

异迟眼蕈蚊成虫行为学特征及性信息素初步研究*

张爽** 张绍勇 赵应苟 贾进伟 黄俊浩 陈安良***

(浙江农林大学 生物农药高效制备技术浙江省工程实验室, 临安 311300)

摘要 【目的】为了寻求高效无污染的防治害虫异迟眼蕈蚊 *Bradysia difformis* Frey 的方法。【方法】本文在人工气候室条件下, 采用行为、化学生态学等研究方法, 系统观察了异迟眼蕈蚊的羽化节律、交配行为, 并对其性信息素进行了初步研究。【结果】异迟眼蕈蚊羽化没有明显的昼夜节律, 雌虫在 16:00—21:00 达到羽化高峰, 雄虫羽化高峰出现在 17:00—23:00, 成虫在光期的羽化数量占总羽化数量的 72%。成虫的求偶交配行为多发生在羽化后 10 min 左右, 交尾时间 3 min 左右。异迟眼蕈蚊雄成虫在“Y”型嗅觉仪中对雌成虫及雌成虫腹部粗提物具有正趋向行为反应 ($P < 0.01$), 证明异迟眼蕈蚊雌虫释放性信息素。【结论】通过气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS) 对雌、雄成虫腹部粗提物进行化学分析, 得到雌成虫特有的 3 种化学物质: 正十二烷、正十六烷酸、(Z,Z)-9,12-十八烷二烯酸, 这些化合物可能是异迟眼蕈蚊雌成虫的性信息素成分。**关键词** 异迟眼蕈蚊, 羽化, 交尾行为, “Y”型嗅觉仪, 性信息素

Adult behavior and a preliminary study of the sex pheromones of *Bradysia difformis*

ZHANG Shuang** ZHANG Shao-Yong ZHAO Ying-Gou JIA Jin-Wei
HUANG Jun-Hao CHEN An-Liang***

(Provincial Engineering Laboratory of Biopesticide Preparation, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an 311300, China)

Abstract 【Objectives】To find an efficient and pollution-free method to control *Bradysia difformis* Frey. 【Methods】Systematic observation of the emergence and mating behaviors of *B. difformis* and a preliminary study of the chemical ecology of the sex pheromones of this species, including their effects on behavior was conducted under laboratory conditions. 【Results】Emergence had an obvious daily rhythm; the peak of female emergence was from 16:00 to 21:00 and that of males was from 17:00 to 23:00. Adults accounted for 72% of the total population during daylight, and could copulate for about 3 minutes ten minutes after emergence. Biological activity tests showed that both female adults and a primary extract of sex pheromone from the female abdomen were attractive to the males ($P < 0.01$). 【Conclusion】GC/MS was used to analyze the constituents of the primary sex pheromone extracted from adult females. Three potential components of the sex pheromone were found; dodecane, n-Hexadecanoic acid and (z,z)-9,12-octadecadienoic acid.

Key words *Bradysia difformis*, emergence, mating, bioassay, sex pheromone

眼蕈蚊科 (Sciaridae) 昆虫是食 (药) 用菌中最常见的一类害虫。可为害食用菌的约有 20

种, 主要有厉眼蕈蚊属 (*Lycoriella*)、迟眼蕈蚊属 (*Bradysia*) 和模眼蕈蚊属 (*Plasosciara*) 等

* 资助项目: 浙江省科技厅公益性项目 (2013C32082)

**E-mail: zhangshuangwks@163.com

***通讯作者, E-mail: anlchen@126.com

收稿日期: 2013-08-28, 接受日期: 2014-04-18

(沈登荣等, 2008)。异迟眼蕈蚊 *Bradysia difformis* Frey 是食用菌菇房内的主要害虫 (White *et al.*, 2000; Hurley *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2012)。因其体形小, 为害隐蔽, 繁殖能力强, 难以在危害早期被察觉, 一旦发现成虫, 大部分菌棒都已受害。

