

· 研究报告 ·

蚜害茶树挥发物组分变化的聚类分析

孙廷哲^{1†}, 岂泽华^{1†}, 梁可欣¹, 李沁^{1,2}, 饶玉春^{2*}, 穆丹^{1*}

¹安庆师范大学生命科学学院, 安庆 246133; ²浙江师范大学化学与生命科学学院, 金华 321004

摘要 舒茶早(*Camellia sinensis* cv. 'shuchazao')是皖西南产区一种茶树品种。为研究茶蚜取食为害诱导的茶树挥发物释放特征, 运用气相色谱-质谱联用技术, 比较了健康茶梢和蚜害茶梢的挥发物组成和相对含量。结果显示, 健康茶梢挥发物种类(16种)和相对含量较少, 而蚜害茶梢挥发物种类(24种)较为丰富且相对含量增大。对具有显著性差异的挥发物种类进行无监督式聚类分析, 结果表明, 健康茶梢和蚜害茶梢挥发物具有明显的聚类特征。基于差异显著挥发物建立了偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)模型。经实验验证, 此模型可较好地区分健康和蚜害茶梢($R^2X=0.903$, $R^2Y=0.875$)。通过计算变量重要性投影, 结果表明, α -蒎烯、长叶烯-(V4)、苯甲醛、反-2-甲基-2-丁烯酸环丙烯酯、3-己烯醛、苧烯和癸醛这7种重要挥发物的相对含量整体变化对判别健康与蚜害茶梢具有重要作用。研究初步揭示了茶蚜为害茶树挥发物含量变化的特征, 可为制定茶蚜防控策略提供新的理论依据。

关键词 茶树挥发物, 气相色谱-质谱联用技术, PLS-DA, 茶蚜, 聚类分析

孙廷哲, 岂泽华, 梁可欣, 李沁, 饶玉春, 穆丹 (2021). 蚜害茶树挥发物组分变化的聚类分析. 植物学报 56, 422–432.

茶树(*Camellia sinensis*)是国内重要的经济作物。高档茶多由芽梢加工而成, 富含氨基酸等成分(林郑和等, 2015), 但芽梢易遭受多种茶树害虫为害。茶蚜(*Toxoptera aurantii*)是一种主要的茶树害虫, 其发生较为隐秘且繁殖速度快, 幼虫和成虫均可刺吸茶汁。茶蚜在国内主要茶区均有分布, 对茶树造成巨大危害(Han and Han, 2007)。茶蚜在春、秋季借助虫口期快速增长, 达到虫口峰值; 茶蚜喜聚集在茶树叶背和嫩茎上, 通过刺吸汁液使茶树芽叶受损; 茶蚜排泄物也可诱导霉菌聚集于茶树叶片, 进而影响茶树的光合作用(Han and Chen, 2002a)。使用化学防治方法易造成茶树农药残留超标, 因此并不是防治茶树害虫的有效手段。近年来, 一个新的研究热点是利用虫害诱导的植物挥发物(herbivore-induced plant volatiles, HIPVs) (亦称互利素)引诱天敌进而实现生物防治, 是植物与植食性昆虫协同进化中形成的一种诱导型防御机制(D'Alessandro et al., 2009; Gish et al., 2015; Sobhy et al., 2015; Aartsma et al., 2019;

Sanou et al., 2019)。HIPVs对害虫防御的现象最早见于Turlings等(1990)对玉米-甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*和寄生蜂 *Cotesia marginiventris*的三级营养关系研究。HIPVs亦可作为信息素, 形成系统性的植物间(如周围健康植株)信息传递(Baldwin et al., 2002; Jing et al., 2021; Ye et al., 2021)。一方面, 周围未遭受为害的植物通过感知HIPVs诱导自身产生防御反应, 如上调防御基因的表达和产生防御相关代谢物(Kost and Heil, 2006; 左照江等, 2009; Zeng et al., 2017; Wang et al., 2019; Zhao et al., 2020)。另一方面, 某些附近健康植株并不产生即时应答反应, 而只在害虫为害发生时产生强烈应答反应, 称之为防御警备(defense priming) (Heil and Silva Bueno, 2007; Ye et al., 2019)。

HIPVs的重要特征之一是其具有特异性(Huffaker et al., 2013)。遭受不同植食性昆虫为害的植物可针对害虫种类做出响应, 形成HIPVs释放图式, 此HIPVs释放图式特征可被相应的害虫天敌识别(Turlings

收稿日期: 2021-02-07; 接受日期: 2021-04-19

基金项目: 国家自然科学基金(No.31971185, No.31800316)、安徽省高校优秀青年人才支持计划(No.gxyqZD2020031, No.gxyq2018034)和安徽省教育厅自然科学基金(No.KJ2017A359)

† 共同第一作者

* 通讯作者。E-mail: ryc@zjnu.cn; mudansmile@126.com

and Erb, 2018)。HIPVs的组成可受植食性昆虫性信息素影响(孙晓玲等, 2016)。HIPVs组分和含量的特异性变化亦可协助拟寄生物辨识其寄主或合适的寄主发育阶段(Takabayashi et al., 1995; de Moraes et al., 1998)。研究表明, 玉米(*Zea mays*)的HIPVs而非光照直接影响粘虫(*Mythimna separata*)的夜间行为(Shiojiri et al., 2006; Joo et al., 2018); 受低温胁迫的植物通过HIPVs的释放可提高周围植物的耐寒性(Zhao et al., 2020)。值得注意的是, 植物机械损伤本身固然可以诱导一些挥发物的生成(Heil and Land, 2014), 但是源自虫害的激发子, 即害虫相关分子图式(herbivore-associated molecular patterns, HAMPs)显著影响HIPVs的动态特征(Schmelz, 2015)。HIPVs的组分和含量特征可向害虫天敌及其它植物提供丰富而有效的信息。因此, 探究HIPVs的特异性对利用植物挥发物进行虫害防治至关重要。

目前, 有关茶蚜和茶树挥发物的关系研究主要包括茶树挥发物结合颜色对蚜虫的吸引作用(Han et al., 2012)、茶树挥发物对茶蚜寻找合适取食点的辅助作用(Han and Han, 2007)以及不同茶树挥发物对茶蚜触角电位(electroantennography, EAG)反应的影响(韩宝瑜和周成松, 2004)。浙江地区茶蚜为害诱导的挥发物组分相对含量变化及其对茶蚜天敌的引诱作用已有报道(Han and Chen, 2002a, 2002b, 2002c)。植物挥发物组分和含量受土壤微环境、盐胁迫和温度等非生物因素影响(Ninkovic et al., 2021), 茶树挥发物组分也具有品种和地理区域特异性(苗爱清等, 2010; 王国昌, 2010)。本研究利用气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)联用技术分析了皖西南茶区茶树品种挥发物的特征, 测定了茶蚜取食前后茶树挥发物的组成和含量, 运用多元统计分析方法揭示虫害发生前后挥发物图谱改变特征, 可为进一步制定茶蚜生物防治策略提供新的科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品处理

