

载体中蓟马聚集信息素组分的释放速率测定及其储藏温度筛选

李晓维¹ 孙冉冉^{1,2} 章金明¹ 张治军¹ 张立猛³ 吕要斌^{1,2*}

(1. 浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所, 农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室(筹), 杭州 310021; 2. 南京农业大学植物保护学院, 南京 210095; 3. 云南省烟草公司玉溪子公司, 玉溪 653100)

摘要: 为明确蓟马聚集信息素组分在2种常用载体中的释放规律,应用固相微萃取(SPME)和气相色谱-质谱联用技术测定不同聚集信息素剂量(1、10、100 μg)和萃取时间(30、60、120 min)下SPME萃取头对载体中3种蓟马聚集信息素组分的萃取效率,筛选最佳萃取条件,并分析储藏温度对载体中蓟马聚集信息素组分释放速率的影响。结果表明,在橡胶塞和PVC管2种载体中,相同聚集信息素剂量下,与萃取30 min处理相比,萃取60、120 min时SPME萃取头对载体释放的3种聚集信息素组分的萃取效率或无显著差异,或随萃取时间增加而呈现降低趋势;相同萃取时间下,SPME萃取头对载体释放的3种聚集信息素组分的萃取效率均随剂量增加而显著增大。因此,测定载体中聚集信息素释放速率的最佳条件为萃取时间30 min、剂量100 μg 。室温25 $^{\circ}\text{C}$ 储藏条件下,橡胶塞和PVC管中3种聚集信息素组分的释放速率均在存储2 d时最高,之后随存放时间的延长而逐渐降低;-20 $^{\circ}\text{C}$ 储藏条件下,载体中3种聚集信息素组分的释放速率随着存放时间的延长相对稳定,56 d内释放速率均处于较高水平,且显著高于室温下储藏载体中聚集信息素组分的释放速率。表明-20 $^{\circ}\text{C}$ 储藏可有效减少载体中聚集信息素组分的损耗,即-20 $^{\circ}\text{C}$ 是聚集信息素载体储藏的适宜温度。

关键词: 聚集信息素; 缓释载体; 固相微萃取(SPME); 释放速率; 储藏温度

The release rates of thrips aggregation pheromones from two dispensers and the selection of storage temperature

LI Xiaowei¹ SUN Ranran^{1,2} ZHANG Jinming¹ ZHANG Zhijun¹ ZHANG Limeng³ LÜ Yaobin^{1,2*}

(1. State Key Laboratory for Managing Biotic and Chemical Threats to the Quality and Safety of Agro-products, Institute of Plant Protection and Microbiology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, Zhejiang Province, China; 2. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China; 3. Yuxi Tobacco Company, Yuxi 653100, Yunnan Province, China)

Abstract: To understand the release dynamics of the three thrips aggregation pheromone compounds, the extraction efficiency under different pheromone doses and solid phase microextraction (SPME) extraction time was investigated for the three thrips aggregation pheromone compounds from two kinds of dispensers by using SPME and gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS). The effect of storage temperature on the release rates of aggregation pheromone compounds from dispensers was also investigated. The results showed that, for both dispensers, the SPME fiber extraction efficiency of the three aggregation pheromone compounds extracted for 60 min or 120 min was either not significantly different, or significantly lower compared with extraction for 30 min. The doses had significant effect on SPME

基金项目: 浙江省重点研发计划(2018C02032), 国家自然科学基金(31570387), 云南省烟草公司科技计划项目(2017YN13)

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

收稿日期: 2018-12-04

extraction efficiency of the three aggregation pheromone compounds: the higher the dose, the higher the extraction efficiency. Consequently, the optimal experimental conditions for release rate measurement were 30 min of SPME extraction and 100 μg of pheromone compounds. When stored at room temperature (25°C), the release rates of the three aggregation pheromone compounds from two dispensers were the highest after stored for 2 d; the release rates then decreased with the storage time. By contrast, when stored at -20°C , the release rates of the three aggregation pheromone compounds from two dispensers either stayed stable or fluctuated along the storage time, but for 56 d, the release rates were consistently higher than those stored at 25°C . The results indicated that storing at -20°C could greatly reduce the loss of pheromone compounds during storage. Consequently, -20°C is recommended as the storage temperature for aggregation pheromone dispensers.

Key words: aggregation pheromone; dispenser; solid phase microextraction (SPME); release rate; storage temperature

蓟马常通过直接取食或间接传播病毒,给作物生产带来了巨大的经济损失,是农作物上常见的重要害虫(Lewis, 1997)。目前在全球分布比较广且给农作物造成巨大危害的蓟马种类主要有蓟马属的棕榈蓟马 *Thrips palmi*、花蓟马属的花蓟马 *Frankliniella intonsa* 和西花蓟马 *F. occidentalis* 等(Lewis, 1997; Wang et al., 2010; Reitz et al., 2011)。由于蓟马个体微小、隐蔽性强、繁殖力强、极易产生抗药性等特点,蓟马信息素的研究及其在蓟马防控中的应用成为了热点,其中对蓟马聚集信息素的研究最广泛,5种主要蓟马害虫西花蓟马、花蓟马、棕榈蓟马、普通大蓟马 *Megalurothrips usitatus* 和丝大蓟马 *M. sjostedti* 的聚集信息素已被分离鉴定(李晓维等, 2019a, b; Niassy et al., 2019)。西花蓟马和花蓟马的聚集信息素主要活性成分相同,均为(*S*)-2-甲基丁酸橙花酯和(*R*)-乙酸薰衣草酯,但这2种组分的释放比例在西花蓟马和花蓟马中差异非常大(Hamilton et al., 2005; Zhang et al., 2011; 祝晓云等, 2012)。棕榈蓟马的聚集信息素活性组分与花蓟马和西花蓟马不同,主要活性组分为(*R*)-3-甲基-3-丁烯酸薰衣草酯(Akella et al., 2014)。最新报道显示,丝大蓟马雄虫同样能够产生聚集信息素,其主要成分为(*R*)-3-丁烯酸薰衣草酯和(*R*)-薰衣草醇(Niassy et al., 2019);而普通大蓟马释放的聚集信息素组分为*E, E*-金合欢醇乙酸酯(李晓维等, 2019a)。基于西花蓟马、花蓟马聚集信息素现已开发出高效引诱剂产品,并在蓟马的绿色防控中得到一定应用(吕要斌等, 2015a, b)。

由于昆虫信息素的组分多具有挥发性,在自然条件下易挥发和降解,需要借助缓释载体保持信息素的稳定性并使其可以均匀释放(Vrkoč et al., 1988)。昆虫信息素诱芯的效果与载体中信息素释

