黑翅土白蚁踪迹信息素组分数量的柱层析分离和活性测定分析*

文 平[1,3**] 嵇保中[1***] 刘曙雯[2] 冀仕琳[1] 刘佳佳[1]

(1. 南京林业大学森林资源与环境学院 南京 210037; 2. 南京中山陵园管理局 南京 210014;
3. 江苏省农用激素工程技术研究中心 常州 213022)

摘 要 本文分析了在活性限浓度进行生物活性测定时,黑翅土白蚁 *Odontotermes formosanu* Shiraki 对踪迹信息素的行为反应特点以及使用不同踪迹线载体对踪迹信息素活性的影响。并设计标准生物活性测试方法,测定了采用柱层析方法分离的黑翅土白蚁踪迹信息素各分离馏分的活性,发现黑翅土白蚁踪迹信息素用 22% 乙酸乙酯/正己烷洗脱液等度洗脱分离后的各馏分中包含两个强活性区段,推测黑翅土白蚁踪迹信息素至少包含 2 个有轻微极性差异的组分。

关键词 黑翅土白蚁,踪迹信息素,柱层析,活性组分

Liquid chromatography and bioassay analysis of components in the trail pheromone of the black-wing subterranean termite *Odontotermes formosanus* Shiraki

WEN Ping[1,3**] JI Bao-Zhong[1***] LIU Shu-Wen[2] JI Shi-Lin[1] LIU Jia-Jia[1]

(1. College of Forest Resource and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China;
2. Administration Bureau of Dr Sun Yat-Sen's Mausoleum, Nanjing 210014, China;
3. Jiangsu Agrochem Laboratory, Changzhou 213022, China)

Abstract By working at the threshold active concentration, the characteristic behavioral reactions of the black-winged subterranean termite *Odontotermes formosanus* Shiraki to extracts of trail pheromone components were analyzed in trail-following bioassays, including the effect of different testing substrates. Based on the results, a standard bioassay method was used to test the fractions from isocratic elution (22% EtOAc/n-hexane) of pheromone extract on a silica gel column. Results show that two active peaks exist in the fractions, which indicate that the trail pheromone of *O. formosanus* consists of at least two components.

Key words *Odontotermes formosanus*, trail pheromone, liquid chromatograph, active components

黑翅土白蚁 *Odontotermes formosanus* Shiraki 属于较高等的培菌白蚁,广泛分布于东南亚各地。其跟踪活动频繁,常挖掘长达数十米的蚁道进行较大范围的活动,使得每巢黑翅土白蚁的危害范围通常较大。常见白蚁种类的信息素为一些烯醇类物质,低等白蚁的踪迹信息素往往被认为是单一组分,蚁道较少,其活动范围往往较为局限(Bordereau and Pasteels, 2011)。但对于一些挖掘长蚁道活动的高等白蚁种类,单一组分不利于实现长蚁道内的信息交流,如不同蚁道的性质(采食、寻觅、分飞等)以及蚁道方向的确定等(文平等, 2011);昆虫往往利用多组分的信息素进行各

* 资助项目:高等学校博士学科点专项科研基金项目(20123204110001);江苏省自然科学基金项目(BK2012816);南京市建委中山陵园管理局资助课题(200409);江苏高校优势学科建设工程资助项目(164010641)。

