



严广, 张梦蝶, 钱路兵, 泽桑梓, 杨斌, 李宗波. 云南切梢小蠹对初侵害云南松挥发物的电生理和行为反应 [J]. 环境昆虫学报, 2021, 43 (6): .

云南切梢小蠹对初侵害云南松挥发物的电生理和行为反应

严广¹, 张梦蝶¹, 钱路兵¹, 泽桑梓², 杨斌^{1,3}, 李宗波^{1,3*}

(1. 西南林业大学生物多样性保护学院, 云南省森林灾害预警与控制重点实验室, 昆明 650224; 2. 云南省林业和草原有害生物防治检疫局, 昆明 650224; 3. 西南山地森林资源保育与利用教育部重点实验室, 昆明 650224)

摘要: 云南切梢小蠹 *Tomicus yunnanensis* (Kirkendall and Faccoli) 是一种蛀害云南松 *Pinus yunnanensis* 的本土害虫。为深入了解其寄主选择机制, 用顶空动态法和浸提法分别提取了初侵染云南松针叶和松脂的挥发性化合物, 并用气相色谱-质谱联用技术 (GC-MS)、气相色谱-昆虫触角电位测量系统 (GC-EAD)、生测法鉴定和筛选了对云南切梢小蠹具有活性功能的成分。结果表明: 云南松针叶和松脂中共有 18 种化合物, 均为萜烯类物质, 但两者化学成分的构成有显著差异。针叶中单萜类占 99.98%, 主要是 α -蒎烯 (80.82%)、 β -蒎烯 (8.78%)、D-柠檬烯 (4.77%)、苧烯 (2.86%) 和 β -月桂烯 (1.42%), 而松脂以单萜类和双萜类为主, 前者以 α -蒎烯 (21.38%)、3-蒎烯 (21.42%) 和异松油烯 (2.78%) 为主要成分, 后者仅有长叶松酸 (51.13%) 一种。云南切梢小蠹对 α -蒎烯、 β -蒎烯、3-蒎烯、 γ -萜品烯和 4-烯丙基苯甲醚有触角电位反应, 其中 α -蒎烯、3-蒎烯和 γ -萜品烯具引诱作用, 4-烯丙基苯甲醚和 β -蒎烯则为驱避功能。研究可为开发植物源引诱剂或与性信息素结合进行种群监测和诱杀提供科学依据。

关键词: 云南切梢小蠹; 云南松; 触角电位; 生测法; 活性成分; 引诱; 驱避

中图分类号: Q965; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2021) 06-1389-09

Electrophysiological and behavioral responses of *Tomicus yunnanensis* to plant volatiles from primarily infected *Pinus yunnanensis* in Yunnan, Southwest China

YAN Guang¹, ZHANG Meng-Die¹, QIAN Lu-Bing¹, ZE Sang-Zi², YANG Bin^{1,3}, LI Zong-Bo^{1,3*}

(1. Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control in Yunnan Province, College of Biodiversity and Conservation, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China; 2. Yunnan Forestry Pest Control and Quarantine Bureau, Kunming 650224, China; 3. Key Laboratory for Forest Resources Conservation and Utilization in the Southwest Mountains of China, Kunming 650224, China)

Abstract: The Yunnan pine shoot beetle, *Tomicus yunnanensis* Kirkendall and Faccoli (Coleoptera: Scolytinae) is a native bark beetle pest of Yunnan Province of Southwest China that kills healthy *Pinus yunnanensis*. To better understand the roles of host volatiles in the host tree selection, we used dynamic headspace and solvent extraction to gain the pine volatiles from the needles and resins of *P. yunnanensis* infected primarily by *T. yunnanensis*, respectively. We used chromatography-mass spectrometry (GC-

基金项目: 国家自然科学基金 (31560213, 31760210); 云南省基础研究重点项目 (202101AS070009); 云南省农业基础研究联合专项重点项目 (2018FG001-010); 云南省高层次人才培养支持计划青年拔尖人才项目 (51900110)

作者简介: 严广, 男, 1997 年生, 重庆开州人, 硕士研究生, 研究方向为森林昆虫学, E-mail: ygaptx@outlook.com

* 通讯作者 Author for correspondence: 李宗波, 博士, 教授, 研究方向为化学生态和昆虫生态与害虫综合治理, E-mail: lizb@swfu.edu.cn

收稿日期 Received: 2021-08-13; 接受日期 Accepted: 2021-09-17

MS), coupled gas chromatography-electroantennographic detection (GC-EAD), and bioassay to detect and identify the biologically-active compounds of *T. yunnanensis* to host pine volatiles. The results showed that pine volatiles from the needles and resins contained 18 compounds totally, as classified into terpenes. The volatile chemical profiles of *P. yunnanensis* varied significantly within needles and resins by multi-response permutation procedure. Needle volatile compounds were predominant monoterpenes (99.98%), particularly like α -pinene (90.82%), β -pinene (8.78%), D-limonene (4.77%), camphene (2.86%), and β -myrcene (1.42%). However, resin contained equally both monoterpene and diterpenes in the chemical profiles. The former mainly involved α -pinene (21.38%), 3-carene (21.42%), and terpinolene (2.78%). The latter only had a highly oxidized diterpene, palustic acid, reaching 51.13% in relative amounts. In GC-EAD analyses of the headspace of needle and fresh resin, the antenna of *T. yunnanensis* produced strongly electroantennographic responses to α -pinene, β -pinene, 3-carene, γ -terpinene, and 4-allylanisole. Behavioral choice indicated that α -pinene, γ -terpinene, and 3-carene enhanced obviously attraction of *T. yunnanensis*, and β -pinene and 4-allylanisole displayed repellent response for *T. yunnanensis*. Plant source attractants and beetle pheromones combined with active host odors may be an indispensable way to monitor and trap *T. yunnanensis* to achieve ecological regulation and management of pests.