茶蚜(*Toxoptera aurantii* (Boyer))采集于安徽省安庆市宜秀区五横乡杨亭村茶园, 在人工气候箱中进行培养, 光周期为12小时光照/12小时黑暗, 相对湿度

60%–70%, 温度为(24±2)°C, 舒茶早(*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze cv. 'shuchazao')盆栽茶苗饲养多代。2020年秋季于五横乡杨亭村选择无病虫害且长势良好的无公害茶园, 茶树品种为舒茶早, 每样点取2株健康茶树用于实验, 株距为60 m。用小毛刷将茶蚜(无翅蚜)接种于1棵茶树的1芽4叶茶梢之上, 数量控制在每茶梢200只, 茶梢用网纱罩住。24小时后, 轻刷去茶蚜及其蜕皮、蜜露, 每样品取茶蚜为害茶梢1芽4叶共计40 g, 取脱脂棉并用蒸馏水预浸润处理, 然后包裹茶枝基部保湿, 即刻收集挥发物。取另一棵茶树上的健康茶梢, 每样品为1芽4叶共40 g, 用脱脂棉进行基部保湿, 以收集挥发物(崔林等, 2015)。采用五点取样法选取生境相同的5个样点, 共计获得5组健康茶梢和5组蚜害茶梢样品。样本编号1–5为健康茶梢组, 6–10为蚜害茶梢组。

1.2 茶梢挥发物收集

使用顶空动态吸附装置(Mu et al., 2012), 将健康茶梢和茶蚜为害茶梢分别置入玻璃圆柱体(直径8 cm, 体积2 L)的主体部分, 玻璃圆柱体以磨砂口密闭。通过圆柱体一端导入经活性炭过滤的纯净空气, 流量为180 mL·min⁻¹; 出气口连接Super Q (50 mg)吸附柱、抽气泵和流量计。收集10小时后, 用300 μL色谱纯二氯甲烷淋洗吸附柱, 淋洗液置入2 000 μL贮样瓶中, 内标为1 μL的10⁻⁴ g·mL⁻¹癸酸乙酯, 充分混匀。用微量进样器取1 μL进行GC-MS样品分析。

1.3 茶梢挥发物鉴定

利用皖西南产品质量监督检验中心的安捷伦GC(7890A)-MS(5975C)进行挥发物鉴定。色谱柱为30.0 m×250 μm×0.25 μm id HP-5MS石英毛细管柱, 流量固定为1.0 mL·min⁻¹; 溶剂延迟为3分钟; 进样口温度和GC-MS接口温度分别设定为250°C和280°C; 程序升温: 柱温初始设定为50°C, 持续5分钟, 然后以每分钟3°C的速度提高至190°C, 于190°C保持5分钟(Mu et al., 2012)。EI离子源, 电离能为70 eV, 全扫描频率为每秒2次。载气为99.999%的氦气。挥发物鉴定检索谱库为NIST08.L。根据化学工作站(安捷伦)的标准图谱结合茶树挥发物相关文献, 对基峰和相对丰度等进行分析。结合质谱挥发物保留时间和标准品进样验证等方式, 对各峰所代表的挥发物化学结

构和名称予以确认。计算每个组分的峰面积与内标峰面积的比例,得出各挥发物组分的相对含量(Mu et al., 2012)。

1.4 统计分析

利用Mann-Whitney U秩和检验方法统计并检验挥发物的含量差异。用MATLAB软件2018b版进行t分布随机邻域嵌入(t-distributed stochastic neighbor embedding, t-SNE) (van der Maaten and Hinton, 2008)、聚类分析(clustering analysis, CA)和主成分分析(principal component analysis, PCA) (Jolliffe and Cadima, 2016)。用SIMCA-P软件进行偏最小二乘法判别分析(partial least squares discrimination

analysis, PLS-DA)。使用MATLAB软件统计作图。

2 结果与讨论

2.1 蚜害诱导茶梢挥发物成分变化特征

我们分别从健康茶梢和蚜害茶梢挥发物中分离鉴定出16种和24种成分(表1)。挥发物成分的GC-MS总离子流如图1所示。蚜害茶梢挥发物各成分总含量相对于内标(internal standard, IS)含量为11.24±2.60 (平均值±标准差),而健康茶梢挥发物各成分总含量相对于内标仅为2.41±0.41,表明茶蚜为害后茶梢挥发物的释放量显著增加(P=0.007 9, Mann-Whitney U秩和检验)。

表1 健康和蚜害茶梢挥发物组分(VOCs)和相对含量(平均值±标准差)

Table 1 The relative content of volatile organic compounds (VOCs) from healthy and infested tea shoots by *Toxoptera aurantii* (means±SE)

No.	Retention time (min)	Volatile organic compounds	Relative content	
			Healthy	Infested
C1	4.842	3-hexenal	0	1.3204±0.3300**
C2	6.984	Ethylbenzene	0.3174±0.0895	0.8110±0.2546
C3	7.391	Benzene,1,3-dimethy-	0.7028±0.0881	1.5338±0.5370
C4	8.261	p-xylene	0.1596±0.0382	0.5888±0.1525
C5	8.572	2-heptanone	0	0.6570±0.2495**
C6	10.057	α-pinene	0	0.3518±0.0670**
C7	11.485	Benaldehyde	0	0.5694±0.1158**
C8	13.402	Decane	0	0.1562±0.0716**
C9	13.658	Octanal	0.0350±0.0080	0.3076±0.1001
C10	14.796	2-ethyl-1-hexanol	0.4416±0.1631	1.1204±0.2834
C11	16.637	Acetophenone	0.0990±0.0240	0.4676±0.1435
C12	18.471	Undecane	0.0756±0.0166	0.1842±0.0535
C13	18.700	Nonanal	0.1240±0.0379	0.5608±0.2060*
C14	19.071	E-2-butenic acid, 2-(methylenecyclopropyl)prop-2-ylester	0	0.0336±0.0123**
C15	20.682	Camphor	0.1174±0.0318	0.5498±0.1094**
C16	21.912	E-2-nonen-1-ol	0	0.1422±0.0804**
C17	22.387	Naphthalene	0.0552±0.0174	0.2874±0.0868*
C18	23.367	Dodecane	0.0334±0.0092	0.1366±0.0350*
C19	23.666	Decanal	0.1188±0.0332	0.6450±0.3569*
C20	28.033	Tridecane	0.0160±0.0036	0.0384±0.0142
C21	32.427	Tetradecane	0.0358±0.0094	0.1904±0.0688*
C22	32.612	Longifolene-(V4)	0	0.0648±0.0141**
C23	34.363	E-5,9-undecadien-2-one,6,10-dimethyl-	0.0470±0.0118	0.2866±0.1340*
C24	40.538	Hexadecane	0.0408±0.0126	0.2320±0.1007*