** E-mail: w684402@163.com

*** 通讯作者,E-mail:jbz9885@njfu.edu.cn

收稿日期:2013-06-06,接受日期:2013-08-17

种信息的神经编码,一些高等白蚁种类也已证实多组分信息素系统的存在(Bordereau and Pasteels, 2011),在广西和越南分布的几种大白蚁,如土垅大白蚁 *Macrotermes annandalei* 和黄翅大白蚁 *M. barneyi* 甚至可能以此实现信息素的种间隔离(Peppuy *et al.*, 2001, 2004)。黑翅土白蚁踪迹信息素已经有了初步的研究:杜桐源等(1982)通过对黑翅土白蚁提取液的柱层析、薄层层析和微化学反应结果推测,黑翅土白蚁踪迹信息素为含有双键的醇类化合物。含 3,6,8(*Z*,*Z*,*E*)-十二碳三烯-1-醇的密褐褶孔菌及其感染腐木块提取物和合成的白蚁踪迹信息化合物 3,6(*Z*,*Z*)-十二碳二烯-1-醇对黑翅土白蚁都有类似天然信息素提取液的跟踪活性(罗钧泽等, 1988a, 1988b;邓晓军等, 2002)。然而,黑翅土白蚁踪迹信息素的组分数量和详细化学结构等信息仍然需要更多的提取分离试验证实。白蚁信息素含量极微,直接用工蚁提取物进行气相色谱分析,往往不能在众多的杂质当中选择出目标组分,需要液相色谱先纯化,然后进行气相色谱分析(Matsumura *et al.*, 1968)。梯度洗脱能快速分离不同极性的化合物,常用来除去样品中极性差异较大的非目标组分,但不能分离极性相近的化合物。等度洗脱情况下,增加柱长度和柱内径,则可能实现极性相差极小化合物的分离,当信息素结构为化学性质相近的一类化合物时,等度洗脱有助于了解信息素组分数目。黑翅土白蚁踪迹信息素的活性浓度限约为 10^{-3} ~ 10^{-5} WEQ/cm(WEQ,1 头工蚁提取物当量)(罗钧泽等, 1988a, 1988b;邓晓军等, 2002)。在不同的活性测定方法中,工蚁的行为反应不同。但活性限浓度测定时,工蚁对踪迹线的转折或者浓度变化处表现出的行为反应未见报道。本文利用等度洗脱柱层析分离结合生物活性测定方法分析黑翅土白蚁踪迹信息素组分数量,探讨踪迹信息素的活性组分数目。

1　试验材料与方法

1.1　供试昆虫

在白蚁活动季节,于南京林业大学树木园采集上树活动泥被下的采食蚁群,置于内衬清洁湿润滤纸的培养皿中(以下简称为培养皿),具体操作为将滤纸用蒸馏水浸泡洗涤多次,垫好后用吸水纸将含水率(以下简称 MC)调节至 120% ~ 150%。将采集的白蚁采食群体中兵蚁挑出后,取一定数量工蚁用于提取和活性测试。用于提取的工蚁即采即用,用于生测的工蚁置于培养皿内,开放空间内静置 1 h 至所有工蚁不再在皿内转圈跑动为止始用于生测。

1.2　信息素提取

据杜桐源等(1982)报道,黑翅土白蚁踪迹信息素为烯醇类化合物,酯化后活性完全丧失,白蚁体内含有多种脂肪酸,为了防止信息素酯化后活性丧失,采用碱水解提取方法。取工蚁 1 000 头,用 20 mL 0.5 mol·L^{-1} KOH/甲醇溶液碱水解,10 mL 正已烷连续萃取至甲醇碱溶液层无踪迹活性(水解后样品的踪迹活性可以维持较长时间)。萃取获得的样品在氮气流下浓缩至 0.5 mL,转入特富龙垫片密封的 2 mL 样品瓶,-80℃冷库保存,供硅胶柱层析分离纯化。

为测定采食过程中释放到基质的踪迹信息素情况,在室内人工饲养的蚁巢上连接玻璃管(长 75 cm)作为采食道,管内壁下侧衬有润湿的硅胶颗粒(60 ~ 100 目),在开始采食 15 h 取出玻璃管,用 10 mL 水和 10 mL 正已烷冲洗后振荡提取,提取液过滤后,取有机相在氮气流下浓缩至 3.8 mL。

1.3　柱层析分离方法

将活化的 100 mL 分析纯硅胶 H(200 ~ 300 目,SiO_2 60,青岛海洋科技)用正已烷混匀装入内径 20 mm 的层析柱,用重蒸馏的正已烷、二氯甲烷、甲醇等连续洗脱至 GC 检测无杂峰出现为止,将整个层析系统置于 4℃的层析冷柜内。向信息素提取液中加入 0.5 g 纯化过的硅胶 H(约 1 mL),0℃冰水浴,7.5 mmHg 减压旋转蒸发干燥,将带有样品的硅胶低温快速转出后,置于层析柱中载体硅胶上方,再用 22% 乙酸乙酯/正已烷(EtOAc/n-hexane)洗脱,柱上端用氮气加低压至流速为 0.5 mL/min,每 5 min 收集一馏分。所有馏分收集前流经 260 nm 紫外检测池,吸收值通过模-数转换器转换为数字信号用电脑记录。洗脱获得的各馏分分别进行生物活性测定。

1.4　生物活性测定方法

将工蚁提取物柱层析各馏分在滤纸上进行生物活性测定。在直径 11.0 cm 的中速定量滤纸上用铅笔划 4 点定出 Y 形(图 1),跟踪活性测定前,将样品用 5 μL 微量进样器(上海高鸽)沿基端与

