

异色瓢虫体表物质对雄性个体交配前识别行为的影响*

王若琳** 邢庆江 王杏杏 张毅***

(青岛农业大学植物医学学院, 青岛 266109)

摘要 【目的】异色瓢虫 *Harmonia axyridis* 对不同体色个体有交配偏好, 并能识别死亡瓢虫, 雄虫对体表物质的识别影响交配过程。本研究旨在明确不同体色以及死亡前后异色瓢虫体表物质对交配前识别过程的影响; 探究体表主要物质的组成以及不同性别、体色、死亡和活体异色瓢虫体表物质的差异。【方法】首先验证雄性异色瓢虫对不同交配对象的选择偏好; 利用行为分析软件和仿真瓢虫, 分析异色瓢虫对不同交配对象的行为模式差异; 通过洗脱分析法, 对多种不同体色的异色瓢虫雌虫及死亡和活体的异色瓢虫鞘翅进行有机溶剂洗脱和 GC-MS 检测, 对物质进行定性检测, 并定量分析不同体色、活体及死亡个体之间的物质差异。【结果】雄性异色瓢虫对黑底雌虫交配对象具有偏好; 正己烷洗脱后的鞘翅对雄虫吸引力显著降低 ($P < 0.01$); 在交配过程中雄虫可以识别死亡个体; 物质分析证实 9-十九烯 (9-Nonadecene) 和 1,15-十五烷二醇 (1,15-Pentadecanediol) 两种碳氢化合物在不同鞘翅底色、性别之间存在显著差异 ($P < 0.05$), 异色瓢虫死亡 1 周后有鞘翅表面 4 种物质被检测到含量变化, 但未能成功鉴定。【结论】雌性异色瓢虫鞘翅表面的物质对于雄虫的交配识别产生影响, 不同色型的雌虫对雄虫吸引能力不同, 死亡瓢虫被有效识别可能和其体表物质差异有关。对异色瓢虫体表物质的系统性研究能加深对其交配过程的理解, 并有潜力应用于异色瓢虫的人工繁育调控过程中。

关键词 异色瓢虫; 交配; 接触识别; 碳氢化合物

The effect of female coloration and cuticle substances on mate choice in male *Harmonia axyridis*

WANG Ruo-Lin** XING Qing-Jiang WANG Xing-Xing ZHANG Yi***

(College of Plant Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract [Aim] To examine how different female colorations, along with surface substances on the cuticle of the ladybird *Harmonia axyridis*, before and after death, affect male mating preferences. [Methods] A preliminary analysis of the composition of the main cuticle surface substances of males and females, and live and dead, *H. axyridis* was conducted. Behavioral analysis software and simulated ladybirds were then used to investigate differences in behavior towards various potential mates. Solvent extraction and GC-MS analysis were carried out on elytra from several different colorations of live and dead female *H. axyridis*, to qualitatively identify surface substances, and quantitatively analyze the differences between different colored, and between live and dead, individuals. [Results] Male *H. axyridis* exhibit a mating preference for females with black elytra; however, the attractiveness of elytra washed with hexane to males was significantly reduced ($P < 0.01$). Males were able to identify dead individuals during the mating process. Chemical analysis confirmed significant differences ($P < 0.05$) in two hydrocarbons—9-nonadecene and 1,15-pentadecanediol—between sexes and across elytra with different background colors. One week after the death of *H. axyridis*, significant quantitative changes were detected in four surface

*资助项目 Supported project: 山东省自然科学基金 (ZR2021MC109)

**第一作者 First author, E-mail: 2605737620@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: yizhang085@qau.edu.cn

收稿日期 Received: 2025-02-02; 接受日期 Accepted: 2025-04-18

substances on the elytra, but these compounds could not be successfully identified. **[Conclusion]** The surface substances of female *H. axyridis* elytra influence male mating preferences, with different colored females varying in their level of attractiveness towards males. Recognition of dead females may also be linked to differences in elytra compounds. Systematic research on the surface substances of ladybirds both improves our understanding of their mating processes and the artificial breeding of these useful biological control agents.

Key words *Harmonia axyridis*; mating; contact recognition; hydrocarbons

异色瓢虫 *Harmonia axyridis*, 在分类学中隶属于鞘翅目 Coleoptera, 多食亚目 Polyphage, 瓢虫科 Coccinellidae, 瓢虫亚科 Coccinellinae, 瓢虫族 Coccinellini, 和谐瓢虫属 *Harmonia* (庞虹等, 2004)。异色瓢虫在我国一年的世代数根据所生活的区域环境不同而存在着较大的差异, 可发生 2-8 个世代 (王小艺和沈佐锐, 2002), 属于完全变态昆虫, 全部发育阶段包括卵、1-4 龄幼虫、蛹、成虫四个阶段。蚜虫 (如桃蚜 *Myzus persicae*、棉蚜 *Aphis gossypii*、小麦蚜虫 *Sitobion avenae*) 和粉虱 (如烟粉虱 *Bemisia tabaci*) 是常见的农业小型害虫, 异色瓢虫作为其重要的捕食性天敌对这类害虫的取食量极大, 且明显高于其它捕食性瓢虫, 在蔬菜害虫防控中发挥着关键作用 (Ferran *et al.*, 1996; Snyder *et al.*, 2004; 王甦等, 2007)。此瓢虫及其改良品系在国内外已经较大规模的应用甚至已经商业化生产, 并带来一定的防治成果 (Buntin and Bouton, 1997; Tourniaire *et al.*, 2000; 张帆等, 2011, 2015; Koch and Costamagna, 2017)。

异色瓢虫能够借助对物理信息的感知, 近距离获得猎物信息。例如, 它可通过感知植株茎叶颜色等物理信息 (Mondor and Warren, 2000), 更有效地在区域内搜索猎物并提升捕食成功率, 同时也利于寻找配偶与聚集活动。在二星瓢虫 *Adalia bipunctata* 的研究中发现, 雄性瓢虫能准确辨别不同死亡时间的雌虫, 并对新近死亡的雌虫表现出强烈的交配倾向, 但随着死亡时间延长, 这种反应逐渐减弱直至消失 (Obata, 1987; Hemptinne *et al.*, 1996, 1998)。基于以上研究推测, 刺激雄虫的关键物质含量可能随生命活动停止而逐渐降低; 换言之, 此类物质在活体中处于动态平衡状态, 一旦生命终止便会逐渐代谢分解

或流失, 需通过生命活动持续补充以维持其浓度。二星瓢虫交配偏好行为的研究表明, 瓢虫鞘翅表面的物质对交配前的识别选择具有重要的作用, Hemptinne 等 (1996, 1998) 发现通过氯仿洗脱过的雌性二星瓢虫鞘翅刺激雄虫, 雄虫不会产生反应; 而重新涂抹氯仿提取物之后, 雄虫开始显现反应, 这一现象证明了瓢虫鞘翅上存在某种或多种物质, 能够刺激雄虫并明确对方属于可交配对象 (即雌虫), 后续研究进一步验证了这些关键物质需通过接触识别, 且属于较难挥发的物质 (Hemptinne *et al.*, 1996, 1998)。