放速率等因素密切相关(荆慧荣和刘孟英, 1996),而载体中昆虫信息素的释放速率受载体材料、载体表面膜厚度、浓度及温度等多种因素影响(吴兆学和赵德仁, 1990)。同时,昆虫信息素诱芯在制备、包装、运输和储藏的过程中同样会发生信息素的损失和降解。因此,明确载体中信息素组分的释放模式及其最佳储藏条件对信息素诱芯的合理应用具有重要的实践意义。

固相微萃取(solid phase microextraction, SPME)是一种新型的样品前处理技术,被广泛应用于多个研究领域(傅若农, 2008)。SPME目前已用于昆虫信息素的分析鉴定(Hamilton et al., 2005; 孔祥波等, 2010; 刘位芬等, 2018)、释放节律研究(李晓维等, 2017)等方面。SPME的成功应用与萃取条件密切相关。影响SPME的因素包括样品量、样品pH、萃取时间、萃取温度、萃取涂层种类等(Ridgway et al., 2007; Wardencki et al., 2007)。前期研究结果表明,美国Supelco公司的SPME萃取头(polydimethylsiloxane coating, 100 μm)可用于蓟马聚集信息素组分的分析(Hamilton et al., 2005; Zhang et al., 2011; Akella et al., 2014)。然而,对于测定载体释放的人工合成聚集信息素组分的萃取条件尚未明确。因此,本研究采用SPME和气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS)联用技术测定SPME萃取头对绿色橡胶塞和PVC管2种常见载体释放的3种人工合成聚集信息素组分的萃取效率,明确SPME和GC-MS技术在测定蓟马聚集信息素释放速率时的最优条件,同时分析储藏温度对诱芯中信息素组分释放速率的影响,筛选聚集信息素诱芯的最佳储藏温度,以期为蓟马聚集信息素的应用提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

聚集信息素:西花蓟马和花蓟马的聚集信息素组分(*R*)-乙酸薰衣草酯(*(R)*-lavandulyl acetate)和(*S*)-2-甲基丁酸橙花酯(*neryl(S)*-2-methylbutanoate)按照 Hamilton et al.(2005)方法合成,纯度 $\geq 98\%$,旋光异构体 $\geq 99\%$;棕榈蓟马聚集信息素组分(*R*)-3-甲基-3-丁烯酸薰衣草酯(*(R)*-lavandulyl 3-methyl-3-butenate)按照 Akella et al.(2014)方法合成,纯度 $\geq 98\%$,旋光异构体 $\geq 99\%$ 。

载体:选择2种市场上广泛应用的诱芯载体绿色天然橡胶塞和PVC管。绿色天然橡胶塞直径1 cm、长1.5 cm,购于北京中捷四方生物科技有限公司,使用前用正己烷浸泡24 h,于80℃烘干2 h,待正己烷挥发干净后装入密封玻璃瓶中备用;PVC管外径1.2 mm、壁厚0.25 mm、长8 cm,购于杨凌翔林农业科技化工有限公司。

试剂及仪器:99%正己烷,色谱纯,上海迈瑞化学技术有限公司;其余试剂均为国产分析纯。固相微萃取装置由手动进样手柄和萃取头组成,萃取头固定相为聚二甲基硅氧烷,固定相涂层厚度为100 μm ,美国Supelco公司;QP2010 Plus气相色谱-质谱联用仪,日本岛津公司;GXZ型智能型光照培养箱,宁波江南仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 聚集信息素组分标准曲线的制作

利用正己烷溶液分别将(*R*)-乙酸薰衣草酯稀释为0、1、10、50、100、200 ng/ μL 系列浓度,将(*S*)-2-甲基丁酸橙花酯和(*R*)-3-甲基-3-丁烯酸薰衣草酯均稀释为0、1、5、10、50 ng/ μL 系列浓度,分别取3种聚集信息素组分每个浓度的溶液1 μL 注射到GC-MS联用仪中,测定总离子流图中该物质的色谱峰面积,分别制定3种聚集信息素组分剂量与其色谱峰面积的标准曲线。

GC-MS联用仪工作条件:色谱柱Rxi-5MS,长30 m、内径0.32 mm、膜厚0.25 μm ;无分流进样;程序升温:40℃保持2 min,以10℃/min升到120℃后,以6℃/min升到180℃,再以10℃/min升到250℃,保持1 min;进样口温度为200℃;载气为He($> 99.999\%$);离子源EI,离子源温度230℃;四级杆温度150℃;电子能量70 eV;扫描质量范围介于35~320 amu之间(Zhang et al., 2011)。聚集信息素的成分分析鉴定利用仪器自带的NIST08谱图库及3种高纯度合成化合物质谱图进行比对。

1.2.2 SPME萃取头对聚集信息素萃取效率的测定

用移液器或进样针分别将剂量为1、10、100 μg 的3种聚集信息素组加入绿色橡胶塞和PVC管2种载体中,PVC管进样后两端用打火机封口。将制备好的带样载体放置在温度为 $25\pm 1^\circ\text{C}$ 、相对湿度为 $(60\pm 5)\%$ 、光照周期为14 L:10 D的光照培养箱中,2 h后采用顶空采样法利用SPME萃取头分别萃取载体中释放的聚集信息素组分30、60、120 min。萃取前,将SPME萃取头在气相色谱进样口中于200℃下活化1 h,以去除萃取头中吸附的杂质。萃取时,首先把待测的带样载体放入20 mL的封闭样品瓶中,将萃取头刺穿样品瓶盖上的胶垫插入到释放空间萃取载体释放的聚集信息素组分。2种载体在每种剂量、每个萃取时间处理下均设3次重复。通过GC-MS联用仪测定不同剂量、不同萃取时间下SPME萃取头对载体释放的3种聚集信息素的萃取效率,工作条件同1.2.1。基于GC-MS联用仪分析得到3种聚集信息素的总离子流图色谱峰面积,根据1.2.1所得标准曲线计算SPME萃取头对3种聚集信息素的萃取量,并计算单位时间内SPME萃取头对聚集信息素的萃取效率,以明确聚集信息素的最佳萃取条件。

