

昆虫触角电位技术的研究进展

田厚军, 陈艺欣, 黄玉清

(福建省农业科学院植物保护研究所, 福建 福州 350013)

摘要: 触角电位技术是直接检测昆虫对化学信号反应的电生理方法。通过介绍该技术的原理、触角电位仪基本结构和发展历程、实验注意事项及其局限性, 旨在为研究昆虫电生理行为提供一个清晰的思路, 对解决试验中遇到的问题有一定的帮助。

关键词: 触角电位技术; 电生理行为; 信号物质; 气相-触角电位联用仪, 单细胞记录

中图分类号: Q 965

文献标识码: A

Advances in Electroantennogram (EAG) Technique of Insect

TIAN Hou-jun, CHEN Yi-xin, HUANG Yu-qing

(Institute of Plant Protection, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China)

Abstract: Electroantennogram (EAG) technique is an electrophysiological method which directly to detect insect responses to chemical signal, and has been widely used in the antenna responses of Orthoptera, Hymenoptera, Diptera, Coleoptera, etc to semichemicals. This article described briefly the theory, basic structure and development of EAG, experimental attentions and limitations of the EAG technique, all of which aiming to provide a clear thinking for studying electrophysiological behavior and to make some help for solving the problems.

Key words: Electroantennogram (EAG); electrophysiological behavior; semichemicals; gas chromatography-electroantennographic detection (GC-EAD); single sensillum recording (SSR)

触角电位技术 (electroantennography, EAG) 在昆虫学试验中被广泛使用, 是直接检测昆虫对挥发性物质化学信号反应的电生理方法。昆虫的触角所扮演的嗅觉功能在其定位寄主、取食、配偶找寻及适宜的产卵场所的选择方面具有重要意义^[1-4]。1957年, Schneider^[5]首次应用该技术测定触角对性信息素的反应, 获得了缓慢的渐次变化的累加感受电位即触角电位 (EAG)。EAG 响应信号的振幅随刺激浓度增大而增长, 直到达到饱和状态。振幅的变化更依赖于刺激物的种类、昆虫的种类、昆虫的性别以及一些没有被很好定义的因素。EAG 方法可以被用在很多用途上, 例如筛选生物学上有活性的化合物, 净化萃取物, 鉴定有活性的馏分, 选择有活性的人造化合物。触角电位技术是从一系列化学物质中筛选出对昆虫有生理反应的部分化合物, 这大大减少了工作量, 在探讨昆虫性信息素、对植物挥发物的反应以及感知植物气味的机理方面发挥着重要的作用。国内学者也提出了此技术中需要注意的一些问题, 并在蝇类昆虫触角电位

技术上尝试进行改进^[1,6]。触角电位与气相色谱的结合, 即气相色谱-触角电位联用仪 (GC-EAD), 形成筛选和鉴定生物活性物质的有效方法。气相色谱单细胞记录仪 (GC-SSR) 可以区分不同感受细胞的反应, SSR 用于记录特定神经细胞的动作电位反应振幅是一样的, 随着化合物活性逐渐增高, 激发的动作电位反应的频率也就越高, 因此研究触角电位时, GC-SSR 可以作为 GC-EAD 的有效补充。

1 触角电位技术

1.1 昆虫触角电位技术原理

昆虫的嗅觉感受器主要分布在触角上, 每个嗅觉感受器细胞都可以被认为是 1 个电压源和电阻的集合体。整个触角包含了无数的嗅觉感受器细胞, 组成了 1 个电压与电阻复合体的串联阵列。触角的电压是相当小的, 电阻则是比较高的, 有几兆欧姆。当实验时触角变干, 这个电阻一般还会增大, 触角的顶部相对于基部会变成负的。电压变动的幅度范围为微伏 (10^{-6} V) 到毫伏 (10^{-3} V)。昆虫触

收稿日期: 2011-05-17 初稿; 2011-08-11 修改稿

作者简介: 田厚军 (1983-), 男, 硕士, 研究实习员, 主要从事昆虫化学生态学研究 (E-mail: tianhoujunbest@163.com)

基金项目: 福建省农业科学院青年科技人才创新基金项目 (2010QB-16); 福建省自然科学基金项目 (2010J06008); 福建省科技计划项目——省属公益类科研院所基本科研专项 (2009R10028-5); 福建省发改委农业“五新”推广项目 [2009 (958)]