异色瓢虫体色表现出复杂的多样性, 其黑色素斑纹的高度可塑性是这种色斑多样性的关键生理基础之一 (Koch, 2003; 唐斌等, 2012; Zhang *et al.*, 2020)。异色瓢虫在不同发育阶段都存在表型多样性现象, 受遗传因素影响, 异色瓢虫成虫可分为黄底型 (f. *succinea*, 黄底黑斑, 斑点数目不定) 和黑底型, 其中黑底还可细分为二窗 f. *conspicua*、四窗 f. *spectabilis*、黑底黄斑 f. *axyridis* 等, 这些特征在交配后还会表现出镶嵌性状, 导致后代斑点更加复杂化。在繁殖过程中, 异色瓢虫在不同的外界环境条件下可能会对特定颜色的伴侣更感兴趣 (Osawa and Nishida, 1992; Wang *et al.*, 2010; 唐斌等, 2012)。

在本研究中, 将碳氢化合物 (Hydrocarbons, HCs) 作为重点关注对象。昆虫表皮是碳氢化合物运输及沉积的一个重要器官, 碳氢化合物类主要分布在昆虫表皮外侧, 在外包膜上覆盖的蜡质层 (Lipid layer) 或蜡层 (Wax layer) 中, 因此是接触时最先被感知到的物质 (Chen *et al.*, 2016; Noh *et al.*, 2016)。昆虫表皮上的 HCs 主要是脂肪族链状化合物, 通常是由直链烷烃、不饱和烷烃和甲基支链烃组成的复杂混合物, 其碳链长度

多在 20-50 碳原子范围内, 较难挥发, 但易被有机溶剂洗脱 (Calla *et al.*, 2018)。表皮碳氢化合物 (Cuticular hydrocarbons, CHCs) 在昆虫体表上作为重要的物理屏障抵御外来伤害。除此之外, CHCs 还可以防止水分的流失, 维持昆虫体内水分平衡 (Qiu *et al.*, 2012); 已有研究证实 CHCs 在昆虫个体或者群体之间可以作为化学交流信号 (如接触性信息素等), 起到信息交流的作用 (Howard and Blomquist, 2005); CHCs 在异色瓢虫的冬季聚集行为中起重要作用, 是引起瓢虫感知集体环境的关键化学信号 (Durieux *et al.*, 2015)。

基于对异色瓢虫交配选择偏好行为及其研究现状的分析, 本研究以雄虫对死亡个体的识别和不同体色交配对象的偏好为切入点, 通过比较不同交配对象的鞘翅表面物质组成以及交配前的识别行为模式, 探讨异色瓢虫交配识别和偏好产生的生化机制。本研究有助于深化对异色瓢虫交配选择过程的理解, 并可能为其人工繁育和交配调控提供技术借鉴和理论支撑。

1 材料与方法

1.1 试虫准备

本研究采用异色瓢虫作为研究对象, 采集于青岛市内 (36.320°N, 120.390°E) 景观树木, 采集后的所有试虫养殖于人工气候箱内 (RGD-500C, 合肥右科仪器设备有限公司), 环境设置为 25 °C, 相对湿度 50%, 光周期 16L : 8D, 以充足的豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 饲喂。豌豆蚜也饲养于室内人工气候箱内, 采用寄主植物蚕豆 *Vicia faba* 饲养, 蚕豆株高 15-30 cm, 环境设置为 20 °C, 相对湿度 50%, 光周期 14L : 10D。通过自交纯化、体视镜观察筛选等方式获得具有不同色斑型的异色瓢虫成虫用于后续试验。

1.2 试验设置

1.2.1 异色瓢虫对不同交配对象的选择偏好

首先将新羽化 2 h 内的异色瓢虫刺吸隔离,

连续饲养一周以上, 保证其达到性成熟, 可以进行交配行为。此后依据性别和鞘翅底色不同将其分为 4 种类型: (1) 黄底雌性个体; (2) 黑底雌性个体; (3) 黄底雄性个体; (4) 黑底雄性个体。

按照以上 4 种分类将异色瓢虫成虫分为以下两组 (每组 40 次重复):

①鞘翅黑底色雄性 (40 头) vs 鞘翅黑底色雌性 (40 头) + 鞘翅黄底色雌性 (40 头), 共计 120 头。

②鞘翅黄底色雄性 (40 头) vs 鞘翅黑底色雌性 (40 头) + 鞘翅黄底色雌性 (40 头), 共计 120 头。

另设活体与死亡个体的对照: 致死方式为黄底雌成虫 CO₂ 处理致死, 常温放置 7 d, 具体设置为 (每组 40 次重复):

①鞘翅黑底色雄性 (40 头) vs 鞘翅黄底色雌性 (40 头) + 死亡鞘翅黄底色雌性 (40 头), 共计 120 头。

②鞘翅黄底色雄性 (40 头) vs 鞘翅黄底色雌性 (40 头) + 死亡鞘翅黄底色雌性 (40 头), 共计 120 头。

将 3 头供试异色瓢虫 (1 雄 2 雌, 按照上文方案设置组合) 置于直径 90 mm 的玻璃培养皿中, 底部垫上滤纸, 摄像头连接计算机外录卡进行录制, 6 h 后结束录像, 将录像文件进行观察并分析结果。依据 Obata (1987) 对异色瓢虫交配行为的系统研究, 本试验中成功交配的定义标准为出现雄虫在背部抱握住雌虫, 并出现外生殖器伸出和雌雄结合, 并且雄虫表现出左右快速摆动的交配行为, 摆动持续时间超过 30 s 即认定为成功交配。

1.2.2 异色瓢虫雄虫对不同仿真雌虫的识别行为分析 对照组: 取羽化后一周以上的黄底异色瓢虫雌成虫, -80 °C 超低温致其死亡 (防止反射性出血导致鞘翅被污染), 取下左右两侧鞘翅备用;

洗脱处理组: 相同处理获得的鞘翅, 采用正己烷分 3 次洗脱处理, 每次 3 min;

