

## 松墨天牛取食行为及其与寄主挥发物的关系

樊建庭<sup>1</sup>, 张冬勇<sup>1</sup>, 章祖平<sup>2</sup>, 孟俊国<sup>1</sup>, 王义平<sup>1</sup>

(1. 浙江农林大学 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300; 2. 临安市河桥镇林业站, 浙江 临安 311324)

**摘要:** 研究了松墨天牛 *Monochamus alternatus* 对于寄主植物马尾松 *Pinus massoniana* 不同部位的取食选择性, 并对相应部位的挥发物进行了成分分析。室内取食试验结果显示, 松墨天牛对不同年龄的寄主植物枝条有显著的取食选择性, 取食量大小顺序为: 1年生>3年生>2年生枝条; 野外取食调查结果显示, 松墨天牛对寄主植物树冠的不同层次和不同方向枝条也存在显著的取食选择性, 取食量大小分别为: 中层>上层>下层, 南向>北向。气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)分析结果显示, 不同部位枝条挥发物成分差异很大, 其中不同枝条挥发物中的 $\alpha$ -蒎烯含量为: 1年生>3年生>2年生枝条, 上层>中层>下层, 不同方向枝条 $\alpha$ -蒎烯含量为: 南向>北向。对比分析发现, 松墨天牛喜欢取食的枝条往往 $\alpha$ -蒎烯在挥发物中的含量较高, 也含有更多的微量成分。这些因素很有可能对松墨天牛取食行为扮演着积极促进的角色。图3表2参10

**关键词:** 森林保护学; 松墨天牛; 取食; 挥发物; 气相色谱-质谱联用仪; 马尾松

中图分类号: S763 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2014)01-0078-05

## Feeding behavior of *Monochamus alternatus* and its relationship with the host volatiles

FAN Jianting<sup>1</sup>, ZHANG Dongyong<sup>1</sup>, ZHANG Zuping<sup>2</sup>, MENG Junguo<sup>1</sup>, WANG Yiping<sup>1</sup>

(1. School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. Forest Station of Heqiao Town in Lin'an City, Lin'an 311324, Zhejiang, China)

**Abstract:** Feeding preferences, using laboratory feeding assays, of *Monochamus alternatus* adults on twigs of different ages, crown levels, and orientations for *Pinus massoniana* were studied by identifying and comparing their volatile profiles with a gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) analysis. Results of the feeding assays of *P. massoniana* twigs demonstrated that *M. alternatus* fed preferentially on young tissue (one- > three->two-year-old tissue). Similar feeding assays showed that adult *M. alternatus* fed preferentially on twigs at different crown levels (mid level > upper level > lower level) and orientation (south > north) of the tree. The GC-MS analysis showed that  $\alpha$ -pinene content for different twigs of *P. massoniana* were different: one->three->two-year-old tissue, upper > middle > lower, and  $\alpha$ -pinene content at the sides of the host crown being: south > north. The comparison showed that *M. alternatus* adults preferred twigs with high  $\alpha$ -pinene content. [Ch, 3 fig. 2 tab. 10 ref.]

**Key words:** forest protection; *Monochamus alternatus*; feeding; volatiles; gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS); *Pinus massoniana*

松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 可导致一种国际公认的毁灭性病害——松材线虫病, 它原产于

收稿日期: 2013-03-13; 修回日期: 2013-04-25

基金项目: 国家林业公益性行业科研专项(201304403); 浙江省自然科学基金资助项目(LY12C04001); 浙江省科技厅公益技术应用研究项目(2010C32100)