* P<0.05, ** P<0.01

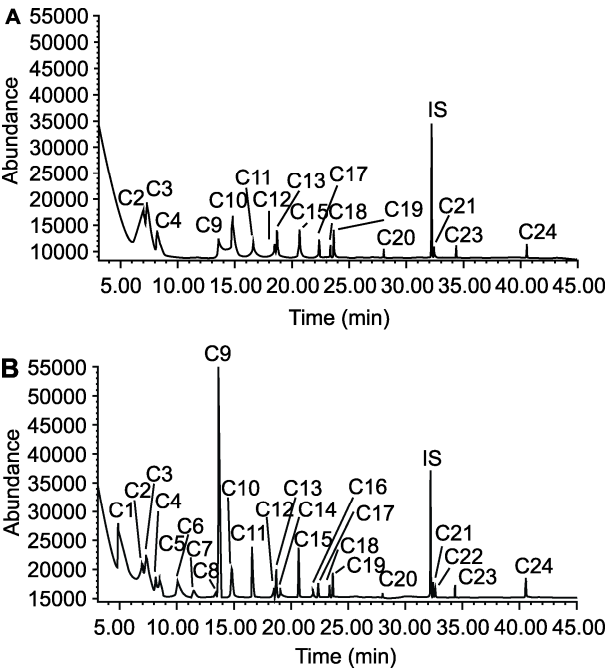


图1 健康茶梢(A)和蚜害茶梢(B)挥发物组分的GC-MS总离子流
C1–C24同表1。IS: 内标。

Figure 1 The total ion chromatograms of the volatile organic compounds from healthy (A) and infested (B) tea shoots by *Toxoptera aurantii*
C1–C24 are the same as Table 1. IS: Internal standard.

健康茶梢和蚜害茶梢挥发物的共有组分为16种, 蚜害茶梢特有组分为3-己烯醛(3-hexenal)、2-庚酮(2-heptanone)、 α -蒎烯(α -pinene)、苯甲醛(benzaldehyde)、癸烷(decane)、反-2-甲基-2-丁烯酸环丙酯(E-2-butenoic acid, 2-(methylenecyclopropyl) prop-2-ylester)、反-2-壬烯醇(E-2-nonen-1-ol)和长叶烯-(V4) (longifolene-(V4)) (表1)。挥发物可分为5类主要成分, 即绿叶挥发物(green leaf volatiles, GLVs)、芳香族化合物(aromatics)、萜烯类化合物(terpenes)、烷烃类化合物(alkanes)和其它化合物(other volatiles) (表2)。健康茶梢挥发物中未见3-己烯醛, 而蚜害茶梢中3-己烯醛表现明显的释放(表1)。在虫害茶梢挥发物中芳香族化合物相对含量显著上调, 而萜烯类物质的含量在蚜害茶梢中也明显升高。烷烃类物质和其它挥发物相对含量亦明显增加(图2A)。从各种挥发物的平均相对含量占比来看, 蚜害组中绿叶挥发物、萜烯类和其它挥发物占比增多, 烷烃类物质占比变化不明显, 而芳香类物质占比明显减少(图2B)。通过检验

表2 茶树挥发物分类

Table 2 Classification of volatile organic compounds from tea plants

Volatile classification	Volatile compounds
GLVs	3-hexenal and 2-ethyl-1-hexanol
Aromatics	Ethylbenzene, benzene, 1,3-dimethyl-, p-xylene, benzaldehyde, acetophenone and naphthalene
Terpenes	α -pinene, E-5,9-undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-, E-2-butenoic acid, 2-(methylenecyclopropyl)prop-2-ylester and longifolene-(V4)
Alkanes	Decane, undecane, dodecane, tridecane, tetradecane and hexadecane
Other	2-heptanone, octanal, nonanal, camphor, E-2-nonen-1-ol and decanal

GLVs: 绿叶挥发物 GLVs: Green leaf volatiles

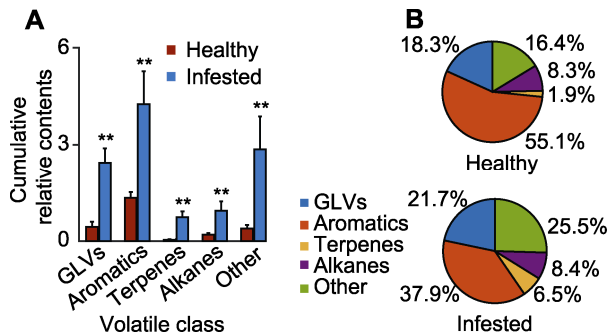


图2 健康茶梢和蚜害茶梢挥发物种类和比例
(A) 健康茶梢和蚜害茶梢5种挥发物的相对含量 (** $P<0.01$);
(B) 健康茶梢和蚜害茶梢5种挥发物占比。GLVs同表2。

Figure 2 The categories and proportions of volatile organic compounds in healthy and infested tea shoots
(A) The relative contents of five kinds of volatiles in healthy and infested tea shoots (** $P<0.01$); (B) The proportion of five volatile compounds in healthy and infested tea shoots. GLVs is the same as given in Table 2.

表明, 不同挥发物组分在健康茶梢和蚜害茶梢挥发物中的含量具有差异性, 共有16种挥发物含量差异显著($*P<0.05$, ** $P<0.01$) (表1)。选择这16种含量有差异的茶梢挥发物并作多元统计分析(Park et al., 2020)。16种挥发物的序号标记见表1。

2.2 茶梢挥发物聚类特征

t 分布随机邻域嵌入(t -SNE)是一种重要的降维可视化方法(van der Maaten and Hinton, 2008), 通常用于将高维数据降至二维或三维。基于 t -SNE方法将10个样本(1–5为健康组, 6–10为蚜害组)数据进行二维可

可视化,结果显示健康组和蚜害组具有很好的聚类特征(图3A)。运用聚类分析方法对10个样本进行多元分析,结果显示,挥发物数据较好地依照健康组和蚜害组分成分2类(图3B)。从聚类特征来看,5组健康茶梢挥发物成分在空间分布上距离较为接近,而蚜害组挥发物组分在空间分布上较为分散(图3)。上述结果表明,健康茶梢和蚜害茶梢挥发物成分组成具有较为明显的空间聚类特征。

2.3 蚜害诱导茶梢挥发物组成变化的评价

主成分分析(PCA)是一种重要的多元分析方法,主要用于数据降维。主成分分析通过一种无监督的方式获取多个主成分,使得主成分构成的坐标轴具有最大样

本方差(Jolliffe and Cadima, 2016)。主成分分析结果显示,第1主成分(pc1)可较好地地区分健康组和蚜害组(图4A)。第1主成分可解释87.76%总惯量,即其贡献率达87.76%,而第2主成分(pc2)贡献率仅为5.95%。健康茶梢(红色点,重叠部分未予显示)和蚜害茶梢(蓝色点)挥发物依第1主成分形成了较好的样品分类形态(图4A)。前2个主成分载荷图显示,第1主成分对中心化原始变量载荷除部分接近0以外,其余均为正值,故第1主成分更适合作为评价指标;第2主成分载荷

