

DOI:10.13718/j.cnki.zwyx.2024.05.008

互叶白千层及其挥发物对柑橘木虱 行为选择的影响及其应用

叶梓栋, 林泽岳, 杨春艳, 蔡宏迪, 韩群鑫

仲恺农业工程学院 植物健康研究院/农业农村部华南果蔬绿色防控重点实验室/
广东省普通高校果蔬病虫害绿色防控重点实验室, 广州 510225

摘要: 柑橘木虱 (*Diaphorina citri* Kuwayama) 是危害柑橘嫩梢期的害虫, 是柑橘黄龙病的传播媒介之一。田间调查表明互叶白千层 (*Melaleuca alternifolia* Cheel) 隔离防护带对柑橘园中的柑橘木虱起到了有效的防控作用。本研究采用气相色谱-质谱联用技术分析广东省德庆市柑橘园种植的互叶白千层植株的挥发物组分, 结合气相色谱-触角电位技术研究了柑橘木虱成虫对互叶白千层精油的触角电位反应, 并利用Y型嗅觉仪测试了柑橘木虱对该植物、植物精油及其主要挥发物的行为反应。结果表明, 互叶白千层生物型为4-松油醇, 挥发物中含有29种化合物。柑橘木虱雌成虫触角对互叶白千层精油中的 α -松油烯、 γ -松油烯和4-松油醇均有电生理反应, 雄成虫触角对 γ -松油烯和4-松油醇有电生理反应。行为反应测试结果表明, 柑橘木虱成虫对互叶白千层枝叶具有明显驱避作用, 对20 μ L/mL、30 μ L/mL互叶白千层精油以及100 μ L/mL 4-松油醇亦均具有明显驱避作用, 而对0.1 μ L/mL γ -松油烯具有明显引诱作用。本研究从行为学反应和化学成分等方面深入研究了柑橘木虱和互叶白千层间的关系, 研究结果可为利用4-松油醇型互叶白千层防控柑橘木虱以及开发柑橘木虱绿色防控技术提供理论依据。

关键词: 亚洲柑橘木虱; 互叶白千层;
挥发物; 行为反应

中图分类号: S432.6

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 2097-1354(2024)05-0063-11

Effect of *Melaleuca alternifolia* Cheel and Its Volatile Compounds on Behavior of *Diaphorina citri* Kuwayama and Its Application

YE Zidong, LIN Zeyue, YANG Chunyan,

收稿日期: 2023-12-29

基金项目: 广东省重点建设学科科研能力提升项目(2022ZDJS020).

作者简介: 叶梓栋, 硕士研究生, 主要从事农业昆虫及害虫防治方面的研究.

通信作者: 韩群鑫, 博士, 教授.

CAI Hongdi, HAN Qunxin

Innovative Institute for Plant Health, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Green Prevention and Control on Fruits and Vegetables in South China, Guangzhou 510225, China

Abstract: The *Diaphorina citri* Kuwayama is an insect pest, which damages the young shoots of citrus and serves as a vector for the transmission of citrus Huanglongbing. Field investigations indicated that citrus orchard with protective belts of *Melaleuca alternifolia* Cheel, could effectively control the *Diaphorina citri* Kuwayama. The volatile components of *M. alternifolia* from citrus orchards in Deqing City, Guangdong Province were analyzed using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Combined with gas chromatography-electroantennographic detection (GC-EAD) technology, the antennal responses of *Diaphorina citri* Kuwayama adults to the essential oil of *M. alternifolia* were also studied. The olfactory behavioral responses of Asian citrus psyllid to *M. alternifolia* plant, plant essential oil, and its major volatile compounds were tested by Y-tube olfactometer. The results showed that bio-type of *M. alternifolia* was 4-terpineol, and its volatile compounds contained 29 components. The antennae of female *Diaphorina citri* Kuwayama exhibited electrophysiological responses to α -terpinene, γ -terpinene, and 4-terpineol of *M. alternifolia* essential oil, while the antennae of male psyllids only responded to γ -terpinene and 4-terpineol. Behavioral response tests indicated that adult *Diaphorina citri* Kuwayama exhibited significant avoidance to branches and leaves of *M. alternifolia*, as well as to 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ and 30 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of *M. alternifolia* essential oil and 100 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 4-terpineol. However, they were significant attracted by 0.1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ γ -terpinene. The relationship between the *Diaphorina citri* Kuwayama and *M. alternifolia* was deeply explored. The study laid a foundation for utilizing the 4-terpineol-type *M. alternifolia* essential oil to control *Diaphorina citri* Kuwayama, offering insights for the development of environmentally friendly pest control techniques for this pest.

Key words: *Diaphorina citri* Kuwayama; *Melaleuca alternifolia* Cheel; volatile compounds; behavioral response

柑橘木虱(*Diaphorina citri* Kuwayama)是危害芸香科(Rutaceae)植物的害虫,为柑橘黄龙病的传播媒介之一,柑橘黄龙病被称为柑橘产业的“癌症”^[1].柑橘木虱危害严重时,柑橘新梢枯死,其排泄物还可引发煤烟病.柑橘木虱成虫和若虫均可携带病原菌,在吸食感染黄龙病的柑橘树后的5周内,若虫感染率可达60%~100%,成虫感染率达40%.感染了黄龙病菌的柑橘木虱,可终身携带黄龙病菌^[2-3],并在体内持续繁殖.因此,控制柑橘木虱对于遏制黄龙病的传播具有至关重要的作用.

