

蓝桉叶片挥发物对棉铃虫产卵选择行为的影响

孙小旭¹ 张秀歌¹ 李 祥¹ 窦元春² 董文霞^{1*}

(1. 云南农业大学植物保护学院, 云南生物资源保护与利用国家重点实验室, 昆明 650201;

2. 红塔烟草(集团)有限公司, 云南 玉溪 653100)

摘要: 为筛选棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 的产卵驱避剂, 利用顶空动态吸附法和气相色谱质谱联用技术分析其非寄主植物蓝桉 *Eucalyptus globulus* 叶片挥发物的主要成分和相对含量, 通过气相色谱-触角电位联用技术研究抱卵雌蛾对蓝桉叶片挥发物的电生理反应, 并测定其电生理活性组分对抱卵雌蛾产卵选择行为的影响。结果表明, 蓝桉叶片挥发物中共鉴定出 39 种物质, 以萜烯类物质为主, 约占挥发物总量的 97.47%, 其中含量最高的 4 种物质为 α -蒎烯、反-罗勒烯、1,8-桉叶素和柠檬烯, 分别占挥发物总量的 44.65%、10.55%、8.16% 和 7.37%。能够引起棉铃虫抱卵雌蛾电生理反应的物质有 12 种, 分别是 α -蒎烯、 β -蒎烯、 β -月桂烯、 α -水芹烯、柠檬烯、1,8-桉叶素、反-罗勒烯、4-异丙烯基甲苯、4,8-二甲基-1,3,7-壬三烯、1,3,8-对薄荷三烯、香橙烯和 α -法尼烯。 α -水芹烯在 0.1 μg 剂量、 α -蒎烯和 α -法尼烯在 1 μg 剂量时对抱卵雌蛾均表现出显著的产卵引诱作用; 柠檬烯在 100 μg 剂量时表现为显著的产卵驱避作用, 其余剂量处理下均失去引诱或驱避效果; 4-异丙烯基甲苯在 1、10 和 100 μg 剂量以及 1,8-桉叶素在 10 μg 和 100 μg 剂量时均表现为显著的产卵驱避作用。表明 4-异丙烯基甲苯和 1,8-桉叶素可作为棉铃虫产卵驱避剂备选物质进行研究和开发。

关键词: 蓝桉; 植物挥发物; 棉铃虫; 气相色谱-触角电位联用技术; 产卵选择行为

Effects of leaf volatiles from blue gum *Eucalyptus globulus* on oviposition choices of the cotton bollworm *Helicoverpa armigera*

Sun Xiaoxu¹ Zhang Xiuge¹ Li Xiang¹ Dou Yuanchun² Dong Wenxia^{1*}

(1. State Key Laboratory on Conservation and Utilization of Biological Resources in Yunnan, College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, Yunnan Province, China;

2. Hongta Tobacco Group Company Limited, Yuxi 653100, Yunnan Province, China)

Abstract: In order to screen out oviposition repellents of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*, the leaf volatiles from *Eucalyptus globulus* (non-host of cotton bollworm) were collected by dynamic headspace absorption method and were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The electro-physiological responses of the gravid female cotton bollworm to the leaf extracts were recorded by coupled gas chromatography-electroantennogram detection (GC-EAD). Their oviposition choices for individual GC-EAD-active components were also tested. The results showed that 39 compounds were identified from *E. globulus* leaves. Among them, the terpenes were the dominant compounds, accounting for 97.47% of the total. Among the terpenes, α -pinene, *trans*-ocimene, 1,8-cineole, and limonene accounted for 44.65%, 10.55%, 8.16% and 7.37%, respectively. Twelve volatile compounds from *E. globulus* leaves elicited GC-EAD responses of the females, including α -pinene, β -pinene, β -myrcene, α -phellandrene, limonene, 1,8-cineole, *trans*-ocimene, 1-methyl-4-isopropyl, 4,8-dimethyl-

基金项目: 云南生物资源与保护重点实验室开放基金(2015-004)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: dongwenxia@163.com

收稿日期: 2016-11-04

1,3,7-nonatriene (DMNT), 1,3,8-*p*-menthatriene, decahydro-1,1,7-trimethyl-4- α -methylene-1h-cycloprop[e]azulene, and α -phellandrene showed significant attractant effect on their oviposition choice at the dosage of 0.1 μg , and so did α -pinene and α -farnesene at the dosage of 1 μg . Limonene resspelled their oviposition at the dosage of 100 μg , and none of these four compounds showed any effect on female oviposition choice at other dosages. 1-methyl-4-isop showed significant repellent effect on the their oviposition at the dosages of 1, 10 and 100 μg , and so did 1,8-cineole at the dosages of 10 μg and 100 μg . These results indicated that 1-methyl-4-isop and 1,8-cineole were good candidates as oviposition repellents of the cotton bollworm.

Key words: *Eucalyptus globulus*; plant volatile; *Helicoverpa armigera*; GC-EAD; oviposition choice

蓝桉 *Eucalyptus globulus* 为桃金娘科桉属植物, 原产于澳大利亚东南角的塔斯马尼亚岛, 我国于 1890 年引入, 在广东、广西、云南、四川、江西等省区均有栽培(杨秀伟和郭庆梅, 2007), 2009 年我国蓝桉人工林面积已超过 70 万 hm^2 , 成为一种重要的造林树种(陈琳, 2009)。但有研究发现, 引种桉树也会对环境产生负面影响, 最为关键的就是降低生物多样性, 如 Poore & Fries (1985) 和余雪标 (1998) 都证明, 桉树人工林群落内的生物多样性低于其它树种的人工林, 特别是会降低昆虫的多样性(李巧等, 2007)。这是因为桉树的次生代谢产物对病虫害具有抑制或杀灭作用(Batish et al., 2008)。

