第57卷 第9期 林 业 科 学 Vol. 57, No. 9
2021年 9 月 SCIENTIA SILVAE SINICAE Sep., 2021

doi:10.11707/j.1001-7488.20210913

白蜡窄吉丁气味结合蛋白 AplaOBP2 的定位、配体结合特性及配体活性*

宋 玄[1,2,3] 王泽华[1] 虞国跃[1] 王 凡[1,4] 单 双[2] 张永军[2] 王山宁[1]

(1. 北京市农林科学院植物保护环境保护研究所 北京 100097; 2. 中国农业科学院植物保护研究所 植物病虫害生物学国家重点实验室 北京 100193; 3. 中国农业大学植物保护学院 北京 100193; 4. 新疆生产建设兵团第三师农业科学研究所 图木舒克 843900)

摘 要: 【目的】研究白蜡窄吉丁气味结合蛋白 AplaOBP2 在触角中的表达定位,解析 AplaOBP2 重组蛋白的配体结合特性及配体活性,旨在通过气味结合蛋白筛选白蜡窄吉丁新的信息化合物。【方法】原核表达白蜡窄吉丁气味结合蛋白 AplaOBP2,采用免疫组织化学技术研究 AplaOBP2 在白蜡窄吉丁触角中的表达定位,通过荧光竞争结合试验分析 AplaOBP2 重组蛋白与 58 种化合物的结合特性,并进一步通过触角电位仪和"Y"型嗅觉仪测定 AplaOBP2 的配体对白蜡窄吉丁成虫的活性。【结果】在原核表达系统中成功表达 AplaOBP2 重组蛋白。免疫定位结果显示 AplaOBP2 在触角嗅觉感器——锥形感器 I 的淋巴液表达。荧光竞争结合试验结果表明,AplaOBP2 蛋白能够与反-2-己烯醛、反-2-庚烯醛、苯甲醛、4′-乙基苯乙酮、3′,4′-二甲氧基苯乙酮和 β-紫罗兰酮6 种配体结合,其解离常数 K_D 值分别为 4.44,4.17,5.20,2.91,3.45 和 0.63 $\mu mol \cdot L^{-1}$。白蜡窄吉丁雌雄成虫对 10 $mg \cdot mL^{-1}$ 的 6 种配体均有触角电位反应。行为学试验表明,在 10 $mg \cdot mL^{-1}$ 刺激剂量条件下, 反-2-己烯醛对雌成虫有显著引诱作用,β-紫罗兰酮对雌虫表现出明显的趋避作用。【结论】白蜡窄吉丁气味结合蛋白 AplaOBP2 在嗅觉感器表达,能够选择性结合醛类和酮类物质,推测其在嗅觉识别中发挥功能。气味结合蛋白可作为靶蛋白,鉴定对白蜡窄吉丁具有吸引或趋避活性的信息化合物。

关键词: 白蜡窄吉丁; 气味结合蛋白; 嗅觉感器; 荧光竞争结合; EAG 反应; 行为反应

中图分类号: S718.7; Q74 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-7488(2021)09-0130-10

Localization, Ligand Binding Characteristics and Ligand Activity of an Odorant Binding Protein, AplaOBP2, from *Agrilus planipennis*

Song Xuan[1,2,3] Wang Zehua[1] Yu Guoyue[1] Wang Fan[1,4] Shan Shuang[2] Zhang Yongjun[2] Wang Shanning[1]

(1. *Institute of Plant and Environment Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences Beijing* 100097; 2. *State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences Beijing* 100193; 3. *College of Plant Protection, China Agricultural University Beijing* 100193; 4. *Agricultural Science Research Institute, the Third Division of Xinjiang Production and Construction Corps Tumshuq* 843900)

Abstract: 【Objective】*Agrilus planipennis* is a borer of ash tree (Emerald ash borer). In this paper we studied the expression of the odorant binding protein AplaOBP2 in the antenna of *Agrilus planipennis*, and investigate the ligand binding characteristics and ligand activity of the AplaOBP2. The purpose of this study is to use AplaOBP2 as target to discover new semiochemicals for *A. planipennis*.【Method】The recombinant AplaOBP2 of *A. planipennis* was expressed in the prokaryotic expression system. The localization of expression of AplaOBP2 in the antenna of *A. planipennis* was studied using immunocytochemistry assay. The binding characteristics of the recombinant AplaOBP2 protein with 58 candidate ligands were analyzed by fluorescence competitive binding assay. The electrophysiological and behavioral responses of *A. planipennis* to AplaOBP2 ligands were studied by electroantennography (EAG) and a Y-tube olfactometer.【Result】The recombinant AplaOBP2 protein was successfully expressed in the prokaryotic expression system. The result of

收稿日期: 2019-11-26; 修回日期: 2020-05-17。

基金项目: 北京市自然基金项目(6184042); 北京市博士后基金项目(2017-ZZ-083); 北京市农林科学院科技创新能力建设专项(KJCX201910, KJCX20180416)。

* 王山宁为通讯作者。北京市林业保护站王合先生和北京锦绣绿都园林绿化有限公司郑凯先生对白蜡窄吉丁的野外采集给予大力帮助,在此表示感谢。

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

immunofluorescence localization showed that AplaOBP2 protein was expressed in the lymph of olfactory sensilla S. basiconica I. The results of fluorescence competitive binding assay showed that *in vitro*, the recombinant AplaOBP2 exhibited high binding affinities with 6 kinds of ligands, including *trans*-2-hexenal, *trans*-2-heptenal, benzaldehyde, 4′-ethylacetophenone, 3′, 4′-dimethoxyacetophenone, β-ionone, and their dissociation constants K_D were 4.44, 4.17, 5.20, 2.91, 3.45 and 0.63 $\mu mol \cdot L^{-1}$, respectively. All AplaOBP2 ligands could trigger antennal responses of both males and females at the dosage of 10 $mg \cdot mL^{-1}$. The behavioral test showed that 10 $mg \cdot mL^{-1}$ *trans*-2-hexenal had significant attraction to female adults, and 10 $mg \cdot mL^{-1}$ β-ionone had a significant evading effect on the female adults.【Conclusion】AplaOBP2 is expressed in olfactory sensilla and can selectively bind affinities with aldehydes and ketones, suggesting that AplaOBP2 might play a role in olfactory perception. This study supports the role of OBPs as targets to discover new semiochemicals that could act as either attractants or repellents for *A. planipennis*.

