

旋花蛾性信息素成分的鉴定

曹宛虹, 何洪巨

(北京市农林科学院蔬菜研究中心, 北京 100089)

摘要: 提取和鉴定了杂草田旋花 *Convolvulus arvensis* 的天敌旋花蛾 *Tyta luctuosa* 的性信息素主要成分, 并应用风洞实验对雄蛾进行了测试。结果表明, 腺体提取物和雌蛾求偶时所释放的主要性信息素成分均为 2 种化合物: 顺-9-十四碳烯醛 (Z9-14:Ald) 和顺-11-十六碳烯醛 (Z11-16:Ald)。腺体提取物中 2 种化合物的总量在个体间差异很大 (22 ~ 167 ng), 但二者的比率相对稳定 (Z9-14:Ald/Z11-16:Ald = 0.3 ± 0.15)。雌蛾所释放的性信息素量及比率在个体间也存在差异。每只雌蛾求偶时平均每小时释放 94 ng Z9-14:Ald 和 45 ng Z11-16:Ald, 平均比率为 2.2。风洞实验结果显示, 48% 的雄蛾可被合成的性信息素混合物 (0.4 μ g Z9-14:Ald, 2 μ g Z11-16:Ald) 引诱完成逆风飞行并最终触及刺激源, 而 2 种对照组 (以求偶期雌蛾或性信息素腺体提取物为刺激源) 的引诱率则分别为 62% 和 44%。

关键词: 旋花蛾; 性信息素; 田旋花; 生物防治

中图分类号: S435.132

文献标识码: A

文章编号: 0454-6296 (2002) 01-0030-05

Identification of sex pheromone of the moth, *Tyta luctuosa*

CAO Wan-Hong, HE Hong-Ju (Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100089, China)

Abstract: The major sex pheromone components of *Tyta luctuosa*, a potential biological control agent for field bindweed, were extracted, identified, and tested with male moths in a wind tunnel. Two compounds, (Z)-9-tetradecenal and (Z)-11-hexadecenal, were identified as the major female sex pheromone components from the pheromone gland extracts and airborne emissions from the calling females. Although the total amount of the two compounds in the extracts varied (22 ~ 167 ng, mean 75 ± 56 ng) among individuals, the ratio of (Z)-9-tetradecenal to (Z)-11-hexadecenal was relatively constant at 0.3 ± 0.15 . The emission rate and the ratio also varied among individuals. Calling females released an average of 94 ng of (Z)-9-tetradecenal and 45 ng of (Z)-11-hexadecenal per hour with a mean ratio of 2.2. In wind tunnel tests, 48% of males completed upwind flight and touched the stimulus source in response to the synthetic pheromone blend of 0.4 μ g of (Z)-9-tetradecenal and 2 μ g of (Z)-11-hexadecenal, compared with 62% and 44% in response to the calling females and pheromone gland extracts, respectively.

Key words: *Tyta luctuosa*; sex pheromone; field bindweed; biological control

旋花科 (Convolvulaceae) 的杂草田旋花 *Convolvulus arvensis* 是一种多年生的深根杂草, 很难用化学或机械的方法防治, 是世界上危害性最大的杂草之一 (Holm *et al.*, 1977), 在我国也有广泛分布。旋花蛾 *Tyta luctuosa* 起源于欧洲, 属鳞翅目夜蛾科, 它的幼虫以田旋花为专一性食物, 是田旋花的天敌 (Rosenthal, 1978), 并可能成为对该杂草进行生物防治的一种有效手段 (Rosenthal *et al.*, 1988)。在经典杂草生物防治程序中, 当作为生物防治剂的节肢动物被释放至田间后, 探测其种群是否建立及分布范围是检测生物防治水平的重要环节。广泛应用于田间的昆虫性信息素捕捉器为此提供了一个有利的工具。