自然条件下植食性昆虫很少在非寄主植物上产卵, 这是由于非寄主植物中存在抑制昆虫产卵或取食的物质(孟国玲等, 2000)。国外有研究表明, 用混合有桉叶粉末的人工饲料喂养棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 幼虫, 能够抑制其生长发育(Kaushik, 2002); 用赤桉 *Eucalyptus camaldulensis* 叶片粗提物浸泡过的卷心菜饲喂棉铃虫幼虫, 能够表现出明显的取食抑制作用(Kathuria & Kaushik, 2005); 利用银叶桉 *Eucalyptus cinerea* 叶片提取物中的 1,8-桉叶素(88.5%)、 α -蒎烯(2%)、 α -萜品醇(9%)对家蝇 *Musca domestica* 进行熏蒸处理, 可作为防治家蝇的杀虫剂(Rossi & Palacios, 2015); 柳叶桉 *Eucalyptus saligna* 叶片的挥发油可作为仓储害虫如赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*、菜豆象 *Acanthoscelides obtectus*、麦蛾 *Sitotroga cerealella* 和玉米象 *Sitophilus zeamais* 的杀虫剂和驱避剂(Bett et al., 2016)。国内学者研究发现, 蓝桉叶片的石油醚、氯仿和乙醇粗提物对马铃薯块茎蛾 *Phthorimaea operculella* 产卵有显著的抑制作用(康敏等, 2007)。

周楠和祁荣频(1993)对云南省主要造林区进行调查, 发现了桉树害虫 32 种, 隶属于 7 目 23 科; 祁荣频等(1995)监测发现黑翅大白蚁 *Odontotermes for-*

mosanus 及铜绿丽金龟甲 *Anomala corpulenta* 等 6 种蓝桉害虫; 陈佩珍和顾茂彬(2000)发现在我国取食桉树的昆虫有 207 种, 分属 10 目 50 科; Wingfield et al.(2008)对桉树病虫害的综述中提到了桉树枝瘿姬小蜂 *Leptocybe invasa* 等 9 种取食桉树的昆虫。就目前国内外有关桉树害虫的研究, 均没有发现典型的多食性害虫棉铃虫为害桉树。当前我国化学农药污染严重, 棉铃虫为害反复发生且抗药性不断增强, 利用天然产物提取或合成害虫抑制剂已经成为重要的研究方向。因此, 本研究选取蓝桉这种棉铃虫的非寄主植物为试验材料, 利用顶空动态吸附法和气相色谱-质谱联用(gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS)技术分析蓝桉叶片挥发物成分, 通过气相色谱-触角电位联用(gas chromatography-electroantennogram, GC-EAD)技术研究抱卵雌蛾对蓝桉叶片挥发物的电生理反应, 并在实验室条件下测定电生理活性组分对其产卵选择行为的影响, 筛选出对棉铃虫产卵有驱避作用的挥发性物质成分, 旨在为棉铃虫的行为调控提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫及植物: 棉铃虫采自云南省昆明市呈贡区斗南村月季花田, 幼虫以人工饲料饲养(Wu & Gong, 1997), 成虫饲以 10% 的蜂蜜水。在温度 $28 \pm 2^\circ\text{C}$ 、相对湿度 $(60 \pm 5)\%$ 、光周期 $L:D=14\text{ h}:10\text{ h}$ 的人工气候箱内单管饲养 5 代以上备用。成虫羽化当天, 将雌、雄蛾以 2:3 的比例进行配对交配, 4 d 后选取健康的雌蛾进行试验。蓝桉于 2014 年 8 月采自云南农业大学校园绿化区, 剪取完全展开的带枝条成熟叶片备用。

标准样品: 98% 正己烷(hexane), 德国 Merck 公司; 98% α -蒎烯(α -pinene)、98% α -水芹烯(α -phellandrene)、90% 反-罗勒烯(*trans*-ocimene)、90% α -法

尼烯(α -farnesene)、97% α -古芸烯(α -gurjunene)、96% α -石竹烯(α -caryophyllene)、99%对伞花烃(*P*-cymene),美国Sigma-Aldrich公司;98% β -蒎烯(β -pinene),美国Acros Organics公司;90% β -月桂烯(β -myrcene)、98% 茨烯(camphene)、90% α -萜品烯(α -terpinene)、99% 苯甲醚(anisole)、99% 萘(naphthalene)、98% 十四烷(tetradecane),中国百灵威公司;95% 柠檬烯(limonene)、98% 1,8-桉叶素(1,8-cineole)、95% 4-异丙烯基甲苯(1-methyl-4-isop)、95% 萜烯-4-醇(terpinene-4-ol)、90% β -石竹烯(β -caryophyllene)、97% 乙酸顺-3-己烯酯(*cis*-3-hexenyl acetate),日本Tokyo Chemical Industry公司;95% 4,8-二甲基-1,3,7-壬三烯(4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene, DMNT),乌克兰Enamine有限公司;99.9% 十一烷(undecane),美国Fluka公司。

仪器:FLI2000H型人工气候箱,日本Eyela公司;700 mg Porapak Type Q 80~100目吸附剂,美国Waters公司;QC-1S型大气采样仪,北京市劳动保护科学研究所;5 μ L微量进样器,上海安亭微量进样器厂;Agilent7890A气象色谱仪、Agilent 6890A/5973MS气象色谱-质谱联用仪,美国Agilent公司;Spectra 360导电胶,美国Parker公司;触角电位仪由Syntech CS-55刺激气流控制器、PRG-2 EAD探头触角固定器和Syntech IDAC-2二通道数据采集器组成,德国Syntech公司。

1.2 方法

1.2.1 蓝桉叶片挥发物的提取

采用顶空动态吸附法。试验前对直径400 mm的玻璃干燥器通气10 min去除其中的气味。玻璃干燥器上部接通2根装有吸附剂的巴斯德管,其中1根用Teflon管连接大气采样仪,作为气味吸附收集柱;另1根与活性炭相连接,作为过滤柱净化空气。于9:00剪取并称量1500 g健康的供试蓝桉叶片,置于干燥器内,控制空气流量为600 mL/min,连续吸附24 h,保持环境通风、无异味,温度为(26 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,相对湿度为(50 $\pm$ 10)%,光源为自然光。收集完成后用2 mL正己烷把吸附柱吸附到的挥发物洗脱至4 mL安捷伦棕色储样瓶中,用氮吹法浓缩至100 μ L,于-20 $^{\circ}$ C冷藏备用。重复4次,每次试验设置空白收集系统为对照组,避免背景气味干扰。