Key words: *Agrilus planipennis*; odorant binding proteins; sensilla basiconica; fluorescence binding assay; EAG response; behavioral response

嗅觉在昆虫寻求寄主、配偶、产卵场和躲避天敌等行为中发挥重要功能（Bruce *et al.*, 2005; Takken, 1991; Vet *et al.*, 1992; Visser, 1986）。触角作为昆虫主要的嗅觉器官，其表面分布多种形态的嗅觉感器。嗅觉感器腔内的嗅觉受体神经元（olfactory receptor neurons, ORNs）树突，能够特异地感受外界的化学信号（Binyameen *et al.*, 2012; Steinbrecht, 1997; Zacharuk, 1980）。气味分子由嗅觉感器壁上的微孔进入感器腔，穿过感器淋巴液，到达 ORNs 树突，激活树突上的受体蛋白，最终引起昆虫的不同行为反应（Hansson *et al.*, 2011; Pelosi, 1996; Krieger *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2006）。研究表明多种功能蛋白参与这一过程，其中气味结合蛋白（odorant binding proteins, OBPs）是主要的外周嗅觉蛋白，在昆虫嗅觉系统中发挥重要功能（Leal, 2013; Pelletier *et al.*, 2010; Vogt *et al.*, 1981; Xu *et al.*, 2005; Ye *et al.*, 2017）。

昆虫 OBPs 是一类小分子量的水溶性蛋白，最早是从鳞翅目昆虫触角中分离鉴定，目前认为 OBPs 几乎在所有的昆虫中都有表达（Hekmat-Scafe *et al.*, 2002; Pelosi *et al.*, 2014; Vieira *et al.*, 2011; Vogt *et al.*, 1981）。在昆虫触角中，OBP 蛋白由位于感器下方的辅助细胞合成，随后被大量分泌到感器腔的淋巴液中（Laue *et al.*, 1994; Steinbrecht *et al.*, 1995; Vogt *et al.*, 1981）。尽管 OBPs 在嗅觉感知中的特定生理作用尚不完全清楚，但人们普遍认为它们在结合、运输疏水性气味通过水溶性淋巴液到达 ORNs 树突上的嗅觉受体中起着重要作用（Leal, 2013; Pelosi *et al.*, 2014）。随着 OBPs 在越来越多的昆虫中被鉴定，不同昆虫 OBPs 的表达分析表明，仅有部分 OBP 基因特异表达在化学感觉器官，OBP 基因在其他非化学感觉器官也有表达，可能参与多种生理功能（Dippel *et al.*, 2014; Forêt *et al.*, 2006; Mckenzie *et al.*, 2014; Pelosi *et al.*, 2017; 杨叶青等, 2017）。触角表达的 OBPs 选择性地表达在不同类型的嗅觉感器中，参与不同化合物的结合运输，但是并不是所有嗅觉感器都需要 OBP 蛋白参与运输气味分子到嗅觉受体（Huang *et al.*, 2018; Jiang *et al.*, 2018; Larter *et al.*, 2016; Pikielny *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2018）

白蜡窄吉丁（*Agrilus planipennis*），是近年来发生和危害比较严重的国际性检疫害虫，主要为害木犀科（Oleaceae）白蜡树属（*Fraxinus*）树木。该虫是东北亚地区的本土昆虫，2002 年传入北美，迄今已造成北美地区数百万白蜡树死亡（Herms *et al.*, 2014; Morin *et al.*, 2017）。同其他昆虫一样，白蜡窄吉丁成虫通过感受不同类型的信息化合物来寻找配偶以及适宜寄主。近年来，国外研究者对该虫的化学生态学做了大量的研究：明确了白蜡窄吉丁寄主识别相关的信息化合物主要种类，鉴定了参与雌雄虫交配的性信息素组分，并挖掘了 12 个 OBPs 基因和 47 个气味受体基因（odorant receptors, ORs）等多种可能参与嗅觉识别的基因（Andersson *et al.*, 2019; Crook *et al.*, 2008a; de Groot *et al.*, 2008; Mamidala *et al.*, 2013; Rodriguez-Saona *et al.*, 2006; Silk *et al.*, 2009），然而各种嗅觉基因的功能尚未展开研究。本实验室前期对白蜡窄吉丁基因组数据进行分析，鉴定了 11 个气味结合蛋白（AplaOBP1-11）序列，组织表达谱结果表明 3 个 OBP 基因（AplaOBP1-3）在雌雄触角特异表达，其中 AplaOBP1 可以识别月桂烯、柠檬烯、橙花叔醇等多种寄主挥发物（Wang *et al.*, 2020），推测其他触角特异表达的 OBPs 在白蜡窄吉丁嗅觉识别中同样发挥重要功能。

因此，本研究重组表达了 AplaOBP2 蛋白，采用

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

免疫组织化学技术从蛋白水平进一步对 AplaOBP2 在触角感器中进行定位,通过荧光竞争结合试验研究 AplaOBP2 重组蛋白的配体结合特性,并通过昆虫电生理和行为学试验研究配体的生物活性,以期为阐明白蜡窄吉丁嗅觉识别机制和通过气味结合蛋白筛选该虫信息化合物提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试昆虫 分别于 2018 年和 2019 年 4 月中旬,于北京郊区(延庆、平谷、通州和昌平)白蜡树林地,将受害美国红梣(*F. pennsylvanica*)砍伐(10 棵),主干截成约 50 cm 的木段,带回北京市农林科学院。将木段置于户外背阴处,用 100 目的尼龙网罩住,待白蜡窄吉丁成虫自然羽化。5 月上旬观察到羽化成虫,将成虫转移至养虫盒内,饲喂白蜡树叶片,用于试验。

1.1.2 主要试剂 表达感受态细胞 BL21(DE3)及测定蛋白浓度试剂购自天根生化科技(北京)有限公司;柱填料购自北京信诺晶科生物技术有限公司;重组肠激酶 Ecombinant Entherokinase 购自安诺伦(北京)生物科技有限公司;组织蛋白抽提试剂盒、Western Blot Kit 和 eECL Western Blot 试剂盒购自康为世纪生物科技有限公司;荧光探针 N-苯基-1-萘胺(N-phenyl-1-naphthylamine, 1-NPN)和气味标样分别购自美国 Sigma 公司、日本东京化成工业株式会社(TCI)、上海麦克林生化科技有限公司和化学慧;南京金斯瑞公司提供基因合成和表达载体构建;北京信诺晶科生物技术有限公司提供抗体制备服务。

1.2 试验方法

1.2.1 AplaOBP2 重组表达 白蜡窄吉丁 *AplaOBP2* 基因(GenBank 登录号:KU342581)序列从白蜡窄吉丁基因组数据中获得。去信号肽后的 *AplaOBP2* 基因序列由南京金斯瑞进行合成并克隆到表达载体 pET30a(+)。重组质粒测序正确后转化至 BL21(DE3)感受态细胞中进行诱导表达。单克隆菌株在含有 100 mg·mL^{-1}卡那霉素的培养基中 37 ℃培养,待 OD_{600}值为 0.6~0.8 时,向培养基中加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol·L^{-1},在 18 ℃下进行诱导表达 16 h。超声破碎后,离心收集包涵体,用于蛋白纯化。包涵体处理步骤如下:用溶液Ⅰ(50 mmol·L^{-1} Tris, 0.2%Triton X-100, pH6.8)洗包涵体沉淀,离心后将沉淀溶于 10 mL 6 mol·L^{-1}盐酸胍,加入 10 mL 溶液Ⅱ(10 mmol·L^{-1} DTT, 200 mmol·L^{-1} Tris, pH8.0),室温 100 r·min^{-1}孵育 60 min;加入 4 mL 溶液Ⅲ(0.5 mol·L^{-1} NaOH, 5 mmol·L^{-1} Cystine),室温孵育 10 min;加入 10 倍体积的溶液Ⅳ(5 mmol·L^{-1} Cysteine, 100 mmol·L^{-1} Tris, pH 8.0),室温 100 r·min^{-1}孵育过夜;离心收集上清并用透析袋在 PBS 蛋白缓冲液中透析过夜。利用 HisTrap 亲和层析柱对蛋白进行纯化,纯化蛋白用重组肠激酶 30 ℃孵育 12 h。再次用 HisTrap 亲和层析柱纯化,经超滤浓缩后得到无 His-tag 的 AplaOBP2 重组蛋白。采用 Bradford 法对 AplaOBP2 蛋白浓度进行测定(Bradford, 1976),通过 4%~20% SDS-PAGE 电泳检测各阶段目的蛋白的表达情况。纯化的无 His 标签 AplaOBP2 重组蛋白送北京信诺晶科生物技术有限公司制备多克隆抗体。