一条臂端上划线,另一臂用同样规格的另一支微量进样器划正已烷线为对照。划线过程当中,进样器由直角尺引导,活塞柄固定在直角尺一边,将针尖轻压到纸上并沿另一直角尺边移动针筒,以保证踪迹线均匀,所画出样品线宽度 3.2 mm,长 5.0 cm,含有样品两臂总长 10 cm。等候圈为一玻璃环(直径 2.5 cm,高 1.3 cm),环一侧壁开 3.0 mm^2 × 3.0 mm^2 缺口,测定时把等候圈放在滤纸上,使其上缺口置于样品线上距中心点 3.0 cm 处。测定时环境温度为(25 ± 1)℃,空气湿度为 70% ±5%。将划好样品线的滤纸或其他载体放置玻璃板上,测定系统下垫海绵以减小环境低频振动的干扰。将静置处理的工蚁用纤维素毛刷轻轻挑取 1 头放入等候室。观察工蚁由等候室缺口爬出后是否沿样品线爬行。

同时,还将蚁道提取物进行基质活度对踪迹信息素活性影响的测试。选用不同活度的载体,包括 105℃活化的薄层层析板(TLC 板,MC 5%)、吸水失活(MC 150%)的 TLC 板、毛玻璃板作为踪迹线载体,踪迹线制备过程中,为了测定活性限,分别选用 1、5、10 μL 微量进样器(上海高鸽,长均为 5 cm)划线生测。

踪迹活性的数据分析方法为:以等候圈出口为起点,0 ~ 3.0 cm(中心点以内)离开样品线的,视为无踪迹活性;在试验中,由于踪迹线均匀,工蚁如果选择一臂多直接达到端部,记为对此臂有选择活性(Active),否则在分支点即离开踪迹线,仅记为基端活性(Base active)。每次测试 1 头虫,测试工蚁和踪迹线均不重复使用。活性组分数量分析时,每处理重复数大于 30 次,选择率按百分比计。不同基质上进行活性限分析时,按选择数/试验次数计。选择率结果用连续性矫正 *U*-test 检验显著性。

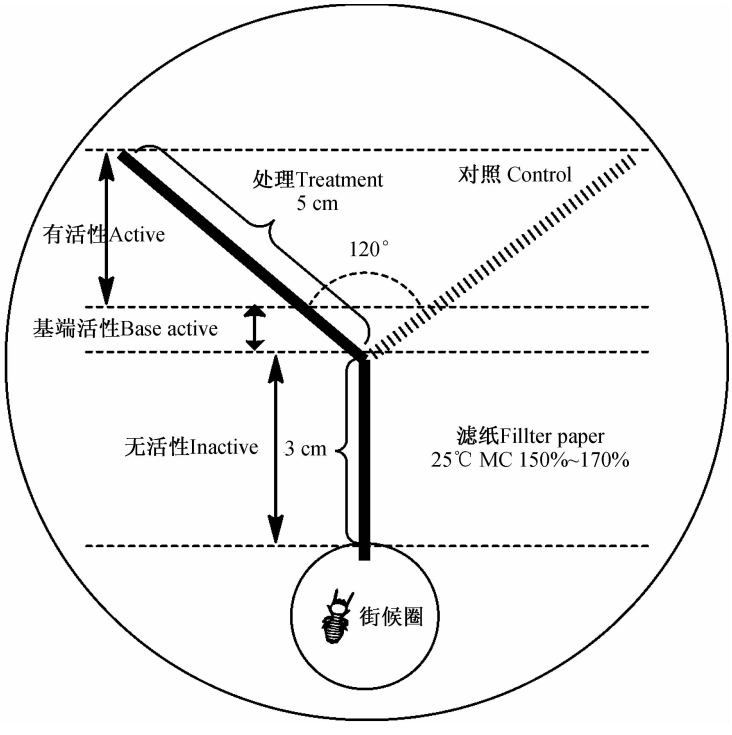


图 1 踪迹信息素的踪迹活性测定

Fig. 1 Trail following bioassay of trail pheromone

将划好踪迹线的滤纸放置在(25 ± 1)℃环境当中,测试工蚁沿基端 B 前进,在分支点前离开踪迹线的视为无活性(Inactive),在分支点处返回或者离开的视为有弱跟踪活性(Base active),工蚁达到一臂端部记为有强活性(Active)。

