

黄守瓜取食行为的机理及黄瓜的化学应答

孔垂华 梁文举 杨晓 张茂新 胡飞

(华南农业大学热带亚热带生态研究所, 广州 510642; 中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110016. E-mail: kongch@mail.edu.cn)

摘要 黄足黄守瓜先用口器在黄瓜幼苗叶面划圈, 然后再取食圈内叶组织, 但黄足黄守瓜却直接取食离体黄瓜子叶, 而不发生划圈取食行为. 研究显示, 黄守瓜这一有趣的划圈取食行为和黄瓜的化学应答显著相关. 当黄瓜被黄守瓜取食后, 子叶中葫芦素 C 的含量在 60 min 内增加 10 倍以上, 15 min 后子叶还出现葫芦素, 并在 60 min 内达到 75 $\mu\text{g/g}$ 鲜重的水平, 而且黄瓜子叶中这一高水平的葫芦素至少要持续 24 h. 进一步的实验证实, 葫芦素 C 在 10 ~ 250 $\mu\text{g/g}$ 浓度范围刺激黄守瓜取食, 250 $\mu\text{g/g}$ 以上浓度则抑制黄守瓜取食; 而葫芦素 在 50 $\mu\text{g/g}$ 浓度就抑制黄守瓜取食, 尤其是和葫芦素 C 混合后, 对黄守瓜取食的抑制效应显著增加. 结果表明, 黄瓜通过增加葫芦素种类和浓度以避免被黄守瓜进一步侵食, 而黄守瓜为了应对黄瓜的这一化学响应机制, 采用先划圈阻断黄瓜圈内叶组织合成葫芦素和使圈外葫芦素不能迁移到圈内, 以保证能取食圈内叶组织. 黄守瓜的取食行为和黄瓜的化学应答是它们为生存而形成的一种巧妙的自我保护策略.

关键词 黄瓜 黄足黄守瓜 取食行为 葫芦素 化学应答

植物和昆虫通过次生物质为媒介的相互作用关系一直是科学研究的前沿之一^[1], 尤其是近年作物/害虫/天敌三营养链中化学关系的阐明, 揭示昆虫可以对植物释放的挥发性物质产生嗅觉响应^[2,3]. 这样, 昆虫可以通过视觉、味觉和嗅觉与植物发生相互作用, 而味觉是昆虫取食植物时最直接的响应机制.

一些 *Acalymma*, *Aulacophora* 和 *Diabrotica* 属甲虫在取食它们的寄主植物时, 往往是先用口器在植物叶面划圈, 然后再取食圈内的叶组织^[4,5]. 对这些甲虫有趣的取食行为, 有 2 种不同的解释: 一种解释认为^[5-7], 当甲虫取食叶面时, 寄主植物根部合成贮存的葫芦素会迅速迁移到叶面以阻止甲虫取食, 甲虫为了克服植物的这一化学防御而采用了划圈取食的对策; 另一种解释则认为^[8,9], 甲虫划圈取食是为了避免叶面的膨压和分泌的黏质, 与植物的化学防御不相关. 前一种解释最主要的问题在于葫芦素往往是这些甲虫取食的引诱物质, 寄主植物叶中的葫芦素往往刺激甲虫取食, 而不是阻止或防御它们的取食, 而后一种解释目前还缺乏有力的证据支持.

黄足黄守瓜 (*Aulacophora femoralis chinensis* Weise) 是一种在中国广为分布的瓜类植物害虫, 黄守瓜成虫对一些瓜类植物就是采用先划圈后取食圈内叶组织的方法. 这一有趣的现象早已被发现^[10], 但从没有任何机理方面的研究和解释. 本文从黄守瓜的

取食行为和黄瓜 (*Cucumis sativus* L) 的化学应答方面入手, 对这一现象的机理予以探讨.

1 材料与方法

() 受试材料和药品. 黄瓜选用华南地区主栽品种粤 1 号; 黄守瓜为单一雌虫卵孵化培养的第二代成虫; 葫芦素 C 和 纯品通过液相色谱 (HPLC) 方法^[11,12] 从葫芦素粗品 (天津医药公司) 中分离获得; 其他有机溶剂均为市售色谱纯或分析纯试剂.

