

Trace Analytical and Electroantennographic Examination of Volatiles Released by Potential Host Trees and Volatiles Induced by *Anoplophora glabripennis* Infestation

MARTIN SCHOLZ AND STEFAN SCHÜTZ

Abstract

The Asian longhorned beetle (ALB) was introduced to several North American and European countries, causing huge damage to some cities' tree populations. In order to determine the host tree suitability of *Fagus sylvatica* and *Quercus robur*, volatile organic compounds (VOCs) from leaves of eight tree species were analyzed with GC/MS technique. Furthermore VOCs of wood infested with ALB was compared with those of uninfested wood and with those of wood infested with several European wood-boring insect species. Additionally, electroantennographic research was done with one of the major antagonists of ALB, *Dastarcus helophoroides*, to identify VOCs that are used by this insect to find trees infested with ALB larvae.

Keywords | *Anoplophora glabripennis*, *Fagus sylvatica*, *Quercus robur*, volatile organic compounds, host tree attraction

Kurzfassung

Spurenanalytische und elektroantennographische Untersuchungen von Volatilen potentieller Wirtsbäume sowie von durch Befall mit *Anoplophora glabripennis* induzierten Volatilen

Der Asiatische Laubholzbock (ALB) wurde in mehrere nordamerikanische und europäische Länder eingeschleppt und verursachte große Schäden an Stadtbäumen. Um die Eignung von *Fagus sylvatica* und *Quercus robur* als Wirtsbäume für den ALB abzuschätzen, wurden die Volatile (VOC) der Blätter von insgesamt acht Baumarten mittels Massenspektrometrie gekoppelter Gaschromatographie (GC/MS) untersucht. Weiterhin wurden die VOC von mit ALB-befallenem Holz mit jenen von gesundem Holz und mit heimischen holzbohrenden Insekten befallenem Holz verglichen. Zusätzlich wurden elektroantennographische Versuche mit einem natürlichen Antagonisten des ALB, *Dastarcus helophoroides*, durchgeführt, um VOC zu identifizieren, die dieses Insekt auf der Suche nach ALB-befallenen Bäumen nutzt.

Schlüsselwörter | *Anoplophora glabripennis*, *Fagus sylvatica*, *Quercus robur*, VOC, Wirtsbäume

Volatiles released by host and non-host trees

The leaf volatiles of the preferred host trees *Acer platanoides*, *Acer pseudoplatanus*, and *Acer saccharum*, and of the unfavoured tree species *Gleditsia triacanthos*, *Ailanthus altissima*, and *Liquidambar styraciflua* were collected by the Closed Loop Stripping Analysis (CLSA)

method and their constitution was observed with gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). The constitutions of these volatiles were compared with volatiles from *Fagus sylvatica* and *Quercus robur* to seek out the suitability of these two central European tree species for the ALB.

The research showed a vast variety among VOCs, but only 36 compounds regularly occurred in the different tree species' volatiles. Few compounds occurred in more than one species, the most important being (Z)-3-hexen-1-ol and (Z)-3-hexenyl acetate. Both substances were absent in the volatiles of *L. styraciflua* and (Z)-3-hexen-1-ol could not be found in *A. altissima*. Equal compounds connecting tree species with status as a host tree for ALB could not be found. According to the single substances in the VOC of the non-host tree species, *L. styraciflua* differed from *A. altissima* and *G. triacanthos*.

The two compounds known to be detected by ALB that also occur in the volatiles, (Z)-3-hexen-1-ol and (E)-2-hexenal (Li et al. 1999; Li et al. 2003), could not show any difference between the different tree species. Based on these two compounds, there is no difference between the tree species that provides a reliable indication of host tree suitability of *F. sylvatica* and *Q. robur*.

Based on these results, no reliable prediction of the host tree suitability of *F. sylvatica* and *Q. robur* can be made (Figure 1). VOCs of both species can be detected by the ALB, which is the first requirement for an infestation. Apparently, the ALB's host tree selection seems to be influenced by a mix of compounds rather than by only one compound of the volatiles. For example, (Z)-3-hexen-1-ol is reported to attract the ALB (Li et al. 2003). Since it also occurs in the VOC of *G. triacanthos*, it is unlikely that this compound alone causes the ALB to feed on/infest a certain tree. Moreover, since there is not a single common compound VOCs of *A. altissima*, *G. triacanthos*, and *L. styraciflua* in, there must be either more than one substance for repelling or different ways of repelling the ALB. Host tree selection by ALB females chewing oviposition sites might be at least partially influenced by the taste or constitution of the tree's bark or sap. Most likely it is not the VOC alone that determines whether a tree becomes infested by the ALB or not.

Volatiles induced by *Anoplophora glabripennis* infestation

Since larvae of ALB feed deep inside the trunk of a tree, it is very unlikely to detect infestations before the adults eclose and leave their significant exit holes. Hence, eradication measures often need to be carried out over many years even in small infestation sites. Additionally, there are several native European insect species that cause similar larval damage to trees that also belong to ALB's preferred host trees in Europe. Such insects are the leopard moth *Zeuzera pyrina*, poplar long-horned beetle *Saperda carcharias* or the European goat moth *Cossus cossus*.