2 结果与分析

2.1　载体对踪迹信息素活性的影响

以采食 15 h 蚁道的提取物为待测物,在滤纸上测定的活性限为 1 μL·cm^{-1}。围绕此活性限,选择了 0.2 μL·cm^{-1}和 2 μL·cm^{-1}作为测试基质活度对踪迹信息素活性影响的浓度。结果表明活度高的 TLC 板完全吸附了踪迹信息素,造成活性丧失。加水润湿失活后,活性恢复。而玻璃板、干滤纸和失活 TLC 板之间的活性差异不显著(表 1)。在活性限浓度测试时,产生行为活性的工蚁多表现为遇到转折点即按基端返回的行为反应特点,跟踪距离多在 3 cm 左右,而有较强活性时测试工蚁可在转折处转向后继续向前,跟踪距离可达 8 cm,部分可达到端点后返回。将两种反应均记为有活性的反应进行选择率分析。

表 1　载体对踪迹信息素活性的影响

Table 1　Impact from testing substrate to the trail-following activity

基质 Substrate	选择率 Selection		跟踪距离 Distance followed (cm) (n = 15)			
	0.2 μL·cm^{-1}	1 μL·cm^{-1}	2 μL·cm^{-1}	0.2 μL·cm^{-1}	1 μL·cm^{-1}	2 μL·cm^{-1}
活化 TLC 板 Activated TLC plate	0/15*ns*	0/15*ns*	0/15*ns*	0.2 ± 0.1b	0.2 ± 0.1b	0.2 ± 0.1b
失活 TLC 板 Deactivated TLC plate	11/15*ns*	13/15**	15/15***	3.1 ± 1.2a	3.4 ± 1.1a	7.4 ± 1.0a
玻璃 Glass	14/15***	14/15***	15/15***	3.2 ± 0.4a	3.2 ± 0.4a	7.4 ± 1.0a
滤纸 Filter paper	12/15*ns*	13/15**	15/15***	3.4 ± 1.1a	3.5 ± 1.1a	7.7 ± 0.7a

注:***标记的选择值极显著($P < 0.001$),**标记的选择值显著($P < 0.01$),*ns* 表示没有显著的选择性。同一列数字后标有相同字母标记的值之间差异不显著($P > 0.05$)。

*** indicates extremely significant selectivity at 0.001 level, ** indicates significant selectivity at 0.01 level, *ns* indicates the selectivity is not significant. Data with the same letters in the same column indicate no significant difference($P > 0.05$).

2.2　柱层析试验结果

按照活性浓度限时工蚁的行为反应特点,将工蚁的行为活性反应分为基本活性和强活性两类,并选择干滤纸(MC 15%)作基质进行测定。黑翅土白蚁工蚁整体提取物经柱层析等度(22%乙酸乙酯/正己烷)洗脱分离,1 000 头工蚁提取物,每管收集 2.5 mL,测定时预计的最高测试浓度约 0.4 WEQ·cm^{-1},但实际上由于拖尾等原因,对各馏分管内测试浓度有一定影响,但各管活性区域组分的强活性反应仍呈现可重复的双峰形式(图 2),其中第 1 个峰在 16 ~ 20 号各管所测得的强活性反应数的比例之间无显著差异,但与相邻的 15 和 21 号管差异极显著($P < 0.001$);第 2 个峰在第 23 号管强活性反应数的比例与相邻的 22 和 24 管强活性反应数之间差异极显著($P < 0.01$)。推测黑翅土白蚁踪迹信息素至少包含有两个活性组分。但是在对应的洗脱体积(区段 1 为 37.5 ~ 50.0 mL, 区段 2 为 55.0 ~ 60.0 mL)却无对应的紫外吸收峰出现(图 3),受非目标物干扰严重,同时也表明踪迹信息素无紫外吸收或者含量极低的特性,与白蚁踪迹信息素报道为含量极低的烯醇类化合物相一致。

图 2 中每管测试多于 30 头工蚁。图 3 显示,存在 2 个具有较强活性馏分的峰值,推测黑翅土白蚁踪迹信息素可能存在至少 2 个活性组分。

3　讨论

高等培菌白蚁信息素的柱色谱分离已经得到过数次的研究应用(Bordereau *et al.*, 1991; Peppuy *et al.*, 2001),在梯度洗脱或者薄层层析试验中,活性区段均表现为较宽的迁移率(Rf)范围,诸多的研究中均把这种较宽的 Rf 值归结为试验操作当中引起的活性物质拖尾现象。本研究中对黑翅土白蚁提取物,采用等度洗脱,并增加柱效后的分离发现实际的活性区段有 2 个,推测黑翅土白蚁的踪迹信息素至少包含两个组分,且二组分间有较小的极性差异。这与已有白蚁踪迹信息素烯醇类化合物的化学性质差异相一致。已知高等