() 田间调查. 2003 年 4 ~ 7 月间分别在广州和沈阳两地选择栽种黄瓜、南瓜 (*Cucurbita moschata* (Duch) Poir)、丝瓜 (*Luffa acutangula* (L) Roxb)、苦瓜 (*Momordica charantia* L) 和西瓜 (*Citrullus lanatus* (Thunb) Mansfeld) 的菜地进行 (各瓜类作物均为当地主栽品种). 调查随机抽样进行, 每一作物至少抽样 9 次, 主要观察田间黄守瓜成虫对各种瓜类作物叶面的取食行为和选择性.

() 温室实验. 在用 50 目滤网罩住的笼 (15 cm \times 10 cm \times 12 cm) 中, 放入盆栽的子叶期黄瓜幼苗 1 株或 1 片离体黄瓜鲜子叶 (放在润湿的脱脂棉上). 然后每笼放入 1 头停止饲喂 24 h 的黄守瓜成虫, 观察黄守瓜对活体或离体黄瓜子叶的取食行为. 当黄守瓜取食 30 s 后, 从笼中取出生长黄瓜幼苗盆或离体鲜叶, 放置实验预设的时间间隔后采集子叶测定它们的葫

葫芦素含量. 所有处理均设 9 个重复. 温室温度在 20 ~ 30 , 相对湿度为 75% ~ 90%.

() 葫芦素定性定量分析. 依据预设的时间间隔, 分别采集 100 mg 被黄守瓜取食的黄瓜活体或离体子叶, 然后加 1 mL 氯仿匀化浸提 5 min, 浸提液离心过滤, 残渣用 3×1 mL 氯仿洗涤后离心过滤. 合并滤液用氮气浓缩至 1 mL, 浓缩液加入反相 C₁₈ Sep-Pak 微固相萃取柱(Waters 公司)中, 萃取柱先后用水和 50% 甲醇水溶液淋洗(3 × 1 mL), 50% 甲醇水溶液淋洗相吹氮气浓缩至 100 μL 后进行定性定量分析. 黄瓜子叶浸提液首先在 Finnigan TSQ-7000 型液相色谱/质谱(LC/MS)联用仪上对葫芦素进行定性测定, 依据质谱分子量值及特征离子^[13]判断葫芦素的种类及相应的色谱峰位置(葫芦素 C: 色谱保留时间, 3.55 min; M⁺-60, 500; m/z, 482; 470; 111; 43. 葫芦素 : 色谱保留时间, 2.75 min; M⁺, 514; m/z, 146; 96; 43.). LC/MS 测定条件如下: 色谱柱为 C₁₈ 反相柱(Hypersil, 125 × 4 mm, 5 μm), 色谱流动相为甲醇/水溶液(7 : 3, 体积比), 流速为 0.5 mL/min, 紫外检测波长 228 nm, 进样量为 10 μL. 质谱采用大气压化学电离(atmospheric pressure chemical ionization, APCI)方式, 氮作为碰撞气体. 质谱滞留时间为 500 ms, 持续时间 10 min, 停顿时间 5 min. 所有测定均在正离子质谱模式下进行, 并采用多重反应监测方式(multiple reaction monitoring mode, MRM)监测相关的离子. 黄瓜子叶中葫芦素 C 和 的定量分析在 HP-1100 型 HPLC 仪上进行, 测定条件与上述 LC/MS 中的色谱条件基本相同, 但流速提高到 1.5 mL/min, 进样量为 30 μL. HPLC 定量分析采用内标法^[14], 分别以准确配制的葫芦素 C 和 纯品的甲醇溶液进样, 以进样浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制出标准曲线. 测试样品中葫芦素 C 和 含量分别以它们各自的色谱峰面积为基准从标准曲线中换算.