在很多夜行性的鳞翅目昆虫种类中, 雌雄的交配是通过雌性信息素来实现的。已有很多种鳞翅目昆虫的雌性信息素成分被确定 (Arn *et al.*, 1992)。旋花蛾也是雌蛾释放性信息素引诱雄蛾。但至今旋花蛾的雌性信息素的化学组成尚未确定。本研究对旋花蛾的雌性信息素腺体成分进行了分析, 并应用风洞实验对其主要的性信息素成分进行了确认。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫的饲养

旋花蛾的起始虫源来自美国 USDA-ARS。卵的孵化及幼虫的饲养均在放有田旋花植株的塑料盒中

进行，直至化蛹。塑料盒置于 25℃ 恒温、16 h 光照的生长箱中。蛹期时雌雄分开，置于小玻璃瓶中，每瓶 1 蛹，瓶盖上有网孔以透气。每天在黑暗前 1 h 检查蛹的羽化，一旦羽化，即刻提供饱蘸果汁的棉球作为成虫的食物，并以羽化当天记为 0 天。蛹及成虫均保存在上述条件的生长箱中，不同性别的成虫分别保存在不同的生长箱中。

1.2 性信息素的收集

1.2.1 腺体提取物：以羽化 2~3 天的未交配雌蛾为材料进行性信息素的收集。将正处于求偶期的雌蛾用 CO₂ 使其昏迷，用刀片将其腹尖的腺体切下，合并 5~10 个腺体于 CH₂Cl₂ (10 μL/腺体) 中浸泡 30 min 或 10 min 后，将腺体取出，溶液用于性信息素成分的鉴定。为定量分析性信息素的主要成分，对单腺体用 50 μL 的含有 90 ng 内标物（正十五碳醛，15: Ald）的 CH₂Cl₂ 提取 10 min 后进行测定，共独立测定了 7 个腺体。

1.2.2 空气中释放物：释放到空气中的性信息素采自单个羽化 2~3 天的未交配雌蛾。将雌蛾放入一个玻璃管中，玻璃管的上端用 5 层木炭吸附材料塞住以净化进入的空气，下端与一个填充有吸附填料 Super Q (80~100 目筛) 的小玻璃柱连接，玻璃柱再与真空泵相连。当雌蛾求偶时，开动真空泵收集释放出的性信息素成分。停止收集后即刻向柱子内加入 90 ng 的内标物，以 300 μL CH₂Cl₂ 洗脱其中所吸附的性信息素成分，洗脱液立即进行成分分析，共分别收集测定了 8 只雌蛾的释放物。

1.3 GC 和 GC-MS 分析

性信息素腺体提取物和空气中释放物的溶液经氮气缓慢浓缩至 1 μL 后，用配备有火焰离子化检测器的 HP 5890 系列 II 型气相色谱仪 (GC) 进行分析。采用的固定相为非极性 (DB5HT, 柱长 15 m, 内径 0.25 mm) 或极性 (Stabilwax, 柱长 30 m, 内径 0.2 mm) 的石英毛细管柱。操作条件：柱初始温度为 80℃，保持 2 min，终止温度为 240℃，升温速率 10℃ 或 5℃/min，进样口和检测器的温度分别是 240℃ 和 250℃。氦气作为载气，流速 20~25 cm/s。数据的收集与处理使用 GRAMS/386 软件在 M-Tech 计算机上进行。通过与已知的标准化合物在经过非极性和极性的 GC 柱时的保留时间的比较对性信息素的化学组成进行初步鉴定后，主要性信息素成分的功能团再应用气-质联用仪 (GC-MS) 作进一步确证。GC-MS 采用的固定相为 SPB-5 石英柱，柱长 30 m，内径 0.2 mm，载气为超纯的氦气（柱头压力

105 kPa)。柱温采用程序升温，70℃ 保持 2 min 后，以 10℃/min 的升温速率升至 220℃，保持 10 min。不分流进样口和 GC-MS 接口温度分别为 285℃ 和 280℃。质谱扫描范围为 40~300 m/z。所得数据经 HP Chem/Station 软件分析处理。