目前,柑橘木虱应急防控主要采用化学防治,有效的杀虫剂包括有机磷类、有机氯类、新烟碱类、氨基甲酸酯类等^[4].然而,过度或不合理使用药剂会使柑橘木虱产生抗药性,并引发环境污染等问题.因此,寻找高效绿色的防控技术对于果园柑橘木虱和黄龙病的防控尤为重要.植物叶片、花朵、果实等释放的具有挥发性质的化合物在害虫防治中发挥了重要作用,柑橘木虱的非寄主植物漆树科腰果属被子灌木腰果(*Anacardium occidentale*)中的有效成分(E)-4,8-二甲基壬-1,3,7-三烯和(3E,7E)-4,8,12-三甲基十三烯-1,3,7,11-四烯被证实对柑橘木虱具有驱避作用^[5];柑橘木虱侵害一个月后,嫁接枳橘的柑橘树挥发物质萜烯醇含量显著增加,增加了对柑橘木虱的驱避效果^[6].植物挥发物在抗虫研究中具有广阔的应用前景,这些研究将为柑橘木虱防治提供了新思路^[7].

互叶白千层(*Melaleuca alternifolia* Cheel)属于桃金娘科(Myrtaceae)植物,是一种产自澳大利亚东部的常绿灌木,20世纪初引入中国,目前广泛种植于广西、广东、四川、江西、福建等

地. 互叶白千层有2种生态类型, 即1, 8-桉叶素型和4-松油醇型, 这2种生态类型之间的单萜对映体如 α -蒎烯、4-松油醇和 α -松油醇的分布存在显著差异^[8]. 互叶白千层的新鲜枝叶通过蒸馏可得到具有豆蔻气味的无色或浅黄色透明油状液体, 亦称茶树精油, 该精油具有低毒、不污染粮食和环境、害虫不易产生抗性等特点, 具有广谱抗菌、防霉、杀虫等活性^[9], 可干扰灰霉菌(*Botrytis cinerea*)的生长过程并导致其死亡^[10], 与其他精油协同作用可增强对李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)的抑菌强度^[11], 对杂拟谷盗(*Tribolium confusum*)及玉米象(*Sitophilus zeamais*)的驱避、灭杀和熏蒸效果明显^[12].

在对柑橘病虫害危害情况进行田间调查时, 发现互叶白千层已作为隔离防护带种植于柑橘园区, 以防控害虫. 植物挥发性物质是植物与昆虫之间重要的信息化学物质, 在昆虫对寄主的搜寻过程中, 寄主植物所散发的化学信号起到重要作用, 昆虫依靠植株释放的挥发性物质来区分是否为寄主植物^[13-14]. 柑橘木虱是寡食性昆虫, 寄主范围仅限于芸香科50多种植物^[15], 桃金娘科植物互叶白千层及其主要成分对柑橘木虱的行为有何影响, 可否用于柑橘园柑橘木虱的防控, 值得进一步探索. 本研究利用Y型嗅觉仪法联合气质联用技术GC-MS、触角电位仪EAG等方法测试分析了互叶白千层及其主要挥发物对柑橘木虱的行为反应, 调查了互叶白千层作防护林的柑橘园中的柑橘木虱和黄龙病的发生情况, 以明确互叶白千层对柑橘木虱的趋性反应和田间应用效果, 为开发柑橘木虱绿色防控技术提供了理论依据.

1 材料与方法

1.1 供试昆虫与植物

柑橘木虱采自仲恺农业工程学院海珠校区校园内的九里香植株. 互叶白千层株高15 m, 采自广东肇庆柑橘园区周边, 每隔2棵依次采集枝叶, 并收集于标记为1, 2, 3, 4的采样袋中.

1.2 仪器及供试试剂

使用仪器包括: 美国安捷伦科技有限公司的7890A-5975C气相色谱-质谱仪、7890B-GC-EAG联用触角电位仪, 南京雪莱生物科技有限公司的Y型嗅觉仪、流量计, 杭州葫陆实业有限公司的纯露机蒸馏器.

供试试剂包括: 上海迈瑞尔生化科技有限公司的4-油醇(CAS: 562-74-3)(纯度 $\geq 98\%$)、 γ -松油烯(CAS: 99-85-4)(纯度 $\geq 95\%$)和1, 8-桉叶素(CAS: 470-82-6)(纯度 $\geq 99\%$), 广州东巨实验仪器有限公司的液体石蜡, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司的植物DNA提取试剂盒及DNA凝胶回收试剂盒, 北京全式金生物技术股份有限公司的克隆PCR产物专用载体.

1.3 试验方法

1.3.1 柑橘木虱对互叶白千层枝叶的趋性反应

利用Y型嗅觉仪进行测定, 该仪器由真空抽气泵、活性炭过滤瓶、蒸馏水过滤瓶、流量计、气味瓶、Y型管组成. 试验过程参照张旭颖^[16]研究中的方法并做改良. 为确保木虱释放后向上移动并对味源做出选择, 将Y型管斜放 45° 并固定于白色纸板上, 进虫管用黑色胶带覆盖至分岔口之间, 连接完成后将其置入养虫笼内, 打开养虫笼顶部的白炽灯作为光源, 虫笼上覆盖黑布以消除光源干扰. 测试在室内完成, 测试时间为12:00~17:00, 室内温度控制在 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$, 相对湿度为 $(65 \pm 5)\%$.

用眼科剪剪枝叶2~3 cm, 称取8 g枝叶置放于味源瓶中, 处理区为8 g剪碎的互叶白千层枝叶, 对照区为空气. 每次测试1头成虫, 每测试10头后更换新鲜枝叶和Y型管并更换味源瓶位置, 消除位置因素的影响. 每头成虫测试15 min, 气体流速控制为200 mL/min. 当虫体爬过味源臂1/3处30 s以上时视为对该气味源作出反应. 每次开始测试前, 先给Y型管通气

15 min, 使气味充满整个 Y 型管后开始测试. 随机测试 200 余头成虫, 待虫体作出选择后, 在体视镜下将雌雄成虫分开, 分别置于 20 cm 的指型管内并计数. 若柑橘木虱在设定时间内一直停留在释放臂未作出选择则不计其数量, 继续引入柑橘木虱, 直至虫体作出选择为止. 每 10 头 1 组测试后, 更换洁净的 Y 型管及气味源瓶. 测试结束后用 75% 乙醇溶液清洗气味瓶和 Y 型管, 晾干供下次使用.

