰胺剂量的EAG反应进行了研究, 研究结果表明性别对EAG反应存在显著差异。用雌虫做实验时发现N-(3-甲基丁基)乙酰胺剂量范围为1-100 μg , 雌虫EAG反应随着N-(3-甲基丁基)乙酰胺剂量的升高显著上升, 并在剂量为100 μg 时达到最大触角电位值, 触角电位反应随后降低。与雌性成虫相比较, 雄虫EAG反应也随着N-(3-甲基丁基)乙酰胺剂量的升高显著上升, 当N-(3-甲基丁基)乙酰胺剂量为1 000 μg 时, 触角电位反应达到最高。比较柑橘大实蝇相同性别和相同大小间EAG反应, 结果发现当N-(3-甲基丁基)乙酰胺剂量为1 000 μg 时, 3日龄未成熟雌虫EAG反应相对值显著高于1 μg 和10 μg ($P<0.01$), 且N-(3-甲基丁基)乙酰胺剂量为100 μg 时, EAG反应仅与1 μg 时的EAG反应存在差异 ($P<0.05$)。当N-(3-甲基丁基)乙酰胺剂量为100 μg 和1 000 μg , 15日龄性成熟雌虫EAG反应相对值显著高于1 μg 和10 μg ($P\leq 0.001$)。用3日龄未成熟雄虫来做EAG发现N-(3-甲基丁基)乙酰胺高剂量1 000 μg 时, 触角电位反应显著高于剂量为1、10、100 μg ($P<0.001$)时的EAG反应; 同时, 3日龄和15日龄性成熟雄虫的EAG反应相比, 高剂量100 μg N-(3-甲基丁基)乙酰胺显著高于低剂量1 μg 和10 μg ($P\leq 0.001$)引起的EAG反应。当N-(3-甲基丁基)乙酰胺剂量为1 000 μg 时, 与剂量1、10、100 μg EAG反应相比, EAG反应存在显著差异 ($P<0.05$)。总体而言, 柑橘大实蝇随着N-(3-甲基丁基)乙酰胺剂量增加EAG反应逐渐增高, 且在100 μg 和1 000 μg 下达到最大值。EAG反应在高剂量和低剂量之间存在显著差异(图3)。

