

DOI: 10.20103/j.stxb.202504070803

黄惠婷, 王宇祥, 任朵朵, 杨晨, 何旭江, 刘一博, 左建房, 赵竑绯, 钟泰林. 3 种国兰挥发性物质对蜜蜂吸引效应的成分鉴定及互作机制. 生态学报, 2026, 46(4): 2036-2046.

Huang H T, Wang Y X, Ren D D, Yang C, He X J, Liu Y B, Zuo J F, Zhao H F, Zhong T L. Chemical identification and functional mechanisms of floral volatiles from three traditional Chinese orchids in bee attraction. Acta Ecologica Sinica, 2026, 46(4): 2036-2046.

3 种国兰挥发性物质对蜜蜂吸引效应的成分鉴定及互作机制

黄惠婷^{1,2}, 王宇祥⁴, 任朵朵⁴, 杨晨⁴, 何旭江⁴, 刘一博³, 左建房¹, 赵竑绯², 钟泰林^{2,*}

1 浙江农林大学林业与生物技术学院, 杭州 311300

2 浙江树人学院城建学院, 绍兴 312028

3 江西省养蜂研究所, 南昌 330051

4 江西农业大学动物科学技术学院, 南昌 330045

摘要: 兰科植物 (Orchidaceae) 是被子植物中最大的科之一, 约三分之一的物种通过欺骗机制而非传统互惠方式吸引授粉昆虫。兰花的挥发性物质高度多样, 而传粉者会对特定花香气味表现出偏好。这些挥发性物质不仅构成了兰花与传粉者之间独特的化学通讯系统, 也可能与其协同进化密切相关。通过对蕙兰、墨兰和风兰等 3 种国兰挥发性物质进行全二维高端质谱质谱测序和种间差异分析, 结果发现 3 种国兰 (蕙兰、墨兰和风兰) 分别检测到 3177、2838、3098 种挥发性物质。其中, 主要挥发性物质种类为烷烃类、醇类、酯类和酮类。感官风味特征分析结果表明, 3 种兰花主要为甜味、水果味和绿色植物味。3 种国兰的共同香味物质为 1241 种, 其中 2-甲基丁醛为 3 种兰花的香味成分的主要贡献者, 其次为乙酸丁酯、2-戊基呋喃、壬烯醛、丙烯酸丁酯、 α -蒎烯、十一烷酮等。此外, 3 种兰花的差异物质分别为 240 种 (蕙兰/风兰)、220 种 (蕙兰/墨兰) 和 171 种 (墨兰/风兰)。筛选了 7 种候选挥发物质, 并通过昆虫触角电位反应 (EAG) 和行为趋向选择测试兰花花朵挥发性成分对中华蜜蜂吸引效应。结果表明, 7 种兰花主要挥发物质均能引起中华蜜蜂的触角电位反应, 其中苯甲醛和 2-甲基丁醛反应值最强, 前者在低浓度下效果最佳, 后者在高浓度下反应最显著。行为实验表明, 除 α -蒎烯在所有浓度下吸引效应显著高于苯甲醛 ($P < 0.05$) 外, 其余物质在不同浓度下对蜜蜂吸引力差异不显著 ($P > 0.05$)。综上, 3 种兰花的挥发性成分表现出明显的多样性, 部分关键成分可诱发蜜蜂电生理反应, 初步揭示了兰科植物与传粉者间的化学互作机制, 并为探讨植物-传粉者协同进化提供科学基础。

关键词: 兰花; 挥发性成分; 中华蜜蜂; 触角电位反应; 吸引效应

Chemical identification and functional mechanisms of floral volatiles from three traditional Chinese orchids in bee attraction

HUANG Huiting^{1,2}, WANG Yuxiang⁴, REN Duoduo⁴, YANG Chen⁴, HE Xujiang⁴, LIU Yibo³, ZUO Jianfang¹, ZHAO Hongfei², ZHONG Tailin^{2,*}

1 College of forestry and biotechnology, Zhejiang A & F University, Hangzhou 311300, China

2 College of Urban Construction, Zhejiang Shuren University, Shaoxing 312028, China

3 Jiangxi Beekeeping Research Institute, Nanchang 330051, China

4 College Of Animal Science And Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China

Abstract: The Orchidaceae, one of the largest families of angiosperms, exhibited a unique pollination strategy where

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32360859); 浙江树人学院科研项目 (2025XZ034); 绍兴市普通高校“风景园林”重点专业项目 (SXSZY202412)

收稿日期: 2025-04-07; **网络出版日期:** 2025-11-13

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: Garden168zhong@163.com

approximately one-third of its species attracted pollinating insects through deceptive mechanisms rather than traditional reciprocal relationships. The volatile substances in orchids exhibited significant diversity, while pollinators demonstrated distinct preferences for specific floral scent profiles. These volatile compounds not only formed a unique chemical communication system between orchids and their pollinators but also appeared integral to their coevolutionary relationships. This study conducted comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry (GC×GC-TOF MS) analysis and interspecific comparative analysis of floral volatiles in three traditional Chinese orchid species: *Cymbidium faberi*, *Cymbidium sinense* and *Neofinetia falcata*. The results showed that there were 3,177, 2,838 and 3,098, volatile compounds identified from *C. faberi*, *C. sinense* and *N. falcata* respectively. Among these, the major classes of volatile compounds were alkanes, alcohols, esters, and ketones. Sensory flavor characterization revealed that the three orchid species predominantly exhibited sweet, fruity, and green-plant notes. A total of 1,241 volatile compounds were shared by all three orchid species, with 2-methylbutanal being the primary contributor to the floral aroma, followed by butyl acetate, 2-pentylfuran, nonenal, butyl acrylate, α -pinene, undecanone, and others. In addition, the differential compounds between the three orchid species were 240 (*C. faberi*/*C. sinense*), 220 (*C. faberi*/*N. falcata*), and 171 (*C. sinense*/*N. falcata*), respectively. Seven candidate volatile compounds were screened, and their attractiveness to *Apis cerana* was evaluated through Electroantennogram (EAG) and behavioral orientation bioassays to characterize the effects of orchid floral volatiles. Notably, the results demonstrated that all seven major orchid volatiles elicited significant EAG responses in *Apis cerana*, with benzaldehyde and 2-methylbutanal showing the highest reaction values. At low concentrations, benzaldehyde elicited the highest electrophysiological response, while 2-methylbutanal showed the strongest response at high concentrations. Behavioral assays revealed that α -pinene exhibited significantly stronger attraction than benzaldehyde ($P < 0.05$). However, no significant differences ($P > 0.05$) were observed in bee attraction among the other volatile compounds at varying concentrations. In summary, the volatile components of the three Chinese orchid species exhibited significant diversity, with specific key compounds eliciting distinct electrophysiological responses in *Apis cerana*. These findings provided new insights into the chemical interactions between orchids and their pollinators, and offered a scientific basis for exploring the co-evolution between plants and pollinators.

