

柑橘凤蝶成虫虫体挥发物成分及 触角电位反应研究*

刘 杰** 李明涛 陈顺安 石 雷*** 陈晓鸣

(中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 国家林业局资源昆虫培育与利用重点实验室, 昆明 650224)

摘 要 【目的】蝴蝶虫体的气味是识别同类和异性的重要信息来源。本研究通过分析柑橘凤蝶 *Papilio xuthus* 雌雄蝶羽化后挥发物的变化规律, 并比较了未交配雌雄蝶对挥发物的触角电位 (EAG) 反应, 为下一步探讨柑橘凤蝶求偶时嗅觉的利用提供依据。【方法】使用顶空固相微萃取 (HS-SPME) 提取柑橘凤蝶挥发物, 并通过气质联用仪 (GC-MS) 分析 SPME 提取物中的主要成分, 采用触角电位仪 (EAG) 测定柑橘凤蝶 *Papilio xuthus* 对挥发物的触角电位反应。【结果】雌雄蝶羽化后共检测到 14 类挥发物, 主要包括醇类和酯类, 其中酯类、萜类在羽化后均有出现。交配时雌雄蝶均共有且含量较高的挥发物有 2 种 (2-乙基己醇、2-乙基己基乙酸酯), 交配时雄蝶特有挥发物仅 1 种 (α -法呢烯), 未检测到雌蝶特有的挥发物。柑橘凤蝶雌雄蝶从交配前到交配后, 其体内的 2-乙基己醇、2-乙基己基乙酸酯和 α -法呢烯的含量都变化明显。在交配前及交配时 2-乙基己醇和 α -法呢烯含量增加, 而 2-乙基己基乙酸酯的含量减少, 表明在交配时, 可能有大量的 2-乙基己醇、2-乙基己基乙酸酯和 α -法呢烯释放到体外。并且未交配雌雄蝶对 2-乙基己醇、2-乙基己基乙酸酯和 α -法呢烯 EAG 反应均明显高于对照。【结论】根据雌雄蝶羽化后挥发物变化规律及触角电位试验初步检验, 推测 2-乙基己醇、2-乙基己基乙酸酯在柑橘凤蝶同种识别及同性识别中起作用, 特有的挥发物 α -法呢烯在柑橘凤蝶同种异性的识别中起作用。

关键词 柑橘凤蝶; 交配; 挥发物; 变化规律; 触角电位反应

Analysis of volatile components and electroantennogram responses of adult *Papilio xuthus*

LIU Jie** LI Ming-Tao CHEN Shun-An SHI Lei*** CHEN Xiao-Ming

(Key Laboratory of Cultivating and Utilization of Resources Insects of State Forestry Administration, Research Institute of Resources Insects, Chinese Academy of Forestry, Kunming 650224, China)

Abstract 【Objectives】The body scent of butterflies acts as an information carrier facilitating both conspecific recognition and mate recognition. We analyzed volatile compounds from adult male and female *Papilio xuthus* during different life stages, and used the EAG responses of unmated male and female butterflies to detect volatile compounds. The reactions and behavioral responses of insects to volatile compounds were also compared. 【Methods】Volatiles from *P. xuthus* were collected by the headspace SPME method and identified using GC-MS. Antennal responses to volatile compounds was measured with an electroantennogram (EAG). 【Results】In total, 14 kinds of volatile compounds were detected during adult eclosion, including alcohols and esters. Among these, esters and terpenes persisted after eclosion. Two kinds of volatile compounds, 2-ethyl-1-hexanol and 2-ethylhexyl acetate, were emitted by both males and females during mating. Only one volatile compound (α -farnesene) was unique to males and was only detected during mating. None of the unique volatile compounds identified was found in females. Levels of 2-ethyl-1-hexanol, 2-ethylhexyl acetate, and farnesene in both sexes of *P. xuthus* were significantly

*资助项目 Supported projects: 中国林业科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目“特色资源昆虫主导的乡村振兴示范样板建设”(CAFYBB2019ZC004)

**第一作者 First author, E-mail: lj014@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: leishi@139.com

收稿日期 Received: 2020-12-31; 接受日期 Accepted: 2021-03-18

different before, and after, mating. Levels of 2-ethyl-1-hexanol and farnesene increased before, and during, mating, whereas the level of 2-ethylhexyl acetate decreased, suggesting that large quantities of 2-ethyl-1-hexanol, 2-ethylhexyl acetate, and farnesene are released by females during mating. The EAG reactions of unmated butterflies to 2-ethyl-1-hexanol, 2-ethylhexyl acetate, and farnesene were significantly stronger than those of the control group. **[Conclusion]** 2-ethyl-1-hexanol and 2-ethylhexyl acetate probably play a role in identifying conspecifics of the same sex in *P. xuthus*, whereas the unique volatile compound α -farnesene may play a role in identifying the opposite sex.

Key words *Papilio xuthus*; mating; volatile compounds; change rule; electroantennogram responses

昆虫利用嗅觉系统辨别环境中的气味, 继而引发特定的生理和行为反应, 如寄主定位、求偶、交配、产卵、躲避天敌等 (Webster and Cardé, 2017; Joerg *et al.*, 2018; 相伟芳等, 2018; Muhammad *et al.*, 2020)。一般而言, 鳞翅目昆虫嗅觉能够辨别并产生生理反应的气味可以分两大类: 昆虫自身的气味和植物产生的气味。昆虫自身的气味通常以信息素的形式参与种内信息交换和行为反馈, 而植物产生的气味作为昆虫觅食、产卵线索来源 (Pirih *et al.*, 2018)。嗅觉发生和行为的反馈通常依赖于气味化学成分的组, 各种组合提供特定的识别信号来传递个体的特定信息 (Nieberding *et al.*, 2015)。Thom 等 (2007) 对意大利蜂 *Apis mellifera* 的研究表明, 作摇摆行为的意大利蜜蜂同时发出独特的气味, 这种气味会吸引更多的工蜂来参与它们的觅食工作。许多蝴蝶, 尤其是雄蝶, 也会释放出各种化学挥发物 (Ômura *et al.*, 2000; Ômura and Honda, 2005; Nieberding *et al.*, 2008; Ômura and Yotsuzuka, 2015)。

多数蝴蝶都具有灵敏的嗅觉感官 (触角), 这便于它们接受各类信息化合物, 有利于种内和种间的信息交流 (王华, 2017)。蝴蝶身体挥发物作为嗅觉信号的组成成分, 其作用非常重要。已有研究表明化学信息在两性的相互作用中常用于识别同性和异性 (Costanzo and Monteiro, 2007; 李承哲, 2017), 在求偶中促进雌蝶对雄蝶的接受 (Nishida *et al.*, 1996; Mellström and Wiklund, 2009)。Ômura (2006) 发现金凤蝶 *Papilio machaon* 雌雄蝶释放的共有挥发物在异性识别中起到重要作用, 在同属的种间识别中也发挥一定作用。此外, 不同蝴蝶种类的触角电位 (EAG) 记录显示对大量挥发性化合物有反应