目前对眼蕈蚊的防治以化学防治为主, 而食用菌上残留的药剂对人体有毒害作用。探索高效、无毒、无污染防治异迟眼蕈蚊的新方法、新途径具有一定科学意义和应用前景。应用昆虫性信息素防治农林害虫具有对天敌无害、对环境无污染、产品无残留等特点而受到重视与应用。迄今为止, 被证实释放性信息素的眼蕈蚊科昆虫有迟眼蕈蚊属的 *B. tritici* (Casartelli *et al.*, 1971) 和 *B. impatiens* (Alberts *et al.*, 1981) 和 *B. odoriphaga* Yang *et Zhang* (Li *et al.*, 2007), 以及厉眼蕈蚊属的 *Lycoriella mali* (Kostelc *et al.*, 1980), 但这些眼蕈蚊的性信息素结构都未最终确认。Li 等 (2008) 曾对韭菜迟眼蕈蚊 *Bradysia odoriphaga* 的成虫行为和化学性信息素进行了初步研究。目前国内外对异迟眼蕈蚊的生物学、为害和防治认识的相关研究尚不深入, 尤其是对性信息素研究鲜有报道。

本研究在室内对迟眼蕈蚊羽化、交配行为特征进行了系统研究, 并初步确定了性信息素的存在及成分, 以期开展有关其化学生态学研究及综合治理奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 供试昆虫

2012 年 9 月上旬在浙江省临安市异迟眼蕈蚊幼虫为害严重的平菇菇房内, 选择健壮活性强的雌雄成虫带回室内 [$(26 \pm 1)^\circ\text{C}$, RH 70% \pm 5%, L:D=16:8 (光照时间 5:00—21:00, 黑暗时间 21:00—5:00)], 用种植后腐烂的蚕豆饲养。

1.2 成虫性行为室内观察

于 2012 年 9 月份异迟眼蕈蚊羽化盛期, 每隔 1 h 记录养虫笼 (30 cm \times 30 cm \times 30 cm) 内雌、

雄虫羽化数量, 连续记录 24 h, 以确定雌、雄虫羽化高峰时间。将新羽化成虫的以雌、雄性比 1:1, 1:2, 1:3, 2:1 和 3:1 的配比放在 50 mL 三角瓶里, 用纱布封口, 观察交尾行为。求偶行为的判断标准是雌虫产卵器外伸, 雄虫振翅、弯腹 (张宏瑞等, 2008)。

1.3 成虫腹部粗提物的提取

将处于求偶高峰的 300 只未交尾的雌虫放在 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱里冷冻 5 min 后用眼科剪剪下腹部, 放入预先装有 1.5 mL 重蒸正己烷的样品瓶 (内径 1.3 cm, 高 3.5 cm, 购于安捷伦公司) 内。室温下浸提 2 h 后, 去除虫体, 取上清液至另一个 1.5 mL 的样品瓶内, 用氮气浓缩至 150 μL , 然后置于 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱贮存备用。用同样方法得到雄成虫腹部粗提物, 试验重复 3 次。

1.4 生物活性测定

用“Y”型嗅觉仪 (主臂 30 cm, 两侧臂 15 cm, 两臂夹角 75 $^\circ$, 主管内径 6 cm, 侧壁内壁直径 4 cm) 测定未交尾雌、雄成虫对各种味源的行为反应, 具体设置见表 1。在“Y”型嗅觉仪两臂各连 1 个味源瓶, 盛不同味源物, 在各瓶前接一个蒸馏水瓶, 在蒸馏水前接活性炭瓶, 以净化和润湿空气, 控制气流流量 100 mL/min。

1.5 提取物的 (GC-MS) 分析条件

Agilent technologies 气质联用色谱仪 (7890AGS system, 7693Autosampler, 5875C insert MSD), FID 氢火焰离子化检测器, 载气为氦气, 流速 1 mL/min, HP-INNOWAX 毛细管柱 (30 m \times 0.32 mm \times 0.50 μm), Agilent 化学工作站。进样量 1 μL , 分流比 10:1。升温程序为起始温度 60 $^\circ\text{C}$, 保持 2 min, 以 30 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 190 $^\circ\text{C}$, 再以 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 230 $^\circ\text{C}$, 保持 10 min。电离方式 EI, 电离能量为 70 eV, 进样口温度 250 $^\circ\text{C}$, 检测器温度 250 $^\circ\text{C}$, 质量扫描范围为 30~350 amu。

1.6 数据处理

试验数据使用 SPSS13.0 统计软件进行 χ^2 检验。

2 结果与分析

2.1 成虫交配行为活动规律

室内观察表明异迟眼蕈蚊的羽化没有明显的昼夜节律(图 1)。雌虫在 16:00—21:00 达到羽化高峰,雄虫在 17:00—23:00 达到羽化高峰,成虫在光期的羽化数量占总羽化数量的 72%,雌虫与雄虫在光期的羽化比例分别为 68%和 76%,雌虫的羽化数量要高于雄虫数,雌雄性比大于 1:1。