角电位信号是一种可以被适当仪器测量的电压偏差,它发生于受到适宜刺激昆虫触角的基部到顶部之间。不同种类以及性别的昆虫,电位的反应取决于以下一些因素,如刺激物的属性,刺激物的强度,触角所处的环境,制备物的存活时间,上一次刺激的数量和强度以及放大器输入信号的质量。此外,温度、湿度也会对反应有影响,甚至昆虫的生理性状也会对反应有一定的影响。

基于以下几个方面考虑,触角电生理变化并不能表示为单纯的行为反应:(1)神经元电位反应产生的脉冲累加效果并不能区分拒避作用(repellency effect)或增效作用(synergistic effect);(2)起决定性作用的可能是小部分神经元。EAG只是反映触角对挥发性化合物的生理反应值,还需进一步的行为试验(如嗅觉仪、风洞等)才能确定该物质的行为活性^[7]。

1.2 昆虫触角电位仪基本结构

目前应用的触角电位系统一般包括以下几个部分:(1)数据采集控制器:有IDAC-2双通道USB接口和IDAC-4双通道USB接口数据采集控制器。(2)信号记录分析软件:有EAG、GC-EAD、ACTIONPOTENTIAL分析程序,用于Syntech IDAC数据采集系统,触发信号到达时,软件能记录时间、信号基线自动归零,实时显示EAG图谱。(3)测量探头:PRS-1通用单端探头,玻璃吸液管电极固定器,钨丝电极固定器;PRG-2昆虫触角电位探头;DTP-1嗅觉探头。(4)刺激气流控制单元:CS-55刺激气流控制单元,内置空气泵具有消震功能;内置活性炭,方便更换。(5)显微操作台:目前有MP-15和MP-22显微操作台。(6)有时还配备钨丝电极生成器和PC-10微液管拉长器用于钨丝电极及玻璃管电极拉制。

1.3 昆虫触角电位发展

1.3.1 单细胞记录 单细胞反应记录装置基本与EAG反应记录装置相似,只是放大器的设计略有不同。由于单细胞反应包括交流的神经脉冲反应和直流的感受器电位,两者的通频带不同。前者的通频带约在40~500 Hz,后者的通频带约在0~40 Hz。用玻璃电极套在切去尖端的毛形感器顶端,参考电极插入毛形感器的基部,通过ArAgCl丝引导,输入到放大器,经过放大器的高通和低通滤波,或者通过记录软件滤波,得到神经脉冲反应和感受器电位。通常还在第三频道同步记录刺激标记。Rstelién等^[8]将其应用到烟蚜夜蛾的触角神经元受体细胞上来检测对大根香叶烯D的反应。在

对性信息素敏感的毛形感器中,每个毛形感器通常有几种嗅觉感受细胞,每种嗅觉感受细胞只对1种气味化合物敏感,其反应的敏感性是很高的,最小的气味刺激量在 $10^{-4} \sim 10^{-3}$ ug就能引起明显的反应。昆虫触角细胞感受器对性信息素组分有非常强的选择性和特异性,具有非常结构-活性相关性。

1.3.2 气相-单细胞记录仪 近年来气相色谱和单细胞记录仪(GC-SSR)连接也得到较为迅速的发展,EAG-SSR的连用在研究昆虫触角外周神经系统感受、加工、编码挥发性气味的质量和时空布局^[9]。借助于电生理等技术Bau等^[10]研究了在性信息素脉冲频率和湿温度变化的影响下触角电位反应以及昆虫对性信息素脉冲嗅觉反应的特异性。Baker和Vickers也做了相关方面的研究,将1根昆虫触角固定在另1只该种昆虫的头上,触角上带有电极,使其在风洞内逆风飞行时,记录昆虫触角对性信息素的电生理反应,再连接SSR,检验昆虫在风洞内飞行是否受到性信息素时空结构的影响^[11]。

1.3.3 GC-EAD以及便携式EAG GC-EAD即气相-触角电位仪,与EAG相比,能够更加迅速的对信号化合物的活性筛选,目前应用也较为广泛。由于便携式EAG的使用使得EAG技术更为简便,可以实时了解田间害虫的种类和数量,田间昆虫性信息素的浓度高低、时空布局、分布范围、化学结构和持续时间,放置引诱剂诱芯的最佳位置及时间。

2 EAG使用注意事项

在触角电位及相关技术的实验中总会遇到一系列问题,而导致这些问题的原因很可能是由于以下操作失误或者不注意造成的。

2.1 EAG使用注意事项

2.1.1 电生理盐水 触角电生理实验导电液最常见的为Ringer和Kaissling溶液。而这两种导电液又有加蔗糖和不加蔗糖两类。二者各有长短,没有蔗糖的易于保存,但加入蔗糖则可大大延长昆虫触角的存活期。