1.2.3 储藏温度对载体中聚集信息素释放速率的影响

根据1.2.2筛选出的最佳萃取条件,分别将浓度为100 μg 的3种聚集信息素组用移液枪和进样针加入绿色橡胶塞和PVC管2种载体中,PVC管进样后两端用打火机封口。将制备好的带样载体装入封口袋中,分别放置在温度为 $25\pm 1^\circ\text{C}$ 、相对湿度为 $(60\pm 5)\%$ 、光照周期为14 L:10 D的光照培养箱和 -20°C 冰箱中,储藏2 d后取出,采用顶空采样法利用SPME萃取头萃取30 min,萃取方法同1.2.2。测完后将带样载体重新放回原储藏温度条件下,之后每7 d按照上述方法测定1次,连续测定8次。每种聚集信息素组分在每种载体、每种储藏温度下均设4次重复。通过GC-MS联用仪测定每种载体、每个储藏温度下载体中3种聚集信息素的释放速率,工作条件同1.2.1。基于GC-MS联用仪分析得到3种聚集信息素的总离子流图色谱峰面积,根据1.2.1所得标准曲线计算SPME萃取头对聚集信息素的萃取量,并计算单位时间内聚集信息素的释放速率,以明确储藏温度对载体中聚集信息素释放速率的影响。

1.3 数据分析

试验数据应用SPSS 16.0软件进行统计分析。聚集信息素组分剂量和萃取时间对每种载体释放的

3种聚集信息素组分萃取效率的影响采用双因素方差分析(two-way analysis of variance, two-way ANOVA),应用Tukey HSD法进行差异显著性检验。2种载体中3种聚集信息素组分在2种储藏温度下的释放速率比较采用一般线性模型中的重复测量方差分析。采用Sigma Plot 12.5软件作图。

2 结果与分析

2.1 SPME萃取头对橡胶塞中聚集信息素的萃取效率

在绿色橡胶塞载体中,信息素剂量对3种聚集信息素组分的SPME萃取效率均有显著影响,萃取时间仅对(R)-3-甲基-3-丁烯酸薰衣草酯的SPME萃取效率有显著影响;萃取时间和聚集信息素剂量的交

互作用对(R)-乙酸薰衣草酯和(S)-2-甲基丁酸橙花酯的SPME萃取效率无显著影响,但对(R)-3-甲基-3-丁烯酸薰衣草酯的SPME萃取效率有显著影响(表1)。

相同萃取时间下,SPME萃取头对绿色橡胶塞中3种聚集信息素组分(R)-乙酸薰衣草酯(30 min: $F_{2,8}=162.069, P<0.001$; 60 min: $F_{2,8}=95.869, P<0.001$; 120 min: $F_{2,8}=326.900, P<0.001$)、(S)-2-甲基丁酸橙花酯(30 min: $F_{2,8}=162.069, P<0.001$; 60 min: $F_{2,8}=122.517, P<0.001$; 120 min: $F_{2,8}=8.281, P=0.019$)和(R)-3-甲基-3-丁烯酸薰衣草酯(30 min: $F_{2,8}=47.113, P<0.001$; 60 min: $F_{2,8}=20.251, P=0.002$; 120 min: $F_{2,8}=75.170, P<0.001$)的萃取效率均随剂量增加而显著增大(图1)。

表1 萃取时间和信息素剂量以及两者交互对绿色橡胶塞释放的3种聚集信息素组分萃取效率的双因素方差分析

Table 1 Two-way ANOVA for the effects of extraction time, dose of pheromones and their interaction on the extraction efficiency of three aggregation pheromone compounds released from green rubber septa

聚集信息素组分 Aggregation pheromone compound	因素 Factor	自由度 df	F	P
(R)-乙酸薰衣草酯 (R)-lavandulyl acetate	萃取时间 Extraction time	2	1.715	0.208
	剂量 Dose	2	118.962	<0.001
	萃取时间×剂量 Extraction time×dose	4	1.204	0.343
(S)-2-甲基丁酸橙花酯 Neryl (S)-2-methylbutanoate	萃取时间 Extraction time	2	0.176	0.840
	剂量 Dose	2	55.538	<0.001
	萃取时间×剂量 Extraction time×dose	4	0.187	0.942
(R)-3-甲基-3-丁烯酸薰衣草酯 (R)-lavandulyl 3-methyl-3-butenoate	萃取时间 Extraction time	2	13.022	<0.001
	剂量 Dose	2	78.654	<0.001
	萃取时间×剂量 Extraction time×dose	4	11.821	<0.001

同剂量时,SPME萃取头对绿色橡胶塞中(R)-乙酸薰衣草酯(100 μg : $F_{2,8}=1.369, P=0.324$; 10 μg : $F_{2,8}=1.860, P=0.235$; 1 μg : $F_{2,8}=1.854, P=0.236$)和(S)-2-甲基丁酸橙花酯(100 μg : $F_{2,8}=0.183, P=0.837$; 10 μg : $F_{2,8}=4.419, P=0.066$)的萃取效率在不同萃取时间之间均无显著差异(图1-A~B)。SPME萃取头对(R)-3-甲基-3-丁烯酸薰衣草酯的萃取效率随着萃取时间延长而显著降低(100 μg : $F_{2,8}=12.229, P=0.008$; 10 μg : $F_{2,8}=7.918, P=0.021$; 图1-C),其中萃取30 min处理显著高于萃取120 min处理,两者与萃取60 min处理均无显著差异。(S)-2-甲基丁酸橙花酯和(R)-3-甲基-3-丁烯酸薰衣草酯在最低剂量1 μg 时,已低于仪器对两者的检测下限,未检测到。

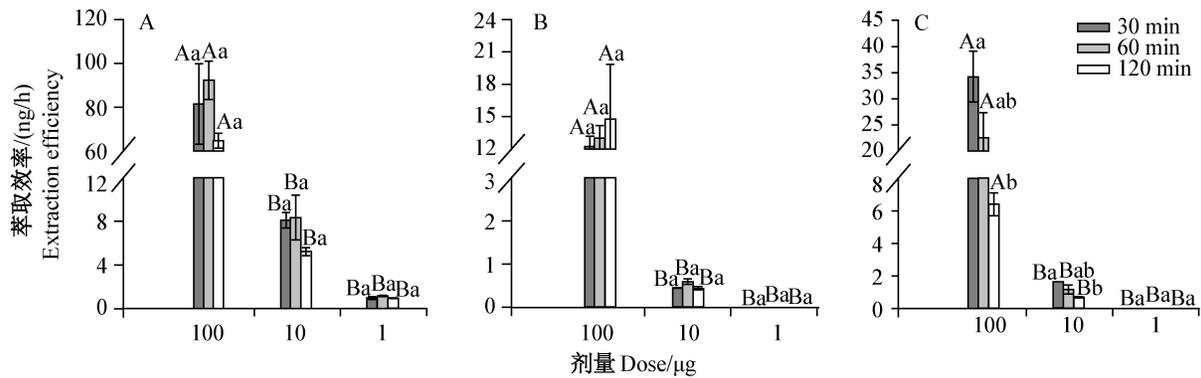
综合上述试验结果和后续长期释放规律测定的要求,确定萃取时间30 min、聚集信息素剂量100 μg 为绿色橡胶塞载体中3种聚集信息素长期释放速率

