

马尾松枝条挥发性组分的鉴定及松墨天牛对其触角电生理反应^{*}

李水清^{1, 2, 3} 张钟宁^{1**}

(1. 中国科学院动物研究所 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室 北京 100080
2. 中国科学院研究生院 北京 100039 3. 长江大学化学与环境工程学院 湖北 荆州 434023)

Volatiles from wattles of *Pinus massoniana* and EAG responses of the adult *Monochamus alternatus* to the identified chemicals. LI Shui-Qing^{1, 2, 3}, ZHANG Zhong-Ning^{1**} (1. *State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China*; 2. *Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China*; 3. *College of Chemical and Environmental Engineering, Yangtze University, Jingzhou 434023, Hubei, China*)

Abstract The volatiles from wattles of *Pinus massoniana* Lamb. were determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The results showed that there were eight constituents in volatiles of one-, two- and three-year-old wattles of *P. massoniana*, which were consisted of α -pinene, camphene, β -pinene, myrcene, limonene, β -phellandrene, terpinolene and β -caryophyllene. But relative contents of these chemicals varied with wattle ages, with considerable difference in α -pinene, camphene, β -pinene, limonene, terpinolene and β -caryophyllene. The relative contents of α -pinene, camphene and terpinolene in one-year-old wattles were the least, which was 20.81%, 0.43% and 4.74% respectively. Whereas, the relative contents of β -pinene, myrcene and limonene were the most, which was 12.37%, 4.33% and 4.53% respectively. Electroantennogram (EAG) responses of the adult *Monochamus alternatus* Hope to these identified chemicals were tested and α -pinene caused maximum EAG responses, and β -caryophyllene the least.

Key words gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), determination of volatile, *Pinus massoniana*, terpenoids, mass spectrometry, *Monochamus alternatus*, electroantennogram

摘 要 为研究松墨天牛 *Monochamus alternatus* Hope 取食期引诱剂, 利用气相色谱—质谱(GC-MS)联用技术与标样核对分析了马尾松(*Pinus massoniana* Lamb.)枝条挥发性气味的化学组成。结果表明, 马尾松1年生、2年生、3年生枝条气味均由8种萜烯类物质组成, 但各组分相对含量不同。经方差分析, α —蒎烯、莰烯、 β —蒎烯、柠檬烯、萜品油烯、 β —石竹烯在3种枝条中的相对百分含量的差异均达到极显著水平。1年生枝条中 α —蒎烯、莰烯和萜品油烯的相对含量最小, 分别为20.81%、0.43%和4.74%, 而 β —蒎烯、月桂烯和柠檬烯的相对含量最高, 分别为12.37%、4.33%和4.53%。鉴定的化合物对松墨天牛雌雄成虫的触角电生理反应的实验, 结果表明, 松墨天牛雌雄成虫对 α —蒎烯的反应最强, 对 β —石竹烯的反应最弱。

关键词 气相色谱—质谱(GC-MS), 挥发物鉴定, 马尾松, 萜类, 质谱学, 松墨天牛, 触角电位

松树枯萎而死是由于松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 的侵染所致, 又称松材线虫病。松材线虫病是松树的毁灭性流行病害。目前该病害主要分布在美国、加拿大、墨西哥、葡萄牙、日本、朝鲜、韩国、中国。尤以日本

最为严重。松材线虫病使日本的赤松(*Pinus densiflora*)和黑松(*P. thunbergii*)遭受巨大损

^{*} 中国科学院知识创新工程重大项目(KSCX1-SW-13)。
^{**} 通讯作者, E-mail: zhangzn@ioz.ac.cn
收稿日期: 2006-05-08 修回日期: 2007-01-11

失^[1]。20 世纪 80 年代,日本 260 万 hm^2 松林中,大约 60 万 hm^2 感染了松材线虫^[2]。

我国自 1982 年在南京首次发现松材线虫病以来,仅 10 多年间相继在江苏、安徽、浙江、广东、山东、台湾、香港等省、区局部地区发生,导致大量松树枯死。仅据 1996 年资料,山东、江苏、浙江、安徽、广东等省发病面积已超过 40 000 hm^2 ,累计枯死松树 670 万株,直接经济损失数亿元^[3],并有逐年扩散蔓延的趋势,不仅给国民经济造成巨大损失,也破坏了自然景观及生态环境,更对我国松林资源构成严重威胁。