本研究中所用的标准化合物购自美国 Sigma 公司，内标物由荷兰植物保护研究所惠赠。标准化合物及内标物的纯度 ≥ 95%。

1.4 触角电位 (EAG) 分析

羽化 1~2 天的雄蛾被 CO₂ 窒息后，用刀片从触角基部将一根触角切下。切断的一端插入参考电极，触角的顶部插入记录电极，电极与放大器和示波器相连。触角暴露在匀速 (100 mL/min) 的湿润气流中。经 GC 非极性或极性柱分离后气化的单腺体提取物用玻璃毛细管分段收集 (1 管/min)，对于样品峰附近的组分缩短收集时间 (1 管/0.5 min)。所收集的各组分由一个 5 mL 的玻璃注射器依次推向触角。记录触角所产生的电信号，以气化的 CH₂Cl₂ 为空白对照。

1.5 风洞实验

本实验所用风洞为一个 1.8 m × 0.9 m × 0.9 m 的有机玻璃箱。空气从左侧经过 5.5 cm 厚的木炭吸附材料和纱布，由电扇吹入风洞内，洞内风速约为 0.24 m/s。风洞顶部装有 8 支 25 W 红炽灯泡，光强调节至 88 lx 左右。羽化 0~3 天的雄蛾用金属网罩住，在测试前放入风洞内至少适应 1 h。测试时将雄蛾放在位于风洞下风侧的小平台上，待测刺激物则位于风洞的上风侧。本实验选用了 3 种刺激物：求偶雌蛾、腺体 (5 个) 提取物以及合成的性信息素混合物。当雄蛾被释放后，观察并记录它在风洞内的行为。

2 结果与讨论

2.1 旋花蛾雌性信息素成分的鉴定

GC 分析显示，旋花蛾腺体在 CH₂Cl₂ 浸泡 30 min 的提取物中存在 4 种主要成分，它们在非极性色谱柱中的滞留时间分别与标准化合物顺-9-十四碳烯醛 (Z9-14: Ald)、顺-9-十四醇 (Z9-14: OH)、顺-11-十六碳烯醛 (Z11-16: Ald) 和顺-11-十六醇 (Z11-16: OH) 相对应 (图 1)。但当分析在 CH₂Cl₂ 中浸泡 10 min 的样品时，只有 2 个主要组分出现，即：Z9-14: Ald 和 Z11-16: Ald。同时，触角电位分析结果也表明，雄蛾的触角对含有这 2 个峰的组分

有很强的电位信号反应 (图 2)。应用极性色谱柱对腺体提取物的分析结果与非极性色谱柱的分析结果相同 (图未显示)。此外, GC-MS 分析进一步确定这 2 种成分的功能团为含有 1 个双键的不饱和醛。

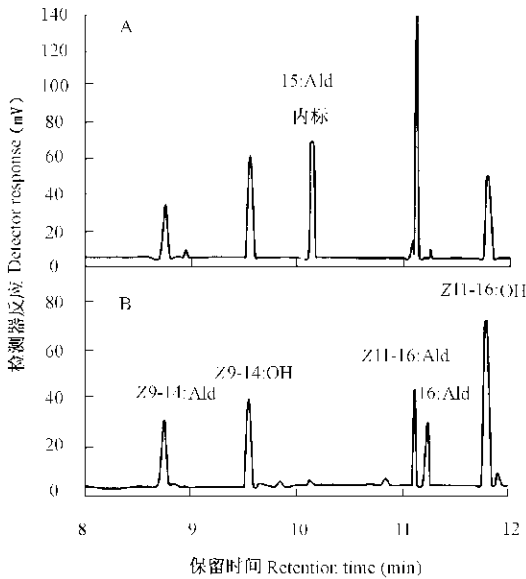


图 1 性信息素腺体提取物 (A) 和标准化合物 (B) 的气相色谱图

Fig. 1 Gas chromatogram of pheromone gland extracts (A) and synthetic standard compounds (B)