测定的最佳条件。

2.2 SPME萃取头对PVC管中聚集信息素的萃取效率

在PVC管载体中,除了萃取时间对(S)-2-甲基丁酸橙花酯的SPME萃取效率无显著影响外,萃取时间、信息素剂量以及两者的交互作用对3种聚集信息素组分的SPME萃取效率均有显著影响(表2)。

相同萃取时间下,SPME萃取头对PVC管中3种聚集信息素组分(R)-乙酸薰衣草酯(30 min: $F_{2,8}=117.142, P<0.001$; 60 min: $F_{2,8}=99.097, P<0.001$; 120 min: $F_{2,8}=1050.789, P<0.001$)、(S)-2-甲基丁酸橙花酯(30 min: $F_{2,8}=421.771, P<0.001$; 60 min: $F_{2,8}=83.913, P<0.001$; 120 min: $F_{2,8}=101.642, P<0.001$)和(R)-3-甲基-3-丁烯酸薰衣草酯(30 min: $F_{2,8}=150.195, P<0.001$; 60 min: $F_{2,8}=408.079, P<0.001$; 120 min: $F_{2,8}=1137.450, P<0.001$)的萃取效率均随着剂量的增加而显著增大(图2)。



A: (*R*)-乙酸薰衣草酯; B: (*S*)-2-甲基丁酸橙花酯; C: (*R*)-3-甲基-3-丁烯酸薰衣草酯。

A: (*R*)-lavandulyl acetate; B: neryl (*S*)-2-methylbutanoate; C: (*R*)-lavandulyl 3-methyl-3-butenote.

图1 不同萃取时间、不同剂量处理下SPME萃取头对绿色橡胶塞释放的3种聚集信息素组分的萃取效率

Fig. 1 The SPME fiber extraction efficiency of the three aggregation pheromone compounds released from green rubber septa at different extraction times and different doses

图中数据为平均数±标准误。不同大、小写字母分别表示相同萃取时间不同剂量之间、相同剂量不同萃取时间之间经Tukey HSD法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. Different uppercase or lowercase letters indicate significant difference among different doses for the same extraction time or among different extraction times at the same dose at $P<0.05$ level by Tukey HSD test, respectively.

表2 萃取时间和信息素剂量以及两者互作对PVC管载体释放的3种聚集信息素组分萃取效率的双因素方差分析

Table 2 Two-way ANOVA for the effects of extraction time, dose of pheromones and their interaction on the extraction efficiency of three aggregation pheromone compounds released from PVC tubes

聚集信息素组分 Aggregation pheromone compound	因素 Factor	自由度 <i>df</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
<i>(R)</i> -乙酸薰衣草酯 <i>(R)</i> -lavandulyl acetate	萃取时间 Extraction time	2	25.327	<0.001
	剂量 Dose	2	326.382	<0.001
	萃取时间×剂量 Extraction time×dose	4	20.846	<0.001
<i>(S)</i> -2-甲基丁酸橙花酯 Neryl (<i>S</i>)-2-methylbutanoate	萃取时间 Extraction time	2	3.461	0.053
	剂量 Dose	2	332.246	<0.001
	萃取时间×剂量 Extraction time×dose	4	3.371	0.032
<i>(R)</i> -3-甲基-3-丁烯酸薰衣草酯 <i>(R)</i> -lavandulyl 3-methyl-3-butenote	萃取时间 Extraction time	2	7.641	0.004
	剂量 Dose	2	757.416	<0.001
	萃取时间×剂量 Extraction time×dose	4	7.242	0.001

相同剂量时,SPME萃取头对PVC管中(*R*)-乙酸薰衣草酯的萃取效率随萃取时间的延长而显著降低(100 µg: $F_{2,8}=22.420, P=0.002$; 10 µg: $F_{2,8}=11.094, P=0.010$; 1 µg: $F_{2,8}=20.931, P=0.002$; 图2-A)。在100 µg和10 µg剂量下,SPME萃取头对(*S*)-2-甲基丁酸橙花酯的萃取效率随萃取时间的延长均无显著差异(100 µg: $F_{2,8}=3.638, P=0.092$; 10 µg: $F_{2,8}=0.177, P=0.842$),在1 µg剂量下,萃取120 min处理显著高于萃取30 min处理($F_{2,8}=7.368, P=0.024$),但两者与萃取60 min处理均无显著差异(图2-B)。在100 µg和1 µg剂量下,SPME萃取头对(*R*)-3-甲基-3-丁烯酸薰衣草酯的萃取效率在萃取30 min时最高(100 µg:

$F_{2,8}=7.575, P=0.023$; 1 µg: $F_{2,8}=12.016, P=0.008$),在10 µg剂量下,3个萃取时间处理之间均无显著差异($F_{2,8}=0.098, P=0.908$; 图2-C)。

综合上述试验结果和后续长期释放规律测定的要求,确定萃取时间30 min、聚集信息素剂量100 µg为PVC管载体中3种聚集信息素长期释放速率测定的最佳条件。

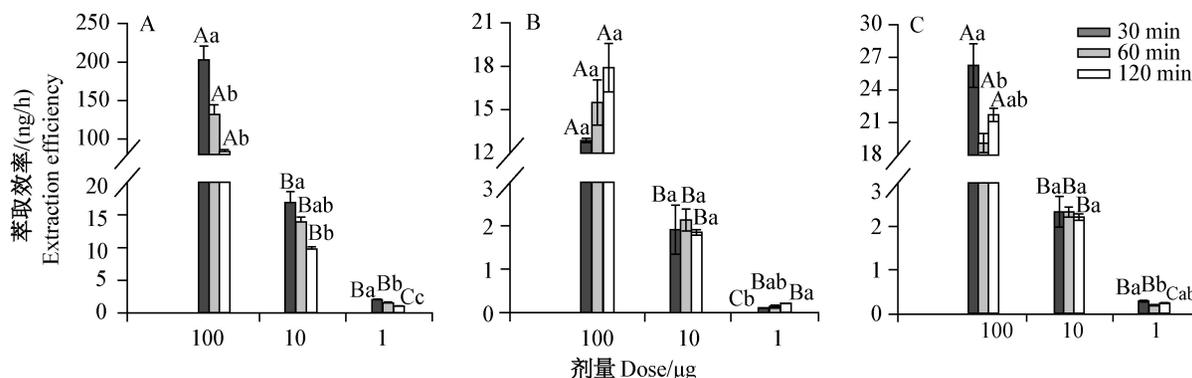
2.3 储藏温度对橡胶塞中聚集信息素释放速率的影响

储藏温度对绿色橡胶塞中3种聚集信息素组分(*R*)-乙酸薰衣草酯($F=4\ 546.086, df=1, P<0.001$)、(*S*)-2-甲基丁酸橙花酯($F=119.307, df=1, P<0.001$)和(*R*)-3-甲基-3-丁烯酸薰衣草酯($F=141.556, df=1,$