1.2.2 蓝桉叶片挥发物组分的分离与鉴定

利用GC-MS对蓝桉叶片挥发物进行分析鉴定,氢火焰离子检测器温度260 $^{\circ}$ C,气化室温度250 $^{\circ}$ C,色谱柱为HP-5毛细管柱(30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m);

程序升温:起始温度40 $^{\circ}$ C,以2 $^{\circ}$ C/min升温至140 $^{\circ}$ C,再以15 $^{\circ}$ C/min升温至260 $^{\circ}$ C;柱前压100 kPa,载气为氮气,流速1.0 mL/min,分流进样,分流比为10:1,进样量2.0 μ L。质谱条件:EI离子源,电子能量70 eV,质子扫描范围35~500 amu,四级杆温度150 $^{\circ}$ C,离子源温度230 $^{\circ}$ C,传输线温度250 $^{\circ}$ C,柱压100 kPa,载气为氦气。

通过对比标准品的保留时间、NIST化学数据库(NIST 2001, <http://webbook.nist.gov/>)质谱数据、保留指数(retention index, RI)以及Wiley7n.1标准谱库数据进行定性分析;并使用峰面积归一法对各组分相对含量进行分析。用以比对保留时间的所有标准品用正己烷配制成浓度为100 ng/ μ L的溶液,上样量2 μ L。保留指数的计算方法参照Robards et al.(1994)。 $RI=100y+100(z-y)(RT_x-RT_y)/(RT_z-RT_y)$,其中 y 和 z 是2个标准烷烃的碳原子数, RT_x 是待鉴定成分色谱峰的保留时间, RT_y 和 RT_z 则分别是2个标准烷烃的保留时间。

1.2.3 成虫对蓝桉叶片挥发物的GC-EAD反应

气相色谱仪的程序升温条件参照1.2.2,将浓缩至100 μ L的蓝桉叶片挥发物正己烷溶液,用微量进样器抽取1 μ L手动进样到GC中。GC柱出口转换器温度为260 $^{\circ}$ C,从GC柱流出的刺激棉铃虫触角的气流与用以降温的洁净气流混合,混流管内径1.5 cm,洁净气体流速设定为10 cm/s,触角离气出口5 cm(黄翠虹等,2014)。将棉铃虫雌蛾的触角用解剖剪迅速由基部剪下,用手术刀片去除鞭节端部的2个亚节后,用导电胶将其与触角电位仪昆虫触角固定器的昆虫触角电位探头连接,待EAD基线平稳后开始记录刺激信号。记录的信号经EAD二通道数据采集器放大,再接到计算机的硬件采集卡上,通过计算机软件(GC-EAD, Syntech 4.6版本)采集和分析数据。重复测试5头棉铃虫,每头选用1根触角。

1.2.4 抱卵雌蛾对蓝桉叶片挥发物的产卵选择测定

产卵试验参考Jiang et al.(2015)的方法进行,并略有改进。试验待测样选用蓝桉叶片挥发物中10种能够引起棉铃虫抱卵雌蛾电生理反应的物质标准样,分别是 α -蒎烯、 β -蒎烯、 β -月桂烯、 α -水芹烯、柠檬烯、1,8-桉叶素、反-罗勒烯、4-异丙烯基甲苯、4,8-二甲基-1,3,7-壬三烯和 α -法尼烯,试验前用正己烷将这些标准样配制成梯度浓度溶液,即0.0005、0.005、0.05、0.5 μ g/ μ L,备用。用铁丝制成20 cm $\times$ 10 cm $\times$ 10 cm长方体产卵笼,并在产卵笼各侧面贴上保鲜膜,用直径0.6 mm大头针按照4孔/cm 2 均匀

扎孔使之透气。20: 30 开始进行试验,在产卵笼两端各封上1块纱布,然后在纱布外侧封上1片粘贴有1张直径10 cm圆形滤纸片的保鲜膜,从外到内顺序依次是保鲜膜、滤纸、纱布,滤纸片上分别均匀涂抹200 μ L待测样品和正己烷(对照),然后接入棉铃虫抱卵雌蛾4头,并在产卵笼中间放1块浸有约2 mL 10%蜂蜜水的脱脂棉供其补充营养。最后将产卵笼置于暗室内,并保持空气相对湿度为70%~80%、温度为25 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C。次日08: 30取出两端的保鲜膜、滤纸和纱布,统计两端的卵粒数。每个待测样品的每个浓度设5次重复。每组试验结束后,解剖雌蛾腹部,观察交配囊中是否有精包,确认其交配状态,剔除未交配组试验结果,并补充试验。

1.3 数据分析

试验数据采用SPSS 17.0软件进行统计分析,应

用*t*测验法进行处理间的差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 蓝桉叶片挥发物组成

从蓝桉叶片挥发物中共鉴定出39种化合物,主要包括萜类、芳香族化合物、脂肪族化合物以及少部分的绿叶气味物质。萜类化合物共32种且含量最高,约占挥发物释放总量的97.47%;芳香族化合物有4种,包括苯甲醚、对伞花烃、4-异丙烯基甲苯和萘,约占挥发物总量的2.10%;脂肪族化合物为十一烷和十四烷2种,约占总量的0.37%;绿叶气味物质含量较少,仅乙酸顺-3-己烯酯1种,约占总量的0.07%。其中释放量最大的物质是 α -蒎烯、反-罗勒烯、1,8-桉叶素和柠檬烯,分别占挥发物总量的44.65%、10.55%、8.16%和7.37%(表1)。

表1 蓝桉叶片挥发物的组成及相对含量
Table 1 Component quantities of volatiles from leaves of *Eucalyptus globulus*