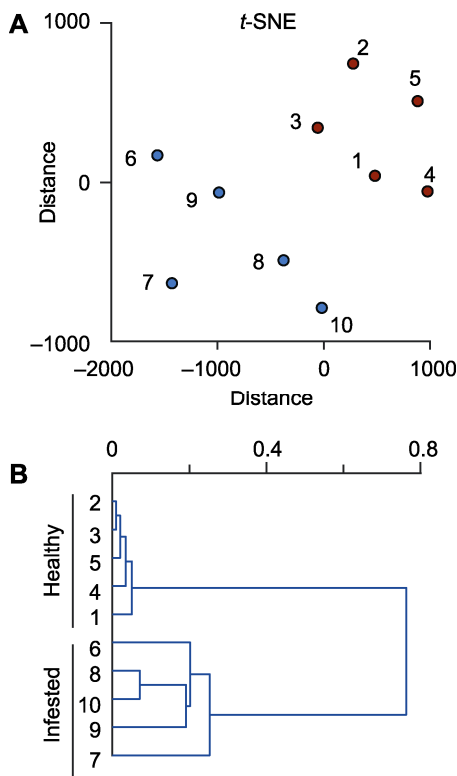


图3 茶梢挥发物组成二维嵌入和聚类分析 (A) 5组健康茶梢(编号1–5)和5组蚜害茶梢(编号6–10)挥发物组成(VOCs)的t分布随机邻域嵌入(t-SNE); (B) 10组茶梢挥发物组分聚类分析

Figure 3 Two-dimensional embedding and clustering for volatiles from tea shoots (A) The t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) for volatile organic compounds (VOCs) from 5 healthy (No. 1–5) and 5 infested (No. 6–10) groups; (B) Clustering analysis for VOCs from 10 groups above

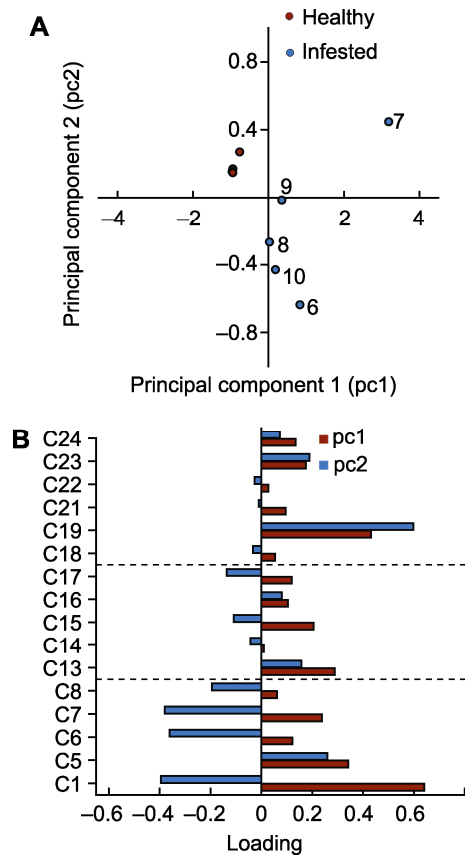


图4 茶树挥发物组成(VOCs)主成分分析 (A) 5组健康茶梢(红色点,因部分重叠故编号未予显示)和5组蚜害茶梢(编号6–10,蓝色点)挥发物成分的主成分分析得分图; (B) 第1主成分(红色)和第2主成分(蓝色)载荷图(挥发物编号同表1)

Figure 4 Principal component analysis for volatile organic compounds (VOCs) of tea plants (A) The principal component scores for VOCs from 5 healthy (red points, owing to the partial overlap among points in healthy group, the number was not marked) and 5 infested (No. 6–10, blue points) groups; (B) Loading plot for the first (red) and second (blue) principal components (the number of volatiles is the same as Table 1)

或正或负,表明其不宜作为评估指数(图4B)。主成分分析结果进一步表明,健康组和蚜害组挥发物组分具有明显的类别特征。

2.4 茶梢挥发物组成偏最小二乘法判别模型

值得注意的是,将主成分分析按贡献率由大到小排序,最后3个特征值分别为 1.97×10^{-4} 、 6.09×10^{-5} 和 2.42×10^{-5} ,都接近于0,表明中心化后各变量(挥发物)间存在近似共线性关系。对于多变量、变量间存在多重相关且样本量较少的情形,更适合采用偏最小二乘法进行分析(Lee et al., 2018)。偏最小二乘法分

析集中了多种多元分析手段(如主成分分析、典型相关分析和线性回归),可以提供更为丰富准确的信息。利用PLS-DA对挥发物成分进行分析,统计结果显示前2个隐变量(latent variable, LV)可分别解释90.3%的自变量变异(R^2X)和87.5%的因变量变异(R^2Y),其中第1个隐变量LV1对自变量的变异可解释比例接近80.0% (80.2%, 图5A)。从各样本在LV1和LV2的得分情形来看,健康组茶梢挥发物分布于第3象限(LV1, LV2<0, 因哑变量(dummy variable)取值为 $y=(0,0,0,0,0,1,1,1,1,1)^T$,其中1表示蚜害组),而蚜害组茶梢挥发物5个样本分布于其它象限;因LV1对自变量变