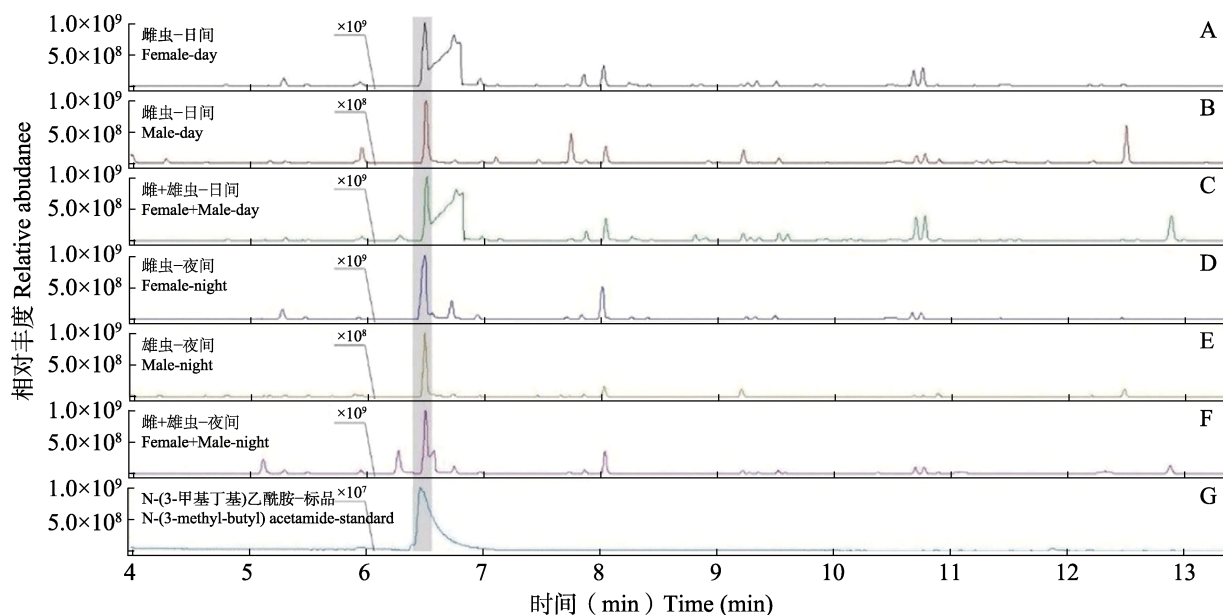


图 1 柑橘大实蝇挥发物 GC-MS 鉴定总离子色谱图

Fig. 1 Total ion chromatogram of volatile compounds of *Bactrocera minax* by GC-MS

A. 15 日龄柑橘大实蝇雌虫日间收集物 (9:00 am-22:00 pm); B. 15 日龄柑橘大实蝇雄虫日间收集物 (9:00 am-22:00 pm); C. 15 日龄柑橘大实蝇雌+雄虫日间收集物 (9:00 am-22:00 pm); D. 15 日龄柑橘大实蝇雌虫夜间收集物 (22:00 pm-9:00 am); E. 15 日龄柑橘大实蝇雄虫夜间收集物 (22:00 pm-9:00 am); F. 15 日龄柑橘大实蝇雌雄虫夜间收集物 (22:00 pm-9:00 am); G. 代表 N-(3-甲基丁基)乙酰胺标准样品。
 $\times 10^8$ or $\times 10^9$ 代表 N-(3-甲基丁基)乙酰胺含量的相对丰度。

A. Volatile collection of 15-day-old female *B. minax* during the day (9:00 am-22:00 pm); B. Volatile collection of 15-day-old male *B. minax* during the day (9:00 am-22:00 pm); C. Volatile collection of 15-day-old male and female *B. minax* mixture during the day (9:00 am-22:00 pm); D. Volatile collection of 15-day-old female *B. minax* at night (22:00 pm-9:00 am); E. Volatile collection of 15-day-old male *B. minax* at night (22:00 pm-9:00 am); F. Volatile collection of 15-day-old male and female *B. minax* mixture at night (22:00 pm-9:00 am); G. N-(3-methyl-butyl) acetamide standard. $\times 10^8$ or $\times 10^9$ represents relative abundance of N-(3-methyl-butyl) acetamide.