(Andersson and Dobson, 2003; Ômura and Honda, 2009; Mikael *et al.*, 2013)。

柑橘凤蝶 *Papilio xuthus* 隶属于鳞翅目 Lepidoptera 锤角亚目 Rhopalocera 凤蝶科 Papilionidae 凤蝶族 Papilionini 凤蝶属 *Papilio*, 主要分布于缅甸、中国、韩国、日本、菲律宾等亚洲的国家地区, 在我国几乎遍布全国各省。多栖息于空旷地带、林地、花园、公园和柑橘种植园, 柑橘凤蝶在我国几乎遍布全国各省。它既是一种农业害虫, 又是一种观赏性很强的昆虫 (蒲正宇等, 2014)。有关柑橘凤蝶的虫体挥发物的研究尚未见有报道。本研究对柑橘凤蝶雌雄蝶挥发物分别进行萃取和分析鉴定, 利用触角电位仪比较了未交配雌雄蝶对共有、特有挥发物的触角电位 (EAG) 反应, 为下一步探索挥发物在柑橘凤蝶求偶过程中的作用提供基础资料, 为开展蝴蝶繁育、景观营造及其作为害虫防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验地点

实验于中国林业科学研究院资源昆虫研究所温室和国家林业局资源昆虫培育与利用重点实验室内进行。

1.2 试验材料

供试成虫: 试验用的柑橘凤蝶来自于中国林业科学研究院资源昆虫研究所元江试验站人工饲养的种群。选用羽化后的成虫用于虫体挥发物分析和触角电位实验。

供试化合物: 结合雌雄蝶羽化后挥发物变化规律, 选取雌雄蝶共有含量较高及特有的挥发物进行触角电位试验, 正己烷作为对照。触角电位

试验所用的 4 种分析纯化合物(2-乙基己醇、2-乙基己基乙酸酯、 α -法呢烯、正己烷)均购买自阿拉丁试剂(上海)有限公司(<http://www.aladdin-e.com/>),含量均 $\geq 99.0\%$ 。用正己烷溶剂分别配制成 $1\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 和 $100\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的溶液,用于雌雄蝶成虫的 EAG 反应测定。

1.3 虫体挥发物检测时段

羽化后分不同时间进行挥发物测定。交配前检测:将羽化后 2 h 的雌雄蝶分开进行检测;交配时检测:柑橘凤蝶羽化 3 d 开始交配,将羽化 3 d 尚未交配的雌雄蝶进行检测;交配后检测:雌雄蝶交配后,分交配后 1 d 和 3 d 检测。

1.4 虫体挥发物检测方法

利用固相微萃取(Solid-phase micro extraction, SPME)方法吸附并收集虫体挥发物:将不同时间段的雌雄蝶取活蝶 2 只,分别置于广口瓶(高 10 cm,开口直径 3 cm,体积 80 mL)中,取 PE 材质塑料膜将广口瓶封口,将 PDMS/DVB 固相微萃取头($65\ \mu\text{m}$, Supelco, Bellefonte, PA, USA)扎穿塑料并固定,萃取时间为 1 h。以空的广口瓶作为空白对照。上述挥发物检测重复 3 次。

使用气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)分析虫体挥发物:参考李承哲(2017)的方法略有改动。每次进样前需将 SPME 萃取头在 GC 进样口老化($250\ ^\circ\text{C}$, 10 min),采用 TR-5MS 色谱柱(内径: $0.25\ \text{mm}$, 厚度: $0.25\ \mu\text{m}$, 长度: 30 m),程序为 $40\ ^\circ\text{C}$ 保持 2 min,然后升温到 $120\ ^\circ\text{C}$ 保持 2 min ($4\ ^\circ\text{C}/\text{min}$),最后升到 $230\ ^\circ\text{C}$ 保持 5 min ($5\ ^\circ\text{C}/\text{min}$),进样口温度为 $250\ ^\circ\text{C}$,载气 He 的气压为 69 kPa。

1.5 触角电位(EAG)试验

触角电位试验方法参考唐宇翀(2013),并略有改动。将新羽化 2-3 d 的柑橘凤蝶触角端部剪去约 2 mm 后,再自触角基部剪下,用导电胶将触角的两端连接在电极上进行 EAG 测定(德国 Syntech 公司,型号 PRG-2)。每次取 $20\ \mu\text{L}$ 的测试样品均匀地滴在滤纸条($4\ \text{cm}\times 0.5\ \text{cm}$)上,待溶剂挥发后将滤纸条放置在巴斯德吸管

中。吸管末端连接刺激气体控制装置,保持每次刺激时间为 0.1 s,连续 2 次刺激的时间间隔为 30 s。每头成虫的触角对同一个样品重复 5 次。每头试虫仅测试一根触角,每个样品重复测 12 根触角(雌雄蝶各 6 根)。

1.6 数据处理

挥发物定性方法:1)以美国国家标准技术研究所(National Institute of Standards and Technology, NIST, <http://webbook.nist.gov/chemistry/>)谱库检索为主,同时结合人工解析质谱图;2)计算挥发性成分的保留指数,并与文献值进行比对。保留指数(Linear retention index, LRI 或 RI)计算公式如下:

$$LRI = 100 \times n + \frac{100 \times (t_x - t_n)}{t_{n+1} - t_n}$$

式中: LRI ——保留指数; t_x ——待测组分的保留时间; t_n ——具有 n 个碳原子的正构烷烃的保留时间; t_{n+1} ——具有 $n+1$ 个碳原子的正构烷烃的保留时间。

EAG 值:数据分析用 SPSS18.0,多个独立样本的比较采用单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 交配前雌雄成虫挥发物成分及相对含量

雌雄蝶羽化 1 d 分别检测到 16 种和 21 种挥发物,共有的挥发物有 11 种,其中,2-乙基己基乙酸酯含量最高(雌雄蝶分别为 44.54%、44.44%),其次是 2-乙基己醇(雌雄蝶分别为 19.58%、21.40%)。雌蝶特有的挥发物有 5 种(1-茛酮、2-蒎烯、10-甲基十九烷、正十八烷及棕榈酸异丙酯),雄蝶特有的挥发物多达 10 种(表 1)。检测到的挥发物主要包括烯烃类、炔烃类、芳香烃、醇类、酮类、脂类、萜类和醌类 8 类,酯类(雌雄蝶含量分别为 67.27%、48.03%)和醇类(雌雄含量分别为 22.04%、22.99%)含量最高(表 2)。