Key words: *Tomicus yunnanensis*; *Pinus yunnanensis*; electroantennography; bioassay; biologically-active compounds; luring agent; repellent agent

云南切梢小蠹 *Tomicus yunnanensis* (Kirkendall and Faccoli) 隶属鞘翅目 Coleoptera 象虫科 Curculionidae 小蠹亚科 Scolytinae 林小蠹族 Hylurgini, 是云南松林最具危害性的一种钻蛀害虫 (Kirkendall *et al.*, 2008; 叶辉, 2011)。先前很长一段时间, 该蠹虫一直被认为与我国东北和亚欧林区的纵坑切梢小蠹 *T. piniperda* 为同一物种, 但分子分析显示该物种与纵坑切梢小蠹存在较远的遗传距离 (Duan *et al.*, 2004), 随后详细的形态比对证实两者鞘翅表面刻点和颗粒有着明显的不同, 应被视作切梢小蠹属的一个新物种 (Kirkendall *et al.*, 2008)。因此, 该虫被正式命名为云南切梢小蠹, 用于取代纵坑切梢小蠹、云南松纵坑切梢小蠹, 或者云南纵坑切梢小蠹等别称。云南切梢小蠹具有独特的危害习性: 新羽化的云南切梢小蠹蛀食新鲜嫩梢, 一般仅选择健康松树补充营养, 致使树势衰弱; 待性成熟后, 云南切梢小蠹则选择衰弱的松树作为寄主, 并在树干韧皮部取食、产卵和繁殖, 最终致使树木死亡 (叶辉, 2011; Lieutier *et al.*, 2015)。可见, 云南切梢小蠹存在一个明显的蛀梢期、蛀干期和转移期, 但转移期是相当短暂的, 且发生时间多集中在早晨, 而其余生活史, 诸如交配、产卵、幼虫发育、化蛹和羽化等过程均在树干内完成。正是由于这种隐蔽的生活方式和空间迁移, 使得云南切梢小

蠹防治难度大, 在云南每年均大面积发生, 危害面积已达每年 13.33 万 ha/年, 并向四川、贵州等地持续扩散 (图 1), 严重影响我国西南地区的生态环境安全和生物多样性保护 (季梅等, 2007; 叶辉, 2011)。采用何种方式使之有虫不成灾? 当然, 基于生态调控的害虫可持续控制是实现该目的不二选择, 即捋顺调节与控制的关系, 整合包括林业技术措施、生物防治、理化诱控技术以及合理的化学防治等多元措施, 以将害虫长时间控制在经济阈值之下 (戈峰, 2020)。在这个过程中, 理化诱控是不可少的, 特别是与害虫寄主选择和配偶识别相关的信息化学物质, 如寄主植物气味, 能够单独或与信息素结合产生增盈效应, 适宜于种群监测、大规模诱杀、迷踪等措施来降低害虫的种群数量。并且, 这些化学信号具有良好的稳定性 (Constancy) 和持久性 (Consistency), 符合绿色无公害、环境友好的林木害虫治理的发展趋势, 也是生态调控过程中最为倚重的一种行为调控技术 (Raffa *et al.*, 2016; 戈峰, 2020)。另一方面, 尽管云南切梢小蠹存在梢转梢、梢转干和干转梢这样一个干外生活时期, 但持续时间短, 加之云南切梢小蠹并不像大小蠹 *Dendroctonus* spp.、齿小蠹 *Ips* spp. 等能够进行长距离扩散 (Chen *et al.*, 2011), 其扩散主要集中在梢与梢和树与树之间的局域空间内, 显示出低攻击密度阈值 (Critical

threshold of attack density) 的云南切梢小蠹对寄主选择应具有更好的辨识能力 (Lieutier *et al.*, 2015; Raffa *et al.*, 2016; Müller *et al.*, 2020), 但一些研究发现切梢小蠹在攻击寄主过程中并不会分泌聚集信息素 (Lieutier *et al.*, 2015; Raffa *et al.*, 2016)。但最近, Wu *et al.* (2019) 发现云南切梢小蠹后肠中存在聚集信息素—(-)-顺马鞭草烯醇, 且在蛀梢期和蛀干期均有, 只是含量有所不同, 这说明云南切梢小蠹能够利用信息素对种群数量进行调控, 而寄主气味在此过程中的作用不可忽视 (Raffa *et al.*, 2016; Müller *et al.*, 2020; 戈峰, 2020)。虽然已有一些学者研究了寄主气味和聚集信息素的引诱功能 (李丽莎等, 1993; 周楠等, 1997; 殷彩霞等, 2002; 路荣春等, 2008; 闫争亮等, 2011), 但林间引诱效果不佳, 几乎无法诱捕到云南切梢小蠹, 意味着诱剂方面存在明显的缺陷。特别是考虑到云南切梢小蠹蛀梢期和蛀干期的营养需求以及信号的空域异质性 (闫争亮等, 2011; Lieutier *et al.*, 2015; Müller *et al.*, 2020), 非常有必要重新检视一下寄主气味的空间分布及

其功能差异。因此, 本文应用顶空动态法和溶剂提取法, 分别收集了初侵染云南松针叶和松脂的挥发性化学物质, 并结合气相色谱-质谱联用技术 (GC-MS)、气相色谱-昆虫触角电位测量系统 (GC-EAD) 和生测法, 鉴定和筛选了对云南切梢小蠹具有活性功能的气味成分, 以期为开发植物源引诱剂或与聚集信息素结合进行种群的理化调控和大规模诱杀提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试虫来源

试虫采集于云南省曲靖市沾益区九龙山林场 (N 25°39'51.2", E 103°47'45.1", 图 1)。选择正在云南松梢内取食的切梢小蠹, 然后将其带回实验室, 再根据鞘翅斜面第二沟间部颗粒瘤有无、刻点排列、颗粒瘤毛长短、腹部背板形态以及是否可见第 8 节等特征鉴定云南切梢小蠹雌、雄成虫 (Kirkendall *et al.*, 2008)。将鉴定好的成虫分别置入 4℃ 冰箱内保存待用, 保存时间不超过 3 d。

