

文章编号: 1001-7380(2015)03-0012-05

寄主和栖境挥发物对花绒寄甲的嗅觉反应 及 GC-MS 分析

高悦¹, 李虹兵², 曹霞³, 解春霞¹, 巨云为³, 徐福元¹

(1. 江苏省林业科学研究院, 江苏 南京 211153; 2. 南京森林警察学院, 江苏 南京 210023;
3. 南京林业大学, 江苏 南京 210037)

摘要: 在实验室条件下, 利用四臂嗅觉仪测定了源于3种寄主以及2种寄主栖境健康和蛀道组织的不同质量浓度提取液对花绒寄甲的嗅觉反应。分别用二氯甲烷和乙醚对3种寄主挥发性化合物抽提浓缩液进行GC-MS分析。结果表明: 松褐天牛挥发物提取液质量浓度为25、50 mg/mL时, 花绒寄甲在处理区的滞留时间显著高于对照; 青杨天牛挥发物提取液质量浓度为25、50 mg/mL时, 花绒寄甲在处理区的滞留时间和进入次数都显著高于对照; 大麦虫挥发物提取液质量浓度为50 mg/mL时, 花绒寄甲在处理区的滞留时间和进入次数都显著高于对照。花绒寄甲对寄主栖境蛀道组织比健康组织的嗅觉反应更显著, 花绒寄甲对黑松比对毛白杨寄主栖境的嗅觉反应更显著。3种寄主挥发性化合物抽提液中含有多种活性成分, 在10~40 min的保留时间峰值较集中, 活性物质的主要成分为C₂₁~C₃₆的直链烷烃以及脂肪酸及其衍生物、萜烯类、醇酮类和苯酚类化合物。

关键词: 花绒寄甲; 松褐天牛; 青杨天牛; 大麦虫; 嗅觉反应; GC-MS

中图分类号: S763.301 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1001-7380.2015.03.003

Olfactory response of *Dastarcus helophoroides* Sharp to the volatiles emitted from hosts, their habitat, and volatile component analysis by GC-MS

GAO Yue¹, LI Hong-bing², CAO Xia³, XIE Chun-xia¹, JU Yun-wei³, XU Fu-yuan¹

(1. Forestry Academy of Jiangsu, Nanjing 211153, China; 2. Nanjing Forest Police College, Nanjing 210023, China;
3. Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: The olfactory response of *Dastarcus helophoroides* Sharp to different volatiles from 3 species hosts and 2 species hosts' habitats, both healthy and bored, was measured by using a four-armed olfactometer in the laboratory. By gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), we analyzed the volatiles from 3 hosts' extraction with dichloromethane and ether. The results indicated that the retention time of *D. helophoroides* in the treatment area with 25 or 50 mg/mL volatile from *Monochamus alternatus* was significantly longer than that in CK; Its retention time and entry number in the treatment area with both 25 and 50 mg/mL volatile from *Saperda populnea* were significantly more than those in CK, but significantly more than those in CK with only 50 mg/mL volatile from *Zophobas morio*. Its olfactory response to the hosts' bored habitat was shown preferably, with more inclination to hosts' *Pinus thunbergii* than *Populus tomentosa* habitat. GC-MS analysis showed many active components in the volatiles, with main peak values from 10 to 40 min at GC-MS graph, including linear paraffins (C₂₁~C₃₆), aliphatic acids and their derivatives, terpenes, alcohols, ketones and phenols.

Key words: *Dastarcus helophoroides*; *Monochamus alternatus*; *Saperda populnea*; *Zophobas morio*; Olfactory response; GC-MS

挥发性信息化合物是联系植物-寄主-天敌3重营养关系的重要媒体。植物所释放的挥发性物质在

寄主栖境定位中起作用^[1],但其暗示寄主存在的可信性相对较低^[2]。寄主自身所释放的挥发物是较

收稿日期: 2015-04-04; 修回日期: 2015-04-09

基金项目: 江苏省林业三新工程项目“松材线虫病生物防控技术集成与示范”“LYSX[2013]20; 江苏省林业科学研究院青年基金项目“花绒寄甲对寄主的搜寻行为及影响因子分析”(JAF-2012-6)