1.2.2 Western blot 检测 取羽化 1~3 天的白蜡窄吉丁触角 30 对,参照组织蛋白抽提试剂盒说明书提取触角粗蛋白。具体操作步骤如下:将提取试剂置于冰上预冷 2~3 min,按照 1∶99 的比例加入蛋白酶抑制剂,配成 1×工作液。向 1.5 mL 离心管中加入 400 μL 工作液,碾磨触角样品,置于冰中孵育 20 min,然后在 4 ℃、12 000 r·min^{-1}下离心 15 min,将上清转移至新的离心管中,获得触角组织粗蛋白,-80 ℃保存备用。

AplaOBP2 重组蛋白和触角粗蛋白通过 4%~20% SDS-PAGE 电泳分离,采用湿转法将蛋白从聚丙烯酰胺凝胶转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。参照 Western Blot Kit 说明书进行 Western blot 操作。参照 eECL Western Blot 试剂盒说明书,将增强型发光剂和稳定剂等体积混合,配成化学发光检测底物工作液,使用化学发光成像分析仪(AI680, GE, USA)进行检测。

1.2.3 免疫组织化学检测 将白蜡窄吉丁雌、雄成虫触角浸入含 4% 多聚甲醛和 2% 戊二醛的 0.1 mol·L^{-1} PBS(pH7.4)溶液中 4 ℃固定过夜;样品经乙醇梯度脱水后,置于 LR 白色树脂(Taab, Aldermaston, Berks, UK)中 60 ℃聚合。使用 Reichert Ultracut 超薄切片机(Reichert Company, Vienna, Austria)进行切片,厚度为 60~80 nm,切片用铜网收集。将含有切片的铜网用双蒸水冲洗后,置于 20 μL PBSG(PBS 含有 50 mmol·L^{-1}甘氨酸)中孵育 5 min,重复该步骤 1 次;铜网用重蒸水冲洗 6 次,转移到 20 μL PBST(PBS 含 0.01%的明胶、1%牛血清白蛋白和 0.02%Tween-20)孵育5 min,重复该步骤 1 次。双蒸水冲洗后,铜网置于 20 μL 一抗(PBST 稀释,1∶5 000),室温孵育 1 h 后,4 ℃过

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

夜。双蒸水冲洗后，将铜网移至胶体金颗粒偶联的羊抗兔二抗（PBST 稀释，1∶20）室温避光孵育 90 min；经 PBST、PBSG 和双蒸水清洗后，加增感液避光 20 min 进行银增感；双蒸水清洗后，用 2% 醋酸双氧铀染色 10 min；再用双蒸水清洗，干燥后用 Hitachi H-7500 TEM（Hitachi Ltd., Tokyo, Japan）透射电镜进行观察；用免疫前的兔血清代替一抗作为阴性对照。雌虫和雄虫纵切和横切样品，各 3 个重复。

1.2.4　荧光竞争结合试验　以 58 种气味物质为候选配体，其中包括 27 种寄主植物挥发物（表 1），利用 F-380 荧光分光光度计（天津港东科技发展股份有限公司，天津）进行荧光竞争结合试验，扫描发射波长范围 370～550 nm，激发波长 337 nm。使用色谱级甲醇溶解荧光探针 1-NPN，母液使用浓度为 1 mmol·L^{-1}。在测定 AplaOBP2 与探针的结合能力曲线时，比色杯中加入溶解在 pH7.4 的 PBS 缓冲液中的重组蛋白 AplaOBP2 溶液，终浓度为 2 μmol·L^{-1}，在 337 nm 的激发波下，加入探针的浓度从2 μmol·L^{-1}梯度递增至12 μmol·L^{-1}，记录与蛋白的结合值，重复 3 次。筛选配体时，加入配体的浓度从 2 μmol·L^{-1} 梯度递增至 20 μmol·L^{-1}，通过 Scatchard 方程计算竞争解离常数 K_D：$K_D = [IC_{50}]/(1+[1\text{-NPN}]/K_{1\text{-NPN}})$。式中，$IC_{50}$是配体置换 50% 探针 1-NPN 时的浓度，[1-NPN]是未结合的 1-NPN 的浓度，$K_{1\text{-NPN}}$为 AplaOBP2 与 1-NPN 的解离常数（Gu *et al*., 2011）。

1.2.5　EAG 反应　将待测试化合物溶于石蜡油配成 10 mg·mL^{-1}的溶液，取 20 μL 滴加于滤纸条上（5 cm×1 cm），置于 1 mL 移液枪头内作为给药筒。用刀片将白蜡窄吉丁雌雄成虫触角从基部切下，去除尖端后插入参考电极（毛细管中浸3 mol·L^{-1}的 KCl 溶液），连接至 EAG 微操作台，触角另一端插入记录电极。EAG 仪器通过 IDAC-2 信号采集器与计算机相连。触角距离气味混合管 1 cm。以 30 s 的间隔产生 0.5 s 的刺激，恒定流量为10 mL·s^{-1}。触角产生的信号用 EAG Pro 软件（Syntech）记录。以乙酸顺-3-己烯酯作为标准参照刺激对各测试样品的刺激反应进行标准化校正。每次进行样品刺激前先进行 1 次对照（石蜡油）和标准参照刺激，然后随机测试待测样品，再进行对照和标准参照刺激，每根触角测试 1 个循环。对每个待测样品，分别记录雌虫和雄虫不同个体的 8 根触角电位反应。将 2 次邻近的标准参照刺激的 EAG 平均值减去 2 次邻近的对照刺激的 EAG 平均值作为标准参照值，其他样品的 EAG 值减去对照的 EAG 平均值后再除以标准参照值进行标准化校正。

1.2.6　嗅觉行为反应　“Y”型嗅觉仪内径 2.5 cm，主臂长 25 cm，两侧臂长均为 20 cm，两者夹角为 60°。载气由大气采样仪泵入，流量设为 1.0 L·min^{-1}，空气经过活性炭过滤和空气加湿后进入“Y”型管，各部件之间用硅胶管连接。“Y”型管两臂端部分别与含有 20 μL 测试样品（浓度 10 mg·mL^{-1}，用石蜡油稀释）和对照石蜡油滤纸条的样品瓶连接。白蜡窄吉丁雌、雄成虫饥饿 24 h 后用于测量，试验测定在成虫活跃的 10∶30—15∶30 进行。将试虫放在主臂入口，使其头部朝向两侧臂，观察成虫的选择反应。若试虫在5 min内沿主臂进入任一侧臂内超过 2 cm，并停留30 s以上，则视为有选择；若停留在主臂则视为无反应。每测试 5 头成虫即交换左右臂位置，并更换滤纸条，测试 10 头后更换干净的“Y”型管。每种测试样品至少记录 30 头有反应成虫。

1.3　数据分析

利用 SPSS 软件（SPSS 7.0, SPSS Inc., USA），采用 Tukey's HSD 多重比较方法对白蜡窄吉丁雌、雄成虫对不同挥发物的 EAG 反应进行差异显著性分析；雌、雄成虫间对同一化合物的 EAG 反应采用 *t*-检验检测差异显著性；嗅觉行为反应的数据采用卡方检验进行差异显著性分析。