初羽化的异迟眼蕈蚊,飞翔能力弱,羽化后成虫会在羽化地附近爬行一段时间。随着发育进展,雄虫比雌虫活跃,雌虫在养虫笼的四周静止,很少活动。羽化后约 10 min 雌虫外伸产卵器,雄虫飞向雌虫,并在其周围振翅、爬行,在接触到雌虫前,雄虫弯曲腹部,用尾部去接触雌虫的腹部;交尾过程中,雄虫伸出抱握器,紧抱住雌

虫外生殖器,雄虫身体旋转 180° 角,雌、雄虫体成 180° 角,呈“一”字形状态,同时雄虫两翅会展开成“V”行,以保持身体平衡,交尾持续时间在 3 min 左右。交尾完成后,雄虫在交尾地附近休息一段时间离开,雌虫一般不动。通过交尾行为观察发现,在雌雄成虫交尾过程中,如有第 2 只雄虫欲与雌虫进行交尾,正在交尾的一对蕈蚊会立即离开,以阻止第 2 只雄虫的交尾。交尾过的雌虫不会再进行交尾,若有其它的雄虫试图与其交尾,雌虫尾部弯曲并离开。雄虫存在多次交尾现象,交尾过的雄虫可与其它雌虫进行再次交尾。

在异迟眼蕈蚊交尾行为的观察中发现有雄雄抱握的现象:一只雄虫不动,另一只爬向雄虫并表现交尾行为,两只雄虫抱握器接触不到 2 s 便分开。此外,还存在雄虫与已死亡雌虫交尾的现象,交尾的时间大约为 3 min。