2.2 交配时雌雄成虫挥发物成分及相对含量

雌雄蝶羽化 3 d 分别检测到 27 种和 28 种挥

表 1 柑橘凤蝶成虫在羽化后不同时间挥发物种类相对含量

挥发物种类 Kinds of compounds	Table 1 Relative contents of volatile compounds at different times after eclosion in the adults of <i>Papilio xuthus</i>							
	交配前(羽化 1 d)挥发物含量(%)				交配后 3 d 挥发物含量(%)			
	雌 Female	雄 Male	雌 Female	雄 Male	雌 Female	雄 Male	雌 Female	雄 Male
正庚醇 Heptan-1-ol	0.63±0.01	0.59±0.09	-	-	-	-	-	-
2-乙基己醇 2-Ethyl-1-hexanol	19.85±0.69	21.40±2.12	36.48±2.48	35.57±1.61	-	-	-	-
13-二十二烯醇 (13Z)-Docosen-1-ol	0.56±0.01	1.01±0.01	-	-	-	-	-	-
二十五烷醇 1-Pentacosanol	-	-	1.91±0.51	1.95±0.06	-	-	-	-
(-)-异长叶醇(-)-Isolongifolol	-	-	-	-	-	-	-	1.99±0.24
2-乙基己醛	-	-	1.60±0.17	0.25±0.00	-	-	-	-
2-Ethylhexanal	-	-	-	-	-	-	-	-
1-萜酮 1-Indanone	0.16±0.01	-	1.12±0.07	1.01±0.02	-	-	-	-
苯乙酮 Acetophenone	1.02±0.02	3.16±0.26	0.18±0.06	0.23±0.01	-	-	-	-
白蒿烯(+)-Calarene	0.13±0.01	0.15±0.00	0.06±0.00	0.21±0.00	-	-	-	-
2-萜烯 α -Pinene	2.29±0.03	-	-	-	-	-	-	-
β -石竹烯 β -Caryophyllene	-	-	-	-	-	4.79±0.16	-	-
α -法呢烯 α -Farnesene	-	0.59±0.07	-	2.01±0.04	13.21±1.48	16.41±1.15	-	11.77±1.82
长叶烯(+)-Longifolene	-	-	-	-	-	-	-	4.83±0.14
(+)-香橙烯(+)-Aromadendrene	-	0.14±0.00	-	-	-	-	-	-
巴伦西亚橘烯 Valencene	4.45±0.12	6.41±0.48	4.59±0.49	8.32±1.10	18.37±3.63	8.71±1.40	13.58±2.79	34.83±1.77
4-氯苯甲醚	-	-	0.80±0.08	0.90±0.12	-	-	-	-
1-Chloro-4-methoxybenzene	-	-	6.59±0.54	6.20±0.96	-	-	-	-
二乙二醇丁醚 Butyldiglycol	-	-	0.28±0.05	0.38±0.05	-	-	-	-
正十五烷 Pentadecane	0.61±0.01	0.82±0.02	1.10±0.00	0.82±0.08	-	-	-	-
十七烷 N-Heptadecane	-	-	-	-	-	-	-	-
10-甲基十九烷	0.57±0.02	-	0.12±0.00	0.15±0.01	-	-	-	-
10-Methylnonadecane	-	-	-	-	-	-	-	-

续表 1 (Table 1 continued)

挥发物种类 Kinds of compounds	交配前(羽化 1 d)挥发物含量(%)		交配时(羽化 3 d)挥发物含量(%)		交配后 1 d 挥发物含量(%)		交配后 3 d 挥发物含量(%)	
	雌 Female	雄 Male	雌 Female	雄 Male	雌 Female	雄 Male	雌 Female	雄 Male
9-己基十七烷	-	-	0.05±0.00	0.04±0.00	-	-	-	-
9-Methylideneheptadecane	-	-	0.05±0.00	0.04±0.00	-	-	-	-
2, 6, 10-3 甲基十四烷	-	0.49±0.03	0.54±0.03	0.45±0.06	-	-	-	-
2,6,10-Trimethyltetradecane	-	-	0.58±0.02	0.60±0.10	3.54±0.44	-	1.51±0.16	-
正十八烷 Octadecane	1.98±0.02	-	0.58±0.02	0.60±0.10	3.54±0.44	-	1.51±0.16	-
正十六烷 Hexadecane	-	0.45±0.01	1.55±0.09	0.89±0.08	-	-	-	-
二十八烷 Octacosane	-	-	0.88±0.02	0.86±0.09	-	-	1.39±0.09	-
二对甲基基甲烷	-	-	-	-	3.32±0.26	-	-	-
1-Methyl-4-[(4-methylphenyl)methyl]benzene	-	-	-	-	3.32±0.26	-	-	-
正二十四烷 Tetracosane	0.35±0.01	0.23±0.00	-	-	-	-	-	-
1-苯基-1-丙炔 Phenylpropyne	-	-	0.48±0.06	0.31±0.02	0.31±0.01	-	-	-
3,7-二甲基-1,3,7-辛三烯	-	15.92±0.88	-	-	-	-	-	-
Alpha-Ocimene	-	-	-	-	-	-	-	-
五甲基苯 Pentamethylbenzene	-	-	-	-	7.37±0.51	2.55±0.29	2.61±0.32	1.06±0.05
2-乙基对二甲苯	-	-	0.09±0.00	0.08±0.00	-	-	-	-
1,4-Dimethyl-2-ethylbenzene	-	-	0.09±0.00	0.08±0.00	-	-	-	-
1, 2-二甲基-3-乙基苯	-	-	-	-	5.35±0.29	-	-	-
1-Ethyl-2,3-dimethylbenzene	-	-	-	-	5.35±0.29	-	-	-
1,4-二乙基苯	-	0.62±0.10	-	-	-	-	-	-
1,4-Diacetylbenzene	-	-	-	-	-	-	-	-
联三甲苯	-	-	0.61±0.09	0.59±0.02	-	-	-	-
1,2,3-Trimethylbenzene	-	-	0.61±0.09	0.59±0.02	-	-	-	-
苯甲腈 Benzonitrile	-	-	0.36±0.02	0.40±0.04	-	-	-	-
苯并噻唑 Benzo[d]thiazole	-	-	0.22±0.01	0.10±0.02	-	-	-	-
2,6-二叔丁基苯醌	0.16±0.01	0.49±0.01	-	-	7.40±1.31	-	-	-
2,6-Di-tert-butyl-p-benzoquinone	0.16±0.01	0.49±0.01	-	-	7.40±1.31	-	-	-

续表 1 (Table 1 continued)