2　结果与分析

2.1　气味结合蛋白 AplaOBP2 的重组表达

AplaOBP2 重组蛋白在上清中不表达，而在包涵体中大量表达（图 1），因此选择包涵体进行蛋白纯化。重组蛋白经过亲和层析纯化及肠激酶切后得到分子质量约为 14 kDa 的目的蛋白（预测的分子量 13.8 kDa）。超滤后得到浓度为 1 mg·mL^{-1}纯化蛋白，用于抗体制备及竞争性结合试验。

2.2　Western blot 检测

AplaOBP2 重组蛋白和触角粗蛋白分别能够与 AplaOBP2 抗体特异性结合（图 2），均出现一条特异性条带，表明 AplaOBP2 抗体的特异性能够满足后续的免疫组织化学检测。

2.3　气味结合蛋白 AplaOBP2 在触角中的表达定位

免疫组化试验结果表明，黑色颗粒标记的 AplaOBP2 蛋白分布在锥形感器类型Ⅰ的感器腔中，在锥形感器类型Ⅱ、类型Ⅲ和单孔化学感器的感器腔中均未检测到特异的黑色标记颗粒（图 3）。

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

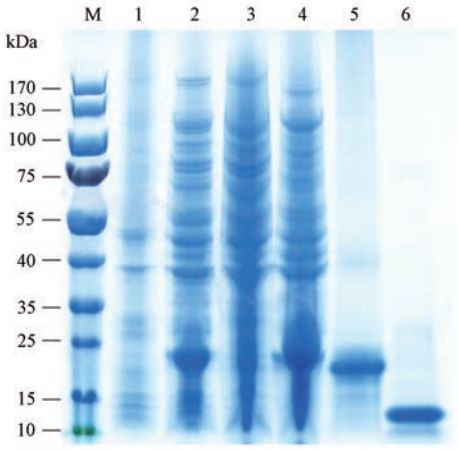

图 1 白蜡窄吉丁 AplaOBP2 重组蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the recombinant AplaOBP2 of *A. planipennis*

M：蛋白质分子质量标准 Protein molecular weight marker；1：未诱导的大肠杆菌菌体 Non-induced *Escherichia coli*；2：诱导的大肠杆菌菌体 Induced *E. coli*；3：上清液 Supernatant；4：包涵体蛋白 Inclusion body protein；5：带 His 标签 AplaOBP2 蛋白 Recombinant AplaOBP2 with His-tag；6：无 His 标签 AplaOBP2 蛋白 Recombinant AplaOBP2 without His-tag.

AplaOBP2 蛋白在锥形感器的表达，推测其可能在嗅觉识别中发挥功能。

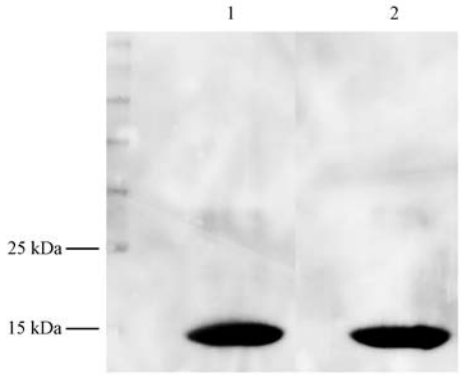

图 2 AplaOBP2 蛋白 Western blot 检测

Fig. 2 Western blot analysis of AplaOBP2

1：AplaOBP2 重组蛋白 Recombinant AplaOBP2；2：提取自白蜡窄吉丁的触角粗蛋白 Crude protein extracted from antennae of *A. planipennis*.

2.4 AplaOBP2 重组蛋白配体结合特征

以 1-NPN 为荧光探针，利用竞争性结合试验测定了 58 种挥发性化合物与 AplaOBP2 重组蛋白的亲和力，其中 27 种挥发物属于白蜡树挥发物。首先，测

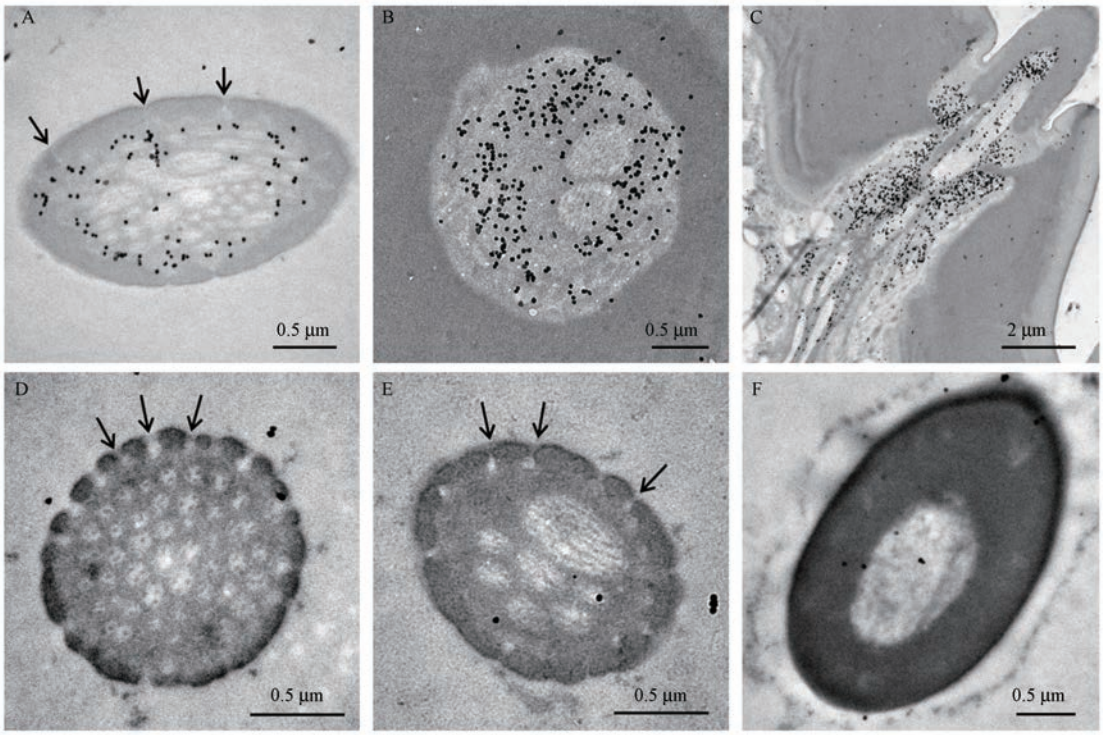

图 3 AplaOBP2 蛋白在白蜡窄吉丁触角的免疫定位

Fig. 3 Immunocytochemical localization of AplaOBP2 protein in the antenna of *A. planipennis*

A：黑色颗粒标记的 AplaOBP2 蛋白分布在锥形感器类型 I 的感器腔中 Black spots labeled AplaOBP2 proteins were distributed in the hair lumen of the sensilla basiconica type I；横切（B）和纵切（C）显示 AplaOBP2 蛋白在锥形感器 I 基部表达 A cross section（B）and longitudinal section（C）showed the expression of AplaOBP2 proteins at the base of s. basiconica type I；锥形感器Ⅱ（D）、锥形感器Ⅲ（E）和单孔化学感器（F）的感器腔未被标记 The hair lumen of s. basiconica type Ⅱ（D），s. basiconica type Ⅲ（E）and uniporous chemoreceptors（F）was never labeled；箭头表示嗅觉感器上的壁孔 Arrows indicate wall pores on the sensillum.

