不同年龄日本弓背蚁雄蚁上颚腺超微结构及化学成分比较研究*

王晓蕾** 许雯婧 贺 虹***

（西北农林科技大学林学院 西部森林灾害治理国家林业和草原局重点实验室，杨凌 712100）

摘 要 **【目的】** 日本弓背蚁 *Camponotus japonicus* Mayr 雄蚁的上颚腺较雌性品级发达。本研究通过比较不同年龄雄蚁上颚腺的超微结构及分泌物挥发性成分变化规律，揭示上颚腺在雄蚁生命活动中的潜在功能。**【方法】** 利用光学显微镜、扫描电子显微镜、透射电子显微镜观察雄蚁上颚腺的整体形态、表面超微结构以及分泌细胞内部特征；用萃取法采集上颚腺的分泌物，并利用气相色谱-质谱（GC-MS）技术分析其分泌物挥发性化学成分。**【结果】** （1）雄蚁上颚腺由一簇分泌单元和一个储存囊组成，每个分泌单元中又包含 1 个分泌细胞和 1 个导管细胞，羽化第 1 个月时上颚腺长度、储存囊长度、分泌细胞直径最大，分泌细胞湿润饱满光滑，随着年龄增长这些指标逐渐降低，至婚飞时分泌细胞皱缩干瘪，失去活力。（2）分泌细胞的细胞质中分布有丰富的线粒体、内质网、高尔基体、脂滴、分泌物颗粒和发达的末端结构；羽化第 1-4 月时，分泌颗粒密度较低、分泌囊泡逐渐丰富，线粒体围绕细胞核和微绒毛周围；到羽化第 8-9 月时，线粒体分散于细胞核、微绒毛及分泌颗粒间，分泌颗粒密度增加，分泌囊泡消失，细胞开始解体。（3）GC-MS 分析结果显示，雄蚁在羽化第 3 个月时上颚腺分泌物总峰面积最小，在羽化第 9 个月时总峰面积最大；上颚腺分泌物中，共鉴定出 23 种挥发性化学成分，其中 2-羟基-6-甲基苯甲酸甲酯、邻氨基苯甲酸甲酯和蜂蜜曲菌素为各个时期中共有且含量最高的物质，其相对含量在不同时期存在差异。**【结论】** 日本弓背蚁雄蚁上颚腺在羽化初期分泌活动水平最高，随着年龄增长逐渐衰退，分泌物化学成分的功能还有待于进一步的验证。

关键词 社会性昆虫；上颚腺；外分泌腺；超微结构；化学通讯

Comparative study of the ultrastructure and chemical composition of the mandibular gland of male *Camponotus japonicus* Mayr at different ages

WANG Xiao-Lei** XU Wen-Jing HE Hong***

(Department of Forestry, Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration for Control of Forest Biological Disasters in Western China, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract **[Objectives]** To investigate the potential function of the mandibular gland of male *Camponotus japonicus* Mayr, which have the most developed mandibular glands among all castes of this species. **[Methods]** The morphology, surface ultrastructure and internal characteristics of secretory cells of the mandibular glands of male ants at different ages were observed using a light microscope (LM), a scanning electron microscope (SEM) and a transmission electron microscope (TEM). Volatile mandibular gland secretions were extracted with n-hexane and analyzed using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **[Results]** (1) The mandibular glands of males consist of a cluster of secretory cells and a reservoir. Each cluster of secretory cells contains a secretory cell and a conducting cell. The total length of the mandibular gland, reservoir length and the diameter of secretory cells, were largest in the 1st month after eclosion. Secretory cells were initially

*资助项目 Supported projects：国家自然科学基金项目（No.32071490）

**第一作者 First author，E-mail：2019050620@nwafu.edu.cn

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：hehong@nwafu.edu.cn

收稿日期 Received：2022-02-21；接受日期 Accepted：2022-05-11

moist, full and smooth, but became progressively less so as males aged. (2) The cytoplasm of secretory cells contains a lot of organelles, such as mitochondria, endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, lipid droplets, other granular secretions and developed end apparatus. From the 1st to 4th month after eclosion, secretory cells have a low density of secretory granules, secretory vesicles gradually become more abundant and mitochondria surround the nucleus and microvilli. From the 8th to 9th month after eclosion, mitochondria become scattered among the nucleus, microvilli and secretory granules, the density of secretory granules increases, secretory vesicles disappear, and the cells began to disintegrate. (3) GC-MS analysis indicates that the least quantity of secretions was emitted during the 3rd month after eclosion and the most during the 9th month. A total of 23 volatile chemical components were identified, of which 2-hydroxy-6-methylbenzoate, Methyl anthranilate and (-)-Mellein were the most common in each period. The relative amounts of these three chemicals varied with age. **[Conclusion]** The secretory activity of the mandibular gland of male *C. japonicus* is highest in the initial stage of emergence, and gradually decreases with age. Determining the biological function of the chemicals secreted requires further investigation.

Key words social insects; mandibular gland; exocrine glands; ultrastructure; chemical communication

蚂蚁是膜翅目 Hymenoptera 蚁科 Formicidae 昆虫的统称，是进化最为成功的社会性昆虫，同时也是陆地生态系统中种类和数量最为丰富的动物类群，拥有复杂的化学通讯模式和社会组织（吴坚和王常禄，1995）。遍布蚂蚁全身的外分泌腺能合成和释放丰富的化学信息物质，构成复杂的化学通讯网络，调控巢群的发育、觅食、亲系识别和品级分化等，发挥失踪、防御、召集、性吸引等重要功能（Hölldobler and Wilson，1990）。迄今已在蚂蚁体内发现 84 种外分泌腺（Billen，2015），仍不断有新的外分泌腺被报道（Billen *et al.*，2015；Xu *et al.*，2021）。大量研究表明外分泌腺的形态和分布在蚂蚁主要类群间变化很大，同种腺体也随蚂蚁种类、品级分化和劳动分工不同而产生形态结构和化学物质组成方面的差异，从而发挥不同的功能（Hughes *et al.*，2001；Torres *et al.*，2001；Wood *et al.*，2002；Francelino *et al.*，2006；Niculita *et al.*，2007；Billen and Al-Khalifa，2018；Brückner *et al.*，2018）。上颚腺是蚂蚁头部主要的外分泌腺，可分泌、贮存和释放多种化学物质，在工蚁品级中主要具有告警和防御功能（Wilson and Regnier，1971；Blum *et al.*，1971），而在雄蚁及带翅雌蚁中多与性信息素的分泌关系密切（Brand *et al.*，1973；Topoff and Greenberg，2008）。也有研究发现上颚腺的形态及超微结构会随着工蚁或蚁后年龄的增加而产生相应的变化，一般呈现从发达到退化甚至消失的趋势（Brough, 1977；Boonen *et al.*，2013）。