松墨天牛 *Monochamus alternatus* Hope 是松材线虫的主要媒介昆虫^[4-5]。在我国安徽省,松墨天牛的主要寄主是马尾松 (*Pinus massouiana* Lamb.),松材线虫依赖于松墨天牛在马尾松中进行传播,如能有效防治松墨天牛,则能阻断松材线虫病的传播途径,使松林免受松材线虫病的侵害。目前,松墨天牛的防治方法有杀虫剂防治^[6]、诱捕器诱捕^[7,8]、微生物防治^[9,10]及焚烧病木等方法。

在研究中我们观察到,松墨天牛取食时总是先咬掉马尾松针叶并优先选择取食 1 年生枝条,然后取食 2 年生或 3 年生枝条。因此我们分析了 1 年生、2 年生和 3 年生马尾松枝条气味的组成,以期找到寄主气味对取食期松墨天牛具有引诱活性的化学物质的种类和组成,以便更有效地防治松墨天牛。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

美国 Agilent 公司 Hewlett-Packard (HP) 6890 GC 和 HP 5793 MS 联用仪, QC-I 大气采样仪(北京市劳动保护科学研究所)。

XAD-2 吸附剂,北京康林公司;色谱纯正己烷, Fisher Chemicals, 美国; α -蒎烯 (98%), 柠檬烯 (92%), New Jersey, 美国; β -蒎烯 ($> 95\%$), 萘品油烯 ($> 85\%$), Tokyo Kasei Kogyo Co. Ltd, 日本; 月桂烯 ($\sim 90\%$), Sigma-Aldrich Chemie, 瑞士; 蒎烯 (75%), Fluka Chemie; 石竹烯 (95%), Aldrich Chemical.

1.2 GC/MS 分析条件

色谱柱为 DB-5 ms 石英毛细管柱 (60 m $\times$ 0.25 mm i.d. $\times$ 0.25 μm , J & W Scientific, USA); 载气为 N_2 , 流速为 1 mL/min, 进样口温度为 250 $^{\circ}\text{C}$ 。柱温升温程序: 50 $^{\circ}\text{C}$ 初始温度下保持 2 min, 以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度升至 200 $^{\circ}\text{C}$, 保持 5 min; 进样量为 1 μL , 分流比 50.0:1; 电离方式为电子轰击 (EI), 电子轰击能量为 70 eV。

1.3 分析样品的制备

在安徽省宣城市采集 1 年生、2 年生、3 年生马尾松枝条 (长约 10~15 cm), 去针叶, 装于两端开口的黑色高压聚乙烯塑料袋中。塑料袋的一端用硅胶管连接一个装有活性炭的玻璃管 (8 cm $\times$ 0.5 cm), 另一端连接 QC-I 大气采样仪, 抽底气 0.5 h。然后在大气采样仪与塑料袋间连接一个装有吸附剂 XAD-2 的玻璃管, 控制气体流速为 1.5 L/min, 连续抽气 5 h。取下吸附管, 用色谱纯正己烷洗脱, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。以不放马尾松枝条的聚乙烯塑料袋为空白对照, 相同条件下处理。

1.4 触角电位记录

将试验化合物用液体石蜡配制成 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 4 个浓度梯度, 每次将 10 μL 的样品滴于滤纸条上, 使刺激剂量分别为 1, 10, 100, 1 000 μg 。将松墨天牛的一根触角自基部切下, 在双目实体显微镜 (Olympus 273059) 下, 将参考电极插入触角的基部, 记录电极套在触角的端部。玻璃电极由毛细管控制而成。毛细管内径 0.2 mm, 在玻璃电极内注射适量的电生理盐水。将直径为 0.2 mm 的银-氯化银电极插入玻璃电极中, 银-氯化银电极装在微动操作仪 (Syntech MP-15) 上, 后者连接有直流/交流放大器 (Syntech UN-06), 刺激放大器 (Syntech CS-05) 和计算机。用 Syntech 软件记录数据。将 10 μL 样品溶液均匀滴在长 6 cm, 宽 0.5 cm 的滤纸条上, 放入巴斯德滴管中, 滴管末端连接气体刺激控制装置, 送气管管口与触角纵向垂直, 并与触角相距 10 mm 左右。调节连续气体流量为 124 mL/min; 刺激气体流量: 20 mL/min。每次刺激时间为 0.1 s。2 次刺激之间间隔 30 s 以保证触

角感觉器官功能的完全恢复。同一化合物同一剂量在一根触角上重复刺激 3 次,至少重复 6 根触角。对于每一样品化合物,刺激顺序为空白对照、样品低浓度到高浓度、空白对照。

1.5 数据处理

马尾松枝条气味的相对百分含量经反正弦变换、松墨天牛对不同化合物的刺激所获得的 EAG 反应幅度的绝对值用 Duncan 新复极差检验差异显著性。所有统计分析用 SPSS11.0 完成。