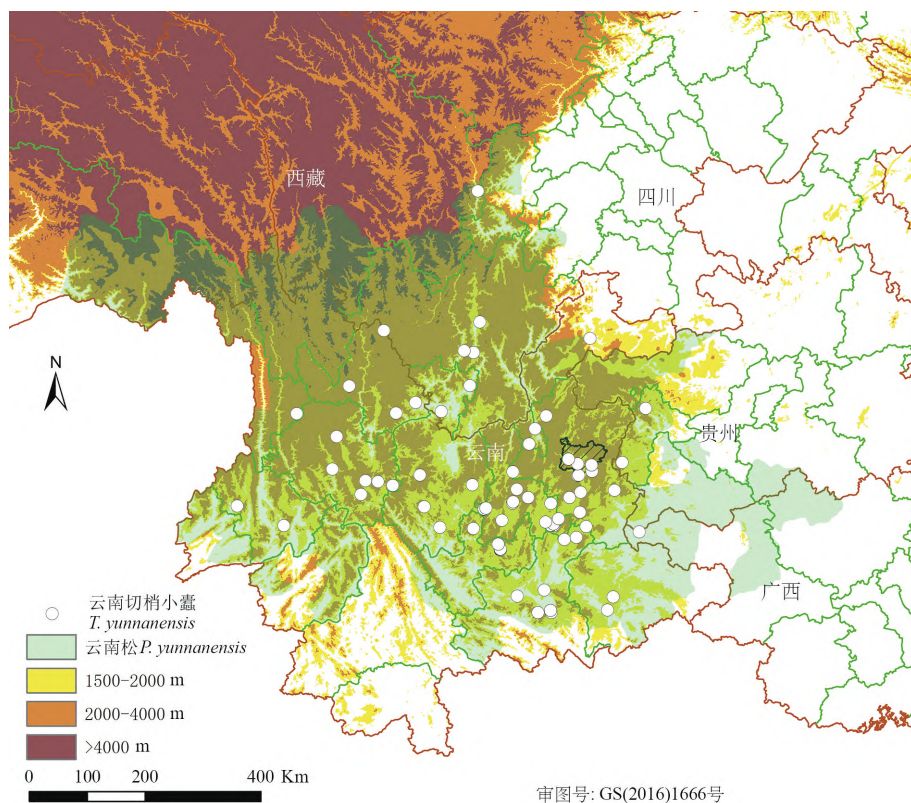


图 1 云南切梢小蠹的地理分布及其试虫来源地 (阴影区)

Fig. 1 Geographic distribution and sampling site (shadow zone) of *Tomicus yunnanensis* in Yunnan, Southwest China

1.2 云南松挥发物的收集与分析

参照云南松受害木的分级标准 (刘宏屏等, 2014), 首先选择松针呈绿色至浅绿色, 枝梢已开始变黄, 伴随着少量的虫孔和凝脂的云南松作为初侵木, 接着选择 5 株初侵木, 按顶空动态法 (Faccoli *et al.*, 2008) 和浸提法 (Munro *et al.*, 2020) 分别收集针叶和松脂的挥发性化学物质。

顶空动态法: 选择未被蛀害的云南松枝条, 然后将其用无味透明的塑料袋 (PTEK, Wursthüllen, German) 包裹, 进气端空气用活性炭 (ORBOTM-32, Supelco, USA) 过滤, 气体流速 400 mL/min, 出气端经 120 mg Porapak Q (50 ~ 80 目, Supelco, USA) 吸附, 流速为 300 mL/min, 持续收集 12 h。完毕后, 用色谱纯级的正己烷 (Tedia, USA) 洗脱, 收集 300 μ L 洗脱液于 2 mL 棕色试剂瓶 (12 $\times$ 32 mm, PTFE, Agilent) 内。最后经 N_2 浓缩定容至 100 μ L, 将其保存在 -20°C 冰箱内待用。

浸提法: 用定量的采血管 (105 mm, 100 μ L, 宇轩, 中国) 收集新鲜松脂 50 μ L, 接着滴入 500 μ L 正己烷溶液中, 经 12 h 静置 (4°C) 后, 将滤液转移至另一干净的 2 mL 试剂瓶中, -20°C 冷藏备用。

化合物分析: 采用 Agilent HP7820A/5977B GC-MS 进行。进样量为 1 μ L, 分流比为 30:1, 质谱柱为 HP-5MS (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m)。高纯氮气作为载气 (1.0 mL/min), 压力 10 psi。升温程序: 起始温度 40°C , 保持 2 min; 以 $5^\circ\text{C}/\text{min}$ 的升温速率升至 280°C , 保持 5 min。质谱离子源温度 230°C , 电离能 70 eV, 扫描范围 50 ~ 600 m/z。化学物质鉴定采用 NIST 98 MS 谱库检索法、保留指数法和参考相关文献法 (Adams, 2007) 加以确定。

1.3 触角电位 (GC-EAD)

将恢复活性的云南切梢小蠹的头部切下, 用拉制的毛细管尖端刺入头部血腔 (参比电极), 固定在微动操作台上, 调整距离, 以便另一毛细管尖端套入触角锤头部 (记录电极)。参比电极和记录电极玻璃管内充满林格氏液, 内插 Ag/AgCl 细丝用于导电。湿润空气流持续吹向固定好的触角, 流速 400 mL/min。将 2.0 μ L 浓缩液从气相色谱进样口注入, 然后经一个四壁不锈钢分流装置将浓

缩液按照 1:1 方式分别注入 GC 和吹向触角, 吹向触角的挥发物经加热罩加热至 260°C , GC 升温程序和色谱柱型号均与 GC-MS 保持一致, 但 GC 不分流。刺激信号通过接受器放大、处理、记录和储存, 通过软件 Autospike (Version 3.6, Syntech) 显示在计算机屏幕上。雌、雄成虫各进行 5 ~ 8 次重复测试。

1.4 生测法

采用 Y 型嗅觉仪进行行为选择性测试。先将样品和空白对照 (二氯甲烷) 滴在玻璃棉上, 室温放置 30 min 后, 置于一个球形容器内, 并与 Y 型管的两臂相连, 然后开始抽气, 气流经活性炭过滤, 再经加湿吹向释放管内的云南切梢小蠹, 气流速度 300 mL/min, 设置反应时间为 5 min, 超过反应时间的小蠹虫将其移出, 记作不反应。每个化合物重复 5 次, 每次测试 30 头, 测试 5 头后, 调换左右臂; 10 头后, 更换新的 Y 型管, 并用乙醇清洗、 100°C 烘干。测试过的小蠹不再使用。