日本弓背蚁 *Camponotus japonicus* 为弓背蚁属中个体较大的种类，是亚洲的代表性广布种，其种群数量高、生态适应性强（王常禄和吴坚，1992）。尤其该种蚂蚁存在较为明显的行为多型和品级分化现象，包括蚁后、带翅雌蚁、雄蚁、大工蚁和小工蚁几个品级，是研究蚂蚁行为生态学的理想种类（戴德纯等，1986；尹绍纮和杨灵芝，1986；吴坚和王常禄，1995；高文韬等，2005）。雄蚁主要职能是参与生殖，一般在蚁巢中存在的时间最短，但是在日本弓背蚁中，成熟蚁巢中于每年秋季 8 月下旬出现带翅雄蚁，直到翌年 5-7 月才进行婚飞交配，然后死亡，这与其他蚂蚁种类明显不同（吴坚和王常禄，1995；高文韬等，2005）。关于日本弓背蚁外分泌腺的研究目前主要涉及不同品级腹部的毒腺、杜氏腺与雄蚁生殖附腺的形态及化学成分分析（李长有等，2016；Zhou *et al.*，2018）。近期对其不同品级的头部腺体进行比较形态学研究时新发现了两个与下唇和下颚相连的两个新的小腺体——后颏基腺（Postmentum base gland）和下颚柄节基腺（Stipes base gland）（Xu *et al.*，2021），同时发现上颚腺在雄蚁中最为发达，其分泌细胞数量是其他品级的 5-10 倍（Xu *et al.*, 2023），这意味着上颚腺在日本弓背蚁雄蚁的化学通讯中发挥更为重要的作用。那么在雄蚁从出现直至其婚飞间长达 10 个月的时间里，随着年龄的增加，其上颚腺的形态、超微结构和分泌物成分会产生怎样的变化趋势，是否与其婚飞活动密切相关值得深入研究。

因此，本文以羽化初期至婚飞交配前的雄蚁为研究对象，采用光学显微镜（Light microscope，LM）、扫描电子显微镜（Scanning electron microscope，SEM）和透射电子显微镜（Transmission electron microscope，TEM）观察日本弓背蚁不同年龄雄蚁上颚腺的整体形态、超微结构，利用气相质谱-色谱联用分析技术（GC-MS）分析雄蚁上颚腺分泌物挥发性成分在不同年龄阶段的变化趋势，旨在揭示不同年龄日本弓背蚁雄蚁上颚腺结构和化学成分的变化规律，为更深入了解蚂蚁外分泌腺的功能及其通讯行为提供更多信息。

1　材料与方法

1.1　日本弓背蚁采集、饲养及腺体样品准备

在陕西省杨凌地区，于 2020 年 9 月从野外采集出现雄蚁的日本弓背蚁蚁巢 3 个，带回实验室用黄粉虫和蜂蜜水饲喂。选取 7 个时间点（当年 9 月、10 月、11 月、12 月和翌年 3 月、4 月、5 月）取样解剖上颚腺，进行腺体形态、超微结构及化学成分分析。对应雄蚁出现和存活的时间，将这 7 个时间点采集的样品分别标记为雄蚁羽化第 1、2、3、4、7、8、9 个月。

1.2　上颚腺解剖

先将雄蚁置于 - 20 ℃冰箱中冷冻 10 min 使其昏迷；用解剖刀切取蚂蚁头部，置于盛有林格氏液（制备方法：NaCl 7.05 g，KCl 10.35 g，$CaCl_2$ 0.21 g，$NaHCO_3$ 0.25 g，加入 1 L 蒸馏水溶解）的培养皿中；在体视显微镜（SMZ 1500，Nikon）下小心解剖出完整的上颚腺，置于盛有 2.5%戊二醛固定液（pH=7.2）的 1.5 mL 离心管中，用于后续光学显微镜观察，以及扫描电镜和透射电镜制样。

1.3　上颚腺整体形态及超微结构观察

1.3.1　光镜观察　在 Nikon SMZ 1500 体视显微镜下观察记录不同年龄雄蚁上颚腺的腺体结构、形状和颜色，测量整个腺体及其储存囊长度。每个蚁巢每次 5 个样品。

1.3.2　扫描电镜制样及观察　将解剖出的上颚腺放入盛有 2.5 %戊二醛固定液（pH=7.2）的 1.5 mL 离心管中，放置于 4 ℃冰箱固定 12 h；小心吸出管中固定液，用 PBS 缓冲液（0.1 mol/L，pH=7.2）冲洗样品 4 次，每次 10 min；然后分别用 30%、50%、70%、80%、90%乙醇对样品梯度脱水，每个梯度 15 min，再用 100%乙醇脱水 3 次，每次 30 min；脱水后在 CO_2 临界点下干燥；将干燥后的样品粘在覆有导电胶的粘台上，离子溅射仪（E-1045 型，日本 Hitachi 公司）喷金，最后在扫描电镜（S-3400 型，日本 Hitachi 公司）下对样品观察并拍照。每个蚁巢每次 3 个样品。

1.3.3　透射电镜制样及观察　将解剖出的上颚腺放入盛有 2.5%戊二醛固定液（pH=7.2）的 1.5 mL 离心管中，放置于 4 ℃冰箱中保存至少 12 h；吸出固定液，用 PBS 缓冲液（0.1 mol/L，pH=7.2）冲洗样品 5 次，每次 20 min；在 1%锇酸溶液中固定 2 h，用 PBS 缓冲液冲洗样品 5 次，每次 20 min；分别用 30%、50%、70%、80%、90%浓度乙醇对样品进行梯度脱水，每个梯度 15 min，再用 100%乙醇脱水 3 次，每次 30 min；然后依次以乙醇与包埋剂 LR-White 3∶1（4 h）、1∶1（8 h）、1∶3（12 h）、3∶1（4 h）、纯包埋剂（24 h）比例对样品进行渗透；将渗透好的样品置于盛有纯包埋剂的胶囊中，放于 60 ℃烘箱中聚合 48 h。利用超薄切片机（LKB2088 microtome，德国 Leica 公司）将样品切成 70 nm 厚的超薄切片，将切片置于铜网上，滴加乙酸双氧铀和柠檬酸铅进行双重染色，在干燥箱中干燥后在透射电镜下（HT-7700 型，日本 Hitachi 公司）观察并拍照。

1.3.4　制作半薄切片　按照透射电镜制样方法，将整个雄蚁的头部进行固定和乙醇梯度脱水，将头部包埋在环氧树脂（Araldite）中，在超显微切片机（EM UC6 型，德国 Leica 公司）下用金刚石刀将组织切成 1 μm 的半薄切片，用亚甲基蓝对切片进行染色，在光学显微镜下观察上颚腺在头部的分布位置及整体形态。

以上制样方法中，扫描电镜参考 Wang 等（2019）制样方法，透射电镜及超薄切片技术参

考 Billen 等(2016)及 Billen 和 Al-Khalifa(2018) 的制样方法。

1.4 GC-MS 分析

将单只雄蚁的 2 个上颚腺作为一个实验样品，放入盛有 50 μL 正己烷的进样瓶中，室温下萃取 2 h，用针挑出上颚腺残体后将进样瓶放入 - 80 ℃冰箱中保存备用，每个年龄阶段 9 个样品重复（每个蚁巢每次 3 个样品），并用正己烷作为空白对照。

在气相色谱仪 TRACE 1310（Thermo Scientific，Waltham，MA，USA）上进行上颚腺样品化学成分分析。色谱柱 DB-5MS（30 m × 0.25 mm × 0.25 μm），自动进样器 TriPlus RSH Autosampler，Xcalibur 2.2 软件控制的 ISQ 单四级质谱仪。进样口温度 300 ℃，分流速度 50 mL/min。载气为高纯度氦气（99.999%），载气速度 1.0 mL/min。起始色谱柱温度 40 ℃保持 2 min，再以 8 ℃/min 升至 320 ℃保持 5 min。接口温度和离子源温度均为 280 ℃，质量扫描范围 45-500 m/z，质谱扫描为 EI 电离模式。