Key Words: Orchidaceae; volatile substances; *Apis cerana*; Electroantennogram (EAG) response; bee attraction

达尔文在《物种起源》中首次提出植物与传粉者的协同进化机制^[1]。在被子植物中,约 80%的虫媒植物通过提供花蜜、花粉等营养报酬,与传粉昆虫建立稳定的互利共生关系^[2]。这一“劳动-报酬”模式是显花植物与授粉者共生的基础^[3]。该互惠系统依赖于化学通讯,即植物通过释放挥发性有机化合物(VOCs),结合花色和形态等视觉线索,吸引传粉昆虫;昆虫则据此精准定位食源^[4-5]。近年来研究证实,特定的化合物可以作为“诚实信号”维系植物-授粉昆虫的互作系统。例如,苯乙醛介导十字花科(Brassicaceae)植物与熊蜂(*Bombus* spp.)的互作^[6];夜间石竹科(Caryophyllaceae)花蜜中的一些苯类化合物可以吸引夜蛾^[7];壬醛则可能是植物与蜜蜂之间的诚实信号^[8]。然而,一些植物类群突破传统互惠模式,演化出欺骗性传粉策略。兰花植物作为欺骗性传粉的典型代表,约 30%—50%的物种不提供花蜜等报酬^[9],却仍可通过精细的化学拟态吸引传粉者^[10]。这种机制常见的是贝茨式拟态,如文心兰属(*Oncidium*)通过模拟金虎尾科(Malpighiaceae)植物的花部特征吸引传粉者^[11]。另一种为化学拟态,如眉兰属(*Ophrys*)通过合成与雌蜂性信息素高度相似的烷烃类化合物,诱骗雄蜂“伪交配”完成传粉^[12]。尽管部分兰科植物的欺骗机制已有深入解析,但对一些中国本土无报酬、无拟态兰花的传粉化学信号仍知之甚少。本研究聚焦中华蜜蜂(*Apis cerana*)与无报酬且无拟态兰花的互作机制,选取蕙兰(*Cymbidium faberi* Rolfe)、墨兰(*C. sinense* (Jack. ex Andr.) Willd.)和风兰(*Neofinetia falcata* (Thunb. ex A. Murray) H. H. Hu)为研究对象,通过 GC×GC-TOF MS 技术解析其花部挥发性有机化合物(VOCs)组成特征,分析不同物种间的差异,并结合触角点位(EAG)与行为测试,旨在揭示兰花花香中关键化学信号在“蜜蜂-兰花”传粉系统中的作用机制,为理解欺骗性传粉植物的化学通讯及其协同进化提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试植物与昆虫

本实验中所涉及的蕙兰(简称 HL)、墨兰(ML)和风兰(FL)是 3 种典型的欺骗性兰花种类,其花朵缺少拟态,但芳香性物质较为浓郁的兰花物种,供试植物生长于浙江省建德市杨村桥镇艺澜种植场,并移至浙江树人学院杨汛桥校区内。本实验所涉及的昆虫分别来自于江西省南昌市江西农业大学蜜蜂研究所饲养的中华蜜蜂蜂群 5 群,和浙江省杭州市浙江农林大学的中华蜜蜂蜂群 5 群。

1.2 方法

1.2.1 挥发性物质采集

兰花的挥发性物质在盛花期达到鼎盛^[13],因此本研究选择 3 种兰花在盛花期(花朵完全开放后 48 h 内)进行采样。为控制昼夜节律及光温条件对 VOCs 释放的影响,所有样品均于晴天 13:00—15:00 采集。采样时选取生理状态一致的花序(每株 20 朵),剔除凋谢或受损花朵,并用聚乙烯膜包裹花序,内置吸附子后以夹子密封。密闭收集 2 小时后取出吸附子,置于顶空进样瓶中,4 °C 保存。每个物种设置 3 个生物学重复。

1.2.2 标准品的制备与 SPME 提取

移取 1000 mg/L 正构烷烃标准品,用正己烷逐级稀释至 1 mg/L,储备液密封保存于 4 °C 冰箱。采用固相微萃取-气相色谱/质谱联用技术(SPME-GC/MS),取 10 μ L 正构烷烃至装有吸附子的 20 mL 顶空进样瓶中,80 °C 孵育 10 min 后,将 SPME 萃取头在 GC 进样口 270 °C 老化 10 min,消除残留干扰,而后将 SPME 萃取头于 80 °C 下吸附 40 min,确保挥发物充分富集,随后转移至 GC 进样口,在 250 °C 脱附 5 min 中,脱附结束后,SPME 萃取头再次于 270 °C 老化 10 min^[14-16]。

1.2.3 GC \times GC-TOF MS 系统参数

借鉴李欢欢等系统参数处理方法^[14-16],采用 LECO Pegasus BT 4D (LECO, St. Joseph, MI, USA) GC \times GC-TOF MS 色谱系统,搭载 Agilent 8890A 气相色谱仪,配置双级喷射调制器和分流/不分流进样模块,质谱系统为高分辨 TOF 质谱检测仪。色谱柱参数分为一维色谱柱:DB-Heavy Wax (30 m \times 250 μ m \times 0.5 μ m)和二维色谱柱 Rxi-5Sil MS (2 m \times 150 μ m \times 0.15 μ m),一维色谱柱为初始温度为 50 °C (保持 2 min),以 4 °C/min 升至 220 °C (保持 13 min);二维色谱柱温度始终高于一维柱 5 °C,调制器温度高于二维柱 15 °C,调制周期 5.0 s。高纯氮气作为载气,恒定流速为 1.0 mL/min,进样口温度为 250 °C。质谱电子轰击源为 70 eV,离子源温度为 250 °C,传输线温度为 250 °C,检测器电压为 1960 V,质谱扫描范围为 m/z35-550,数据采集速率为 200 谱图/秒。

1.2.4 数据分析

采用 ChromaTOF 软件处理 GC \times GC-TOF MS 数据,生成多维总离子流色谱图。通过 NIST2020 质谱库对挥发性物质进行初步注释。利用 PubChem 数据库获取挥发性物质的化学属性,并通过 Classyfire 软件进行层级分类^[17]。用相对气味活度法(ROAV)来评价样品的风味,一般 ROAV 越大,说明该物质对风味的贡献度越大^[18]。感官风味特征则通过 Flavordb 解析^[19]。通过主成分分析(PCA)、偏最小二乘判别分析(PLS-DA)和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)进行多元统计分析,对多维数据进行降维和归类分析,筛选差异物质。差异代谢物筛选标准为 $P < 0.05$,且 Log_2 Fold change 绝对值 >1 ^[20]。

1.2.5 触角点位(EAG)测定

基于 GC \times GC-TOF MS 鉴定与分析结合生物学功能,选取 3 种兰花共有 VOCs 中与蜜蜂嗅觉受体潜在互作的化合物作为目标物质(表 1)。将各种化合物溶于正己烷,稀释为 0.4、4.0、40.0 g/L 三个浓度梯度。在测试前,将定性分析滤纸裁剪合适大小(1 cm \times 1 cm),折叠后固定于巴斯德吸管(15 cm)末端,吸取 10 μ L 待测液至滤纸上。于实验当日从健康蜂群采集成年工蜂,在体式显微镜下,快速截取右侧触角,并立即转移至生理盐水中保持活性(0.9% NaCl)。将触角远心端切除 1 mm 形成新鲜切面,并将触角基节与端部连接到装了 EAG

