

马尾松叶片挥发物组成及其对松墨天牛有触角电生理反应的活性成分鉴定*

赖 略¹ 邹学冰² 徐金柱³ 秦长生³
杨 华³ 田龙艳³ 张春花³ 邱华龙³

(1. 河源市森林病虫害防治服务中心, 广东 河源 517000; 2. 河源市源城区林业综合服务中心, 广东 河源 517000;
3. 广东省林业科学研究院 / 广东省森林培育与保护利用重点实验室, 广东 广州 510520)

摘要 为了明确马尾松 *Pinus massoniana* 叶片中吸引松墨天牛 *Monochamus alternatus* 的特定挥发性化合物, 利用 Y 型嗅觉仪测试了马尾松挥发物对松墨天牛的趋性, 应用 GC-MS 分析鉴定了马尾松叶片中挥发物的组成, 并使用 GC-EAD 筛选了能引起松墨天牛触角电生理反应的活性化合物。结果表明: 松墨天牛对马尾松挥发物具有较强的选择趋性; GC-MS 分析表明马尾松叶片中共有 22 个化合物, 其中萜烯类物质 14 种, 醇类物质 5 种, 羧酸类物质和酯类物质各 1 种, 以及 1 个未鉴定的化合物。在上述挥发物中, β -蒎烯的相对含量最高, 为 $(28.68 \pm 0.67)\%$, 其次为 α -蒎烯, 为 $(21.03 \pm 5.08)\%$; α -蒎烯、 β -蒎烯、 β -水芹烯、 β -石竹烯、D-吉玛烯以及乙酸龙脑酯 6 个化合物能引起松墨天牛雌雄成虫的触角电生理反应。

关键词 松墨天牛; EAG; 挥发物; 萜烯化合物

中图分类号: S782.42 文献标志码: A 文章编号: 2096-2053 (2022) 03-0148-06

Identification of Leaf Volatiles from *Pinus massoniana* and Antennal Electrophysiological Activity of Volatiles to *Monochamus alternatus*

LAI Lue¹ ZOU Xuebing² XU Jinzhu³ QIN Changsheng³
YANG Hua³ TIAN Longyan³ ZHANG Chunhua³ QIU Hualong³

(1. Forest Pest Control Service Center of Heyuan City, Heyuan, Guangdong, 517000, China; 2. Forestry Comprehensive Service Center of Yuancheng District of Heyuan City, Heyuan, Guangdong, 517000; 3. Guangdong Academy of Forestry/Guangdong Provincial Key Laboratory of Silviculture, Protection and Utilization, Guangzhou, Guangdong 510520, China)

Abstract In order to identify the specific volatile compounds that attract the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus* Hope, 1842 (Coleoptera: Cerambycidae), in the leaves of the Masson's pine, *Pinus massoniana*, the Y-type olfactometer was used to determine the attractive effect of volatile compounds of *P. massoniana* leaves and the composition in leaf volatiles of *P. massoniana* was analyzed and identified by GC-MS, as well as the active compounds that can cause the electrophysiological response of the antennae of Japanese pine sawyers were screened by GC-EAD. The results showed that the volatiles of Masson's pine could significantly attract adults of Japanese pine sawyers. GC-MS results showed that there were 22 compounds in the Masson's pine leaves, including 14 terpenoids, 5 alcohols, 1 carboxylic acid and 1 ester, as well as one unidentified

* 基金项目: 河源市科技计划项目 (河科 2021005)。

第一作者: 赖略 (1989—), 男, 工程师, 主要从事林业有害生物防控工作, E-mail: hy3379028@163.com。

通信作者: 邱华龙 (1988—), 男, 副研究员, 主要从事林业有害生物综合防治研究, E-mail: qiuhualong2008@163.com。

compound. Among the leafy volatiles, the relative percentage of β -pinene was the highest (28.68 ± 0.67)%, followed by α -pinene (21.03 ± 5.08)%; Six compounds of α -Pinene, β -Pinene, β -Carylene, β -Dianthus caryophyllene, D-gemonene and bornyl acetate could elicit the antennal electrophysiological responses of male and female adults of the pine sawyer. These results will provide a reference for the chemical mechanism of *M. alternatus* location for the host plant and the improvement of the attractant against Japanese pine sawyers.

