

模拟不同因素对狼蛛嗅觉器官定位猎物的影响

黄颖¹, 颜亨梅^{2*} (1. 广州大学地理科学学院, 广东广州 510006; 2. 北京师范大学珠海分校, 广东珠海 519087)

摘要 [目的]了解狼蛛捕食行为的影响因子。[方法]以拟水狼蛛为研究对象, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计, 探讨了狼蛛嗅觉感受器对捕食行为(寻觅、选择与定位猎物)的影响, 并对不同反应观察时长提出试验设计方案。试验全过程在 25℃ 恒温环境完成, 采用四臂嗅觉仪测定。[结果]间距对狼蛛定位果蝇灵敏度的影响最大, 其次是果蝇组织液浓度和狼蛛反应时长观察。经正交试验统计检验, 得出狼蛛定位猎物的最佳优化组合为果蝇体液浓度 80%、距离为 6 cm、狼蛛反应时长 300 s, 此时狼蛛嗅觉感受器灵敏度最高。[结论]试验结果为制定保护和利用蜘蛛防治害虫的措施提供了理论依据。

关键词 拟水狼蛛; 果蝇; 四臂嗅觉仪; 正交试验
中图分类号 S476.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)09-0008-04

Effects of Olfactory Receptor on Locating Prey of *Pirata subpiraticus* in Different Factors
HUANG Ying¹, YAN Heng-mei^{2*} (1. College of Geographical Sciences, Guangzhou University, Guangzhou, Guangdong 510006; 2. Zhuhai Campus, Beijing Normal University, Zhuhai, Guangdong 519087)

Abstract [Objective] The aim was to understand influencing factors of feeding behavior of *Pirata subpiraticus*. [Method] We used $L_9(3^4)$ orthogonal experiment for *Pirata subpiraticus*'s olfactory receptor and tested at 25℃ environment to explore factors that *Pirata subpiraticus*'s olfactory receptors how to find, to select and locate prey (fruit fly) through several experiments, and used four-arm olfactometer experimental device to explore the accuracy in predation prey of the *Pirata subpiraticus* and proposed experimental design options for different experimental observations with *Pirata subpiraticus*'s reaction. [Result] The distance had the biggest effect on the chemoreceptor sensitivity of *Pirata subpiraticus*, secondly were fruit fly fluid concentration and experimental observation. The optimal combination that *Pirata subpiraticus*'s olfactory receptors appeared the highest sensitivity was as followed: the fruit fly fluid concentration of 80%, a distance of 6 cm, the experimental observation of 300 s reaction time. [Conclusion] The results provide theoretical basis for making measures for protecting and using *Pirata subpiraticus* to control pests.

Key words *Pirata subpiraticus*; Fruit fly; Four-arm olfactometer; Orthogonal experiment

拟水狼蛛属节肢动物门螯肢亚门蛛形纲蜘蛛目狼蛛科^[1]。我国蜘蛛生物学研究落后于分类学, 在已知的 2 361 种蜘蛛中, 了解其生活史和生物学特性的仅 20 多种^[2], 蜘蛛对化学物质反应灵敏, 蜘蛛进化过程中最初极可能是通过化学通讯来进行个体之间信息交流的方式, 从而使雌雄个体相互吸引以完成物质交换^[3]。很早就有行为证据能够证明蜘蛛具有嗅觉功能^[4], 普遍认为琴形器是蜘蛛的嗅觉器官, 它分布在步足各节末端以及螯肢和胸板上。Dumpert^[5]随后证实多种挥发性物质能够激发跗节器的电生理反应, 但蜘蛛的远距离化学感受器即嗅觉感受器目前仍存在争议。

从拟水狼蛛的生物学、行为学和生态学特性看, 该蛛生长历期长、繁殖力强、孵化率和成活率高、环境适应性好、田间种群数量大^[6]、对水稻害虫的捕食量大控制作用强^[7], 有重要的保护和利用价值。其嗅觉是由挥发性物质的分子所激发, 可在一定距离内发挥作用。影响蜘蛛捕食行为的因素很多, 包括环境温度、湿度、光照强度、猎物密度等, 这些因素综合地对蜘蛛的捕食行为产生影响, 利用蜘蛛进行防治虫害时, 必须充分考虑这些因素, 尽可能地把这些因素控制在一个最合适的范围, 增强蜘蛛的捕食行为, 提高控制虫害的效率。笔者运用室内试验与资料考查相结合的方法对拟水狼蛛的行为学特性进行了观察, 通过猎物气味浓度与定位距离来测定其行为反应, 通过分别设置不同的间距、不同的浓度