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

定了 AplaOBP2 对 1-NPN 的亲和力常数。AplaOBP2 与 1-NPN 可逆结合，解离常数 K_D 为 1.26 μmol·L^{-1}，表明 1-NPN 是一种合适的荧光探针（图 4）。荧光竞争结合试验结果表明，6 种化合物与 AplaOBP2 重组蛋白有较强的结合能力，包括：反-2-己烯醛、反-2-庚烯醛、苯甲醛、3′,4′-二甲氧基苯乙酮、4′-乙基苯乙酮和 β-紫罗兰酮（图 5）。AplaOBP2 重组蛋白与 β-紫罗兰酮结合能力最强，解离常数 K_D 为 0.63 μmol·L^{-1}（表 1）。

2.5　白蜡窄吉丁成虫对 AplaOBP2 配体的 EAG 反应

为明确 AplaOBP2 结合配体对白蜡窄吉丁成虫是否具有活性，首先测定了白蜡窄吉丁雌雄成虫对 6 种配体在 10 mg·mL^{-1}浓度的触角电位反应（表 2）。结果表明，所有配体均能引起雌虫和雄虫 EAG 反应，并且雌雄虫之间的差异不显著。由表 2 可以看出，不同挥发物引起的白蜡窄吉丁触角反应不同，其中反-2-己烯醛和反-2-庚烯醛在雌雄触角中能够引起较大的 EAG 反应，而 β-紫罗兰酮引起的雌雄触角反应最弱。

2.6　白蜡窄吉丁成虫对 AplaOBP2 配体的“Y”型嗅觉行为反应

进一步采用“Y”型嗅觉仪检测了雌虫和雄虫对 AplaOBP2 配体的行为反应。在 10 mg·mL^{-1}测试浓度下，反-2-己烯醛对白蜡窄吉丁雌虫具有显著的引诱作用（$P<0.05$），对雄虫的引诱量略多于对照，但未达到显著水平；β-紫罗兰酮对白蜡窄吉丁雌虫具有显著的驱避作用（$P<0.05$），对雄虫驱避作用未达到显著水平；剩余的 4 种测试样品对白蜡窄吉丁雌虫和雄虫没有表现出显著的引诱或者驱避作用（图 6）。

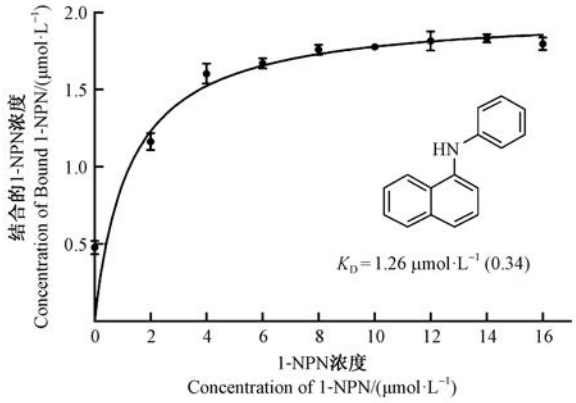

图 4　1-NPN 和重组蛋白 AplaOBP2 的结合曲线

Fig. 4　Binding curve of 1-NPN to recombinant AplaOBP2

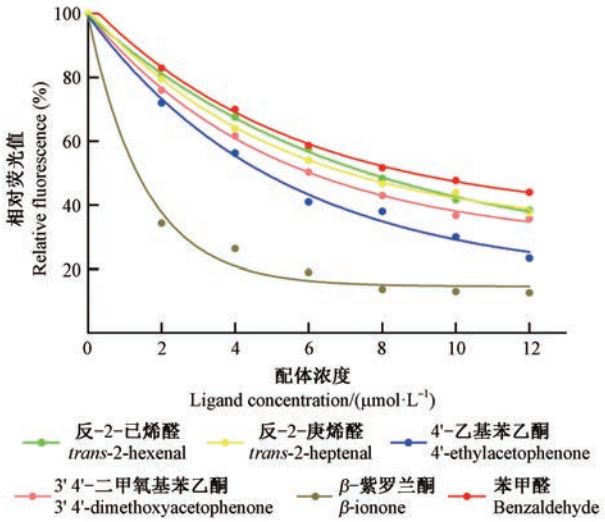

图 5　AplaOBP2 与 6 种配体的竞争结合曲线

Fig. 5　Competitive binding curves of 6 kinds of ligands to AplaOBP2

3　讨论

白蜡窄吉丁触角共分布有 4 种化学感受器，其中锥形感器类型Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ具有壁孔，是典型的嗅觉感受器，而没有壁孔的单孔化学受器则属于味觉感受器，每种化学感器可能参与不同类型化学信号的识别（Crook *et al.*, 2008b）。本研究免疫组化结果表明，气味结合蛋白 AplaOBP2 在白蜡窄吉丁锥形感器Ⅰ中特异表达，表明它可能选择性结合运输特定类型的气味分子，以满足该类型嗅觉感器的生理功能。荧光竞争结合试验显示 AplaOBP2 重组蛋白选择性结合醛类和酮类化合物，并表现出强的结合能力，表明 AplaOBP2 可能参与白蜡窄吉丁的嗅觉识别行为，这与其在嗅觉感器的表达具有一致性。AplaOBP2 与 AplaOBP1 表现出不同的表达及配体结合特征。尽管 AplaOBP1 同样在锥形感器中表达，但其在类型Ⅰ和类型Ⅲ中均有表达，并且其识别物质主要为萜类物质（Wang *et al.*, 2020）。与 AplaOBP2 结合的配体化合物中，反-2-己烯醛和 4′-乙基苯乙酮属于寄主植物挥发物组分（Rigsby *et al.*, 2017），因此进一步推测 AplaOBP2 可能在白蜡窄吉丁寄主识别中发挥功能。

前人的研究发现，白蜡窄吉丁成虫对包括反-2-己烯醛在内的多种寄主绿叶挥发物、单萜和倍半单萜表现出触角反应（Crook *et al.*, 2008a；de Groot *et al.*, 2008；Rodriguez-Saona *et al.*, 2006）。在本研究中，除反-2-己烯醛以外的其他 5 种配体也能引起雄虫和雌虫的触角反应，推测它们同样是白蜡窄吉丁潜在的信息化合物。不同配体化合物的 EAG