探针的电极两端,并调整至出风口 1 cm 处。连续载气为经活性炭过滤的加湿空气(流速 10 mL/s),刺激脉冲气流(流速 5 mL/s)由脚踏阀触发,持续 0.3 s,每个浓度梯度刺激 3 次,刺激间隔 8 s,并设置正己烷溶剂对照(刺激前后各 3 次)。取三次重复平均峰值作为有效值,共测试 6 组触角。

EAG 相对触角点位计算公式如下: $R=T/D$,其中 R 为中华蜜蜂对样品的 EAG 反应相对值, T 为某一样品刺激 3 次重复的平均值, D 为该样品刺激前后两次对照组分别三次重复的总平均值。昆虫触角电位反应数据采用 Statview 5.0(SAS Institute Inc.)软件中的 ANOVA and ANCOVA 及 Fisher's PLSD 高阶检验进行多重比较分析, $P < 0.05$ 表示差异显著。

表 1 试验中标准品基本信息

Table 1 Basic Information of Standards Used in the Experiment

化合物 Compound	CAS 号 CAS number	纯度 Purity/%	来源 Producer	生物学功能 Biological function	参考文献 References
甲基丁醛 2-Methylbutanal	96-17-3	95	Sigma-Aldrich	对香蕉象虫有吸引力;作为梨花香成分对意大利蜜蜂和中华蜜蜂有吸引效果	[21—22]
乙酸丁酯 Acetic acid butyl ester	123-86-4	≥99	Sigma-Aldrich	昆虫引诱剂成分	[23]
丙烯酸丁酯 2-Propenoic acid, butyl ester	141-32-2	≥99.5	Sigma-Aldrich	昆虫引诱剂成分	[24]
2-十一烷 2-Undecanone	112-12-9	≥98	Sigma-Aldrich	对橄榄树皮小蠹有吸引作用	[25]
异戊酸 3-Methylbutanoic acid	503-74-2	99	Sigma-Aldrich	气味具有一定的诱导性,可以作为一种刺激物来引导或调节动物的行为。	[26]
苯甲醛 Benzaldehyde	100-52-7	≥99	Sigma-Aldrich	果蝇的引诱剂成分	[27]
α-蒎烯 α-Pinene	80-56-8	98	普菲德	昆虫引诱剂成分-诱捕害虫如甲虫、松材线虫等	[28—29]

CAS:化学物质登录号 Chemical abstracts service

1.2.6 行为学测试

根据 3 种兰花共同挥发性成分含量、ROAV 分析结果及前人文献关于挥发性成分在授粉昆虫中作用的相关报道,选取了表 1 中的 7 种目标 VOCs,以高纯度石蜡油为溶剂,梯度配制 0.2%、2%、10%、50% 浓度刺激液。将 50 mL 离心管盖改造为人工花冠,内置定性滤纸片(1 cm×1 cm)。选取健康的中华蜜蜂作为测试对象,在直径约 30 cm 白色泡沫圆盘放置蔗糖假花(含 50% 蔗糖溶液),锻炼蜜蜂采食,然后采用无毒颜料笔对成功返回采蜜的蜜蜂进行标记,确保个体识别无误(见图 1)。

待标记后蜜蜂返回后移除蔗糖假花,实验组假花在滤纸上滴有刺激液,所有假花中央滴加 10 μL 去离子水模拟兰花无蜜腺状态,在圆盘外缘等距且随机放置 7 个无蜜假花,每次测试需随机旋转圆盘以消除位置偏好。记录其首次选择行为作为测试数据(图 2)。每次测试后,更换蜜蜂触碰过的实验假花,防止蜜蜂采蜜时留下信息素干扰选择,同时旋转圆盘以消除位置偏好。每只蜜蜂进行测试后将其处死以避免重复采样。

蜜蜂行为测试数据中,7 种挥发物对蜜蜂吸引效应的行为学数据采用 Statview 软件中的非参数分析 Mann-Whitney U test 进行比较分析;四个不同浓度条件下挥发物对蜜蜂吸引效应的趋势比较分析采用 Statview 软件中的非参数分析 Kruskal Wallis test 进行比较分析; $P < 0.05$ 均表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 兰花挥发性物质鉴定与分析

2.1.1 挥发物的组成分析

采用 GC×GC-TOF MS 技术,共鉴定出风兰(FL)、蕙兰(HL)和墨兰(ML)的挥发性有机化合物(VOCs)分别为 3093、3177、2838 种(图 3)。三者的 VOCs 主要包括烷烃、醇、醛、酮、酯、有机酸及杂环化合物,以烷烃为

主要成分,占比 29.1%—37.6%(图 3)。其中,蕙兰的 VOCs 种类最多,且烷烃(37.5%)和醇类(8.3%)占比高于风兰和墨兰;风兰中酮类(6.0%)、酯类(7.5%)和有机酸(2.4%)含量最高。