作者简介: 樊建庭, 副教授, 博士, 从事昆虫化学生态学和害虫综合防治研究。E-mail: fanjt123@sina.com

北美地区, 然后传播到日本、中国、韩国、墨西哥和葡萄牙等地<sup>[1]</sup>。松墨天牛 *Monochamus alternatus* 是松材线虫在中国和日本地区最重要的传播媒介。目前, 在中国和日本应用的引诱剂主要是产卵期成虫引诱剂<sup>[2-4]</sup>。然而绝大多数线虫 (>80%) 是在松墨天牛补充营养期 (18~25 d) 通过取食伤口传播到健康的松树上<sup>[5]</sup>。因此, 研究松墨天牛取食期引诱剂对于监测和控制松材线虫病具有非常重要的意义。松墨天牛对于寄主植物的初始选择主要决定于嗅觉信号, 而是否接受进而继续取食则由味觉信号决定。从松树枝条的树皮部分提取的物质, 如  $\beta$ -谷甾醇、菜油甾醇、蔗糖、葡萄糖、阿拉伯糖苷、果糖、松醇、甘露醇、木糖醇、半乳糖和纤维醇, 具有刺激松墨天牛取食的作用。然而, 寄主挥发物很有可能是松墨天牛取食期引诱剂的重要物质之一。目前, 有不少关于松树寄主挥发物作为其他几种天牛引诱剂和取食刺激物的研究报告<sup>[6]</sup>。Fan 等<sup>[7]</sup>关于松墨天牛的野外试验也证明, (+)- $\alpha$ -蒎烯是松墨天牛产卵期最重要的引诱物质。该研究主要进行了松墨天牛对于寄主植物马尾松 *Pinus massoniana* 不同年龄枝条、树冠不同层次和不同方向的枝条的取食行为进行研究和调查, 并对这些枝条挥发物进行分析鉴定, 研究这些挥发物在松墨天牛取食行为中的作用, 为研究松墨天牛取食期引诱剂奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 虫源

虫源基地位于浙江省富阳市昌东村。为了获得松墨天牛成虫虫源, 需要提前设置马尾松诱木, 具体方法是: 选择为 16~20 年生的马尾松, 用斧头在树干基部距地 20 cm 高处分不同方向各砍 3 个伤口, 以伤及木质部为准, 然后注入 5 mL 体积分数为 5% 的百草枯。大约 1 周后, 受伤的马尾松会吸引到大量的雌雄成虫来树干部位产卵。在第 2 年 4 月, 将马尾松诱木砍倒, 锯成 3~4 m 长的木段, 然后堆积到大养虫笼内 (4 m  $\times$  5 m  $\times$  3 m, 由铁制框架和塑料纱窗制成)。每天砍伐新鲜的马尾松枝条放入大养虫笼内, 供刚羽化的成虫补充营养所需。5 月开始会陆续有成虫羽化, 每天及时收集, 供室内取食行为试验使用。在进行行为试验之前, 对成虫停止喂食 4 h。

### 1.2 实验设备及试剂

6890N-5973N 气相色谱-质谱联用仪 GC-MS (Agilent Technology, Palo Alto, CA); 色谱柱 (DB-5MS, J&W Scientific, Folsom, CA); QC-I 大气采样仪 (北京劳动保护研究所); 树枝剪; XAD-2 吸附剂 (Amberlite, Philadelphia, PA); 玻璃棉 (Supelco, Bellefonte, PA); 无味聚乙烯塑料袋 (Reynolds, Richmond, VA); 硅胶管; 进口样品瓶 (北京康林公司); 色谱纯正己烷 (Fisher Chemicals, USA)。气相色谱-质谱联用仪所用化合物 (+)- $\alpha$ -蒎烯 (98%),  $\gamma$ -萜品烯 (97%) 和 (+)-长叶烯 (99%) 采购于 Acros 化学试剂公司 (Geel, Belgium); 蒎烯 (85%), (-)- $\beta$ -蒎烯 (80%), R-(-)- $\alpha$ -水芹烯 (65%), (R)-(+)-柠檬烯 (96%), 萜品油烯 (85%) 和  $\alpha$ -葑草烯 (98%) 采购于 Fluka 化学试剂公司 (Buchs, Switzerland); 月桂烯 (98%), (+)-3-蒎烯 (90%), (-)-龙脑烯 (95%) 和  $\beta$ -石竹烯 (98%) 采购于 Aldrich 化学试剂公司 (Milwaukee, Wisconsin, USA)。我们没有获得  $\beta$ -水芹烯的标准品, 其成分鉴定是基于质谱库分析结果。

### 1.3 室内取食试验

取食试验在室内进行, 温度为 18~28  $^{\circ}\text{C}$ , 光周期为 14 h:10 h (光照:黑暗)。选择取食试验, 将马尾松枝条剥去松针, 然后按照年龄截成 1 年生、2 年生和 3 年生等 3 种枝条, 各称量 100 g 放入同一个养虫笼 (10 cm  $\times$  10 cm  $\times$  10 cm), 养虫笼由不锈钢丝网和杨木框架制成, 每个养虫笼放入饥饿 4 h 并且虫龄一致的 10 头成虫 (5 头雌虫+5 头雄虫), 重复 5 次。无选择取食试验方法同上, 只是将 1~3 年生的 3 种枝条分别放入不同的养虫笼里, 每个养虫笼放入 5 头成虫 (3 雌+2 雄), 重复 5 次。待取食 48 h 后, 枝条上的取食刻痕用透明硫酸纸记录下来, 然后用坐标纸测量取食面积 ( $\text{mm}^2$ )。测试试虫 1 次 $\cdot$ 头 $^{-1}$ 。