挥发物种类 Kinds of compounds	交配前(羽化 1 d)挥发物含量(%)		交配时(羽化 3 d)挥发物含量(%)		交配后 1 d 挥发物含量(%)		交配后 3 d 挥发物含量(%)	
	雌 Female	雄 Male	雌 Female	雄 Male	雌 Female	雄 Male	雌 Female	雄 Male
2,3-苯并芴 2,3-Benzfluorene	-	-	-	-	6.45±0.65	-	-	-
2,3,6-三甲基萘	-	-	-	-	5.66±0.28	-	-	-
Naphthalene,2,3,6-trimethyl-								
肉豆蔻酸异丙酯	-	-	0.16±0.02	0.16±0.01	-	-	38.26±2.66	27.16±2.32
Isopropyl myristate								
2-乙基己基乙酸酯	44.54±2.83	45.44±2.12	34.03±2.49	31.99±1.56	-	-	-	-
2-Ethylhexyl acetate								
邻苯二甲酸二丁酯	0.10±0.01	0.88±0.07	-	-	-	-	-	-
Dibutyl phthalate								
棕榈酸甲酯 Methyl palmitate	-	0.94±0.03	0.29±0.05	0.16±0.01	-	-	-	-
棕榈酸异丙酯	22.64±1.93	-	-	-	-	-	-	-
Isopropyl palmitate								
邻苯二甲酸二正戊酯	-	0.50±0.08	-	-	-	-	-	-
Di-n-Amyl phthalate								
2-甲基丙酸乙酯	-	0.11±0.00	-	-	-	-	-	-
Ethyl isobutyrate								
邻苯二甲酸二乙酯	-	0.16±0.02	-	-	-	-	-	-
Diethyl phthalate								
单反油酸甘油酯	-	-	-	-	29.32±2.19	67.54±2.04	42.65±0.29	18.36±1.34
Monoelaidin								
邻苯二甲酸二辛酯	-	-	-	-	-	-	-	-
Bis(2-ethylhexyl) phthalate								
2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚	-	-	0.15±0.02	0.22±0.02	-	-	-	-
3,5-Di-t-Butyl-4-hydroxyanisole								
异辛酸 2-Ethylcaproic acid	-	-	3.65±0.20	3.45±0.49	-	-	-	-

表中数据为平均值±标准误差; -: 未检测到。表 2 同。
Data in the table are mean ±SE; -: no such compounds. The same as table 2.

表 2 柑橘凤蝶成虫在羽化后不同时间挥发物归类

Table 2 Classification of compounds at different times after eclosion in the adults of *Papilio xuthus*

挥发物种类 Kinds of compounds	交配前 (羽化 1 d) 挥发物含量 (%) Compound contents before mating (one day after eclosion)		交配时 (羽化 3 d) 挥发物含量 (%) Compound contents during mating (three day after eclosion)		交配后 1 d 挥发物 含量 (%) Compound contents after mating one day		交配后 3 d 挥发物 含量 (%) Compound contents after mating three day	
	雌 Female	雄 Male	雌 Female	雄 Male	雌 Female	雄 Male	雌 Female	雄 Male
烷烃类 Alkanes	3.50±0.02	1.98±0.02	5.10±0.47	4.19±0.37	6.86±0.70	—	2.90±0.07	—
烯烃类 Olefins	—	15.92±0.88	—	—	—	—	—	—
炔烃类 Alkynes	—	—	—	—	—	—	—	—
芳香烃类 Aromatic hydrocarbons	—	0.62±0.10	1.54±0.12	1.38±0.07	13.03±0.23	2.55±0.29	2.61±0.32	1.06±0.05
醇类 Alcohols	21.04±0.68	22.99±2.02	38.39±2.96	37.52±1.66	—	—	—	1.99±0.24
醛类 Aldehydes	—	—	1.60±0.17	0.25±0.00	—	—	—	—
酮类 Ketones	1.18±0.01	3.16±0.26	1.30±0.13	1.24±0.02	—	—	—	—
脂类 Lipids	67.27±0.89	48.03±2.33	34.48±2.45	32.31±1.57	29.32±2.19	67.54±2.04	80.91±2.95	45.53±3.66
萜类 Terpenoids	6.87±0.16	7.29±0.41	4.65±0.49	10.54±1.14	31.58±4.85	29.90±2.38	13.58±2.79	53.42±1.77
酸类 Acids	—	—	3.65±0.20	3.45±0.40	—	—	—	—
醌类 Quinones	0.16±0.01	0.49±0.01	—	—	7.40±1.31	—	—	—
酚类 Phenols	—	—	0.15±0.02	0.22±0.02	—	—	—	—
醚类 Ethers	—	—	7.39±0.62	7.10±1.08	—	—	—	—
杂环类 Heterocyclics	—	—	0.22±0.01	0.10±0.02	12.12±0.93	—	—	—

发物, 共有的挥发物有 27 种, 其中 2-乙基己醇 (雌雄蝶分别为 36.48%、35.57%) 和 2-乙基己基乙酸酯 (雌雄蝶分别为 34.03%、31.99%) 含量最高, 其次是二乙二醇丁醚 (雌雄蝶分别为 6.59%、6.20%)、巴伦西亚橘烯 (雌雄蝶分别为 4.59%、8.32%) 和异辛酸 (雌雄蝶分别为 3.65%、3.45%)。未检测到雌蝶特有的挥发物, 雄蝶特有的挥发物 α -法呢烯 (2.01%) (表 1)。检测到的挥发物主要包括烷烃类、芳香烃类、醇类、醛类、酮类、脂类、萜类、酸类和酚类、醚类和杂环类 11 类, 醇类 (雌雄蝶含量分别为 38.39%、37.52%) 和酯类 (雌雄蝶含量分别为 34.48%、32.31%) 含量最高, 其次是醚类 (雌雄蝶含量分别为 7.39%、7.10%)、萜类 (雌雄蝶分别为 4.65%、10.54%) 和酸类 (雌雄蝶分别为 3.65%、3.45%) (表 2)。

2.3 交配后 1 d 雌雄成虫挥发物成分及相对含量

雌雄蝶交配 1 d 分别检测到 11 种和 5 种挥发物, 共有的挥发物有 4 种, 其中单反油酸甘油酯含量最高 (雌雄蝶分别为 29.32%、67.54%), 其次是巴伦西亚橘烯 (雌雄蝶分别为 18.37%、8.71%) 和 α -法呢烯 (雌雄蝶分别为 13.21%、16.41%)。雌蝶特有的挥发物有 7 种, 分别是正十八烷 (3.54%)、二对甲基苯基甲烷 (3.32%)、1-苯基-1-丙炔 (0.31%)、1, 2-二甲基-3-乙基苯 (5.35%)、2,6-二叔丁基苯醌 (7.40%)、2,3-苯并芴 (6.45%)、2, 3, 6-三甲基萘 (5.66%), 雄蝶特有的挥发物有 1 种, β -石竹烯 (4.79%) (表 1)。检测到的挥发物主要包括烷烃类、芳香烃类、脂类、萜类、醌类和杂环类 6 类挥发物, 酯类 (雌雄蝶含量分别为 29.32%、67.54%) 和萜类 (雌