$P < 0.001$)的释放速率均有显著影响(图3)。

室温25℃条件下,存放时间对绿色橡胶塞中3种聚集信息素组分(*R*)-乙酸薰衣草酯($F=100.701$, $df=1.185$, $P=0.001$;图3-A)、(*S*)-2-甲基丁酸橙花酯($F=98.790$, $df=1.842$, $P < 0.001$;图3-B)和(*R*)-3-甲基-3-丁烯酸薰衣草酯($F=69.393$, $df=1.398$, $P=0.001$;图3-C)的释放速率均有显著影响,释放速率随着存放时间的延长逐渐降低。-20℃条件下,存放时间对绿色橡胶塞中(*R*)-乙酸薰衣草酯($F=12.673$, $df=2.132$, $P=0.006$)和(*R*)-3-甲基-3-丁烯酸薰衣草酯($F=5.101$, $df=2.360$, $P=0.039$)的释放速率有显著影响,

释放速率随时间变化有一定的起伏,但总体保持较高的释放速率;但对(*S*)-2-甲基丁酸橙花酯的释放速率无显著影响($F=3.514$, $df=2.032$, $P=0.096$),释放速率一直保持较高水平(图3)。除了(*R*)-3-甲基-3-丁烯酸薰衣草酯的释放速率在-20℃和25℃下储藏2 d时无显著差异外,-20℃下储藏2~56 d的橡胶塞中3种聚集信息素组分的释放速率均显著高于室温下储藏载体中3种组分的释放速率((*R*)-乙酸薰衣草酯: $F=4546.086$, $df=1$, $P < 0.001$;(*S*)-2-甲基丁酸橙花酯: $F=119.307$, $df=1$, $P < 0.001$;(*R*)-3-甲基-3-丁烯酸薰衣草酯: $F=141.556$, $df=1$, $P < 0.001$)。



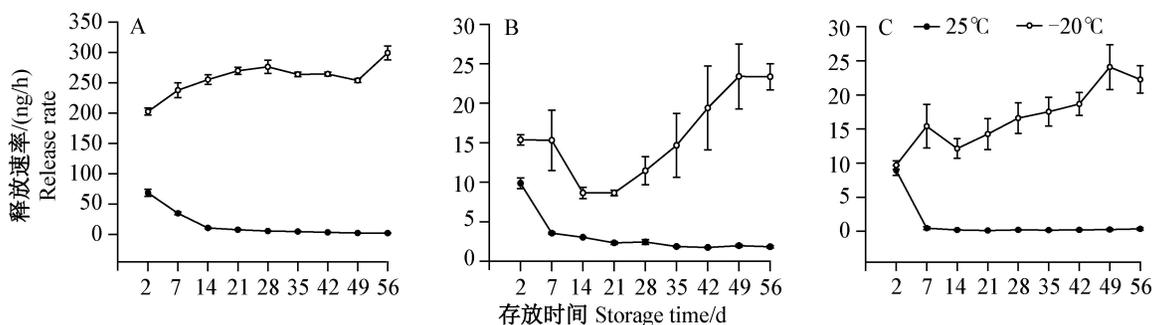
A: (*R*)-乙酸薰衣草酯; B: (*S*)-2-甲基丁酸橙花酯; C: (*R*)-3-甲基-3-丁烯酸薰衣草酯。

A: (*R*)-lavandulyl acetate; B: neryl (*S*)-2-methylbutanoate; C: (*R*)-lavandulyl 3-methyl-3-butenate.

图2 不同萃取时间、不同剂量处理下SPME萃取头对PVC管载体释放的3种聚集信息素组分的萃取效率

Fig. 2 The SPME fiber extraction efficiency of the three aggregation pheromone compounds released from PVC tubes at different extraction times and different doses

图中数据为平均数±标准误。不同大、小写字母分别表示相同萃取时间不同剂量之间、相同剂量不同萃取时间之间经Tukey HSD法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. Different uppercase or lowercase letters indicate significant difference among different doses for the same extraction time or among different extraction times at the same dose at $P < 0.05$ level by Tukey HSD test, respectively.



A: (*R*)-乙酸薰衣草酯; B: (*S*)-2-甲基丁酸橙花酯; C: (*R*)-3-甲基-3-丁烯酸薰衣草酯。

A: (*R*)-lavandulyl acetate; B: neryl (*S*)-2-methylbutanoate; C: (*R*)-lavandulyl 3-methyl-3-butenate.

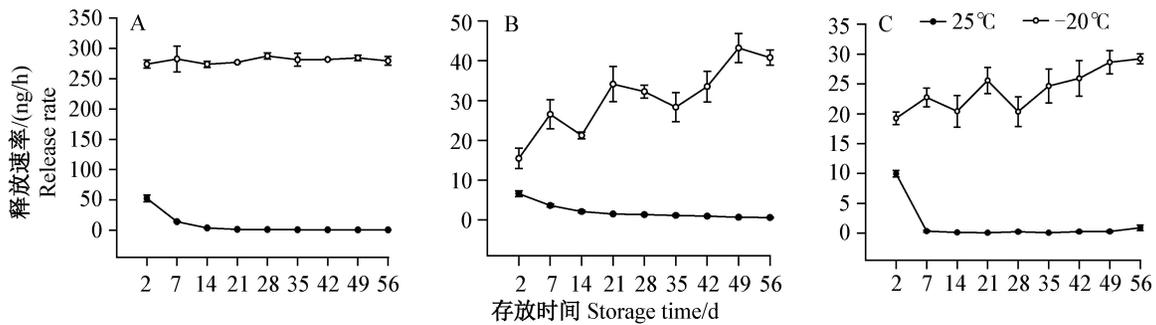
图3 绿色橡胶塞中3种聚集信息素组分在2种储藏温度下的释放速率

Fig. 3 Release rates of three aggregation pheromone compounds from green rubber septa under two storage temperatures
图中数据为平均数±标准误。Data are mean±SE.