() 生测. 将黄瓜子叶 1 cm 直径的叶碟, 分别在实验设定浓度的葫芦素 C 和 I 的氯仿溶液中蘸 2 s, 另设只蘸氯仿的叶碟为对照. 叶碟在氯仿挥发后放入直径 12 cm 的培养皿中, 培养皿放置一层滤纸, 下衬湿纱布. 每皿分别放入 2 片处理和对照的叶碟(等距离间隔放置), 再放入 1 头停止饲喂 24 h 的黄守瓜成虫. 培养皿放入培养箱(25 ± 2 , L : D = 16 : 8), 4 h 后用毫米方格纸分别统计处理和对照叶碟被取食的面积, 结果以取食指数(feeding index, FI)表征^[15]:

$$FI = \frac{C - T}{C + T} \times 100.$$

C 为对照叶碟被取食面积, T 为处理叶碟被取食面积, FI > 0 表示刺激取食, FI < 0 表示拒食. 所有生测均在相同的条件下重复 5 次.

2 结果

2.1 黄守瓜对瓜类植物的取食行为

广州和沈阳南北两地区的田间观察结果表明, 黄足黄守瓜成虫主要划圈取食黄瓜和南瓜, 而不取食丝瓜、苦瓜和西瓜等其他瓜类植物, 而且这种划圈取食行为可以发生在黄瓜和南瓜幼苗子叶到成熟植株叶面的各个阶段. 黄守瓜成虫飞到叶面后, 以身体为半径在 30 s 内旋转咬食划圈, 然后取食圈内叶组织, 瓜叶一旦被划圈取食, 其他的黄守瓜在至少 24 h 内不再取食. 这些田间观察结果通过在温室内以黄瓜为取食植物的实验得到进一步的验证, 而且一个重要的发现是, 黄守瓜的这一划圈取食行为仅发生在活体黄瓜叶面, 对离体的黄瓜鲜叶, 黄守瓜是直接取食, 而不发生先划圈后取食圈内叶组织的行为(图 1). 这显示黄守瓜的划圈取食行为明显地与黄瓜被取食后的响应相关. 值得一提的是, 黄足黑守瓜(*Aulacophora cattigarensis* Weise)主要取食丝瓜, 而且几乎不采用划圈取食的方法, 显示守瓜属成虫, 即使非常接近的种不仅对取食的瓜类植物有选择性, 而且取食行为也有很大的差异.

2.2 黄瓜对黄守瓜取食的化学应答

黄守瓜对黄瓜活体和离体鲜叶根本不同的取食行为, 应归结于活体黄瓜能对黄守瓜的取食产生响应, 而离体鲜叶则不能产生相应的机制. 如果这种响应机制与化学防御相关, 黄瓜叶面被黄守瓜取食前后的相关化学物质应有显著的变化. LC/MS 和 HPLC 测定结果显示, 当黄瓜被黄守瓜划圈取食后, 子叶中葫芦素 C 的含量在 60 min 内增加 10 倍以上, 15 min 后子叶中还出现可测的葫芦素 , 并在 60 min 内达到 75 μg/g 鲜重的水平(图 2), 而且这一黄瓜子叶中高水平的葫芦素 C 和 至少持续 24 h, 但同样的结果并没有出现在圈内叶组织和离体鲜叶的实验中.

黄瓜子叶含有葫芦素 C, 一般不含有其他种类的葫芦素, 而且葫芦素 C 含量高的黄瓜品种更易被相关甲虫取食, 这一结果早已被阐明^[11,16]. 虽然一些黄瓜属的植物如 *Cucumis prophetarum* 能合成葫芦素