仿真雌虫制作: 将热熔胶枪设定至 200 °C 进行加温, 采用 EVA 树脂制作直径约 5 mm 的

半球形热熔胶液滴,凝固后粘贴鞘翅。

雄虫对模拟雌虫的接触感知行为观测:采用直径 90 mm 的培养皿作为行为观测区域,选择羽化一周以上,性成熟的异色瓢虫雄性成虫,使用摄像头连接采集卡录制 12 h,将视频采集数据导入 The observer XT(V16.0, Noldus Information Technology, Wageningen, the Netherlands) 行为观察分析系统中,设置采用特征定义法,识别追踪对象为雄虫,追踪对象行动轨迹,用于分析量化行为模式。分析获得雄虫在面对不同处理的模拟雌虫时的典型爬行轨迹图,此外还测定了雄虫爬行速度、在模拟雌虫附近停留时长,以及它们与模拟雌虫之间的平均距离。本实验进行了 15 组重复。对获取到的数据进行正态分布验证和方差齐次性验证后,复合单因素方差分析的标准,采用 SPSS (v. 22; IBM Corp., Armonk, NY, USA) 对数据进行差异性检验, $P < 0.05$ 认定为存在显著性差异(两两比较:独立样本 t 检验;多组比较:单因素方差分析, One-way ANOVA)。

1.2.3 不同底色异色瓢虫鞘翅表面碳氢化合物的提取和定性、定量分析 准备不同底色与色斑型的异色瓢虫,包括斑点少(0-8个)的纯合黄底成虫(雄虫记为 Y-M,雌虫记为 Y-F)、纯合黑底四窗型成虫(雄虫记为 B-M,雌虫记为 B-F)、以及两者杂交后的 F_1 代杂交个体(雄虫记为 YM-M,雌虫记为 YM-F)羽化 7 d 后进行试验;参考 Young 和 Schal(1997)、陈楠(2018)缺、冯竹君(2020)缺提取表皮碳氢化合物的方法,采用正己烷对瓢虫鞘翅表面物质进行洗脱提取。此外,对于死亡后 7 d 的成虫(CO_2 处理致死),也采用了相同方法进行了表皮物质的提取检测每个处理选取 10 对鞘翅,每对鞘翅设为一个重复。

1.2.3.1 对提取物进行色谱分析 使用 GC-MS (Thermo Scientific, USA) 对碳氢化合物的提取物进行色谱分析,控制程序名称为 Xcalibur 2.2,使用 TR-5 MS UI 毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μ m, Agilent Technologies, USA)。

(1)样品进样模式为自动进样,设置为不分流模式,每次进样 1 μ L。柱温箱的升温程序设

为:在 60 $^{\circ}C$ 下保持 2 min 后,以 5 $^{\circ}C/min$ 的速度升至 320 $^{\circ}C$,在 320 $^{\circ}C$ 下保持 10 min。分别将检测器、进样器和气质质谱传输线的温度设为 280、300 和 280 $^{\circ}C$,电离能数值为 70 eV,质谱扫描为 EI 模式,扫描范围为 45-650 m/z,扫描速率为 5 次/s。

(2)使用 Xcalibur 软件,计算出实验获得的色谱图中每个色谱峰的峰面积。用各个色谱峰的面积与总面积相除,得到相对含量百分比。利用 GraphPad Prism 8.0.2 软件对数据进行分析处理并作图。

1.2.3.2 对提取物进行非靶向代谢组 GC-MS 标准分析 采用正己烷进行鞘翅表面物质洗脱。将步骤 1.2.1 中取得的不同性别、不同色型的异色瓢虫鞘翅洗脱液编号,邮寄至南京派森诺基因科技有限公司(Personal Biotechnology Co., Ltd., Shanghai, China.) 进行非靶向代谢组 GC-MS 全套标准分析。

1.2.3.3 不同底色以及活体死亡个体鞘翅表面物质定量比较 不同底色瓢虫基于以上获取到的数据,对所有分组进行比较分析。数据采用 SPSS (v. 22; IBM Corp., Armonk, NY, USA) 进行非参数检验(Kruskal-Wallis), $P < 0.05$ 认定为存在显著性差异。

活体死亡鞘翅比较:将候选瓢虫低温致死,死亡后迅速取下一侧鞘翅并编号,采用 1.2.3 节的方法进行正己烷的洗脱分析,作为活体样本;另一侧鞘翅伴随试虫进行对应编号,25 $^{\circ}C$ 放置 7 d 后取下进行洗脱分析。获取到的数据通过 SPSS (v. 22; IBM Corp., Armonk, NY, USA) 进行配对 t 检验(Paired t -test), $P < 0.05$ 认定为存在显著性差异。

1.3 数据分析

试验获取的所有数据采用了 SPSS (v. 22; IBM Corp., Armonk, NY, USA) 进行统计分析。行为分析试验数据经过正态分布检验和方差齐次性检验后,复合 t 检验(2组对比)和单因素方差分析(One-way ANOVA)的要求,并进行差异性分析($P < 0.05$)。体表物质 GC-MS 检测

受机器色谱柱污染和批次效应影响, 实际导出数据存在一定缺失, 数据不满足方差分析的要求, 采用了非参数检验 (Kruskal-Wallis) 并进行差异性分析 ($P < 0.05$)。活体死亡鞘翅试验样本非独立样本, 符合配对 t 检验 (Paired t -test) 要求, 进行差异性分析 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 异色瓢虫对不同交配对象的选择偏好

在雄虫对不同鞘翅底色雌虫的选择交配结果中, 不论雄虫为哪种底色, 选择黑底色雌虫进

行交配的次数都多于选择黄底色雌虫的次数。其中黄底雄虫成功交配的 12 次中, 有 10 次选择了黑底雌虫, 有 2 次选择了黄底雌虫; 而在黑底雄虫成功交配的 34 次中, 有 31 次选择了黑底雌虫, 有 3 次选择了黄底雌虫; 并且不同鞘翅底色的异色瓢虫雄虫交配成功的概率也有所区别, 其中黄底雄虫的交配成功率为 30%, 而黑底雄虫交配的成功率高达 85.0% (表 1)。

针对活体与死亡瓢虫的选择实验, 无论雄虫是任何底色, 都选择与活体雌虫进行交配; 其中黄底雄虫的交配成功率为 85.0%, 而黑底雄虫交配的成功率为 87.5% (表 2)。

表 1 异色瓢虫雄虫与不同底色雌虫的交配情况

Table 1 The mating behavior of *Harmonia axyridis* males with females of different colors

数据分组 Data group	1m vs 2f	1m vs 2f	合计 Total
雄虫鞘翅底色 The elytral color of male	黄 Yellow	黑 Black	/
试验样本量 The total number	40	40	80
交配成功次数 The number of successful mate	12	34	45
交配成功率 (%) The success rate of mating (%)	30	85	-
数量比 (选黄 : 选黑) The selection ratio of yellow and black elytra	1 : 5.00	1 : 11.33	1 : 8.20

表中的 “m” 和 “f” 代表了雄性和雌性, 前面的数字代表了处理组中对应性别的数目。下表同。
The “m” and “f” in the table represent male and female, respectively, with the preceding numbers indicating the count of individuals of each gender in the treatment group. The same below.