2 结果与分析

2.1 马尾松枝条挥发性气味组分鉴定

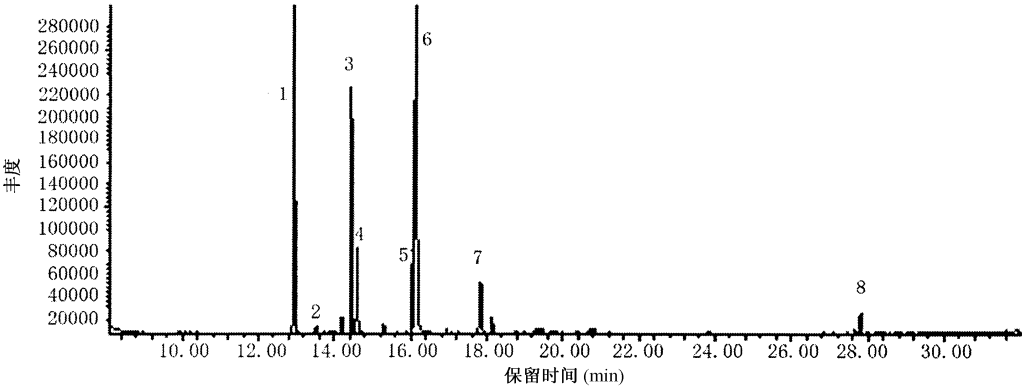


图 1 1 年生马尾松枝条挥发性气味的 TIC 图

表 1 马尾松枝条挥发物的化学组成

色谱峰编号	保留时间(min)	化合物	分子式	分子量
1	12.94	α -蒎烯	$C_{10}H_{16}$	136
2	13.53	莰烯	$C_{10}H_{16}$	136
3	14.44	β -蒎烯	$C_{10}H_{16}$	136
4	14.60	月桂烯	$C_{10}H_{16}$	136
5	16.05	柠檬烯	$C_{10}H_{16}$	136
6	16.14	β -水芹烯	$C_{10}H_{16}$	136
7	17.85	萜品油烯	$C_{10}H_{16}$	136
8	27.82	β -石竹烯	$C_{10}H_{16}$	136

注: 由于 β -水芹烯无标准品, 只能根据谱库检索定性。

从表 1 可知, 马尾松 1 年生、2 年生及 3 年生枝条挥发性气味组成相同, 我们从中确定了 8 种成分的化学结构和相对含量。其中 7 种属单萜类化合物, 1 种为倍半萜类化合物。虽然 3 种枝条挥发性气味的组成相同, 但各组成的相对百分含量却存在明显差异, 各组分相对百分

采用 GC-MS 对马尾松枝条气味和空白对照的正己烷洗脱液进行分析, 通过 NIST02 谱库检索及标准化化合物的保留时间定性, 并对峰面积进行归一化处理, 得到各组分的相对含量。结果表明, 在空白对照的正己烷洗脱液未发现任何色谱峰, 而在样品的正己烷洗脱液中鉴定了 8 个挥发性化合物。马尾松 1 年生枝条挥发性气味的总离子流图见图 1。2 年生和 3 年生枝条挥发性气味的总离子流图与 1 年生枝条相同, 只是峰面积不同而已。

图中各色谱峰定性结果列于表 1。

含量见表 2。

表 2 马尾松枝条挥发物的相对含量

化合物	1 年生枝条	2 年生枝条	3 年生枝条
α -蒎烯	20.81 $\pm$ 1.21C	29.38 $\pm$ 0.51B	41.00 $\pm$ 1.14A
莰烯	0.43 $\pm$ 0.04C	0.54 $\pm$ 0.01B	1.16 $\pm$ 0.04A
β -蒎烯	12.37 $\pm$ 0.27A	3.18 $\pm$ 0.07C	5.17 $\pm$ 0.06B
月桂烯	4.33 $\pm$ 0.06aA	3.68 $\pm$ 0.25bB	3.80 $\pm$ 0.13bB
柠檬烯	4.53 $\pm$ 0.17A	3.79 $\pm$ 0.11B	2.93 $\pm$ 0.14C
β -水芹烯	52.52 $\pm$ 0.79aA	51.88 $\pm$ 0.85aA	37.30 $\pm$ 0.52bB
萜品油烯	4.74 $\pm$ 0.06C	5.55 $\pm$ 0.06B	7.72 $\pm$ 0.15A
β -石竹烯	1.16 $\pm$ 0.04B	1.39 $\pm$ 0.03A	1.06 $\pm$ 0.04C