1.3.2 互叶白千层精油提取及其成分分析

1.3.2.1 互叶白千层精油提取

采用 HOOLOO 灵犀电热纯露机蒸馏器提取精油. 该蒸馏器根据蒸馏的原理, 利用液体加热后沸点的差异, 将液体分离成不同的组分, 从而将植物中的精油提取出来. 使用时, 首先将植物放入蒸馏器中, 根据料液比加入适量水, 而后加热沸腾, 产生蒸汽. 蒸气经过冷凝器冷却后成为液体, 即可得到精油. 物料罐每次加入长 2~3 cm 枝叶, 共 206.5 g, 料液比为 1:4 (206.5 g 物料, 826 mL 水), 蒸馏 92 min (加热时长为 32 min, 32 min 后出露), 待蒸馏结束后收集精油, 并计算精油得率.

$$\text{精油得率}(\%) = \text{精油质量} / \text{植物碎枝叶质量} \times 100\%$$

1.3.2.2 互叶白千层精油成分分析

样品前处理: 将精油样品用乙酸乙酯稀释 200 倍, 待测.

GC 条件: 色谱柱为石英毛细管柱 DB-5MS(30 m×0.25 mm×0.25 μm); 载气为高纯氦气(99.999 5%); 分流比 1:5; 流速为 1.2 mL/min, 程序升温为 50 °C 保持 3 min, 以 5 °C/min 升至 160 °C, 再以 10 °C/min 升至 280 °C, 保持 5 min; 进样口温度为 260 °C; 进样量为 1 μL.

MS 条件: EI 源, 电离电压 70 eV; 离子源温度为 230 °C; 四极杆温度为 150 °C; 传输线温度为 280 °C; 扫描范围 40~550 amu, 全扫描方式.

数据处理: 利用安捷伦化学工作站定性软件和 NIST14 数据库鉴定化合物.

1.3.3 GC-EAG 联用测定柑橘木虱对互叶白千层精油的行为反应

采用 GC-EAG 联用触角电位仪分别测定柑橘木虱雌、雄成虫对互叶白千层精油的反应. 每头成虫只测 1 根触角, 每测 1 次后更换不同的成虫, 更换触角时, 用酒精清洗电极针, 晾干后重复使用. 雌、雄成虫各重复测试 6 次.

试验测定步骤如下: 打开触角电位仪和气相色谱仪开关, 打开空气、氢气、氮气瓶开关旋钮, 对仪器进行预热. 开启软件 Gc-Ead 2014 v1.2.5 准备记录, 打开软件 7890B-GC, 设置进样口温度 260 °C, 载气为流速 1 mL/min 的 99.999% N₂, 分流比 1:5, 充分预热后设定升温程序, 50 °C 保持 3 min, 以 5 °C/min 的速率升至 160 °C, 再以 10 °C/min 升至 280 °C, 保持 5 min; 进样量为 1 μL. 用丙酮稀释互叶白千层精油, 经 GC-EAG 联用触角电位仪反复测试浓度范围. 精油浓度为 2 μL/mL 时, FID EVE 化学物质图谱内化合物峰值未出现平峰, 证明该浓度为合适浓度. 在体视显微镜下用昆虫解剖针及镊子将整个柑橘木虱头部分离, 用导电胶将触角沾在电极两端, 将连接好的触角固定在支架上, 旋钮可移动支架的操作手柄把接好的触角电极推进到电位仪接口. 打开触角电位仪的 Syn-tech IDAC-2 检测器, 当观察到软件图谱基线呈平缓后进行测定.

1.3.4 柑橘木虱对互叶白千层精油及化学单体标准品的趋性反应

柑橘木虱对互叶白千层精油及化学单体标准品的趋性反应参照 1.3.1 进行.

将滤纸剪成 2.5 cm×2.5 cm 大小并置于味源瓶内, 每次测试时向滤纸片上加入 10 μL 待测液, 处理区均为待测试剂, 对照区均为 10 μL 液体石蜡. 打开气泵, 将气体流速控制为 200 mL/min, 每次开始测试前, 先向 Y 型管内通气 15 min, 使气味充满整个 Y 型管之后再开始测试. 精油及每个单体标准化合物每个浓度测试 80 头成虫(每次 1 头). 每测试 10 头后更换味源瓶位置, 以

消除位置因素带来的影响.若柑橘木虱在设定时间内一直停留在释放臂未作出选择则不计其数量,继续引入木虱,直到木虱作出选择为止.每组测试结束后用75%的乙醇溶液清洗气味瓶和Y型管,放置室内晾干供用.

购买主要成分为4-松油醇、 γ -松油烯、1,8-桉叶素的4-松油醇型互叶白千层.精油及化学标准单体用液体石蜡稀释成3个浓度,互叶白千层精油稀释为20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、30 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、60 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 3个浓度,4-松油醇稀释为5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 3个浓度; γ -松油烯稀释为0.1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 3个浓度;1-8-桉叶素稀释为0.1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 3个浓度.

1.4 互叶白千层对柑橘病虫害的田间防控效果

2023年11月上旬,调查广东省德庆市互叶白千层作为隔离防护林的柑橘园中柑橘病虫害的发生情况.调查时天气晴朗,温度约20 $^{\circ}\text{C}$.柑橘园约23.33 hm^2 ,四周有丘陵,果园位于一峡区内.处理区密植互叶白千层作为防护层,株高约4 m,对照区未种植互叶白千层.每0.07 hm^2 为一个调查小区,对照5个小区,处理5个小区.每小区与果园边界间隔2~5行.选取东、南、西、北、中5个点,每点选相邻植株2株,每株调查按东、南、西、北4个方向取新梢和嫩梢各2根,记录柑橘病虫害发生情况,计算带虫株率及每株平均虫量.同时,调查每个小区中疑似黄龙病植株,按每株采集8~12片老熟黄化叶片作为一个样品,处理区为25个样品,对照区为25个样品,并带回实验室,按照刘顺民等^[17]研究中的方法进行黄龙病菌的检测,引物为:OI1: 5'-GCGCGTATCCAATACGAGCGGCA-3', OI2C: 5'-GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3',以黄龙病阳性样品的DNA为阳性对照、柑橘无病毒苗木样品为阴性对照,以ddH₂O为空白对照,通过常规PCR技术进行检测,确认田间疑似黄龙病植株是否为黄龙病植株,计算柑橘黄龙病发生率.