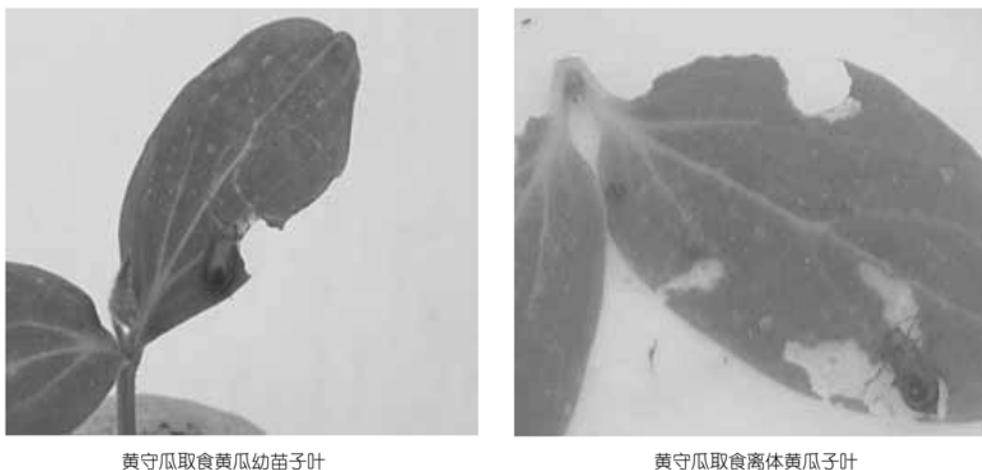


图1 黄守瓜对黄瓜幼苗和离体子叶的不同取食行为

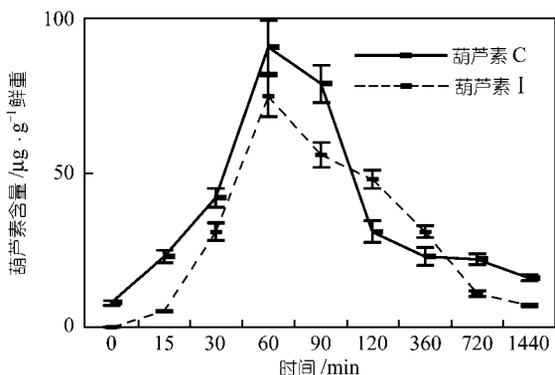


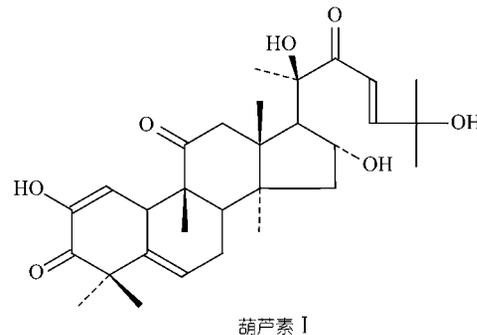
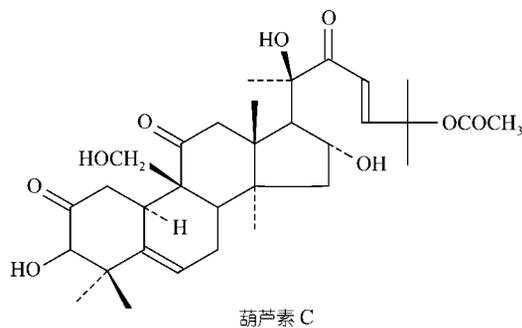
图2 黄守瓜取食的黄瓜子叶葫芦素含量与持续时间
圈内叶组织和离体子叶中葫芦素 C 和 含量在 7.9 和 0.0 μg/g 鲜重左右, 均不随时间变化, 数据未显示

[17], 但黄瓜子叶在被黄守瓜取食后能产生葫芦素, 则没有被报道。很显然, 葫芦素是黄瓜对黄守瓜取食的一种重要的化学响应物质。

进一步的试验证实, 黄守瓜取食前, 黄瓜根和子叶中只含有葫芦素 C, 而不含有可测的葫芦素, 葫芦素只能在黄守瓜取食后的根叶中检出, 而且子叶中葫芦素的含量高于根组织(图 3)。这表明葫芦素是黄瓜被黄守瓜取食后诱导产生的, 而且很可能是叶组织直接合成, 而不是从根部合成贮存后迁移到叶面的。