表 2 异色瓢虫雄虫与不同底色的死亡/活体雌虫的交配情况

Table 2 The mating behavior of *Harmonia axyridis* males with death/alive females of different colors

数据分组 Data group	1m vs 2f	1m vs 2f	合计 Total
雄虫鞘翅底色 The elytral color of male	黄 Yellow	黑 Black	/
试验样本量 The total number	40	40	80
交配成功次数 The number of successful mate	34	35	-
交配成功率 (%) The success rate of mating (%)	85.0%	87.5%	-
数量比 (选活 : 选死) The selection ratio of alive and death	34 : 0	35 : 0	69 : 0

2.2 鞘翅物质洗脱对交配识别行为的影响

异色瓢虫雄虫在面对未经处理的雌虫鞘翅时, 在模拟雌虫周围的活动路径更加密集, 而对于经过有机溶剂 (正己烷) 洗脱的雌虫鞘翅, 则是围绕培养皿内壁的活动路径更加密集 (图 1: D)。在异色瓢虫雄虫面对未处理鞘翅组与洗脱处理组的活动数据比较中, 首先分析了雄虫接触

鞘翅 (分析区 in) 与未接触鞘翅 (分析区 out) 区域的速度 (图 1: A), 结果显示雄虫在未处理组中爬行速度略低于处理组; 雄虫在模拟雌虫附近停留的时间数据显示: 雄虫在未处理组的鞘翅附近停留时间略高于处理组, 但统计学无显著差异 ($t = 162.105$, $df = 32$, $P = 0.31$, 图 1: B)。雄虫在试验时段距离仿真雌虫的平均距离中, 对照组的平均距离显著低于处理组 ($t = 5.345$,

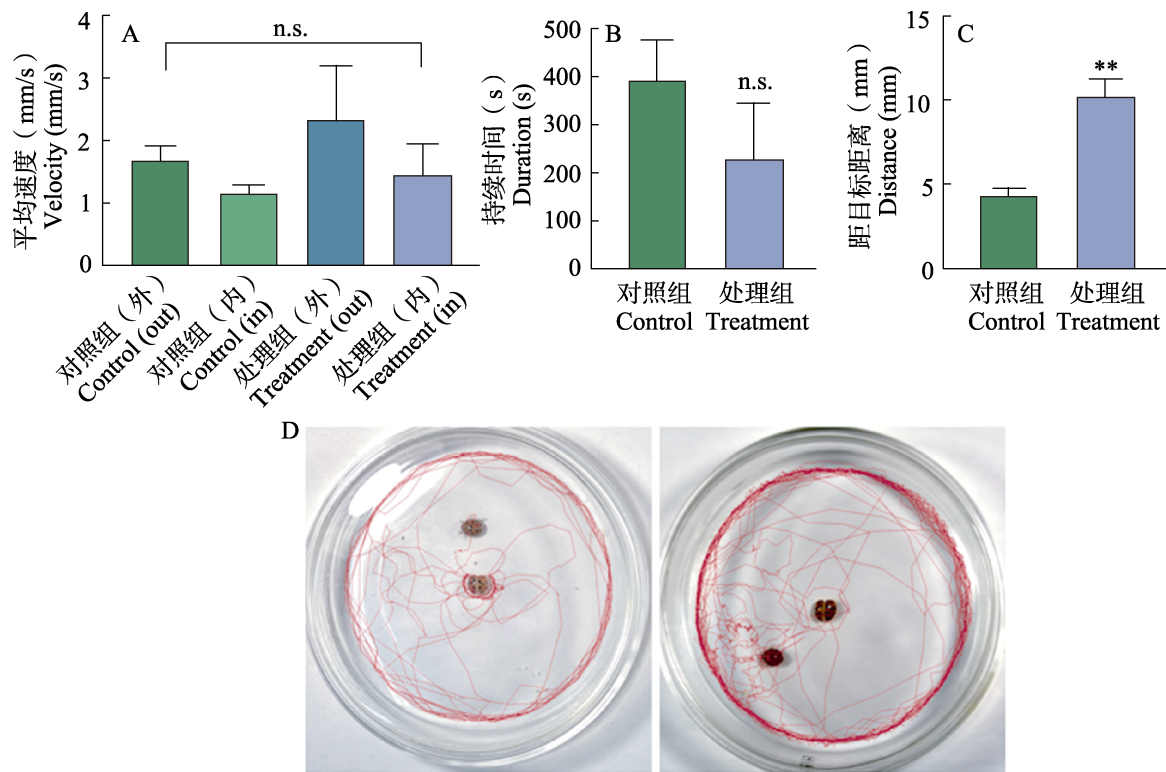


图 1 雄性异色瓢虫对不同仿真雌虫的行为反馈

Fig. 1 Male *Harmonia axyridis* behavioral responses to various simulated female ones

A. 爬行速度; B. 停留时间; C. 距目标平均距离;

D. 轨迹可视化图形 (左图仿真雌虫为未洗脱鞘翅的对象, 右侧为鞘翅洗脱后的对象)。以仿真雌虫为中心, 半径 1.5 cm 的圆形区域设置为“内 (in)”, 剩余区域设置为“外 (out)”。

**表示存在显著性差异 ($P < 0.01$, 独立样本 t 检验),

n.s.表示差异不显著 ($P > 0.05$, 单因素方差分析和独立样本 t 检验)。

A. The crawling speed of the target insect; B. The duration spent at the edge of the simulated female;

C. The average distance of the target male to the simulated female throughout the experiment;

D. Typical trajectory visualization (the left image showing the simulated female with intact elytra, while the right depicts the one after elytra removal). The region around the simulated female is set as 'in', with a circular area of 1.5 cm radius, while the remaining area is labeled 'out'. ** indicates statistically significant difference, n.s. indicates no significant difference observed among treatments ($P < 0.001$, one-way ANOVA and t -test).

$df = 32$, $P < 0.01$, 图 1: C)。

2.3 异色瓢虫鞘翅表面碳氢化合物的物质组成

结合气相色谱保留时间 (Retention time, RT)、质谱分析和标准品交叉比对, 气相色谱峰结果及物质鉴定分析的结果如表 3 和图 2 所示, 表明异色瓢虫鞘翅表面物质主要包括部分正链烷烃以及一系列带有支链的碳氢化合物。其中含量较高的有: (*E*)-5-二十碳烯、9-十九烯、正十九烷、正二十烷、1,19-二十碳二烯以及 1 种未知物质。

2.4 不同底色异色瓢虫鞘翅表面碳氢化合物的含量差异分析

相对定量分析显示: 9-十九烯 (9-Nonadecene, RT = 25.14; $F = 2.805$, $P < 0.05$) (图 3: C) 在杂交 F_1 代中积累水平显著高于纯合组, 1,15-十五烷二醇在杂交 F_1 代中积累水平显著低于纯合组, 甚至检测不到相关信号 (1,15-Pentadecanediol, RT = 28.87; $H = 14.85$, $P < 0.05$) (图 3: K); 保留时间为 29.39 min 的物质在样本整体间也检测到类似结果, 在杂交