获得离子流图和质谱图，采用人工解析及 NIST05 标准谱库检索定性；参照空白对照扣除杂质后根据 $M_{i,j}=A_{i,j}/A_{s,j}$ 计算各组分相对百分含量，进一步定量分析挥发性成分，其中，$M_{i,j}$ 为 i 组分峰面积与供试样品 j 的总峰面积之比，$A_{i,j}$ 为供试样品 j 的 i 组分峰面积，$A_{s,j}$ 为供试样品 j 的所有组分峰面积（李可，2020）。数据应用 SPSS.26 软件（IBM，USA)进行单因素方差分析，采用 Duncan's 新复极差法进行多重比较（P<0.05）。

2 结果与分析

2.1 雄蚁上颚腺整体结构及表面形态

从雄蚁头壳横切面半薄切片可以看出，上颚腺位于头部两侧，与上颚相连，成对存在（图 1：

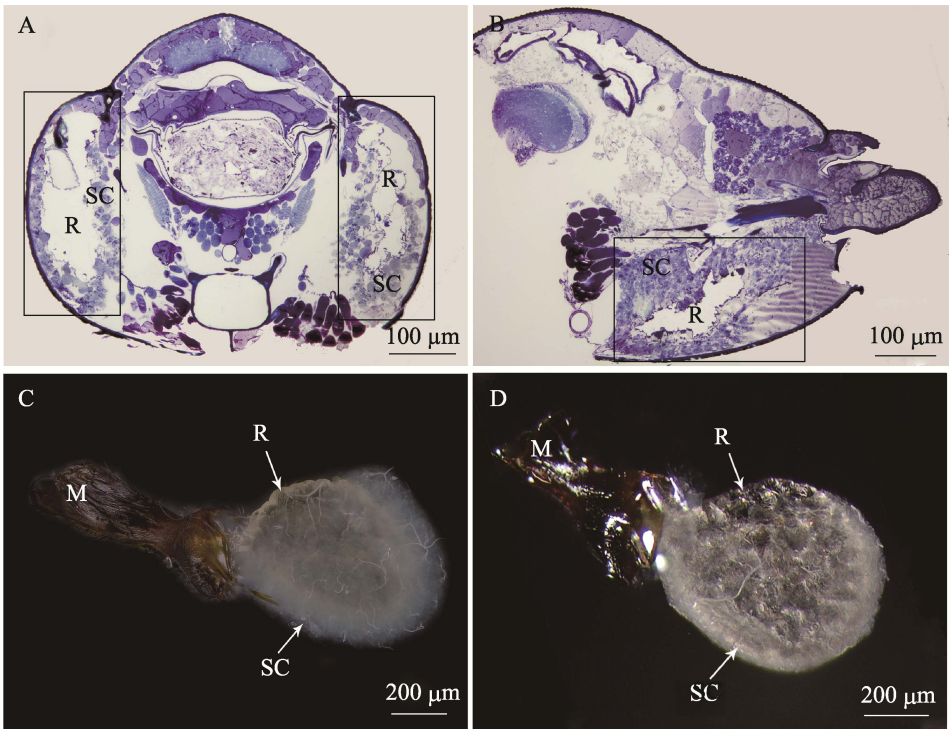

图 1 日本弓背蚁雄蚁上颚腺整体形态

Fig. 1 The general morphology of mandibular gland in *Camponotus japonicus* males

A. 雄蚁头部横截面；B. 雄蚁头部纵截面；C. 羽化第 1 个月的上颚腺；D. 羽化第 9 个月的上颚腺。M：上颚；R：储存囊；SC：分泌细胞单元。

A. Cross-section through a male's head; B. Longitudinal-section through a male's head; C. Mandibular gland at 1st month after eclosion; D. Mandibular gland at 9th month after eclosion. M: Mandibular; R: Reservoir; SC: Secretory cell units.

A，B）。上颚腺由一簇分泌单元和储存囊两部分组成，每个分泌单元又包含 1 个分泌细胞和 1 个导管细胞，分泌单元乳白色，半包裹黄色透明的储存囊（图 1：C，D）。刚羽化第 1 个月的雄蚁，其上颚腺看起来饱满湿润，上颚腺及其储存囊总长度分别为（891.51±88.49）μm 和（746.47±76.76）μm（图 1：C）；羽化第 9 个月即将婚飞时，上颚腺及其储存囊总长度缩小至（667.33±93.80）μm 和（617.95±75.15）μm（图 1：D）。整体上看，随着雄蚁年龄增加，其上颚腺逐渐缩小，腺体分泌细胞皱缩，失去活力。

扫描电镜结果显示，羽化第 1-5 个月的雄蚁，其上颚腺分泌细胞圆形饱满，表面光滑，细胞间排列紧密，有气管相连，单个分泌细胞直径约（25.26±2.58）μm（图 2：A-C）；随着年龄的增加，至羽化第 7 个月时分泌细胞逐渐皱缩，形状不规则，细胞间隙增大，到羽化第 9 个月时，分泌细胞大部分已干瘪，直径约（14.25±2.35）μm（图 2：E-F）。整体上看，上颚腺分泌细胞大小随着雄蚁年龄的增加逐渐下降、衰退，失去活力（图 3）。

2.2　雄蚁上颚腺超微结构

从透射电镜图片可以看出，储存囊壁由一层厚度均匀的角质层构成，囊壁褶皱状，具有极大的收缩性（图 4：A）。

分泌细胞紧密相连，相互挤压，造成形状不规则；每个分泌细胞内有一个大的圆形、卵圆形或不规则形状的细胞核，细胞质中分布有滑面内质网、粗面内质网、高尔基体、大量脂滴和分泌颗粒、丰富的线粒体以及发达的末端结构；线粒体呈长条形、圆形或不规则形状；脂滴与分泌颗