2.4 储藏温度对PVC管中聚集信息素释放速率的影响

储藏温度对PVC管中3种聚集信息素组分(*R*)-乙酸薰衣草酯($F=2463.221$, $df=1$, $P < 0.001$)、(*S*)-2-

甲基丁酸橙花酯($F=169.364$, $df=1$, $P < 0.001$)和(*R*)-3-甲基-3-丁烯酸薰衣草酯($F=638.593$, $df=1$, $P < 0.001$)的释放速率均有显著影响(图4)。



A: (*R*)-乙酸薰衣草酯; B: (*S*)-2-甲基丁酸橙花酯; C: (*R*)-3-甲基-3-丁烯酸薰衣草酯。

A: (*R*)-lavandulyl acetate; B: neryl (*S*)-2-methylbutanoate; C: (*R*)-lavandulyl 3-methyl-3-butenate.

图4 PVC管中3种聚集信息素组分在2种储藏温度下的释放速率

Fig. 4 Release rates of three aggregation pheromone compounds from PVC tubes under two storage temperatures

图中数据为平均数±标准误。Data are mean±SE.

室温25℃条件下,存放时间对PVC管中3种聚集信息素组分(*R*)-乙酸薰衣草酯($F=77.056$, $df=1.042$, $P=0.003$;图4-A)、(*S*)-2-甲基丁酸橙花酯($F=51.509$, $df=1.587$, $P=0.001$;图4-B)和(*R*)-3-甲基-3-丁烯酸薰衣草酯($F=121.047$, $df=1.973$, $P<0.001$;图4-C)的释放速率均有显著影响,释放速率随着存放时间的延长逐渐降低。-20℃条件下,存放时间对PVC管中(*R*)-乙酸薰衣草酯($F=0.355$, $df=1.458$, $P=0.659$)和(*R*)-3-甲基-3-丁烯酸薰衣草酯($F=2.858$, $df=1.599$, $P=0.154$)的释放速率均无显著影响,释放速率一直保持在较高水平;而存放时间对(*S*)-2-甲基丁酸橙花酯的释放速率有显著影响($F=13.834$, $df=1.810$, $P=0.008$),释放速率随着存放时间的延长变化起伏较大,但总体保持较高的释放速率(图4)。-20℃下储藏2~56 d的PVC管中3种聚集信息素组分的释放速率均显著高于室温下储藏载体中3种组分的释放速率((*R*)-乙酸薰衣草酯: $F=2\,463.221$, $df=1$, $P<0.001$);(*S*)-2-甲基丁酸橙花酯: $F=169.364$, $df=1$, $P<0.001$);(*R*)-3-甲基-3-丁烯酸薰衣草酯: $F=638.593$, $df=1$, $P<0.001$)。

3 讨论

本研究应用SPME和GC-MS联用技术测定了SPME萃取头对绿色橡胶塞和PVC管2种常见载体释放的3种人工合成聚集信息素组分的萃取效率,发现3种人工合成聚集信息素组分的SPME萃取效率与信息素组分量度和萃取时间密切相关。萃取时间是影响SPME萃取效率的重要因素之一。一般情况下,萃取时间越长,萃取头纤维膜上萃取的挥发性化合物分子越多,然而当萃取头纤维膜涂层达到饱和后,萃取时间的延长则对萃取效率不再有影响,甚至会出现解吸附现象(Zhang & Pawliszyn, 1993)。Bertelli et al.(2008)利用SPME法测定柑橘属植物

花蜜中的邻氨基苯甲酸甲酯含量时发现,其萃取效果随着时间延长呈现先增加后降低的趋势;牛永浩(2015)采用SPME法提取储粮害虫挥发性化合物时也发现,随着萃取时间的增加,萃取效率先增加后降低。本研究利用SPME法对2种载体中3种聚集信息素组分进行萃取时发现,萃取时间对萃取效率或没有显著影响,或随着时间的延长呈下降趋势,说明所选取的萃取头对不同聚集信息素组分的萃取效率存在差异,因此采用SPME法萃取3种聚集信息素的最优萃取时间建议为30 min。样品浓度同样影响SPME的萃取效率。本研究采用SPME法对3种聚集信息素组分进行萃取时发现,萃取效率均随着聚集信息素剂量的增加呈增加趋势,因此建议将100 μg作为测定聚集信息素释放规律的剂量。

化合物的性质、载体类型同样会影响化合物的释放速率。不同化合物在同一缓释载体中的释放速率差异很大。如松墨天牛 *Monochamus alternatus* 聚集信息素组分(+/-)- α -蒎烯和乙醇在聚乙烯类缓释载体中的释放速率存在显著差异,前者释放速率为后者的6倍多(Teale et al., 2011);小蠹烯醇类聚集信息素成分在聚氯乙烯塑料膜缓释载体中的释放速率是0.05~0.20 mg/d,小蠹二烯醇的释放速率为0.005~0.15 mg/d(李学琳等,2015)。本研究结果显示,在绿色橡胶塞和PVC管2种载体中,(*R*)-乙酸薰衣草酯的释放速率最高,(*R*)-3-甲基-3-丁烯酸薰衣草酯的释放速率次之,(*S*)-2-甲基丁酸橙花酯的释放速率最低,说明(*R*)-乙酸薰衣草酯的挥发性最强,(*R*)-3-甲基-3-丁烯酸薰衣草酯次之,(*S*)-2-甲基丁酸橙花酯的挥发性最低。气体分子的扩散速率与相对分子质量有关,相对分子质量越大,扩散速率越大,(*R*)-乙酸薰衣草酯的相对分子质量为196,(*R*)-3-甲基-3-丁烯酸薰衣草酯的相对分子质量为236,(*S*)-

2-甲基丁酸橙花酯的相对分子质量为238,与上述测定的释放速率大小相吻合。另外,同种信息素组分在不同载体中的释放速率也存在很大差异(刘奎伟等,2012;李学琳等;2015;朱诚棋等;2017)。本研究初步发现3种聚集信息素组分在PVC管中的释放速率高于在橡胶塞中的释放速率,而关于3种聚集信息素组分在2种载体中的长期释放规律比较有待进一步深入研究。