雄含量分别为 31.58%、29.90%) 含量最高(表 2)。

2.4 交配后 3 d 雌雄成虫挥发物成分及相对含量

雌雄蝶交配 3 d 分别检测到 6 种和 7 种挥发物, 共有的挥发物有 4 种, 其中肉豆蔻酸异丙酯(雌雄蝶含量分别为 38.26%、27.16%) 和单反油酸甘油酯(雌雄蝶含量分别为 42.65%、18.36%) 含量最高, 其次是巴伦西亚橘烯(雌雄蝶含量分别为 13.58%、34.83%)。雌蝶特有的挥发物有 2 种, 分别是正十八烷(1.51%) 和二十八烷(1.39%), 而雄蝶特有的挥发物有 3 种分别是(-)-异长叶醇(1.99%)、 α -法呢烯(11.77%) 和二长叶烯(4.83%)(表 1)。检测到的挥发物主要包括烷烃类、醇类、萜类、芳香烃类、脂类 5 类挥发物, 脂类(雌雄蝶含量分别为 80.91%、45.53%) 和萜类(雌雄蝶含量分别为 13.58%、53.42%) 含量最高(表 2)。

比较发现雌雄蝶羽化后共检测出 14 类挥发物, 其中萜类、酯类在雌雄蝶羽化后均有出现。醛类、酸类、酚类和醚类仅在交配时雌雄蝶虫体中检测到, 烯炔类仅在交配前雄蝶虫体中检测到。雌蝶交配前后含量最多挥发物有 5 类, 分别是芳香烃类、醇类、酯类、醚类及萜类挥发物, 雄蝶交配前后含量最多挥发物有 5 类, 分别是烯炔类、醇类、酯类、醚类及萜类挥发物(表 2)。

交配时雌雄蝶优势挥发物为醇类、酯类(图 1 雌雄蝶虫体中醇类的含量在交配前及交配时随

羽化时间的增加而上升, 交配后 1 d 消失, 交配后 3 d 在雄蝶虫体中检测到。雌雄蝶虫体中酯类在雌雄蝶羽化后不同时间均存在。

交配时雌雄蝶虫体共有的相对含量较高的挥发物有 2 种(2-乙基己醇、2-乙基己基乙酸酯), 雄蝶特有挥发物有 1 种(α -法呢烯)(图 2)。2-乙基己醇在交配前及交配时的相对含量随羽化时间的增加而增加, 交配后从雌雄蝶虫体中消失。2-乙基己基乙酸酯在雌雄蝶交配前及交配时都有检测到, 雌雄蝶交配后消失。 α -法呢烯在雄蝶成虫羽化后一直有检测到, 交配后 1 d 相对含量最高, α -法呢烯仅在雌蝶交配后 1 d 有检测到。

2.5 雌雄成虫对挥发物的 EAG 反应

本研究结果表明 3 种挥发物不论是低浓度(1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 还是高浓度(100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 与对照相比, 均能激起雌雄蝶明显的 EAG 反应($P < 0.01$), 说明这 3 种挥发物对雌雄蝶的触角均有较大的刺激作用。雄蝶对 2-乙基己醇不论是低浓度(1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 还是高浓度(100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) EAG 反应均强于雌蝶。雌蝶对 α -法呢烯不论是低浓度(1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 还是高浓度(100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) EAG 反应均强于雄蝶, 雌雄蝶对 2-乙基己基乙酸酯 EAG 反应随浓度而改变, 低浓度时, 雄蝶的 EAG 反应高于雌蝶, 高浓度时, 雌蝶的 EAG 反应高于雄蝶(图 3)。

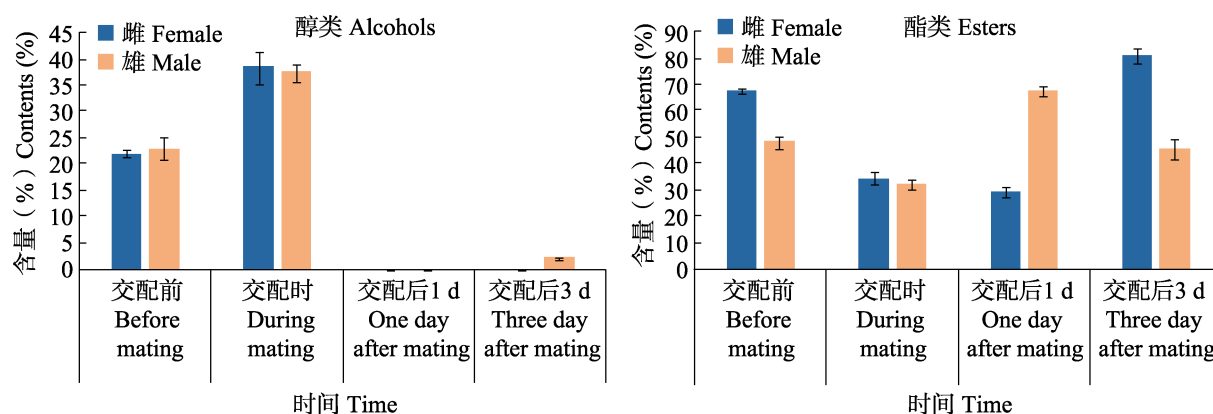


图 1 不同时期主要挥发物(醇类、酯类)归类的变化

Fig. 1 Changes in the classification of main volatile compounds (alcohols, esters) in different periods

柱上标有*表示雌雄蝶差异显著(t -检验, $P < 0.05$), **表示差异极显著(t -检验, $P < 0.01$)。下图同。

Histograms with * indicate significant difference between the female and male at the 0.05 level by t -test, while with ** indicate extremely significant difference at the 0.01 level by t -test. The same below.

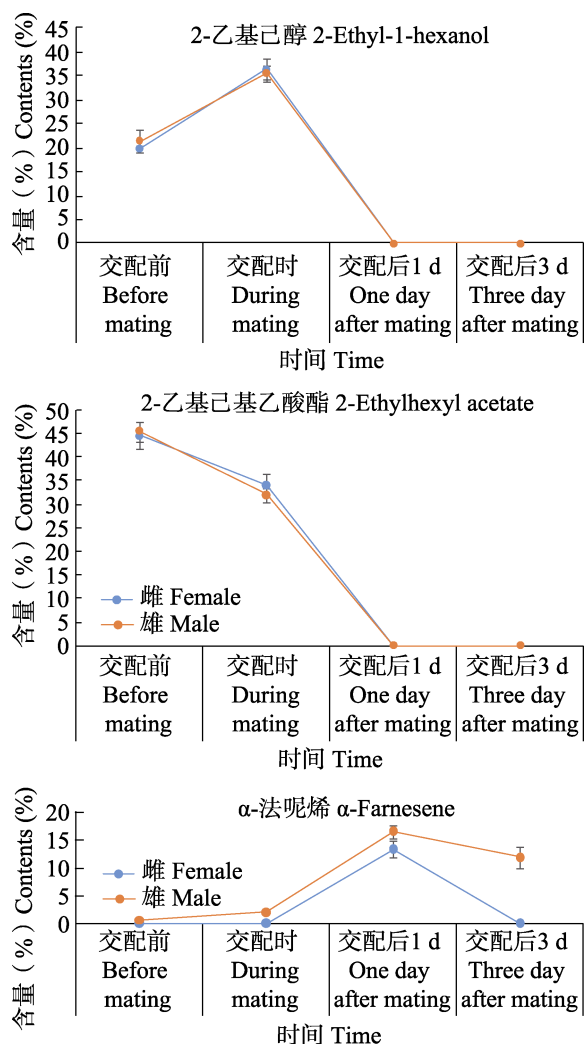


图 2 不同时期共有挥发物 (2-乙基己醇、2-乙基己基乙酸酯) 及特有挥发物 (α -法呢烯) 含量的变化

Fig. 2 Changes in contents of common volatile compounds (2-Ethyl-1-hexanol, 2-Ethylhexyl acetate and unique volatile compounds (α -Farnesene) in different periods