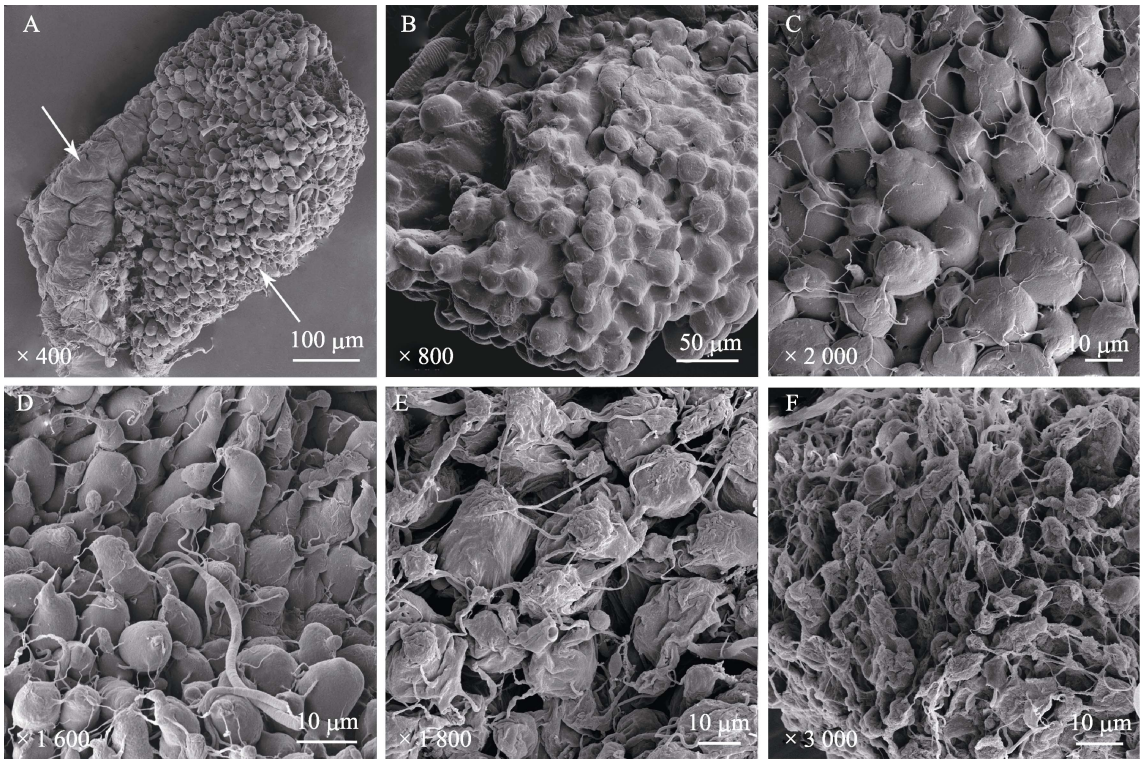

图 2　不同年龄雄蚁上颚腺分泌细胞扫描电镜图

Fig. 2　Scanning electron microscopy of secretory cells of mandibular gland in males at different ages

A. 上颚腺扫描电镜图，上面箭头指储存囊，下面箭头指分泌细胞；B. 羽化第 1 个月；C. 羽化第 2 个月；D. 羽化第 7 个月；E. 羽化第 8 个月；F. 羽化第 9 个月。

A. Scanning electron microscopy of mandibular glands, the upper arrow is the reservoir, and the lower arrow is the secretory cell; B. The 1st month after eclosion; C. The 2nd month after eclosion; D. The 7th month after eclosion; E. The 8th month after eclosion; F. The 9th month after eclosion.

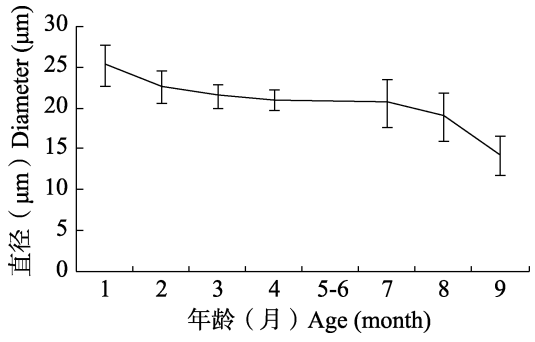

图 3　不同年龄雄蚁上颚腺分泌细胞直径变化趋势图
Fig. 3　Variation trend of secretory cell diameter of male mandibular gland at different ages

粒多分布于细胞外缘；末端结构是导管细胞末端膨大形成的用于与分泌细胞相连接的结构，非常发达，其周围的微绒毛排列紧密，末端结构的功能是将分泌细胞产生的分泌物通过导管细胞输入贮存囊中保存（图 4：B-E）。

随着雄蚁年龄的增加，上颚腺储存囊角质层厚度无明显变化，但分泌细胞的细胞结构和分泌物数量发生了明显的变化。羽化第 1-4 个月时，分泌细胞的细胞质中线粒体丰富，多为长条形，围绕细胞核和末端结构微绒毛周围，末端结构微绒毛发达；分泌颗粒密度较低，零星分布于边缘；其中羽化第 1 个月时无分泌囊泡，羽化第 2 个月时有零星分布，羽化第 3-4 个月时分泌囊泡大量分布（图 4：F-I）。随着年龄增加，羽化第 7 个月时，分泌颗粒数量明显增多，密度增大，但分泌囊泡缺失；线粒体分布于细胞核和末端结构周围及分泌颗粒间（图 4：G）。至羽化第 8 个月和第 9 个月时，细胞质中分泌颗粒密度增加，线粒体数量减少，细胞壁极不规则，细胞体积变小，质核比变大（图 4：K，L），不同年龄间分泌颗粒直径无明显变化（图 5）

2.3　不同年龄雄蚁上颚腺挥发性化学成分分析

GC-MS 分析结果表明，羽化 1 个月时上颚腺分泌物总峰面积为 1.72×10^{10}，随着雄蚁年龄增加，分泌物总峰面积迅速下降，羽化第 2 个月时总峰面积为 0.90×10^{10}，至羽化第 3 个月时总峰面积最小，为 0.30×10^{10}，然后又开始上升，至羽化第 7 个月时总峰面积 1.85×10^{10}，羽化第 8 个月时稍有下降，为 1.60×10^{10}，至羽化第 9 个月时（翌年 5 月即将婚飞时）总峰面积达到最高，为 2.02×10^{10}（图 6）。

从 7 个年龄阶段雄蚁上颚腺分泌物中共检测到 23 种化学物质，包括烃类（8 种）、酯类（5 种）、酮类（5 种）、醇类（3 种）、酸类（1 种）和酚类（1 种）（表 1）。从化合物种类组成上看，随着雄蚁年龄的增加，上颚腺分泌物化学成分的多样性呈现一定的变化，其中羽化第 1-4 个月时，化学物质有 11-14 种，至羽化第 7 个月和第 8 个月时挥发物质种类最为丰富，达到 17 种，至羽化第 9 个月即将婚飞时又降至 13 种。

在 7 个年龄阶段中共有的化学成分有 7 种，分别是（Z）-1,1-二甲氧基-9-十八碳烯、角鲨烯、2-羟基-6-甲基苯甲酸甲酯、邻氨基苯甲酸甲酯、蜂蜜曲菌素、2-十五烷酮和间甲酚。其中，2-羟基-6-甲基苯甲酸甲酯相对含量为 50.89%-62.48%，是雄蚁上颚腺的优势化学物质；其次是邻氨基苯甲酸甲酯，相对含量为 12.28%-21.66%，蜂蜜曲菌素为 10.75%-16.26%，间甲酚为 1.85%-5.41%。其余物质的相对含量较低，分散出现在雄蚁不同年龄阶段的上颚腺分泌物中。多重比较分析结果表明，仅部分化学成分的相对含量在不同年龄间具有显著差异（$P<0.05$）。

3　讨论

上颚腺是蚂蚁头部最主要的外分泌腺之一，根据 Noirot 和 Quennedey（1974）提出的昆虫腺体分类标准，上颚腺属于 3 型腺体，通常由一簇分泌单元和储存囊构成，每个分泌单元又包含分泌细胞和导管细胞；导管细胞由角质层和细胞核组成，与分泌细胞相连的一端膨大呈表面覆盖微绒毛的末端结构，另一端与储存囊相连；储存囊的末端是腺体总导管，与上颚相连；分泌物通过靠近上颚基部的孔口释放出去（Billen，1991；Billen *et al.*，2016；Richter *et al.*，2021）。日本弓背蚁雄蚁的上颚腺形态与已报道的其它蚂蚁上颚腺相似，如法老蚁 *Myrmoteras iriodum*（Billen *et al.*，2016）和黑毛蚁 *Lasius niger*（Niculita *et al.*，2007）相似。本研究结果表明，上颚腺和储存囊长度、分泌细胞饱满程度和表面