Key words *Monochamus alternatus*; *Pinus massoniana*; EAG; Volatiles; Terpenoids

松墨天牛 *Monochamus alternatus* 是我国松林最为严重的一种病害松材线虫病的主要传播媒介之一^[1]。松墨天牛在广东主要危害马尾松 *Pinus massoniana*, 同时也危害云南松 *P. yunnanensis*、雪松 *Cedrus deodara* 以及黑松 *P. thunbergii* 等其它多种松科植物^[2]。松墨天牛幼虫可蛀食树干韧皮部及木质部, 阻断和破坏输导组织, 影响植物生长所需的水分和养分运输, 严重阻碍树木生长。此外, 松墨天牛成虫羽化后补充营养阶段造成的植物伤口促使松材线虫传入健康松树, 从而引发松材线虫病, 使松树发病继而枯死^[3-4]。松墨天牛成虫传播的松材线虫病是我国重大的林业植物疫情之一, 它能在较短时间内引发大面积松林感病和死亡, 对我国广大松林资源构成严重威胁。

对于松材线虫病的防治, 目前主要依靠人工方法及时清理病枯死松树, 并在松墨天牛羽化盛期喷洒噻虫啉等药剂防治这种媒介昆虫^[5-7]。这些防治方法需要投入巨大的人力、物力和财力, 虽然能暂时阻止松墨天牛的快速扩散蔓延, 但是不能有效对松材线虫进行长期的可持续控制。一旦财政经费投入减少, 松材线虫病又很快死灰复燃, 不断扩散蔓延。因此, 亟需探索研究其它防治方法对其进行可持续性控制。

天牛主要利用触角通过寄主植物释放的挥发物进行远距离定位寄主植物, 然后通过聚集信息素寻找配偶并进行交配繁殖^[8-9]。根据松墨天牛聚集信息素主要成分开发的松墨天牛引诱剂已在全国松墨天牛监测和防治中得到广泛应用。聚集信息素引诱剂中加入寄主植物信息素对天牛具有引诱活性的挥发物能够扩大对天牛的作用距离, 从而提高引诱剂的引诱效果^[8]。虽然利用松墨天牛聚集信息素十一烷氧基乙醇诱杀松墨天牛已得到广泛应用^[10], 但是目前马尾松挥发物中对松墨天牛具有生理活性的成份尚不清楚, 而且无添加到

引诱剂配方中的报道。因此, 本研究将分析鉴定马尾松叶片挥发物成份, 并测试挥发物成份对松墨天牛雌雄成虫的触角电生理反应, 以期增强现有松墨天牛诱芯的引诱活性提供参考。

1 材料与方法

1.1 松墨天牛采集与饲养

2021年4-10月在广东省河源市源城区松林内通过挂放松墨天牛诱捕器进行诱集成虫, 每天下午16:00时将诱集罐中的天牛放入养虫笼中带回实验室饲养。实验室饲养条件: 温度(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度(45 ± 5)%、光周期L:D=12h:12h。每天用新鲜的马尾松枝条饲喂。

1.2 松墨天牛对马尾松植物的偏好选择

使用自制的Y型嗅觉仪(主臂长30cm、分支臂长25cm、两分支臂角度120 $^{\circ}$, 内径5cm)测定松墨天牛对寄主植物马尾松的选择行为。将气泵进气口通过橡胶软管连接一根活性炭过滤管(内径6mm, 外径8mm), 吸附空气中的杂质。气泵出气口通过聚四氟乙烯管连接装有超纯水的洗气瓶, 对泵入的空气进行湿润。然后再用聚四氟乙烯管连接至装有寄主植物的气味瓶, 随后气味瓶再分别连接Y型嗅觉仪的两臂。在Y型嗅觉仪的柄端放入松墨天牛, 观察并记录松墨天牛对寄主植物气味的选择行为。选择标准为当试虫沿着柄端爬行到两臂交接处, 然后选择一臂超过臂长的1/2并且停留时间超过1min, 即判定为对该臂连接的寄主植物做出偏好选择; 如果试虫停留在嗅觉仪柄端处超10min, 但仍没做出选择, 则确定其为无反应。每15头虫作为一组, 测定一组试虫后用丙酮和蒸馏水冲洗后擦干, 继续测定, 总共测定4组。

