

红火蚁告警信息素的 GC-EAD 分析

刘先福^{1,2}, 陈立², 李俊凯^{1*}

¹长江大学农学院, 湖北 荆州 434025; ²中国科学院动物研究所,
农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100101

摘要:【背景】2-乙基-3,6-二甲基吡嗪是红火蚁告警信息素的主要成分,本研究旨在分离、鉴定红火蚁工蚁浸提液中告警信息素成分,分析红火蚁工蚁对告警信息素合成样品混合物的电生理反应。【方法】200 g 红火蚁工蚁的正己烷浸提液过硅胶柱,正己烷—丙酮体系洗脱,气相色谱(GC)和气相色谱—质谱联用(GC-MS)分析检测浸提液中含告警信息素的流分,气相色谱—触角电位联用仪(GC-EAD)分析红火蚁工蚁对 2-乙基-3,5(6)-二甲基吡嗪混合物的电生理活性。【结果】红火蚁工蚁正己烷浸提液硅胶柱层析分离能够得到含 2-乙基-3,6-二甲基吡嗪的流分,GC-MS 分析的保留时间在 11.45 min。经过 GC-EAD 分析,发现红火蚁工蚁对 2-乙基-3,5(6)-二甲基吡嗪混合物有显著的电生理反应。【结论与意义】红火蚁工蚁对 2-乙基-3,6-二甲基吡嗪的电生理反应比 2-乙基-3,5-二甲基吡嗪高。

关键词: 红火蚁; 告警信息素; 气相色谱—触角电位联用

Analysis of the alarm pheromone components of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae)

Xian-fu LIU^{1,2}, Li CHEN², Jun-kai LI^{1*}

¹College of Agronomy, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025, China; ²State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: 【Background】2-Ethyl-3,6-dimethylpyrazine is a main alarm pheromone component of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren. This study aimed to isolate and identify the reported alarm pheromone component of fire ant workers and to analyze the electrophysiological response of fire ant workers to the synthetic alarm pheromone component mixture. 【Method】Hexane extract of 200 g of fire ant workers was subjected to a silica gel column chromatography and eluted with hexane-acetone solvent system. The alarm pheromone fraction was analyzed by gas chromatography (GC) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analyses. The electrophysiological response of fire ant worker to synthetic 2-ethyl-3,5(6)-dimethylpyrazine mixture was analyzed by gas chromatography-electroantennographic detection (GC-EAD). 【Result】A fraction containing 2-ethyl-3,6-dimethylpyrazine was obtained through the silica gel column chromatography of hexane extract of ant workers. The retention time of 2-ethyl-3,6-dimethylpyrazine in the alarm pheromone fraction in GC-MS analysis was 11.45 min. GC-EAD analysis demonstrated that fire ant worker showed significant electrophysiological response to 2-ethyl-3,5(6)-dimethylpyrazine mixture. 【Conclusion and significance】Fire ant workers showed higher activity to 2-ethyl-3,6-dimethylpyrazine than to 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine, which can be used in baits to attract workers.

Key words: *Solenopsis invicta* Buren; alarm pheromone; GC-EAD

信息素(pheromone)在协调社会性昆虫个体之间的生理和行为活动及完成整个群体生存所必要的活动方面起着重要的作用,对于其完成认同与集群、识别、生殖、报警和防御等社会性通讯尤为重要。根据蚂蚁家族个体分工的不同,蚂蚁信息素大

致可分为 3 类,即蚁后信息素(queen-produced pheromone)、工蚁信息素(worker-derived pheromone)和幼虫信息素(brood-produced pheromone)(Rosen *et al.*, 1996)。工蚁的主要功能是觅食、防御,所以工蚁释放的信息素主要有两大类:一种是由头部上颚

收稿日期(Received): 2014-03-25 接受日期(Accepted): 2014-04-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(30970402)

作者简介: 刘先福,男,硕士研究生。研究方向: 化学生态学。E-mail: 664949079@qq.com

* 通讯作者(Author for correspondence), E-mail: junkaili@sina.com

腺分泌的告警信息素 (alarm pheromone), 能让蚁群免于外敌入侵而遭受侵害; 另外一种是由腹部杜氏腺分泌的跟踪信息素 (trail pheromone), 具有高效的觅食和招募功能 (Wilson, 1962)。这 2 类信息素保证了工蚁个体间的信息交流。