化合物 Compound	保留指数 Retention index	提取物组分相对含量 Relative content of the compound (%)	鉴定方法 Identification method
萜类化合物 Terpenoids			
α -侧柏烯 α -thujene	927	0.26 $\pm$ 0.08	MS, RI
α -蒎烯 α -pinene	935	44.65 $\pm$ 1.18	MS, RI, std
茨烯 Camphene	958	0.32 $\pm$ 0.08	MS, RI, std
马鞭草烯 Verbenene	967	0.23 $\pm$ 0.09	MS, RI
香桉烯 Sabinene	971	0.09 $\pm$ 0.01	MS, RI
β -蒎烯 β -pinene	977	1.30 $\pm$ 0.09	MS, RI, std
β -月桂烯 β -myrcene	993	1.55 $\pm$ 0.15	MS, RI, std
α -水芹烯 α -phellandrene	1 003	1.90 $\pm$ 0.15	MS, RI, std
α -萜品烯 α -terpinene	1 016	0.16 $\pm$ 0.02	MS, RI, std
柠檬烯 Limonene	1 028	7.37 $\pm$ 0.11	MS, RI, std
1,8-桉叶素 1,8-cineole	1 031	8.16 $\pm$ 0.09	MS, RI, std
顺-罗勒烯 <i>cis</i> -ocimene	1 037	0.70 $\pm$ 0.07	MS, RI
反-罗勒烯 <i>trans</i> -ocimene	1 050	10.55 $\pm$ 1.72	MS, RI, std
γ -萜品烯 γ -terpinene	1 062	0.26 $\pm$ 0.07	MS, RI
4,8-二甲基-1,3,7-壬三烯 4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene	1 111	5.50 $\pm$ 1.89	MS, RI, std
1,3,8-对-薄荷三烯 1,3,8-p-menthatriene	1 134	3.52 $\pm$ 0.67	MS, RI
反-柠檬烯氧化物 <i>trans</i> -limonene oxide	1 139	0.11 $\pm$ 0.04	MS, RI
4-萜品醇 Terpinene-4-ol	1 178	0.05 $\pm$ 0.01	MS, RI, std
α -萜品醇 α -terpineol	1 200	0.07 $\pm$ 0.01	MS, RI
乙酸- α -松油酯 α -terpinenyl acetate	1 340	0.49 $\pm$ 0.09	MS, RI
异喇叭烯 (-)-isolekene	1 366	0.22 $\pm$ 0.05	MS, RI
α -胡椒烯 α -copaene	1 376	0.14 $\pm$ 0.06	MS, RI
十四碳烯 1-tetradecene	1 374	0.20 $\pm$ 0.01	MS
α -古芸烯 α -gurjunene	1 401	0.98 $\pm$ 0.10	MS, RI, std
β -石竹烯 β -caryophyllene	1 410	0.95 $\pm$ 0.25	MS, RI, std
β -古芸烯 (+)- β -gurjunene	1 414	0.16 $\pm$ 0.01	MS
香橙烯 Decahydro-1,1,7-trimethyl-4- α -methylene-1h-cycloprop[e]azulene	1 487	3.22 $\pm$ 0.30	MS, RI

续表 1 Continued

化合物 Compound	保留指数 Retention index	提取物组分相对含量 Relative content of the compound (%)	鉴定方法 Identification method
α -石竹烯 α -caryophyllene	1 436	0.22±0.02	MS, RI, std
别芳萜烯	1 443	0.64±0.04	MS
Decahydro-1,1,7-trimethyl-4- β -methylene-1h-cycloprop[e]azulene			
大根香叶烯-D Germacrene-D	1 466	0.52±0.11	MS, RI
喇叭烯 Ledene	1 481	0.16±0.05	MS, RI
α -法尼烯 α -farnesene	1 509	2.82±0.33	MS, RI, std
合计 Sum		97.47±7.95	
芳香族化合物 Aromatics			
苯甲醚 Anisole	918	0.10±0.01	MS, RI, std
对伞花烃 p-cymene	1 029	0.35±0.24	MS, RI, std
4-异丙烯基甲苯 1-methyl-4-isop	1 091	1.57±0.12	MS, RI, std
萘 Naphthalene	1 185	0.08±0.04	MS, RI, std
合计 Total		2.10±0.41	
烃类 Hydrocarbons			
十一烷 Undecane	1 100	0.30±0.08	MS, RI, std
十四烷 Tetradecane	1 400	0.07±0.01	MS, RI, std
合计 Total		0.37±0.09	
绿叶气味 Green leaf volatiles			
乙酸顺-3-己烯酯 cis-3-hexenyl acetate	1 007	0.07±0.04	MS, RI, std
合计 Total		0.07±0.04	

MS: 表示质谱图与NIST的对比; RI: 表示保留指数与NIST对比; std: 表示与标准品的保留时间对比。表中数据为平均数±标准误。MS: Comparison of the mass spectrum with those of the computer mass libraries of NIST; RI: comparison of RI with those from the literature of NIST; std: injection of an authentic sample. Data in the table are mean±SE.

2.2 抱卵雌蛾对蓝桉叶片挥发物的GC-EAD反应

GC-EAD检测中,棉铃虫抱卵雌蛾对蓝桉叶片挥发物中的12种组分有明显电生理反应,其中柠檬烯和1,8-桉叶素在气相色谱图中未能被分开(图1)。

以FID和EAD信号的相对强度为指标,判定电生理反应强弱顺序为4-异丙烯基甲苯> β -月桂烯和 α -法尼烯> α -水芹烯> β -蒎烯>1,3,8-对薄荷三烯>香橙烯>反-罗勒烯> α -蒎烯>DMNT>柠檬烯和1,8-桉叶素。