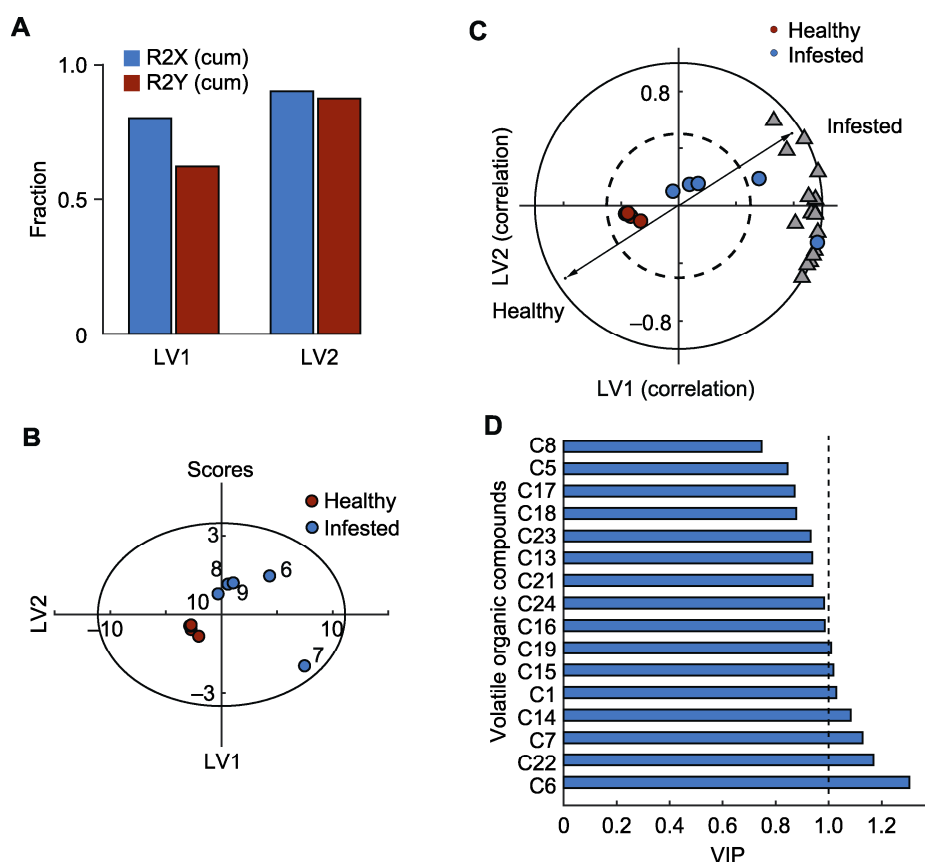


图5 茶树挥发物组分的偏最小二乘法判别分析

(A) 前2个隐变量(LVs)累计解释总变异百分比(红色为自变量, 蓝色为因变量); (B) 健康组和蚜害组在前2个隐变量的得分图(椭圆为基于Hotelling T^2 计算出的95%置信域); (C) 偏最小二乘法判别分析双标图(实线圆半径为1.0, 虚线圆半径为0.5); (D) 各挥发物(编号同表1)的变量重要性投影(VIP)图(虚线为取值1.0引导线)

Figure 5 The partial least square discriminant analysis for volatile contents of tea plants

(A) The fraction of cumulative explained variations for the first two latent variables (LVs) (red: predictor, blue: response); (B) Scores for the healthy and infested groups with respect to the LV1 and LV2 (the ellipse denotes the 95% confidence interval based on Hotelling T^2); (C) The biplot in partial least squares discrimination analysis (the radius for solid and dashed circle is 1.0 and 0.5, respectively); (D) Variable importance for the projection (VIPs) for each volatile (the number is the same as Table 1) organic compound (the dashed line is a guideline for 1.0)

异解释能力较强,故4组(样本6–9组)蚜害组挥发物在LV1上具有正得分,而样本10的LV1负得分绝对值也较低(图5B)。虽然蚜害组样本点7和其它样本点具有较大偏离,但10个样本点均位于95%置信区间(Hotelling T^2 椭圆)内,表明不存在离群值(outlier)(图5B)。

进一步绘制载荷和得分双标图(biplot),可用于观察样本点之间的相似性和差异性特征。如图5C所示, LV1与所有差异显著的变量均呈正相关;健康组茶梢挥发物与LV1、LV2取值均呈负相关,而蚜害组茶梢挥发物不具备此特征。依照两隐变量(LV1, LV2)模型计算变量重要性投影(variable importance for the projection, VIP), VIP值大于1表示此变量具有重要判别特征。结果显示, α -蒎烯(1.304 62)、长叶烯-(V4) (1.168 62)、苯甲醛(1.127 76)、反-2-甲基-2-丁烯酸环丙烯酯(1.082 84)、3-己烯醛(1.029 08)、蒎酮(1.018 17)和癸醛(1.009 45)对此判别模型具有较强的解释能力(图5D)。

2.5 讨论

2.5.1 茶树-茶蚜-天敌三级营养关系及茶蚜防控策略

一般而言, HIPVs在茶树-害虫-天敌三级营养关系中起关键作用(Turlings and Erb, 2018)。在遭受害虫为害后, 茶树可触发防御机制合成并释放HIPVs, 通过HIPVs介导植物间信息传递(Zeng et al., 2017; Wang et al., 2019); HIPVs亦可趋避害虫或吸引害虫天敌, 实现直接或间接防御(Schröder et al., 2005; Mu et al., 2012; Jing et al., 2021)。损伤诱导防御机制一般发生于为害后的特定时间内, 包含损伤发生、产生信号、信号感知和信号转导, 最终激活防御反应(Bustos-Segura and Foley, 2018)。

茶蚜在中国茶区广泛分布, 在每年的4–5月和9–10月形成2个虫口高峰(韩宝瑜和周成松, 2004)。以往茶蚜研究多集中于春季和夏季虫口期(Han et al., 2012; Bian et al., 2014), 而对秋季虫口高峰期茶树挥发物特征却鲜有报道。本研究对秋季虫口期茶蚜为害茶梢挥发物释放特征进行分析, 对秋季虫害防控和茶园冬季封园管理具有一定的指导作用, 有利于保证来年新茶品质。本研究茶树样品取自皖西南地区, 而以往对于皖西南产区茶树品种虫害诱导的挥发物特征分析鲜见报道。

从HIPVs的种类可以推测, 茶蚜为害诱导的茶梢挥发物较之健康茶梢挥发物种类更为丰富, 且各类挥发物的相对含量总体上明显升高。从占比来看, 健康茶梢和蚜害茶梢中芳香族化合物和绿叶挥发物的相对含量占比较高, 萜烯类物质占比较低。值得注意的是, 一般情况下, 绿叶挥发物在虫害为害后数秒内即可得到释放, 这与植物体内存在丰富的绿叶挥发物代谢酶类, 且其可迅速与底物反应有关(Matsui, 2006)。相较而言, 虫害诱导的萜烯类化合物合成则需要数小时甚至几日(Pare and Tumlinson, 1999; 董燕梅等, 2020; Liu et al., 2020)。秋冬季茶梢挥发物中芳香族化合物比例较春季茶梢挥发物明显升高, 萜烯类化合物相对含量占比则降低(穆丹, 2011), 表明在秋冬季和春季茶树利用其挥发物进行防御的策略具有一定差异。

通过偏最小二乘法分析, 我们发现了7种主要挥发物的活性成分, 即 α -蒎烯、长叶烯-(V4)、苯甲醛、反-2-甲基-2-丁烯酸环丙烯酯、3-己烯醛、蒎酮和癸醛对茶蚜为害植株和健康植株起到主要判别作用。萜烯类和芳香族挥发物对茶树害虫的捕食性和寄生性天敌具有明显的引诱效果(焦龙等, 2018)。在国槐(*Sophora japonica*)等10种植物的挥发物中, α -蒎烯对蚜虫和蚜虫的天敌异色瓢虫(*Harmonia axyridis*)具有明显的引诱效应(薛皎亮等, 2008), 且在棉花(*Gossypium hirsutum*)和小麦(*Triticum aestivum*)等植物中 α -蒎烯对天敌的引诱作用也同样显著(Xiu et al., 2019)。芳香族化合物苯甲醛在秋季释放增多(蔡晓明, 2016), 可作为互利索引诱害虫天敌(Simpson et al., 2011)。Han和Chen (2002a, 2002b)对茶树-茶蚜-蚜茧蜂(*Aphidius* sp.)、茶树-茶蚜-七星瓢虫(*Coccinella septempunctata*)和茶树-茶蚜-大草蛉(*Chrysopa sinica*)等三级营养关系进行了系统研究。反-2-甲基-2-丁烯酸环丙烯酯的类似物, 如(Z)-3-己烯丁酸酯、(Z)-3-己烯乙酸酯、丁酸-顺(反)-3-己烯酯、乙酸-顺(反)-3-己烯酯和顺(反)-3-己烯基丁酸酯可作为互利索引诱大草蛉、茶尺蠖绒茧蜂(*Apanteles* sp.)和微小裂骨缨小蜂(*Schizophragma parvula*) (崔林等, 2015; 韩善捷等, 2016; 范培珍等, 2020)。长叶烯是许多红茶品种的特征香气成分, 具有一定的抗氧化和抗微生物作用(Abdullah et al., 2014; Yu et al., 2016)。用布洛芬(ibuprofen)抑制茉莉素可显著降低虫害茶树中长叶烯的释放, 表明长叶烯可能在虫害防