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 1 重组 AplaOBP2 蛋白与候选配体结合能力①

Tab.1 Binding capabilities of the recombinant AplaOBP2 to candidate ligands

配体 Ligand	来源 Source	CAS 号 CAS No.	纯度 Purity(%)	IC_{50}/ ($\mu mol \cdot L^{-1}$)	K_D/ ($\mu mol \cdot L^{-1}$)
醇类 Alcohols					
1-己醇 1-hexanol*	TCI	111-27-3	>98.0	—	—
反-2-己烯-1-醇 *trans*-2-hexen-1-ol	TCI	928-95-0	>95.0	—	—
顺-2-己烯-1-醇 *cis*-2-hexen-1-ol	TCI	928-94-9	>93.0	—	—
反-3-己烯-1-醇 *trans*-3-hexen-1-ol	Sigma	928-97-2	97.0	—	—
顺-3-己烯-1-醇 *cis*-3-hexen-1-ol*	TCI	928-96-1	>97.0	—	—
反 4-己烯-1-醇 *trans*-4-hexen-1-ol	Sigma	928-92-7	≥96.0	—	—
1-辛醇 1-octanol	TCI	111-87-5	>99.0	—	—
2-苯乙醇 2-phenylethyl alcohol	TCI	60-12-8	>98.0	—	—
醛类 Aldehydes					
丁醛 Butyraldehyde	TCI	123-72-8	>98.0	—	—
戊醛 Valeraldehyde	TCI	110-62-3	>95.0	—	—
己醛 Hexanal*	TCI	66-25-1	>98.0	—	—
反-2-己烯醛 *trans*-2-hexenal*	TCI	6728-26-3	>97.0	7.41±0.20	4.44±0.12
反-2-庚烯醛 *trans*-2-heptenal	TCI	18829-55-5	>95.0	6.95±0.10	4.17±0.06
正辛醛 n-octanal	TCI	124-13-0	>98.0	—	—
壬醛 Nonanal*	TCI	124-19-6	>95.0	—	—
苯甲醛 Benzaldehyde	TCI	100-52-7	>98.0	8.66±0.31	5.20±0.18
烷类 Alkanes					
正辛烷 Octane	TCI	111-65-9	>97.0	—	—
癸烷 Decane*	TCI	124-18-5	>99.0	—	—
十一烷 Undecane	TCI	1120-21-4	>99.0	—	—
十二烷 Dodecane*	TCI	112-40-3	>99.0	—	—
十三烷 Tridecane	TCI	629-50-5	>99.0	—	—
酯类 Esters					
苯乙酸甲酯 Methyl phenylacetate	TCI	101-41-7	>99.0	—	—
水杨酸甲酯 Methyl salicylate*	TCI	119-36-8	>99.0	—	—
丁酸顺式-3-己烯酯 *cis*-3-hexenyl butyrate*	Sigma	16491-36-4	≥98.0	—	—
苯甲酸甲酯 Methyl benzoate	TCI	93-58-3	>99.0	—	—
丙烯酸异丁酯 Isobutyl acrylate	TCI	106-63-8	>99.0	—	—
丁酸己酯 Hexyl butyrate	TCI	2639-63-6	>98.0	—	—
乙酸反-2-己烯酯 *trans*-2-hexenyl acetate	TCI	2497-18-9	>97.0	—	—
丁酸反-2-己烯基酯 *trans*-2-hexenyl butyrate	TCI	53398-83-7	>93.0	—	—
乙酸己酯 Hexyl acetate*	TCI	142-92-7	>99.0	—	—
乙酸顺-3-己烯酯 *cis*-3-hexenyl acetate*	TCI	3681-71-8	>97.0	—	—
惕各酸异丁酯 Isobutyl tiglate	TCI	61692-84-0	>96.0	—	—
酮类 Ketones					
2-庚酮 2-heptanone	TCI	110-43-0	>98.0	—	—
2-辛酮 2-octanone	TCI	111-13-7	>98.0	—	—
4′-乙基苯乙酮 4′-ethylacetophenone*	TCI	937-30-4	>97.0	4.85±0.14	2.91±0.09
3′,4′-二甲氧基苯乙酮 3′, 4′-dimethoxyacetophenone	TCI	1131-62-0	>98.0	5.76±0.17	3.45±0.10
β-紫罗兰酮 β-ionone	TCI	14901-07-6	>95.0	1.05±0.05	0.63±0.03
萜烯类 Terpenes					
β-蒎烯 β-pinene*	麦克林 Maclin	127-91-3	≥95	—	—
(1*R*)-(+)-α-蒎烯(1*R*)-(+)-α-pinene*	TCI	7785-70-8	>97.0	—	—
月桂烯 Myrcene*	麦克林 Maclin	123-35-3	≥90.0	—	—
3-蒈烯 3-carene*	麦克林 Maclin	13466-78-9	90.0	—	—
(+)-柠檬烯(+)-limonene*	TCI	5989-27-5	>95.0	—	—
松油醇 Terpineol	Sigma	8000-41-7	≥96	—	—
α-松油烯 α-terpinene	TCI	99-86-5	>90.0	—	—
橙花叔醇 Nerolidol*	TCI	7212-44-4	>97.0	—	—
α-葎草烯 α-humulene*	TCI	6753-98-6	>93.0	—	—
α-可巴烯 α-copaene*	化学慧 Chemhui	3856-25-5	>90.0	—	—

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

续表 1 Continued

配体 Ligand	来源 Source	CAS 号 CAS No.	纯度 Purity(%)	IC_{50}/ ($\mu mol \cdot L^{-1}$)	K_D/ ($\mu mol \cdot L^{-1}$)
香叶醇 Geraniol	TCI	106-24-1	>96.0	—	—
金合欢烯 Farnesene *	Sigma	502-61-4	>90.0	—	—
罗勒烯 Ocimene *	Sigma	13877-91-3	≥90.0	—	—
β-石竹烯 β-caryophyllene *	TCI	87-44-5	>90.0	—	—
(-)-氧化石竹烯(-)-caryophyllene oxide *	Sigma	1139-30-6	95.0	—	—
芳樟醇 Linalool *	TCI	78-70-6	>96.0	—	—
1,8-桉树脑 1,8-cineole *	TCI	470-82-6	>99.0	—	—
柠檬醛 Citral	TCI	5392-40-5	>96.0	—	—
(-)-香茅醛(-)-citronellal	TCI	5949-05-3	>96.0	—	—
其他 Others					
四氢吡咯 Pyrrolidine	TCI	123-75-1	>98.0	—	—
吲哚 Indole *	TCI	120-72-9	>99.0	—	—

①IC_{50}：配体置换 50%探针 1-NPN 时的浓度 Concentration of ligand displacing 50% 1-NPN；K_D：解离常数 Dissociation constant；—：未检测到 Not detected. *：寄主植物挥发物 Host plant volatiles(Rigsby *et al*., 2017).

值在雌雄间差异均不显著，此次试验仅测定了雌雄各 8 根触角的 EAG 反应，因此并不排除由于样本数量少、标准偏差大引起的 EAG 值差异不显著，其样本量还需进一步增加。反-2-己烯醛是一种常见的绿叶挥发物，尽管前人已经报道了该化合物对白蜡窄吉丁成虫的触角电位活性(Rodriguez-Saona *et al*., 2006)，但对其行为活性未见报道。本研究通过"Y"型嗅觉仪研究发现，反-2-己烯醛对白蜡窄吉丁雌虫具有明显的吸引活性，因此该化合物可以作为潜在的诱饵组分用于成虫的监测或诱杀。β-紫罗兰酮对白蜡窄吉丁雌虫具有显著地驱避效果，前期研究发现 β-紫罗兰酮对跳甲(*Phyllotreta cruciferae*)和稻纵卷叶螟(*Cnaphalocrocis medinalis*)等均有显著驱避作用(Cáceres *et al*., 2016; Sun *et al*., 2016)，与本研究结果相类似。