作者简介: 高悦(1981-),男,辽宁凤城人,回族,助理研究员,在读博士,研究方向:森林保护学。

为可靠的信息,在寄主定位中起着重要作用^[3]。研究挥发性化合物对昆虫行为调控机理,可以揭示其间的化学通讯关系,将天敌昆虫的行为学机理研究引向深入。

花绒寄甲(*Dastarcus helophoroides* Sharp)是天牛类蛀干昆虫的主要天敌,目前对花绒寄甲的研究多以防治利用为主,并已大面积成功应用于多种林木的生物防治上^[4-5]。笔者前期进行了花绒寄甲对不同寄主蛹的选择性和非选择性试验,发现花绒寄甲对寄主的嗜好存在显著差异^[6],但目前对其寄主搜寻行为以及他感物成分尚无研究。为此,本文研究了源于寄主和寄主栖境不同质量浓度提取液对花绒寄甲的嗅觉反应,并对寄主挥发物抽提浓缩液进行了 GC-MS 分析,以探讨花绒寄甲对寄主搜寻行为的特点,分析影响其搜寻行为的他感物成分,为更深入研究花绒寄甲与植物、寄主之间的 3 重营养关系和花绒寄甲的行为学机理研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫 供试的花绒寄甲成虫由江苏省林业科学研究院天敌繁育中心提供。供试的松褐天牛(*Monochamus alternatus*) 采自溧阳市天目湖风景区病死的黑松(*Pinus thunbergii* Parl.) 枝条内;供试的青杨天牛(*Saperda populnea*) 采自山西被蛀毛白杨(*Populus tomentosa* Carr.) 枝条内;供试大麦虫(*Zophobas morio*) 购自南京市夫子庙花鸟鱼虫市场。以上各供试昆虫每只单独放入指形管中,试验前在 4~6℃ 冷库保存备用。

1.1.2 嗅觉仪测试用寄主体表挥发物的抽提 参考万方浩等^[7]对寄主挥发物进行抽提。粗提液为松褐天牛、青杨天牛和大麦虫幼虫的正己烷提取液(实验室收集寄主成虫,用正己烷在 4℃ 条件下浸泡 24 h,冷凝回流并过滤,滤后的成分再加入 20 mL 正己烷,70℃ 回流 10 h,合并冷提取和回流抽提的浓缩液为粗提液,再将粗提液在旋转蒸发仪上分别浓缩为 10, 25, 50 mg/mL,置于 4℃ 冰箱中保存),对照为纯溶剂,每个质量浓度梯度作为 1 个处理。

1.1.3 嗅觉仪测试用寄主栖境挥发物的抽提 寄主栖境挥发物的粗提液为松褐天牛幼虫和青杨天牛幼虫栖息于黑松和毛白杨的陈蛀屑正己烷提取液,以及未被危害的黑松和毛白杨的健康组织正己烷提取液,提取方法相同,再将粗提液在旋转蒸发仪上分

别浓缩为 25, 50 mg/mL 2 个质量浓度,对照为纯溶剂,每个质量浓度梯度作为 1 个处理。

1.1.4 GC-MS 测试用寄主体表挥发物的抽提 直接浸提法参考文献[7],将松褐天牛、青杨天牛和大麦虫幼虫分别放入 250 mL 三角瓶中,用 200 mL 二氯甲烷或 200 mL 乙醚浸提 24 h 后过滤,再通过旋转蒸发,分别得到 C1, C2, C3 和 M1, M2, M3 质量浓度为 50 mg/mL 的 6 种提取液。

1.2 方法

1.2.1 嗅觉反应测定 参考白树雄等^[8]的方法并加以改进。利用四壁嗅觉仪进行花绒寄甲对不同挥发性粗提液的行为测定。经过预试验后,确定合适的气流流量为 400 mL/min。试验时每次引入 1 头花绒寄甲,做出选择的标准:当花绒寄甲爬至超过某臂的 1/3 处,并持续 1 min 以上者,就记为该花绒寄甲对该臂的气味源作出选择,记录滞留时间和进入次数(停留 5 s 以上记作 1 次)。如该虫引入 3 min 仍不做出选择,则停止观察。每组测试后,用 95% 乙醇擦洗内、外壁,烘干后调换位置再测,测试仪置于暗光条件。每处理重复 30 次。