御中发挥关键作用(付建玉, 2017)。有研究显示, 蒎酮是从樟树精油中提取的对害虫趋避作用的主要活性成分, 对蚜虫具有触杀作用(Nerio et al., 2010)。此外, 蒎酮也可以直接趋避茶树害虫(Zhang et al., 2013, 2015)。水杨酸甲酯、反-2-己烯醛和苯甲醛可以趋避茶蚜(韩宝瑜和周成松, 2004)。因秋季茶树挥发物特征与春季具有显著差异, 本研究中检出的绿叶挥发物3-己烯醛是绿叶挥发物反-2-戊烯醛和反-2-己烯醛的类似物, 因此, 秋季受茶蚜为害的茶树挥发物可通过合成功能类似物实现虫害防御。值得注意的是, 本研究中未检出之前报道的茶蚜为害诱导挥发物中的主要活性成分 α -法呢烯(α -farnesene) (Guo and Wang, 2019), 这可能与茶树品种和茶树分布地域特征有关(如土壤条件和微域气候差异)(苗爱清等, 2010; 王国昌, 2010; Ninkovic et al., 2021)。本研究中使用的是皖西南名茶中的舒茶早品种, 而前述研究中使用的是杭州地区龙井43或龙井长叶品种。

2.5.2 蚜害茶梢挥发物的特征及判别

本研究表明, 蚜害茶梢挥发物种类和相对含量较之健康茶梢明显增加, 因此, 健康茶梢和蚜害茶梢的挥发物释放具有较为明显的空间分类特征。无论是聚类分析、主成分分析(无监督方式, unsupervised)还是偏最小二乘法判别分析(有监督方式, supervised), 均可有效区分蚜害和健康茶梢挥发物。值得注意的是, 一方面, 偏最小二乘法判别分析结果显示, 健康茶梢挥发物集中分布于LV1-LV2坐标中的第3象限, 而蚜害茶梢挥发物在其它3个象限均有分布, 因此, 茶树对于茶蚜为害的响应可能是多向的。另一方面, 秋季茶梢挥发物中包含互利素反-2-戊烯醛和反-2-己烯醛的类似物3-己烯醛, 也包含许多其它互利素的类似物反-2-甲基-2-丁烯酸环丙烯酯, 而3-己烯醛和反-2-甲基-2-丁烯酸环丙烯酯也是判别模型中解释能力较强的变量(VIP>1)。生物体是一个具有鲁棒性(robustness)的系统, 多样性(diversity)是实现鲁棒性的一种重要方式(Kitano, 2004)。生物体通过多种方式实现特定生物功能, 可为维持生物稳态提供一种故障保险机制(fail-safe mechanism)。茶树受茶蚜为害诱导释放功能类似物(3-己烯醛和反-2-甲基-2-丁烯酸环丙烯酯)以及虫害诱导挥发物的反应多向性从多个角度体现了鲁棒性中多样性的特点。因此, 蚜害茶梢挥发物的

组分及其相对含量特征亦是生命系统鲁棒性的一种体现。

本研究尝试对皖西南地区茶蚜为害舒茶早品种诱导的挥发物释放特征进行研究。通过多元统计分析得出挥发物主要评价指标, 以实现健康和茶蚜为害茶树进行判别。受样本量限制, 本研究建立了一个初步的判别模型, 后期如扩大样本量有可能获得更为准确的模型。挥发物属于微量物质, 在茶蚜为害后, 不同类别挥发物的释放时程会存在差异。因此, 富集时间和方法至关重要(可能对结果造成一定影响)。基于多时间点的动态测定可获取新的信息。值得注意的是, 虫害诱导的挥发物亦可吸引茶树害虫同类而非天敌(Sun et al., 2010)。本研究中蚜害诱导的HIPVs释放图式是否具有类似特征需进一步探索。此模型鉴别出的主要评价指标是否可作为互利素吸引害虫天敌也有待通过行为生测法进行验证。

参考文献

- 蔡晓明 (2016). 茶小绿叶蝉与植物间化学通讯物质的鉴定与田间功能验证. 博士论文. 北京: 中国农业科学院. pp. 48–50.
- 崔林, 张新亭, 周宁宁, 叶火香, 余继忠, 祝愿, 韩宝瑜 (2015). 茶互利素和蚜性信息素及其组合调控大草蛉行为的效应. 生态学报 35, 1537–1546.
- 董燕梅, 张文颖, 凌正一, 李靖锐, 白红彤, 李慧, 石雷 (2020). 转录因子调控植物萜类化合物生物合成研究进展. 植物学报 55, 340–350.
- 范培珍, 韩善捷, 韩宝瑜 (2020). 灰茶尺蠖为害诱导茶树释放的互利素的鉴定. 中国生物防治学报 36, 65–71.
- 付建玉 (2017). 茶树倍半萜类物质代谢及其对虫害胁迫响应. 博士论文. 北京: 中国农业科学院. pp. 17–20.
- 韩宝瑜, 周成松 (2004). 茶梢和茶花信息物引诱有翅茶蚜效应的研究. 茶叶科学 24, 249–254.
- 韩善捷, 潘铖, 韩宝瑜 (2016). 假眼小绿叶蝉为害致茶梢挥发物变化及其引诱微小裂骨缨小蜂效应. 中国生物防治学报 32, 142–148.
- 焦龙, 蔡晓明, 边磊, 罗宗秀, 李兆群, 辛肇军, 陈宗懋 (2018). 茉莉酸类化合物: 从植物的诱导抗虫防御反应到生长-防御权衡. 应用生态学报 29, 3876–3890.
- 林郑和, 钟秋生, 陈常颂, 陈志辉, 游小妹 (2015). 不同香型茶树鲜叶挥发性组分与 β -葡萄糖苷酶的相关性分析. 植物学报 50, 713–720.