图 1 蜜蜂行为测试挑选假花

Fig.1 Selection of false flowers for bee behavior test



图 2 蜜蜂选定假花

Fig.2 Selection of false flowers by bees

感官组学分析显示,3 种兰花均以甜味、水果味和绿色植物味为主;但风兰更具甜果香,蕙兰偏柑橘香,墨兰则木本味和香精味最显著(图 3)。

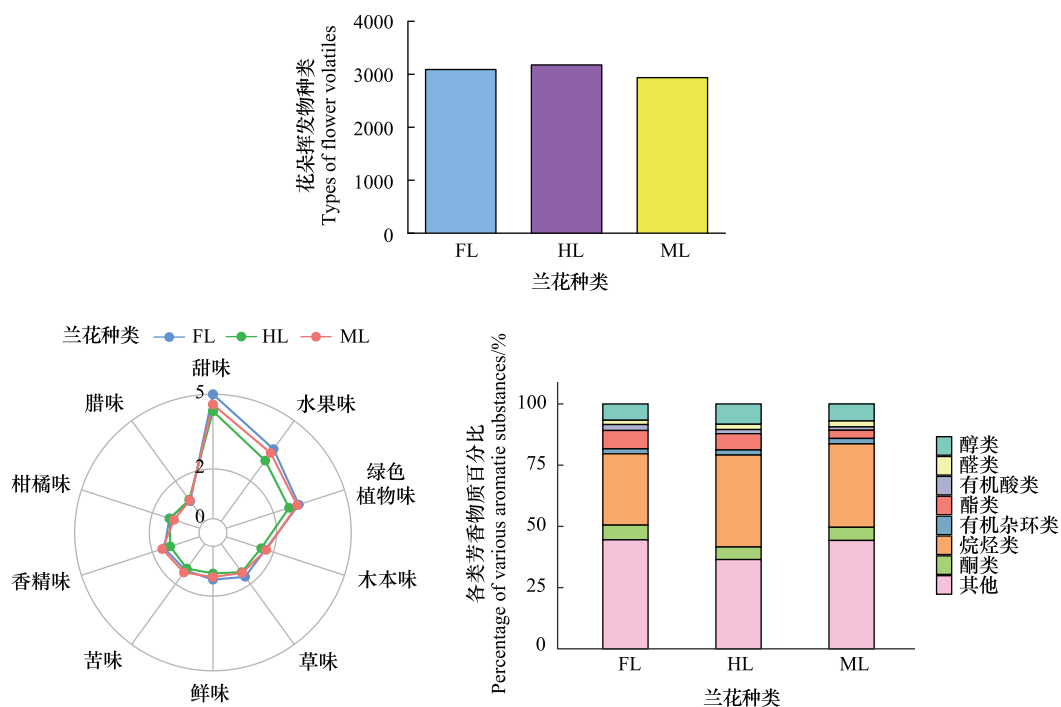


图 3 挥发性物质组成

Fig.3 Composition of volatile substances

FL: 风兰 *Neofinetia falcata*; HL: 蕙兰 *Cymbidium faberi*; ML: 墨兰 *C. sinense*

2.1.2 挥发性物质差异分析

风兰、蕙兰及墨兰共同 VOCs 种类达 1241 种(图 4)。这一结果表明 3 种兰花在长期进化中保留了核心挥发物质库,并可能与其传粉策略有关^[30]。差异分析结果显示,HL vs FL 和 ML vs HL 组中均检测到最多的 73 种差异 VOCs,而三组比较仅共有 1 种差异物质,为酯类化合物 2-甲基丙酸-2-甲基丙酯。具体来看,HL vs FL 中有 118 种 VOCs 下调,112 种上调;ML vs HL 中下调 118 种,上调 102 种;ML vs FL 中下调 88 种,上调 83 种(图 5)。聚类分析表明,蕙兰(HL)与墨兰(ML)聚为一类,风兰(FL)则单独成群,与他们分为 2 个不同属理论吻合;HL 与 ML 中高丰度 VOCs(红色区域)与 FL 存在明显差异。

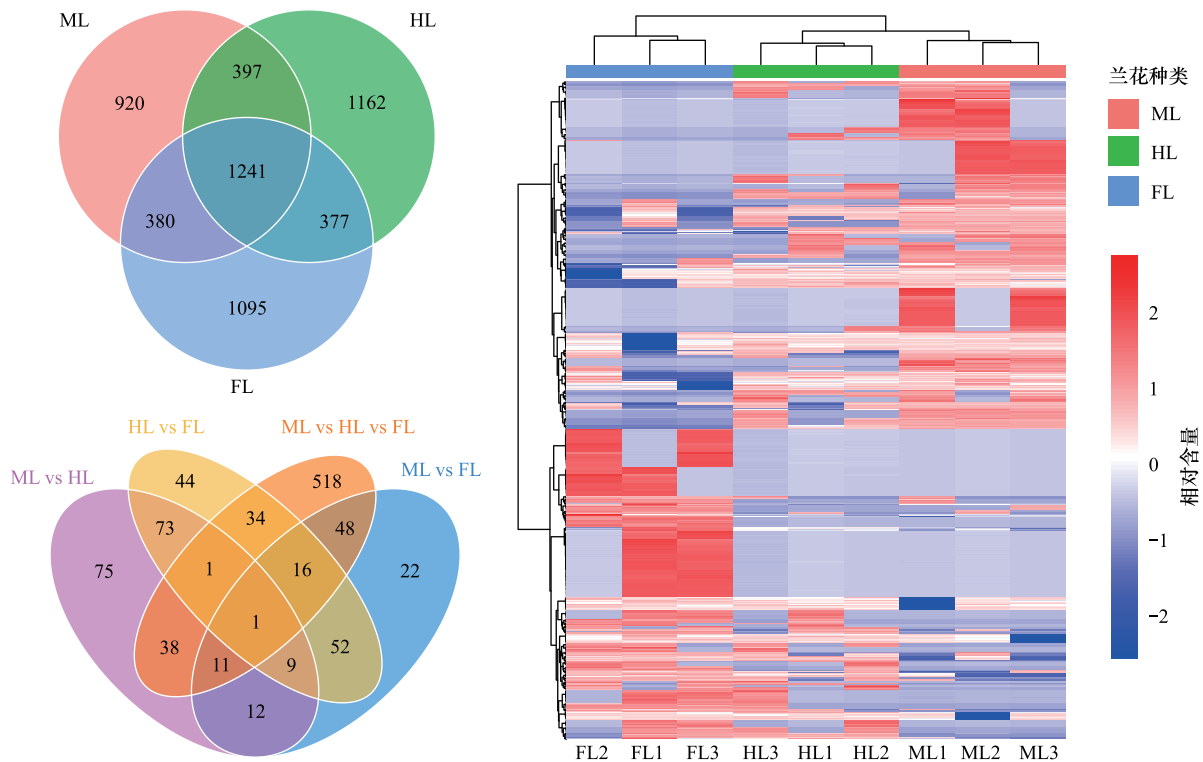


图 4 兰花香物质差异分析

Fig.4 Analysis of differences in orchid aroma substances

图中每幅圈代表一个样本组鉴定风味物质数,重叠部分代表多个样本组共同鉴定到的风味物质数,非重叠部分代表相应样本组特异性鉴定到的风味物质数;不同颜色表示两组共有差异物,重叠区域为多组共有差异物;相对含量的多少通过颜色的不同显示,颜色越红相对含量越高,越蓝相对含量越低;其中列代表样本,行代表物质,图中左侧的聚类树为差异物质种类聚类树

2.1.3 兰花气味活度值(ROAV)分析

ROAV 分析可以阐明每种挥发性化合物对花朵整体香气特征的贡献。如图 6 可知,风兰 ROAV 值前三位依次是 2-甲基丁醛(100.00)、乙酸丁酯(50.44)、2-戊基呋喃(33.69);蕙兰 ROAV 值排名在前的是 2-甲基丁醛(85.60)、2-戊基呋喃(80.93)、乙酸丁酯(62.02);墨兰(ML)则以 2-甲基丁醛(100.00)、2-戊基呋喃(47.93)、2-壬烯醛(9.36)为主要贡献者。值得注意的是,3 种兰花共有的高 ROAV 化合物为 2-甲基丁醛、乙酸丁酯、2-戊基呋喃、壬烯醛等,其中 2-甲基丁醛在 FL 和 ML 中均达到理论最大值(100.00),在 HL 中也占据主导地位(85.60)。

2.2 蜜蜂对气味标样的 EAG 反应

分别以 0.4、4.0、40.0 g/L 三个浓度梯度对蜜蜂触角进行 7 种共有化合物(苯甲醛、2-甲基丁醛、乙酸丁酯、丙烯酸丁酯、异戊酸、 α -蒎烯、十一烷酮)刺激,结果显示,在低浓度(0.4、4.0 g/L)下,苯甲醛诱导的触角电位(EAG)反应最强。苯甲醛与 2-甲基丁醛的 EAG 反应显著高于其他化合物,且苯甲醛的 EAG 响应呈明显的浓