1.2.2 GC-MS 分析 参考王勇等^[9]的方法,对寄主挥发物的二氯甲烷、乙醚抽提浓缩液进行分析,弹性石英毛细管柱规格为 25 m × 200 μm × 0.33 μm。升温程序:初始温度 50℃,保持 1 min,8℃/min 升至 120℃ 保留 5 min,10℃/min 升至 220℃ 保留 10 min。气室温度为 280℃,载气为氦气,流速 1 mL/min,无分流进样,进样量 1 μL。电离源为 EI,电子能量 70 eV,离子源温度 230℃,扫描范围 30~500 质量单位。挥发性物质经 GC-MS 分析后,所得图谱利用计算机标准质谱图谱(NIST98),并辅以人工识别确定化合物,以质谱离子峰面积百分数表示各成分相对含量。

1.3 数据处理

数据分析采用 SPSS19.0 统计软件,数值采用平均值 ± 标准误,用配对法 T 测验检测花绒寄甲在四壁嗅觉仪 2 对角区域中是否呈假设检验 $H_0: \mu_1 = \mu_2$ 的分布理论,计算相应显著水平。

2 结果与分析

2.1 花绒寄甲对寄主体表挥发物提取液的嗅觉反应

寄主挥发物提取液对花绒寄甲的嗅觉反应结果显示(见表 1),不同质量浓度的寄主挥发物提取液

对花绒寄甲的嗅觉反应影响明显不同。25、50 mg/mL 的松褐天牛挥发物提取液对花绒寄甲有明显的吸引作用,花绒寄甲在处理区的滞留时间都显著高于对照区,并且在 25 mg/mL 时,花绒寄甲在处理区的进入次数也明显高于对照区。25、50 mg/mL 的青

杨天牛挥发物提取液对花绒寄甲都有明显的吸引作用,花绒寄甲在处理区的滞留时间和进入次数都显著高于对照区。50 mg/mL 的大麦虫挥发物提取液对花绒寄甲才有明显的吸引作用,花绒寄甲在处理区的滞留时间和进入次数都显著高于对照区。

表 1 花绒寄甲对不同质量浓度寄主体表挥发物的嗅觉反应

供试寄主	质量浓度/ (mg/mL)	滞留时间/s			进入次数		
		对照	处理	P	对照	处理	P
松褐天牛	10	5.36 ± 0.65	7.18 ± 1.12	0.062	1.2 ± 0.84	2.2 ± 0.44	0.089
	25	9.26 ± 0.76	11.84 ± 0.86*	0.007	2.8 ± 0.84	4.4 ± 1.14*	0.016
	50	12.14 ± 0.74	14.06 ± 0.96*	0.039	3.4 ± 1.14	5.2 ± 1.31	0.088
青杨天牛	10	3.02 ± 0.61	4.76 ± 1.37	0.077	2.0 ± 0.71	2.8 ± 0.84	0.099
	25	4.68 ± 0.51	6.26 ± 0.78*	0.007	3.2 ± 1.31	5.4 ± 1.14*	0.020
	50	4.76 ± 0.86	7.34 ± 0.51*	0.006	3.8 ± 0.84	6.0 ± 0.71*	0.004
大麦虫	10	4.72 ± 0.41	5.44 ± 0.95	0.178	1.8 ± 0.84	2.6 ± 0.89	0.338
	25	6.06 ± 0.55	7.34 ± 1.1	0.106	2.6 ± 0.71	3.2 ± 0.84	0.426
	50	11.36 ± 1.59	13.76 ± 1.32*	0.035	3.6 ± 0.84	6.4 ± 1.14*	0.019

P < 0.05, 表示相同质量浓度下处理与对照间存在差异显著, n = 30。

所以,寄主体表挥发物提取液对花绒寄甲的滞留时间影响大于对其进入次数的影响;不同寄主挥发物提取液对花绒寄甲的嗅觉反应影响有所不同;同一种寄主不同质量浓度体表挥发物提取液对花绒寄甲的嗅觉反应也有影响。

2.2 寄主栖境挥发物提取液对花绒寄甲嗅觉反应的影响

寄主栖境不同质量浓度挥发物提取液对花绒寄甲嗅觉反应结果(见表 2)显示,花绒寄甲对黑松和毛白杨蛀道组织的挥发物提取液的嗅觉反应显著高于对黑松和毛白杨健康组织的挥发物提取液。花绒寄甲对黑松健康组织挥发物 50 mg/mL 提取液的嗅