梯度和不同试验观察时长研究了狼蛛的最适定位间距、最适猎物浓度和两者的行为阈值范围, 并初步探讨了不同试验观察时长下气味浓度对狼蛛捕食行为反应的影响, 旨在为进一步了解狼蛛捕食行为的影响因子, 制定保护利用蜘蛛防治害虫的措施提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 狼蛛。采自北京师范大学珠海分校校园内丽泽湖边草丛间, 共 10 只, 雌蛛 3 只, 雄蛛 7 只, 均为成熟狼蛛。将狼蛛分别置于 10 个 250 mL 锥形瓶中, 瓶口用棉花塞住, 内置 1 块加水湿润脱脂棉, 放置于恒温实验室饲养。

1.1.2 猎物。白蚁: 采自北京师范大学珠海分校校园内丽泽湖边草丛间, 属昆虫纲等翅目, 营巢穴居昆虫, 是多型性社会昆虫, 取食木材或其他植物, 造成巨大危害^[8]。蚊子: 采自北京师范大学珠海分校校园内丽泽湖边草丛间, 是昆虫纲双翅目的一种具有刺吸式口器的纤小飞虫。吸血种类和腐蚀性种类是重要的传病介体^[8]。蚜虫: 采自北京师范大学珠海分校校园内丽泽湖边草丛间, 又称蜜虫、腻虫等, 属于同翅目蚜科, 为刺吸式口器的害虫, 常群集于叶片、嫩枝、花序或幼芽上, 少数在根部刺吸汁液, 使叶片皱缩、卷曲、畸形, 严重时引起枝叶枯萎甚至整株死亡。蚜虫是农业重要害虫^[8]。果蝇(*Drosophila melanogaster*): 双翅目成虫, 来自北京师范大学珠海分校汪波老师培育, 喜腐败发酵味, 产卵于腐败果实或植物上, 繁殖快, 生活史短^[8]。

1.2 方法

1.2.1 嗜口试验。将 10 只狼蛛进行饥饿处理, 3 d 后进行

基金项目 国家自然科学基金项目(31372159)。
作者简介 黄颖(1990—), 女, 广东深圳人, 硕士研究生, 研究方向: 自然资源利用与评价。*通讯作者, 教授, 硕士, 博士生导师, 从事动物学和生态学研究。
收稿日期 2017-03-17

试口试验。如图 1 所示,将低温处理后的狼蛛放于 A 点,在四臂嗅觉仪一端接放有活体猎物的圆底烧瓶,其余端口接蒸馏水,选择出狼蛛最喜欢的猎物进行下一步试验。

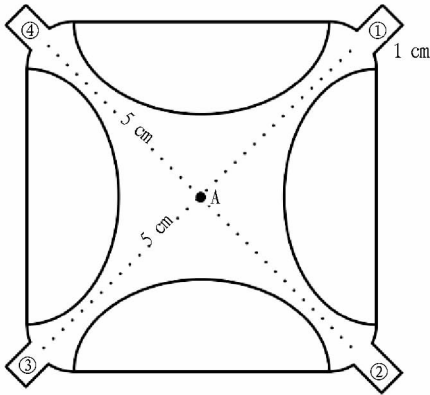


图 1 四臂嗅觉仪俯视示意

Fig. 1 Aerial views of four-arm olfactometer

1.2.2 嗜好猎物的正交试验。给狼蛛喂食 3 d 最喜爱猎物,建立条件反射和适口试验后,停止供给食物,使狼蛛处于饥饿状态,5 d 后再进行正式试验。为了系统观察狼蛛定位猎物的最佳行为,选取了 3 因子 3 水平的 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,测定 9 个条件对狼蛛定位猎物灵敏度的影响,从而确定最优组合,随后进行正交试验验证其效果。

1.2.3 四臂嗅觉仪测定方法。将四臂嗅觉仪放置于经过暗处理的环境中,将狼蛛低温处理(4 ℃ 冰箱中 1 min),以减少狼蛛的活跃性,调节环境温度至 25 ℃,将猎物或沾有猎物体液的纱布放在四臂嗅觉仪端口处,后将狼蛛放于中心点 A 处,用黑色垃圾袋暗处理,根据一定试验时间,记录最终结果,狼蛛走向猎物处,记为“1”,没有反应,记为“0”,错误乱跑,记为“X”反应。