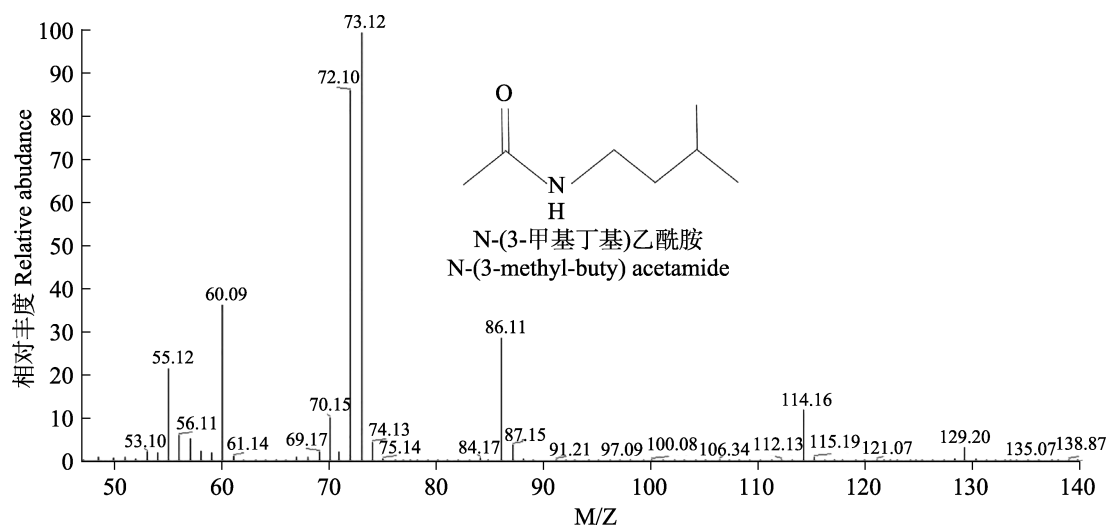


图 2 柑橘大实蝇挥发物总离子质谱图

Fig. 2 Mass spectrogram of volatile compounds of *Bactrocera minax*

质谱图谱和标品比对确定该信息素物质为 N-(3-甲基丁基)乙酰胺 (m/z: 129, 114, 86, 73, 72, 60)。GC-MS shows N-(3-methyl-butyl) acetamide is the major unknown chemical (m/z: 129, 114, 86, 73, 72, 60) and later it is confirmed by N-(3-methyl-butyl) acetamide standard.

表 1 HS-SPME 收集到的其它柑橘大实蝇挥发物
Table 1 Other volatiles of *Bactrocera minax* collected by HS-SPME

保留时间 Retention time	化合物 Compounds	离子峰 Ions peaks
8.05	Ethanone, 1-(6-methyl-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-1-yl)-	43, 112, 55
10.72	1,1'-(4-Methyl-1,3-phenylene)bis[3-(5-benzyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)urea]	91, 43, 40
10.80	3-Cyclopentylpropionic acid, 2-pentadecyl ester	125, 55, 83

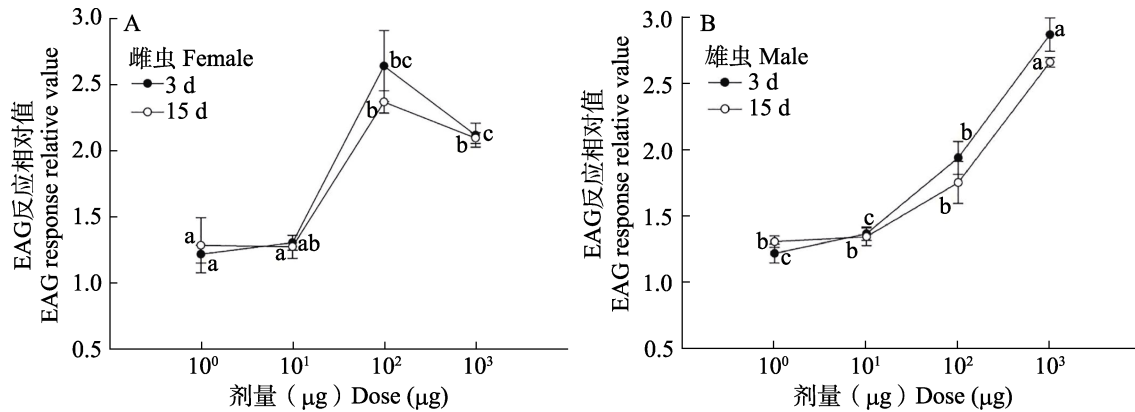


图 3 柑橘大实蝇成虫对不同剂量 N-(3-甲基丁基)乙酰胺的 EAG 反应
Fig. 3 EAG responses to different doses of N-(3-methyl-butyl) acetamide in female and male adults of *Bactrocera minax*

A. 柑橘大实蝇雌虫的 EAG 反应相对值; B. 柑橘大实蝇雄虫的 EAG 反应相对值。

A. EAG response of female *B. minax*; B. EAG response of male *B. minax*.

误差棒为 4 个生物学重复的标准误。图中标有不同字母表示同性别同日龄间差异显著 (LSD, Dunnett T3)。

The error bars are the standard error SE ($N=4$). The different letters indicate the statistical difference between the same sex and the same day (LSD, Dunnett T3).