载体储藏温度对其装载的信息素组分所发挥效果的影响很大。一般而言,生物活性物质在低温情况下可以得到有效保存。宣维健等(2003)研究发现,室温不利于二化螟 *Chilo suppressalis* 性诱剂诱芯的保存, -18℃和-4℃低温有利于诱芯的保存,且温度越低保存效果越好。本研究结果与上述结果相同,发现在25℃室温储藏条件下,3种聚集信息素的释放速率随着存放时间的延长逐渐降低;-20℃储藏条件下,3种聚集信息素的释放速率随着存放时间的延长或相对稳定,或有一定程度的起伏,但56 d内释放速率均维持在较高水平,且显著高于室温存储载体中3种聚集信息素的释放速率,表明-20℃储藏可有效减少载体中聚集信息素组分的损耗,即-20℃可作为聚集信息素载体的适宜储藏温度。该结果将为蓟马聚集信息素诱芯的储藏和批量生产提供重要指导价值。低温保存虽然可以有效减少诱芯中信息素组分的损耗,但保存时间的长短仍会对诱芯的诱虫活性产生影响。如肖留斌等(2010)研究结果表明,斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 性信息素橡胶塞诱芯置于冰箱储藏1年或2年,诱蛾活性显著下降60%以上。因此,除了需要明确合适的储藏温度外,低温储藏时间对信息素诱芯诱集效果的影响也需要进一步研究。

本研究基于SPME和GC-MS联用技术初步明确了室内恒定条件下不同蓟马聚集信息素组分的释放特性差异和不同载体对聚集信息素缓释效果的差异,这将对进一步明确不同蓟马聚集信息素的释放模式、筛选合适载体具有指导意义。信息素诱芯在田间应用过程中的释放受光照、风速、温度等多方面因素影响;诱芯的田间诱集效果同样受诱捕器类型、颜色、悬挂高度、密度等因素影响(肖留斌等,2010;鞠倩等,2014;曹盼盼等,2016)。因此,需要进一步探索蓟马聚集信息素诱芯的田间释放规律。

参 考 文 献 (References)

AKELLA SVS, KIRK WDJ, LU YB, MURAI T, WALTERS KFA, HAMILTON JGC. 2014. Identification of the aggregation pheromone

- of the melon thrips, *Thrips palmi*. PLoS ONE, 9(8): e103315
- BERTELLI D, PAPOTTI G, LOLLI M, SABATINI AG, PLESSI M. 2008. Development of an HS-SPME-GC method to determine the methyl anthranilate in *Citrus* honeys. Food Chemistry, 108(1): 297-303
- CAO PP, LU CK, WANG XQ. 2016. Field trapping assessment and population dynamics of *Apolygus lucorum* in vineyards. Journal of Plant Protection, 43(3): 523-524 (in Chinese) [曹盼盼, 路常宽, 王晓勤. 2016. 绿盲蝽性诱剂在葡萄园诱捕效果及种群动态监测. 植物保护学报, 43(3): 523-524]
- FU RN. 2008. The evolution and advances of solid phase microextraction. Chemical Reagents, 30(1): 13-22 (in Chinese) [傅若农. 2008. 固相微萃取(SPME)的演变和现状. 化学试剂, 30(1): 13-22]
- HAMILTON JGC, HALL DR, KIRK WDJ. 2005. Identification of a male-produced aggregation pheromone in the western flower thrips *Frankliniella occidentalis*. Journal of Chemical Ecology, 31(6): 1369-1379
- JING HR, LIU MY. 1996. The influence of rubber substrates on isomerization of the sex pheromone compounds of the pin caterpillar moth in pheromone dispensers. Acta Entomologica Sinica, 39(2): 126-132 (in Chinese) [荆慧荣, 刘孟英. 1996. 几种橡胶载体对马尾松毛虫性信息素几何构型异构化的影响. 昆虫学报, 39(2): 126-132]
- JU Q, LI X, JIANG XJ, ZHAO ZQ, JIANG XG, NI WL, QU MJ. 2014. Characterization of female sex-pheromone in *Holotrichia parallela* (Coleoptera, Scarabaeidae, Melolonthinae) of Qingdao population and their application in the field. Journal of Plant Protection, 41(2): 197-202 (in Chinese) [鞠倩, 李晓, 姜晓静, 赵志强, 蒋相国, 倪婉莉, 曲明静. 2014. 青岛地区暗黑鳃金龟性信息素鉴定及田间应用技术. 植物保护学报, 41(2): 197-202]
- KONG XB, ZHAO LL, ZHANG Z, WANG HB, BAI FH, YU GM. 2010. Solid-phase microextraction of pheromone components of *Dendrolimus houi* (Lepidoptera: Lasiocampidae) and their characterization by gas chromatography-mass spectrometry and GC-electroantennographic detection. Acta Entomologica Sinica, 53(8): 857-863 (in Chinese) [孔祥波, 赵莉茜, 张真, 王鸿斌, 柏芳华, 于国民. 2010. 松毛虫性信息素的固相微萃取及质谱和触角电位分析. 昆虫学报, 53(8): 857-863]
- LEWIS T. 1997. Thrips as crop pests. Wallingford, UK: CAB International
- LI XL, KONG XB, ZHANG SF, WANG HB, ZHANG Z, YANG MF. 2015. Researches on the release rates of four types of insect semiochemicals from four dispenser types. Scientia Silvae Sinicae, 51(12): 63-70 (in Chinese) [李学琳, 孔祥波, 张苏芳, 王鸿斌, 张真, 杨茂发. 2015. 4类昆虫信息化学物质在不同缓释载体上的释放速率. 林业科学, 51(12): 63-70]
- LI XW, LUO XJ, WANG LK, ZHANG JM, ZHANG ZJ, HUANG J, WU JH, LÜ YB. 2019a. Isolation and identification of the aggregation pheromone in *Megalurothrips usitatus* (Thysanoptera: Thripidae). Acta Entomologica Sinica, 62(9): 1017-1027 (in Chinese) [李晓维, 罗雪君, 王丽坤, 章金明, 张治军, 黄俊, 吴建辉, 吕要斌. 2019a. 普通大蓟马聚集信息素的分离和鉴定. 昆虫学报, 62(9): 1017-1027]