2.3 葫芦素对黄守瓜取食的影响

黄瓜在被黄守瓜取食后, 子叶中葫芦素 C 和含量的显著变化表明, 这 2 个化合物与黄守瓜的划圈取食行为有关。生测结果显示, 葫芦素 C 在 10 ~ 250



μg/g 浓度范围内均刺激黄守瓜取食, 250 μg/g 以上浓度则开始显示抑制取食效应, 而葫芦素则在 50 μg/g 低浓度就开始抑制黄守瓜取食(图 4)。这显示高剂量的葫芦素能抑制黄守瓜取食。

黄守瓜取食黄瓜后, 黄瓜子叶中葫芦素 C 含量升高的最大值为 91 μg/g, 难以达到抑制取食的 250 μg/g 门槛, 而黄瓜子叶中葫芦素的含量在取食后 60 min 能达到 75 μg/g 抑制取食门槛(图 2 和 4)。这表明, 黄瓜子叶中的葫芦素 C 是黄守瓜取食的刺激物

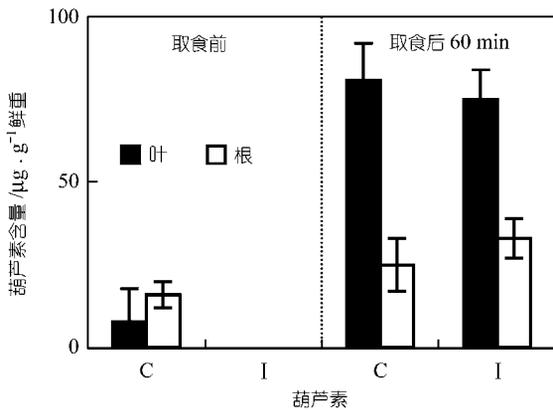


图 3 黄守瓜取食前后黄瓜幼苗根叶中葫芦素的含量

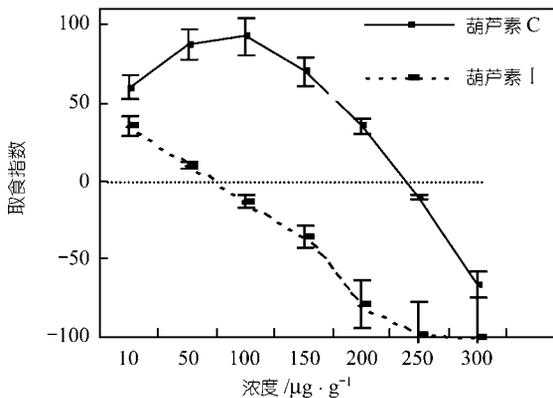


图 4 不同浓度葫芦素 C 和 I 对黄守瓜的取食影响

质，而葫芦素 I 则是黄守瓜取食的抑制物质。但黄瓜子叶中被黄守瓜取食诱导合成的葫芦素 C 含量最大值 75 μg/g 对黄守瓜的取食抑制效应并不显著(图 4)，这样有理由推测，黄瓜对黄守瓜取食的抑制作用应是两种葫芦素的协同效应。这样进一步以黄守瓜划圈取食后 60 min 时，黄瓜子叶葫芦素 C 和 I 的含量为浓度进行生测，结果发现葫芦素 C 和 I 的混合物比相同浓度的单一葫芦素 I 对黄守瓜取食的抑制效应明显增强(图 5)。

3 讨论

植物的乳液防御(latex defense)常导致一些昆虫采用切割叶脉的取食方式 [18]，葫芦科植物分泌的黏质及韧皮部确能增加相关甲虫取食的困难 [9,19]。但黄守瓜取食黄瓜时，黄瓜子叶能迅速增加葫芦素的种类，并达到抑制其取食的浓度，这表明黄瓜对黄守瓜的取食产生了化学响应。黄守瓜为了应对黄瓜的这