2.3 不同日龄和性别的柑橘大实蝇对 N-(3-甲基丁基)乙酰胺的 EAG 反应

柑橘大实蝇对 N-(3-甲基丁基)乙酰胺的性别和成虫发育阶段的触角电位反应进行了研究, 研究数据分析表明在相同剂量相同性别下 3 d 大小和 15 d 大小柑橘大实蝇雌雄虫对 N-(3-甲基丁基)乙酰胺的 EAG 反应差异不显著 ($P>0.05$)。进一步分析同剂量同日龄柑橘大实蝇对 N-(3-甲基丁基)乙酰胺的 EAG 反应, 结果发现当 N-(3-甲基丁基)乙酰胺剂量为 1 µg 或 10 µg 时, EAG 反应无明显差异 ($P>0.05$)。当 N-(3-甲基丁基)乙酰胺剂量为 100 µg 时, 未成熟 3 日龄柑橘大实蝇雌雄虫 EAG 反应无显著差异 ($P>0.05$), 成熟 15 日龄柑橘大实蝇雌雄虫 EAG 反应显著差异 ($P<0.05$)。但当 N-(3-甲基丁基)乙酰胺剂量为 1 000 µg 时, 3 d 和 15 d 的雌雄虫柑橘大实蝇之间存在差异显著 ($P<0.05$) 的触角电位反应 (图 4)。

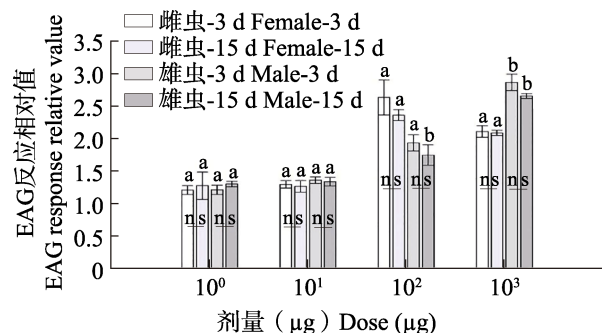


图 4 不同日龄和性别的柑橘大实蝇对 N-(3-甲基丁基)乙酰胺的 EAG 反应

Fig. 4 EAG responses to N-(3-methyl-butyl) acetamide of *Bactrocera minax* as a function of different ages and sexes

误差棒为 4 个生物学重复的标准误, ns 代表同剂量同性别间差异比较不显著 (t -检验), 柱上标有不同字母表示同剂量同龄期间差异显著 (t -检验)。

The error bars are the standard error (SE) of four replicates.

Histograms with ns indicate no significant difference between the same concentration and the same sex, while with different letters indicate significant difference (t -test).

2.4 剂量、性别、日龄变量及交互作用对 N-(3-甲基丁基)乙酰胺的 EAG 反应

对 N-(3-甲基丁基)乙酰胺的不同剂量和剂量×性别对 N-(3-甲基丁基)乙酰胺的触角电位反应的多因素方差分析进行了研究, 结果表明剂量、剂量×性别对 N-(3-甲基丁基)乙酰胺的 EAG 反应相对值有显著影响 ($P<0.001$)。而单变量性别和日龄, 多变量间剂量×日龄、性别×日龄和剂量×性别×日龄对 N-(3-甲基丁基)乙酰胺的 EAG 反应相对值无显著差异 ($P>0.05$) (表 2)。

表 2 多因素方差分析剂量, 性别, 日龄及变量相互作用对 N-(3-甲基丁基)乙酰胺的 EAG 反应

Table 2 MANOVA testing for effects of dose, sex, age and interactions of these variables on EAG responses of N- (3-methyl-butyl) acetamide

源 Source	df	F	P
剂量 Dose	3	103.330	***0.000
性别 Sex	1	0.146	0.704
日龄 Age	1	4.195	0.227
剂量×性别 Dose×sex	3	21.079	***0.000
剂量×日龄 Dose×age	3	1.251	0.302
性别×日龄 Sex×age	1	0.025	0.874
剂量×性别×日龄 Dose×sex×age	3	0.248	0.862
误差 Error	48		

$P>0.05$ 代表差异不显著; *代表 $0.01<P\leq 0.05$; **代表 $P\leq 0.01$; ***代表 $P\leq 0.001$ 。

$P>0.05$ denotes no significant difference; * denotes $0.01<P\leq 0.05$; ** denotes $P\leq 0.01$; *** denotes $P\leq 0.001$.