1.3 马尾松叶片挥发物的提取与鉴定

将干净的马尾松嫩叶叶片30g放在正己烷

(HPLC 纯) 中, 浸泡 20 min 以收集叶片的挥发性物质, 用无水 Na_2SO_4 除去样品中的水分, 用带过滤尼龙膜的一次性移液针将液体样品转移到 2 mL 的棕色样品瓶内, 并用氮吹仪中的高纯氮气将样品浓缩至 200 μL , 保存在 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱内待用。用气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS: 安捷伦 7890B-5977B) 对样品化合物进行分析鉴定。

使用的气相色谱仪为安捷伦 7890B, 色谱柱型号为 HP-5ms 毛细管色谱柱, 色谱柱长度 * 内径 * 膜厚 = 0.25 mm * 30 m * 0.25 μm 。色谱柱柱流量为 1 mL/min, 载气为 99.999% 高纯氮气。进样口温度为 $220\text{ }^\circ\text{C}$, 不分流进样。柱箱程序升温程序为: $40\text{ }^\circ\text{C}$ 保留 2 min, 然后以 $15\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 $235\text{ }^\circ\text{C}$ 。后运行温度为 $270\text{ }^\circ\text{C}$, 时间为 6 min。

质谱条件为: 传输线温度 $280\text{ }^\circ\text{C}$, 离子源温度 $230\text{ }^\circ\text{C}$, 四级杆温度 $150\text{ }^\circ\text{C}$, 溶剂延迟 4 min, 离子扫描范围 50-500 m/z。使用 $\text{C}_7\text{-C}_{40}$ 的正构烷烃混合物标准品计算目标化合物的相对保留指数 (Retention Index, RI), RI 的计算公式参照文献中的公式计算^[11]。同时根据 NIST17 谱库中的特征离子碎片信息及化合物的保留指数对化合物进行鉴定。选取 Masshunter 软件中 NIST17 普库比对中匹配值最大的化合物 (匹配值需大于等于 85%) 为鉴定化合物, 当最大匹配度 < 85% 时, 将该化合物定性为未知化合物。对峰面积 > 最大峰面积的 1% 的目标峰进行积分, 并计算其相对百分含量。

1.4 松墨天牛对马尾松挥发物的触角电生理反应

用气象色谱-触角电位联用仪 (GC-EAD) 测试松墨天牛雌、雄成虫对寄主植物挥发物的触角电生理反应。气象色谱端的条件与上述 GC-MS 中的相同。利用 EAG 昆虫触角电位记录仪 (荷兰 Syntech 公司) 测定挥发物引起昆虫的触角电生理反应大小。首先沿松墨天牛触角基部将触角剪下约 2 cm, 并在触角尖部用小刀将表皮切开约 0.5 mm 的细口, 然后将处理好的触角连接到触角电位仪的两个玻璃电极上。手动进样 2 μL , 不分流进样。GC 和 EAD 分流平板的样品分流比为 1:1, 测试松墨天牛雌雄成虫对寄主植物气味的电生理反应。每次实验重复 6 根触角以上, 当对松墨天牛重复 3 次以上都有反应的化合物则为活性化合物。

1.5 数据处理

利用 SPSS 软件中非参数检验的卡方对选择寄

主植物的松墨天牛数量进行差异显著性分析 ($P = 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 松墨天牛对寄主植物气味的行为选择

松墨天牛对寄主植物气味与空白对照的选择结果表明 (图 1), 78.33% 的天牛选择寄主植物气味 ($\chi^2=27.65$, $df = 1$, $P < 0.001$), 说明马尾松叶片气味对松墨天牛均具有显著的吸引作用。