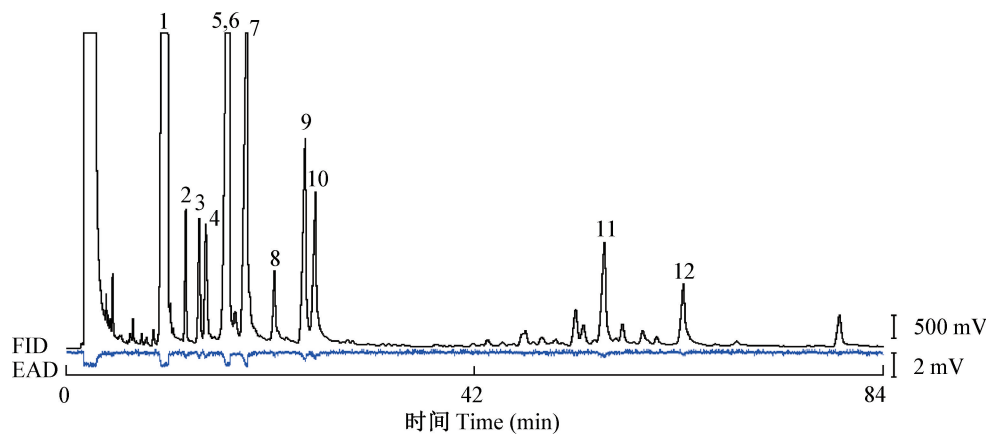


图1 棉铃虫对蓝桉叶片挥发物的GC-EAD反应

Fig. 1 The GC-EAD responses of *Helicoverpa armigera* to volatiles from leaves of *Eucalyptus globulus*
1: α -蒎烯; 2: β -蒎烯; 3: β -月桂烯; 4: α -水芹烯; 5: 柠檬烯; 6: 1,8-桉叶素; 7: 反-罗勒烯; 8: 4-异丙烯基甲苯; 9: 4,8-二甲基-1,3,7-壬三烯(DMNT); 10: 1,3,8-对薄荷三烯; 11: 香橙烯; 12: α -法尼烯。500 mV和2 mV分别是2路信号的标尺。
1: α -pinene; 2: β -pinene; 3: β -myrcene; 4: α -phellandrene; 5: limonene; 6: 1,8-cineole; 7: *trans*-ocimene; 8: 1-methyl-4-isop; 9: 4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene; 10: 1,3,8-p-menthatriene; 11: decahydro-1,1,7-trimethyl-4- α -methylene-1h-cycloprop[e]azulene (DMNT); 12: α -farnesene. 500 mV and 2 mV are the scales for two signals.

2.3 蓝桉叶片挥发物对抱卵雌蛾产卵选择的影响

棉铃虫抱卵雌蛾对10种电生理活性物质4种剂量的产卵选择试验结果显示,产卵驱避和产卵引诱现象共存。 α -水芹烯在0.1 μg 剂量、 α -蒎烯和 α -法尼烯在1 μg 剂量时表现出显著的产卵引诱作用,柠檬烯在100 μg 剂量时表现为显著的产卵驱避作用($P < 0.05$,图2),这3种物质在其余剂量时均失去了引诱或驱避效果。4-异丙烯基甲苯在1、10、100 μg 剂

下都表现出显著的产卵驱避作用($P < 0.05$),在0.1 μg 剂量时无显著影响。1,8-桉叶素在10 μg 剂量时表现为极显著的产卵驱避作用($P < 0.01$),100 μg 剂量时表现为显著的产卵驱避作用($P < 0.05$),0.1 μg 和1 μg 剂量时无显著影响。 β -月桂烯在1 μg 和10 μg 剂量时,分别表现为显著的产卵引诱作用和产卵驱避作用($P < 0.05$,图2)。 β -蒎烯、反-罗勒烯和DMNT在各剂量下均未表现出显著的产卵调控作用。

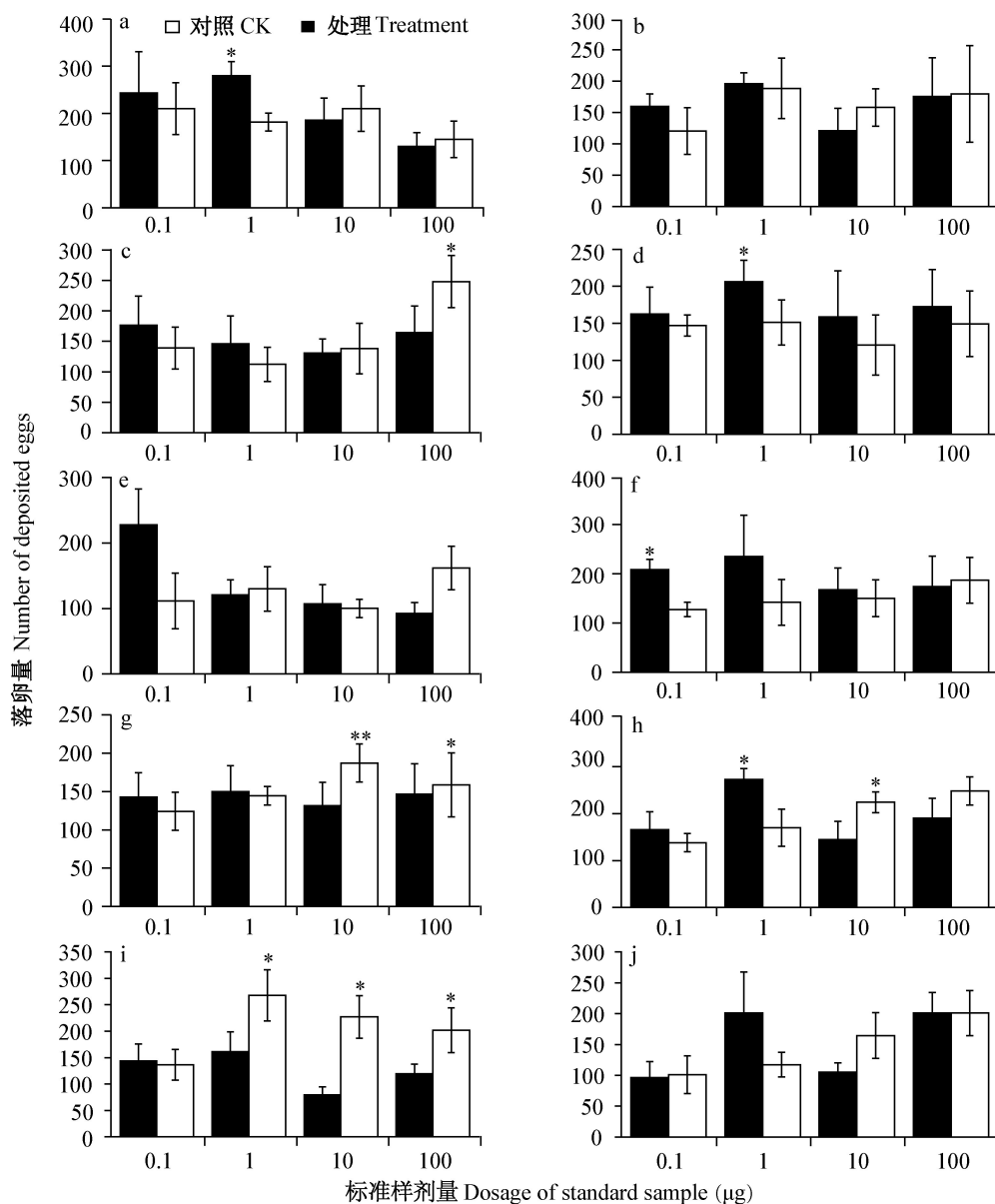


图2 棉铃虫抱卵雌蛾对蓝桉叶片挥发物中10种有电生理活性化合物的产卵选择反应

Fig. 2 Oviposition behavior of female *Helicoverpa armigera* moths to ten EAD-active compounds from leaves of *Eucalyptus globulus*