3 结论与讨论

本研究采用顶空固相微萃取的方法分析鉴定柑橘大实蝇信息素。我们的研究结果发现性成熟的柑橘大实蝇雌雄虫在白天和晚上及在不同性别组合下均会释放 N-(3-甲基丁基)乙酰胺, 所以我们提出 N-(3-甲基丁基)乙酰胺可能为柑橘大实蝇的一种信息素。N-(3-甲基丁基)乙酰胺属于脂肪族酰胺类化合物家族, 其作为昆虫信息素在许多实蝇昆虫中已被报道, 其中包括雄性昆士兰实蝇 *B. tryoni* (Tan and Nishida, 1995)、雄

性瓜实蝇 *D. cucurbitae* (Nishida *et al.*, 1993)、雄性桔小实蝇 *B. dorsalis* (Perkins *et al.*, 1990)、雄性杨桃实蝇 *B. carambolae* (Wee and Tan, 2005)、番石榴实蝇 *B. correcta* (Zhang *et al.*, 2019)。Bellas 和 Fletcher (1979) 分析鉴定出 6 种脂肪族酰胺为雄性昆士兰实蝇的性信息素成分。上述结果中雄性实蝇通过直肠腺释放 N-(3-甲基丁基)乙酰胺信息素的现象与本研究相似。遗憾的是, 以上研究尚未确切证明 N-(3-甲基丁基)乙酰胺的作用以及探究雌性实蝇是否会释放 N-(3-甲基丁基)乙酰胺信息素。据已有的研究报道推测, N-(3-甲基丁基)乙酰胺可作为性信息素或警告信息素 (Heath and Landolt, 1988; Dani *et al.*, 2008; Kumaran *et al.*, 2014)。肖伟等 (2013) 利用有机溶剂提取获得了柑橘大实蝇成虫的直肠粗提物, 通过分析研究该提取物的生物活性, 我们的结果发现柑橘大实蝇雌雄成虫直肠器官粗提物中都含有能够吸引成虫异性个体的信息素生物活性物质。因此, 我们推测雌雄虫中均含有的 N-(3-甲基丁基)乙酰胺物质为柑橘大实蝇直肠粗提物分泌的成分之一, 但是否是橘大实蝇肠道微生物合成的产物还需要做进一步的研究。除此之外, 由于实验前抓取柑橘大实蝇放入透明的三角瓶以及白天时间段人为的走动, 对其有一定的惊扰, 柑橘大实蝇在不同时间段和性别组合下均释放 N-(3-甲基丁基)乙酰胺物质, 推测 N-(3-甲基丁基)乙酰胺也可能是一种警示性信号化合物, 但该假设还需在行为方面研究的进一步验证。

基于以上推测和结论, 本研究进一步利用触角电位分别测定了不同日龄的柑橘大实蝇雌雄成虫对 N-(3-甲基丁基)乙酰胺的 EAG 反应, 因为不同日龄代表了不同性成熟程度。我们的研究结果表明随着 N-(3-甲基丁基)乙酰胺信息素浓度的升高, EAG 反应相对值增大, 且在滤纸上的含量为 100 μg 和 1 000 μg 时都达到最大反应值。这在其它昆虫的相关研究中也得到验证, 相较于低浓度 1 μg 和 10 μg , 高浓度如大于 100 μg 往往会引起实蝇较大的触角电位反应 (杜迎刚等, 2015; 邢亚等, 2017)。柑橘大实蝇羽化过程中,

雄虫先羽化,性成熟后飞向桔园占领领地,后与雌虫进行交配(武可明,2013),从这个角度来看,雄虫的EAG最高反应值位于1 000 μg 高于雌虫的最高反应值100 μg ,N-(3-甲基丁基)乙酰胺也可能作为一种橘大实蝇成虫的领地标记信息素。