2.1.2 微电极 有时会因气流的过大而产生机械刺激,所以玻璃微电极的口径尽量越小越好。避免金属电极与触角直接接触引起机械刺激;延长离体触角的存活寿命;许多电解质的加入增强溶液导电能力。

2.1.3 味源滤纸 放入巴斯德吸管中的滤纸片,须容得下所需的溶剂量;而且滤纸片的宽度不可大于巴斯德吸管内径,否则刺激气流会不通畅。有时在实验中会形成的双峰,不仅形状不稳定,而且峰

高的变化幅度也很大，究其原因就是滤纸片未平放，弯曲的滤纸会分离成不均匀刺激气流段，产生双峰，带来实验误差。

2.1.4 污染源 多组分的试验同时进行的时候，要特别注意交叉污染的危险。在操作实施中，镊子、滤纸片、巴斯德吸管都要使用干净的，切勿直接用手接触。

2.1.5 触角 切触角：触角的切除有离体切除和非离体切除2种，离体切除在较大型昆虫中较常见，如松墨天牛；小型昆虫多用于活体试验，如烟蚜。感受细胞较多的触角顶部的要量少切，使其上的传感器最大程度的减少。

接触角：玻璃毛细管要尽可能克服液体存在的表面张力。浸入过多生理盐水触角的顶部，会影响实验结果。玻璃微电极中充满电生理盐水时尖端可能会产生微型气泡，为了克服可能存在的问题，接新触角前用滤纸从玻璃电极尖端吸少量液体。

活体触角：可以将试虫进行冰冻处理，将其触角以下部位固定住，然后对其测定。

2.1.6 数据分析 在试验过程中，为防止触角的反应活性减弱以及触角不同个体间差异带来的实验误差，要送样合适的标准化合物，以该标准化合物的触角反应值作为参照；测定刺激样品和标准化合物前后分别用对照刺激1次，取平均值。即 $EAG \text{ 相对值} = \text{测试样品反应值} \times 2 / [\text{标样反应值（前）} + \text{标样反应值（后）}]$ 。

3 EAG 应用展望

近年来，随着电生理技术的不断发展，其应用的范围也扩展到了微观领域，在细胞和分子水平上探讨昆虫嗅觉感受机理，对嗅觉化学感受行为的产生有了更多的了解。在与GC连用鉴定性信息素时的重要性尤为明显。有些学者针对不同昆虫特点对其进行了改进。触角电位技术所得结果与行为实验结果间并非完全一致。如有些昆虫对化合物的刺激在行为测定上没有表现出明显的效应，但是却能激发昆虫较强的EAG反应；相反，那些激发昆虫强烈的EAG反应的信号物质，在行为上却是驱避效应^[12]。然而有些学者认为在行为上表现为引诱作用的化合物所激发的EAG回落速度较慢，则反映不出其真实变化值^[13]，获得一个较为可靠准确的结论需要复杂的参数分析，仅依靠最大的反应电位高度并不能完全描述该信号物所激发的EAG特征。刺激物多为寄主植物挥发物标样，或昆虫性信息素，或二者混合物。目前EAG还有个明显的缺

点是由于刺激气流控制系统的限制，达到感受器的气味分子的浓度无法确定，大大影响了实验的精度^[14]。此外，电生理试验还无法模拟昆虫在自然条件下对气味的反应强度。

EAG技术当前主要在鞘翅目昆虫如松褐天牛^[15]、松墨天牛^[16]、光肩星天牛^[17]、科罗拉多甲虫^[18]等；鳞翅目昆虫如小菜蛾^[19]、甜菜夜蛾^[20]、烟青虫^[21]等；直翅目如东亚飞蝗^[22]、蝗蝻^[23]、草原蝗虫^[24]等；膜翅目如烟蚜茧蜂^[25]、桑天牛长尾啮小蜂^[26]、西方蜜蜂^[27]等；同翅目如茶蚜^[28]、蚜虫^[29]等；双翅目如蚕饰腹寄蝇^[30]、淡色库蚊^[31]、橘小实蝇^[32]等；等翅目如家白蚁和大家白蚁中应用。