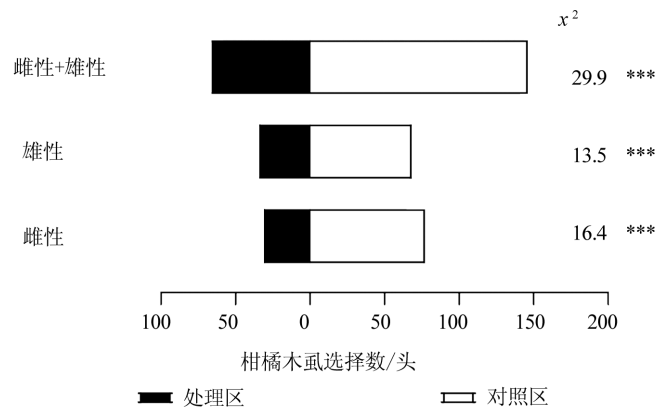
1.5 数据处理与统计学分析

采用SPSS 26.0软件进行数据分析,对柑橘木虱的趋性数据进行 χ^2 适合性检验,田间调查数据进行新复极差法分析.

2 结果与分析

2.1 柑橘木虱对互叶白千层枝叶的趋性反应

柑橘木虱成虫对互叶白千层枝叶的趋性反应见图1.结果表明,柑橘木虱雌、雄成虫对8 g剪碎的互叶白千层枝叶表现出明显的负趋性($p < 0.01$),互叶白千层枝叶对柑橘木虱成虫具有明显的驱避作用.



“***”表示柑橘木虱对互叶白千层枝叶的趋性反应明显($p < 0.01$).

图1 柑橘木虱成虫对互叶白千层枝叶的趋性反应

2.2 互叶白千层精油的得油率及其成分分析

采用灵犀电热纯露机蒸馏器提取互叶白千层枝叶精油共 26 次, 枝叶总质量为 5 369 g, 精油总质量为 87 g, 得油率 1.6%。根据互叶白千层精油密度 0.878 g/mL(25 °C)和公式 $V=m/\rho$, 计算得出提取约 99 mL 互叶白千层精油, 与实际测量值吻合。

互叶白千层精油 GC-MS 分析得出的主要化合物及相对质量分数见表 1。结果表明, 4 个采集袋中的枝叶精油共鉴定出 29 种化合物。互叶白千层精油化学成分主要为萜类化合物, 其中 4-松油醇的平均质量分数为 56.891%, γ -松油烯平均质量分数为 17.005%, α -松油烯的平均质量分数为 7.050%, 对伞花烯的平均质量分数为 5.250%, α -松油醇平均质量分数为 4.027%, 这 5 种成分占总质量分数的 90.223%, 且 4-松油醇组分质量分数 > 30%, 根据国家标准^[18]确定广东省德庆市柑橘园采集的互叶白千层的生态类型为 4-松油醇型。