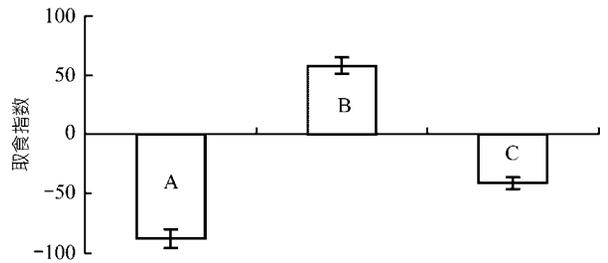


图 5 葫芦素 C 和 I 混合物对黄守瓜的取食影响
A 示葫芦素 C 和 I 混合物，以黄守瓜被取食后 60min 时子叶中的含量为浓度，即 91 μg/g 葫芦素 C+75 μg/g 葫芦素 I，总浓度为 166 μg/g。
B 示葫芦素 C，浓度为 166 μg/g。C 示葫芦素 I，浓度为 166 μg/g

一化学响应机制而采用划圈取食的方法，这不仅阻断了圈内黄瓜叶组织进一步合成葫芦素，也使圈外叶组织合成的葫芦素不能迁移到圈内，而离体鲜叶脱离了黄瓜幼苗，不再具备相应的化学应答机制，这就导致圈内叶组织和离体鲜叶中葫芦素的种类和浓度难以发生变化，从而使得黄守瓜能取食圈内的叶组织或直接取食离体鲜叶。另外，黄瓜幼苗子叶在黄守瓜取食后增加的葫芦素 C 和 I 的含量，能持续相当长的时间，使黄守瓜不能取食同一瓜叶，以保证自身在短期内不被进一步侵食。黄守瓜的取食行为和黄瓜的化学响应是它们为生存而形成的一种巧妙的自我保护策略。上述结果能够支持相关的化学防御假设 [5-7]，但黄瓜对黄守瓜取食的化学应答不应是其防御的全部机制，只能是主要机制之一。而黄守瓜划圈取食行为不发生在离体黄瓜鲜叶的结果则显示叶膨压与黄守瓜划圈取食行为关联不大。

葫芦素是一类四环三萜化合物，对人及大多数动物均有毒害作用 [11]，但一些甲虫却突破了葫芦科和十字花科等植物合成葫芦素的化学防御，反而利用取食葫芦素来防御自身的天敌 [20]。目前已分离鉴定了 10 余种结构不同的葫芦素，大量的研究显示单一的葫芦素往往刺激一些昆虫的取食 [4,21]，以葫芦素为主要成份的诱饵已被利用在田间诱捕害虫 [22-24]。但较少的研究注意到同一植物合成的多种结构葫芦素对相关昆虫取食的综合效应，或同一昆虫对不同结构葫芦素的取食差异。事实上，一些甲虫是可以辨别不同结构葫芦素的，如黄瓜十一星叶甲 (*Diabrotica undecimpunctata*) 就取食葫芦素 B, E 和 D，而不取食葫芦素 I [25,26]。本研究结果也表明黄守瓜能够辨别结构相差较小的葫芦素 C 和 I，而且这 2 种葫芦素在合适比例的浓度可以比单一葫芦素更显著地抑制黄守瓜取食。

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号: 30170182)和中国科学院“百人计划”资助项目。