a: α -pinene; b: β -pinene; c: limonene; d: α -farnesene; e: *trans*-ocimene; f: α -phellandrene; g: 1,8-cineole; h: β -myrcene; i: 1-methyl-4-isopropyl-1,3,7-nonatriene (DMNT); j: 4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene (DMNT). Data in the figure are means $\pm$ SE. * or ** indicates significant difference between the treatment and control at $P < 0.05$ or $P < 0.01$ level by *t* test, respectively.

3 讨论

本研究共鉴定出蓝桉叶片挥发物组分39种,其中萜烯类化合物32种,占挥发物总量的97.47%,相对含量最高的前4种物质是 α -蒎烯、反-罗勒烯、1,8-桉叶素和柠檬烯,分别占挥发物总量的44.65%、10.55%、8.16%和7.37%;宋爱华等(2009)利用水蒸气蒸馏法提取蓝桉的干树叶挥发油,结合GC-MS技术分析鉴定出50种主要成分,其中相对含量最高的是1,8-桉叶素,占挥发物总量的72.71%,含量较高的成分有 α -蒎烯、(-)-蓝桉醇、 α -松油醇和别香橙烯,分别占挥发物总量的9.22%、2.77%、2.54%和2.47%;Vilela et al. (2009)采用水蒸气蒸馏法提取蓝桉叶片得到16种物质,其中含量最高的也是1,8-桉叶素,占挥发物总量的89.95%;吴素香等(2008)同样采用水蒸气蒸馏法结合GC技术测得蓝桉挥发油的主要成分也是1,8-桉叶素和 α -蒎烯。这些结果与本研究相比存在的组分数量和单组分挥发量的差异,可能是因为材料采集地域、材料处理方法以及挥发物提取方法的不同所致。

阎凤鸣等(2002)研究发现,棉铃虫抱卵雌虫触角能够对 α -蒎烯、 β -蒎烯、 β -月桂烯和 β -罗勒烯产生电生理反应,但对法尼烯不产生电生理反应。本研究中蓝桉叶片挥发物能够引起棉铃虫抱卵雌虫电生理反应的物质共12种,与上述试验结果大致相符,但 α -法尼烯却能引起抱卵雌虫的电生理反应,这一现象有可能是试验中法尼烯的释放量过低所致(Yan et al., 2004)。通过对比这12种具有电生理活性物质的FID和EAD相对强度发现,对棉铃虫抱卵雌虫触角刺激强度最大的物质是4-异丙烯基甲苯,其次是 β -月桂烯和 α -法尼烯,其余依次为 α -水芹烯> β -蒎烯>1,3,8-对薄荷三烯>香橙烯>反-罗勒烯> α -蒎烯>DMNT,而柠檬烯和1,8-桉叶素的刺激强度最小。结合产卵结果分析,4-异丙烯基甲苯能够在3种剂量处理中都表现出显著的产卵驱避作用,说明蓝桉叶片挥发物中此物质可能是驱避棉铃虫产卵的主要物质。

本试验的产卵选择结果表明,蓝桉叶片挥发物中同时存在着能够引诱和驱避棉铃虫抱卵雌虫产卵的物质成分, α -蒎烯、 α -法尼烯、 α -水芹烯和 β -月桂烯都只在1种剂量下对棉铃虫抱卵雌虫表现出显著的产卵引诱作用;马艳粉等(2012)研究发现, α -蒎烯、 β -蒎烯、 β -月桂烯在0.00075~0.012 g/L浓度范围内对马铃薯块茎蛾产卵有显著的引诱作用;松树释

放出的 α -蒎烯和 β -蒎烯可以引诱云杉卷叶蛾 *Choristoneura fumiferana* 产卵(Städler, 1974);小眼夜蛾 *Panolis flammea* 雌蛾对寄主的定位和产卵依靠松树针叶释放出的 α -蒎烯和 β -蒎烯(Leather, 1987); β -月桂烯对棉铃虫和松小梢斑螟 *Dioryctria pryeri* 雌成虫产卵有显著的引诱作用(Rembold et al., 1991; 李新岗等, 2006)。这些报道与本研究结果基本一致,说明 α -蒎烯和 β -月桂烯是常见的昆虫产卵引诱物质,但 β -蒎烯在本研究中对棉铃虫抱卵雌虫的产卵没有影响,可能选取的试验昆虫与上述研究不同,感器专一性有差别。本研究中 β -月桂烯在1 μ g剂量时表现出显著的产卵引诱作用,但在10 μ g剂量时表现出显著的产卵驱避作用,是一种正常的低浓度引诱、高浓度驱避的现象。有学者报道称柠檬烯能够显著引诱马铃薯块茎蛾的成虫产卵(Sharaby et al., 2009),本研究发现柠檬烯在低剂量时对棉铃虫的产卵没有影响,高剂量时表现为产卵驱避效果,原因可能是研究所选取的昆虫不同,感受范围不同,对试剂的处理方法不同。

1,8-桉叶素(桉叶油醇)是棉铃虫非寄主植物蓝桉叶片的特征性挥发物,能够显著引诱马铃薯块茎蛾成虫产卵(Ma & Xiao, 2013),本研究发现1,8-桉叶素在10 μ g和100 μ g剂量下对棉铃虫产卵表现出显著的驱避作用,低剂量时则对其产卵行为没有影响。蓝桉叶片挥发物中比较特殊的组分4-异丙烯基甲苯在0.1 μ g剂量时对棉铃虫产卵行为无影响,1、10、100 μ g剂量时均表现为显著的产卵驱避作用。这表明蓝桉叶片中1,8-桉叶素和4-异丙烯基甲苯可在棉铃虫防治过程中作为产卵驱避物质开发应用。