表 3 异色瓢虫鞘翅表面物质定性检测结果

Table 3 The qualitative detection results of substances on the elytra surface of *Harmonia axyridis*

平均保留时间 (min)	主要物质名称	平均保留时间 (min)	主要物质名称
Retention time (min)	The name of main substance	Retention time (min)	The name of main substance
24.12	正十九烷 Nonadecane	28.45	未知物质 Unknown
24.90	杜荆素-木糖苷 Vitexin xyloside	28.68	未知物质 Unknown
25.14	草酸烯丙基壬酯 Oxalic acid, allyl nonyl ester	28.87	1,15-十五烷二醇 1,15-Pentadecanediol
25.89	9-十九烯 9-Nonadecene	29.55	未知物质 Unknown
26.13	正二十烷 n-Eicosane	29.73	未知物质 Unknown
26.85	未知物质 Unknown	31.07	1,19-二十碳二烯 1,19-Eicosadiene
27.78	(E)-5-二十碳烯(E)-5-Eicosene	31.20	未知物质 Unknown
28.00	3,4,5,6-四甲基-辛烷 3,4,5,6-Tetramethyl-Octane		

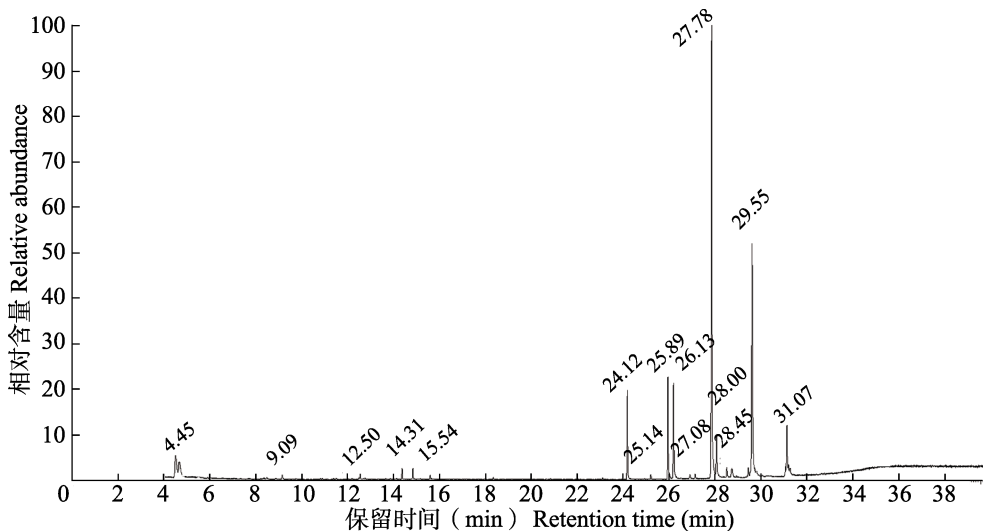


图 2 异色瓢虫鞘翅表面物质 GC 色谱峰 (以黄底雌虫鞘翅为例)

Fig. 2 The GC detection results of the surface (elytra of yellow-ground individual) substances of *Harmonia axyridis*

F₁代中积累水平显著较低或未检测到(图 3:L), 但本分析中未能得出此物质的具体组成。

两个纯合组中 9-十九烯(图 3:C)在不同性别异色瓢虫之间(D-M,Y-M vs D-F,Y-F)也表现出显著差异, 雄虫体表积累量显著高于雌虫($P<0.05$)。此外(E)-5-二十碳烯(图 3:G)也显示出在雄性鞘翅中含量高于雌性的趋势, 但差异不显著($P>0.05$)。

还有些物质, 如 1,19-二十碳二烯(1,19-Eicosadiene)、1,15-十五烷二醇(1,15-Pentadecanediol)、保留时间为 29.55、31.13 和

31.20 min 的未鉴定出的物质(图 3:K, M-P)在黄底雌性中含量较高。其余物质比较结果中也有部分物质显示出类似的差异倾向(仅在某种色型的某种性别中存在过高或者过低的情况), 但规律性不强(图 3:E, I, L, P)。

2.5 活体与死亡异色瓢虫鞘翅表面碳氢化合物的含量差异分析

死亡 7 d 后, 异色瓢虫成虫鞘翅表面部分碳氢化合物含量显著升高。主要包括保留时间 28.45 min 的物质($t=6.944$, $df=15$, $P<0.001$) (图 4:A)、保留时间为 28.68 min 的物质($t=$