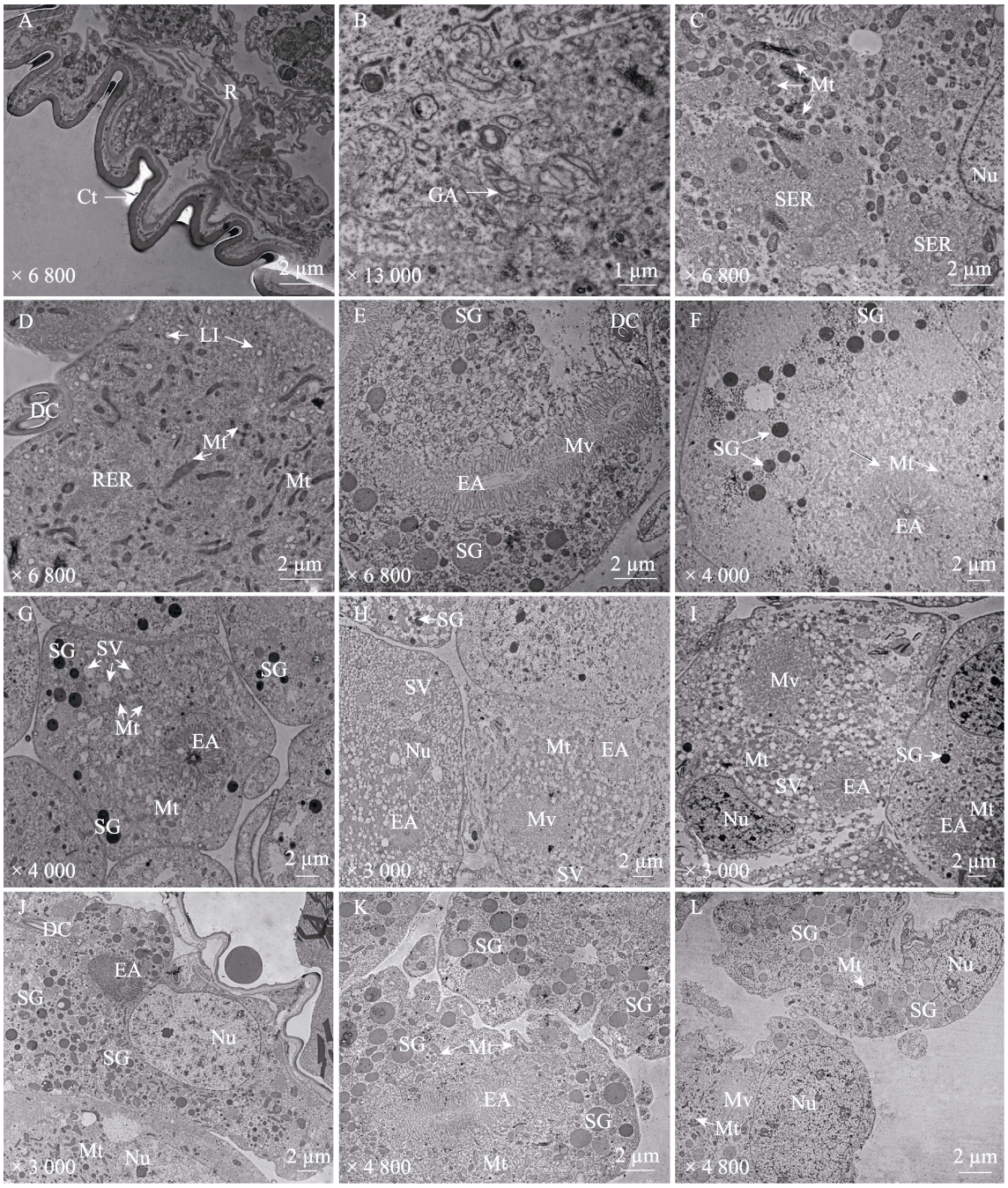

图 4　日本弓背蚁雄蚁上颚腺超微结构

Fig. 4　Ultrastructure of mandibular gland of *Camponotus japonicus* males

A. 褶皱的储存囊壁及内衬的角质层；B-E. 分泌细胞中细胞器及分泌物细节图；F-L. 不同年龄（分别是羽化第 1、2、3、4、7、8、9 个月）雄蚁上颚腺分泌细胞超微结构。Ct：角质层；GA：高尔基体；SER：滑面内质网；REA：粗面内质网；SG：分泌颗粒；SV：分泌囊泡；LI：液滴状分泌物；Mt：线粒体；EA：末端结构；Mv：微绒毛；Nu：细胞核；　Tr：气管；DC：导管。

A. Wrinkled reservoir wall, lined with thin cuticle; B-E. Details of organelles and secretions in secretory cells; F-L. Ultrastructure of secretory cells of mandibular gland of males at different ages. Ct: Cuticle; GA: Golgi apparatus; SER: Smooth endoplasmic reticulum; RER: Rough endoplasmic rreticulum; SG: Secretion granule; SV: Secretory vesicle; Li: Lamellar inclusions; Mt: Mitochondria; EA: End apparatus; Mv: Microvilli; Nu: Nucleus; V: Vacuolation; Tr: Trachea; DC: Duct cells.

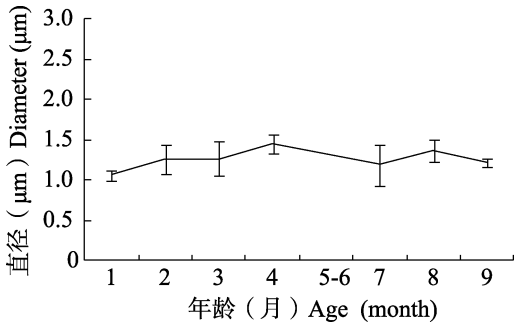

图 5 不同年龄雄蚁上颚腺分泌细胞中分泌颗粒直径变化趋势图

Fig. 5 Variation trend of secretion granule diameter of secretory cells of male mandibular gland at different ages

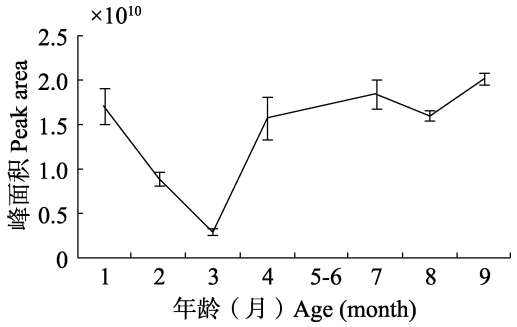

图 6 不同年龄雄蚁上颚腺挥发性成分 GC-MS 总峰面积变化趋势图

Fig. 6 Variation trend of GC-MS total peak area of volatile components in mandibular gland of male at different ages

直径均随着雄蚁年龄的增长逐渐下降，至婚飞时分泌细胞皱缩、体积减小、失去活力。Boonen 等（2013）研究法老蚁 *Monomorium pharaonis* 蚁不同年龄阶段上颚腺的形态变化规律，发现上颚腺整体大小、储存囊宽度、分泌细胞长度及宽度、细胞核直径均随年龄呈指数递减，认为蚁后上颚腺在其刚羽化时发育最好，这与本研究结果较为一致。

在透射电镜下观察分泌细胞超微结构，发现上颚腺存在发育良好的高尔基体和滑面内质网，这与上颚腺具有较高的脂类代谢活性和分泌信息素功能密切相关（Billen，1991）。上颚腺分泌细胞的细胞质中分布大量的线粒体，前期分布在细胞核及末端结构周围，羽化后期（第 7-9 个月），线粒体同时分布于分泌颗粒之间，且数量减少，这表明上颚腺羽化初期具有较高的代谢水平，但可能由于不同时间细胞内需要 ATP 区域不同，其分布发生转变。同时，随着年龄增长，分泌细胞中分泌物质形态发生转变，由分泌囊泡形成、丰富到消失，后期分泌颗粒数量增加，这可能与不同时期上颚腺发挥不同功能有关。羽化后期分泌细胞逐渐皱缩，线粒体数量减少，分泌物种类减少及分泌颗粒聚集，这说明上颚腺逐渐衰退，这与扫描电镜中观察到的分泌细胞状态相一致。