腺体提取物与标准化合物均使用非极性柱 DB5HT 分离, 升温速率 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。The extracts and standards were separated using a nonpolar DB5HT column. The column temperature increased at $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$

雌蛾在求偶时释放的性信息素中含有与腺体提取物中相同的 2 个主要组分, 即: Z9-14:Ald 和 Z11-16:Ald (图 3)。定量分析结果显示, 平均每只正在求偶的雌蛾每小时释放 94 ng Z9-14:Ald 和 45 ng Z11-16:Ald, 释放量在个体间有很大差异; 每个腺体平均含有 17 ng Z9-14:Ald 和 58 ng Z11-16:Ald, 同样其含量在个体间也有很大差异 (表 1)。值得注意的是, 每只雌蛾所释放的 2 种性信息素成分的比率与存在于腺体提取物中的 2 种成分的比率有显著差异。从求偶雌蛾所收集的释放物中 Z9-14:Ald 的含量高于 Z11-16:Ald; 而在腺体提取物中, Z9-14:Ald 的含量则低于 Z11-16:Ald。求偶雌蛾释放到空气中的性信息素中含有高比率的 Z9-14:Ald, 可能是由于 Z9-14:Ald 的碳链稍短于 Z11-16:Ald, 从而具有较高的挥发性。

表 1 腺体提取物中性信息素含量以及求偶雌蛾性信息素释放率及其比值*

Table 1 Content of pheromone components in gland extract and pheromone emission rate of calling female and the content ratio of the same component*

性信息素 化合物 Pheromone compounds	腺体提取物 (ng/腺体) Gland extract (ng/gland)	雌蛾释放率 (ng/h) Emission rate (ng/h)	比值 Ratio
Z9-14:Ald	$17 \pm 15 \text{ a}$	$58 \pm 41 \text{ b}$	0.3 ± 0.15
Z11-16:Ald	$94 \pm 36 \text{ a}$	$45 \pm 17 \text{ b}$	2.2 ± 0.90

* 表中数据为平均值 \pm 标准差, 同行数据后有不同字母表示经 ANOVA 分析有显著差异 ($P < 0.01$)。The data in the table indicate means \pm SD and in the same row those followed by different letters are significantly different by ANOVA test ($P < 0.01$)

表 2 旋花蛾雄蛾在风洞中对不同来源性信息素的反应百分率

Table 2 Percentage of male *Tyta luctuosa* in response to sex pheromone from different sources in wind tunnel

行为分类 Behavior item	雄蛾对不同刺激源反应的百分率 (%) Response percentage of male moth to different sources of stimulus		
	求偶雌蛾 Calling female ($n = 26$)	5 个腺体提取物 Extract of 5 glands ($n = 25$)	合成性信息素* Synthetic pheromone ($n = 27$)
激活 activated	92	76	89
起飞 taking-off	85	68	85
锁定 locking	77	48	59
逆风定向 orientation	65	44	52
定向飞行至风洞 中部 flying to mid-way	62	44	48
完成飞行 complete flight	62	44	48
降落 landing	62	44	48
触及刺激源 touching source	62	44	48

含 $0.4 \mu\text{g}$ Z9-14:Ald 和 $2 \mu\text{g}$ Z11-16:Ald 的滤纸

The filter paper containing $0.4 \mu\text{g}$ Z9-14:Ald and $2 \mu\text{g}$ Z11-16:Ald

2.2 风洞实验结果

预备实验显示, 在小滤纸条上滴加 $0.4 \mu\text{g}$ Z9-14:Ald 和 $2 \mu\text{g}$ Z11-16:Ald 后, 其挥发至空气中的量相当于 1 个雌蛾在求偶时所释放的性信息素的量, 这时加在滤纸条上的 2 种性信息素成分的比率 (0.2) 接近于在腺体提取物中二者的比率 (0.3)。