A current project analyzes how much the VOCs of trees infested with ALB differ from healthy trees and trees infested with *Saperda carcharias* (Figure 2), *Zeuzera pyrina* and *Cossus cossus*. The samples were taken via the CLSA and Thermodesorption (TDS) methods from small stems of willow or poplar trees infested with the different insect species. The samples were then analyzed by GC-MS.

This project is still in progress but initial results show that there seem to be only minor differences between the VOCs of the different stems. There are hints that two substances might occur only in the VOCs of infested trees. These compounds might be sesquiterpenes (C-15 body) and do not seem to be related to a certain insect species but rather to an infestation of wood by a boring larva. These two compounds are only a minor part of the VOCs. The volatile concentrations released by infested wood in general seem to be very low compared to those of green-leaves.

In addition to the constitution of the VOC of infested wood, it will be determined how the natural enemy *Dastarcus helophoroides* utilizes infestation-induced VOCs during host-finding and parasitization of ALB larvae. This research is performed with the gas chromatographic-electroantennographic detection (GC-EAD) technique. Preliminary experiments show reactions of *D. helophoroides* to (Z)-3-hexen-1-ol, a common green-leaf volatile, and nonanal, one of the major compounds in the VOCs of wood-samples.



Figure 1: The general host tree suitability of European Beech (*Fagus sylvatica*) for the Asian Longhorned Beetle (*Anoplophora glabripennis*) remains uncertain (photo: Anna Plasil).

Abbildung 1: Die generelle Eignung der Rotbuche (*Fagus sylvatica*) als Wirtsbaum für den Asiatischen Laubholzbock (*Anoplophora glabripennis*) ist weiterhin unklar (Foto: Anna Plasil).

Acknowledgement

This project is supported by the graduation scholarship program of the German Federal Environment Foundation

(DBU). We are thankful for supporting our project.

Sponsored by



German – Deutsch

Volatile von Wirts- und Nicht-Wirtsbaumarten

Die Blattvolatile der vom ALB bevorzugt befallenen Baumarten *Acer platanoides*, *Acer pseudoplatanus* und *Acer saccharum* sowie die der gemiedenen Baumarten *Gleditsia triacanthos*, *Ailanthus altissima* und *Liquidambar styraciflua* wurden über die Closed Loop Stripping Analysis (CLSA)-Methode gesammelt und mittels GC/MS auf ihre Zusammensetzung untersucht. Um die Attraktivität von *Fagus sylvatica* und *Quercus robur* für den ALB abzuschätzen, wurden Volatile dieser Baumarten ebenfalls gesammelt und mit jenen der anderen Baum-

arten verglichen.

Die Blattvolatile der beprobten Baumarten sind insgesamt sehr verschieden. 36 Substanzen finden sich regelmäßig in den Volatilen, die wichtigsten waren dabei (Z)-3-Hexen-1-ol und (Z)-3-Hexen-1-yl-acetat. (Z)-3-Hexen-1-ol kommt regelmäßig in den Volatilen aller Baumarten außer *L. styraciflua* und (Z)-3-Hexen-1-yl-acetat bei allen Arten außer *L. styraciflua* und *A. altissima* vor. Substanzen, die die Baumarten nach ihrem Status als Wirtsbaum für den ALB trennen, wurden nicht gefunden. Auf Basis der in den Volatilen der Nicht-Wirtsbaumarten gefundenen Substanzen unterscheidet sich *L. styraciflua* deutlich von *A. altissima* und *G. triacanthos*.

Aufgrund der zwei Substanzen in den Proben, von denen bekannt ist, dass sie vom ALB wahrgenommen werden können, (Z)-3-Hexen-1-ol und (E)-2-Hexenal (Li et al. 1999; Li et al. 2003), konnte kein Unterschied zwischen den verschiedenen Baumarten festgestellt werden. Die Attraktivität von *F. sylvatica* und *Q. robur* als Wirtsbaum für den ALB kann daher auf Grundlage dieser Untersuchungen nicht sicher prognostiziert werden. Die Volatile beider Arten können vom ALB wahr-

genommen werden, was die erste Bedingung für einen Befall ist. Offensichtlich wird die Wirtsbaumwahl des ALB eher von einer Mischung aus verschiedenen Substanzen beeinflusst als nur von einem in den Volatilen vorkommenden Stoff. So wirkt beispielsweise (Z)-3-Hexen-1-ol attraktiv auf den ALB (Li et al. 2003), da es aber auch in den VOC von *G. triacanthos* auftritt, ist es unwahrscheinlich, dass diese Substanz allein dafür verantwortlich ist, dass der ALB an einem Baum frisst oder diesen befällt. Da die VOC von *A. altissima*, *G. triacanthos* und *L. styraciflua* nicht eine einzige Substanz gemeinsam haben, muss es umgekehrt auch mehr als nur eine auf den ALB anziehend wirkende Substanz oder unterschiedliche Wege der Repellenz geben. Die Wirtsbaumwahl insbesondere der die Eiablage-Grübchen herstellenden Weibchen scheint zumindest teilweise vom Geschmack und der Konsistenz der Rinde und des Baumsaftes zu sein. Sehr wahrscheinlich sind es nicht die VOC alleine, die beeinflussen, ob ein Baum vom ALB befallen wird oder nicht.