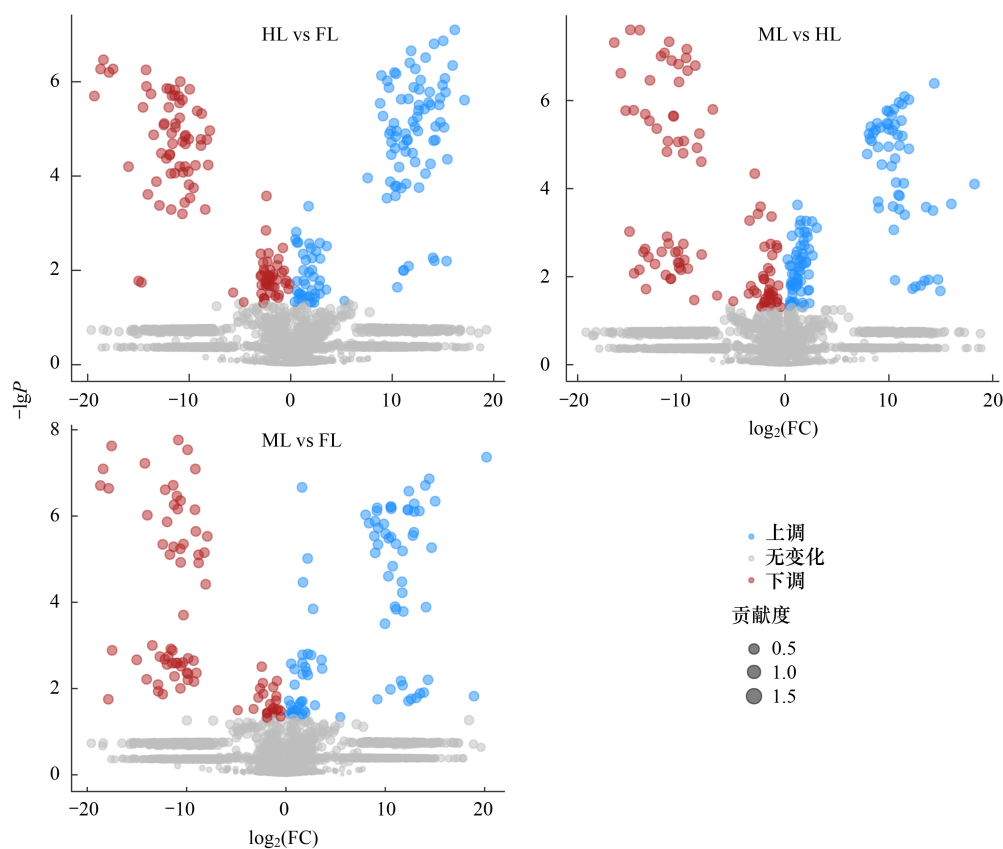


图5 兰花差异花香物质火山图

Fig.5 Volcanic diagram of different floral substances in orchids

图中每个点表示一种物质,横坐标表示某物质在两样品中定量差异倍数的对数值(Log_2 Fold change);纵坐标表示 P 值的 $-\log$ 对数值。横坐标绝对值越大,说明某物质在两样品间的表达量倍数差异越大;纵坐标值越大,表明差异表达越显著; $P < 0.05$ 和 $|\text{Log}_2\text{FC}| > 1$ 表示差异显著;图中红色点代表上调差异表达物质,蓝色点代表下调差异表达物质,灰色点代表能检测到但差异不显著的物质

度依赖性,随浓度升高而增强。作为3种兰花共有的核心香气成分,2-甲基丁醛的EAG反应强度仅次于苯甲醛,尽管其响应曲线呈非线性,但在高浓度(40.0 g/L)下仍达到最大反应,显著高于其他VOCs(图7)。

2.3 蜜蜂对气味标样的趋向选择反应

行为学实验定量评估了7种挥发性有机化合物(VOCs)在不同浓度下对蜜蜂的吸引效应。对7种VOCs的吸引效果进行比较分析,结果显示,仅 α -蒎烯对蜜蜂的吸引效应显著高于苯甲醛(Mann-Whitney U检验, $P = 0.02$,图8),其余各组间差异均不显著($P > 0.05$)。进一步采用Kruskal-Wallis检验评估不同浓度对各气味物质吸引效应的影响,结果表明在所测试的4种浓度条件下,7种VOCs对蜜蜂的吸引力均未呈现显著差异性趋势($P > 0.05$)。

3 讨论

大多数植物花朵的挥发性物质为数十种至数百种^[31]。如在丁香(*Luculia Gratissima*)花朵中鉴定到了20种挥发物^[32];在百合(*Lilium spp.*)花中鉴定出了59种花朵挥发物^[33]。而少量的植物花朵如茉莉花(*Gardenia jasminoides*)能释放数百种挥发性物质^[34]。本研究结果表明,3种兰花的挥发性物质高达3000余种(图3),远远高于其他植物的花朵挥发物。这一发现不仅揭示了兰科植物高度特化的代谢能力,也提示其在长期进化中可能通过高度复杂的化学信号体系,建立了精细的传粉者互作机制。另聚类分析表明的蕙兰(HL)与墨兰(ML)聚为一类,风兰(FL)则单独成群,因为他们分别为2个不同属,存在属间差别各为一类,与经