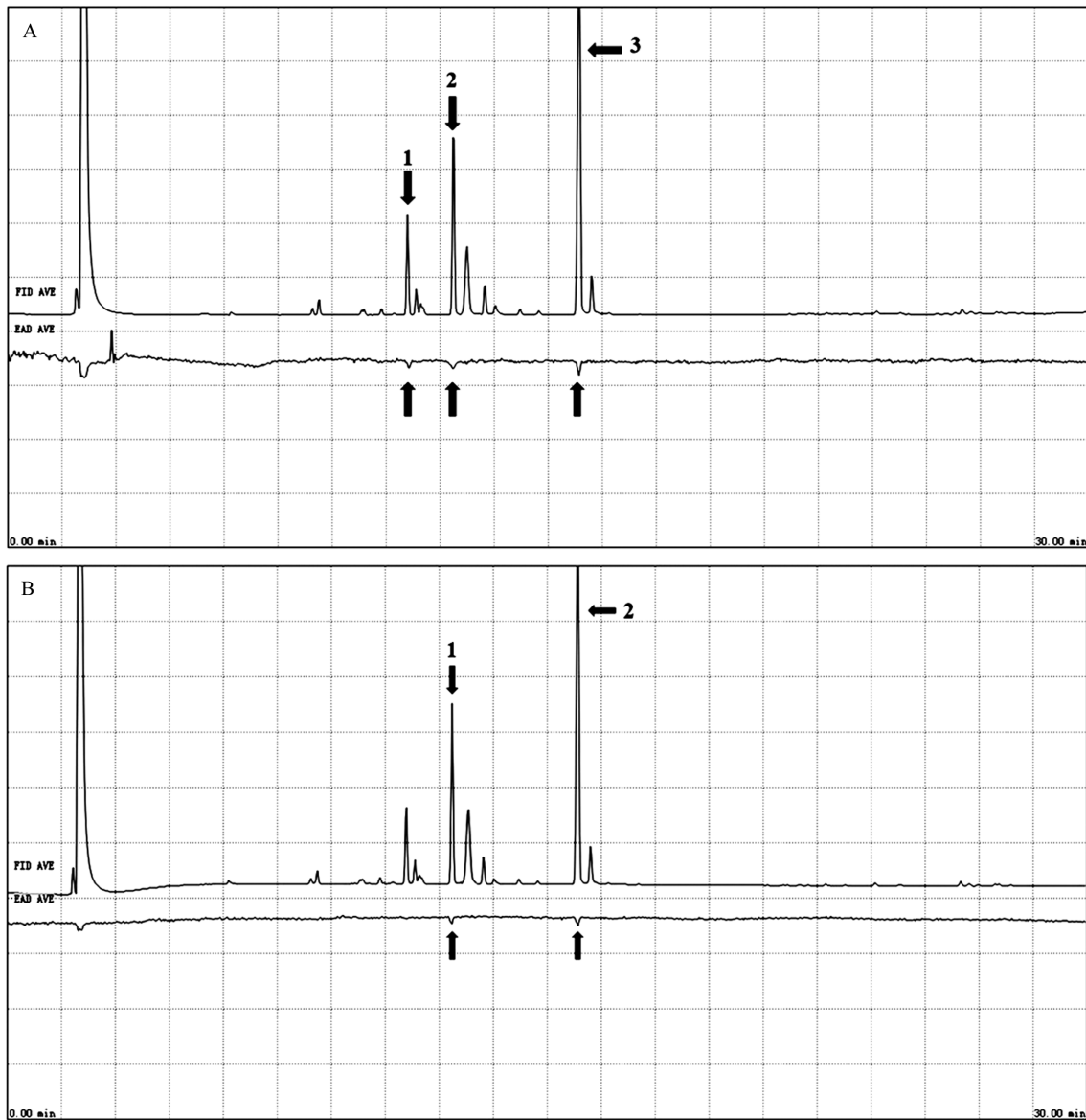
表 1 互叶白千层精油主要成分及相对质量分数

化合物	保留时间/min	CAS 号	相对质量分数/%				平均质量分数/%
			1	2	3	4	
α -侧柏烯	7.390	28634-89-1	0.590	0.570	0.569	0.570	0.570
α -蒎烯	7.586	80-56-8	1.425	1.423	1.411	1.410	1.417
桉烯	8.777	3387-41-5	0.352	0.345	0.352	0.346	0.342
β -蒎烯	8.814	127-91-3	0.448	0.448	0.446	0.448	0.447
β -月桂烯	9.317	123-35-3	0.548	0.549	0.553	0.555	0.550
α -水芹烯	9.720	99-83-2	0.166	0.156	0.156	0.156	0.158
α -松油烯	10.159	99-86-5	7.121	7.066	7.041	6.974	7.050
对伞花烯	10.371	527-84-4	5.221	5.253	5.268	5.258	5.250
D-柠檬烯	10.493	5989-27-5	0.905	0.918	0.903	0.903	0.907
1,8-桉叶素	10.551	470-82-6	0.612	0.639	0.627	0.619	0.624
γ -松油烯	11.504	99-85-4	17.034	17.086	16.977	16.923	17.005
异松油烯	12.341	586-62-9	2.627	2.614	2.600	2.591	2.608
4-松油醇	15.200	562-74-3	56.837	56.840	56.924	56.965	56.891
α -松油醇	15.513	98-55-5	3.961	4.012	4.046	4.090	4.027
α -萜澄茄油烯	19.775	17699-14-8	0.010	0.010	0.010	0.011	0.010
异喇叭烯(-)	20.405	95910-36-4	0.011	0.010	0.010	0.010	0.010
马兜铃烯	20.538	6831-16-9	0.010	0.010	0.011	0.011	0.011
甲基丁香酚	21.175	93-15-2	0.063	0.058	0.061	0.063	0.061
α -古芸烯	21.385	489-40-7	0.059	0.059	0.059	0.061	0.060
β -石竹烯	21.645	87-44-5	0.082	0.074	0.075	0.075	0.077
香橙烯	22.169	72474-25-2	0.227	0.215	0.215	0.220	0.219
α -石竹烯	22.492	6753-98-6	0.022	0.018	0.018	0.019	0.019
香树烯(-)	22.698	25246-27-9	0.110	0.103	0.105	0.111	0.107
β -杜松溪	22.984	523-47-7	0.051	0.043	0.045	0.049	0.047
白千层烯(+)	23.593	21747-46-6	0.210	0.168	0.170	0.182	0.182
δ -杜松烯	24.245	483-76-1	0.222	0.215	0.214	0.224	0.218
桉油烯醇	25.515	77171-55-2	0.225	0.269	0.273	0.274	0.260
蓝桉醇	25.701	51371-47-2	0.630	0.606	0.643	0.630	0.627
白千层醇(+)	25.907	552-02-3	0.220	0.223	0.217	0.251	0.227

2.3 GC-EAG 联用测定柑橘木虱对互叶白千层精油的行为反应

柑橘木虱雌成虫、雄成虫对互叶白千层精油挥发性化学物质的 GC-EAD 反应图谱如图 2 所示。由试验结果可知, 保留时间分别为 11.504 min 和 15.200 min 的精油成分均能引起柑橘木虱雌成虫、雄成虫触角产生电生理反应, 相较于雄成虫, 雌成虫在保留时间为 10.159 min 时也产生了电生理反应。由 GC-MS 结果可知, 保留时间为 10.159 min 对应的化合物为 α -松油烯, 11.504 min 对应的化合物为 γ -松油烯, 15.200 min 对应的化合物为 4-松油醇, 说明柑橘木虱雌

成虫、雄成虫对 γ -松油烯和 4-松油醇均能产生行为反应,雌性除了对以上 2 种成分产生行为反应外,还对 α -松油烯产生电生理反应. 4-松油醇和 γ -松油烯这 2 种化合物对柑橘木虱雌成虫、雄成虫产生驱避或者吸引作用,尚需进一步进行验证.



A 为柑橘木虱雌成虫 GC-EAD 反应图, B 为柑橘木虱雄成虫 GC-EAD 反应图;

FID AVE 曲线为白千层精油挥发性化学物质图谱, EAD AVE 曲线为相应的昆虫触角电位变化图谱.