雌蛾对性信息素刺激的典型反应通常包括: (1) 激活, 特征为翅膀迅速不停地扇动; (2) 起

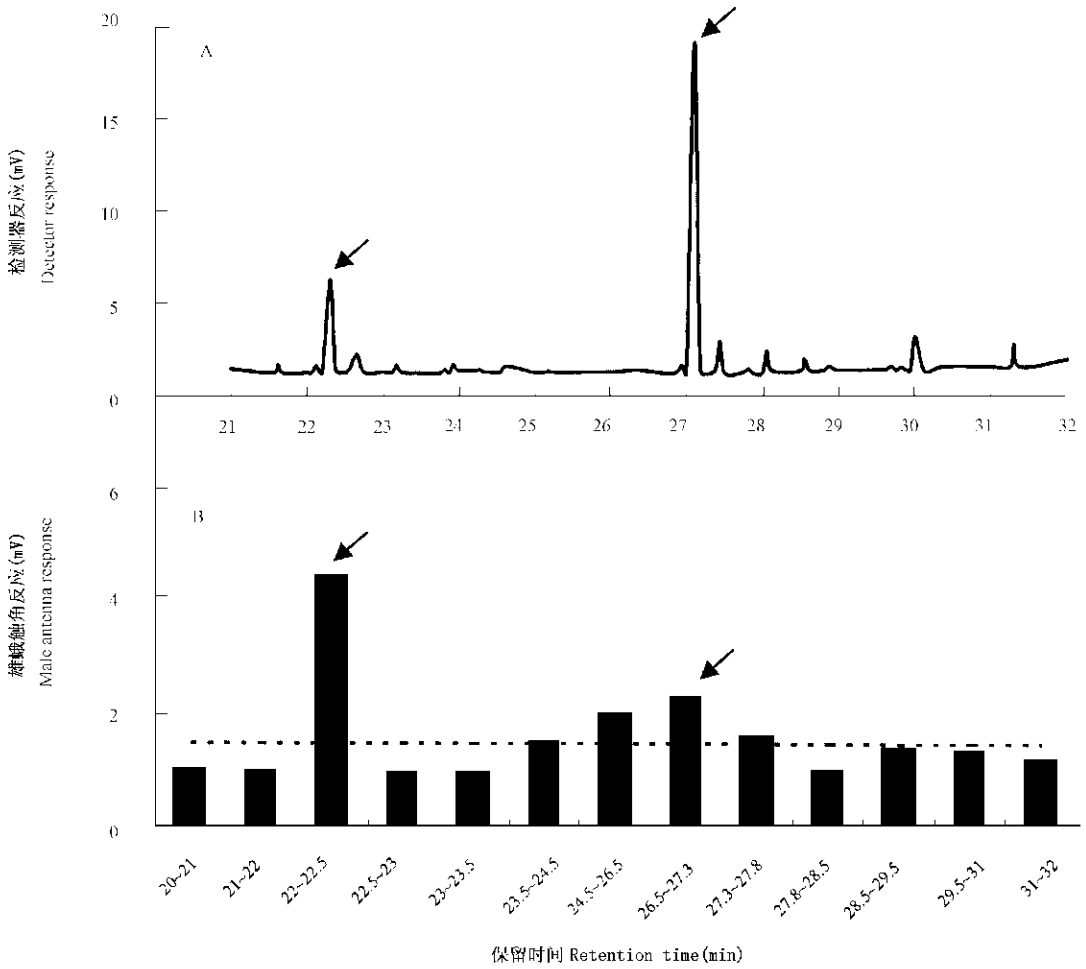


图2 腺体提取物的气相色谱图 (A) 和相应的触角电位图 (B)