### 1.4 野外取食调查试验

试验样地设在浙江省富阳市昌东村的马尾松林地, 该林地有松材线虫病发生。据不完全统计, 松树死亡率约为 5%, 马尾松为 15~20 年生, 树高 5~10 m, 胸径 7~15 cm, 郁闭度 0.27。

选取受到松墨天牛危害的马尾松, 对松墨天牛取食行为进行调查。首先, 对寄主马尾松树冠的上、中、下层 3 个层次分别进行取样, 取样方法为采用高枝剪在每个层次各随机剪取 5 个枝条, 重复 5 棵

树。然后,对马尾松树冠的南、北2个方向枝条进行取样,取样方法同上。将剪下的枝条做好标记,带回实验室,用透明硫酸纸记录下枝条上的取食刻痕,再用坐标纸测量取食面积( $\text{mm}^2$ )。

### 1.5 挥发物收集与分析

挥发物成分分析采用顶空吸附方法。首先将剥去松针后的1~3年生马尾松木段各100 g,马尾松树冠上、中、下3层和南、北向新鲜枝条各取200 g,分别放入聚乙烯塑料袋中。空气通过含有5 cm活性炭的玻璃管(7 cm  $\times$  1 cm ID)纯化后,进入含有枝条的塑料袋。每个塑料袋连着末端封有玻璃棉且含有0.5 cm XAD-2玻璃管(7 cm  $\times$  0.5 cm ID)。然后玻璃管与QC-1大气采样仪的进气口相连,含有活性炭的玻璃管则与大气采样仪的出气口相连。气流计维持 $1.5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ 的平稳气流。采样设备的所有部件通过硅胶管相连。采样时间为5 h(10:00–15:00),重复5次·处理 $^{-1}$ 。各个挥发物样品用含有以正十二烷( $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )为内标的色谱纯正己烷(500 L)洗脱。洗脱后的样品保存在 $-5 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中待用。

将洗脱后的样品用正己烷稀释20倍,然后通过气相色谱与质谱联用仪(Agilent 6890N-5973N GC/MSD)分析。载气是高纯度氦气,气流为 $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。色谱柱为DB-5MS,60 m (long)  $\times$  0.25 mm (ID)  $\times$  0.25 m (film)。进样 $2 \text{ L}\cdot\text{次}^{-1}$ ,分流比为50:1。升温程序为:50  $^\circ\text{C}$ 恒温2 min,然后以 $5 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度升温到200  $^\circ\text{C}$ ,最后在220  $^\circ\text{C}$ 恒温5 min。火焰离子检测温度为300  $^\circ\text{C}$ ,进样温度为250  $^\circ\text{C}$ ,质谱轰击电压为70 eV,扫描的质量范围为30~300。

### 1.6 统计分析

样品中化合物成分的鉴定是通过与标准化合物和NIST02质谱库的出峰时间和质谱图对比完成,定量分析通过内标正十二烷的峰面积计算。数据分析采用统计软件SPSS 11.0 for Windows。马尾松不同枝条取食面积以及挥发物成分之间的差异显著性通过方差(ANOVA)分析,采用Bonferroni多重比较法。

## 2 结果与分析

### 2.1 室内取食试验

松墨天牛对马尾松1~3年生枝条室内取食试验结果显示,松墨天牛对不同年龄的枝条存在显著的取食偏好性。其中,在选择取食试验中,喜好顺序为:1年生 $>$ 3年生 $>$ 2年生(表1)。而无选择取食试验结果显示:2年生和3年生差异不显著,仍然是最喜欢取食1年生枝条,差异显著。另外,我们也可以发现,在没有最喜欢取食的1年生枝条情况下,松墨天牛对2年生和3年生枝条的取食量也比较大。