1.5 数据处理与分析

所有的数据分析均在 RStudio (R version 4.05, <https://cran.r-project.org/>) 平台上进行。为了对比云南松松针与松脂间气味的异同, 数据首先进行平方根转换和 Wisconsin 双重标准化, 然后用非对称的 Bray-curtis 距离建立一个数值介于 0 ~ 1 的距离矩阵, 并用非度量多维标度 (Vegan 2.5-7, <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>) 计算矩阵间的最佳距离, 最后用多重响应排列程序 (multi-response permutation procedure, MRPP) 分析配对样本间的相似性, 置换检验的次数设定为 10 000。对于 GC-EAD 数据, 先将其导入到 Origin 中, 再对 EAG 和 FID 信号进行基线校准和低通滤波过滤, 绘制出云南切梢小蠹的触角电位图谱。对于行为选择性数据, 采用 Welch 双样本 t 检验, 并用 GraphPad Prism (Version 8.0.2) 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 初侵云南松针叶和松脂挥发物的组成

初侵云南松针叶和松脂中共有 18 种化合物, 均为萜烯类化学物质 (表 1)。其中, 针叶挥发物由单萜类和倍半萜两类组成, 前者占总含量的

99.98%，含量超过 1% 的化合物有 α -蒎烯、 β -蒎烯、D-柠檬烯、莰烯和 β -月桂烯，尤以 α -蒎烯含量最高，最低含量也接近于 80%；而后者仅有石竹烯一种，且仅被发现一次，含量为 0.2%。松脂挥发物包括了单萜类、倍半萜类和双萜类三类化学物质，单萜类和双萜类含量较高， α -蒎烯、3-蒎烯和异松油烯是单萜类的主要成分，含量分别为 21.38%、21.42% 和 2.78%；倍半萜有 3 种，但含量较低，以石竹烯（0.13%）和顺- β 法尼烯（0.22%）为主；双萜类含量最高，但仅有一种双萜类氧化物长叶松酸，含量超过了 50%。经非度量多维标度排序，初侵染云南松松针和松脂挥发物的空间分化明显（图 2），多重响应排序显示两者之间差异显著（ $A=0.788$ ， $P=0.009$ ）。

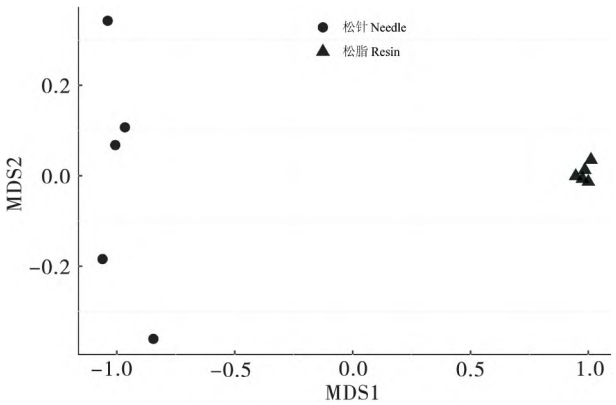


图 2 初侵染云南松松针和松脂挥发物的非度量多维标度排序

Fig. 2 Non-metric multidimensional scale (NMDS) ordination of volatile compositions from the needle and fresh resin of *Pinus yunnanensis* primarily infected by *Tomiscus yunnanensis*

表 1 初侵染云南松松针和松脂挥发物的组成与含量

Table 1 Relative amounts of volatile composition from the needle and fresh resin of *Pinus yunnanensis* primarily infected by *Tomiscus yunnanensis*

峰 Peak	化合物 * Compounds	KI	松针 Needles (%)			松脂 Resins (%)		
			均值	最小值	最大值	均值	最小值	最大值
			Mean ± SE	Minimum	Maximum	Mean ± SE	Minimum	Maximum
单萜类 Monoterpene								
1	三环萜 Tricyclene	922	0.22 ±0.07	0.09	0.49	0.05 ±0.00	0.05	0.06
2	α-侧柏烯 α-Thujene	928	0.00 ±0.00	0.00	0.00	0.07 ±0.00	0.06	0.08
3	α-蒎烯 α-Pinene *	931	80.82 ±1.17	78.37	85.06	21.38 ±0.56	19.94	22.62
4	莰烯 Camphene	943	2.86 ±1.22	1.50	7.75	0.24 ±0.01	0.22	0.26
5	β-蒎烯 β-Pinene *	970	8.78 ±2.30	3.04	13.13	0.57 ±0.03	0.50	0.62
6	β-月桂烯 β-Myrcene	979	1.42 ±0.41	0.72	2.95	0.89 ±0.01	0.86	0.91
7	α-水芹烯 α-Phellandrene	997	0.28 ±0.26	0.00	1.34	0.05 ±0.00	0.04	0.05
8	3-萜烯 3-Carene *	1 005	0.02 ±0.00	0.00	0.02	21.42 ±0.36	20.38	21.94
9	D-柠檬烯 D-Limonene	1 018	4.77 ±0.80	2.34	6.83	0.43 ±0.11	0.12	0.60
10	β-罗勒烯 β-Ocimene	1 041	0.07 ±0.00	0.06	0.08	0.00 ±0.00	0.00	0.00
11	γ-萜品烯 γ-Terpinene *	1 047	0.05 ±0.04	0.00	0.21	0.24 ±0.00	0.23	0.25
12	异松油烯 Terpinolene	1 078	0.30 ±0.22	0.00	1.16	2.78 ±0.02	2.72	2.83
13	4-烯丙基苯甲醚 4-Allylanisole *	1 171	0.41 ±0.24	0.01	1.33	0.38 ±0.05	0.24	0.44
倍半萜类 Sesquiterpene								
14	长叶烯 Longifolene	1 417	0.00 ±0.00	0.00	0.00	0.02 ±0.00	0.01	0.02
15	石竹烯 Caryophyllene	1 424	0.20 ±0.00	0.00	0.02	0.22 ±0.01	0.18	0.23
16	顺-β 法尼烯 cis-β-Farnesene	1 449	0.00 ±0.00	0.00	0.00	0.13 ±0.01	0.10	0.14
17	蛇麻烯 Humulene	1 456	0.00 ±0.00	0.00	0.01	0.00 ±0.00	0.00	0.00
双萜类 Diterpene								
18	长叶松酸 Palustric acid	2 293	0.00 ±0.00	0.00	0.00	51.13 ±0.90	49.17	53.47

注：* 表示对云南切梢小蠹有活性的化学成分。Note：* meaned biologically-active compounds to *T. yunnanensis*.