通常在反击过程中, 告警信息素能够加强蚂蚁的移动速度和进攻强度 (Brown *et al.*, 1970)。然而, 对于蚂蚁这种个体较小, 且蚁巢内相互交流较少的种群, 告警信息素更多的是起到一个及时疏散成员的作用 (Regnier & Wilson, 1969)。关于蚂蚁告警信息素的化学成分研究已有大量报道 (Bradsha *et al.*, 1975; Hernandez *et al.*, 1999; Wheeler *et al.*, 1975)。第 1 个告警信息素是从切叶蚁 *Atta texana* Buckley 体内提取、分离得到, 其主要成分是 4-甲基-3-庚酮 (Moser *et al.*, 1968)。进一步研究发现, 4-甲基-3-庚酮还能引起 *A. texana* (Buckley)、*A. robusta* Borgmeier、*A. bisphaerica* Forel、*A. capiguara* Gon alves 和 *A. sexdens* (L.) 等 5 种蚂蚁的告警行为 (Blum, 1968; Moser *et al.*, 1968; Riley *et al.*, 1974)。而据研究报道, 红火蚁 *Solenopsis invicta* Buren 的告警信息素的主要成分是 2-乙基-3, 6-二甲基吡嗪 (Vandermeer *et al.*, 2010)。

人工合成的 2-乙基-3, 5(6)-二甲基吡嗪标准样品的比例为 45% : 55% 的 2-乙基-3, 6-二甲基吡嗪和其同分异构体 2-乙基-3, 5-二甲基吡嗪的混合物 (Sugimoto *et al.*, 2006)。由于没有红火蚁告警信息素标准样品纯品, 在利用告警信息素样品做生物试验时, 必须考虑到混合物的作用。这一对异构体可在气相色谱柱上分开, 所以用气相色谱—触角电位联用仪 (GC-EAD) 分析红火蚁工蚁对告警信息素混合物中 2 种化合物的电生理反应时, 就能验证红火蚁告警信息素混合物中的有效成分, 为进一步研究告警信息素对红火蚁告警行为的调控提供参考。红火蚁告警信息素在红火蚁体内属于极微量化合物, 本试验拟用柱层析法分离大量红火蚁浸提液, 然后与标准样品对比 GC-MS 离子图, 以确定是否能得到红火蚁告警信息素流分。

1 材料与方法

1.1 供试材料及仪器

1.1.1 供试虫源 红火蚁种群采自红火蚁发生区广东省广州市及周边几个地区。从野外采回的红

火蚁, 在实验室利用“水试管”提供清水和 10% 的蜂蜜水, 每天每巢投放 3 ~ 5 头黄粉虫 *Tenebrio molitor* L. (吕利华等, 2006)。

1.1.2 主要试剂及仪器 正己烷, 色谱纯, 上海安谱科学仪器有限公司; 丙酮, 分析纯, 国药集团化学试剂北京有限公司; 2-乙基-3, 5(6)-二甲基吡嗪, 西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司; 高纯氮气、氦气, 北京千禧京城气体销售中心; 聚四氟乙烯乳液, 广州兴胜杰科技有限公司; 硅胶柱, 内径 22 mm, 北京欣维尔玻璃仪器有限公司; 硅胶粉, 300 ~ 400 目, 青岛海洋化工厂。气相色谱仪 GC7890A、气相色谱—质谱联用仪 GC-MS, 7890A-5975C, 美国 Agilent Technologies 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 红火蚁告警信息素分离分析 将 200 g 红火蚁工蚁置于 -20 ℃ 的冰箱中冷冻 60 min, 用 470 mL 色谱纯级正己烷浸提 48 h, 取出浸提液, 加入 30 g 无水硫酸钠, 处理 12 h 后取出, 置于 4 ℃ 冰箱冷藏待用。告警信息素标品为 2-乙基-3, 5(6)-二甲基吡嗪, 浓度为 $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 溶剂为色谱纯级正己烷。