Fig. 2 Gas chromatogram (A) and corresponding electroantennogram (B) of pheromone gland extract

提取物使用非极性柱 DBSHT 分离, 升温速率 $5^\circ\text{C}/\text{min}$ 。雄蛾触角对 CH_2Cl_2 (空白对照) 的反应值为 1.5 mV (虚线)。箭头所示为具有活性的性信息素组分 The extracts were separated using a nonpolar DBSHT column. The column temperature increased at $5^\circ\text{C}/\text{min}$. Male antennal response to CH_2Cl_2 (blank) was 1.5 mV (dash line). Arrows indicate the active pheromone fractions

飞; (3) 锁定, 为雄蛾在性信息素氛围中徘徊做出下一步动作之前的一种非常短暂的停滞状态; (4) 逆风定向, 包括雄性鳞翅目昆虫典型的“之”字型飞行行为; (5) 定向飞行至风洞的中部; (6) 在刺激源附近降落; (7) 触及刺激源 (Bell *et al.*, 1995; Cardé and Baker, 1984)。

为检测合成的性信息素混合物 ($0.4\ \mu\text{g}$ Z9-14: Ald 和 $2\ \mu\text{g}$ Z11-16: Ald) 对雄蛾的引诱率, 本研究使用该混合物作为刺激源, 并以求偶雌蛾及其腺体提取物分别作为对照进行了风洞实验。观察结果表明: 85% 以上的被试雄蛾可被合成的性信息素混合物激活并起飞, 59% 可以观察到锁定状态, 52% 可以定向, 48% 的被试雄蛾可以完成逆风飞行并最终触及刺激源 (表 2)。与 2 组对照比较, 合成性信

息素混合物对雄蛾的引诱率低于求偶雌蛾, 而高于腺体提取物。对所有 3 种不同的性信息素刺激源, 雄蛾都表现为一旦可以逆风飞行至风洞中央, 即可最终到达并触及刺激源。腺体提取物对雄蛾的引诱率低于求偶雌蛾, 这一方面可能是由于还有微量的组分未被鉴定出来, 另一方面由于本实验采用的腺体提取物取自 5 个腺体, 其性信息素的含量可能与求偶雌蛾所释放的性信息素量仍有差异。

风洞实验结果说明, Z9-14: Ald 和 Z11-16: Ald 是引起旋花蛾雄蛾定向逆风飞行的 2 个基本成分。这 2 种成分也是鳞翅目夜蛾科昆虫中最常见的性信息素成分 (Arm *et al.*, 1992)。Dunkelblum 等 (1989) 曾在大棉铃虫 *Heliothis peltigera* 的性信息素腺体中发现了 10 种成分, 并通过风洞实验和诱捕

实验确定 Z11-16:Ald 和 Z9-14:Ald 为主要成分。本研究曾在旋花蛾的性信息素腺体提取物中发现了多种性信息素类的化合物, 如 Z9-14:OH, Z9-14:Ald, Z11-16:OH, Z11-16:Ald, 但从求偶雌蛾收集的释放物中只检测到 Z9-14:Ald 和 Z11-16:Ald。其它成分有可能是性信息素生物合成的前体或中间产物 (Morse and Meighen, 1987)。

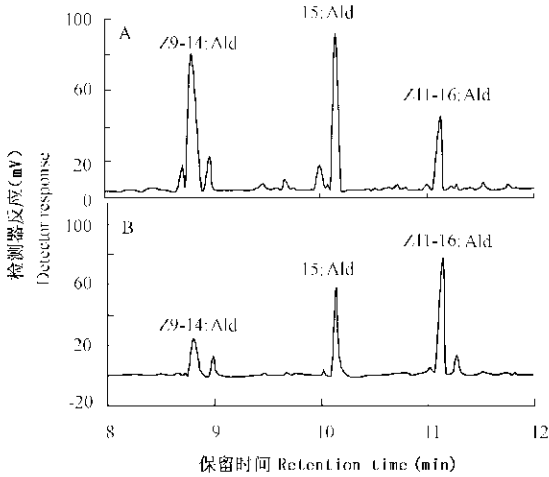


图 3 腺体提取物 (B) 和单个雌蛾所释放的性信息素 (A) 的气相色谱图

Fig. 3 Gas chromatogram of pheromone gland extracts (B) and airborne emissions by individual female (A)