- 苗爱清, 吕海鹏, 孙世利, 王力, 庞式, 赖兆祥, 曾琼, 林智 (2010). 乌龙茶香气的HS-SPME-GC-MS/GC-O研究. 茶叶科学 30, 583–587.
- 穆丹 (2011). 茶树挥发性信息素调控假眼小绿叶蝉及叶蝉三棒缨小蜂行为的功效. 博士论文. 北京: 中国农业科学院. pp. 44.
- 孙晓玲, 董文霞, 蔡晓明, 桂连友, 陈宗懋 (2016). 外用不同浓度茉莉酸甲酯诱导的茶树挥发物的种类和时序变化. 应用昆虫学报 53, 499–506.
- 王国昌 (2010). 三种害虫诱导茶树挥发物的生态功能. 博士论文. 北京: 中国农业科学院. pp. 20–22.
- 薛皎亮, 贺璐, 谢映平 (2008). 植物挥发物对天敌昆虫异色瓢虫的引诱效应. 应用与环境生物学报 14, 494–498.
- 左照江, 张汝民, 高岩 (2009). 植物间挥发物信号的研究进展. 植物学报 44, 245–252.
- Aartsma Y, Leroy B, van der Werf W, Dicke M, Poelman EH, Bianchi FJJA (2019). Intraspecific variation in herbivore-induced plant volatiles influences the spatial range of plant-parasitoid interactions. *Oikos* 128, 77–86.
- Abdullah ZS, Ficken KJ, Greenfield BPJ, Butt TM (2014). Innate responses to putative ancestral hosts: is the attraction of western flower thrips to pine pollen a result of relict olfactory receptors? *J Chem Ecol* 40, 534–540.
- Baldwin IT, Kessler A, Halitschke R (2002). Volatile signaling in plant-plant-herbivore interactions: what is real? *Curr Opin Plant Biol* 5, 351–354.
- Bian L, Sun XL, Cai XM, Chen ZM (2014). Slow release of plant volatiles using sol-gel dispensers. *J Econ Entomol* 107, 2023–2029.
- Bustos-Segura C, Foley WJ (2018). Foliar terpene chemotypes and herbivory determine variation in plant volatile emissions. *J Chem Ecol* 44, 51–61.
- D'Alessandro M, Brunner V, von Mérey G, Turlings TCJ (2009). Strong attraction of the parasitoid *Cotesia marginiventris* towards minor volatile compounds of maize. *J Chem Ecol* 35, 999–1008.
- De Moraes CM, Lewis WJ, Paré PW, Alborn HT, Tumlinson JH (1998). Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. *Nature* 393, 570–573.
- Gish M, De Moraes CM, Mescher MC (2015). Herbivore-induced plant volatiles in natural and agricultural ecosystems: open questions and future prospects. *Curr Opin Insect Sci* 9, 1–6.
- Guo H, Wang CZ (2019). The ethological significance and olfactory detection of herbivore-induced plant volatiles in interactions of plants, herbivorous insects, and parasitoids. *Arthropod-Plant Interactions* 13, 161–179.
- Han BY, Chen ZM (2002a). Composition of the volatiles from intact and mechanically pierced tea aphid-tea shoot complexes and their attraction to natural enemies of the tea aphid. *J Agric Food Chem* 50, 2571–2575.
- Han BY, Chen ZM (2002b). Composition of the volatiles from intact and tea aphid-damaged tea shoots and their allurement to several natural enemies of the tea aphid. *J Appl Entomol* 126, 497–500.
- Han BY, Chen ZM (2002c). Behavioral and electrophysiological responses of natural enemies to synomones from tea shoots and kairomones from tea aphids, *Toxoptera aurantii*. *J Chem Ecol* 28, 2203–2219.
- Han BY, Han BH (2007). EAG and behavioral responses of the wingless tea aphid *Toxoptera aurantii* (Homoptera: Aphididae) to tea plant volatiles. *Acta Ecol Sin* 27, 4485–4490.
- Han BY, Zhang QH, Byers JA (2012). Attraction of the tea aphid, *Toxoptera aurantii*, to combinations of volatiles and colors related to tea plants. *Entomol Exp Appl* 144, 258–269.
- Heil M, Land WG (2014). Danger signals-damaged-self recognition across the tree of life. *Front Plant Sci* 5, 578.
- Heil M, Silva Bueno JC (2007). Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 5467–5472.
- Huffaker A, Pearce G, Veyrat N, Erb M, Turlings TCJ, Sartor R, Shen ZX, Briggs SP, Vaughan MM, Alborn HT, Teal PEA, Schmelz EA (2013). Plant elicitor peptides are conserved signals regulating direct and indirect anti-herbivore defense. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, 5707–5712.
- Jing TT, Du WK, Gao T, Wu Y, Zhang N, Zhao MY, Jin JY, Wang JM, Schwab W, Wan XC, Song CK (2021). Herbivore-induced DMNT catalyzed by CYP82D47 plays an important role in the induction of JA-dependent herbivore resistance of neighboring tea plants. *Plant Cell Environ* 44, 1178–1191.
- Jolliffe IT, Cadima J (2016). Principal component analysis: a review and recent developments. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* 374, 20150202.
- Joo Y, Schuman MC, Goldberg JK, Kim SG, Yon F, Brütting C, Baldwin IT (2018). Herbivore-induced volatile blends with both “fast” and “slow” components provide robust indirect defence in nature. *Funct Ecol* 32, 136–149.