同浓度同日龄橘大实蝇雌雄虫触角电位反应相对值比较,仅在高浓度100 μg 和1 000 μg 下存在差异。当N-(3-甲基丁基)乙酰胺物质浓度为100 μg 时,15 d大小雌虫的触角电位反应相对值高于雄虫,相反N-(3-甲基丁基)乙酰胺物质浓度为1 000 μg 时,3 d和15 d雄虫的触角电位反应相对值显著高于雌虫。推测15 d的橘大实蝇雌虫在100 μg 浓度下,具有更显著灵敏的敏感性,而3 d和15 d橘大实蝇雄虫在1 000 μg 浓度下,具有更显著灵敏的敏感性,并与其最高触角电位反应值对应的最适浓度,推断橘大实蝇触角感受器的数量的差异性和分布的特异性可能会影响其敏感性(宋傲群等,2015)。而当浓度太低时,未能引起橘大实蝇雌雄虫明显的嗅觉反应,所以表现出无显著差异。随后比较发现,同浓度同性别但不同日龄的橘大实蝇雌雄虫触角电位反应相对值均无显著差异。说明天数和性成熟与否不会造成橘大实蝇雌、雄虫对N-(3-甲基丁基)乙酰胺的反应强度差异。由此可见N-(3-甲基丁基)乙酰胺物质可能并不是性信息素成分之一。本研究进一步分析浓度、性别、日龄变量以及变量间相互作用对N-(3-甲基丁基)乙酰胺的触角电位反应相对值影响,推测雌雄虫间羽化过程和行为上的差异导致了剂量以及剂量 $\times$ 性别变量对N-(3-甲基丁基)乙酰胺的触角电位反应不同差异。

综上所述,本研究初步分析了橘大实蝇成虫的挥发性信号化合物,结果发现N-(3-甲基丁基)乙酰胺可能是一种警告信息素或标记信息素化合物,N-(3-甲基丁基)乙酰胺会引起成虫强烈的触角电位反应,研究结果和过程对完整揭示橘大实蝇化学通讯系统具有十分重要的意义。本研究结果也为进一步开发利用橘大实蝇诱捕器奠定了基础。然而,N-(3-甲基丁基)乙酰胺在

橘大实蝇体内合成的具体部位和在橘大实蝇化学通讯系统中的功能尚不明确,N-(3-甲基丁基)乙酰胺在田间的实际效果还有待于进一步深入试验和田间试验的验证。

参考文献 (References)

- Anderbrant O, Östrand F, Bergström G, Wassgren AB, Auger-Rozenberg MA, Geri C, Hedenström E, Högborg HE, Herz A, Heitland W, 2005. Release of sex pheromone and its precursors in the pine sawfly *Diprion pini* (Hym., Diprionidae). *Chemoecology*, 15: 147–151.
- Bellas TE, Fletcher BS, 1979. Identification of the major components in the secretion from the rectal pheromone glands of the queensland fruit flies *Dacus tryoni* and *Dacus neohumeralis* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Chemical Ecology*, 5(5): 795–803.
- Chen SX, Xie YZ, 1955. Taxonomic notes on the Chinese citrus fly *Tetradacus citri* Chen. *Acta Entomologica Sinica*, 5(1): 123–126. [陈世襄, 谢蕴贞, 1955. 关于桔大实蝇的学名及种征. 昆虫学报, 5(1): 123–126.]
- Dani FR, Jeanne RL, Clarke SR, Jones GR, Morgan ED, Francke W, Turillazzi S, 2008. Chemical characterization of the alarm pheromone in the venom of *Polybia occidentalis* and of volatiles from the venom of *P. sericea*. *Physiological Entomology*, 25(4): 363–369.
- Du TH, Hua DK, He ZZ, Wang FL, Gui LY, 2018. Behavioral responses of adults *Bactrocera minax* (Diptera: Tephritidae) to volatile organic components from *Castanea* (Fagales: Fagaceae). *Journal of Environmental Entomology*, 40(2): 474–484. [杜田华, 华登科, 何章章, 王福莲, 桂连友, 2018. 橘大实蝇成虫对板栗挥发物的行为反应. 环境昆虫学报, 40(2): 474–484.]
- Du YG, Ji QE, Lai ZX, Chen JH, 2015. Electroantennographic responses of three fruit flies to methyl eugenol and cuelure. *Journal of Forest and Environment*, 35(3): 279–283. [杜迎刚, 季清娥, 赖钟雄, 陈家骅, 2015. 3种实蝇对甲基丁香酚和诱蝇酮的触角电位反应. 森林与环境学报, 35(3): 279–283.]
- Gong QT, Zhao ZM, Sun RH, He L, Xiao W, Li SH, 2014. Electrophysiological activity of some materials to Chinese citrus fly and their attraction in field. *Journal of Environmental Entomology*, 36(1): 95–101. [宫庆涛, 赵志模, 孙瑞红, 何林, 肖伟, 李素红, 2014. 多种物质对桔大实蝇的电生理活性及田间引诱效果评价. 环境昆虫学报, 36(1): 95–101.]
- Harris RL, Oehler DD, Berry IL, 1976. Sex pheromone of the stable fly: Effect on cuticular hydrocarbons of age, sex, species, and mating. *Environmental Entomology*, 5(5): 973–977.