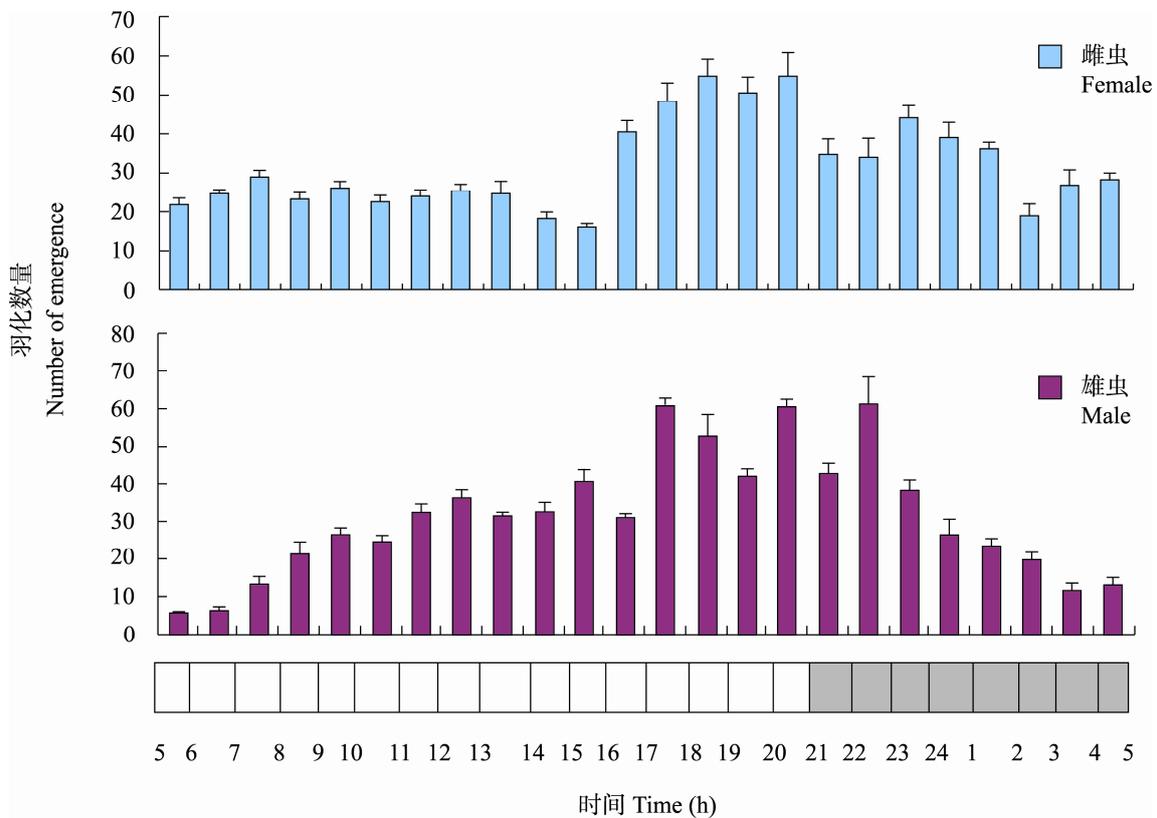


图 1 异迟眼蕈蚊雌、雄虫的羽化节律

Fig. 1 Emergence rhythm of female and male *Bradysia difformis*

2.2 生物活性测定

雄成虫对雌成虫、雌成虫腹部提取物选择具有明显趋性 ($P < 0.01$); 雄成虫对雌成虫的选择行为为无显著性影响 ($P = 0.138$, $P = 0.765$)。这说明雌成虫释放性信息素, 其腹部粗提物含有一定量的性信息素成分。

2.3 粗提物的 GC-MS 分析比较

用正己烷作为提取溶剂得到的雌、雄成虫浸提物离子流图见图 2。将雌、雄成虫浸提液离子流图进行比较, 在保留时间为 8.102, 10.390, 12.000 min 时, 雌成虫腹部浸提物特有的组分为: 正十二烷、正十六烷酸、(Z, Z)-9, 12-十八烷二烯酸。因此可以初步推测以上化合物可能是异迟眼蕈蚊信息素成分。

3 讨论

通过室内条件下对异迟眼蕈蚊成虫羽化行为为节律的观察研究, 发现异迟眼蕈蚊的羽化没有明显的昼夜节律, 雌虫在 16:00—21:00 达到羽化

高峰, 这段时间可能也是雌虫释放性信息素的高峰期, 为提取性信息奠定基础。雄虫羽化高峰出现在 17:00—23:00 (图 1), 暗期蕈蚊羽化数只占总羽化数的 28%, 雌雄性比大于 1:1, 交尾时间 3 min 左右, 雄虫有多次交尾现象。这与张宏瑞等 (2008) 在菇房内观察发现异迟眼蕈蚊羽化多发生在傍晚至次日上午, 雌雄性比一般大于 1:1, 雄虫有多次交尾现象所得的结果大体一致, 均证明异迟眼蕈蚊的整个种群雌多雄少, 雌虫一生只交尾一次。羽化时间的差异可能是昆虫受外界环境 (光照、温度、湿度) 因子的影响而引起改变。

到目前为止, 全世界已经鉴定和合成的昆虫性信息素或类似物达到 2 000 多种 (孟宪佐, 1997)。其中已鉴定的瘿蚊科昆虫性信息素是含有酰基短链烷烃的酯类化合物; 毛蠓科和潜蝇科昆虫是萜烯类物质; 实蝇科昆虫是烷烃 (Claude, 2007)。眼蕈蚊科昆虫由于虫体小, 观察和实验难度大, 在性信息素方面研究比较少, 目前只有 *Lycoriella mali* 的性信息素已被鉴定为正十七烷

表 1 异迟眼蕈蚊成虫行为反应的“Y”型嗅觉仪测定
Table 1 Behavioral responses of adult *Bradysia difformis* Frey in “Y” olfactometer

实验号 Test number	供试♀/♂ 成虫数 The number of test female/male adult	处理 Treatment		趋向各味源瓶 的♀/♂数 The number of female/male trend to each odor source		选择率 (%) Selectivity		χ^2 值及显著性 Chi square value and significance
		A	B	A	B	A	B	
1	45♂	10♀	10♂	36	9	80.00	20.00	16.588*
2	46♂	10♂	空白 Blank	22	24	47.83	52.17	0.093NS
3	45♂	10♀	空白 Blank	37	8	82.22	17.78	18.679*
4	28♀	10♀	10♂	18	10	64.27	35.73	2.227NS
5	36♀	10♂	空白 Blank	17	19	47.22	52.78	0.089NS
6	46♀	10♀	空白 Blank	22	24	47.83	52.17	0.088NS
7	54♂	雌虫浸提液 Female extract	正己烷 Hexane	39	15	72.22	27.78	10.608*

NS 为差异不显著 ($P > 0.01$), * 为差异显著 ($P < 0.01$)。

NS means no obvious difference ($P > 0.01$), * means significant difference ($P < 0.01$).