取上述工蚁浸提液, 用硅胶柱层析法 (80.0 g, 300 ~ 400 目硅胶载入直径 22 mm 层析柱) 分离含有吡嗪的流分。用正己烷与丙酮按比例冲洗层析柱, 每管收集 2 mL 为 1 个流分, 然后用 GC 测定每个流分的化学成分 (Chen & Fadamiro, 2009a、2009b)。柱层析分离所收集的流分样品用 Agilent 7890A 气相色谱仪进行分析, 色谱柱为 HP-5MS 毛细管柱 (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm film thickness, Agilent Technologies), 进样量 1 μL , 无分流进样。样品检测程序: 进样口温度 230 ℃, 程序升温起始温度 50 ℃, 以 $5 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速率升至 100 ℃, 以 $10 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速率升至 240 ℃, 保持 4 min, 总共分析时间 30 min。检测器为火焰离子检测器 (FID), 温度 260 ℃。将 GC 色谱图相同或相近的流分合并成 1 个流分。同时进一针标准样品, 通过对比 GC 保留时间来确定吡嗪流分, 然后将吡嗪流分浓缩至 1 mL, 进行 GC-MS 分析。用 GC-MS 分析过柱收集到的吡嗪流分和告警信息素标品混合物, 对比 2 组数据的离子峰和保留时间, 确定样品中吡嗪流分中的告警信息素成分。

1.2.2 红火蚁告警信息素混合物气相色谱—触角电位联用 (GC-EAD) 分析 EAG 试验所用缓冲液

为 Ringer's 生理盐水,各组分配比为氯化钠 0.75 g, 氯化钾 0.035 g,氯化钙 0.029 g,水 100 g。将银丝插入 2 个电极中,挑选 1 对端口较小的玻璃毛细管,作记录和参比电极。

挑选 1 头体型较大的工蚁,放置在玻片上,用手术刀快速切下头部,切口端与充满 Ringer's 生理盐水的参比电极相连,触角的尖端连接记录电极。电极通过镀氯化银银丝与信号放大器连接,信号通过探针监测 (PRG-3, Syntech®, the Netherlands), 用 GC-EAD 软件 (Syntech®, the Netherlands) 记录和分析数据 (Chen & Fadamiro, 2007)。

GC-EAD 分析色谱柱为 HP-5MS 毛细管柱,进样量 2 μL ,无分流进样。色谱条件同 1.2.1。测试的样品为 2-乙基-3,5(6)-二甲基吡嗪,即告警信息素混合物,浓度 1 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。程序结束后保存 FID 离子检测图与 EAD 图谱。

2 结果与分析

2.1 红火蚁告警信息素分离分析

红火蚁工蚁浸提液通过硅胶柱层析分离,用正己烷和丙酮溶剂体系能够分离得到告警信息素流分,经过 GC-FID 分析浓缩得到 1 mL 吡嗪流分。对样品中吡嗪流分和标准样品中告警信息素混合物进行 GC-MS 分析,得到 2 个样品的 GC-MS 总离子色谱图 (图 1),色谱峰 1 的质谱图见图 2。由图 1 可知,提取物样品中吡嗪流分的色谱图中在 11.45 min 出现了一个峰,经质谱鉴定以及与标准样品对比保留时间,发现吡嗪流分中的峰 1 和合成标准品混合物中峰 1 是同一种化合物。通过比对文献中合成吡嗪混合物的色谱图出峰顺序和含量比,确定峰 1 是 2-乙基-3,6-二甲基吡嗪,峰 2 是 2-乙基-3,5-二甲基吡嗪 (Sugimoto *et al.*, 2006)。此结果说明,大量红火蚁工蚁浸提液过柱能够得到告警信息素的成分,但含量非常低。

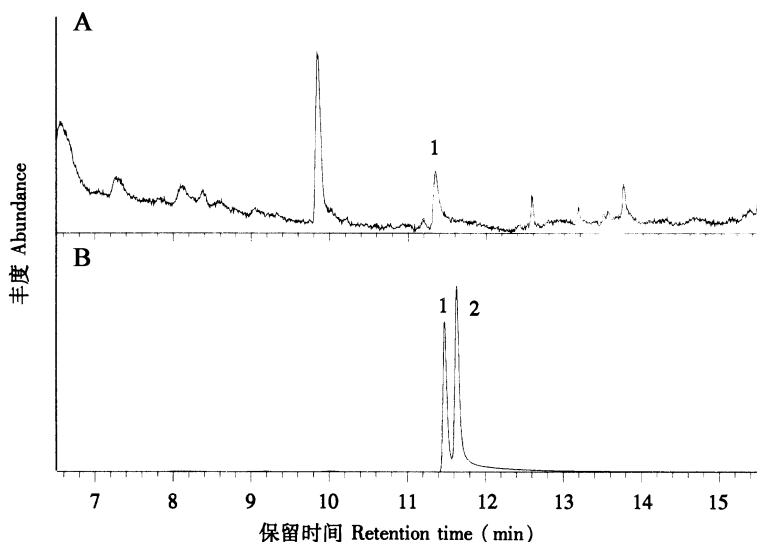


图 1 红火蚁工蚁浸提物中吡嗪流分 (A) 和告警信息素标准样品混合物 (B) 的总离子色谱图

Fig. 1 Total ion chromatograms of the pyrazine fraction of the body extract from workers of *S. invicta* (A) and synthetic alarm pheromone component mixture (B)