2.2 云南切梢小蠹的触角电位反应

通过对初侵染云南松松针和松脂挥发物的 GC-EAD 测定发现：云南切梢小蠹成虫对针叶中的 α -蒎烯、 β -蒎烯和 γ -萜品烯有触角电位反应（图 3-A），而对松脂中的 α -蒎烯、 β -蒎烯、3-萜烯和 4-烯丙基苯甲醚有电生理反应（图 3-B）。进一步，用化合物标准品（0.45 ng/ μ L）进行 GC-EAD 验证显示：云南切梢小蠹对 4-烯丙基苯甲醚最大的反应强度（ -0.122 ± -0.018 mV），其次为 α -蒎

烯（ -0.068 ± -0.004 mV）、 γ -萜品烯（ -0.05 ± -0.008 mV）和 β -蒎烯（ -0.041 ± -0.006 mV），最小的则是 3-萜烯（ -0.014 ± -0.001 mV）。

2.3 云南切梢小蠹对活性气味的行为选择性

通过对初侵染云南松挥发物中的 5 种化合物的行为选择性测试发现： α -蒎烯、3-萜烯和 γ -萜品烯对云南切梢小蠹具有明显的正趋性，即具有引诱功能，而 4-烯丙基苯甲醚和 β -蒎烯则表现负趋性，有驱避作用（图 4）。

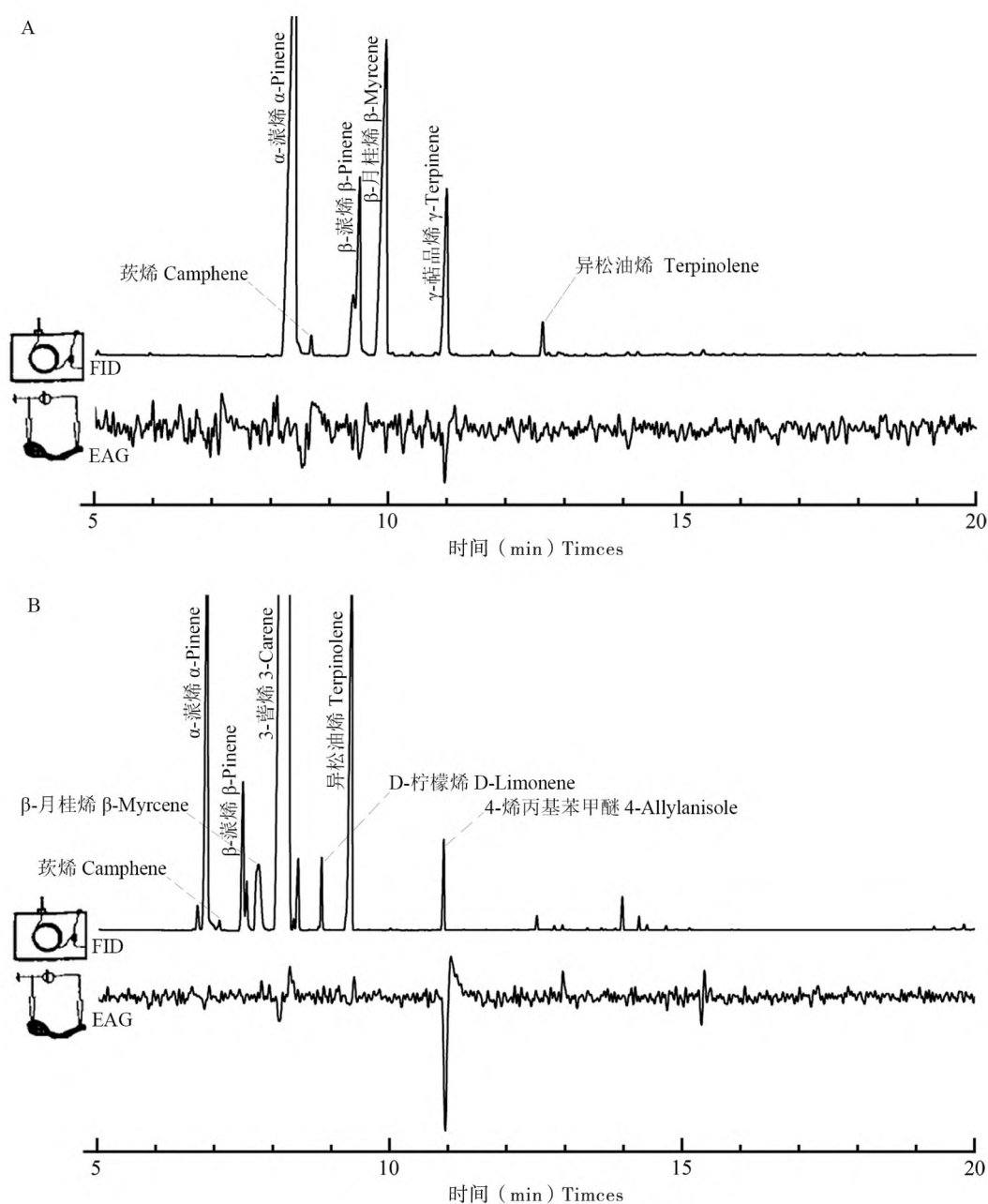


图3 云南切梢小蠹对初侵染云南松松针（A）和松脂挥发物（B）的触角电位反应

Fig. 3 GC-EAD recordings of antenna of *Tomiscus yunnannensis* responding to headspace needle odors (A) and freshly tapped resin (B) from primarily infected host *Pinus yunnanensis*, respectively