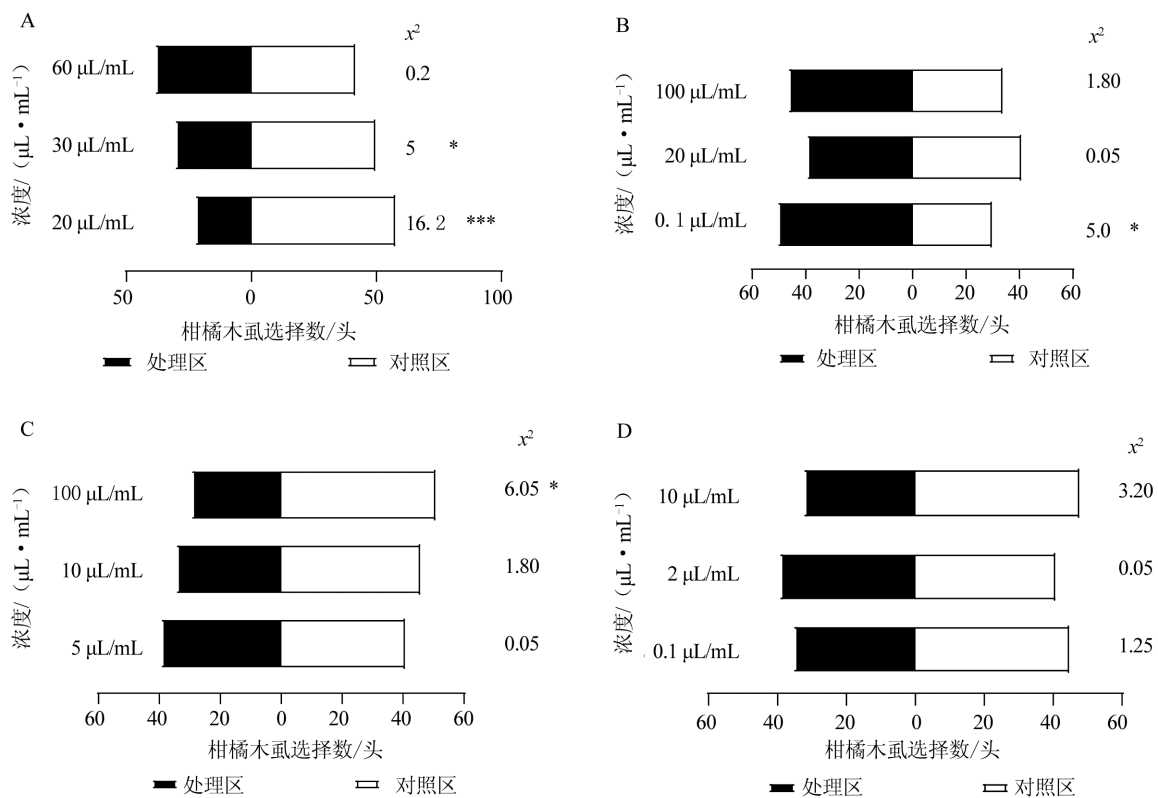
图 2 柑橘木虱雌、雄成虫对互叶白千层精油挥发性化学物质的 GC-EAD 反应图谱

2.4 柑橘木虱对互叶白千层精油及其单体标准化化合物的趋性反应

柑橘木虱对精油及其单体标准化化合物的趋性反应见图 3. 行为反应测试结果表明柑橘木虱成虫对 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、30 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 互叶白千层精油(图 3A)以及 0.1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ γ -松油烯(图 3B)均具有明显驱避作用,而对 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 4-松油醇具有明显引诱作用(图 3C), 1, 8-桉叶素 3 个浓度下对柑橘木虱成虫趋性反应无明显效果(图 3D).

柑橘木虱对 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 互叶白千层精油有极明显的负趋性($p < 0.001$),对 30 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 互叶白千层精油则表现出明显的负趋性($p < 0.05$),而对 60 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 该精油无明显趋性反应,表明

互叶白千层精油在一定浓度范围内,才会对柑橘木虱成虫具有驱避作用.柑橘木虱成虫对100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 4-松油醇有明显负趋性($p < 0.05$),而对5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 和10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 4-松油醇无明显趋性反应,说明100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 4-松油醇对柑橘木虱成虫有明显驱避作用. γ -松油烯则与以上2种化合物不同,柑橘木虱成虫对0.1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ γ -松油烯有明显的正趋性($p < 0.05$),而对20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 和100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ γ -松油烯均无明显的趋性反应,表明0.1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ γ -松油烯对柑橘木虱有明显吸引作用.1,8-桉叶素0.1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 和10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 这3个浓度对柑橘木虱的选择行为差异均无统计学意义,结果表明了在该浓度范围内,1,8-桉叶素对柑橘木虱行为反应无明显影响.



A, B, C, D 分别代表互叶白千层精油、 γ -松油烯、4-松油醇、1,8-桉叶素;

图中“*”表示柑橘木虱对该精油的趋性反应明显($p < 0.05$),“***”表示柑橘木虱对该精油的趋性反应极明显($p < 0.001$).

图3 柑橘木虱对互叶白千层精油及其成分的趋性反应

2.5 互叶白千层对柑橘木虱的田间防控效果

田间调查结果表明,无论是否种植互叶白千层作为防护隔离带,柑橘种植区都有柑橘红蜘蛛、柑橘潜叶蛾、柑橘炭疽病的发生.由调查结果可知,5个处理区的柑橘木虱成虫和若虫的数量均为0,而5个对照区均发现柑橘木虱,最高数量可达 (14.0 ± 2.7) 头,有虫株率则为80%.由此可见,互叶白千层在柑橘果园中对柑橘木虱驱避效果明显,能有效阻止柑橘木虱危害(表2).