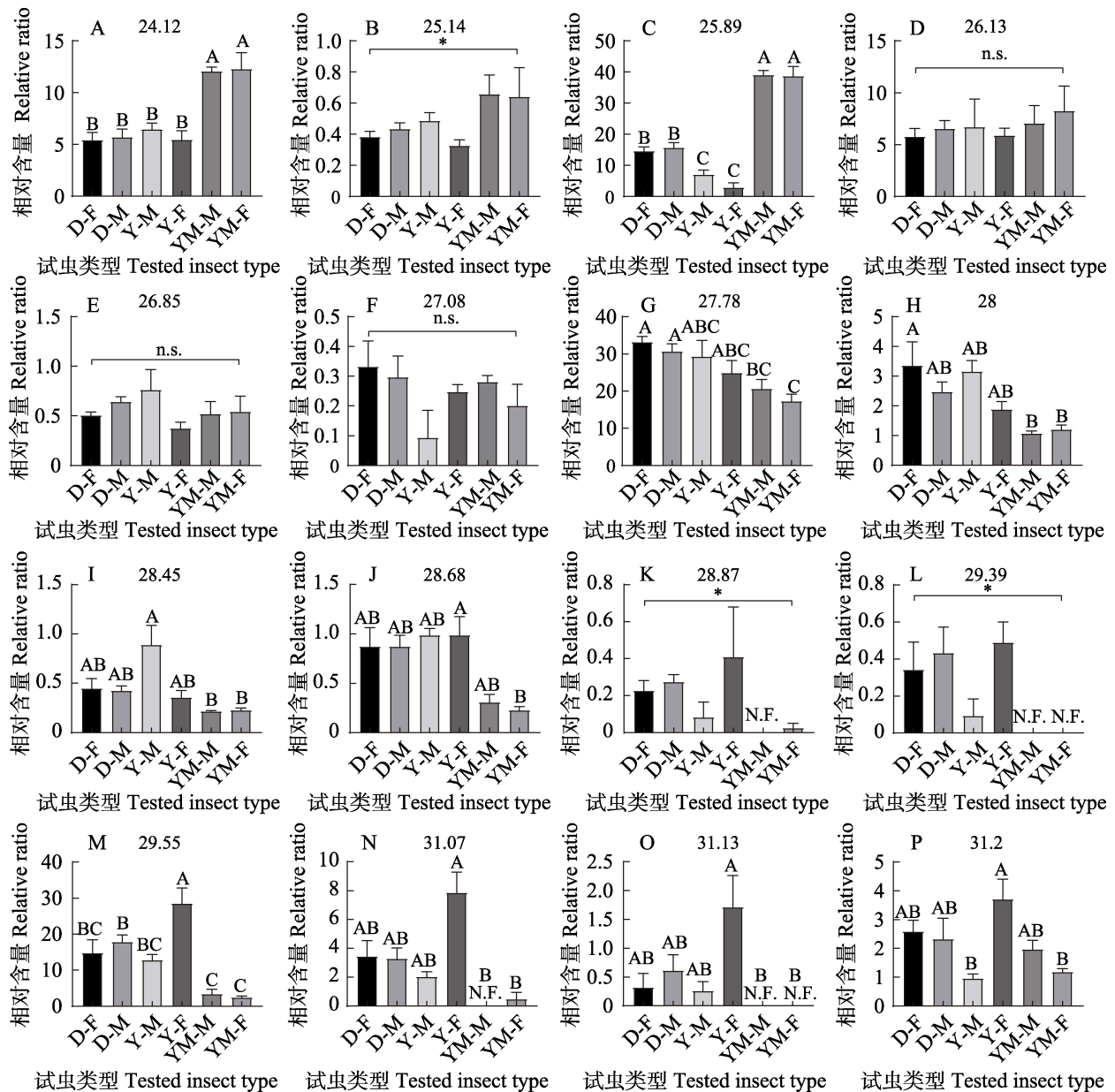


图3 异色瓢虫鞘翅表面主要碳氢化合物的含量比较

Fig. 3 Comparison of the main hydrocarbon contents on the elytral surface of the *Harmonia axyridis*

A. 正十九烷; B. 草酸烯丙基壬酯; C. 9-十九烯; D. 正二十烷; E. 未知物质; F. 未知物质; G. 5-二十碳烯; H. 3,4,5,6-四甲基-辛烷; I. 未知物质; J. 未知物质; K. 1,15-十五烷二醇; L. 未知物质; M. 未知物质; N. 1,19-二十碳二烯; O. 未知物质; P. 未知物质。D-M: 黑底雄性; Y-M: 黄底雌性; D-F: 黑底雌性; Y-F: 黄底雌性; YM-M: 黑黄杂交 F_1 代雄性; YM-F: 黑黄杂交 F_1 代雌性。杂交 F_1 代外观上表现为黑底和黄底性状镶嵌共存。由于部分物质未能定性, 图中的数字代表了物质的保留时间 (min)。标注 “N.F.” 表示在本组处理中此物质未被检测到。柱上不同字母表示显著差异, n.s. 表示所有处理组之间未检测到显著差异 ($P < 0.05$, 非参数检验; Kruskal-Wallis test)。

A. Nonadecane; B. Oxalic acid, allyl nonyl ester; C. 9-Nonadecene; D. *n*-Eicosane; E. Unknown substance; F. Unknown substance; G. 5-Eicosene; H. 3,4,5,6-Tetramethyl-octane; I. Unknown substance; J. Unknown substance; K. 1,15-Pentadecanediol; L. Unknown substance; M. Unknown substance; N. 1,19-Eicosadiene; O. Unknown substance; P. Unknown substance. D-M: Black background males; Y-M: Yellow background females; D-F: Black background females; Y-F: Yellow background females; YM-M: F_1 hybrid males (black and yellow hybridization); YM-F: F_1 hybrid females (black and yellow hybridization). The F_1 hybrids exhibit a mosaic coexistence of black and yellow background traits in appearance. Since some compounds could not be identified, the numbers in the figure represent the retention times (min) of substances. “N.F.” indicates substance is not detected; Different letters above bars indicate significant difference ($P < 0.05$, non-parametric test; Kruskal-Wallis test). n.s. indicates no significant difference ($P < 0.05$, non-parametric test; Kruskal-Wallis test).

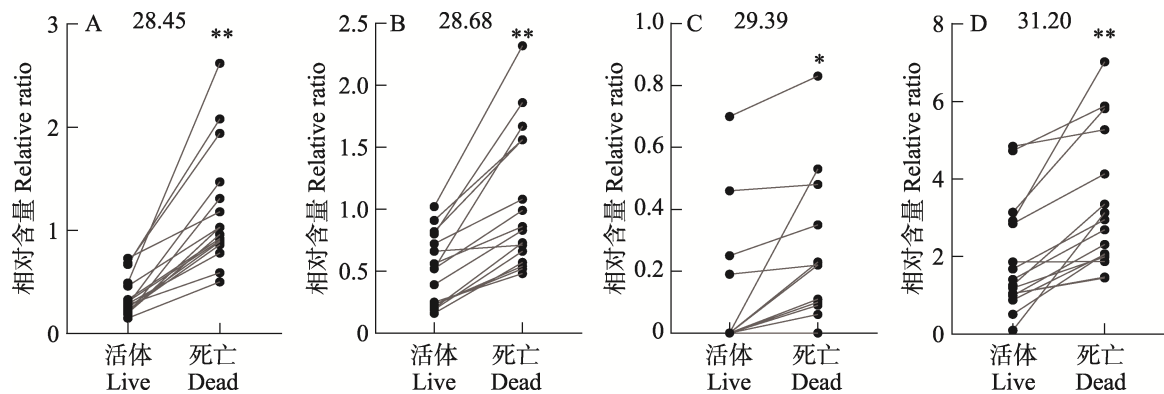


图 4 死亡 7 d 后异色瓢虫鞘翅表面碳氢化合物中含量发生显著变化的 CHCs

Fig. 4 Hydrocarbons (CHCs) on the elytral surface of *Harmonia axyridis* that showed significant changes in content after 7 days of death

由于涉及物质未能定性, 图上方数字代表了物质的保留时间, 分别为保留时间在 28.45 (A)、28.68 (B)、29.39 (C) 和 31.20 min (D) 的物质。*和**代表处理组之间存在显著差异 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, 配对样本 t 检验)。

Due to the inability to identify the substances involved, the numbers in the chart above represent the retention times (min) of the substances, these are substances with retention times of 28.45 (A), 28.68 (B), 29.39 (C) and 31.20 min (D), respectively. * and ** indicate significant difference between treatments (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, paired t -test).