3 结论与讨论

Bacquet 等 (2015) 认为化学信号可以确保同种相互作用的生物之间的交流, 且具有高度的专一性。与视觉、听觉或电子通信 (Arnegard *et al.*, 2010) 等交流方式相比, 化学通信具有独特性, 旨在保证和促进交配前生殖的空间隔离。此外, 已经证明, 雄性信息素在模式物种偏瞳蔽眼蝶 *Bicyclus anynana* 的配偶选择中起关键作用 (Nieberding *et al.*, 2008; Erik *et al.*, 2013)。Nieberding 等 (2015) 认为雌性根据性信息素成

分评估求交配雄性的年龄差异状况, 以挑选最佳交配对象。来自雄性挥发物的嗅觉信号成分的细微变化提供了足以让雌性选择最优雄性伴侣的物质基础。斑蝶科雄蝶通过腹部味刷或翅膀下分泌器官, 分泌二氢吡咯烷酮和 β -内酯类物质作为性诱剂 (Honda *et al.*, 1995; Nishida *et al.*, 1996)。粉蝶科黑纹粉蝶 *Pieris melete* 成虫和近缘物种暗脉菜粉蝶 *Pieris napi* 通过翅膀的香鳞释放特性挥发物香叶醛和柠檬醛 (Hayashi *et al.*, 1978; Kuwahara, 1979)。Ômura 和 Honda (2005) 研究发现玉带凤蝶 *Papilio polytes* 挥发物以醛类、醇类居多, 主要分布在翅膀部位, 而乙酰甲基甲醇主要存在胸部和身体。金凤蝶 *Papilio machaon* 的挥发物主要分布在翅膀, 身体部位的挥发物和翅膀部位存在差别, 产生气味的器官或气孔广泛分布在翅膀上 (Ômura *et al.*, 2001)。本研究通过对柑橘凤蝶羽化后活的完整的虫体挥发物进行检测分析, 可知雌雄蝶虫体挥发物动态变化规律, 利用触角电位比较了未交配雌雄蝶对挥发物的 EAG 反应。

柑橘凤蝶成虫羽化后不会立即飞行, 需要对翅进行整理 (如振翅等), 羽化当天很少飞行且不访花, 此时主要依靠蛹期积累的能量维持生命, 而不需要访花来补充营养 (李承哲, 2017)。本研究发现交配前雌雄蝶虫体醇类 (2-乙基己醇)、酯类 (2-乙基己基乙酸酯) 含量最高, 雌雄蝶共有的挥发物有 10 种, 雌蝶特有挥发物差别较大雌雄蝶分别为 5 种、10 种。柑橘凤蝶羽化 3 d 时已进入求偶交配阶段, 访花活动维持在较高水平。这说明蝴蝶在进入交配期后, 仍需要继续补充营养。本研究结果表明雌雄蝶虫体中仍然是酯类、醇类含量最高。雌雄蝶虫体中共有挥发物 2-乙基己醇、2-乙基己基乙酸酯的相对含量与交配前一致且相对含量最高。交配时未检测到雌蝶特有的挥发物, 雄蝶特有的挥发物 α -法呢烯较交配前含量高, 以上结果表明在交配时, 可能有大量的 2-乙基己醇、2-乙基己基乙酸酯和 α -法呢烯释放到体外。初步推测雄蝶特有挥发物 α -法呢烯为求偶时异性的识别提供了某种线索。柑橘凤蝶交配后蝴蝶进入孕卵生殖阶段, 雄蝶完成

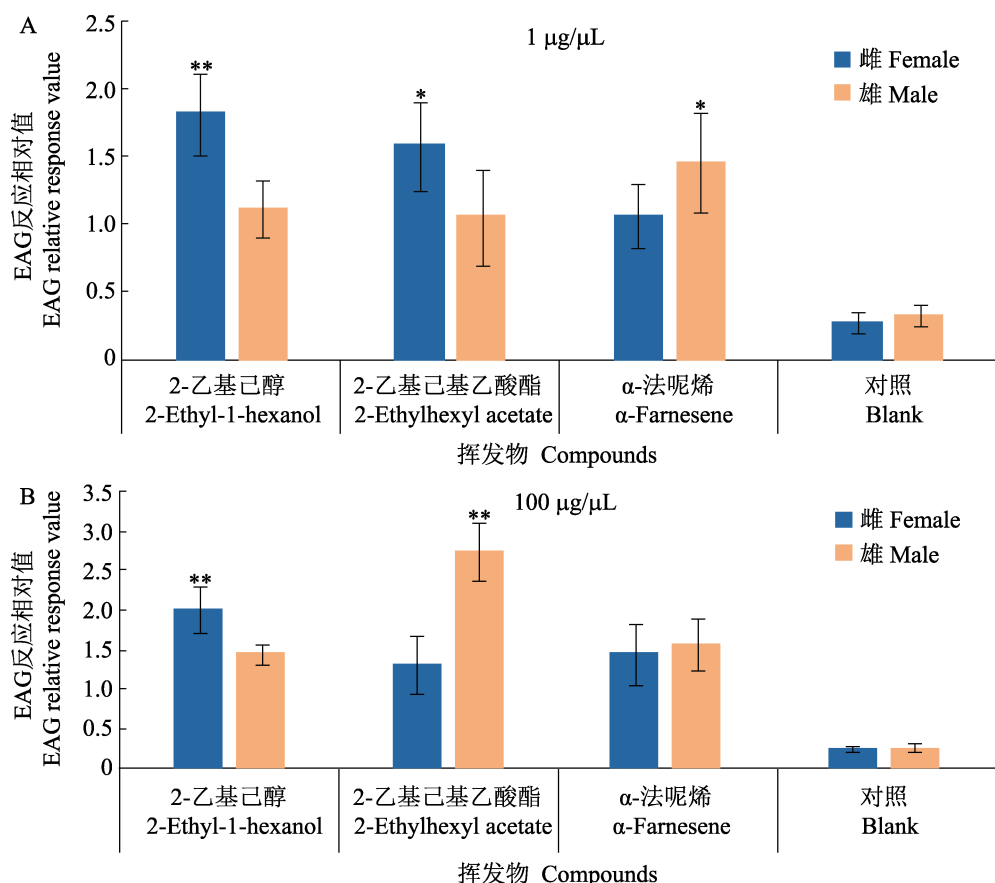


图 3 柑橘凤蝶雌雄蝶对不同浓度化合物的触角电位反应

Fig. 3 Electroantennogram responses of *Papilio xuthus* females and males to compounds at different concentrations

A. 雌雄蝶对 1 µg/µL 各化合物的 EAG 反应; B. 雌雄蝶对 100 µg/µL 各化合物的 EAG 反应。

A. Electroantennogram responses of females and males to the dose of compounds is 1 µg/µL; B. Electroantennogram responses of females and males to the dose of compounds is 100 µg/µL.