昆虫对信息物质反应阈值的高或低,表明该物质可能为近距离信息化合物或远距离信息化合物(Dickens, 1984)。从剂量反应来看,不同的挥发物气味对棉铃虫的影响在特定浓度下才能起到作用,浓度过小可能表现为产卵引诱作用,浓度较大时则能表现出显著的产卵驱避作用,如本研究中的 β -月桂烯。本研究中 α -水芹烯、 α -蒎烯和 α -法尼烯可能是棉铃虫选择产卵的远距离物质,1,8-桉叶素、4-异丙烯基甲苯和 β -月桂烯可能是棉铃虫选择产卵的近距离物质。Del Socorro et al. (2010)对桉属植物引诱棉铃虫的研究表明, α -蒎烯是这些桉属植物释放的大量物质,推测 α -蒎烯可能是棉铃虫对多数桉属植物定向的远距离物质。

蓝桉作为棉铃虫典型的非寄主植物,其叶片挥发物中能引起棉铃虫抱卵雌虫产生GC-EAD反应

的物质组分中,引诱棉铃虫产卵组分的挥发量多于驱避组分。Del Socorro et al.(2010)的研究中提到了5种桉属植物能够对棉铃虫雌雄蛾产生强烈的引诱作用。基于本研究结果,推测蓝桉植株可能在某种距离上也能够引诱棉铃虫,但是棉铃虫不能在桉树上产卵的原因可能是上述提到的低剂量引诱产卵,高剂量驱避产卵或失去作用所致。蓝桉叶片挥发物中 β -月桂烯、 α -水芹烯和 α -法尼烯这些产卵引诱组分的释放量过小,不能达到引诱抱卵雌蛾产卵的感受阈值;对抱卵雌蛾电生理刺激最强的挥发物4-异丙烯基甲苯,虽然释放量不大却能在中剂量时表现出显著的产卵驱避作用;1,8-桉叶素和柠檬烯的释放量很高,足以表现出产卵驱避作用;原本在低剂量有产卵引诱作用的 α -蒎烯释放量过大,导致其在近距离失去了引诱作用。植物挥发性次生代谢物是由多种物质按一定比例组成,并且多种化合物混配有协同作用,同样,蓝桉叶片挥发物中同时存在着引诱和驱避棉铃虫雌蛾产卵的物质,这些物质协同作用的结果是棉铃虫不能在蓝桉上取食和产卵。本研究在实验室条件下成功筛选出了4-异丙烯基甲苯和1,8-桉叶素这2种驱避棉铃虫产卵的物质,下一步将对其在田间实际操作中的作用进行研究。

参 考 文 献 (References)

- Batish DR, Singh HP, Kohli RK, Kaur S. 2008. *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management*, 256(12): 2166–2174
- Bett PK, Deng AL, Ogendo JO, Kariuki ST, Kamatenesi-Mugisha M, Mihale JM, Torto B. 2016. Chemical composition of *Cupressus lusitanica* and *Eucalyptus saligna* leaf essential oils and bioactivity against major insect pests of stored food grains. *Industrial Crops and Products*, 82: 51–62
- Chen L. 2009. Research progress of *Eucalyptus globulus*. *China Pharmaceuticals*, 18(4): 61–62 (in Chinese) [陈琳. 2009. 蓝桉的研究进展. *中国药业*, 18(4): 61–62]
- Chen PZ, Gu MB. 2000. Investigation on *Eucalyptus* pests in China. *Forest Research*, 13(1): 51–56 (in Chinese) [陈佩珍, 顾茂彬. 2000. 我国桉树害虫种类调查. *林业科学研究*, 13(1): 51–56]
- Del Socorro AP, Gregg PC, Alter D, Moore CJ. 2010. Development of a synthetic plant volatile-based attracticide for female noctuid moths. I. Potential sources of volatiles attractive to *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Australian Journal of Entomology*, 49(1): 10–20
- Dickens JC. 1984. Olfaction in the boll weevil, *Anthonomus grandis* Boh. (Coleoptera: Curculionidae): electroantennogram studies. *Journal of Chemical Ecology*, 10(12): 1759–1785
- Huang CH, Li JJ, Zhou L, Yan FM. 2014. EAG and GC-EAD techniques. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(2): 579–585 (in Chinese) [黄翠虹, 李静静, 周琳, 闫凤鸣. 2014. 昆虫触角电位(EAG)及其与气谱联用(GC-EAD)技术. *应用昆虫学报*, 51(2): 579–585]
- Jiang XC, Dong WX, Chen B, Xiao C, Gui FR, Yan NS, Qian L, Li ZY. 2015. Electrophysiological and oviposition responses of Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae), to compounds rinsed from the surfaces of sugarcane and maize leaves. *European Journal of Entomology*, 112(2): 295–301
- Kang M, Ren JT, Su PJ, Hu CH, Xiao C. 2007. Oviposition deterring effect of crude extracts from three plants on *Phthorimaea operculella*. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 35(10): 2858–2859 (in Chinese) [康敏, 任静涛, 苏鹏娟, 胡纯华, 肖春. 2007. 3种植物提取物对马铃薯块茎蛾产卵的抑制作用. *安徽农业科学*, 35(10): 2858–2859]
- Kathuria V, Kaushik N. 2005. Feeding inhibition of *Helicoverpa armigera* (Hübner) by *Eucalyptus camaldulensis* and *Tylophora indica* extracts. *Insect Science*, 12(4): 249–254
- Kaushik N. 2002. Pesticidal activity of *Eucalyptus* leaf extracts against *Helicoverpa armigera* larvae.//Biodiversity: biomolecular aspects of biodiversity and innovative utilization. New York: Springer, pp. 287–289
- Leather SR. 1987. Pine monoterpenes stimulate oviposition in the pine beauty moth, *Panolis flammea*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 43(3): 295–297
- Li Q, Chen YQ, Liu FY, Guo X, Chen Z, Fu W. 2007. Comparison of beetle (Insecta: Coleoptera) diversity in forest plantations in Yuanmou dry-hot valley. *Chinese Journal of Ecology*, 26(1): 46–50 (in Chinese) [李巧, 陈又清, 刘方炎, 郭萧, 陈祯, 付文. 2007. 元谋干热河谷不同人工林中鞘翅目甲虫多样性比较. *生态学杂志*, 26(1): 46–50]
- Li XG, Liu HX, Liu LP, Ma YM. 2006. Study on host-plant volatiles affecting the host selection of *Dioryctria pryeri*. *Scientia Silvae Sinicae*, 42(6): 71–78 (in Chinese) [李新岗, 刘惠霞, 刘拉平, 马养民. 2006. 影响松果梢斑螟寄主选择的植物挥发物成分研究. *林业科学*, 42(6): 71–78]
- Ma YF, Xiao C. 2013. Push-pull effects of three plant secondary metabolites on oviposition of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella*. *Journal of Insect Science*, 13(1): 128
- Ma YF, Xu Y, Xiao C. 2012. Oviposition attraction effect of ten host-plant volatiles on potato tuber moth, *Phthorimaea operculella*. *Chinese Journal of Biological Control*, 28(3): 448–452 (in Chinese) [马艳粉, 胥勇, 肖春. 2012. 10种寄主植物挥发物对马铃薯块茎蛾产卵的引诱作用. *中国生物防治学报*, 28(3): 448–452]
- Meng GL, Xiao C, Gong XW. 2000. Progress in the study and application of oviposition deterrents of insect. *Acta Entomologica Sinica*, 43(2): 214–224 (in Chinese) [孟国玲, 肖春, 龚信文. 2000. 昆虫产卵抑制素的研究与应用. *昆虫学报*, 43(2): 214–224]
- Poore MED, Fries C. 1985. The ecological effects of *Eucalyptus*. Rome: FAO Forestry Paper No. 59
- Qi RP, Zhou N, Ding GJ, Zhao MS, Xu DK. 1995. Monitoring report