相应的挥发物成分分析结果显示,马尾松不同年龄枝条挥发物中的多种成分存在显著性差异(图1)。在1年生枝条中 $\alpha$ -蒎烯的挥发量要显著高于3年生枝条,3年生枝条显著高于2年生枝条。 $\beta$ -蒎烯和 $\beta$ -水芹烯在1年生和2年生枝条中的挥发量要显著高于3年生枝条。总体看来,相对于2年生和3年生枝条来说,1年生枝条挥发物中含有更多种类和数量的化合物。 $\gamma$ -萜品烯和萜品油烯在3年生枝条挥发物中没有检测到,而龙脑烯在2年生和3年生枝条中都没有检测到。 $\alpha$ -萹草烯在1年生枝条挥发物中的相对含量显著高于其他枝条。

### 2.2 野外取食调查试验

野外取食危害调查结果显示,松墨天牛对马尾松树冠不同层次的取食危害存在显著性差异(表2)。其中,中层枝条受到的松墨天牛危害最为严重,其次是上层,下层危害很轻。中层枝条取食危害面积大约是上层的4倍,下层的20倍。松墨天牛对马尾松树冠南向枝条的取食危害情况比北向枝条更为严重,差异十分显著。

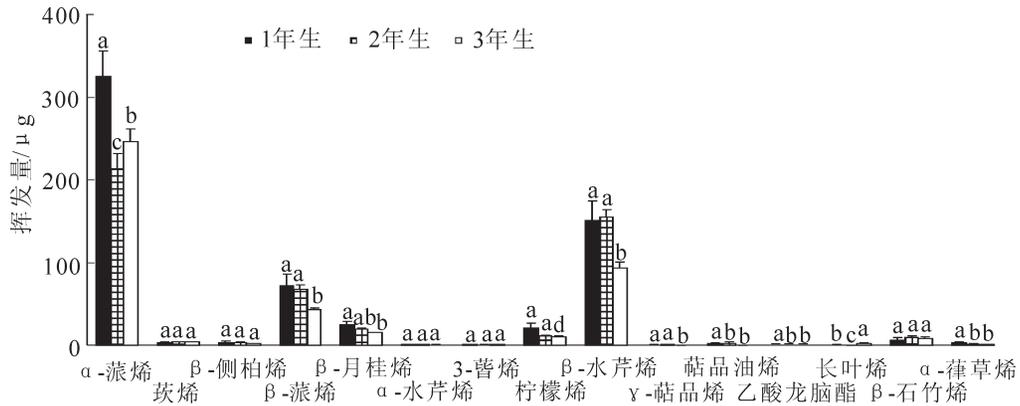
相应的挥发物成分分析结果显示,马尾松树冠不同层次枝条挥发物多种成分存在显著性差异。上层枝条挥发物中含有的萜烯类化合物总量最高(图2),其次是中层,下层最低。其中, $\alpha$ -蒎烯、柠檬烯和 $\beta$ -水芹烯都是在上层枝条中挥发量最高,中层其次,下层最低,差异显著。 $\beta$ -蒎烯和 $\beta$ -

表1 松墨天牛对不同年龄枝条取食试验

Table 1 Feeding results of *Monochamus alternatus* on twigs of different ages in the laboratory

枝龄	取食面积/( $\text{mm}^2\cdot\text{头}^{-1}$ )	
	选择( $n=50$ )	无选择( $n=50$ )
1年生	114.30 $\pm$ 8.55 a	204.00 $\pm$ 9.88 a
2年生	38.60 $\pm$ 4.57 c	164.56 $\pm$ 9.54 b
3年生	62.00 $\pm$ 7.16 b	163.04 $\pm$ 13.84 b