觉反应高于其对 25 mg/mL 提取液的反应,但不显著。在黑松健康组织挥发物 50 mg/mL 提取液时,花绒寄甲在处理区的进入次数显著高于对照。质量浓度为 25、50 mg/mL 的黑松蛀道组织挥发物提取液对花绒寄甲都有明显的吸引作用,花绒寄甲在处理区的滞留时间和进入次数显著高于对照区。花绒寄甲对 2 个质量浓度的毛白杨健康组织均无显著嗅觉反应。质量浓度为 25 mg/mL 的毛白杨蛀道组织挥发物提取液对花绒寄甲有明显的吸引作用,花绒寄甲在处理区的滞留时间显著高于对照区,而提取液在 50 mg/mL 质量浓度时,花绒寄甲对其嗅觉反应不显著。

表 2 花绒寄甲对不同质量浓度寄主栖境挥发物的嗅觉反应

寄主组织	质量浓度/ (mg/mL)	滞留时间/s			进入次数		
		对照	处理	P	对照	处理	P
黑松健康	25	9.38 ± 1.57	9.58 ± 0.96	0.856	1.6 ± 0.6	2.0 ± 1.2	0.374
	50	13.92 ± 0.91	17.44 ± 3.12	0.185	2.4 ± 0.6	3.6 ± 1.0*	0.033
黑松蛀道	25	23.66 ± 3.51	33.42 ± 3.25*	0.027	1.8 ± 0.6	3.6 ± 0.7	0.053
	50	26.94 ± 2.17	36.88 ± 4.51*	0.009	2.6 ± 1.0	6.4 ± 0.6*	0.012
毛白杨健康	25	4.64 ± 1.11	5.14 ± 1.19	0.169	1.6 ± 0.6	1.8 ± 0.8	0.621
	50	5.88 ± 0.59	6.10 ± 0.76	0.667	2.2 ± 1.0	2.4 ± 1.0	0.749
毛白杨蛀道	25	10.84 ± 0.84	13.22 ± 1.47*	0.039	2.0 ± 0.6	4.0 ± 1.0	0.089
	50	15.94 ± 3.91	18.48 ± 5.25	0.402	3.4 ± 0.6	5.6 ± 1.0	0.141

P < 0.05, 表示相同质量浓度下处理与对照间存在差异显著, n = 30。

花绒寄甲在挥发物质量浓度为 50 mg/mL 时,对黑松比毛白杨蛀道组织的嗅觉反应影响更显著。所以,寄主蛀道组织比健康组织对花绒寄甲嗅觉反应的影响更大。

2.3 寄主体表挥发物抽提浓缩液的 GC-MS 分析

对 3 种寄主挥发物的二氯甲烷和乙醚的抽提浓缩液进行 GC-MS 分析结果(见图 1)显示,提取的浓缩液中含有多种活性组分,主要峰值的保留时间在 10~40 min 之间。进一步的 GC-MS 鉴定得到 2 种

提取浓缩液中均分离到 C₂₁~C₃₆ 的直链烷烃活性成分,另有其他化合物成分见表 3,二氯甲烷提取液成分中主要含有脂肪酸及其衍生物和萜烯类化合物。乙醚提取液成分中除含有脂肪酸及其衍生物和萜烯类,还有醇酮类和苯酚类化合物。2 种提取液中提取到相同的组分相对含量大于 0.5% 的物质除了直链烷烃,还有辛酸、棕榈酸、β-蒎烯、反式角鲨烯、油酸等,但各组分在提取液中的相对含量不同。