了自己的使命,雌蝶进入产卵阶段,寻找合适的寄主植物进行产卵。本研究的结果表明,交配后雌雄蝶虫体中脂类、萜类占主导地位。雌雄蝶虫体中共有挥发物 2-乙基己醇、2-乙基己基乙酸酯彻底消失,预示着它们使命的完成。雄蝶特有的挥发物 α-法呢烯在雌雄蝶虫体中均有检测到。结合前人 (Vane and Boppré, 1993; Thomas, 2011) 的研究可利用挥发物区别交配和未交配的雌蝶。因此,初步推测柑橘凤蝶雌蝶虫体中 α-法呢烯具有区别交配和未交配雌蝶的功能。

雌雄成虫对部分挥发物浓度反应有差异,这可能是由于不同性别之间的生理状态、触角感器的种类和数量以及社会分工 (雌性繁育后代) 有差异所致 (刘晓梅等, 2013)。本研究发现无论

高浓度还是低浓度未交配雌雄蝶对 2-乙基己醇、2-乙基己基乙酸酯和都具有较强的电生理反应,均明显高于对照。特有挥发物 α-法呢烯无论是高浓度还是低浓度,雌蝶的反应均高于雄蝶,进一步验证了雌蝶通过特有挥发物识别同种异性。雌蝶对 2-乙基己基乙酸酯的反应随着浓度而改变,浓度高时,雌蝶的反应较雄蝶的强,雌蝶对挥发物具有较强的灵敏性,初步推断与其社会分工 (雌性繁育后代) 有关,肩负更多的责任,具有更灵敏的嗅觉。

蝴蝶求偶识别时利用的嗅觉信号通常是身体挥发物,如菲罗豆粉蝶 *Colias philodice* 的身体挥发物 13-甲基二十七烷,在吸引同种异性和种间识别中发挥重要作用 (Grula *et al.*, 1980)。

Ômura 等 (2001) 通过对金凤蝶 *Papilio machaon* 身体挥发物的测定, 发现雌雄蝶释放的共有挥发物 (雌、雄含量差异大) 在异性识别中起到重要作用, 王翻艳 (2015) 通过对大帛斑蝶 *Idea leuconoe* 身体挥发物研究, 发现雌雄蝶释放的共有挥发物在异性识别中起到重要作用。结合本研究检测到的柑橘凤蝶雌雄蝶虫体挥发物变化规律及 GAG 的初步测验, 推测雌雄蝶成虫共有挥发物 (2-乙基己醇、2-乙基己基乙酸酯) 可能用于柑橘凤蝶识别同种及同性。李承哲 (2017) 发现白带锯蛱蝶 *Cethosia cyane* 雌雄蝶特异性挥发物可以用来辨别同种异性。结合本研究的结果, 雄蝶特有的挥发物 α -法呢烯可能用于柑橘凤蝶同种异性的识别。 α -法呢烯在雄蝶羽化后一直有检测到, 作者前期在柑橘凤蝶 *Papilio xuthus* 行为学观察中发现雄蝶有重复交配的现象, 可推断此挥发物具有可以让雄蝶一直保持较高的吸引力, 从而促进雌蝶接受求偶有关。Andersson 等 (2003) 研究暗脉菜粉蝶 *Pieris napi* 的身体挥发物时发现, 交配前只有雄蝶的身体挥发物中存在水杨酸甲酯 (MeS), 交配后, 在雌雄蝶中均检测到该物质, 认为是交配时雄蝶将 MeS 转移到了雌蝶体内, 目的是避免雌蝶再次交配。本研究发现交配时雄蝶虫体特有挥发物 α -法呢烯, 交配后, 在雌雄蝶中均检测到该物质, 初步推断 α -法呢烯可能起避免雌蝶再次与别的雄性交配的作用。

研究蝴蝶挥发物的具体作用, 通常是在触角电位技术 (EAG) 的基础上, 再进行行为学验证, 已有报道称蝴蝶对挥发物的 EAG 反应并不完全对应行为学的验证结果 (Honda *et al.*, 1998; 王翻艳, 2015), 因此, 若要进一步明确 2-乙基己醇、2-乙基己基乙酸酯和 α -法呢烯在柑橘凤蝶求偶时识别同类同种及同种异性的作用, 还需要进行行为验证, 这也是下一步需要进行的工作。

参考文献 (References)

- Andersen J, Borg-Karlson AK, Wiklund C, 2003. Antiaphrodisiacs in pierid butterflies: A theme with variation! *Journal of Chemical Ecology* 29(6): 1489–1499.
- Andersson S, Dobson HE, 2003. Antennal responses to floral scents in the butterfly *Heliconius melpomene*. *Journal of Chemical Ecology*, 29(10): 2319–2330.
- Arnegard ME, McIntyre PB, Harmon LJ, Zelditch ML, Crampton WGR, Davis JK, Sullivan JP, Lavoue S, Hopkins CD, 2010. Sexual signal evolution outpaces ecological divergence during electric fish species radiation. *American Naturalist*, 176(3): 335–356.
- Bacquet PMB, Brattstrom O, Wang HL, Allen CE, Lofstedt C, Brakefield PM, Nieberding CM, 2015. Selection on male sex pheromone composition contributes to butterfly reproductive isolation. *Proceedings Biological Sciences*, 282(1804): 20142734.
- Costanzo K, Monteiro A, 2007. The use of chemical and visual cues in female choice in the butterfly *Bicyclus anynana*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological*, 274(1611): 845–851.
- Erik VB, Brakefield PM, Stéphanie H, Zwaan BJ, Nieberding CM, 2013. The scent of inbreeding: A male sex pheromone betrays inbred males. *Proceedings Biological Sciences*, 280 (1758): 1–2.
- Grula JW, McChesney JD, Taylor OR, 1980. Aphrodisiac pheromones of the sulfur butterflies *Colias eurytheme* and *C. philodice* (Lepidoptera, Pieridae). *Journal of Chemical Ecology*, 6(1): 241–256.
- Hayashi N, Kuwahara Y, Komae H, 1978. The scent scale substances of male Pieris butterflies (*Pieris melete* and *Pieris napi*). *Experientia*, 34(6): 684–685.
- Honda K, Ômura H, Hayashi N, 1998. Identification of floral volatiles from *Ligustrum japonicum* that stimulate flower-visiting by cabbage butterfly, *Pieris rapae*. *Journal of Chemical Ecology*, 24(12): 2167–2180.
- Honda K, Tada A, Hayashi N, 1995. Dihydropyrrolizines from the male scent-producing organs of a danaid butterfly, *Ideopsis similis* (Lepidoptera: Danaidae) and the morphology of alar scent organs. *Applied Entomology and Zoology*, 30(3): 471–477.
- Joerg F, Pablo P, Heinz B, Jürgen K, 2018. Access to the odor world: Olfactory receptors and their role for signal transduction in insects. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(5): 485–508.
- Kuwahara Y, 1979. Scent scale substances of male *Pieris melete* Ménéttriès (Pieridae: Lepidoptera). *Applied Entomology and Zoology*, 14(3): 350–355.
- Li CZ, 2017. Species and sex recognition mechanism during courtship and butterfly flying landscape construction based on adult behavior of butterflies. Doctoral dissertation. Beijing: Chinese Academy of Forestry. [李承哲, 2017. 基于蝴蝶成虫行为学的两性求偶识别机制及蝴蝶飞舞景观构建. 博士学位论文. 北京: 中国林业科学研究院.]