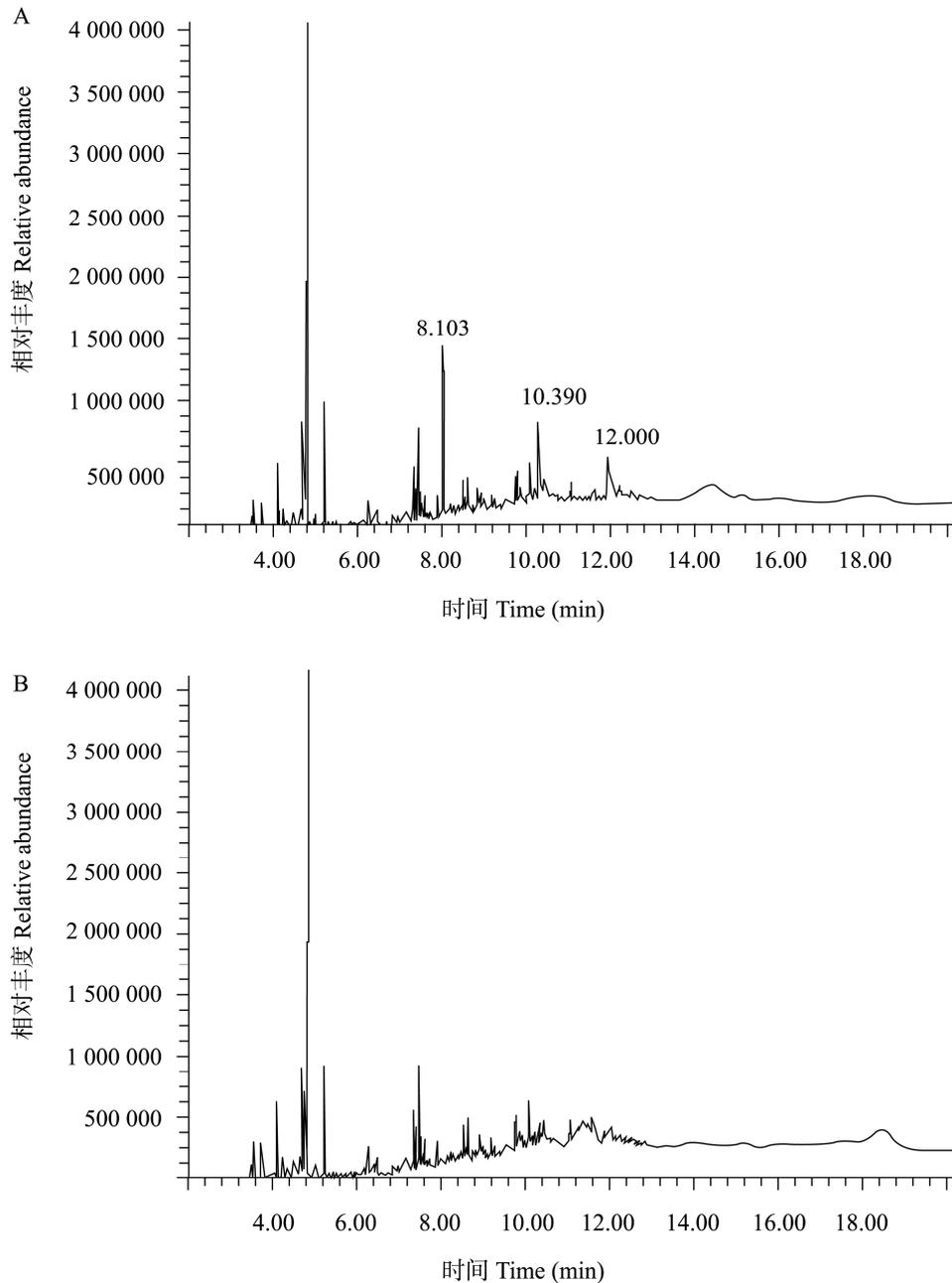


图 2 异迟眼蕈蚊雌成虫 (A) 和雄成虫 (B) 腹部浸提成分的总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatogram of abdomen extracts from female (A) and male (B) *Bradysia difformis*