- LI XW, SUN RR, ZHANG JM, ZHANG ZJ, LÜ YB. 2017. Mating behavior and aggregation pheromone release rhythm of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) adults during photophase. *Acta Entomologica Sinica*, 60(12): 1439–1446 (in Chinese) [李晓维, 孙冉冉, 章金明, 张治军, 吕要斌. 2017. 西花蓟马成虫昼间交配习性和聚集信息素释放节律. *昆虫学报*, 60(12): 1439–1446]
- LI XW, ZHANG JM, ZHANG ZJ, WANG LK, LÜ YB. 2019b. Advances in the research and application of thrips pheromones. *Journal of Plant Protection*, 46(6): 1163–1173 (in Chinese) [李晓维, 章金明, 张治军, 王丽坤, 吕要斌. 2019b. 蓟马信息素研究及应用进展. *植物保护学报*, 46(6): 1163–1173]
- LIU KW, KONG XB, ZHANG Z, ZHOU CG, CHAI JF. 2012. Release rates and isomerization effects of conjugated dienes sex pheromone from two types of dispensers. *Scientia Silvae Sinicae*, 48(7): 72–78 (in Chinese) [刘奎伟, 孔祥波, 张真, 周成刚, 柴景峰. 2012. 共轭二烯性信息素在2种载体上的释放速率和异构化效果. *林业科学*, 48(7): 72–78]
- LIU WF, LIANG C, MIAO CH, YANG S. 2018. Analysis and identification of male pheromone component in *Galleria mellonella* by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometer. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 46(4): 87–89 (in Chinese) [刘位芬, 梁铨, 苗春辉, 杨爽. 2018. 顶空固相微萃取/GC-MS分析鉴定大蜡螟雄性信息素成分. *江苏农业科学*, 46(4): 87–89]
- LÜ YB, ZHANG JM, LI WD, ZHANG PJ, ZHANG ZJ, LIN WC, HUANG F, BEI YW. 2015a. Attractants of flower thrips: CN 104381256A. 2015-03-04 (in Chinese) [吕要斌, 章金明, 郇卫弟, 张蓬军, 张治军, 林文彩, 黄芳, 贝亚维. 2015a. 一种用于引诱花蓟马的试剂: CN 104381256A. 2015-03-04]
- LÜ YB, ZHANG JM, LI WD, ZHANG ZJ, BEI YW, ZHANG PJ, HUANG F, LIN WC. 2015b. Attractants of western flower thrips: CN 104381255A. 2015-03-04 (in Chinese) [吕要斌, 章金明, 郇卫弟, 张治军, 贝亚维, 张蓬军, 黄芳, 林文彩. 2015b. 一种用于引诱西花蓟马的试剂: CN 104381255A. 2015-03-04]
- NIASSY S, TAMIRU A, HAMILTON JGC, KIRK WDJ, MUMM R, SIMS C, DE KOGEL WJ, EKESI S, MANIANIA NK, BANDI K, et al. 2019. Characterization of male-produced aggregation pheromone of the bean flower thrips *Megalurothrips sjostedti* (Thysanoptera: Thripidae). *Journal of Chemical Ecology*, 45(4): 348–355
- NIU YH. 2015. Detection of volatiles in stored grain and stored grain insect with solid phase microextraction-gas chromatography mass spectrometry (SPME-GCMS). Ph. D Thesis. Yangling: Northwest A&F University, pp. 19–25 (in Chinese) [牛永浩. 2015. 固相微萃取与气质联用检测储粮及储粮害虫挥发性化合物的研究. 博士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学, pp. 19–25]
- REITZ SR, GAO YL, LEI ZR. 2011. Thrips: pests of concern to China and the United States. *Agricultural Sciences in China*, 10(6): 867–892
- RIDGWAY K, LALLJIE SPD, SMITH RM. 2007. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. *Journal of Chromatography A*, 1153(1/2): 36–53
- TEALE SA, WICKHAM JD, ZHANG FP, SU J, CHEN Y, XIAO W, HANKS LM, MILLAR JG. 2011. A male-produced aggregation pheromone of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae), a major vector of pine wood nematode. *Journal of Economic Entomology*, 104(5): 1592–1598
- VRKOČ J, KONEČNÝ K, VALTEROVÁ I, HRDÝ I. 1988. Rubber substrates and their influence on isomerization of conjugated dienes in pheromone dispensers. *Journal of Chemical Ecology*, 14(5): 1347–1358
- WANG CL, LIN FC, CHIU YC, SHIH HT. 2010. Species of *Frankliniella* Trybom (Thysanoptera: Thripidae) from the Asian-Pacific area. *Zoological Studies*, 49(6): 824–838
- WARDENCKI W, CURYŁO J, NAMIESNIK J. 2007. Trends in solventless sample preparation techniques for environmental analysis. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(2): 275–288
- WU ZX, ZHAO DR. 1990. Study of the theoretical research of controlled release of insect sex pheromone. *Polymeric Materials Science and Engineering*, (6): 84–89 (in Chinese) [吴兆学, 赵德仁. 1990. 昆虫信息素的控制释放剂型的理论研究. *高分子材料科学与工程*, (6): 84–89]
- XIAO LB, BAI LX, LIU YQ, SHI XJ, TAN YG. 2010. Effects of different factors on traps with sex pheromone of *Spodoptera litura*. *Journal of Plant Protection*, 37(4): 365–369 (in Chinese) [肖留斌, 柏立新, 刘艳青, 石学娟, 谭永安. 2010. 几种因素对斜纹夜蛾性信息素诱捕效果的影响. *植物保护学报*, 37(4): 365–369]
- XUAN WJ, JIAO XG, WANG HT, SHAO QC, SHENG CF. 2003. Effect of storage temperature and duration of sex pheromone septa on capturing male moths of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Walker). *Journal Jilin Agricultural University*, 25(4): 367–370 (in Chinese) [宣维健, 焦晓国, 王红托, 邵庆春, 盛承发. 2003. 存贮温度和时间对二化螟性诱剂诱蛾效果的影响. *吉林农业大学学报*, 25(4): 367–370]
- ZHANG PJ, ZHU XY, LU YB. 2011. Behavioural and chemical evidence of a male-produced aggregation pheromone in the flower thrips *Frankliniella intonsa*. *Physiological Entomology*, 36(4): 317–320
- ZHANG ZY, PAWLISZYN J. 1993. Headspace solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry*, 65(14): 1843–1852
- ZHU CQ, CHEN JY, MA T, MOU J, QIN WQ, WEN XJ. 2017. Research on release rates of semiochemicals of *Monochamus alternatus*. *Forest Research*, 30(2): 315–321 (in Chinese) [朱诚棋, 陈家颖, 马涛, 牟静, 秦文权, 温秀军. 2017. 松墨天牛信息化合物在不同缓释载体上的释放速率. *林业科学研究*, 30(2): 315–321]
- ZHU XY, ZHANG PJ, LÜ YB. 2012. Isolation and identification of the aggregation pheromone released by male adults of *Frankliniella intonsa* (Thysanoptera: Thripidae). *Acta Entomologica Sinica*, 55(4): 376–385 (in Chinese) [祝晓云, 张蓬军, 吕要斌. 2012. 花蓟马雄虫释放的聚集信息素的分离和鉴定. *昆虫学报*, 55(4): 376–385]

(责任编辑:李美娟)