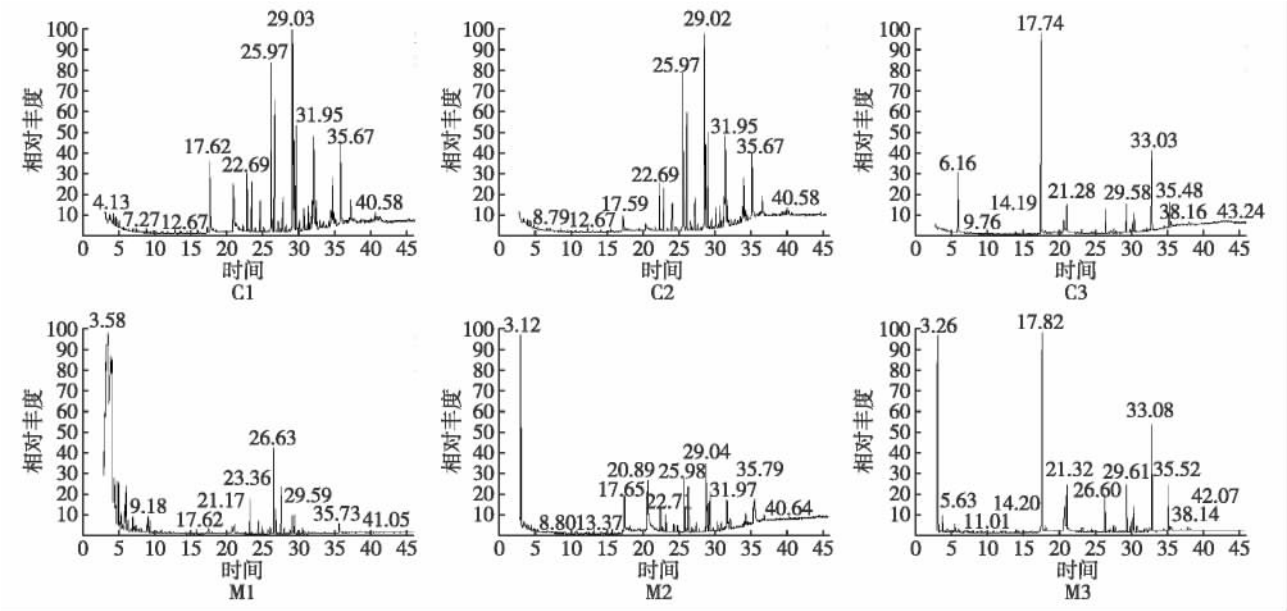


图 1 寄主挥发物提取浓缩液的 GC-MS 扫描图谱

表 3 寄主挥发物提取浓缩液成分的 GC-MS 鉴定

二氯甲烷抽提浓缩液		乙醚抽提浓缩液	
名称	分子式	名称	分子式
辛酸	C ₈ H ₁₆ O ₂	3-羟基-2-丁酮	C ₄ H ₈ O ₂
β-蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	2,3-丁二醇	C ₄ H ₁₀ O ₂
棕榈酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	2,4-二甲基-3-戊醇	C ₇ H ₁₆ O
亚油酸	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	苯乙酮	C ₈ H ₈ O
顺式十八碳-9-烯酸	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	1,2-二甲苯	C ₈ H ₁₀
油酸	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	辛酸	C ₈ H ₁₆ O ₂
辛酸癸酯	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	4-仲丁氧基-2-丁酮	C ₈ H ₁₆ O ₂
乙酸十八酯	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	萘苯	C ₁₀ H ₈
辛酸十二烷基酯	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	甘菊蓝	C ₁₀ H ₈
辛酸十四烷基酯	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	β-蒎烯	C ₁₀ H ₁₆
辛酸十六烷基酯	C ₂₄ H ₄₈ O ₂	棕榈酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
三辛酸甘油酯	C ₂₇ H ₅₀ O ₆	油酸	C ₁₈ H ₃₄ O ₂
反式角鲨烯	C ₃₀ H ₅₀	油酸乙酯	C ₂₀ H ₃₈ O ₂
		邻苯二甲酸二异辛酯	C ₂₄ H ₃₈ O ₄
		三辛酸甘油酯	C ₂₇ H ₅₀ O ₆
		反式角鲨烯	C ₃₀ H ₅₀
		三癸酸甘油酯	C ₃₃ H ₆₂ O ₆

3 讨论

寄主及其栖境一般由多种生物组成,天敌昆虫必须借助与寄主有关的信号进行搜索^[10]。本试验通过应用四臂嗅觉仪对花绒寄甲的嗅觉反应测定,表明寄主及栖境挥发物在花绒寄甲搜寻寄主过程中起着相当重要的作用,花绒寄甲对寄主及栖境挥发物的趋性可能与挥发物质量浓度有关,过高或过低的挥发物质量浓度可能对昆虫的嗅觉反应均不显著^[11]。Wei 等^[12]推测(R)-(+)-柠檬烯可能是花绒寄甲成虫搜索过程中利它素的重要组成部分。本研究通过 GC-MS 分析,检验出用二氯甲烷或乙醚为提取液时对 3 种寄主挥发性化合物的相关组分,可能使花绒寄甲搜索过程中利它素的研究更为丰富。但驱使花绒寄甲产生趋性的有效活性物质,还应采用 EAG 技术从已检测出的活性成分中进行触角电