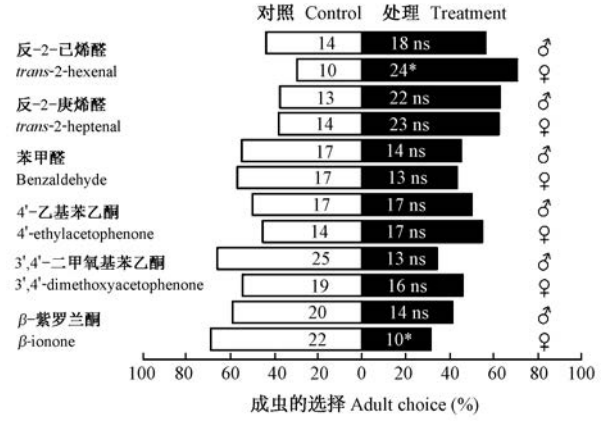

图 6　白蜡窄吉丁雌雄虫对 AplaOBP2 配体(10 mg·mL^{-1})的行为反应

Fig. 6　Behavioral responses of male and female *A. planipennis* to the ligands(10 mg·mL^{-1}) of the AplaOBP2

数据统计采用卡方检验，星号表示在 0.05 水平下处理和对照(石蜡油)间存在显著差异，ns 表示不存在显著性差异(P>0.05)。

The Chi-square test was used for data analysis. The asterisk indicate significant difference between the treatment and the control(paraffin oil) at the 0.05 level, while ns indicates no significant difference(P>0.05).

表 2　白蜡窄吉丁雌雄成虫对 AplaOBP2 配体(10 mg·mL^{-1})的 EAG 反应①

Tab.2　EAG responses of male and female *A. planipennis* to the ligands(10 mg·mL^{-1}) of the AplaOBP2

化合物 Chemical	标准化 EAG Normalized EAG	
	雌虫 Female	雄虫 Male
反-2-己烯醛 *trans*-2-hexenal	0.441±0.045 abA	0.533±0.116 aA
反-2-庚烯醛 *trans*-2-heptenal	0.613±0.097 aA	0.509±0.074 aA
苯甲醛 Benzaldehyde	0.270±0.064 bcA	0.192±0.074 bA
4'-乙基苯乙酮 4'-ethylacetophenone	0.182±0.093 bcA	0.130±0.046 bA
3',4'-二甲基苯乙酮 3',4'-dimethylacetophenone	0.091±0.037 cA	0.146±0.032 bA
β-紫罗兰酮 β-ionone	0.027±0.031 cA	0.049±0.025 bA

①EAG 反应值用 10 mg·mL^{-1} 乙酸顺-3-己烯酯激起的反应作标准参照值进行校正，数值为平均差±标准误，雌雄各重复 8 头，同列小写字母表示同一浓度不同化合物间差异显著(Tukey's HSD，P<0.05)，同行大写字母表示同一化合物两性间差异显著(t-检验，P<0.05). EAG response values were corrected with the responses elicited by 10 mg·mL^{-1} *cis*-3-hexenyl acetate as the standard reference values. The data are mean ± SE, n = 8 for each sex. Small letters following the data in a column indicate significant differences among different chemical at the same concentration (Tukey HSD, P < 0.05), while capital letters following the data in a row indicate significant difference between sexes(t-test, P<0.05).

目前，寄主绿叶挥发物顺-3-己烯醇作为白蜡窄吉丁诱饵的主要组分，已广泛用于白蜡窄吉丁成虫的监测，田间诱集效果表明，顺-3-己烯醇对雄虫的诱集效果优于雌虫(Grant *et al*., 2010; 2011)。本研究发现反-2-己烯醛对白蜡窄吉丁雌虫表现出显著的引诱活性，因此可以考虑将其与顺-3-己烯醇联合使用，增强现有诱饵对白蜡窄吉丁雌虫的诱集效果，但是其诱集活性还需进一步通过田间试验

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

验证。另外,本研究仅测定了单一剂量的单一组分化合物对白蜡窄吉丁成虫的行为反应,化合物不同浓度和混配可能对白蜡窄吉丁成虫具有不同的行为活性,还需进一步试验验证。

4 结论

免疫组织化学研究显示 AplaOBP2 蛋白在白蜡窄吉丁嗅觉感受器——锥形感器 I 中表达,荧光竞争结合研究发现 AplaOBP2 重组蛋白能与反-2-己烯醛、反-2-庚烯醛、苯甲醛、4′-乙基苯乙酮、3′,4′-二甲氧基苯乙酮和 β-紫罗兰酮 6 种化合物结合,并且 6 种配体均能引起成虫触角的电生理反应,推测 AplaOBP2 在白蜡窄吉丁嗅觉识别中发挥功能。室内行为学试验发现反-2-己烯醛能显著吸引白蜡窄吉丁雌成虫,而 β-紫罗兰酮则对雌虫具有明显的趋避作用,2 种化合物可作为潜在的信息素组分用于白蜡窄吉丁行为调控。本研究为阐明白蜡窄吉丁的嗅觉识别机制奠定了基础,也为以 OBP 蛋白作为靶标筛选白蜡窄吉丁嗅觉行为调控剂用于该虫防治提供了依据。

参 考 文 献

杨叶青, 王山宁, 彭 勇, 等. 2017. 气味结合蛋白 MmedOBP19 在中红侧沟茧蜂足部的表达及配体结合特征. 昆虫学报, 60(6): 613-620.

(Yang Y Q, Wang S N, Peng Y, *et al*. 2017. Expression of the odor binding protein MmedOBP19 in the legs of *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae) and its ligand binding characteristics. Acta Entomologica Sinica, 60(6): 613-620. [in Chinese])

Andersson M N, Keeling C I, Mitchell R F. 2019. Genomic content of chemosensory genes correlates with host range in wood-boring beetles (*Dendroctonus ponderosae*, *Agrilus planipennis*, and *Anoplophora glabripennis*). BMC Genomics, 20(1): 1-17.

Binyameen M, Anderson P, Ignell R, *et al*. 2012. Spatial organization of antennal olfactory sensory neurons in the female *Spodoptera littoralis* moth: differences in sensitivity and temporal characteristics. Chemical Senses, 37(7): 613-629.

Bradford M M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72(1/2): 248-254.

Bruce T J, Wadhams L J, Woodcock C M. 2005. Insect host location: a volatile situation. Trends in Plant Science, 10(6): 269-274.

Cáceres L A, Lakshminarayan S, Yeung K C, *et al*. 2016. Repellent and attractive effects of α-, β-, and Dihydro-β-lonone to generalist and specialist herbivores. Journal of Chemical Ecology, 42(2): 107-117.

Crook D J, Khrimian A, Francese J A, *et al*. 2008a. Development of a host-based semiochemical lure for trapping emerald ash borer *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae). Environmental Entomology, 37(2): 356-365.

Crook D J, Kerr L M, Mastro V C. 2008b. Distribution and fine structure of antennal sensilla in emerald ash borer (Coleoptera: Buprestidae). Annals of the Entomological Society America, 101(6): 1103-1111.

de Groot P, Grant G G, Poland T M, *et al*. 2008. Electrophysiological response and attraction of emerald ash borer to green leaf volatiles (GLVs) emitted by host foliage. Journal of Chemical Ecology, 34(9): 1170.

Dippel S, Oberhofer G, Kahnt J, *et al*. 2014. Tissue-specific transcriptomics, chromosomal localization, and phylogeny of chemosensory and odorant binding proteins from the red flour beetle *Tribolium castaneum* reveal subgroup specificities for olfaction or more general functions. BMC Genomics, 15: 1141.