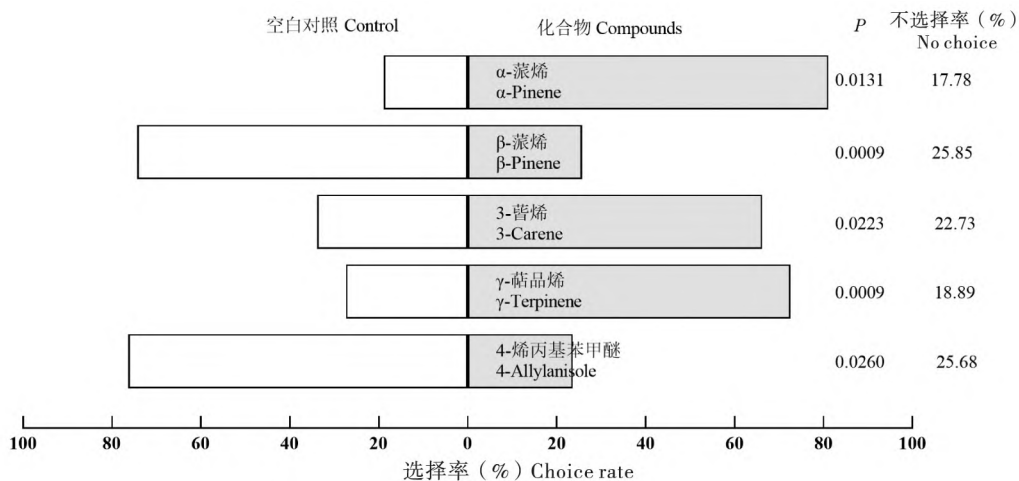


图 4 云南切梢小蠹对活性气味的选择性反应

Fig. 4 Choice rate of *Tomiscus yunnanensis* exposed to five biologically-active compounds in a GC-EAD

3 结论与讨论

云南切梢小蠹对初侵染云南松挥发物中的α-蒎烯、β-蒎烯、3-萜烯、γ-萜品烯和4-烯丙基苯甲醚有触角电位和行为反应，但反应强度和趋向性有所不同。其中，触角电位反应中等的α-蒎烯、γ-萜品烯以及最小的3-萜烯表现出正趋性，即引诱作用，而触角电位反应最强的4-烯丙基苯甲醚和中等的β-蒎烯则为负趋向性，有驱避功能。考虑到初侵染云南松针叶和树干挥发物组成及其空间分布（图2），活性成分的差异性可能暗示着云南切梢小蠹的性成熟程度或者卵巢发育进度，影响云南切梢小蠹对寄主挥发物的嗅觉和行为反应。

3.1 云南松挥发物的组成

与其它松属植物类似，云南松能够释放非常丰富的挥发性物质，尤其是单萜类，但化合物种类及其含量上有着显著不同（Hengxiao *et al.*, 1999；赵涛等，2002；殷彩霞等，2002；路荣春等，2008；杨燕等，2009；闫争亮等，2011）。例如，丁靖凯等（1987）用水蒸气蒸馏法鉴定了松针的挥发物，但仅鉴定出26种化合物，α-蒎烯（30%~90%）和β-蒎烯（1%~43%）是主要成分，且两者在每个样品中的总含量超过70%，有明显的地理变异，而α-侧柏烯、β-金合欢烯、β-澄椒烯也首次在针叶中被发现。杨燕等（2009）同样用水蒸气蒸馏法，发现松针挥发物了53种化合物，鉴定出50种成分，不仅包括单萜类（α-蒎烯、β-蒎烯、β-月桂烯、柠檬烯、香桉烯、异松油烯，含

量为7.77%）和倍半萜类物质（α-古巴烯、双环榄香烯、α-萆澄茄烯、β-榄香烯、大根香叶烯D等16种，含量27.23%），而且还有醇类物质11种（0.26%）、醛类物质2种（3.98%）、烷烃类物质3种（1.79%）、有机酸类6种（25.66%）、脂类物质3种（3.34%）、以及含氮化合物2种（20.24%）。殷彩霞等（2002）则用石油醚萃取并解析了云南松松针和松梢的挥发物组成，发现两者均有13种成分，仅有α-蒎烯、β-蒎烯、β-月桂烯、茨烯、3-萜烯、香桉烯等6种化合物与上述成分相同，α-蒎烯同样具有最高含量，在松针和松梢中分别含有9.14%和47.13%。赵涛等（2002）则用正己烷萃取树干韧皮部的挥发物，但仅鉴定出10种成分，有6种成分出现在针叶挥发物中，而α-蒎烯的含量高达90.43%，为唯一的优势化合物。尹晓兵等（2007）分析了不同云南松种源间松脂的挥发性成分，发现其单萜类（31.9%~57.3%）和倍半萜类（41.8%~68.0%）含量高，单萜类物质能够反应云南松地理种源的遗传距离，尤其是α-蒎烯和β-蒎烯，这与丁靖凯等（1987）的结果相一致；双萜类含量较为稳定，含量0.3%~4.9%，以长叶松酸、左旋海松酸和新枞酸为主，但与种源的遗传距离关系不大。在本文结果中，发现云南松针和松脂挥发物中仅有萜烯类物质，尤其针叶中的单萜类物质，含量达到99.98%，而松脂中成分也在其它研究中被发现，只是不含有分子量相对较大、沸点较高，或者其它来源的次生代谢物质（殷彩霞等，2002；杨燕等，2009），考虑到溶剂萃取对溶解物质的选择