- Heath RR, Landolt PJ, 1988. The isolation, identification and synthesis of the alarm pheromone of *Vespula squamosa* (Drury) (Hymenoptera: Vespidae) and associated behavior. *Experientia*, 44(1): 82–83.
- Kumaran N, Hayes RA, Clarke AR, 2014. Cuelure but not zingerone make the sex pheromone of male *Bactrocera tryoni* (Tephritidae: Diptera) more attractive to females. *Journal of Insect Physiology*, 68: 36–43.
- Lu HX, Zhang FY, Mu BZ, 1998. Preliminary study on extraction of sex pheromone of Chinese citrus fly *Dacus citri* (Chen). *Journal of Hubei Agricultural College*, 18(1): 33–35. [鲁红学, 张方钰, 牟本忠, 1998. 柑桔大实蝇性信息素的提取及测试. 湖北农学院学报, 18(1): 33–35.]
- Nishida R, Iwahashi O, Tan KH, 1993. Accumulation of *Dendrobium superbum* (Orchidaceae) fragrance in the rectal glands by males of the melon fly, *Dacus cucurbitae*. *Journal of Chemical Ecology*, 19(4): 713–722.
- Perkins MV, Fletcher MT, Kitching W, Drew RAI, Moore CJ, 1990. Chemical studies of rectal gland secretions of some species of *Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Journal of Chemical Ecology*, 16(8): 2475–2487.
- Rochat D, Ramirez-Lucas P, Malosse C, Aldana R, Kakul T, Morin JP, 2000. Role of solid-phase microextraction in the identification of highly volatile pheromones of two Rhinoceros beetles *Scapanes australis* and *Strategus aloeus* (Coleoptera, Scarabaeidae, Dynastinae). *Journal of Chromatography A*, 885(1/2): 433–444.
- Song AQ, Zhou Q, Liu L, Huang KR, 2015. Sensilla of adult *Bactrocera minax* observed with scanning electron microscope. *Journal of Environmental Entomology*, 37(6): 171–175. [宋傲群, 周琼, 刘路, 黄科瑞, 2015. 柑橘大实蝇成虫超微感器的扫描电镜观察. 环境昆虫学报, 37(6): 171–175.]
- Tan KH, Nishida R, 1995. Incorporation of raspberry ketone in the rectal glands of males of the queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni* Froggatt (Diptera: Tephritidae). *Applied Entomology and Zoology*, 30(3): 494–497.
- Tian HJ, Chen YX, Huang YQ, 2011. Advances in electroantennogram (EAG) technique of insect. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 26(5): 907–910. [田厚军, 陈艺欣, 黄玉清, 2011. 昆虫触角电位技术的研究进展. 福建农业学报, 26(5): 907–910.]
- Wang XL, Zhang RJ, 2009. Review on biology, ecology and control of *Bactrocera (Tetradacus) minax* Enderlein. *Journal of Environmental Entomology*, 31(1): 73–79. [王小蕾, 张润杰, 2009. 桔大实蝇生物学、生态学及其防治研究概述. 环境昆虫学报, 31(1): 73–79.]