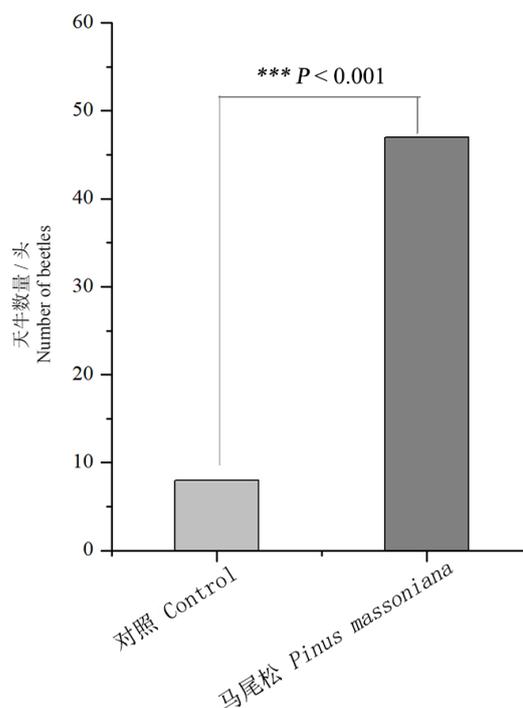


图 1 松墨天牛对马尾松寄主气味的行为选择

Fig.1 Odor preference of *Monochamus alternatus* adults to volatiles of *Pinus massoniana* plant leaves

2.2 马尾松叶片挥发物鉴定

通过 GC-MS 以及 NIST17 谱库检索分析马尾松叶片中总共检测到 22 种挥发性化合物 (图 2、表 1) 其中萜烯类物质 14 种, 醇类物质 5 种, 羧酸类物质和酯类物质各 1 种, 有 1 个未鉴定化合物。在上述挥发物中, 相对含量超过 8% 的均为萜烯类化合物, 其中 β -蒎烯的相对百分含量最高, 达 $(28.68 \pm 0.67.0)\%$, 其次为 α -蒎烯, 含量达 $(21.03 \pm 5.08)\%$, 然后依次为 D-吉玛烯 $(13.60 \pm 1.60)\%$ 、 β -水芹烯 $(8.85 \pm 0.97)\%$ 以及 β -石竹烯 $(8.24 \pm 5.08)\%$ 。