每次试验结束后,均用无水乙醇消毒四臂嗅觉仪和橡胶管道,待乙醇挥发后,更换纱布和狼蛛,在 4 个端点不同位置重复多次,以排除狼蛛留下的痕迹及猎物气味对某个方向的偏好性。

1.3 数据处理 采用 Excel 软件进行数据统计,对试验数据进行单因素分析,检测自变量与因变量之间的关系,结合 $L_9(3^4)$ 的正交表进行试验,然后对试验结果进行极差分析,以探明最优的因子组合^[9-10]。

2 结果与分析

2.1 狼蛛对不同猎物种类的嗜好性 试验活体猎物状况分别为蚜虫 0.977 8 g、果蝇 1.002 0 g、蚊子 0.988 9 g、白蚁 1.011 0 g。试验在 25 ℃ 恒温实验室完成,均采用相同质量的活体猎物,距离中心 6 cm 处进行,反应时长 180 s。

由图 2 可知,饥饿状态下的狼蛛对不同猎物的嗜好性有明显差异,狼蛛停留在有活体果蝇的方向占 72.5%,停留在有活体蚜虫方向占 50.0%,表明狼蛛对不同猎物嗜好大小顺序为果蝇、蚜虫、蚊子、白蚁。故选择果蝇进行后续试验。

2.2 单因素试验结果

2.2.1 果蝇组织液浓度对狼蛛定位的影响。在排除温度和

距离(6 cm)的影响条件下($A_2B_1C_2$),无水乙醇浸泡 1 h 后取出 50 只果蝇研磨碾碎,以 1 mL 配比,按 100%、80% 和 50% 加蒸馏水稀释,取充分振荡混匀后溶液进行试验,对比不同果蝇组织液浓度狼蛛反应观察 300 s 的灵敏度。

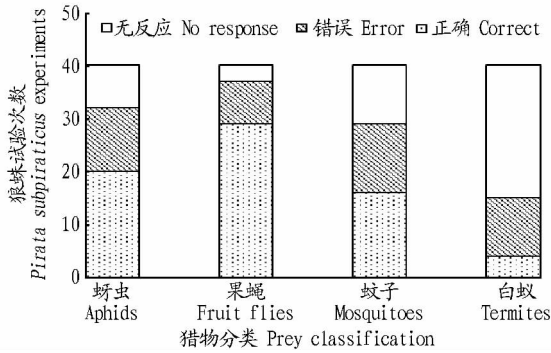


图 2 狼蛛对不同猎物嗜好程度比较

Fig. 2 Comparison of different degrees *Pirata subpiraticus* hobby prey

由图 3 可知,在该试验条件下,狼蛛对果蝇组织液均有较强烈的反应,集中选择 80% 果蝇组织液浓度端口的蜘蛛比例最大,占 60%。在试验浓度范围内,有效分子扩散与浓度无正相关关系,可能存在 80% 果蝇组织液浓度左右气味有效分子最大化的临界值。

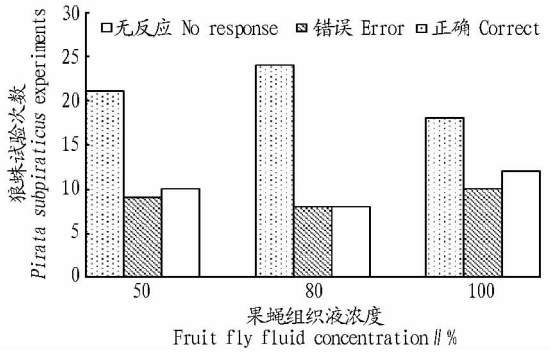


图 3 不同数量果蝇体内液分析

Fig. 3 Different quantity fruit flies tissue fluid analysis

2.2.2 间距对狼蛛定位猎物的影响。在排除温度和果蝇组织液浓度 80% 的影响下($A_2B_2C_2$),对比在 3 个不同间距情况下,狼蛛反应观察 300 s 后,观察到狼蛛定位猎物的灵敏度。