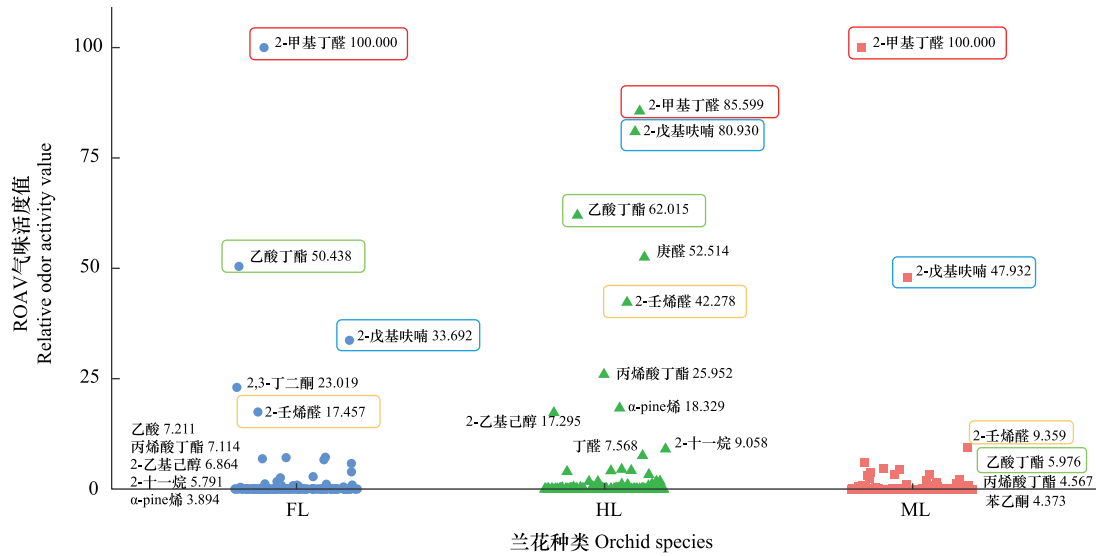


图 6 气味活度值 ROAV 散点图

Fig.6 Scatter plot of odor activity values

横坐标表示不同组别,纵坐标表示风味物质 ROAV 值,颜色表示不同的分组

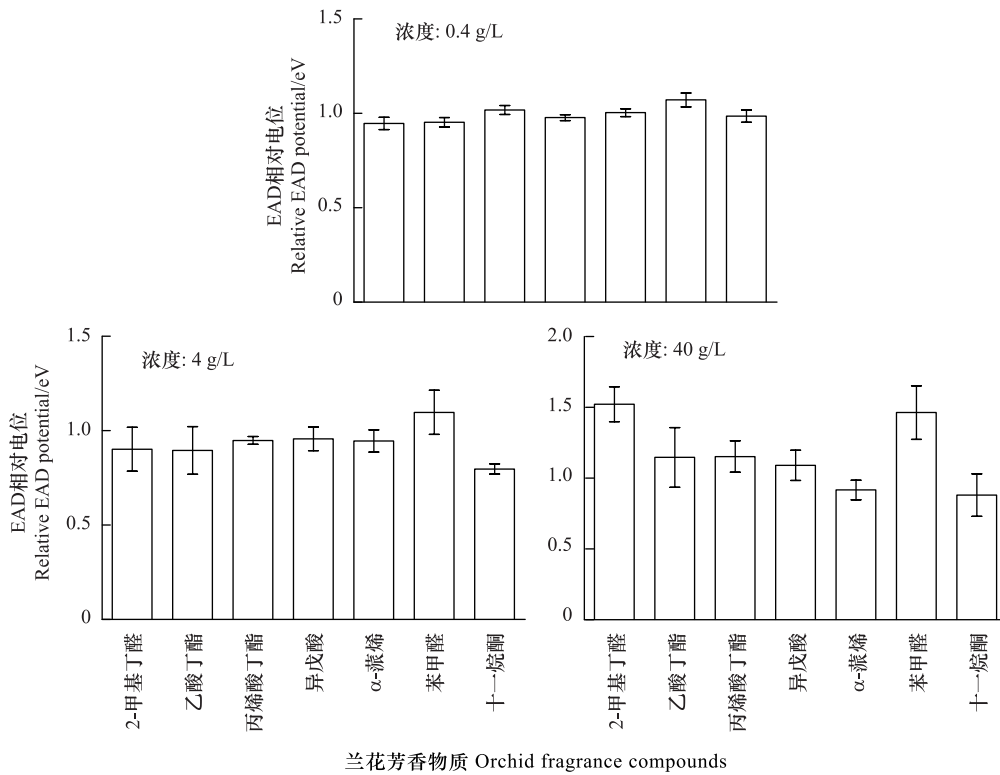


图 7 不同浓度 (0.4g/L、4g/L、40g/L) 蜜蜂的 EAG 触角点位

Fig.7 EAG antenna positions of bees at different concentrations (0.4g/L, 4g/L, 40g/L)

EAD: 电子亲和势差 Relative potential of Electron Affinity Difference;不同颜色表示不同挥发性物质,不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 相同字母表示差异不显著 ($P \geq 0.05$)

典分类学分属理论相吻合。

前人研究表明,欺骗性兰花通常表现出比报酬型兰花更高的 VOCs 多样性^[35],其可能通过复杂的化学信

号增强对传粉者的吸引效应。例如,烷烃和烯烃组合可模拟蜜蜂的性信息素从而欺骗假交配行为^[36]。多花兰(*C. floribundum*)则通过花瓣和花萼部分释放 3-羟基辛酸(3-hydroxyoctanoic acid)和 10-羟基-(E)-2-癸烯酸(10-hydroxy-(E)-2-decenoic acid)的特定比例混合物吸引日本蜜蜂(*A. cerana*)^[37]。本研究结果表明 3 种兰花的 VOCs 均以烷烃类为优势成分(相对含量>29%),其次是醇类、酯类、酮类和有机杂环类挥发性物质(图 4),且 3 种兰花之间的花朵挥发物成分存在 1241 种共同 VOCs 和 170-240 种特异 VOCs(图 5)。这种“共享-特异”结构的挥发性化学谱系,可能是兰科植物在系统发育基础上,通过物种分化过程不断积累的结果,既反映了保守代谢通路的遗传保留,也体现了为适应不同传粉者或生态位所形成的化学多样化策略。

有趣的是,本研究并未发现这些物质中存在蜜蜂性信息素,且 3 种兰花也无模仿雌性蜜蜂的“拟态特征”。那么这些兰花是如何实现对蜜蜂欺骗性授粉的呢? 3000 余种花朵挥发性成分是否在欺骗性授粉过程中如

何扮演着重要作用呢? 我们提出了兰花是否能通过更为精巧的“食物信号拟态”策略来吸引蜜蜂的假说。这一策略依赖花香物质模拟蜜蜂偏好的食物气味,引发其探索行为,虽无食物回报,但因其复杂气味构型具备一定的欺骗性,从而绕过蜜蜂“学习-规避”机制的惩罚反馈。

感官组学分析表明,3 种兰花整体气味均以甜味、水果味和绿色植物味为主,表明 3 种兰花的花香气味存在模拟传粉昆虫甜味食物的可能。ROAV 分析结果显示 2-甲基丁醛是 3 种兰花的最重要的香气特征的贡献化合物,其次是乙酸丁酯、2-戊基呋喃、壬烯醛、丙烯酸丁酯、 α -蒎烯、十一烷酮等(图 6)。前人研究表明,2-甲基丁醛在兰花花香物质中起重要作用,而本研究 ROAV 分析结果首次表明 2-甲基丁醛是 3 种兰花共有的最重要花香气味特征物质。因此,这些主要的兰花香味物质可能在吸引授粉昆虫中起重要作用。

鉴于此,本研究选取了以 2-甲基丁醛等为主的 7 种挥发性成分(表 1),并测试了这些候选挥发性成分对中华蜜蜂的吸引效应。昆虫触角电位结果表明,低剂量条件下苯甲醛产生的蜜蜂触角电位反应最高,而高剂量时 2-甲基丁醛的触角电位反应最高(图 7)。这与梨属植物(*Pyrus* spp.)挥发性物质中 2-甲基丁醛对意大利蜜蜂(*A. mellifera*)和中华蜜蜂的触角电位实验结果相吻合^[38]。然而,行为学测试结果表明,2-甲基丁醛和苯甲醛均不是显著吸引蜜蜂访问的关键物质,且在四个不同浓度下,7 种候选挥发物对蜜蜂的吸引力并未出现显著的偏差性(图 8)。这提示仅靠单一化合物难以解释兰花对蜜蜂的吸引机制,其真实作用机制可能是多组分协同效应或浓度动态配比共同决定的。

由于蜜蜂是一种嗅觉十分灵敏并且学习记忆能力强的昆虫,不同浓度的花香物质对其吸引效应可能存在差异。同时,各类挥发物之间的组合可产生协同效应,吸引授粉昆虫。例如,番荔枝(*Annona cherimoya*)果实的挥发性物质中苯并噻唑(Benzothiazole)和(E)- β -香叶烯((E)- β -caryophyllene)仅在组合状态下才对番荔枝科果象甲(*Optatus palmaris*)具有吸引效果^[39]。因此,未来研究需系统开展兰花花香成分的“组合-配比-浓度”三维梯度实验,解析哪些组合是实现欺骗性吸引的关键,并借助神经成像或学习行为实验手段进一步明确其作用机制。