2.3 马尾松叶片对松墨天牛的触角电位反应

GC-EAD 检测结果表明 (图 3), 马尾松叶片挥发物中有 6 种化合物能够引起松墨天牛雌、雄

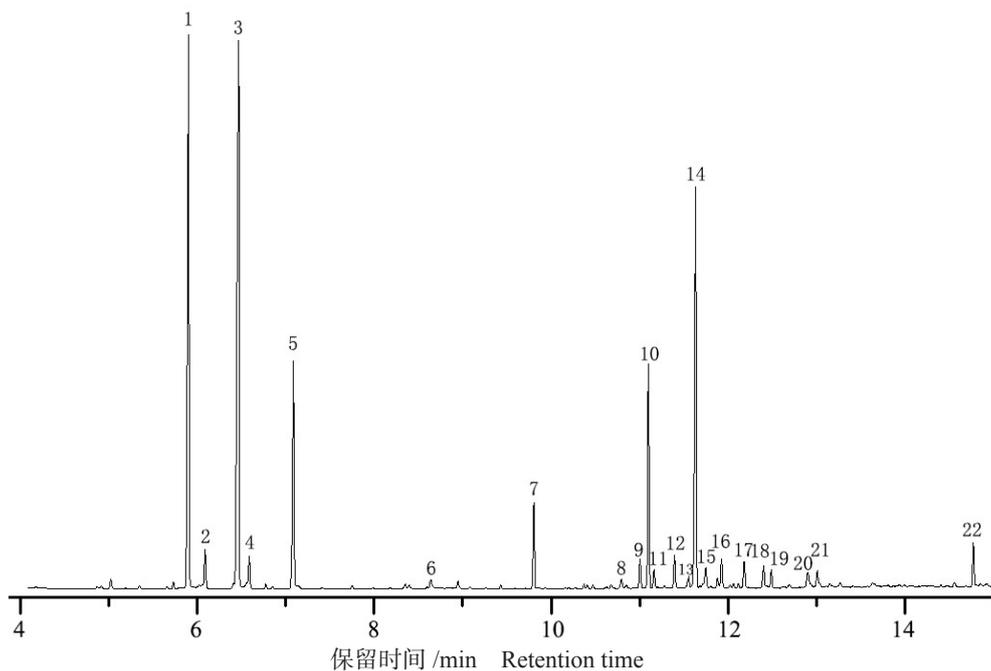
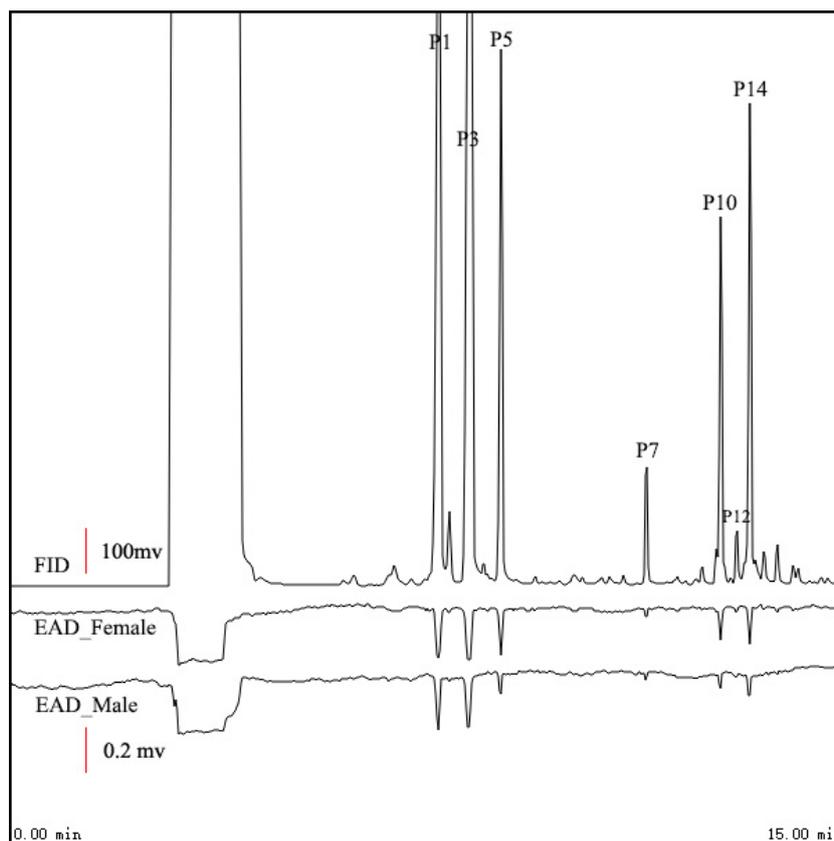


图 2 马尾松叶片挥发物的 TIC 总离子流
Fig.2 Total Ion chromatogram of volatiles of *Pinus massoniana* leaves



注：图中 p1、p3、p5、p7、p10 和 p14 为表 1 中的化合物编号。Note: p1、p3、p5、p7、p10 和 p14 in the figure are chemicals with the relative numbers in table1.

图 3 松墨天牛雌、雄成虫对马尾松叶片挥发物的触角电生理反应

Fig. 3 Electroantennogram of antennae of female and male *Monochamus alternatus* adults to volatiles of *Pinus massoniana* leaves

表 1 马尾松叶片挥发物组分及相对含量
Table1 Chemicals and relative contents of volatiles from *Pinus massoniana* leaves