- Wee SL, Tan KH, 2005. Female sexual response to male rectal volatile constituents in the fruit fly, *Bactrocera carambolae* (Diptera: Tephritidae). *Applied Entomology and Zoology*, 40(2): 365–372.
- Wu KM, 2013. Studies on the sex pheromone of Chinese citrus fly, *Bactrocera minax*. Master dissertation. Chongqing: Southwest University. [武可明, 2013. 柑橘大实蝇性信息素的初步研究. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学.]
- Xia YL, Ma XL, Hou BH, Ouyang GC, 2018. A review of *Bactrocera minax* (Diptera: Tephritidae) in China for the purpose of safeguarding. *Advances in Entomology*, 6(2): 35–61.
- Xiao W, Wu KM, Gong QT, Zhao ZM, He L, 2013. Pheromonal activity of rectum extracts from Chinese citrus fly (*Bactrocera minax*). *Scientia Agricultura Sinica*, 46(7): 1501–1508. [肖伟, 武可明, 宫庆涛, 赵志模, 何林, 2013. 柑橘大实蝇直肠粗提物的信息素功能. 中国农业科学, 46(7): 1501–1508.]
- Xing Y, Chi DF, Yu J, Yan JX, Ran YL, 2017. EAG and behavioral responses of *Cryptorrhynchus lapathi* (Coleoptera: Curculionidae) to twelve plant volatiles. *Scientia Silvae Sinicae*, 53(6): 159–167. [邢亚, 迟德富, 宇佳, 严峻鑫, 冉亚丽, 2017. 杨干象对 12 种植物挥发物的电生理及行为反应. 林业科学, 53(6): 159–167.]
- You KX, Zhou Q, Jin Q, 2012. Feeding, mating and oviposition behaviours of the adults of *Bactrocera minax* Enderlein. *Journal of Natural Science of Hunan Normal University*, 35(5): 68–71. [尤克西, 周琼, 荆奇, 2012. 柑橘大实蝇成虫的取食、交配和产卵行为. 湖南师范大学自然科学学报, 35(5): 68–71.]
- Zhang HY, 2015. *Bactrocera minax* sex pheromone. China, Patent, 105145557. 2015-12-16. [张宏宇, 2015. 一种柑桔大实蝇性信息素. 中国, 发明专利, 105145557. 2015-12-16.]
- Zhang X, Wei C, Miao J, Zhang X, Wei B, Dong W, Xiao C, 2019. Chemical compounds from female and male rectal pheromone glands of the guava fruit fly, *Bactrocera correcta*. *Insects*, 10(3): 78.
- Zhou Q, Liu L, You KX, Jing Q, 2014. The extracting method and application of a sex pheromone of *Bactrocera minax*. China, Patent, 103766336. 2014-05-07. [周琼, 刘路, 尤克西, 荆奇, 2014. 一种柑橘大实蝇性信息素及其提取方法与应用. 中国发明专利. 103766336. 2014-05-07.]
- Zhou HZ, Xiang ZJ, Qin XJ, 2009. Occurrence and damage characteristics of *Bactrocera minax* and its control technology. *Hubei Plant Protection*, 111(1): 38–39. [周华众, 向子钧, 秦仙姣, 2009. 柑橘大实蝇的发生危害特点及防控技术. 湖北植保, 111(1): 38–39.]
- Zhu FD, Yang H, 2015. Mating and oviposition behaviours of *Bactrocera (Tetradacus) minax*. *Journal of Mountain Agriculture and Biology*, 34(3): 72–74. [诸凤丹, 杨鸿, 2015. 柑橘大实蝇交配和产卵习性的研究. 山地农业生物学报, 34(3): 72–74.]