Forêt S, Maleszka R. 2006. Function and evolution of a gene family encoding odorant binding-like proteins in a social insect, the honey bee (*Apis mellifera*). Genome Research, 16(11): 1404-1413.

Grant G G, Poland T M, Tina C, *et al*. 2011. Comparison of male and female emerald ash borer (Coleoptera: Buprestidae) responses to phoebe oil and (*Z*)-3-hexenol lures in light green prism traps. Journal of Economic Entomology, 104(1): 173-179.

Grant G G, Ryall K L, Lyons D B, *et al*. 2010. Differential response of male and female emerald ash borers (Col., Buprestidae) to (*Z*)-3-hexenol and manuka oil. Journal of Applied Entomolology, 134(1): 26-33.

Gu S H, Wang W X, Wang G R, *et al*. 2011. Functional characterization and immunolocalization of odorant binding protein 1 in the lucerne plant bug, *Adelphocoris lineolatus* (GOEZE). Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 77(2): 81-99.

Hansson B S, Stensmyr M C. 2011. Evolution of insect olfaction. Neuron, 72(5): 698-711.

Hekmat-Scafe D S, Scafe C R, McKinney A J, *et al*. 2002. Genome-wide analysis of the odorant-binding protein gene family in *Drosophila melanogaster*. Genome Research, 12(9): 1357-1369.

Herms D A, McCullough D G. 2014. Emerald ash borer invasion of North America: history, biology, ecology, impacts, and management. Annual Review Entomology, 59(1): 13-30.

Huang G Z, Liu J T, Zhou J J, *et al*. 2018. Expressional and functional comparisons of two general odorant binding proteins in *Agrotis ipsilon*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 98: 34-47.

Jiang X C, Ryl M, Krieger J, *et al*. 2018. Odorant binding proteins of the desert locust *Schistocerca gregaria* (Orthoptera, Acrididae): topographic expression patterns in the antennae. Frontiers in Physiology, 9: 417.

Krieger J, Breer H. 1999. Olfactory reception in invertebrates. Science, 286(5440): 720-723.

Larter N K, Sun J S, Carlson J R. 2016. Organization and function of *Drosophila* odorant binding proteins. eLife, 5: e20242.

Laue M, Steinbrecht R A, Ziegelberger G. 1994. Immunocytochemical localization of general odorant-binding protein in olfactory sensilla of the silkmoth *Antheraea polyphemus*. Naturwissenschaften, 81(4): 178-180.

Leal W S. 2013. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. Annual Review of Entomology,

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

58(1)：373-391.

Mamidala P, Wijeratne A J, Wijeratne S, *et al*. 2013. Identification of odor-processing genes in the emerald ash borer, *Agrilus planipennis*. PLoS ONE, 8(2)：e56555.

McKenzie S K, Oxley P R, Kronauer D J. 2014. Comparative genomics and transcriptomics in ants provide new insights into the evolution and function of odorant binding and chemosensory proteins. BMC Genomics, 15(1)：718.

Morin R S, Liebhold A M, Pugh S A, *et al*. 2017. Regional assessment of emerald ash borer, *Agrilus planipennis*, impacts in forests of the Eastern United States. Biological Invasions, 19(2)：703-711.

Pelletier J, Guidolin A, Syed Z, *et al*. 2010. Knockdown of a mosquito odorant-binding protein involved in the sensitive detection of oviposition attractants. Journal of Chemical Ecology, 36(3)：245-248.

Pelosi P, Iovinella I, Felicioli A, *et al*. 2014. Soluble proteins of chemical communication：an overview across arthropods. Frontiers in Physiology, 5：320.

Pelosi P, Iovinella I, Zhu J, *et al*. 2017. Beyond chemoreception：Diverse tasks of soluble olfactory proteins in insects. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society, 93(1)：184-200.

Pelosi P. 1996. Perireceptor events in olfaction. J Neurobiol, 30(1)：3-19.

Pikielny C W, Hasan G, Rouyer F, *et al*. 1994. Members of a family of Drosophila putative odorant-binding proteins are expressed in different subsets of olfactory hairs. Neuron, 12(1)：35-49.

Rigsby C M, Mccartney N B, Herms D A, *et al*. 2017. Variation in the volatile profiles of black and manchurian ash in relation to emerald ash borer oviposition preferences. Journal of Chemical Ecology, 43(8)：831-842.

Rodriguez-Saona C, Poland T M, Miller J R, *et al*. 2006. Behavioral and electrophysiological responses of the emerald ash borer, *Agrilus planipennis*, to induced volatiles of manchurian ash, *Fraxinus mandshurica*. Chemoecology, 16(2)：75-86.

Silk P J, Ryall K, Barry Lyons D, *et al*. 2009. A contact sex pheromone component of the emerald ash borer *Agrilus planipennis* Fairmaire (Coleoptera：Buprestidae). Naturwissenschaften, 96(5)：601-608.

Steinbrecht R A, Laue M, Ziegelberger G. 1995. Immunolocalization of pheromone-binding protein and general odorant-binding protein in olfactory sensilla of the silk moths *Antheraea* and *Bombyx*. Cell and Tissue Research, 282(2)：203-217.

Steinbrecht R A. 1997. Pore structures in insect olfactory sensilla：a review of data and concepts. International Journal of Insect Morphology Embryology, 26(3/4)：229-245.

Sun X, Zhao Z F, Zeng F F, *et al*. 2016. Functional characterization of a pheromone-binding protein from rice leaffolder *Cnaphalocrocis medinalis* in detecting pheromones and host plant volatiles. Bulletin Entomological Research, 106(6)：781-789.

Takken W. 1991. The role of olfaction in host-seeking of mosquitoes：a review. International Journal of Tropical Insect Science, 12(1-3)：287-295.

Vet L E M, Dicke M. 1992. Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. Annual Review of Entomology, 37：141-172.

Vieira F G, Rozas J. 2011. Comparative genomics of the odorant-binding and chemosensory protein gene families across the Arthropoda：origin and evolutionary history of the chemosensory system. Genome Biology Evolouion, 3：476-490.

Visser J H. 1986. Host odor perception in phytophagous insects. Annual Review of Entomology, 31：121-144.

Vogt R G, Riddiford L M. 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. Nature, 293(5828)：161-163.

Wang S N, Shan S, Liu J T, *et al*. 2018. Characterization of antennal chemosensilla and associated odorant binding as well as chemosensory proteins in the parasitoid wasp *Microplitis mediator* (Hymenoptera：Braconidae). Scientific Reports, 8：7649.

Wang S N, Shan S, Yu G Y, *et al*. 2020. Identification of odorant-binding proteins and functional analysis of antenna-specific AplaOBP1 in the emerald ash borer, *Agrilus planipennis*. Journal of Pest Science, 93(2)：853-865.

Wilson R I, Mainen Z F. 2006. Early events in olfactory processing. Annual Review of Neuroscience, 29：163-201.

Xu P X, Atkinson R, Jones D N, *et al*. 2005. *Drosophila* OBP LUSH is required for activity of pheromone-sensitive neurons. Neuron, 45(2)：193-200.

Ye Z F, Liu X L, Han Q, *et al*. 2017. Functional characterization of PBP1 gene in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera：Noctuidae) by using the CRISPR/Cas9 system. Scientific Reports, 7(1)：8470.

Zacharuk R Y. 1980. Ultrastructure and function of insect chemosensilla. Annual Review Entomology, 25：27-47.

（责任编辑　朱乾坤）

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net