花朵的气味对于许多传粉者(尤其是群居蜜蜂)来说,是决定是否降落并探寻花蜜的关键因素,蜜蜂会学习并记住特定花朵的气味特征,并通过气味来辨别自己要寻找的花朵,当花朵的气味发生变化,即使外观不

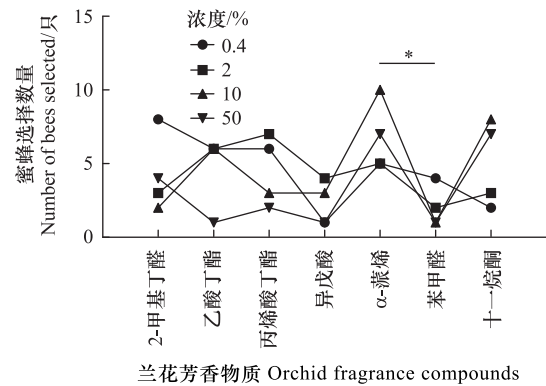


图 8 不同浓度(0.4%、2%、10%、50%)蜜蜂的行为反应

Fig. 8 Behavioral responses of bees at different concentrations (0.4%, 2%, 10%, 50%)

不同颜色表示不同挥发性物质;利用 Mann-Whitney U test 对 7 种气味物质的蜜蜂吸引效应进行比较分析,仅 α -蒎烯和苯甲醛组差异显著 $P=0.02$,并用 * 表示差异性,其他各组之间均差异不显著 ($P>0.05$);利用 Kruskal Wallis test 对 4 个浓度进行比较分析,不同浓度之间均无显著差异 ($P>0.05$,用 NS 表示)

变,蜜蜂也可能拒绝访问^[40]。例如,同期开花的荔枝与芒果,蜜蜂会采集花蜜含量多的荔枝而拒绝采集芒果花^[41]。那么无报酬的兰花如何能使得蜜蜂持续访问?这一内在机制挑战了传统的动物“学习-规避”理论^[40],仅靠气味吸引而无食物回报欺骗授粉者的机制看似难以长期维系。本研究的行为学实验结果未能直接证明关键花香物质具有持续吸引并欺骗蜜蜂访花的作用,但这并不意味着不能通过其他尚未识别的机制或策略实现类似效果。事实上,这类欺骗性兰花依然稳定存在,甚至在生态系统中维持种群扩展。作者认为,兰花诱导蜜蜂等授粉者进行授粉,可能存在更为复杂的策略。例如,它们可能利用其复杂的花香气味物质发展出了特定的“欺骗-模仿-强化”三段式策略,即先以复杂气味吸引蜜蜂初访,再通过模糊模仿真实食物气味的方式延迟其识别,最后形成暂时性记忆强化,从而实现短期高频访花。由此可见,其作用机制可能相当复杂,仍需进一步深入研究与解析。未来应进一步开展多组分混合气味的电生理响应与行为学研究,结合化学生态建模及脑神经机制解析,系统揭示欺骗性兰花如何跨越蜜蜂的学习能力限制,实现稳定的传粉互动。这将为理解植物欺骗性传粉的演化策略提供新视角,也为开发仿生授粉引诱剂等应用提供理论基础。

4 结论

本研究鉴定了3种国兰的复杂挥发性成分图谱,并发现2-甲基丁醛是三者共有的关键气味活性物质。昆虫触角电位反应结果揭示中华蜜蜂对2-甲基丁醛等主要的兰花挥发性成分具有显著的电生理响应,但行为测试并未展现出较强的吸引效应。这些后续工作将有助于阐明兰花特异的传粉昆虫吸引机制,并为其独特的授粉策略的进化历程提供新的见解,为理解兰科植物的生态适应和进化成功提供了新的化学视角。

参考文献(References):

- [1] Friedman W E. The meaning of Darwin's 'abominable mystery'. *American Journal of Botany*, 2009, 96(1): 5-21.
- [2] 史刚荣. 虫媒植物与传粉昆虫的协同进化. *生物学杂志*, 1996, 13(3): 2.
- [3] Johnson S D, Anderson B. Coevolution between food-rewarding flowers and their pollinators. *Evolution: Education and Outreach*, 2010, 3(1): 32-39.
- [4] Dobson H E M. Floral volatiles in insect biology. *Insect-Plant Interaction*, 1994, 47-81.
- [5] Dobson H E M, Bergström G. The ecology and evolution of pollen odors. *Plant Systematics and Evolution*, 2000, 222(1): 63-87.
- [6] Knauer A C, Schiestl F P. Bees use honest floral signals as indicators of reward when visiting flowers. *Ecology Letters*, 2015, 18(2): 135-143.
- [7] Balao F, Herrera J, Talavera S, Dötterl S. Spatial and temporal patterns of floral scent emission in *Dianthus inoxianus* and electroantennographic responses of its hawkmoth pollinator. *Phytochemistry*, 2011, 72(7): 601-609.
- [8] Liu Y B, Zeng Z J, Barron A B, Ma Y, He Y Z, Liu J F, Li Z, Yan W Y, He X J. The involvement of a floral scent in plant-honeybee interaction. *The Science of Nature*, 2022, 109(3): 30.
- [9] Hansen I, Olesen J M. Comparison of reproductive success in two orchids: the nectarless *Dactylorhiza majalis* s.s. and the nectar-producing *Gymnadenia conopsea* s.l. *Nordic Journal of Botany*, 1999, 19(6): 665-671.
- [10] 任宗昕, 王红, 罗毅波. 兰科植物欺骗性传粉. *生物多样性*, 2012, 20(3): 270-279.
- [11] Papadopulos A S T, Powell M P, Pupulin F, Warner J, Hawkins J A, Salamin N, Chittka L, Williams N H, Whitten W M, Loader D, Valente L M, Chase M W, Savolainen V. Convergent evolution of floral signals underlies the success of Neotropical orchids. *Proceedings Biological Sciences*, 2013, 280(1765): 20130960.
- [12] Schiestl F P, Ayasse M, Paulus H F, Löfstedt C, Hansson B S, Ibarra F, Francke W. Orchid pollination by sexual swindle. *Nature*, 1999, 399(6735): 421.
- [13] 黄昕蕾, 郑宝强, 王雁. 鼓槌石斛不同花期香气成分及盛花期香气日变化规律研究. *林业科学研究*, 2018, 31(4): 142-149.
- [14] Li H H, Geng W H, Haruna S A, Zhou C G, Wang Y, Ouyang Q, Chen Q S. Identification of characteristic volatiles and metabolomic pathway during pork storage using HS-SPME-GC/MS coupled with multivariate analysis. *Food Chemistry*, 2022, 373: 131431.
- [15] Sun C X, Wang R, Wang T Y, Li Q. Primary evaluation of nine volatile N-nitrosamines in raw red meat from Tianjin, China, by HS-SPME-GC-MS. *Food Chemistry*, 2020, 310: 125945.
- [16] Da Silva G C, da Silva A A S, da Silva L S N, de O Godoy R L, Nogueira L C, Quitério S L, Raices R S L. Method development by GC-ECD and HS-SPME-GC-MS for beer volatile analysis. *Food Chemistry*, 2015, 167: 71-77.
- [17] Djoumbou Feunang Y, Eisner R, Knox C, Chepelev L, Hastings J, Owen G, Fahy E, Steinbeck C, Subramanian S, Bolton E, Greiner R, Wishart D S. ClassyFire: automated chemical classification with a comprehensive, computable taxonomy. *Journal of Cheminformatics*, 2016, 8(1): 61.