由图 4 可知,在 3 个距离梯度下,果蝇越近,狼蛛可接受的有效分子浓度越大,化学感受器灵敏度越高,在 6 cm 处达 60%,并且随着距离的增加,正确定位的狼蛛个数越来越少,错误定位和无反应的狼蛛个数不断增加,具有明显的规律性。

2.2.3 狼蛛反应时长对定位猎物的影响。试验观察时长的设定是以狼蛛放入实验设备中即开始计时。该研究将低温处理的狼蛛放在四臂嗅觉仪 A 点处,观察狼蛛开始苏醒活动触肢时,打开真空抽气泵开始计时试验狼蛛反应观察,并提出不同的时间设置。在距离 6 cm、果蝇组织液浓度为 80% 的条件下,直接记录最后蜘蛛所选择方向的正确率见表 1。在

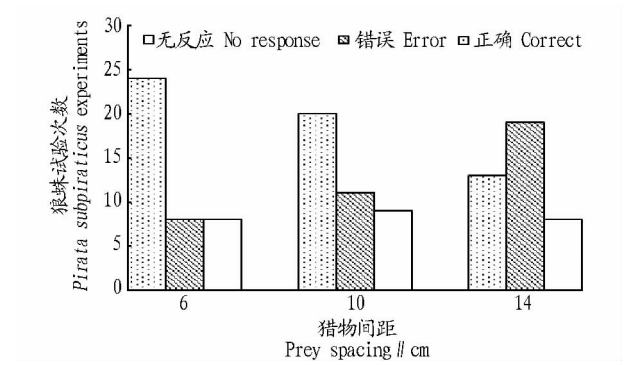


图4 间距梯度分析

Fig.4 Analysis of spacing gradient

距离 6 cm、果蝇组织液浓度为 80% 的条件下,测定狼蛛试验期间正确选择的比率见表 2。

表1 试验最终正确选择猎物比率

反应观察时长 Reaction observation time // s	正确端 The right side	错误端 The wrong side	无反应 No response	正确选择率 Correct selection rate // %
180	19	7	12	47.5
300	24	8	8	60.0
600	18	9	13	45.0

表2 试验期间正确选择猎物比率

反应观察时长 Reaction observation time // s	正确端 The right side	错误端 The wrong side	无反应 No response	正确选择率 Correct selection rate // %
180	27	7	6	67.5
300	32	4	4	80.0
600	25	11	4	62.5

根据狼蛛试验最终反应选择和狼蛛试验期间反应选择的正确方向进行分析,结果见图 5。

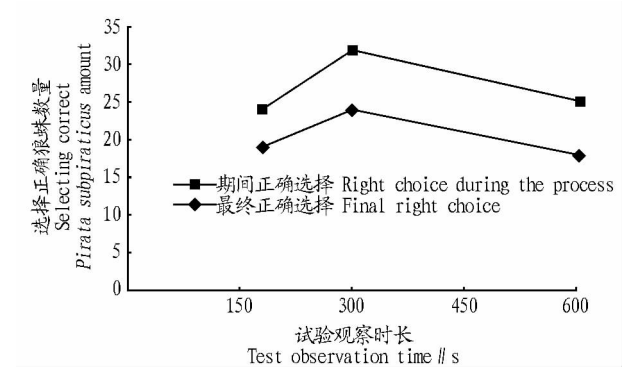


图5 试验观察正确选择比较

Fig.5 Comparison of experimental observation right choice

结果表明,试验最终选择有果蝇的狼蛛仅 45.0% 以上,而试验期间能够完成正确选择的狼蛛在 62.5% 以上。狼蛛尤为敏锐,嗅觉感受器做出选择的时间快、准确率高,但是随着时间推移气味逐渐扩散被抽出,准确率逐渐下降。狼蛛在试验期间选择正确,气味浓度降低离开正确端口,可能存在

气味浓度随着时间呈倒“U”型变化。试验以狼蛛最终选择为依据完成。

2.3 狼蛛嗅觉定位猎物最佳因子水平组合 根据试验方案提出 3 因素(猎物浓度、猎物距离、狼蛛反应时间)3 水平正交试验,依次测定狼蛛依靠嗅觉寻觅定位猎物的最佳组合因子。正交试验因素与水平见表 3。