在上颚腺功能方面，许多研究表明蚂蚁的上颚腺分泌物具有报警、抑菌和亲系识别的作用，如 Brough（1978，1983）通过行为学观察发现丽蚁属 *Calomyrmex* 蚂蚁的上颚腺分泌物具有报警和抑菌功能；Bradshaw 等（1979）通过对织叶蚁 *Oecophylla longinoda* 工蚁上颚腺化学成分检测及行为测定，发现己醛、己醇、3-十一酮和 2-丁基-2-辛烯醛 4 种物质会使大工蚁产生警觉、吸引、撕咬等行为；Cammaerts 等（1982）研究发现 3 种红蚁（*Myrmica rubra*，*M. rugulosa* 和 *M. schencki*）工蚁的上颚腺分泌物对工蚁产生明显的吸引作用；Hernández 等（2002）发现 *Atta laevigata* 的工蚁对异巢蚂蚁上颚腺分泌物产生明显的攻击行为，具有亲系识别信息素的功能；Brückner 等（2018）在 6 种行军蚁属 *Eciton* 中检测到具有报警信息素功能的 4-甲基庚烷-3-酮；Pokorny 等（2020）证实了一种猛蚁 *Platythyrea punctata* 工蚁上颚腺的香茅醛和猕猴桃碱具有报警信息素的作用。

而在雄蚁中，通常认为上颚腺能产生性信息素，在婚飞交配时发挥作用。Hölldobler 和 Maschwitz（1965）发现广布弓背蚁 *Camponotus herculeanus* 雄蚁在离开巢穴婚飞时，上颚腺有内容物排出，这些释放的物质会触发雌蚁起飞，Hölldobler（1976）在收获蚁属 *Pogonomyrmex* 蚂蚁中也发现类似现象，但这些物质的具体成分未进行鉴定。随后 Fowler（1982）及 Alonso 和 Vander（1997）分别对切叶蚁和红火蚁 *Solenopsis invicta* 野外蚁巢进行观察，发现在将要婚飞的蚁巢中，工蚁聚集在巢口附近，表现出兴奋且有较强攻击性的状态，而雄蚁在巢口处等待婚飞，认为这是工蚁对雄蚁上颚腺分泌物的反应，从而使

表 1　日本弓背蚁不同年龄雄蚁上颚腺挥发性化学成分

Table 1　Volatile components of mandibular gland in males of *Camponotus japonicus* at different ages

化学名称 Designation	化学式 Formula	相对含量（%）Relative content (%)						
		1	2	3	4	7	8	9
烃类 Hydrocarbon								
(Z)-1,1-二甲氧基-9-十八碳烯 (Z)-1,1-dimethoxy-9-Octadecene	$C_{20}H_{40}O_2$	0.83±0.46 a	1.14±1.04 a	1.32±0.37 a	1.35±0.93 a	1.36±0.77 a	1.67±1.12 a	1.12±0.82 a
正二十四烷 Tetratriacontane	$C_{34}H_{70}$	0.49±0.31 a	–	–	0.24±0.15 a	0.36±0.24 a	0.28±0.24 a	0.30±0.20 a
角鲨烯 Squalene	$C_{30}H_{50}$	0.66±0.40 ab	0.69±0.65 ab	0.56±0.64 ab	0.13±0.14 b	0.88±0.62 a	0.25±0.38 b	0.21±0.12 b
2,7,10-三甲基-十二烷 2,7,10-trimethyl Dodecane	$C_{15}H_{32}$	–	–	0.21±0.13	–	–	–	–
1-碘-2-甲基十一烷 1-Iodo-2-methylundecane	$C_{12}H_{25}I$	–	–	0.08±0.04	–	–	–	–
7-已基-二十烷 7-hexyl-Eicosane	$C_{26}H_{54}$	–	0.08±0.05 a	–	–	0.10±0.08 a	–	–
2,6-二甲基-庚烷 2,6-dimethyl-Heptadecane	$C_{19}H_{40}$	–	0.09±0.07	–	–	–	–	–
十七烷 Heptadecane	$C_{17}H_{36}$	–	–	–	–	–	0.19±0.14	–
酯类 Esters								
水杨酸甲酯 Methyl salicylate	$C_8H_8O_3$	0.36±0.05 a	–	–	0.23±0.14 a	0.19±0.04 a	0.15±0.11 a	0.35±0.27 a
2–羟基-6-甲基苯甲酸甲酯 2-hydroxy-6-methyl-, methyl ester Benzoic acid	$C_9H_{10}O_3$	54.48±7.27 abc	50.89±5.66 c	53.15±9.00 ab	62.48±13.36 a	55.53±7.53 abc	60.46±7.58 ab	57.84±7.43 abc
邻氨基苯甲酸甲酯 Methyl anthranilate	$C_8H_9NO_2$	15.77±3.40 ab	21.66±9.55 a	17.67±7.73 ab	12.28±7.12 b	15.12±2.54 b	15.31±4.12 ab	15.78±4.15 ab
蜂蜜曲菌素(-)-Mellein	$C_{10}H_{10}O_3$	16.26±7.99 a	14.71±5.39 a	10.94±3.53 a	10.75±6.15 a	15.73±4.58 a	13.71±2.86 a	15.16±3.09 a
邻苯二甲酸二（2-丙基戊基）酯 Phthalic acid, di(2-propylpentyl) ester	$C_{24}H_{38}O_4$	–	–	–	–	0.12±0.11 a	0.19±0.14 a	–

续表 1 (Table 1 continued)

化学名称 Designation	化学式 Formula	相对含量（%）Relative content (%)						
		1	2	3	4	7	8	9
酮类 Ketones								
2-十七烷酮 2-Heptadecanone	$C_{17}H_{34}O$	1.14±0.46 a	–	–	1.15±0.43 a	0.05±0.02 b	1.32±0.66 a	1.07±0.46 a
2-十五烷酮 2-Pentadecanone	$C_{15}H_{30}O$	0.25±0.16 a	0.52±0.24 a	0.47±0.38 a	0.47±0.34 a	0.38±0.13 a	0.37±0.25 a	0.26±0.15 a
2-十九烷酮 2-Nonadecanone	$C_{19}H_{38}O$	0.34±0.22 b	1.69±0.64 a	1.41±0.17 a	-	0.17±0.07 b	0.14±0.04 b	0.16±0.05 b
3-十六烷酮 3-Hexadecanon	$C_{16}H_{32}O$	0.09±0.02 a	–	–	0.16±0.09 a	0.14±0.05 a	0.14±0.07 a	0.11±0.05 a
3-十七烷酮 3-Heptadecanone	$C_{17}H_{34}O$	–	–	–	–	0.05±0.02	–	–
酸类 Acids								
香叶酸 Geranic acid	$C_{10}H_{16}O_2$	4.20±0.56 a	1.13±0.75 b	–	3.35±1.94 a	3.19±1.51 a	3.90±1.05 a	4.46±1.30 a
醇类 Alcohols								
香叶基香叶醇 trans-Geranylgeraniol	$C_{20}H_{34}O$	0.08±0.05 a	0.11±0.05 a	–	–	0.08±0.04 a	0.10±0.04 a	–
反式-9-十六烯-1-醇 trans-9-Hexadecen-1-ol	$C_{16}H_{32}O$	–	0.15±0.17 a	0.07±0.03 a	–	–	–	–
2,6-二甲基-5-庚-1-醇 2,6-dimethyl-5-Hepten-1-ol	$C_9H_{18}O$	–	–	–	–	–	0.15±0.09	–
酚类 Phenolic								
间甲酚 3-methyl-Phenol	C_7H_8O	3.67±1.11 ab	1.85±0.62 b	4.56±1.87 ab	4.28±1.28 ab	4.71±1.35 ab	4.56±1.45 ab	5.41±1.64 a