应用EAG技术已发现了许多活性物质，如测定小菜蛾时，六碳醛（正己醛，反-2-己烯醛）、醇（青叶醇）以及异硫氰酸丙烯酯等能引起具有较高的EAG反应，在行为上也表现为吸引小菜蛾着落^[33]。烟夜蛾交配雌蛾对（-）-里那醇的行为反应显著高于处女雌蛾和雄蛾^[34]。鞘翅目昆虫对萜烯类物质（ α -蒎烯， β -蒎烯，长叶烯，反式石竹烯等）的EAG反应较强烈，如松褐天牛雄虫对Carene的反应最为强烈，并对其单个组分进行行为测定^[35]。麦长管蚜和禾谷缢管蚜对水杨酸甲酯的反应最大，反-2-己烯醇、辛醛、里那醇、反-3-己烯乙酸酯也都具有较强的EAG反应，但表现为行为活性的大多为几种化合物的混合物^[36]。

目前EAG技术还在不断完善，研究触角对化学物质的反应，仍以EAG或GC-EAD为主，并以GC-SSR技术作为补充。GC-EAD数据目前处于直观定性阶段，论文中一般显示图谱即可，不涉及统计分析。下一步的工作应当是在相同的色谱条件下（仅减小进样量或增大分流比）做GC-MS试验，对生物活性成分进行定性。EAG技术下一步的改进应使仪器更为自动化，尽量避免由于人为因素造成的误差。EAG的发展前景还体现在为产品创造应用价值，如为昆虫引诱剂或性诱剂或驱避剂等合成提供数据指导。

参考文献：

- [1] 方宇凌，张钟宁. 触角电位（EAG）实验中一些问题的探讨 [C] // 昆虫学创新与发展—中国昆虫学会2002年学术年会论文集. 北京：中国科学计数出版社，2002：155—157.
- [2] MYRICK A J, BAKER T C. Locating a compact odor source using a four-channel insect electroantennogram sensor [J]. Bioinspir Biomim, 2011, 6 (1): 016002.
- [3] WANG X, XU J, SHEN Y L, et al. Electroantennogram responses of *Maruca testulalis* (Lepidoptera: Pyralidae) to