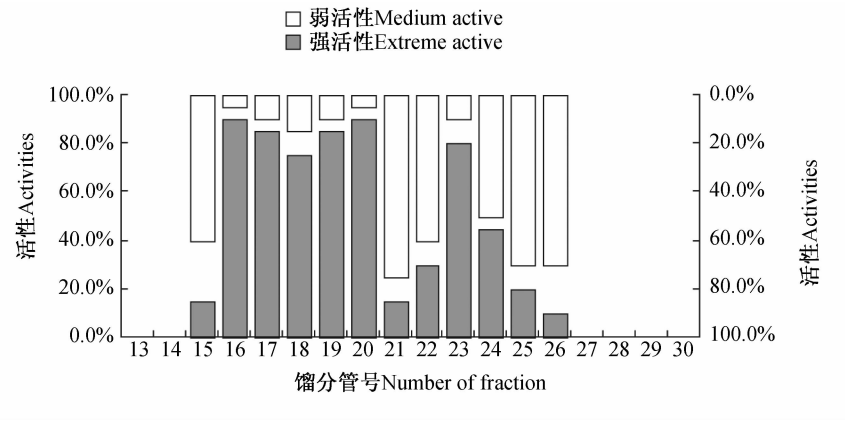


图 2 硅胶柱层析分离馏分的生物活性测定结果

Fig. 2 Activity of the fractions eluted from the silica gel column chromatography

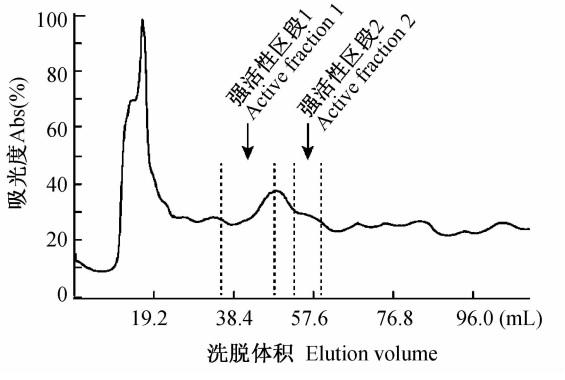


图 3 等度洗脱柱层析馏出物的 UV260 紫外吸收图谱

Fig. 3 UV260 absorption chromatography of isocratic elutions on a silica gel column

白蚁的信息素组分中的三种烯醇化合物,即 3(*Z*)-十二碳烯-1-醇、3,6(*Z*,*Z*)-十二碳二烯-1-醇、3,6,8(*Z*,*Z*,*E*)-十二碳三烯-1-醇之间因不饱和双键数目差异形成的分子极化程度差异造成 3 种化合物之间极性轻微不同。因此,在对黑翅土白蚁信息素进行分析时可考虑组分的极性差异采用相应的分离方法,如使用聚乙二醇作固定相的毛细管气相色谱柱等。从研究结果推测黑翅土白蚁信息素为前述 3 种化合物中的至少 2 种,我们前期对黑翅土白蚁配对性信息素的鉴定中发现其包含两个主要组分,3(*Z*)-十二碳单烯-1-醇和 3,6(*Z*,*Z*)-十二碳二烯-1-醇组成(Wen *et al.*, 2012),从白蚁信息素简约性的角度,推测其踪迹信息素也可能由相似的组分组成。但由于洗脱液的稀释作用以及在活性浓度范围操作的需要,本文分离到的活性馏分即使浓缩 20 倍后的化学分析(GC, GC-MS)也没有检出有活性组分的结构,需要使用固相微萃取(SPME)的方法萃取多头工蚁,进一步提取分离鉴定组分结构,并且分析其依靠多组分系统进行信息交流的机制。此外,由于踪迹信息素的活性受载体吸附性(活度)的影响明显,也需要采用适当的载体进行跟踪活性分析,在测定时最好考虑信息素作用微环境的活度情况进行分析,地下蚁道多为润湿的环境,而地上活动泥被蚁路则通常较干燥,仅新修泥被的前端部较润湿,这种差别均需要在近一步的鉴定试验设计中得到体现。各文献报道的活性测定当中制作的踪迹线不规则,容易引入人为误差,本试验采用引导划线注射器的办法制备均匀踪迹线,使测试工蚁能够感受到的踪迹变化仅为转折点,在活性限时,因浓度过低使循迹精度不够而在转折处产生易于分辨的行为反应,如离开或者折回,有利于分辨信息素的活性限反应。由于白蚁信息素的各烯醇组分具有弱极性且极性存在差异,利用分辨率更高的正向 HPLC 可更有效分离,结合生物活性测定,可以在分泌量极低的情况下实现更精确的组分数量分析。昆虫信息素组分中的烯醇类化合物紫外吸收值较低,响应浓度最低也只能到约万分之一(约 0.1 μg·mL^{-1}),而白蚁信息素含量约在每 1 000 头工蚁 10^{-8} ~ 10^{-7} g,既使峰值馏分中也远低于检测限,也提示紫外吸收检测法不能作为有效的白蚁信息素检测方法。在本文之前的一些研究当中,没有水解过的样品存储一段时间后丧失了活性。而经过碱水解法提取到的踪迹信息素低温保