峰 Peak	保留时间 / 分 Retention Index/min	化合物名称 Compound	匹配值 Match value	平均相对含量 ± 标准偏差 /%Mean relative quantity ± SD
1	5.90	α - 蒎烯 α -Pinene	948.00	21.03 ± 5.08
2	6.09	茨烯 Camphene	939.00	1.24 ± 0.08
3	6.47	β - 蒎烯 β -Pinene	939.00	28.68 ± 0.67
4	6.59	β - 月桂烯 β -Myrcene	938.00	3.23 ± 3.65
5	7.09	β - 水芹烯 β -Phellandrene	948.00	8.85 ± 0.97
6	8.64	辛酸 Octanoic acid	856.00	0.45 ± 0.06
7	9.81	乙酸龙脑酯 Bornyl acetate	958.00	2.47 ± 0.46
8	10.80	拮靶烯拮靶烯 β -Copaene	898.00	0.38 ± 0.06
9	11.01	长叶烯 D-longifolene	935.00	1.10 ± 0.22
10	11.10	β - 石竹烯 β -Caryophyllen	970.00	8.24 ± 5.08
11	11.17	α - 香柠檬烯 α -Bergamotene	905.00	0.69 ± 0.07
12	11.40	α - 蛇麻烯 α -Humulene	939.00	1.36 ± 0.30
13	11.56	γ - 木罗烯 γ -Muurolene	893.00	0.68 ± 0.12
14	11.64	D- 吉玛烯 D-Germacrene	961.00	13.60 ± 1.60
15	11.75	γ - 古芸烯 γ -Gurjunene	863.00	0.84 ± 0.2
16	11.93	杜松烯 Cadina-1(10),4-diene	897.00	1.15 ± 0.09
17	12.18	反式 - 橙花叔醇 E-Nerolidol	943.00	1.47 ± 0.39
18	12.41	大香叶烯 D—4—醇 Germacrene D-4-ol	918.00	1.02 ± 0.18
19	12.49	石竹素 Caryophylene oxide	926.00	0.78 ± 0.17
20	12.90	α - 毕橙茄醇 * α -Cadinol	894.00	0.88 ± 0.24
21	13.01	α - 毕橙茄醇 * α -Cadinol	862.00	0.82 ± 0.13
22	14.78	未知化合物 /unknow	/	1.05 ± 0.44

成虫的触角电生理反应。通过保留指数和 GC-MS NIST 谱库鉴定比较, 确定这 6 种物质中 5 种为萜类化合物, 分别为 α - 蒎烯、β - 蒎烯、β - 水芹烯、β - 石竹烯和 D- 吉玛烯, 1 种为酯类物质乙酸龙脑酯。松墨天牛雌雄成虫之间对马尾松挥发物有触角电位反应的挥发物种类没有差别。

3 讨论

目前生产上对松材线虫病的防治措施主要包括清理病枯死松树、喷洒化学农药防治媒介昆虫松墨天牛, 以及利用诱捕器诱杀松墨天牛^[6]。喷洒化学农药严重污染林业生态环境, 人工清理病枯死树需耗费大量人力和物力, 因此这些防治方法均存在较大弊端。诱捕器诱杀天牛是一种较为

环保的监测和控制松墨天牛种群密度的方法。然而, 以松墨天牛的聚集信息素十一烷氧基乙醇为主要成分的诱芯制作的诱捕器的诱杀距离较短, 对于长距离诱杀仍然是其短板。寄主植物挥发物在天牛远距离识别寻找寄主及产卵场所等行为过程中起关键作用^[12-14]。研究松墨天牛对寄主植物挥发物的偏好行为及触角电生理反应, 不仅对于松墨天牛有引诱活性的挥发物筛选有帮助, 而且对提高现有诱捕器的引诱范围和效果具有潜在作用。

Y 型嗅觉仪选择性试验表明, 78.33% 的松墨天牛选择具有马尾松气味的一端, 说明马尾松叶片挥发物对松墨天牛的偏好选择行为具有调控作用。马尾松挥发物中主要为一些烯烴类的化合物,

主要包括 β -蒎烯、 α -蒎烯、D-吉玛烯、 β -水芹烯以及 β -石竹烯。这些绿叶挥发性气味组成与现有报道较一致^[15-16]。含量较多的上述5种化合物均可和引起松墨天牛雌雄成虫明显的触角电生理反应。宁眺等^[17]对5种不同生理状态(健康、人为物理损伤、饵木、取食和产卵)的马尾松的萜烯化合物进行了分析,结果表明不同生理状态下萜烯化合物的相对含量会发生显著变化,如随着饵木的衰弱进程, α -蒎烯的相对含量显著减少而 β -蒎烯的含量显著增加,两者比例的变化可能是马尾松寄主树势衰弱程度变化的一个重要信号。此外,乙酸龙脑酯天然存在于冷杉 *Abies fabri* 油以及一些松科植物挥发性油中,在马尾松叶片中的相对百分含量为(2.47 ± 0.46)%,但是乙酸龙脑酯也可引起松墨天牛的触角反应。本研究发现马尾松植物中存在 α -毕橙茄醇两种异构体,但由于缺乏标准品,未能对这两个异构体进行准确的鉴别。