参 考 文 献

- 1 Rausher M D. Co-evolution and plant resistance to natural enemies. *Nature*, 2001, 411: 857~864[DOI]
- 2 Kessler A, Baldwin I T. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science*, 2001, 291: 2141~2144 [DOI]
- 3 康乐, Hopkins T L. 黑蝗初孵蝗蝻对植物气味和植物挥发性化合物的行为和嗅觉反应. *科学通报*, 2004, 49: 81~85[摘要] [DPF]
- 4 Abe M, Matsuda K, Tamaki Y. Differences in feeding response among three cucurbitaceous feeding leaf beetles to cucurbitacins. *Appl Entomol Zool*, 2000, 35: 137~142[DOI]
- 5 Carroll C R, Hoffman C A. Chemical feeding deterrent mobilized in response to insect herbivory and counter adaptation by *Epilachna tredecimnotata*. *Science*, 1980, 209: 414~416
- 6 Tallamy D W. Squash beetle feeding behavior: an adaptation against induced cucurbit defense. *Ecology*, 1985, 66: 1574~1579
- 7 Tallamy D W, Mullin C A, Frazier J L. An alternate route to insect pharmacophagy: The loose receptor hypothesis. *J Chem Ecol*, 1999, 25: 1987~1997[DOI]
- 8 Dhillon N P S. The lack of a relationship between bitterness and resistance of cucurbits to red pumpkin beetle (*Aulacophora foveicollis*). *Plant Breed*, 1993, 110: 73~76
- 9 McCloud E S, Tallamy D W, Halaweish F T. Squash beetle trenching behavior: Avoidance of cucurbitacin induction or mucilaginous plant sap? *Ecol Entomol*, 1995, 20: 51~59
- 10 华南农业大学主编. 农业昆虫学, 第二版, 下册. 北京: 农业出版社, 1991. 273
- 11 Gorski P M, Jaworski A, Shannon S, et al. Rapid TLC and HPLC quantification of cucurbitacin C in cucumber cotyledons. *Hortscience* 1986, 21: 1034~1036
- 12 Halaweish F T, Tallamy D W. Quantitative determination of cucurbitacins by high performance liquid chromatography and high performance thin layer chromatography. *J Liquid Chromatogr*, 1993, 16: 497~511
- 13 Rice C A, Rymal K S, Chambliss O L, et al. Chromatographic and mass spectral analysis of cucurbitacins of three *cucumis sativus* cultivars. *J Agric Food Chem*, 1981, 29: 194~196
- 14 Matsuo K, DeMilo A B, Schroder R F W, et al. Rapid high-performance liquid chromatography method to quantitative elaterinide in juice and reconstituted residues from a bitter mutant of Hawkesbury watermelon. *J Agric Food Chem*, 1999, 47: 2755~2759[DOI]
- 15 Eichenseer H, Mullin C A, Chyb S. Antifeedant discrimination thresholds for two populations of western corn rootworm. *Physiol Entomol*, 1998, 23: 220~226[DOI]
- 16 Ferguson J E, Metcalf E R, Metcalf R L, et al. Influence of cucurbitacin content in cotyledons of cucurbitaceae cultivars upon feeding behavior of Diabrotica beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). *J Econ Entomol*, 1983, 76: 47~51
- 17 Afifi M S, Ross S A, Elsohly M A, et al. Cucurbitacins of *Cucumis prophetarum* and *Cucumis prophetarum*. *J Chem Ecol*, 1999, 25: 847~853[DOI]
- 18 Dussouard D, Eisner T. Vein-cutting behavior: insect counterploy to the latex defense of plants. *Science*, 1987, 237: 898~901
- 19 Alosi M C, Melroy D L, Park R B. The regulation of gelation of phloem exudates from *cucurbita* fruit by dilution, glutathione and glutathione reductase. *Plant Physiol*, 1988, 86: 1089~1094
- 20 Agrawal A A, Gorski P M, Tallamy D W. Polymorphism in plant defense against herbivory: constitutive and induced resistance in *Cucumis sativus*. *J Chem Ecol*, 1999, 25: 2285~2304[DOI]
- 21 Tallamy D W, Stull J, Ehresman N P, et al. Cucurbitacins as feeding and oviposition deterrents to insects. *Environ Entomol*, 1997, 26: 678~683
- 22 Fielding D J, Ruesink W G. Varying amounts of bait influences numbers of western and northern corn rootworms (Coleoptera: Chrysomelidae) caught in cucurbitacin traps. *J Econ Entomol*, 1985, 78: 1138~1144
- 23 Lance D R, Sutter G R. Field tests of a semiochemical-based toxic bait for suppression of corn rootworm beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). *J Econ Entomol*, 1992, 85: 967~973
- 24 Brust G E, Foster R E. Semiochemical-based toxic baits for control of striped cucumber beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) in cantaloupe. *J Econ Entomol*, 1995, 88: 112~116
- 25 李绍文. 生态生物化学. 北京: 北京大学出版社, 2001. 230~231
- 26 Chambliss O L, Jones C M. Cucurbitacin: specific insect attractants in cucurbitaceae. *Science*, 1966, 153: 1392~1393

(2004-04-26 收稿, 2004-06-08 收修改稿)