说明:同一列的不同字母表示松墨天牛对不同年龄枝条取食面积差异显著( $P<0.05$ ),采用Bonferroni多重比较方法。



同一化合物的不同字母表示不同年龄枝条挥发物成分挥发量差异显著 ( $P < 0.05$ ), 采用 Bonferroni 多重比较。

图 1 不同年龄枝条挥发物中萜烯类化合物挥发量

Figure 1 Amounts of terpenes in the volatiles of different ages twigs

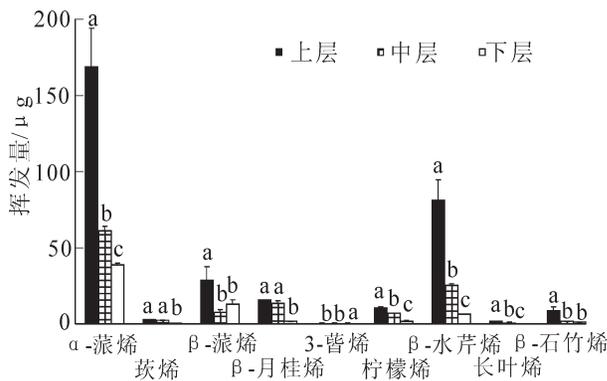
石竹烯在上层枝条中的挥发量也显著高于中层和下层枝条。茨烯和  $\beta$ -月桂烯在上层和中层枝条的挥发量显著高于下层枝条。3-萜烯仅在下层枝条中检测到, 而长叶烯仅在上层和中层枝条中检测到。除 3-萜烯在树冠南北向枝条中的挥发量没有差异, 长叶烯在北向枝条中没要检测到以外, 其他的萜烯类化合物在南向枝条中的挥发量都要显著高于北向(图 3)。

表 2 树冠不同层次和方向枝条取食危害调查

Table 2 Feeding results of *Monochamus alternatus* on twigs in different levels and sides of the host crown in the field

部位	取食面积/mm <sup>2</sup>
上层	314.00 ± 25.01 d
中层	1 207.00 ± 119.50 b
下层	62.40 ± 6.96 e
南向	3 830.80 ± 150.79 a
北向	487.60 ± 77.32 c

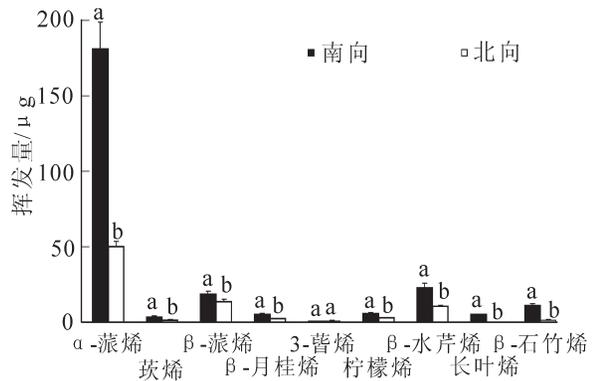
说明: 同一列的不同字母表示松墨天牛对不同树冠层或树冠层不同方向枝条取食面积差异显著 ( $P < 0.05$ ), 采用 Bonferroni 多重比较方法。



同一化合物的不同字母表示不同年龄枝条挥发物成分挥发量差异显著 ( $P < 0.05$ ), 采用 Bonferroni 多重比较。

图 2 树冠层不同层次枝条挥发物中萜烯类化合物挥发量

Figure 2 Amounts of terpenes in the volatiles of different levels twigs of the host crown



同一化合物的不同字母表示不同年龄枝条挥发物成分挥发量差异显著 ( $P < 0.05$ ), 采用 Bonferroni 多重比较。

图 3 树冠不同方向枝条挥发物中萜烯类化合物挥发量

Figure 3 Amounts of terpenes in the volatiles of different sides twigs of the host crown

### 3 结论与讨论

马尾松树冠南向枝条挥发物总量显著高于北向, 取食量也是南向显著大于北向枝条。树冠上层和中层枝条挥发物总量显著高于下层, 取食结果也比较一致。因此, 我们推测松墨天牛偏好取食的枝条往往挥发物总量较高。我们在林间调查也发现, 下层和北向的枝条往往比较短小、干瘪, 长势明显弱于上

层、中层和南向枝条, 松墨天牛很有可能比较喜欢取食长势良好、比较健康的枝条。同时, 挥发物中微量萜烯类化合物(比如  $\gamma$ -萜品烯、萜品油烯、龙脑烯、长叶烯和  $\alpha$ -萜草烯)在1年生枝条或上中层枝条中挥发量更加丰富。这些微量成分有可能指示枝条中含有更加丰富的营养物质, 从而吸引和促进松墨天牛的取食行为。关于这些微量萜烯类化合物对于取食行为影响的试验值得进一步研究。