Durch ALB-Befall induzierte Volatile

Da die Larven des ALB tief im Holz eines Baumes fressen, ist es sehr schwierig, einen Befall vor dem Schlüpfen der Käfer zu entdecken. Die selbst bei kleinen Freilandausbrüchen oft mehrere Jahre dauernden Ausrotungsmaßnahmen der Behörden bezeugen dieses Problem. Weiterhin gibt es eine Reihe von einheimischen Insekten, die auch an vom ALB in Europa bevorzugten Baumarten einen vergleichbaren Larvenschaden verursachen. Dazu gehören das Blausieb (*Zeuzera pyrina*), der Große Pappelbock (*Saperda carcharias*) oder der Weidenbohrer (*Cossus cossus*).

Im Rahmen eines noch laufenden Projektes wird untersucht, inwieweit sich die VOC von ALB-befallenen Bäumen von denen gesunder Bäume und wie bzw. ob sich die VOC von mit *Saperda carcharias*, *Zeuzera pyrina* oder *Cossus cossus* befallenen Bäumen von jenen der ALB-befallenen Pflanzen unterscheiden. Die Proben werden dabei von mit den jeweiligen Arten befallenen Weiden- oder Pappelstecklingen über die CLSA- und Thermodesorptions-(TDS)-Methode genommen und anschließend durch GC-MS analysiert.

Erste Ergebnisse zeigen, dass zwischen den VOC der verschiedenen Stämme nur geringe Unterschiede



Figure 2: Larval damage caused by *Saperda carcharias* and other European insect species is similar to damage caused by Asian Longhorned Beetle (photo: Julia Schirmer).

Abbildung 2: Der Larvenschaden des Großen Pappelbockes (*Saperda carcharias*) und anderer europäischer Arten ist dem des Asiatischen Laubholzbockes sehr ähnlich (Foto: Julia Schirmer).

vorhanden sind. Es gibt Hinweise auf zwei Substanzen, die offenbar nur in den VOC der befallenen Stämme auftreten. Es handelt sich dabei möglicherweise um zwei Sesquiterpene, die anscheinend nicht auf eine spezielle Insektenart beschränkt sind, sondern generell eher auf dem Befall mit holzbohrenden Larven beruhen. Die beiden gefundenen Substanzen machen im Duftspektrum des befallenen Holzes mengenmäßig nur einen kleinen Teil aus. Prinzipiell sind die von befallenen Holz abgegebenen VOC deutlich geringer als zum Beispiel jene von grünen Blättern.

Zusätzlich zu den Untersuchungen über die Zusammensetzung der VOC befallener Stämme wird erforscht, an welchen Substanzen aus

diesem Duftspektrum sich *Dastarcus helophoroides*, ein natürlicher Antagonist des ALB, bei der Suche nach ALB-Larven im Holz orientiert. Diese Untersuchungen nutzen die Technik der mit Gaschromatographie gekoppelten Elektroantennographie (GC-EAD). Vorläufige Ergebnisse deuten auf Reaktionen von *D. helophoroides* auf (Z)-3-Hexen-1-ol hin, einen bedeutenden Grünblattduft, und Nonanal, einen Hauptbestandteil in den VOC der Holzproben.

Danksagung

Das Vorhaben wird durch das Promotionsstipendienprogramm der Deutschen Bundesumweltstiftung DBU gefördert. Wir danken für die Unterstützung.



References/Literatur

- Li, J. G., Luo, Y. Q., Jin, Y. J. 1999: Electroantennogram activity of Ash-leaf maple (*A. negundo*) volatiles to *Anoplophora glabripennis* (Motsch.). J. Beijing For. Univ., 21(4): 1-5.
- Li, J. G., Jin, Y. J., Luo, Y. Q., Xu, Z. C., Chen, H. J. 2003. Leaf Volatiles from Host Tree *A. negundo*: Diurnal Rhythm and Behavior Responses of *Anoplophora glabripennis* to Volatiles in Field. Acta Botanica Sinica 2003, 45 (2): 177 – 182.

Martin Scholz, Georg-August-University Göttingen, Buisen-Institute, Department for Forest Zoology and Forest Conservation, Buisenweg 3, 37077 Göttingen, Germany. Phone: +49-551-393636, E-Mail: mschol4@gwdg.de

Stefan Schütz, Georg-August-University Göttingen, Buisen-Institute, Department for Forest Zoology and Forest Conservation, Buisenweg 3, 37077 Göttingen, Germany. Phone: +49-551-393601, E-Mail: stefan.schuetz@forst.uni-goettingen.de