性以及水蒸气蒸馏容易损失低沸点和水溶性组分, 本文所采用的顶空动态法, 更近似于云南松在自然生境中所释放的挥发物, 也更利于筛选云南切梢小蠹寄主选择或者取食和繁殖过程中所利用的挥发物成分, 这也在众多的植物-昆虫-天敌组成的三级营养系统中被广泛验证 (Agelopoulou and Pickett, 1998; Faccoli *et al.*, 2008; Munro *et al.*, 2020)。另一方面, 松属植物所释放的萜烯类物质, 不仅仅是小蠹虫寄主定位的引导信号, 更重要是植物的防御性反应, 即抵御害虫或病原微生物侵入自身的防御系统 (Gershenzon and Dudareva, 2007; Romón *et al.*, 2017), 且一些研究已证实 α -蒎烯、 β -蒎烯和柠檬烯含量越低, 越有利于小蠹侵入寄主 (Lieutier *et al.*, 2015; Romón *et al.*, 2017), 这与本文研究结果高度一致 (表 1)。同时, 萜烯类物质也有着明显的地理变异和季节差异性 (丁靖凯等, 1987; Hengxiao *et al.*, 1999; 尹晓兵等, 2007; Romón *et al.*, 2017), 特别是在一些区域内, 由于云南松含有较高含量的 β -蒎烯和柠檬烯, 可以更好的抵御云南切梢小蠹的攻击, 正如云南楚雄紫溪山的云南松很少受害, 就是一个很好的例证。

3.2 云南切梢小蠹利用的活性成分与生态功能

截止目前, 仅发现单萜类物质 α -蒎烯、 β -蒎烯、 β -水芹烯和 3-蒎烯对云南切梢小蠹具有活性功能, 这也与大小蠹 *Dendroctonus* spp.、齿小蠹 *Ips* spp.、地中海切梢小蠹 *T. destruens* 以及横坑切梢小蠹 *T. minor* 等所利用的寄主成分相同 (李丽莎等, 1993; 殷彩霞等, 2002; 闫争亮等, 2011; Hofstetter *et al.*, 2012; Lieutier *et al.*, 2015), 但云南切梢小蠹对挥发物成分的趋向性并不相同。例如, 李丽莎等 (1993) 采用小容器生测法发现 α -蒎烯和 3-蒎烯具有正趋向性, 趋向率可达到 95%, 但林间无法诱捕到云南切梢小蠹。殷彩霞等 (2002) 则发现单一的 α -蒎烯、 β -蒎烯、 β -水芹烯和 3-蒎烯对云南切梢小蠹没有趋性, 但按照 20.6:4.7:6.6:1 的配比则对云南切梢小蠹有 60.5% 的引诱比率。闫争亮等 (2011) 发现蛀梢期的云南切梢小蠹对松梢挥发物表现出一定的正趋向性, 对树干挥发物则出现驱避性, 而此时树梢挥发物以 α -蒎烯 (29.20%) 和 β -水芹烯 (30.52%) 为主, 树干以 α -蒎烯 (81.01%) 和 3-蒎烯 (6.66%) 含量最高, 说明着云南切梢小蠹的行为选择性与挥发物组成和浓度依赖有关。

在本文中, 云南切梢小蠹对针叶和松脂挥发物成分既有正趋向性, 又有负趋向性, 考虑到针叶和松脂挥发物的空间分化, 预示着云南切梢小蠹对为害部位具有明显的选择特性, 这与地中海切梢小蠹对寄主植物—意大利五针松 *P. pinea* 的松梢和树干的选择性是一致的 (Faccoli *et al.*, 2008)。与其它切梢小蠹一样, 云南切梢小蠹在蛀梢时补充营养, 完成卵巢的发育; 在蛀干时, 则进行交尾和产卵, 完成生殖目的。结合初侵染云南松针叶和松脂挥发物成分及其空间分布, 云南切梢小蠹的趋向性差异可能与信息化学物质的空间异质性直接有关, 这样有利于寻找适宜的寄主, 提升自我的繁殖适合度 (Lieutier *et al.*, 2015)。因此, 下一步结合云南松挥发物的空间分化特征, 并考虑其地理变异的特性, 在不同区域内调整、优化化合物的组成和配比, 才可能解决林间无法诱捕到云南切梢小蠹的难题, 实现云南切梢小蠹种群的理化调控和可持续控制。

参考文献 (References)

- Adams RP. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry [M]. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007: 9–53.
- Agelopoulou NG, Pickett JA. Headspace analysis in chemical ecology: Effects of different sampling methods on ratios of volatile compounds present in headspace samples [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 1998, 24 (7): 1161–1172.
- Chen H, Li Z, Bu S, *et al.* Flight of the Chinese white pine beetle (Coleoptera: Scolytidae) in relation to sex, body weight and energy reserve [J]. *Bulletin of Entomological Research*, 2011, 101 (1): 53–62.
- Ding JK, Ding LS, Yi YF, *et al.* Chemical constituents of pine needle oil from *Pinus yunnanensis* and *Pinus kesiya* [J]. *Plant Diversity and Resources*, 1987, 9 (4): 505–508. [丁靖凯, 丁立生, 易元芬, 等. 滇产云南松、思茅松松针油的化学成分 [J]. 植物分类与资源学报, 1987, 9 (4): 505–508]
- Duan Y, Kerdelhué C, Ye H, *et al.* Genetic study of the forest pest *Tomicus piniperda* (Col., Scolytinae) in Yunnan Province (China) compared to Europe: New insights for the systematics and evolution of the genus *Tomicus* [J]. *Heredity*, 2004, 93 (5): 416–422.
- Faccoli M, Anfora G, Tasin M. Responses of the mediterranean pine shoot beetle *Tomicus destruens* (Wollaston) to pine shoot and bark volatiles [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2008, 34 (9): 1162–1169.
- Ge F. The ecological regulation and management of pests [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2020, 57 (1): 10–19. [戈峰. 论害虫生态调控策略与技术 [J]. 应用昆虫学报, 2020, 57 (1): 10–19]