- on pests and diseases of *Eucalyptus globulus*. Yunnan Forestry Science and Technology, (1): 56–60 (in Chinese) [祁荣频, 周楠, 丁光俊, 赵明寿, 徐德楷. 1995. 蓝桉病虫害监测初报. 云南林业科技, (1): 56–60]
- Rembold H, Kohne AC, Schroth A. 1991. Behavioral response of *Heliothis armigera* Hb. (Lep.: Noctuidae) moths on a synthetic chickpea (*Cicer arietinum* L.) kairomone. Journal of Applied Entomology, 112(1/5): 254–262
- Robards K, Haddad PR, Jackson PE. 1994. Principles and practice of modern chromatographic methods. New York: Academic Press
- Rossi YE, Palacios SM. 2015. Insecticidal toxicity of *Eucalyptus cinelea* essential oil and 1,8-cineole against *Musca domestica* and possible uses according to the metabolic response of flies. Industrial Crops and Products, 63: 133–137
- Sharaby A, Abdel-Rahman H, Moawad S. 2009. Biological effects of some natural and chemical compounds on the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* Zell. (Lepidoptera: Gelechiidae). Saudi Journal of Biological Sciences, 16(1): 1–9
- Song AH, Wang Y, Liu YM. 2009. Study on GC-MS analysis of volatile oil constituents from *Eucalyptus globulus* Labill. leaf. Food and Drug, 11(1): 30–32 (in Chinese) [宋爱华, 王颖, 刘艳梅. 2009. 蓝桉叶挥发油化学成分的气相色谱-质谱分析研究. 食品与药品, 11(1): 30–32]
- Städler E. 1974. Host plant stimuli affecting oviposition behavior of the eastern spruce budworm. Entomologia Experimentalis et Applicata, 17(2): 176–188
- Vilela GR, de Almeida GS, D'Arce MABR, Moraes MHD, Brito JO, da Silva MFDGF, Silva SC, de Stefano Piedade SM, Caloridomingues MA, da Gloria EM. 2009. Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. Journal of Stored Products Research, 45 (2): 108–111
- Wingfield MJ, Slippers B, Hurley BP, Coutinho TA, Wingfield BD, Roux J. 2008. Eucalypt pests and diseases: growing threats to plantation productivity. Southern Forests, 70(2): 139–144
- Wu KJ, Gong PY. 1997. A new and practical artificial diet for the cotton bollworm. Insect Science, 4(3): 277–282
- Wu SX, Sun JH, Sheng C. 2008. GC fingerprint of the constituents in the volatile oil of *Eucalyptus globulus* Labill. Chinese Traditional Patent Medicine, 30(3): 318–320 (in Chinese) [吴素香, 孙静芸, 盛春. 2008. GC法建立蓝桉挥发油指纹图谱研究. 中成药, 30 (3): 318–320]
- Yan F, Bengtsson M, Anderson P, Ansebo L, Xu C, Witzgall P. 2004. Antennal response of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) to volatiles in transgenic *Bt* cotton. Journal of Applied Entomology, 128(5): 354–357
- Yan FM, Xu CR, Bengtsson M, Witzgall P, Anderson P. 2002. Volatile compositions of transgenic *Bt* cotton and their electrophysiological effects on the cotton bollworm. Acta Entomologica Sinica, 45 (4): 425–429 (in Chinese) [阎凤鸣, 许崇任, Bengtsson M, Witzgall P, Anderson P. 2002. 转 *Bt* 基因棉挥发性气味的化学成分及其对棉铃虫的电生理活性. 昆虫学报, 45(4): 425–429]
- Yang XW, Guo QM. 2007. Studies on the chemical compounds of the fruit of *Eucalyptus globulus*. China Journal of Chinese Materia Medica, 32(6): 496–500 (in Chinese) [杨秀伟, 郭庆梅. 2007. 蓝桉果实化学成分的研究. 中国中药杂志, 32(6): 496–500]
- Yu XB. 1998. Studies on the productivity and soil properties of continuous *Eucalyptus* plantations in different generations. Ph. D Thesis. Nanjing: Nanjing Forestry University, pp. 29–49 (in Chinese) [余雪标. 1998. 桉树不同连栽代次人工林生产力及土壤性质的研究. 博士学位论文. 南京: 南京林业大学, pp. 29–49]
- Zhou N, Qi RP. 1993. List of major *Eucalyptus* pests in Yunnan. Yunnan Forestry Science and Technology, (2): 61–63, 44 (in Chinese) [周楠, 祁荣频. 1993. 云南主要桉树害虫名录. 云南林业科技, (2): 61–63, 44]

(责任编辑:李美娟)