表 2 互叶白千层对柑橘木虱的田间防控效果

组别	采样地点	调查株数/株	带虫株数/株	带虫株率/%	平均虫量/头	平均每株虫量/头
处理区	1 区	10	0	0		0c
	2 区	10	0	0		0c
	3 区	10	0	0	0.0±0.0b	0c
	4 区	10	0	0		0c
	5 区	10	0	0		0c
对照区	1 区	10	10	100		4.2±0.6b
	2 区	10	10	100		5.1±0.8b
	3 区	10	10	100	65.0±37.0a	4.2±0.3b
	4 区	10	10	100		6.2±1.5b
	5 区	10	8	80		14.0±2.7a

注:小写字母不同表示组间数据比较差异具有统计学意义($p < 0.05$).

2.6 田间柑橘黄龙病 PCR 检测结果

由 PCR 检测结果可知,处理区 25 个样品与阴性对照、ddH₂O 空白对照结果相同,均无明显条带;对照区中 25 个样品共 6 个样品扩增出或明或暗的目的条带,条带大小约为 1 100 bp.对扩增产物纯化回收与克隆转化,挑选出阳性克隆子,将阳性克隆子送至广州天一辉远基因科技有限公司测序分析,而后将所得序列在 NCBI 中与基因库所有序列进行比对分析,所得序列均为亚洲柑橘木虱黄龙病菌,相似度均为 100%.本次在广东德庆市柑橘园处理区 25 个样品均未检测出黄龙病菌,而对照区共检测出 6 个样品携带黄龙病菌,阳性率为 24%(表 3),说明处理区内密植的互叶白千层防护林可以有效阻隔柑橘木虱为害,减少对目标区域柑橘树的侵害,遏止了柑橘黄龙病的传播.

表 3 田间柑橘黄龙病 PCR 检测结果

组别	采样地点	样品数/个	检出数/个	阳性率/%
处理组	1 区	25	0	0
	2 区	25	0	0
	3 区	25	0	0
	4 区	25	0	0
	5 区	25	0	0
对照组	1 区	25	2	8
	2 区	25	2	8
	3 区	25	1	4
	4 区	25	0	0
	5 区	25	1	4

3 结论与讨论

柑橘黄龙病是毁灭性病害,目前已成为柑橘产业的发展瓶颈,柑橘木虱是田间传播柑橘黄龙病的媒介昆虫,如何有效防控柑橘木虱成为防控柑橘黄龙病的有效措施之一.从农田生态系统整体功能出发的生态调控是目前最安全、有效和可持续的害虫管理措施之一,其核心是基于“作物—害虫—天敌及其周围环境”的相互作用关系,构建合理的生态技术体系,以调控、保护

和利用农田生物多样性;这种方法的目的是促进天敌的繁殖和作物的生长,同时不利于害虫的发展,以充分发挥农田生态系统在控制害虫方面的生态服务功能^[19]. 田间调查结果表明,广东省德庆市柑橘种植区引入4-松油醇型互叶白千层作为隔离防护带,可以有效阻隔柑橘木虱危害和柑橘黄龙病的发生,为田间栽培4-松油醇型互叶白千层防控柑橘木虱提供了理论基础,为探索柑橘木虱绿色防控技术做了大胆尝试,对防控柑橘黄龙病具有重要意义.

互叶白千层主要有3种生态类型,即1,8-桉叶素型、 γ -松油烯和4-松油醇型. 不同地理、生态类型和提取方法对互叶白千层精油的主要特征组分和次要含量都有影响. 4-松油醇也是衡量互叶白千层品种的重要指标之一,质量分数越高代表品种越优良^[20]. 互叶白千层精油具有特殊气味,影响昆虫的选择行为,对害虫具有良好的生物活性^[21]. 目前,在害虫防控方面主要集中在4-松油醇上,4-松油醇能阻止葱蝇(*Delia antique*)在其寄主上产卵^[22],但4-松油醇对不同害虫可能显示出不同的行为反应,如4-松油醇对北美天牛(*Hylotrupes bajulus*)有强烈的引诱作用^[23],聚乙烯管中涂抹4-松油醇可致使小蠹虫(*Rtyogenes chalcagphus*)在群集或扩散等习性中迷失方向^[24],黄衫大痣小蜂(*Megastigmussp*)雌性还对4-松油醇产生强烈的正趋性^[25],4-松油醇与其他化合物混合可作为引诱剂对大露尾甲(*Rhizophagus grandis*)进行捕捉^[26]. 云杉树特征主分中含有互叶白千层精油的共有成分4-松油醇,当树皮甲虫危害云杉树时,该树会释放出4-松油醇等物质,对雄性甲虫起到了驱避作用^[27]. 本研究结合气相色谱-质谱联用仪GC-MS测定了广东省德庆市柑橘园种植的互叶白千层的主要成分及含量,确定其生态类型为4-松油醇型,柑橘木虱雌、雄成虫对互叶白千层及其主要成分4-松油醇和 γ -松油烯均能产生行为反应,柑橘木虱对100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 4-松油醇有明显驱避作用,对0.1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ γ -松油烯有明显吸引作用,而对1,8-桉叶素没有明显的行为反应. 嗅觉行为测定结果表明柑橘木虱对4-松油醇型互叶白千层枝叶表现出明显的驱避作用,20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 和30 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 4-松油醇互叶白千层精油对柑橘木虱成虫也有明显的驱避作用. 互叶白千层精油具有广谱抗菌、防霉、杀虫等活性,可进一步研究该植物及其精油对其他作物有害生物的行为影响,明确互叶白千层在有害生物绿色防控中的防虫防菌谱,开发互叶白千层的生产应用价值.

当前柑橘木虱的绿色防控是一种极具前景的防治方向,广西特色作物研究院研究团队已进行多次试验,采用50目防虫网搭建密闭型网棚(棚肩高3 m,拱高1.25 m,总高4.25 m),在网棚内种植柑橘树有效控制了柑橘木虱的数量和黄龙病病菌的传播^[28]. 本研究表明,密植株高约4 m的4-松油醇型互叶白千层作为隔离防护带因其高大的树体结构所形成的屏障及其对柑橘木虱的驱避作用也可应用于柑橘园防控柑橘木虱,减少农药使用和病虫害防治成本,可进一步在适宜栽种互叶白千层的地区推广应用.