(Kostelc *et al.*, 1980), 但在活体测定中并未见引诱效果 (Gotoh *et al.*, 1990)。

室内观察和生物活性测定结果表明, 异迟眼蕈蚊雌成虫释放性信息素, 能够引起雄成虫振翅表现出交尾行为。雌成虫性信息素的释放和雄成虫的求偶、交尾行为表现出一定的节律性, 这与 Haynes 等 (1983) 和 Pope 等 (1984) 对于昆虫的性行为 and 性信息素产生与释放节律均存在一

致性相符合。本试验通过对雌、雄成虫腹部信息化学物质的研究, 采用 GC-MS 分析初步得出的主要成分为正十二烷、十六烷酸和 (Z, Z)-9, 12-十八烷二烯酸。单组分物质进行“Y”型嗅觉仪测试时都表现出一定的活性, 但异迟眼蕈蚊性信息素是否为这 3 种物质以及比例如何还需通过触角电位-气谱联用仪 (GC-EAD)、微量化学反应分析以及田间实验来证明。

参考文献 (References)

- Alberts SA, Kennedy MA, Carde RT, 1981. Pheromone mediated anemotactic flight and mating behavior of the sciarid fly *Bradysia impatiens*. *Environ. Entomol.*, 10(1): 10–15.
- Casartelli C, Schreiber LR, Toledo LA, Baslio VL, De Magalhaes LE, 1971. Sex-pheromones in *Bradysia tritici*. *Experientia*, 27(9): 1096–1097.
- Claude WT, 2007. Pheromonal communication involved in courtship behavior in Diptera. *J. Insect Physiol.*, 53(11): 1089–1100.
- Gotoh T, Nakamura K, Tokoro M, Nakashima T, 1999. Copulatory behaviour and sex pheromones in sciarid fly, *Lycoriella mali* (Fitch) (Sciaridae: Diptera). *Jpn. J. Appl. Ent. Zool.*, 43(4): 181–184.
- Haynes KF, Gaston LK, Pope MM, Baker TC, 1983. Rate and periodicity of pheromone release from individual female artichoke plume moths, *Platytilia carduidactyla* (Lepidoptera: Pterophoridae). *Environ. Entomol.*, 12(5): 1597–1600.
- Hurley BP, Govender P, Coutinho TA, Wingfield BD, Wingfield MJ, 2007. Fungus gnats and other Diptera in South African forestry nurseries and their possible association with the pitch canker fungus. *S. Afr. J. Sci.*, 103(1/2): 43–46.
- Kostelc JG, Girard JE, Hendry LB, 1980. Isolation and identification of a sex attractant of a mushroom-infesting sciarid fly. *J. Chem. Ecol.*, 6(1): 1–11.
- Li HJ, He XK, Zeng AJ, Liu YJ, Jiang SR, 2007. *Bradysia Odoriphaga* copulatory behavior and evidence of a female sex pheromone. *J. Agric. Urban Entomol.*, 24(1): 27–34.
- Li HJ, He XK, Zeng AJ, 2008. Evidence of a female sex pheromone in *Bradysia odoriphaga* (Diptera: Sciaridae). *Can. Entomol.*, 140(3): 324–326.
- Pope MM, Gaston LK, Baker TC, 1984. Composition, quantification and periodicity of sex pheromone volatiles from individual *Heliothis zea* females. *J. Insect Physiol.*, 30(12): 943–945.
- Santos A, Zanetti R, Almado RP, Serrão JE, Zanuncio JC, 2012. First report and population changes of *Bradysia difformis* (Diptera: Sciaridae) on *Eucalyptus* nurseries in Brazil. *Florida Entomologist*, 95(3): 569–572.
- White PF, Smith JE, Menzel F, 2000. Distribution of *Sciaridae* (Dipt.) species infesting commercial mushroom farms in Britain. *Entomol. Mon. Mag.*, 136(1636/1639): 207–209.
- White PF, 1981. Chemical control of the mushroom Sciarid *Lycoriella auripila* (Winn.). *Mushroom Sci.*, 11(6): 265–273.
- 孟宪佐, 1997. 昆虫性信息素的应用. *生物学通报*, 32(3): 46–47.
- 沈登荣, 张宏瑞, 张陶, 2008. 我国食用菌眼蕈蚊的研究现状. *中国食用菌*, 27(1): 48–50.
- 张宏瑞, 张晓云, 沈登荣, 张陶, 李正跃, 2008. 食用菌异迟眼蕈蚊 *Bradysia difformis* 的生物学特性. *中国食用菌*, 27(6): 54–56.