- plant volatiles and sex pheromone [J]. Chin J App Ecol, 2009, 20 (8): 1973—1979.
- [4] NGUMBI E, CHEN L, FADAMIRO H Y. Comparative GC-EAD responses of a specialist (*Microplitis croceipes*) and a generalist (*Cotesia marginiventris*) parasitoid to cotton volatiles induced by two caterpillar species [J]. J Chem Ecol, 2009, 35 (9): 1009—1020.
- [5] SCHNEIDER D. Elektrophysiologische Untersuchungen von chemo-und Mechanorezeptoren der Antenne des Seidenspinners *Bombyx mori* L. [J]. Z Vergl Physiol, 1957, 40: 8—41.
- [6] 赵云鲜, 康乐. 改进蝇类昆虫触角电位技术的尝试 [J]. 昆虫知识, 2001, 38 (5): 386—387.
- [7] 闫凤鸣. 化学生态学[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 161—163.
- [8] RSTELIEN T, BORG-KARLSON AK, MUSTAPARTA H, et al. The plant sesquiterpene germacrene D specifically activates a major type of antennal receptor neuron of the tobacco budworm moth *Heliothis virescens* [J]. Chem Senses, 2000, 25 (2): 141—148.
- [9] VICKERS N J, BAKER T C. Reiterative responses to single strands of odor promote sustained upwind flight and odor source location by moths [J]. PNAS, 1994, 91: 5756—5760.
- [10] BAU J, JUSTUS K A, CARDE R T. Antennal resolution of pulsed pheromone plumes in three moth species [J]. J Insect Physiol, 2002, 48: 433—442.
- [11] VICKERS N J, CHRISTENSEN T A, BAKER T C, et al. How do odour plume dynamics influence the brain's olfactory code [J]. Nature, 2001, 410: 466—470.
- [12] HERNANDEZ M M, SANZ I, ADELANTADO M. Electroantennogram activity from antennae of *Ceratitis capitata* (Wied.) to fresh orange airborne volatiles [J]. J Chem Ecol, 1996, 22 (9): 1607—1619.
- [13] 侯照远, 严福顺. 寄生蜂寄主选择行为研究进展 [J]. 昆虫学报, 1997, 40: 94—107.
- [14] LIGHT D M, JANG E B, FLATH R A. Electroantennogram responses of the mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* to the volatile constituents of nectarines [J]. Ent exp appl, 1992, 63: 13—26.
- [15] 王四宝, 周弘春, 黄勇平, 等. 松褐天牛触角感器电镜扫描和触角电位反应[J]. 应用生态学报, 2005, 16(2): 317—322.
- [16] 李水清, 张钟宁. 松墨天牛成虫对幼虫粪挥发性物质的触角电位反应及林间驱避试验 [J]. 昆虫学报, 2008, 51 (3): 284—289.
- [17] JIN Y J, LI J Q, STEPHEN A T, et al. Olfactory response of *Anoplophora glabripennis* to volatile compounds from Ash-leaf maple (*Acer negundo*) under drought stress [J]. Sci Silvae Sin, 2004, 40 (1): 99—105.
- [18] VISSER J H. Electroantennogram responses of the colorado beetle *Leptinotarsa decemlineata* to plant volatiles [J]. Entomol Exp et Appl, 1979, 25: 86—97.
- [19] ROJAS J C. Electrophysiological and behavioral response of the cabbage moth to plant volatiles [J]. J Chem Ecol, 1999, 25 (8): 1867—1883.
- [20] MOCHIZUKI F, SHIBUYA T, WAKAMURA S, et al. Electrophysiological responses of the male antenna to compounds found in the female sex pheromone gland of *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. Appl Entomol Zool, 1993, 28 (4): 489—496.
- [21] 赵新成, 阎云花, 王琛柱. 雄性棉铃虫和烟青虫对雌性信息素的触角电生理反应[J]. 动物学报, 2003, 49(6): 795—799.
- [22] 康乐, HOPKINS. 黑蝗初孵蝗蝻对植物气味和植物挥发性化合物的行为和嗅觉反应[J]. 科学通报, 2004, 49(1): 81—85.
- [23] 陈湖海, 赵云鲜, 康乐. 两种同域分布的草原蝗虫对植物挥发性化合物的嗅觉反应 [J]. 中国科学: C 辑, 2003, 33 (5): 421—428.
- [24] 严福顺, 阎云花, 王琛柱, 等. 两种蚜茧蜂及其寄主蚜虫对大豆植株挥发性次生物质的触角电位反应 [J]. 昆虫学报, 2005, 48 (4): 509—513.
- [25] 李继泉, 张凤娟, 王宇, 等. 桑天牛长尾啮小蜂对桑枝挥发物的触角电位和嗅觉反应[J]. 蚕业科学, 2007, 33(4): 543—548.
- [26] 张同心, 崔为正, 梁中贵, 等. 松阿扁叶蜂对不同树种挥发物的触角电位反应[J]. 昆虫学报, 2005, 48(4): 514—517.
- [27] HAN B Y, HAN B H. EAG and behavioral responses of the wingless tea aphid *Toxoptera aurantii* (Homoptera: Aphididae) to tea plant volatiles [J]. Acta Ecol Sin, 2007, 27 (11): 4485—4490.
- [28] PARK K C, HARDIE J. An improved aphid electroantennogram [J]. J Insect Physiol, 1998, 44: 919—928.
- [29] VISSER J H, YAN F S. Electroantennogram responses of the grain aphid *Sitobion avenae* (F.) and *Metopolophium dirhodum* (Walk) (Homoptera, Aphididae) to plant odor components [J]. J Appl Entomol, 1995, 119 (8): 539—542.
- [30] 徐延熙, 孙绪良, 戈峰, 等. 被害马尾松 (*Pinus massoniana*) 针叶挥发性物质的提取、鉴定及蚕饰腹寄蝇 (*Blepharipa zebina*) 的电生理活性 [J]. 生态学报, 2007, 27 (11): 4403—4411.
- [31] 余静, 李春晓, 赵彤言, 等. 淡色库蚊对一些化合物的触角电生理及行为反应 [J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2008, 15 (3): 154—157.
- [32] 欧阳革成, 杨悦屏, 梁广文, 等. 矿物油乳剂作用下橘小实蝇的产卵拒避及触角电位反应 [J]. 昆虫学报, 2008, 51 (4): 390—394.
- [33] 韩宝瑜, 张钟宁, 方宇凌. 小菜蛾对白菜挥发性次生物质的触角电生理和行为反馈 [J]. 科学通报, 2001, 46 (16): 1384—1387.
- [34] 付晓伟, 郭线茹, 罗梅浩, 等. 烟夜蛾和棉铃虫对高浓度烟草挥发物的电生理和行为反应 [J]. 昆虫学报, 2008, 51 (9): 902—909.
- [35] 王四宝, 周弘春, 黄勇平, 等. 松褐天牛触角感器电镜扫描和触角电位反应[J]. 应用生态学报, 2005, 16(2): 317—322.
- [36] 刘勇, 陈巨莲, 倪汉祥. 麦长管蚜和禾谷缢管蚜对小麦挥发物的触角电位反应[J]. 昆虫学报, 2003, 46(6): 679—683.

(责任编辑: 柯文辉)