- Liu XM, Ling B, Zhang MX, 2013. Pheromone research progress of *Phyllotreta striolata*. *Journal of Environmental Entomology*, 35(5): 656–663. [刘晓梅, 凌冰, 张茂新, 2013. 跳甲聚集信息素的研究进展. *环境昆虫学报*, 35(5): 656–663.]
- Mellström HL, Wiklund C, 2009. Males use sex pheromone assessment to tailor ejaculates to risk of sperm competition in a butterfly. *Behavioral Ecology*, 20(5): 1147–1151.
- Mikael A, Alexander S, Dick RN, Niklas J, 2013. Organization of the olfactory system of Nymphalidae butterflies. *Chemical Senses*, 38(4): 355–367.
- Muhammad IW, Aneela Y, Asif A, Fatima R, Wang MQ, 2020. Expression profiles and biochemical analysis of chemosensory protein 3 from *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). *Journal of Chemical Ecology*, 46(4): 363–377.
- Nieberding CM, Fischer K, Saastamoinen M, Allen CE, Wallin EA, Hedenström ME, Brakefield PM, 2015. Cracking the olfactory code of a butterfly: The scent of ageing. *Ecology Letters*, 15(5): 415–424.
- Nieberding CM, Vos HD, Schneider MV, Lassance JM, Estramil N, Andersson J, Bang J, Hedenström E, Löfstedt C, Brakefield PM, 2008. The male sex pheromone of the butterfly *Bicyclus anynana*: Towards an evolutionary analysis. *PLoS ONE*, 3(7): e2751.
- Nishida R, Schulz S, Kim CS, Fukami H, Kuwahara Y, Honda K, Hayashi N, 1996. Male sex pheromone of a giant danaine butterfly, *Idea leuconoe*. *Journal of Chemical Ecology*, 22(5): 949–972.
- Ômura H, 2006. Foraging behavior of adult butterflies and its semiochemicals as olfactory signals. *Comparative Physiology and Biochemistry*, 23(3): 134–142.
- Ômura H, Honda K, 2005. Chemical composition of volatile substances from adults of the swallowtail, *Papilio polytes* (Lepidoptera: Papilionidae). *Entomology and Zoology*, 40(3): 421–427.
- Ômura H, Honda K, 2009. Behavioral and electroantennographic responsiveness of adult butterflies of six nymphalid species to food-derived volatiles. *Chemoecology*, 19(4): 227–234.
- Ômura H, Honda K, Hayashi N, 2001. Identification of odoriferous compounds from adults of a swallowtail butterfly, *Papilio machaon* (Lepidoptera: Pilionidae). *Zeitschrift für Naturforschung C Journal of Biosciences*, 56(11): 1126–1134.
- Ômura H, Morinaka S, Honda K, 2000. Chemical nature of volatile compounds from the valvae and wings of male *Delias butterflies* (Lepidoptera: Pieridae). *Entomological Science*, 3(3): 427–432.
- Ômura H, Yotsuzuka S, 2015. Male-specific epicuticular compounds of the sulfur butterfly *Colias erate poliographus* (Lepidoptera: pieridae). *Applied Entomology and Zoology*, 50(2): 1–9.
- Pirih P, Ilic M, Rudolf J, Arikawa K, Stavenga D, 2018. The giant butterfly-moth *Paysandisia archon* has spectrally rich apposition eyes with unique light-dependent photoreceptor dynamics. *Journal of Comparative Physiology, A. Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 204(7): 639–651.
- Pu ZY, Shi JY, YAO Jun, Zhou DQ, Yang Z, 2014. Analysis of nutritional components of *Papilio xuthus* larva and pupa. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 45(6): 736–740. [蒲正宇, 史军义, 姚俊, 周德群, 杨志, 2014. 柑橘凤蝶幼虫和蛹的营养成分分析. *沈阳农业大学学报*, 45(6): 736–740.]
- Tang YC, 2013. The research of olfactory and visual response during butterflies foraging. Doctoral dissertation. Beijing: Chinese Academy of Forestry. [唐宇翀, 2013. 蝴蝶觅食过程中的嗅觉和视觉行为反应研究. 博士学位论文. 北京: 中国林业科学研究院.]
- Thom C, Gilley DC, Hooper J, Esch HE, 2007. The scent of the waggle dance. *PLoS Biology*, 5(9): e228.
- Thomas ML, 2011. Detection of female mating status using chemical signals and cues. *Biological Reviews*, 86(1): 1–13.
- Vane-Wright RI, Boppré M, 1993. Visual and chemical signalling in butterflies: Functional and phylogenetic perspectives. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, 340(1292): 197–205.
- Wang FY, 2015. Behavior observation and courtship mechanism study of *Ideal leuconoe* adults. Master dissertation. Beijing: Chinese Academy of Forestry. [王翻艳, 2015. 大帛斑蝶成虫行为学观察及其求偶机制研究. 硕士学位论文. 北京: 中国林业科学研究院.]
- Wang H, 2017. Visual and olfactory utilization in butterfly foraging and courtship: A case study of two butterfly species. Master dissertation. Beijing: Chinese Academy of Forestry. [王华, 2017. 蝴蝶觅食和求偶中视觉和嗅觉利用-两种蝴蝶为例. 硕士学位论文. 北京: 中国林业科学研究院.]
- Webster B, Cardé RT, 2017. Use of habitat odour by host-seeking insects. *Biological Reviews*, 92(2): 1241–1249.
- Xiang WF, Li M, Lin YP, Wang J, Zhang XY, Guo MQ, Yang YX, Zhu GP, Pan LN, 2018. Molecular docking of odorant binding protein1 of *Chouioia cunea* with host volatiles. *Journal of Biosafety*, 27(3): 193–199. [相伟芳, 李敏, 林艳平, 王静, 张新玥, 郭美琪, 杨艺新, 朱耿平, 潘丽娜, 2018. 白蛾周氏啮小蜂气味结合蛋白 OBP1 与寄主挥发物的分子对接研究. *生物安全学报*, 27(3): 193–199.]