“–”表示未检测到该化合物；1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 分别表示羽化第 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 个月；表中数据为平均值±标准差；同行数据后标有不同小写字母表示差异显著（P<0.05，Duncan’s 新复极差法检验）。

“–” means certain compound which not detected; 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 is the month after emergence; The data in the table are “mean ± standard deviation”; Same raw of data with different lowercase letters indicate, significant differences (P<0.05, Duncan’s multiple range test).

工蚁在婚飞群集时对雄蚁进行保护，并吸引雌蚁准备婚飞。Hernández 等（1999）分析了光滑芭切叶蚁 *Atta laevigata* 雄蚁婚飞前后上颚腺化学成分的变化，发现交配前后 4-甲基-3-庚酮和 4-甲基-3-庚醇相对比例发生转换，且有新的物质 4-甲基-3-己酮产生，认为物质比例的转变以及新物质的产生都与婚飞有关。Bento 等（2007）进一步分析了切叶蚁 *Atta sexdens rubropilosa* 工蚁对未交配雄蚁和带翅雌蚁上颚腺分泌物反应，发现工蚁对未交配雄蚁分泌的 4-甲基-3-庚醇和 4-甲基-3-庚酮天然混合物产生兴奋和攻击性反应，但对带翅雌蚁的分泌物反应较小。

本研究中从不同年龄阶段的日本弓背蚁雄蚁上颚腺分泌物中检测到 23 种化学物质，包括酯、烃、酮、酸、醇和酚类物质。其中 2-羟基-6-甲基苯甲酸甲酯相对含量最高，是雄蚁上颚腺的优势化学物质，其次是邻氨基苯甲酸甲酯、蜂蜜曲菌素和间甲酚，这几种物质在不同年龄雄蚁的上颚腺中相对含量差异不明显。邻氨基苯甲酸甲酯和蜂蜜曲菌素亦在其它蚂蚁体内检测到，并确定其具有踪迹信息素的功能，如 Brand 等（1973）首次从 3 种弓背蚁（*Camponotus herculeanus*、*C. ligniperda* 和 *C. pennsylvanicus*）雄蚁的上颚腺中检测到蜂曲菌素；随后 Kern 等（1997）在亮毛收获蚁 *Lasius fuliginosus* 工蚁的后肠中检测到蜂蜜曲菌素，并鉴定其有踪迹信息素的作用；Torres 等（2001）在 *Camponotus ramulorum* 雄蚁的全身提取物的挥发性成分中也检测到蜂蜜曲菌素。Oldham 等（1994）在一种双节行军蚁 *Aenictus* sp.工蚁臀板腺中检测到邻氨基苯甲酸甲酯，并鉴定其有踪迹信息素的作用。因此，日本弓背蚁雄蚁上颚腺中的邻氨基苯甲酸甲酯和蜂蜜曲菌素可能具有踪迹信息素的功能，但 2-羟基-6-甲基苯甲酸甲酯作为日本弓背蚁雄蚁上颚腺的优势化学成分，迄今还未在蚂蚁甚至其它膜翅目昆虫中检测到，其功能还需结合行为学试验进行确定。

此外，我们也在野外观察日本弓背蚁婚飞时工蚁、雄蚁和雌蚁在巢口的行为反应，雄蚁的交配飞行模式是聚集型，大量雄蚁和带翅雌蚁聚集在蚁巢洞口，同时工蚁活动频繁并且好斗，但这些活动与上颚腺分泌物中的哪些物质有关还需进一步的研究。此外，雄蚁主要化学物质组成没有表现出随年龄变化的明显特征，意味着这些物质不仅仅是雄蚁婚飞时期的指示信息素，也可能参与雄蚁在蚁巢中的一些活动，如获得工蚁的保护、饲喂等，或提供雄蚁自身的营养供给。这有待进一步通过行为学的试验揭示上颚腺分泌物在日本弓背蚁雄蚁中的功能。

参考文献 (References)

Alonso LE, Vander MRK, 1997. Source of alate excitant pheromones in the red imported fire ant *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Insect Behaviour*, 10(4): 541–555.

Bento MJS, Della Lucia TMC, Do Nascimento RR, Bergmann J, Morgan ED, 2007. Response of workers of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) to mandibular gland compounds of virgin males and females. *Physiological Entomology*, 32(3): 283–286.

Billen J, 1991. Ultrastructural organization of the exocrine glands in ants. *Ethology Ecology & Evolution*, 3(1): 67–73.

Billen J, 2015. Insect exocrine glands. *Arthropod Structure and Development*, 44(1): 399–400.

Billen J, Mandonx T, Hashim R, Ito F, 2015. Exocrine glands of the ant *Myrmoteras iriodum*. *Entomological Science*, 18(2): 167–173.

Billen J, Hashim R, Ito F, 2016. Ultrastructure of the mandibular gland of the ant *Myrmoteras iriodum*. *Arthropod Structure & Development*, 45(4): 320–324.

Billen J, Al-Khalifa M, 2018. Morphology and ultrastructure of the mandibular gland in the ant *Brachyponera sennaarensis* (Hymenoptera, Formicidae). *Micron*, 104(1): 66–71.

Blum MS, Doolittle RE, Beroza M, 1971. Alarm pheromones: Utilization in evaluation of olfactory theories. *Journal of Insect Physiology*, 17(12): 2351–2361.

Boonen S, Eelen D, Børgesen L, Billen J, 2013. Functional morphology of the mandibular gland of queens of the ant *Monomorium pharaonis* (L.). *Acta Zoologica*, 94(4): 373–381.

Brand JM, Fales HM, Sokoloski EA, MacConnell JG, Blum MS, Duffield RM, 1973. Identification of mellein in the mandibular gland secretions of carpenter ants. *Life Sciences*, 13(3): 201–211.

Bradshaw JWS, Baker R, Howse PE, 1979. Multicomponent alarm pheromones in the mandibular glands of major workers of the African weaver ant, *Oecophylla longinoda*. *Physiol. Entomol.*, 4(1): 15–25.

Brough EJ, 1977. The morphology and histology of the mandibular gland of an Australian species of *Calomyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). *Zoomorphologie*, 87(1): 73–86.

Brough EJ, 1978. The multifunctional role of the mandibular gland secretion of an Australian desert ant, *Calomyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). *Zeitschrift für Tierpsychologie*, 46(3): 279–297.

Brough EJ, 1983. The antimicrobial activity of the mandibular gland secretion of a formicine ant, *Calomyrmex* sp. (Hymenoptera:

Formicidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 42(3): 306–311.

Brückner A, Hoenle PO, Beeren CV, 2018. Comparative chemical analysis of army ant mandibular gland volatiles (Formicidae: Dorylinae). *Peerj*, 6(3): 6e5319.