参考文献:

- [1] 胡双双,戴素明,张阳,等. 柑橘木虱防控药剂筛选及矿物油对其增效作用评价[J]. 植物保护, 2022, 48(2): 247-254.
- [2] 江宏燕,吴丰年,王妍晶,等. 亚洲柑橘木虱的起源、分布和扩散能力研究进展[J]. 环境昆虫学报, 2018, 40(5): 1014-1020.
- [3] HUNG T H, HUNG S C, CHEN C N, et al. Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter Asiaticus*, the Bacterium Causing Citrus Huanglongbing in Vector Psyllids; Application to the Study of Vector - Pathogen Relationships[J]. Plant Pathology, 2004, 53(1): 96-102.
- [4] 田发军,刘家莉,曾鑫年. 柑橘木虱抗药性研究进展[J]. 应用昆虫学报, 2018, 55(4): 565-573.
- [5] FANCELLI M, BORGES M, LAUMANN R A, et al. Attractiveness of Host Plant Volatile Extracts to the A-

- sian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri*, is Reduced by Terpenoids from the Non-Host Cashew[J]. Journal of Chemical Ecology, 2018, 44(4): 397-405.
- [6] JONES S E, KILLINY N. Influence of Rootstock on the Leaf Volatile Organic Compounds of Citrus Scion is more Pronounced after the Infestation with *Diaphorina citri*[J]. Plants, 2021, 10(11): 2422.
- [7] 朱汉斌. 广东省农业科学院果树研究所 柑橘黄龙病研究获进展[N]. 中国科学报, 2023-09-28(3).
- [8] 陈海燕, 李桂珍, 梁忠云. 1, 8-桉叶素型互叶白千层花与叶挥发油成分分析[J]. 安徽农业科学, 2021, 49(10): 164-166.
- [9] 陶凤云, 赵伟, 林强. 茶树油对植物病原真菌的抑制作用[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(34): 15055-15056, 15148.
- [10] 韩艳丽, 陈岑, 李静, 等. 茶树精油对草莓果实采后灰霉病发生的影响[J]. 新疆农业大学学报, 2019, 42(4): 249-260.
- [11] 冯鹏, 何梓钰, 廖鲜艳, 等. 三种单方精油及其复配后抑菌作用与抗氧化活性的分析[J]. 香料香精化妆品, 2018(2): 24-32.
- [12] 廖敏. 互叶白千层精油对储粮害虫的杀虫活性及作用机制[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2016.
- [13] 张贺贺, 陈家骅, 季清娥, 等. 影响昆虫产卵行为的因素及其应用研究概述[J]. 环境昆虫学报, 2015, 37(2): 432-440.
- [14] BOLTERC J, DICKE M, VAN LOON J J A, et al. Attraction of Colorado Potato Beetle to Herbivore-Damaged Plants during Herbivory and after Its Termination[J]. Journal of Chemical Ecology, 1997, 23(4): 1003-1023.
- [15] HALBERT S E, MANJUNATH K L. Asian Citrus Psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and Greening Disease of Citrus: A Literature Review and Assessment of Risk in Florida [J]. Florida Entomologist, 2004, 87(3): 330-353.
- [16] 张旭颖. 非寄主植物挥发油对亚洲柑橘木虱的驱避作用研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2020.
- [17] 刘顺民, 吕佳, 杜丹超, 等. 浙江省金华市柑橘黄龙病检测及柑橘木虱分布情况调查[J]. 浙江农业科学, 2023, 64(11): 2723-2728.
- [18] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 互叶白千层(精)油, 松油烯-4-醇型: GB/T26514—2011[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [19] 戈峰. 论害虫生态调控策略与技术[J]. 应用昆虫学报, 2020, 57(1): 10-19.
- [20] 古佛政, 张燕君. 互叶白千层芳香油的提取和利用研究[J]. 广东林业科技, 1999, 15(3): 34-39.
- [21] 张莉睿, 毕洁. 植物精油对储藏物害虫防治作用的研究进展[J]. 中国粮油学报, 2023, 38(3): 20-27.
- [22] COWLES R S, MILLER J R, HOLLINGWORTH R M, et al. Cinnamyl Derivatives and Monoterpenoids as Nonspecific Ovipositional Deterrents of the Onion Fly[J]. Journal of Chemical Ecology, 1990, 16(8): 2401-2428.
- [23] FETTKÖTHER R, REDDY G V P, NOLDT U, et al. Effect of Host and Larval Frass Volatiles on Behavioural Response of the Old House Borer, *Hylotrupes Bajulus* (L.) (Coleoptera: Cerambycidae), in a Wind Tunnel Bioassay[J]. CHEMOECOLOGY, 2000, 10(1): 1-10.
- [24] CHAGONDA L, GUNDIDZA M, WIJESURIA A M S, et al. Composition of the Leaf Oil of *Zanthoxylum chalybeum* Thunb[J]. Journal of Essential Oil Research, 1994, 6(6): 561-563.
- [25] THIÉRY D, MARION-POLL F. Electroantennogram Responses of Douglas-Fir Seed Chalcids to Plant Volatiles [J]. Journal of Insect Physiology, 1998, 44(5-6): 483-490.
- [26] GUNDIDZA M, CHINYANGANYA F, CHAGONDA L, et al. Essential Oil Composition of *Schistostephium heptalobum* Oliver & Hiern[J]. Journal of Essential Oil Research, 1994, 6(3): 315-318.
- [27] BIRGERSSON G, BERGSTRÖM G. Volatiles Released from Individual Spruce Bark Beetle Entrance Holes Quantitative Variations during the First Week of Attack[J]. Journal of Chemical Ecology, 1989, 15(10): 2465-2483.
- [28] 唐燕玲, 梅正敏, 傅翠娜, 等. 防虫网棚设施栽培对广西柑橘主要品种生长、结果及品质的影响[J]. 南方园艺, 2022, 33(2): 1-8.