表3 正交试验因素与水平

Table 3 Factors and levels of the orthogonal experiment

水平 Level	果蝇组织液浓度(A) Fruit fly fluid concentration // %	距离(B) Distance // cm	狼蛛反应观察时长(C) The observation time of <i>Pirata subpiraticus</i> reaction // s
1	50	6	180
2	80	10	300
3	100	14	600

极差最大,对试验结果影响最大,也就是最重要的因素水平。由表 4 可知,B 因素影响最大,C 因素影响最小。优方案应挑选每个因素 k 值最大的值对应的水平,所以优方案为 $A_2B_1C_1$,即当果蝇组织液浓度为 80%、间距为 6 cm、试验观察时长为 180 s 时,狼蛛的捕食反应速度达到最大值,为最优方案,但理论数据不一定为最后实际最优方案,故进行验证试验。

表4 正交试验方案及结果

Table 4 The orthogonal experimental scheme and result

试验号 Test No.	因素 Factors				正确选择率 Correct selection rate // %
	A	空列 Null	B	C	
1	1	1	1	1	52.5
2	1	2	2	2	50.0
3	1	3	3	3	17.5
4	2	1	2	3	52.5
5	2	2	3	1	42.5
6	2	3	1	2	60.0
7	3	1	3	2	32.5
8	3	2	1	3	47.5
9	3	3	2	1	52.5
k_1	40.0	45.8	53.3	49.2	
k_2	51.7	46.7	51.7	47.5	
k_3	44.2	43.3	30.8	39.2	
R	35.0	10.0	67.5	30.0	

在验证试验中,以狼蛛定位果蝇的正确率为指标,狼蛛定位果蝇的最佳因素组合是 $A_2B_1C_1$,狼蛛灵敏度最好。以理论计算所得最佳试验条件进行试验,与已完成的最佳试验组结果进行对比,将优方案 $A_2B_1C_1$ 与正交表中较好的第 6 号试验 $A_2B_1C_2$ 、第 1 号试验 $A_1B_1C_1$ 、第 4 号试验 $A_2B_2C_3$ 和第 9 号试验 $A_3B_2C_1$ 作对比试验,可以明显发现 $A_2B_1C_2$ 是真正的最优方案,狼蛛定位猎物的正确选择率为 60%,明显高于其他已进行过的试验结果(表 5)。

3 结论与讨论

试验证明狼蛛的化学感受器存在的同时,也发现了影响狼蛛定位猎物灵敏度的主次因素。通过 3 因素 3 水平对比

分析、正交试验检验,发现狼蛛依靠嗅觉定位猎物果蝇最佳优化组合为狼蛛反应观察 300 s、果蝇组织液浓度 80%、间距 6 cm,在上述条件下狼蛛的化学感受器定位猎物的灵敏度最高。

表 5 最佳试验条件验证结果
Table 5 The optimum conditions to verify the results

试验方案 The experimental scheme	正确选择率 Correct selection rate	错误选择率 Wrong selection rate	无反应 No response
A ₂ B ₁ C ₁	0.475	0.175	0.300
A ₂ B ₁ C ₂	0.600	0.200	0.200
A ₁ B ₁ C ₁	0.525	0.225	0.250
A ₂ B ₂ C ₃	0.525	0.250	0.225
A ₃ B ₂ C ₁	0.525	0.250	0.225

该研究结果为探明游猎型蜘蛛与猎物之间的信息联系机制提供了基础资料,有利于后续进行狼蛛的其他感受器作用的探测,以得出狼蛛在猎食果蝇的过程中嗅觉感受器配合选择猎物作用的侧重点及综合效应。了解和掌握狼蛛的行为特性,对于最大限度地保护和利用天敌蜘蛛、有机地结合其他措施,在害虫管理中减少化学农药的使用、保护生态环境、协调害虫控制效果具有重要意义。

该试验是通过狼蛛定位猎物果蝇,然后在试验过程中利用距离、果蝇体内组织液浓度、观察时间观察狼蛛的反应和测定相关数值。试验过程中仍存在以下问题:①所选用的间距数量级范围较大。由于受四臂嗅觉仪的最短中心距离限制,结论所得出的最佳距离无法进一步缩小间距,因此,对有效间距的临界点有待进一步研究。②试验设备的振动隔音。无法对装置四周进行完全隔音,所以在试验过程中可能存在

(上接第 7 页)