存能较长时间保持活性(60 d)。说明白蚁信息素容易与有机酸(因正已烷提取的样品也会出现失活,说明造成失活的酸类往往具有较长的烃基,通常为一些碳数较高,可溶于非极性溶剂的酸类)酯化失活。这与杜桐源等(1982)的研究结果一致,同时也提示,白蚁信息素样品制作与保存过程中,需要将样品除酸并低温保存。

参考文献(References)

Bordereau C, Robert A, Bonnard O, Le QJ, 1991. (3*Z*,6*Z*,8*E*)-3,6,8-Dodecatrien-1-ol: Sex pheromone in a higher fungus-growing termite, *Pseudacanthotermes spiniger* (Isoptera, Macrotermitinae). *J. Chem. Ecol.*, 17(11): 2177 – 2191.

Bordereau C, Pasteels JM, 2011. Pheromones and chemical ecology of dispersal and foraging in termites. // David EB, Yves R, Nathan L (eds). Biology of Termites: a Modern Synthesis. German: Springer-Verlag. 279 – 320.

Matsumura F, Coppel HC, Tai A, 1968. Isolation and identification of termite trail-following pheromone. *Nature*, 219:963 – 964.

Peppuy A, Robert A, Sémon E, Bonnard O, Son NT, Bordereau C, 2001. Species specificity of trail pheromones of fungus-growing termites from northern Vietnam. *Insect Soc.*, 48(3):245 – 250.

Peppuy A, Robert A, Sémon E, Ginies C, Lettere M, Bonnard O, Bordereau C, 2001. (*Z*)-dodec-3-en-1 -ol, a novel termite trail pheromone identified after solid phase microextraction from *Macrotermes annandalei*. *J. Insect Physiol.*, 47(4):445 – 453.

Peppuy A, Robert A, Bordereau C, 2004. Species-specific sex pheromones secreted from new sexual glands in two sympatric fungus-growing termites from northern Vietnam, *Macrotermes annandalei* and *M. barneyi*. *Insect Soc.*, 51(1):91 – 98.

Wen P, Ji B, Liu S, Liu C, Sillam-Dussès D, 2012. Sex-pairing pheromone in the Asian termite pest species *Odontotermes formosanus*. *J. Chem. Ecol.*, 38(5):566 – 575.

邓晓军, 张珈敏, 胡建芳, 杨娟, 胡远杨, 郑穹, 2002. 合成黑翅土白蚁踪迹信息素类似物的生物活性. 昆虫学报, 45(6):739 – 742.

杜桐源, 罗钧泽, 汤敏玲, 陈梅英, 1982. 黑翅土白蚁的跟踪信息素. 昆虫学报, 25(2):172 – 177.

罗钧泽, 何复梅, 吕筠, 郑壮良,邓秀莲, 杜桐源, 1988a. 白蚁跟踪信息素类似物的利用(Ⅰ)黑翅土白蚁对跟踪信息素及其类似物的行为反应. 昆虫天敌, 10(4):205 – 213.

罗钧泽, 何复梅, 吕筠, 郑壮良, 邓秀莲, 杜桐源, 李子达, 1988b. 白蚁跟踪信息素类似物的利用(Ⅱ)诱杀堤坝白蚁和林木白蚁. 昆虫天敌, 10(4):214 – 221.

文平, 嵇保中, 刘曙雯, 2011. 白蚁采食行为中的信息交流. 昆虫学报, 54(3):352 – 360.