6.236, $df = 15$, $P < 0.001$) (图 4: B)、保留时间为 29.39 min 的物质 ($t = 2.963$, $df = 15$, $P < 0.05$) (图 4: C) 以及保留时间 31.20 min 的物质 ($t = 5.334$, $df = 15$, $P < 0.001$) (图 4: D)。

3 讨论

本研究通过对不同体色、活体及死亡异色瓢虫的选择行为进行实验, 以及对物质的洗脱定性和定量分析, 首先证实了雄性异色瓢虫对不同底色雌虫的交配识别过程中的选择偏好, 并能够对活体与死亡个体产生不同的反馈; 其次, 研究表明在异色瓢虫的交配识别过程中, 鞘翅表面的物质起到了关键作用。进一步的物质检测分析结果显示, 不同底色的死亡和活体瓢虫体表物质的比例存在显著差异, 体表不同碳氢化合物 (CHCs) 的含量和不同比例可能是重要化学识别信号, 导致雄虫识别过程和后续交配偏好产生, 以及有效识别死亡个体。

在交配前的识别阶段, 异色瓢虫雄虫能有效识别不同底色的雌虫, 影响后续的交配决策。研究结果显示, 在实验室条件下, 两类底色的雄虫交配对象的选择都偏好于黑色雌虫; 但雌虫的反馈行为也会影响交配的成功率, 这也反映在选择

性试验中, 黑色雄虫相对黄色个体在交配中也更容易不被雌虫拒绝, 获得交配优势; 这与 Osawa 和 Nishida (1992)、Wang 等 (2010) 及唐斌等 (2012) 的研究结论类似, 即异色瓢虫雌雄个体都会对黑底交配对象存在选择偏好, 这也是引起异色瓢虫自然种群存在体色季节性变动的原因之一, 推测此策略背后的机制与不同遗传背景的异色瓢虫具备了差异的生态优势有关; 不同色型的异色瓢虫遗传性状稳定, 分化产生的时间久远, 因而两者在抗逆性、捕食能力等生物学特性方面产生了差异, 通过不同环境下交配选择偏好的变化, 可以使野外种群获得最大的生态优势。同时, 由于自然界野生环境条件复杂, 瓢虫的偏好是否稳定偏好黑色还是受到其他因素影响, 这方面的推测还需要寻求更多的证据。此外, 异色瓢虫雄虫能有效识别死亡的雌虫, 并且不会尝试进行交配, 这与在二星瓢虫上的研究结果相似 (Obata, 1987; Hemptinne *et al.*, 1996, 1998); 有趣的是, 通过比较两组交配选择实验, 雄虫在正常雌虫和尸体两者间做出选择并交配成功的概率, 显著高于与雄虫在两只活体雌虫中进行最终选择并成功交配的概率, 我们推测原因可能是因为避免了多头瓢虫间的相互干扰, 即雌虫之间可能也存在的交配竞争, 这方面的交配竞争互作也

是我们未来研究需要关注的。

仿真雌虫鞘翅洗脱实验表明,鞘翅表面物质对雄性瓢虫的交配识别至关重要,与 Hemptinne 等 (1996, 1998) 在二星瓢虫上的研究结果类似,正己烷洗脱后的鞘翅明显无法引起雄虫的有效识别,限制了后续交配行为的发生。洗脱试验的结果暗示了异色瓢虫的体表物质在交配前的识别过程中,起了关键的作用,是接下来交配行为的重要前置步骤;雄性瓢虫可以通过识别体表物质差异判断不同底色、活体或死亡个体。不同色型个体体表物质差异的化学物质基础和识别机制是引起种群色型组成季节性差异的重要原因 (Osawa and Nishida 1992; Wang *et al.*, 2010)。

通过软件行为模式分析,进一步佐证了雄性异色瓢虫的对鞘翅表面物质的反馈行为存在差异。雄虫在未洗脱处理的鞘翅周边活动最慢,结合行为步骤数据,显示其处于探测阶段 (Obata, 1987); 此外,获取到不同的试虫行为参数比较分散,行为数据分析后难以验证到显著性差异,反映了昆虫行为模式的复杂性和个体差异性,但从宏观角度,雄虫靶标与仿真雌虫的平均距离统计结果显示,整个对照组雄虫与目标的距离显著小于洗脱组,反映了雄虫对洗脱前后鞘翅不同的行为互动模式,表明了正常鞘翅对雄虫具备较强的吸引力。但基于以上结果,我们不能直接认为较强的吸引力对应较高的交配成功率,雌虫对雄虫的行为反馈也具有重要的作用,雌虫是否也通过化学信号进行识别判断也是值得进一步探索的内容。

物质的定性和相对定量分析揭示了鞘翅表面物质的整体组成特征,其主要成分是体表碳氢化合物 (CHCs),但受限于分析数据库和标准品数量,部分物质未能有效鉴定,尤其是在活体、死亡个体之间显著差异的 4 种物质未能成功鉴定。尽管如此,能够确认在不同色型个体之间、雌雄之间以及死亡个体与活体之间,不同的 CHCs 积累量检测到显著差异。在生存状态不同的异色瓢虫鞘翅表面所检测到的 CHCs 在死亡个体鞘翅上的积累量增加,推测可能是部分代谢酶的失活导致物质无法被代谢到下游,产生了物质积累。在此基础上,推测雄性瓢虫对交配对象

的识别可能在存在识别正向吸引的物质的同时,结合了趋避信号;而对死亡个体的趋避还能避免接触潜在被昆虫病害感染的风险,对瓢虫在野外环境中生存具有一定的意义。后续将针对这些未知的物质进行鉴定,并补充相关行为实验以验证这一推测。

针对不同底色雌虫的物质选择偏好研究结果显示,包括 9-十九烯 (9-Nonadecene) 和 1,15-十五烷二醇 (1,15-Pentadecanediol) 和保留时间为 29.39 min 的未知物质在不同底色雌性瓢虫中存在差异,但它们的含量不同。除了在杂交 F_1 代部分物质出现积累量剧烈减少的情况 (气相色谱信号弱,信噪比达不到定量要求,并非无此物质),尚未筛查到仅在特定色型瓢虫体表存在的特殊物质,后续将着重对于关键物质的种类筛选和功能进行深入研究。与异色瓢虫交配偏好体表物质的筛选和定量分析具有潜在的应用价值:通过异色瓢虫对交配识别相关物质的行为反应,可以在人工饲养环境下通过外源施加的方式,控制瓢虫种群的交配节奏,调控种群繁殖和增长规模;还可以针对性的对具有优良性状的靶标种群进行外源调控,提高交配竞争优势,定向培育种群。

综上,异色瓢虫的交配行为受多种因素影响。本研究初步分析了雄性个体对交配对象的行为模式,验证了鞘翅表面物质对交配选择识别的影响;并检测到在不同底色、活体与死亡个体之间的物质差异。洗脱试验证实了雌性瓢虫 CHCs 会对雄虫产生吸引效果;而死亡个体 CHCs 的异常积累暗示了某些物质的含量过高可能具有趋避效应;引起雄虫识别并做出决策的机制可能是一个较为复杂的过程。受限于物质检测技术和定性结果,工作中还有很多值得深入的角度,引起行为决策关键物质的分离鉴定也是未来的重点研究方向;本研究涉及的异色瓢虫种群来源集中,结果主要反映了试验种群的交配策略,未来需要进一步扩大种群来源,明确此现象是否具备广泛性;其次,未来对异色瓢虫交配策略和行为的生理生化机制研究,将为理解其交配调节策略、交配偏好产生的原因提供思路,并有潜力应用于异色瓢虫人工繁育过程中的交配调控。