位生理测定加以佐证。另外,挥发性化合物有效成分的比例对昆虫的趋性也有很大影响^[13]。虽然花绒寄甲的视觉退化严重,但视觉因素也有可能对昆虫在定位寄主和交配时产生影响^[14]。随着单细胞记录技术(SCR)^[15]和分子生物学的发展,笔者认为对于花绒寄甲搜索寄主行为和化学通讯的研究,应继续从超微结构、电生理反应及化学感受基因^[16]等层面进行更深入探讨。

参考文献:

- [1] Nina E F, Gabriella B K, Lucas A K, et al. Oviposition-induced plant cues: do they arrest *Trichogramma* wasps during host location? [J]. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2005, 115 (1): 207-215.
- [2] Paré P W, Tumlinson J H. Induced synthesis of plant volatiles [J]. *Nature*, 1997, 385(2): 30-31.
- [3] Vet L E M, Dicke M. Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context [J]. *Annual Review of Entomology*, 1992(37): 141-172.
- [4] 杨忠岐,李建庆,梅增霞,等.释放花绒寄甲防治危害白蜡的云斑天牛[J]. *林业科学*, 2011, 47(12): 78-84.
- [5] 高悦,解春霞,刘云鹏,等.花绒寄甲对柳树光肩星天牛的防治效果及寄生能力[J]. *西南林业大学学报*, 2013, 33(5): 104-106.
- [6] 高悦,解春霞,刘云鹏,等.花绒寄甲松褐天牛生物型人工繁育替代寄主的筛选研究[J]. *中国生物防治学报*, 2015, 31(2): 264-267.
- [7] 万方浩,仝赞华,陶淑霞,等.引诱赤眼蜂产卵的他感化合物活性物质的提取及分析[J]. *中国农业科学*, 2001, 34(3): 277-282.
- [8] 白树雄,王振营,何康来,等.玉米螟赤眼蜂对亚洲玉米螟益它素的嗅觉反应[J]. *昆虫学报*, 2004, 47(1): 48-54.
- [9] 王勇,肖铁光,何忠,等.马尾松树脂挥发性化学物质对松毛虫赤眼蜂嗅觉及寄生行为的影响[J]. *昆虫知识*, 2008, 45(6): 944-949.
- [10] Vinson S B. The general host selection behavior of parasitoid *Hymenoptera* and a comparison of initial strategies utilized by *Larvaphagous* and *Oophagous* species [J]. *Biological Control*, 1998, 11(2): 79-96.
- [11] 练永国,王素琴,白树雄,等.挥发性信息化合物对玉米螟赤眼蜂寄生选择行为的影响[J]. *昆虫学报*, 2007, 50(5): 448-453.
- [12] Wei J R, Yang Z Q, Hao H L, et al. (R)-(+)-limonene, kairomone for *Dastarcus helophoroides*, a natural enemy of longhorned beetle [J]. *Agricultural and Forest Entomology*, 2008, 10(4): 323-330.
- [13] 罗永松,肖活生,孙江华,等.利用 α -Pinene等引诱剂诱杀松瘤象的研究[J]. *江西植保*, 2004, 27(1): 26-27.
- [14] 刘博,徐华潮,孟俊国,等.视觉因素在松墨天牛定位寄主和交配中的作用[J]. *浙江农林大学学报*, 2012, 29(4): 617-620.
- [15] 陶瑞松.昆虫触角感受器电位的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(16): 8944-8946.
- [16] 阎雄飞,刘博,刘永华,等.植食性昆虫寄主识别的化学感受分子机理[J]. *榆林学院学报*, 2013, 23(2): 5-10.

(上接第 11 页)

- [8] 王鹏善. 钟山志[M]. 南京: 南京出版社, 2009.
- [9] 梁珍海,刘海燕,陈霞,等.南京紫金山不同植物群落中VOCs的组成[J]. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 2011, 35(1): 34-38.
- [10] 李美娟. 鹭峰国家森林公园大气—植物VOCs的研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2007.
- [11] 陈华君,洪蓉,金幼菊,等.近自然状态下植株挥发物的采集和热脱附-GC-MS分析[J]. *分析测试学报*, 2003, 22: 226-228.
- [12] 盛国英,傅家漠,成玉,等.粤港澳地区大气中有机污染物初步研究[J]. *环境科学*, 1999, 20(4): 6-11.
- [13] 何兰,姜志宏.天然产物资源化学[M]. 北京: 科学出版社, 2008, 220-273.