2.2 红火蚁告警信息素标准样品混合物 GC-EAD 分析

红火蚁工蚁对告警信息素混合物 GC-EAD 反应如图 3。合成告警信息素标准样品为 2-乙基-3,5(6)-二甲基吡嗪的混合物,经过 GC-EAD 分析,发现红火蚁工蚁对 2 种化合物均有电生理反应,其中

活性高的为化合物 1,活性低的为化合物 2。与 GC-MS 离子图谱比对,发现化合物 1 为 2-乙基-3,6-二甲基吡嗪,化合物 2 为 2-乙基-3,5-二甲基吡嗪。GC-EAD 结果证实红火蚁工蚁对 2-乙基-3,6-二甲基吡嗪 (即告警信息素) 的电生理反应比对其同分异构体 2-乙基-3,5-二甲基吡嗪的反应大。

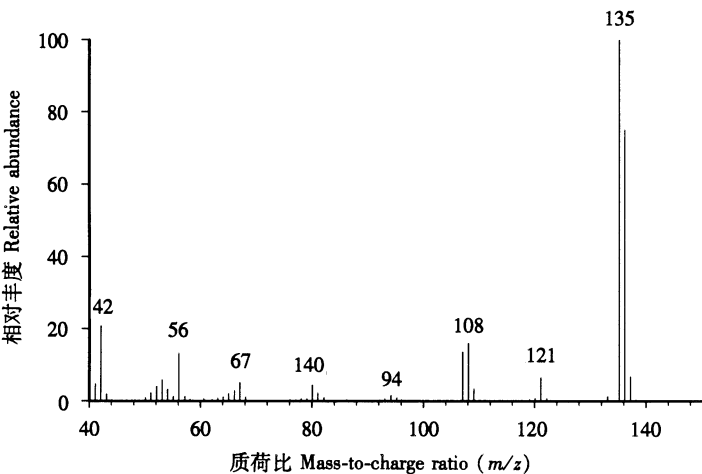


图2 2-乙基-3,6-二甲基吡嗪的质谱图
Fig. 2 Mass spectra of 2-ethyl-3,6-dimethylpyrazine

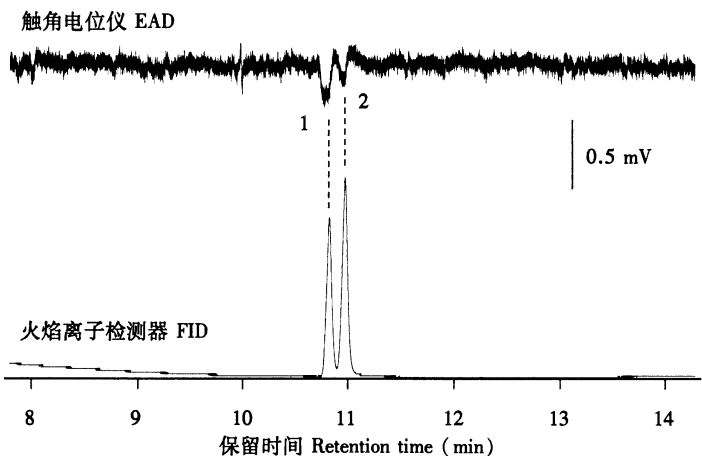


图3 红火蚁工蚁对告警信息素标准样品混合物的 GC-EAD 反应
Fig. 3 GC-EAD analysis of *S. invicta* workers to the synthetic alarm pheromone component mixture
1: 2-乙基-3,6-二甲基吡嗪; 2: 2-乙基-3,5-二甲基吡嗪。
1: 2-ethyl-3,6-dimethylpyrazine; 2: 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine.