- Kitano H** (2004). Biological robustness. *Nat Rev Genet* **5**, 826–837.
- Kost C, Heil M** (2006). Herbivore-induced plant volatiles induce an indirect defence in neighbouring plants. *J Ecol* **94**, 619–628.
- Lee LC, Liong CY, Jemain AA** (2018). Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) for classification of high-dimensional (HD) data: a review of contemporary practice strategies and knowledge gaps. *Analyst* **143**, 3526–3539.
- Liu GH, Yang M, Fu JY** (2020). Identification and characterization of two sesquiterpene synthase genes involved in volatile-mediated defense in tea plant (*Camellia sinensis*). *Plant Physiol Biochem* **155**, 650–657.
- Matsui K** (2006). Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Curr Opin Plant Biol* **9**, 274–280.
- Mu D, Cui L, Ge J, Wang MX, Liu LF, Yu XP, Zhang QH, Han BY** (2012). Behavioral responses for evaluating the attractiveness of specific tea shoot volatiles to the tea green leafhopper, *Empoasca vitis*. *Insect Sci* **19**, 229–238.
- Nerio LS, Olivero-Verbel J, Stashenko E** (2010). Repellent activity of essential oils: a review. *Bioresour Technol* **101**, 372–378.
- Ninkovic V, Markovic D, Rensing M** (2021). Plant volatiles as cues and signals in plant communication. *Plant Cell Environ* **44**, 1030–1043.
- Pare PW, Tumlinson JH** (1999). Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiol* **121**, 325–332.
- Park J, Thomasson JA, Gorman Z, Brewer MJ, Rooney WL, Kolomiets MV** (2020). Multivariate analysis of sorghum volatiles for the fast screening of sugarcane aphid infestation. *J Asia-Pacific Entomol* **23**, 901–908.
- Sanou A, Traoré F, Ba MN, Dabiré-Binso CL, Pittendrigh BR, Sanon A** (2019). Effects of volatiles from *Clavigralla tomentosicollis* Stål. (Hemiptera: Coreidae) adults on the host location behavior of the egg parasitoid *Gryon fulviventris* (crawford) (Hymenoptera: scelionidae). *Int J Insect Sci* **11**, 1179543318825250.
- Schmelz EA** (2015). Impacts of insect oral secretions on defoliation-induced plant defense. *Curr Opin Insect Sci* **9**, 7–15.
- Schröder R, Forstreuter M, Hilker M** (2005). A plant notices insect egg deposition and changes its rate of photosynthesis. *Plant Physiol* **138**, 470–477.
- Shiojiri K, Ozawa R, Takabayashi J** (2006). Plant volatiles, rather than light, determine the nocturnal behavior of a caterpillar. *PLoS Biol* **4**, e164.
- Simpson M, Gurr GM, Simmons AT, Wratten SD, James DG, Leeson G, Nicol HI** (2011). Insect attraction to synthetic herbivore-induced plant volatile-treated field crops. *Agric Forest Entomol* **13**, 45–57.
- Sobhy IS, Erb M, Turlings TCJ** (2015). Plant strengtheners enhance parasitoid attraction to herbivore-damaged cotton via qualitative and quantitative changes in induced volatiles. *Pest Manag Sci* **71**, 686–693.
- Sun XL, Wang GC, Cai XM, Jin S, Gao Y, Chen ZM** (2010). The tea weevil, *Myloecerus aurolinatus*, is attracted to volatiles induced by conspecifics. *J Chem Ecol* **36**, 388–395.
- Takabayashi J, Takahashi S, Dicke M, Posthumus MA** (1995). Developmental stage of herbivore *Pseudaletia separata* affects production of herbivore-induced synomone by corn plants. *J Chem Ecol* **21**, 273–287.
- Turlings TCJ, Erb M** (2018). Tritrophic interactions mediated by herbivore-induced plant volatiles: mechanisms, ecological relevance, and application potential. *Annu Rev Entomol* **63**, 433–452.
- Turlings TCJ, Tumlinson JH, Lewis WJ** (1990). Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science* **250**, 1251–1253.
- van der Maaten L, Hinton G** (2008). Visualizing data using t-SNE. *J Mach Learn Res* **9**, 2579–2605.
- Wang XW, Zeng LT, Liao YY, Li JL, Tang JC, Yang ZY** (2019). Formation of α -farnesene in tea (*Camellia sinensis*) leaves induced by herbivore-derived wounding and its effect on neighboring tea plants. *Int J Mol Sci* **20**, 4151.
- Xiu CL, Zhang W, Xu B, Wyckhuys KAG, Cai XM, Su HH, Lu YH** (2019). Volatiles from aphid-infested plants attract adults of the multicolored Asian lady beetle *Harmonia axyridis*. *Biol Control* **129**, 1–11.
- Ye J, Zhang LL, Zhang X, Wu XJ, Fang RX** (2021). Plant defense networks against insect-borne pathogens. *Trends Plant Sci* **26**, 272–287.
- Ye M, Glauser G, Lou YG, Erb M, Hu LF** (2019). Molecular dissection of early defense signaling underlying volatile-mediated defense regulation and herbivore resistance in rice. *Plant Cell* **31**, 687–698.
- Yu B, Zhang D, Yan XW, Wang JW, Yao L, Tan LH, Zhao SP, Li N, Cao WG** (2016). Comparative evaluation of the chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the volatile oils of hawk tea from six botanical origins. *Chem Biodivers* **13**, 1573–1583.
- Zeng LT, Liao YY, Li JL, Zhou Y, Tang JC, Dong F, Yang**

- ZY (2017). α -farnesene and ocimene induce metabolite changes by volatile signaling in neighboring tea (*Camellia sinensis*) plants. *Plant Sci* **264**, 29–36.
- Zhang ZQ, Bian L, Sun XL, Luo ZX, Xin ZJ, Luo FJ, Chen ZM (2015). Electrophysiological and behavioural responses of the tea geometrid *Ectropis obliqua* (Lepidoptera: Geometridae) to volatiles from a non-host plant, rosemary, *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae). *Pest Manag Sci* **71**, 96–104.
- Zhang ZQ, Sun XL, Xin ZJ, Luo ZX, Gao Y, Bian L, Chen ZM (2013). Identification and field evaluation of non-host volatiles disturbing host location by the tea geometrid, *Ectropis obliqua*. *J Chem Ecol* **39**, 1284–1296.
- Zhao MY, Wang L, Wang JM, Jin JY, Zhang N, Lei L, Gao T, Jing TT, Zhang SR, Wu Y, Wu B, Hu YQ, Wan XC, Schwab W, Song CK (2020). Induction of priming by cold stress via inducible volatile cues in neighboring tea plants. *J Integr Plant Biol* **62**, 1461–1468.

Clustering Analysis of Volatile Components from the Tea Plants Infested by Tea Aphid (*Toxoptera aurantii*)

Tingzhe Sun^{1†}, Zehua Qi^{1†}, Kexin Liang¹, Qin Li^{1,2}, Yuchun Rao^{2*}, Dan Mu^{1*}

¹School of Life Sciences, Anqing Normal University, Anqing 246133, China

²School of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China

Abstract Shuchazao tea (*Camellia sinensis* cv. 'shuchazao') is a newly cultivated tea species in southwest Anhui, China. To investigate the volatile release profiles of tea aphid (*Toxoptera aurantii*) infested tea shoots, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis was used to compare the volatile compositions and relative contents in healthy and infested tea shoots. 16 volatile organic compounds (VOCs) were detected in healthy tea shoots with fewer relative contents, whereas more volatiles (24 VOCs) were released with increasing relative contents in tea plants induced by tea aphid feeding. Unsupervised clustering analysis based on the significantly different volatiles indicated that the volatile profiles in healthy and tea aphid infested tea shoots apparently showed clustering characteristics. A model was created by supervised partial least square discrimination analysis (PLS-DA) for volatiles with statistical significance. By experimental verification, the model could clearly discriminate healthy tea shoots from aphid infested ones ($R^2X=0.903$, $R^2Y=0.875$). By calculating the variable importance for the projection (VIP), seven important volatiles (α -pinene, longifolene-(V4), benaldehyde, E-5,9-undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-, 3-hexenal, camphor and decanal) were identified which collectively contribute to discrimination between healthy and infested tea shoots. The current work has preliminarily demonstrated the changing patterns in tea plant volatiles after tea aphid infestation to provide novel theoretical guidance for tea aphid management.

Key words tea plant volatiles, GC-MS, PLS-DA, tea aphid, clustering analysis

Sun TZ, Qi ZH, Liang KX, Li Q, Rao YC, Mu D (2021). Clustering analysis of volatile components from the tea plants infested by tea aphid (*Toxoptera aurantii*). *Chin Bull Bot* **56**, 422–432.

† These authors contributed equally to this paper

* Authors for correspondence. E-mail: ryc@zjnu.cn; mudansmile@126.com

(责任编辑: 白羽红)