通常萜烯类化合物是植物绿叶中产生芳香气味的主要物质,对植物害虫及其天敌的行为具有非常重要的调节作用^[16,18]。 α -蒎烯和 β -蒎烯广泛存在于松树和杉木中,进一步开展室内及田间引诱试验对筛选松墨天牛诱芯增效剂,提高现有诱芯的引诱效率有积极作用。

参考文献

- [1] 杨宝君,汪来发,赵文霞,等. 松材线虫病的潜伏感染及松墨天牛传播新途径[J]. 林业科学研究, 2002, 15(3): 251-255.
- [2] 张世渊. 松褐天牛成虫补充营养取食研究[J]. 浙江林业科技, 1998, 18(2): 44-48.
- [3] 王玲萍. 松材线虫病媒介昆虫: 松墨天牛的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2002.
- [4] 杨洪. 松褐天牛 *Monochamus alternatus* Hope 生物学特性和交配行为的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2006.
- [5] 李同敏, 韦斌. 林业工作中松材线虫病防治措施[J]. 中国林业产业, 2016(10): 42-43.
- [6] 叶燕华, 余海滨, 林绪平. 广东省松材线虫病的发生现状及防控措施[J]. 广东林业科技, 2005, 21(2): 73-75.
- [7] 叶燕华, 方天松, 秦长生, 等. 3种药剂对松树疫木伐桩内松褐天牛的触杀活性[J]. 林业与环境科学, 2017, 33(5): 35-38.
- [8] 樊建庭, 孟俊国, Baode Wang, 等. 聚集性信息素和植物源信息素对松墨天牛的联合诱捕作用[J]. 应用昆虫学报, 2013, 50(5): 1274-1279.
- [9] 钱明惠, 方海鹏, 黄泽翰, 等. 松褐天牛聚集信息素引诱剂林间诱捕作用[J]. 林业与环境科学, 2018, 34(3): 47-50.
- [10] 刘明荣, 陆军. 松墨天牛聚集信息素十一烷氧基乙醇的生产工艺, CN107805187A[P]. 苏州华道生物药业股份有限公司.
- [11] Van Den Dool H, Kratz P D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography[J]. J. Chromatogr, 1963(11): 463-471.
- [12] 李建光. 光肩星天牛对寄主植物挥发性物质的行为反应及作用机理的研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2001.
- [13] 张嫣, 王星霖, 张玲玲, 等. 红缘天牛成虫对葡萄挥发物的EAG和行为反应[J]. 天津师范大学学报(自然科学版), 2017, 37(2): 30-35.
- [14] 王广利, 迟德富. 天牛化学通讯及其在害虫综合治理中的应用[J]. 林业科学, 2007, 43(9): 88-95.
- [15] 范丽清, 严善春, 程红, 等. 光肩星天牛对寄主植物萜烯类化合物触角活性和电位反应[J]. 东北林业大学学报, 2012(11): 146-149.
- [16] 王紫薇, 徐华潮, 张妮妮, 等. 光肩星天牛对寄主的选择及主要寄主挥发物的化学成分分析[J]. 浙江农林大学学报, 2016, 33(4): 558-563.
- [17] 宁眺, 樊建庭, 方宇凌, 等. 不同危害状态下寄主萜烯挥发物含量的变化及松墨天牛对其组分的触角电位反应[J]. 昆虫学报, 2006, 49(2): 179-188.
- [18] 洪崇耀, 曲芳华. 萜类化合物对植食昆虫天敌的吸引效力[J]. 中华农学会报, 2017, 18(34): 213-222.