Sakai 等<sup>[3]</sup>研究结果显示:  $\alpha$ -萜烯对刚羽化的松墨天牛有引诱作用(可能与补充营养取食有关), 但是1~2周天牛达到性成熟后引诱作用会减弱。含有  $\alpha$ -萜烯和乙醇的诱捕器在白点墨天牛补充营养期(性成熟之前)的早期有显著的引诱作用<sup>[8]</sup>。Wallin 等<sup>[9]</sup>发现,  $\alpha$ -萜烯和  $\beta$ -萜烯的比例会随着北美短叶松 *Pinus banksiana* 落叶程度的加深而降低。宁眺等<sup>[10]</sup>对不同生理状态的松树寄主分析结果显示, 当寄主健康状况下降时,  $\alpha$ -萜烯的相对含量显著降低。Fan 等<sup>[3]</sup>研究结果发现, 松墨天牛人工饲料在一定范围内添加  $\alpha$ -萜烯可以显著增加取食量, 这说明  $\alpha$ -萜烯在松墨天牛取食行为的选择和接受等环节扮演着重要的角色。通过对比不同类型枝条挥发物成分和取食结果, 我们发现: 2年生枝条挥发物中  $\alpha$ -萜烯挥发量最低, 取食量也是最低; 下层枝条挥发物中  $\alpha$ -萜烯挥发量最低, 取食量也是最低; 而北向枝条挥发物中  $\alpha$ -萜烯相对含量最低, 取食量仍然是最低。这些结果进一步证明:  $\alpha$ -萜烯很有可能在松墨天牛取食行为中扮演着积极促进的角色。然而,  $\alpha$ -萜烯在上层枝条挥发量最高, 而松墨天牛对中层枝条取食量最高。这说明, 对于寄主植物的取食选择行为是否接受, 以及最终的取食量可能与其他因素有关, 比如味觉、躲避天敌等。关于味觉因素与松墨天牛取食行为之间的关系有待于将来的深入研究。

因此, 我们推测松墨天牛取食偏好性与枝条挥发物总量、 $\alpha$ -萜烯挥发量、微量成分等因素之间存在着密切关系, 将来我们需要进一步深入研究松墨天牛取食期和产卵期取食行为差异和引诱机制。

#### 参考文献:

- [1] SUN Jianguhua. Forest invasive species: Country report-P. R. China[M]//PHILIP M, CHRIS B, SUN Jianguhua, *et al.* *The Unwelcome Guests, Proceedings of the Asia-Pacific Forest Invasive Species Conference*. Thailand: FAO Regional Office for Asia and Pacific, 2005: 80 - 86.
- [2] FAN Jianting, SUN Jianguhua. Influences of host volatiles on feeding behaviour of the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus* [J]. *J Appl Entomol*, 2006, **130**: 238 - 244.
- [3] SAKAI M, YAMASAKI T. Dextro-cis-3-pinen-2-ol attractant for male cerambycid beetle *Monochamus alternatus* Hope [J]. *J Chem Ecol*, 1991, **17**: 757 - 766.
- [4] 赵锦年, 蒋平, 吴沧松, 等. 松墨天牛引诱剂及引诱作用研究[J]. *林业科学研究*, 2000, **13**(3): 262 - 267.  
ZHAO Jinnian, JIANG Ping, WU Cangsong, *et al.* Study on *Monochamus alternatus* attractant and the attractability [J]. *For Res*, 2000, **13**(3): 262 - 267.
- [5] JIKUMARU S, TOGASHI K. Transmission of *Bursaphelenchus mucronatus* (Nematoda: Aphelenchoididae) through feeding wounds by *Monochamus saltuarius* (Coleoptera: Cerambycidae) [J]. *Nematol*, 2001, **3**: 325 - 333.
- [6] FACCOLI M, BLAZENEC M, SCHLYTER F. Feeding response of host and nonhost compounds by males and females of the spruce bark beetle *Ips typographus* in a tunnelling microassay [J]. *J Chem Ecol*, 2005, **31**: 745 - 759.
- [7] FAN Jianting, SUN Jianguhua, SHI Jin. Attraction of the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus*, to volatiles from stressed host in China [J]. *Ann For Sci*, 2007, **64**: 67 - 71.
- [8] MOREWOOD W D, HEIN K E, KATINIC P J, BORDEN JH. An improved trap for large wood-boring insects, with special reference to *Monochamus scutellatus* (Coleoptera: Cerambycidae) [J]. *Can J For Res*, 2002, **32**: 519 - 525.
- [9] WALLIN K F, RAFFA K F. Altered constitutive and inducible phloem monoterpenes following natural defoliation of Jack pine: Implications to host mediated interguild interactions and plant defense theories [J]. *J Chem Ecol*, 1999, **29**: 861 - 880.
- [10] 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.  
NING Tiao, FAN Jianting, FANG Yuling, *et al.* Changes in contents of host volatile terpenes under different damaged states and electroantennogram response of *Monochamus alternatus* Hope to these volatiles [J]. *Acta Entol Sin*, 2006, **49**(2): 179 - 188.