所有成分均采用非极性柱 DB5HT 分离, 升温速率 10°C/min, 定量内标物为 90 ng 的 15:Ald

A DB5HT nonpolar column was used to separate the chemicals. The column temperature increased at 10°C/min. 90 ng 15:Ald was added as internal standard

旋花蛾雌蛾所释放的 2 种性信息素成分的量在个体间有很大差异, 但 2 种成分的比率趋于相对稳定 (2.2 ± 0.9)。性信息素释放量的个体间差异可能是由于一个或多个因素造成的, 如成虫日龄、生理状态、性信息素收集的时间等。雌蛾腺体内性信息素的含量也会随其日龄、求偶周期等因素变化而不同。雄蛾在风洞中的行为会受到性信息素浓度、环境温度等多种因素的影响 (Charlton *et al.*, 1993)。

风洞实验所提供的结果理论上应该接近于田间实验, 但本实验所用的合成性信息素混合物最终还需要经过田间诱捕试验来检验它的活性, 从而开发出一种有效的性信息素诱捕系统 (McNeil, 1991), 以监测作为杂草田旋花生物防治剂的旋花蛾在田间释放后的种群水平、分散及传播范围。

参 考 文 献 (References)

- Arn H, Tóth M, Priesner E, 1992. List of Sex Pheromones of Lepidoptera and Related Attractants (2nd ed.). Montfavet: International Organization for Biological Control. 1~78.
- Bell W J, Kipp L R, Collins R D, 1995. The role of chemo-orientation in search behavior. In: Cardé R T, Bell W J eds. Chemical Ecology of Insect, 2. New York: Chapman & Hall. 105~152.
- Cardé R T, Baker T C, 1984. Sexual communication with pheromones. In: Bell W J, Cardé R T eds. Chemical Ecology of Insects. London: Chapman & Hall. 355~377.
- Charlton R E, Kanno H, Collins R D *et al.*, 1993. Influence of pheromone concentration and ambient temperature on flight of the gypsy moth, *Lymantria dispar* (L.), in a sustained-flight wind tunnel. *Physiol. Entomol.*, 18: 349~362.
- Dunkelblum E, Kehat M, 1989. Female sex pheromone components of *Heliothis peltigera* (Lepidoptera: Noctuidae): chemical identification from gland extracts and male response. *J. Chem. Ecol.*, 15 (8): 2 233~2 245.
- Holm L G, Pancho J V, Herberger J P *et al.*, 1977. The World's Worst Weeds. Honolulu: The University Press of Hawaii. 98~104.
- McNeil J N, 1991. Behavioral ecology of pheromone-mediated communication in moths and its importance in the use of pheromone traps. *Ann. Rev. Entomol.*, 36: 407~430.
- Morse D, Meighen E, 1987. Pheromone biosynthesis: Enzymatic studies in Lepidoptera. In: Prestwich G D, Blomquist G J eds. Pheromone Biochemistry. New York: Academic Press. 121~158.
- Rosenthal S S, 1978. Host specificity of *Tyta luctuosa* (Lep.: Noctuidae) in insect associated with *Convolvulus arvensis* (Convolvulaceae). *Entomophaga*, 23 (4): 367~370.
- Rosenthal S S, Clement S L, Hostettler N *et al.*, 1988. Biology of *Tyta luctuosa* (Lep.: Noctuidae) and its potential value as a biological control agent for the weed *Convolvulus arvensis*. *Entomophaga*, 33 (2): 185~192.