- Gershenzon J, Dudareva N. The function of terpene natural products in the natural world [J]. *Nature Chemical Biology*, 2007, 3 (7): 408–414.
- Heng XG, McMillin JD, Wagner MR, *et al.* Altitudinal variation in foliar chemistry and anatomy of yunnan pine, *Pinus yunnanensis*, and pine sawfly (Hym., Diprionidae) performance [J]. *Journal of Applied Entomology*, 1999, 123 (8): 465–471.
- Hofstetter RW, Gaylord ML, Martinson S, *et al.* Attraction to monoterpenes and beetle-produced compounds by syntopic *Ips* and *Dendroctonus* bark beetles and their predators [J]. *Agricultural and Forest Entomology*, 2012, 14 (2): 207–215.
- Ji M, Dong XQ, Liu HP, *et al.* Preliminary study on remote forest damaged sensing detection of Yunnan pine by *Tomicus piniperda* [J]. *Journal of West China Forestry Science*, 2007, 36 (1): 87–90. [季梅, 董谢琼, 刘宏屏, 等. 云南松林纵坑切梢小蠹灾害遥感监测的初步研究 [J]. 西部林业科学, 2007, 36 (1): 87–90]
- Kirkendall LR, Faccoli M, Ye H. Description of the Yunnan shoot borer, *Tomicus yunnanensis* Kirkendall & Faccoli sp. n. (Curculionidae, Scolytinae), an unusually aggressive pine shoot beetle from southern China, with a key to the species of *Tomicus* [J]. *Zootaxa*, 2008, 1819: 25–39.
- Li LS, Shu NB, Huai KY, *et al.* Trapping experiments of *Tomicus piniperda* to the chemical volatiles [J]. *Entomological Knowledge*, 1993, 30 (3): 159–161. [李丽莎, 舒凝碧, 槐可跃, 等. 几种化合物对松纵坑切梢小蠹的引诱试验 [J]. 昆虫知识, 1993, 30 (3): 159–161]
- Vega FE, Hofstetter RW. Bark Beetles: Biology and Ecology of Native and Invasive Species [M]. San Diego: Academic Press, 2015: 371–426.
- Liu HP, Ze SZ, Ji M, *et al.* Technical Regulations for Clearing of Damaged Trees by Yunnan Pine Shoot Beetles [S]. Beijing: National Forestry Administration, 2014: LY/T 2352–2014. [刘宏屏, 泽桑梓, 季梅, 等. 云南切梢小蠹受害木清理技术规程 [S]. 北京: 国家林业局, 2014: LY/T 2352–2014]
- Lu RC, Wang HB, Zhang Z, *et al.* Research advances on using *Pinus yunnanensis* volatiles to monitor and control *Tomicus yunnanensis* (Coleoptera: Scolytidae) [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2008, 23 (2): 124–128. [路荣春, 王鸿斌, 张真, 等. 利用云南松挥发性化学物质监测和防治云南纵坑切梢小蠹的研究进展 [J]. 西北林学院学报, 2008, 23 (2): 124–128]
- Müller C, Caspers BA, Gadau J, *et al.* The power of infochemicals in mediating individualized niches [J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2020, 35 (10): 981–989.
- Munro HL, Gandhi KJK, Barnes BF, *et al.* Electrophysiological and behavioral responses *Dendroctonus frontalis* and *D. terebrans* (Coleoptera: Curculionidae) to resin odors of host pines (*Pinus* spp.) [J]. *Chemoecology*, 2020, 30 (5): 215–231.
- Tittiger C, Blomquist GJ. *Advances in Insect Physiology* [M]. London: Academic Press, 2016: 1–74.
- Romón P, Aparicio D, Palacios F, *et al.* Seasonal terpene variation in needles of *Pinus radiata* (Pinales: Pinaceae) trees attacked by *Tomicus piniperda* (Coleoptera: Scolytinae) and the effect of limonene on beetle aggregation [J]. *Journal of Insect Science*, 2017, 15 (5): 1–6.
- Wu CX, Liu F, Zhang SF, *et al.* Semiochemical regulation of the intraspecific and interspecific behavior of *Tomicus yunnanensis* and *Tomicus minor* during the shoot-feeding phase [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2019, 45 (3): 227–240.
- Yan ZL, Ma HF, Ze SZ. Difference of taxis responses of *Tomicus yunnanensis* to volatile extracts from trunks and branches of *Pinus yunnanensis* [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2011, 33 (2): 191–194. [闫争亮, 马惠芬, 泽桑梓. 云南切梢小蠹对云南松树干和枝梢挥发性物质趋向反应的差异分析 [J]. 环境昆虫学报, 2011, 33 (2): 191–194]
- Yang Y, Yang MF, Yang ZH, *et al.* Chemical constituents of volatile from pine needles of *Pinus yunnanensis* [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2009, 45 (5): 173–177. [杨燕, 杨茂发, 杨再华, 等. 云南松松针的挥发性化学成分 [J]. 林业科学, 2009, 45 (5): 173–177]
- Ye H. *Tomicus yunnanensis* [M]. Kunming: Yunnan Science and Technology Press, 2011: 15–67. [叶辉. 云南切梢小蠹 [M]. 昆明: 云南科技出版社, 2011: 15–67]
- Yin CX, Gao ZL, Lv J, *et al.* Test on the taxis responses of *Tomicus piniperda* to the volatiles of Yunnan pine shoot [J]. *Entomological Knowledge*, 2002, 39 (5): 384–386. [殷彩霞, 高竹林, 吕军, 等. 纵坑切梢小蠹对云南松枝梢提取物趋性测试 [J]. 昆虫知识, 2002, 39 (5): 384–386]
- Yin XB, Geng SX, Zheng W, *et al.* Differences of physical and chemical characteristics of oleoresin among provenances from *Pinus yunnanensis* [J]. *Journal of West China Forestry Science*, 2007, 36 (3): 34–41. [尹晓兵, 耿树香, 郑巍, 等. 云南松种源间松脂物理化学特征差异研究 [J]. 西部林业科学, 2007, 36 (3): 34–41]
- Zhao T, Li LS, Zhou N. The attraction of Yunnan pine to pine shoot beetle and tree volatile compositions [J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 2002, 30 (4): 47–49. [赵涛, 李丽莎, 周楠. 云南松对松小蠹的引诱能力及其挥发物组成 [J]. 东北林业大学学报, 2002, 30 (4): 47–49]
- Zhou N, Li LS, Jiang ZL, *et al.* Study on aggregation pheromone of *Tomicus piniperda* [J]. *Yunnan Forestry Science and Technology*, 1997, 79 (2): 20–38. [周楠, 李丽莎, 蒋昭龙, 等. 云南松纵坑切梢小蠹聚集信息素研究 [J]. 云南林业科技, 1997, 79 (2): 20–38]