参考文献 (References)

- Buntin GD, Bouton JH, 1997. Aphid (Homoptera: Aphididae) management in alfalfa by spring grazing with cattle. *Journal of Entomological Science*, 32(3): 332–341.
- Calla B, MacLean M, Liao LH, Dhanjal I, Tittiger C, Blomquist GJ, Berenbaum MR, 2018. Functional characterization of *CYP4G11*-a highly conserved enzyme in the western honey bee *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, 27(5): 661–674.
- Chen N, Fan YL, Bai Y, Li XD, Zhang ZF, Liu TX, 2016. Cytochrome P450 gene, *CYP4G51* modulates hydrocarbon production in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 76: 84–94.
- Durieux D, Fassotte B, Deneubourg JL, Brostaux Y, Vandereycken A, Joie E, Haubruge E, Verheggen FJ, 2015. Aggregation behavior of *Harmonia axyridis* under non-wintering conditions. *Insect Science*, 22: 670–678.
- Ferran A, Niknam H, Kabiri F, Picart JL, De Herce C, Brun J, Ipert G, Lapchin L, 1996. The use of *Harmonia axyridis* larvae (Coleoptera: Coccinellidae) against *Macrosiphum rosae* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aphididae) on rose bushes. *European Journal of Entomology*, 93(1): 59–67.
- Howard RW, Blomquist GJ, 2005. Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annual Review of Entomology*, 50: 371–393.
- Hemptonne JL, Dixon AFG, Lognay G, 1996. Searching behaviour and mate recognition by males of the two-spot ladybird beetle, *Adalia bipunctata*. *Ecological Entomology*, 21(2): 165–170.
- Hemptonne dagger J, Lognay double dagger G, Dixon AFG, 1998. Mate recognition in the two-spot ladybird beetle, *Adalia bipunctata*: Role of chemical and behavioural cues. *Journal of Insect Physiology*, 44(12): 1163–1171.
- Koch RL, 2003. The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: A review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts. *Journal of Insect Science*, 3: 32.
- Koch RL, Costamagna AC, 2017. Reaping benefits from an invasive species: Role of *Harmonia axyridis* in natural biological control of *Aphis glycines* in North America. *BioControl*, 62(3): 331–340.
- Mondor EB, Warren JL, 2000. Unconditioned and conditioned responses to colour in the predatory coccinellid, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *European Journal of Entomology*, 97(4): 463–467.
- Noh MY, Muthukrishnan S, Kramer KJ, Arakane Y, 2016. Cuticle formation and pigmentation in beetles. *Current Opinion in Insect Science*, 17: 1–9.
- Obata S, 1987. Mating behavior and sperm transfer in the ladybird beetle, *Harmonia axyridis* Pallas: Coleoptera: Coccinellidae. *Applied Entomology and Zoology*, 22(4): 434–442.
- Osawa N, Nishida T, 1992. Seasonal variation in elytral colour polymorphism in *Harmonia axyridis* (the ladybird beetle): The role of non-random mating. *Heredity*, 69(4): 297–307.
- Pang H, Ren SX, Zeng T, Pang XF, 2004. Biodiversity and Their Utilization of Coccinellidae in China. Guangzhou: Science and Technology Press of Guangdong. 168. [庞虹, 任顺祥, 曾涛, 庞雄飞, 2004. 中国瓢虫物种多样性及其利用. 广州: 广东科技出版社. 168.]
- Qiu Y, Tittiger C, Wicker-Thomas C, Le Goff G, Young S, Wajnberg E, Fricaux T, Taquet N, Blomquist GJ, Feyereisen R, 2012. An insect-specific P450 oxidative decarbonylase for cuticular hydrocarbon biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(37): 14858–14863.
- Snyder WE, Clevenger GM, Eigenbrode SD, 2004. Intraguild predation and successful invasion by introduced ladybird beetles. *Oecologia*, 140(4): 559–565.
- Tang B, Zhu J, Guo HS, Fang D, Shen QD, Zheng XX, Wang SG, Zhang F, Wang S, 2012. Studies of the diversity of multiple elytral color morphs of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae). *Journal of Hangzhou Normal University (Natural Sciences Edition)*, 11(2): 132–136. [唐斌, 诸信, 郭红双, 方丹, 沈祺达, 郑笑笑, 王世贵, 张帆, 王甦, 2012. 异色瓢虫鞘翅色斑变异多样性研究进展. 杭州师范大学学报(自然科学版), 11(2): 132–136.]
- Tourniaire R, Ferran A, Giuge L, Piotte C, Gambier J, 2000. A natural flightless mutation in the ladybird, *Harmonia axyridis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 96(1): 33–38.
- Wang S, Michaud JP, Zhang RZ, Zhang F, Liu S, 2010. Seasonal cycles of assortative mating and reproductive behaviour in polymorphic populations of *Harmonia axyridis* in China. *Ecological Entomology*, 34(4): 483–494.
- Wang S, Zhang RZ, Zhang F, 2007. Research progress on biology and ecology of *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae). *Chinese Journal of Applied Ecology*, 18(9): 2117–2126. [王甦, 张润志, 张帆, 2007. 异色瓢虫生物生态学研究进展. 应用生态学报, 18(9): 2117–2126.]
- Wang XY, Shen ZR, 2002. Progress of applied research on multicolored Asian ladybird beetle. *Entomological Knowledge*, 39(4): 255–261. [王小艺, 沈佐锐, 2002. 异色瓢虫的应用研究概况. 昆虫知识, 39(4): 255–261.]
- Young HP, Schal C, 1997. Cuticular hydrocarbon synthesis in relation to feeding and developmental stage in nymphs of *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 90(5): 655–663.
- Zhang F, Li S, Xiao D, Zhao J, Wang R, Guo XJ, Wang S, 2015. Progress in pest management by natural enemies in greenhouse vegetables in China. *Scientia Agricultura Sinica*, 48(17): 3463–3476. [张帆, 李姝, 肖达, 赵静, 王然, 郭晓军, 王甦, 2015. 中国设施蔬菜害虫天敌昆虫应用研究进展. 中国农业科学, 48(17): 3463–3476.]
- Zhang F, Zhang JM, Luo C, Wang S, 2011. Overview of biological control techniques for vegetable pests. *China Vegetables*, 2011(1): 23–24. [张帆, 张君明, 罗晨, 王甦, 2011. 蔬菜害虫的生物防治技术概述. 中国蔬菜, 2011(1): 23–24.]
- Zhang Y, Wang XX, Feng ZJ, Cong HS, Chen ZS, Li YD, Yang WM, Zhang SQ, Shen LF, Tian HG, Feng Y, Liu TX, 2020. Superficially similar adaptation within one species exhibits similar morphological specialization but different physiological regulations and origins. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8: 300.