注: 表中数据为 4 个重复的平均值 $\pm$ 标准差。每行数据后大小写字母不相同表示百分含量经反正弦变换后由 Duncan 新复极差检验差异显著 ($P<0.05$) 或极显著 ($P<0.01$)。

从表 2 知, α -蒎烯、莰烯、 β -蒎烯、柠檬烯、萜品油烯、 β -石竹烯在 3 种枝条中的相对百分含量的差异均达到极显著水平。月桂烯在 2 年生和 3 年生枝条中的含量差异不显著, 而

在 1 年生枝条的含量较高,与 2、3 年生枝条相比达极显著水平。 β -水芹烯在 1 年生、2 年生枝条中的含量没有差异,而与 3 年生枝条中的含量差异达极显著水平。从以上结果可推断, β -水芹烯在引诱松墨天牛取食方面应该没有特殊的作用。月桂烯、柠檬烯和 β -蒎烯在较高浓度下具有明显的引诱作用, α -蒎烯、莰烯和萜品油烯则在较低浓度下具引诱作用。当

然,也可能这 8 种萜烯类物质按 1 年生枝条气味的组成混合才具有引诱松墨天牛取食的活性。

2.2 松墨天牛对马尾松枝条挥发性物质的触角电位反应

松墨天牛雌雄成虫对 8 种鉴定的挥发性组分的触角电位反应见表 3。

表 3 松墨天牛对马尾松枝条挥发性组分的 EAG 反应

化合物样品	雌雄	EAG 反应(μ g)			
		1 000	100	10	1
α -蒎烯	♂	1042±87a	877±36a	685±40a	542±30a
	♀	943±51ab	814±35ab	660±28ab	469±19b
莰烯	♂	675±48def	569±49d	427±28d	380±31c
	♀	621±44f	551±26d	465±38d	443±33bc
β -蒎烯	♂	852±27bc	817±23ab	641±25ab	468±20b
	♀	782±32cde	753±16bc	631±28ab	428±11bc
月桂烯	♂	678±63def	581±52d	440±28d	394±21c
	♀	661±57ef	550±51d	433±36d	257±28d
柠檬烯	♂	797±20cde	718±30bc	676±21ab	466±22b
	♀	798±28cde	695±19c	653±24ab	421±22bc
萜品油烯	♂	811±24cd	786±26abc	586±22bc	421±14bc
	♀	759±20cde	684±25c	510±27cd	391±23c
β -石竹烯	♂	399±33g	307±25e	239±23e	215±15de
	♀	386±29g	308±23e	212±14e	185±12e

注:表中数据为平均值±标准差。同一列数据后有相同字母者表示经 duncan 方差分析差异不显著。
由于无 β -水芹烯标准品,故未试验松墨天牛对 β -水芹烯的触角电生理反应。

由表 3 可知,试验挥发物均能引起松墨天牛雌雄成虫一定的触角电生理反应。但总的来说,各化合物引起的松墨天牛的触角电位反应微弱。对每一个化合物的不同刺激剂量而言,触角电位反应都随浓度的增加而增强。相同刺激剂量的不同化合物比较而言, α -蒎烯引起的触角电位反应最强,其次是 β -蒎烯、萜品油烯、柠檬烯、月桂烯和莰烯, β -石竹烯引起的触角电生理反应最弱。

3 讨论

具有物种特异性的化学信息物质在昆虫的生境选择、交配定位和种群分布过程中起着重要作用。松墨天牛在我国安徽省的主要寄主是马尾松。研究表明,马尾松挥发性次生物质主

要由萜烯类物质组成。马尾松针叶主要挥发性组分及相对百分含量为: α -蒎烯(41.2%), β -蒎烯(14.4%), β -石竹烯(10.1%),柠檬烯(2.6%),莰烯(2.5%),杜松烯(2.4%)等^[11]。本研究的结果说明,马尾松枝条挥发性气味的主要成分是 β -水芹烯, α -蒎烯, β -蒎烯,萜品油烯,月桂烯,柠檬烯等。可见,马尾松针叶和枝条挥发性气味无论是组成还是含量上都存在较大的差异。

马尾松产生的挥发性萜烯类物质的单组分或与乙醇、丙酮的混合物对松墨天牛具有引诱作用。研究寄主挥发性物质对昆虫的 EAG 反应活性有利于筛选生物活性化合物,为害虫的综合治理提供有效的生态防治方法。目前尚未见系统研究马尾松寄主挥发物对松墨天牛的