- [18] Zhu Y F, Chen J, Chen X J, Chen D Z, Deng S G. Use of relative odor activity value (ROAV) to link aroma profiles to volatile compounds: application to fresh and dried eel (*Muraenesox cinereus*). *International Journal of Food Properties*, 2020, 23(1): 2257-2270.
- [19] Garg N, Sethupathy A, Tuwani R, Nk R, Dokania S, Iyer A, Gupta A, Agrawal S, Singh N, Shukla S, Kathuria K, Badhwar R, Kanji R, Jain A, Kaur A, Nagpal R, Bagler G. FlavorDB: a database of flavor molecules. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(D1): D1210-D1216.
- [20] Kieffer D A, Piccolo B D, Vaziri N D, Liu S M, Lau W L, Khazaeli M, Nazertehrani S, Moore M E, Marco M L, Martin R J, Adams S H. Resistant starch alters gut microbiome and metabolomic profiles concurrent with amelioration of chronic kidney disease in rats. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 2016, 310(9): F857-F871.
- [21] Braimah H, Van Emden H F. Attractiveness of some host plant and conspecific male semiochemicals to the banana weevil, *Cosmopolites sordidus* (Germar, 1824). *Ghana Journal of Agricultural Science*, 2006, 37(1): 75-84.
- [22] 马迪, 肖文芳, 李佐, 张俊卫, 陈和明, 吕复兵. 兰科植物花香成分研究进展. *中国农学通报*, 2023, 39(16): 52-60.
- [23] Lu P F, Qiao H L. Peach volatile emission and attractiveness of different host plant volatiles blends to *Cydia molesta* in adjacent peach and pear orchards. *Scientific Reports*, 2020, 10: 13658.
- [24] Xiu C L, Zhang W, Xu B, Wyckhuys K A G, Cai X M, Su H H, Lu Y H. Volatiles from aphid-infested plants attract adults of the multicolored Asian lady beetle *Harmonia axyridis*. *Biological Control*, 2019, 129: 1-11.
- [25] Szuman-Szumski K J, Pea A, Kelly D R, Campos M. Identification of chemicals attractive to the olive bark beetle, *Phloeotribus scarabaeoides*, in laboratory bioassays. *BioControl*, 1998, 43(3): 345-355.
- [26] López-López N, Rojas J C, Cruz-López L, Ulloa-García A, Malo E A. Dog hair volatiles attract *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) females. *Journal of Medical Entomology*, 2023, 60(3): 432-442.
- [27] Luo Z C, Zhang Y, Zhang P P, Liu L Y, Yuan J X, Yan S C, Liu W, Wang G R. Benzaldehyde acts as a behaviorally active component in brewer's yeast protein powder which attracts *B. dorsalis* through olfaction. *Journal of Chemical Ecology*, 2024, 50(12): 1010-1022.
- [28] Collignon R M, Swift I P, Zou Y F, McElfresh J S, Hanks L M, Millar J G. The influence of host plant volatiles on the attraction of longhorn beetles to pheromones. *Journal of Chemical Ecology*, 2016, 42(3): 215-229.
- [29] Lee H R, Lee S C, Lee D H, Choi W S, Jung C S, Jeon J H, Kim J E, Park I K. Identification of the aggregation-sex pheromone produced by male *Monochamus saltuarius*, a major insect vector of the pine wood nematode. *Journal of Chemical Ecology*, 2017, 43(7): 670-678.
- [30] Knudsen J T, Eriksson R, Gershenzon J, Ståhl B. Diversity and distribution of floral scent. *The Botanical Review*, 2006, 72(1): 1.
- [31] Knudsen J T, Gershenzon J. The chemical diversity of floral scent//*Biology of Plant Volatiles*. Boca Raton: CRC Press, 2020: 57-78.
- [32] Lin W D, Lin S. Floral scent composition in *Luculia gratissima* (wallich) sweet analyzed by HS-SPME-GC-MS. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 2016, 19(7): 1801-1806.
- [33] Wei L J, Wei S H, Hu D L, Feng L, Liu Y Y, Liu H W, Liao W B. Comprehensive flavor analysis of volatile components during the vase period of cut lily (*Lilium* spp. 'Manissa') flowers by HS-SPME/GC-MS combined with E-nose technology. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 822956.
- [34] 徐晓俞, 李爱萍, 吴思逢, 李程勋, 郑开斌. 栀子鲜花花水和鲜花细胞液气相和液相的成分分析. *中国农业科学*, 2020, 53(22): 4710-4726.
- [35] Salzmann C C, Nardella A M, Cozzolino S, Schiestl F P. Variability in floral scent in rewarding and deceptive orchids: the signature of pollinator-imposed selection. *Annals of Botany*, 2007, 100(4): 757-765.
- [36] Schiestl F P, Ayasse M, Paulus H F, Löfstedt C, Hansson B S, Ibarra F, Francke W. Sex pheromone mimicry in the early spider orchid (*Ophrys sphegodes*): patterns of hydrocarbons as the key mechanism for pollination by sexual deception. *Journal of Comparative Physiology A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 2000, 186(6): 567-574.
- [37] Sugahara M, Izutsu K, Nishimura Y, Sakamoto F. Oriental orchid (*Cymbidium floribundum*) attracts the Japanese honeybee (*Apis cerana japonica*) with a mixture of 3-hydroxyoctanoic acid and 10-hydroxy-(E)-2-decenoic acid. *Zoological Science*, 2013, 30(2): 99-104.
- [38] Ma W H, Long D L, Wang Y, Li X Y, Huang J X, Shen J S, Su W T, Jiang Y S, Li J. Electrophysiological and behavioral responses of Asian and European honeybees to pear flower volatiles. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 2021, 24(1): 221-228.
- [39] Pineda-Ríos J M, Cibrián-Tovar J, López-Romero R M, Hernández-Fuentes L M, Soto-Rojas L, Llanderal-Cázares C, García-Sosa P R, Salomé-Abarca L F. Volatilome analysis of soursop fruits for the determination of kairomone components that attract the Annonaceae fruit weevil (*Optatus palmaris* Pascoe). *Plants*, 2023, 12(22): 3898.
- [40] Wright G A, Schiestl F P. The evolution of floral scent: the influence of olfactory learning by insect pollinators on the honest signalling of floral rewards. *Functional Ecology*, 2009, 23(5): 841-851.
- [41] Bhatia R S, Gupta D, Chandel J S, Forestry J. Relative abundance of insect visitors on flowers of major subtropical fruits in Himachal Pradesh and their effect on fruit set. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 1995, 65: 907-912.