Cammaerts MC, Evershed RP, Morgan ED, 1982. Mandibular gland secretions of workers of *Myrmica rugulosa* and *M. schencki*: Comparison with four other *Myrmica* species. *Physiological Entomology*, 7(2): 119–125.

Dai DC, Wang ZW, Li JH, Ge BW, Xu JS, Zheng HQ, 1986. Study on *Camponotus japonicus* Mayr and its control on pine caterpillar. *Forest Pest and Disease*, 5(1): 4–6. [戴德纯, 王振威, 李桂和, 葛葆蔚, 徐进生, 郑红旗, 1986. 日本木工蚁及其对松毛虫控制作用的研究. 森林病虫通讯, 5(1): 4–6]

Fowler HG, 1982. Male induction and function of workers' excitability during swarming in leaf-cutting ants (*Atta* and *Acromyrmex*) (Hymenoptera: Formicidae). *International Journal of Invertebrate Reproduction*, 4(5): 333–335.

Francelino MR, Mendonça AL, Do Nascimento RR, Sant'ana AEG, 2006. The mandibular gland secretions of the leaf-cutting ants *Atta sexdens sexdens* and *Atta opaciceps* exhibit intercaste and intercolony variations. *Journal of Chemical Ecology*, 32(3): 643–656.

Gao WT, Meng QF, Liu S, 2005. Bionomics of *Camponotus japonicus* Mayr. *Journal of Forest Pest and Disease,* 24(4): 26–28. [高文韬, 孟庆繁, 刘思, 2005. 日本弓背蚁的生物学特性. 中国森林病虫, 24(4): 26–28.]

Hernández JV, Cabrera A, Jaffe K, 1999. Mandibular gland secretion in different castes of the leaf-cutter ant *Atta laevigata*. *Journal of Chemical Ecology*, 25(11): 2433–2444.

Hernández JV, López H, Jaffe K, 2002. Nestmate recognition signals of the leaf-cutting ant *Atta laevigata*. *Journal of Insect Physiology*, 48(3): 287–295.

Hughes WO, Howse PE, Goulson D, 2001. Mandibular gland chemistry of grass-cutting ants: Species, caste, and colony variation. *Chemical Ecology*, 27(1): 109–124.

Hölldobler B, Maschwitz U, 1965. Der hochzeitsschwarm der rossameise *Camponotus herculeanus* L. (Hym. Formicidae). *Zeitsehrift für Vergleiehende Physiologie*, 50(5): 551–568.

Hölldobler B, 1976. The behavioral ecology of mating in harvester ants (Hymenoptera: Formicidae: *Pogonomyrmex*). *Behavioral Ecology Sociobiology*, 1(4): 405–423.

Hölldobler B, Wilson EO, 1990. The Ants. Cambridge: Belknap Press of Harvard. 227–296.

Kern F, Klein RW, Janssen E, Bestmann HJ, Attygalle AB, Schäfer D, Maschwitz U, 1997. Mellein, a trail pheromone component of the ant *Lasius fuliginosus*. *Journal of Chemical Ecology,* 23(3): 779–792.

Li CY, Wang YG, He H, 2016. The male internal reproductive system, including chemical compounds, of the carpenter ant *Camponotus japonicus* Mayr. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 53(5): 1118–1123. [李长有, 王云果, 贺虹, 2016. 日本弓背蚁雄蚁生殖系统结构及其化学组成研究. 应用昆虫学报, 53(5): 1118–1123.]

Li K, 2020. Identification of host plant volatiles and pheromones and their electroantennogram responses of *Bactrocera minax*. Master dissertation. Shaanxi: Northwest A&F University. [李可, 2020. 柑橘大实蝇寄主植物挥发物和信息素的鉴定及其对触角电位反应研究. 硕士学位论文. 陕西: 西北农林科技大学.]

Noirot C, Quennedey A, 1974. Fine structure of insect epidermal glands. *Annual Review of Entomology*, 19: 61–80.

Niculita H, Billen J, Keller L, 2007. Comparative morphology of cephalic exocrine glands among castes of the black ant *Lasius niger*. *Arthropod Structure & Development*, 36(2): 135–141.

Oldham NJ, Morgan ED, Gobin B, Billen J, 1994. First identification of a trail pheromone of an army ant (*Aenictus* species). *Experientia*, 50(8): 763–765.

Pokorny T, Sieber LM, Hofferberth JE, Bernadou A, Ruther J, 2020. Age-dependent release of and response to alarm pheromone in a ponerine ant. *Experimental Biology*, 223(6): jeb.218040.

Richter A, Schoeters E, Billen J, 2021. Morphology and closing mechanism of the mandibular gland orifice in ants (Hymenoptera: Formicidae). *Morphology*, 282(8): 1127–1140.

Torres JA, Snelling RR, Blum MS, Flournoy RC, Jones TH, Duffield RM, 2001. Mandibular gland chemistry of four Caribbean species of *Camponotus* (Hymenoptera: Formicidae). *Biochemical Systematics & Ecology*, 29(7): 673–680.

Topoff H, Greenberg L, 2008. Mating behavior of the socially-parasitic ant *Polyergus Breviceps*: The role of the mandibular glands. *Psyche*, 95(1/2): 81–87.

Wang CL, Wu J, 1992. Study on population dynamics and reproductive law of *Camponotus japonicus* Mayr. *Journal of Beijing Forestry University*, 14(3): 69–74. [王常禄, 吴坚, 1992. 日本弓背蚁种群动态及繁殖规律的研究. 北京林业大学学报, 14(3): 69–74.]

Wang C, Billen J, Wei C, He H, 2019. Morphology and ultrastructure of the infrabuccal pocket in *Camponotus japonicus* Mayr (Hymenoptera: Formicidae). *Insectes Sociaux*, 66(4): 637–646.

Wilson EO, Regnier FE, 1971. The evolution of the alarm-defense system in the formicine ants. *The American Naturalist*, 105(943): 279–289.

Wood WF, Palmer TM, Stanton ML, 2002. A comparison of volatiles in mandibular glands from three *Crematogaster* ant symbionts of the whistling thorn acacia. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30(3): 217–222.

Wu J, Wang CL, 1995. The Ants of China. Beijing: Chinese Forestry Publishing House. 1–10, 181–182. [吴坚, 王常禄, 1995. 中国蚂蚁. 北京: 中国林业出版社. 1–10, 181–182.]

Xu W, He H, Billen J, 2021. Morphology of the exocrine glands associated with the maxillolabial complex in the ant *Camponotus japonicus* Mayr, 1866 (Hymenoptera: Formicidae). *Insectes Sociaux*, 68(1): 59–67.

Xu W, Zhang L, Ma R, Billen J, He H. 2023.Morphology and ultrastructure of the mandibular gland in *Camponotus japonicus*. *Arthropod Structure & Development*, 77: 101313.

Yin SH, Yang LZ, 1986. Preliminary observation on the morphology and living habits of *Camponotus japonicus* Mayr. *Chinese Bulletin of Entomology*, 23(5): 215–217. [尹绍竑, 杨灵芝, 1986. 大黑蚁的形态及生活习性的初步观察. 昆虫知识, 23(5): 215–217.]

Zhou Y, Li C, Billen J, He H, 2018. Morphology and ultrastructure of Dufour's and venom glands in the ant *Camponotus japonicus* Mayr (Hymenoptera: Formicidae). *Micron*, 104(1): 72–79.