3 结论

从连云港青口卤水中分离纯化出一株嗜盐细菌 LYG2#,并对该细菌进行了多项分类学鉴定。根据 16S rRNA 基因序列相似性、生理生化特性研究以及系统发育学分析,判断 LYG2#为 *Spiribacter* 属的一个新种资源,命名为 *Spiribacter lygqingkouensis* sp. nov.。该菌可以耐受很广的盐浓度范围,其生长对盐浓度有严格的依赖性,是一株中度嗜盐菌。自然界中嗜盐微生物具有极其丰富的多样性,新发现的嗜盐微生物的数量也越来越多,人们对这些微生物的研究也逐渐深入,嗜盐菌在工业、农业、生物技术领域的应用也会越来越广泛。

参考文献

[1] 沈萍.微生物学[M].北京:高等教育出版社,2000:23-324.

一定回声或者是声音的干扰,从而对试验数据造成一定的影响。③气流问题。由于试验设备不够完善,无法测得试验中的详细流速,而且不少狼蛛在试验中出现被气流惊吓的情况,导致正确选择率水平明显低于文献报道的试验数据。

目前,国内对蜘蛛感受器选择方面的试验观察非常少,大多选择初始选择或最终选择,而试验全程观察记录狼蛛活动可发现狼蛛反应不同观察时长对正确选择率影响非常大,明显可见试验期间正确率高于初始或最终选择。该研究仅对拟水狼蛛的嗅觉作用进行了初步探测,以及狼蛛反应不同观察时长提出一定的试验设计依据,有关其具体的行为和作用机理有待进一步研究。

参考文献

[1] 许春华.中国狼蛛科的属级分类研究(蛛形纲:蜘蛛目)[D].保定:河北大学,2010.
[2] LI J Q,ZHAO Z M,HOU J J. Study foreground of spider in plant protection [J]. Plant doctor,2000,13(6):9-12.
[3] WEYGOLDT P. Communication in crustaceans and arachnids[M]//SE-BEOK T A. How animals communicate. Bloomington: Indiana University Press,1977:303.
[4] GASKETT A C. Spider sex pheromones;Emission,reception,structures,and functions[J]. Biological reviews,2007,82(1):27-48.
[5] DUMPERT K. Spider odor receptor;electrophysiological proof[J]. Experimentia,1978,34(6):754-756.
[6] 强兆雨,李生才. 蜘蛛捕食行为的研究[J]. 山西农业科学,2007,35(12):37-39.
[7] 吴六保,王洪全. 拟水狼蛛(*Pirata subpiraticus* Boes. et. str)生物学研究[J]. 长沙水电师院学报(自然科学版),1986,1(1):78-81
[8] 彩万志,庞雄飞,花保祯,等. 普通昆虫学[M].2版.北京:中国农业大学出版社,2011:340-411.
[9] 王立芹,杨俊英,唐龙妹,等. 单因素重复测量设计的方差分析及 SAS 与 SPSS 的实现[J]. 华北煤炭医学院学报,2005,7(1):17-19.
[10] 杨向东. 利用 Excel 进行单因素随机区组产比试验结果的统计分析[J]. 农业网络信息,2009(5):131-133.

[2] 李云海,于德爽,张培玉. 高盐度废水处理中优势耐盐菌鉴定与生长特性研究[J]. 青岛理工大学学报,2009,30(2):59-64.
[3] 周培瑾. 嗜盐细菌[J]. 微生物学通报,1989,16(1):31-34.
[4] KUSHNER D J. Microbial life in extreme environments[M]. London,United Kingdom:Academic Press,1978:317-368.
[5] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001.
[6] LALITHA M K. Manual on antimicrobial susceptibility testing[M/OL]. [2016-11-25]. <http://www.docin.com/p-55484591.html>.
[7] GERHARDT P,MURRAY R G E,WOOD W A,et al. Methods for general and molecular bacteriology[M]. Washington,DC:American Society for Microbiology,1994.
[8] SAITOU N,NEI M. The neighbor-joining method;A new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Mol Biol Evol,1987,4(4):406-425.
[9] LEÓN M J,FERNÁNDEZ A B,GHAI R,et al. From metagenomics to pure culture:Isolation and characterization of the moderately halophilic bacterium *Spiribacter salinus* gen. nov. sp. nov. [J]. Appl Environ Microbiol,2014,80(13):3850-3857.