3 讨论

本研究将大量红火蚁浸提液经硅胶柱层析分离,得到含告警信息素的流分,与 2-乙基-3,5(6)-二甲基吡嗪标准样品的气相色谱图保留时间对比,确定告警信息素流分含有 2-乙基-3,6-二甲基吡嗪。将标准样品混合物进行 GC-EAD 分析,红火蚁工蚁对 2-乙基-3,6-二甲基吡嗪的电生理反应活性比对 2-乙基-3,5-二甲基吡嗪的高。

由于告警信息素属于小分子易挥发物质,利用柱层析方法洗脱分离较难得到该组分,会让大量的物质挥发损失;另外,试验选用的红火蚁是冻死之后的工蚁,红火蚁在被冻死过程中可能会释放告警信息素,也会影响告警信息素的提取效率。因此,下一步可改进提取方法,如利用动态顶空吸附、固

相微萃取等。另外,还可对已鉴定出来的告警信息素及一系列吡嗪类似物做电生理反应及行为反应测试,探讨吡嗪类似物对红火蚁行为的影响。

参考文献

吕利华, 冯夏, 陈焕瑜, 刘杰, 刘晓燕, 何余容. 2006. 介绍红火蚁的野外采集和实验室饲养的方法. 昆虫知识, 43(2): 265 – 267.

Blum M S. 1968. Alarm pheromones. *Annual Review of Entomology*, 14: 157 – 180.

Brown W L, Eisner T and Whittaker R H. 1970. Allomones and kairomones: trans-specific chemical messengers. *Bioscience*, 20: 21 – 22.

Bradsha J W, Baker R and Howse P E. 1975. Multicomponent alarm pheromones in the weaver ants. *Nature*, 258: 230 – 231.

- Chen L and Fadamiro H Y. 2007. Behavioral and electroantennogram responses of phorid fly *Pseudacteon tricuspid* (Diptera: Phoridae) to red imported fire ant *Solenopsis invicta* odor and trail pheromone. *Journal of Insect Behavior*, 20: 267 – 284.
- Chen L and Fadamiro H Y. 2009a. Re-investigation of venom chemistry of *Solenopsis* fire ants. I. Identification of novel alkaloids in *S. richteri*. *Toxicon*, 53: 469 – 478.
- Chen L and Fadamiro H Y. 2009b. Re-investigation of venom chemistry of *Solenopsis* fire ants. II. Identification of novel alkaloids in *S. invicta*. *Toxicon*, 53: 479 – 486.
- Hernandez J V, Cabreera A and Jaffe K. 1999. Mandibular gland secretion in different castes of the leaf-cutter ant *Atta laevigata*. *Journal of Chemical Ecology*, 25: 2433 – 2444.
- Hölldobler B and Wilson E. 1990. *The Ants*. Belknap Press, Cambridge, MA.
- Moser J C, Brownlee R C and Silverstein R. 1968. Alarm pheromones of the ant *Atta texana*. *Journal of Insect Physiology*, 14: 529 – 535.
- Regnier F E and Wilson E O. 1969. The alarm defense system of the ant *Lasius aliens*. *Journal of Insect Physiology*, 15: 893 – 898.
- Riley R G, Silverstein R and Moser J C. 1974. Isolation, identification, synthesis and biological activity of volatile compounds from the heads of *Atta* ants. *Journal of Insect Physiology*, 20: 1627 – 1637.
- Rosen D, Bennett F D and Capinera J L. 1996. *Pest Management in the Subtropics: Integrated Pest Management-a Florida Perspective*. Denproptetrovsk: Intercept Limited.
- Sugimoto N, Yomota C, Furusho N, Sato K, Yamazaki T and Tanamoto K. 2006. Application of liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy for the identification of ethyldimethylpyrazine, a food flavouring agent. *Food Additives and Contaminants*, 23: 1253 – 1259.
- Vandermeer R K, Preston C A and Choi M Y. 2010. Isolation of a pyrazine alarm pheromone component from the fire ant, *Solenopsis invicta*. *Journal of Chemical Ecology*, 36: 163 – 170.
- Wheeler J W, Evans S L, Blum M S and Torgerson R L. 1975. Cyclopentyl ketones-identification and function in *Azteca* ants. *Science*, 187: 254 – 255.
- Wilson E O. 1962. Chemical communication among workers of the fire ant *Solenopsis aevissima* (Fr. Smith) 1. The organization of mass-foraging. 2. An information analysis of the odor trail. 3. The experimental induction of social responses. *Animal Behaviour*, 10: 134 – 164.

(责任编辑:郭莹)