EAG 活性的报道。我们的研究表明, 马尾松挥发物能引起松墨天牛雌雄成虫触角的电生理反应, 但刺激反应总体较弱。大部分试验挥发物对松墨天牛雌雄成虫的触角电位反应无性别差异。

目前, 松墨天牛引诱剂的主要成分是 α -蒎烯, β -蒎烯, 乙醇及丙酮等, 主要引诱性成熟的松墨天牛。在萜烯类化合物中加入乙醇和丙酮, 是因为这 2 种物质对引诱剂具有增效作用。本研究的结果是, 在 3 种不同树龄的枝条气味中, 以 1 年生枝条 α -蒎烯的相对含量最低, β -蒎烯的相对含量最高, 而松墨天牛喜食 1 年生枝条。这说明 α -蒎烯含量过高可能会对松墨天牛的取食起到抑制作用, 而增加 β -蒎烯的含量可能会增强引诱效果。因此, 降低 α -蒎烯而增加 β -蒎烯的含量可能是研制取食期引诱剂的关键。马尾松枝条挥发性物质对

取食期松墨天牛引诱活性方面的研究正在进行中。

参 考 文 献

1 Togashi K., Nakamura K., Takahashi F. *Appl. Entomol. Zool.*, 1992, **27**(3): 341~347.

2 Mamiya Y. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 1983 **21**: 201~220.

3 胡学兵, 曲涛, 郑华. 森林病虫通讯, 1997, (3): 30~32.

4 Mamiya Y., Endo N. *Nematologica*, 1972, **18**: 159~162.

5 Togashi K. *Appl. Entomol. Zool.*, 1989, **24**(4): 379~386.

6 Togashi K. *Appl. Entomol. Zool.*, 1990, **25**(2): 187~197.

7 Sakai M., Yamasaki T. *J. Chem. Ecol.*, 1990, **16**(12): 3 383~3 392.

8 Sakai M., Yamasaki T. *J. Chem. Ecol.*, 1991, **17**(4): 757~765.

9 Shimazu M. *Appl. Entomol. Zool.*, 1994, **29**(1): 127~130.

10 Shimazu M., Sato H. *Appl. Entomol. Zool.*, 2003, **38**(1): 1~5.

11 赵成华, 伍德明, 阎云花, 李群. 林业科学, 1995, **31**(2): 125~131.

淡色库蚊对四种化学物质的嗅觉反应

恽悦 黄求应 雷朝亮*

(华中农业大学昆虫资源研究所 武汉 430070)

Olfactory response of *Culex pipiens pallens* to four chemicals. DING Si-Yue, HUANG Qiu-Ying, LEI Chao-Liang* (*Institute of Insect Resources Research, Huangzhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*)

Abstract Olfactory responses of *Culex pipiens pallens* female adults to 7 chemicals were investigated in the laboratory using a Y-tube olfactometer. These chemicals tested were lactic acid, acetone, ammonia solution, octyl alcohol, *n*-heptanoic acid, *p*-cresol, and *m*-cresol. The results indicated that, among the 7 chemicals tested, 1 mg/L and 10 mg/L ammonia solution, 1, 10 and 100 mg/L *n*-heptanoic acid solution, 1 mg/L octyl alcohol solution, 0.1 mg/L and 1 mg/L *p*-cresol solution were more attractive significantly than the control to the female adults of *C. pipiens pallens*, while remaining chemicals showed no significantly attractive effect on the female adults. For the relative attraction rate among all the treatments, 10 mg/L *n*-heptanoic acid was the highest by above 50% and the other treatments were lower than 40% with the lowest attraction rate in 0.1 mg/L *p*-cresol solution.

Key words *Culex pipiens pallens*, olfactory response, attraction

摘 要 在室内条件下通过 Y 型嗅觉仪测试了淡色库蚊 *Culex pipiens pallens* 雌成虫对乳酸、丙酮、氨水、辛醇、正庚酸、对甲酚、间甲酚等 7 种化学物质的嗅觉反应。结果表明: 与对照相比, 1 和 10 mg/L 氨水, 1, 10 和 100 mg/L 正庚酸, 1 mg/L 辛醇, 0.1 和 1 mg/L 对甲酚对淡色库蚊雌成虫具有显著的引诱作用。比较各处理的相对引诱率, 最高的为 10 mg/L 正庚酸, 达 50% 以上; 其他处理相对引诱率均低于 40%, 最低的为 0.1 mg/L 对甲酚。

关键词 淡色库蚊, 嗅觉反应, 引诱

* 通讯作者, E-mail: ioir@mail.hzau.edu.cn
收稿日期: 2006-05-29, 修回日期: 2006-06-12, 2006-12-08 再修回