

柠条绿虎天牛幼虫龄期的划分

张燕如^{1,2}, 李珏闻³, 赵婷婷¹, 潘 龙⁴, 金树磊⁵, 许姝婧², 骆有庆^{2*}

- (1. 内蒙古农业大学林学院, 呼和浩特 010019; 2. 北京林业大学省部共建森林培育与保护教育部重点实验室, 北京 100083; 3. 中国林业科学研究院研究生部, 北京 100091; 4. 中国林业科学研究院林业新技术研究所森林病原整合生物学研究室, 北京 100091; 5. 内蒙古武警森林总队, 呼和浩特 010010)

摘要 为明确柠条绿虎天牛 *Chlorophorus caragana* Xie & Wang 幼虫的龄期, 以便进行预测预报及采取防治措施。通过林间采集柠条绿虎天牛幼虫, 并根据前胸背板宽、触角孔间距和体长 3 项形态指标的频次分布结果初步划分龄期, 然后利用戴氏生长法则和线性回归进行验证。结果表明: 柠条绿虎天牛幼虫可分为 7 龄, 触角孔间距和前胸背板宽符合 Dyar 法则和 Crosby 法则并呈现明显的线性回归关系, 可作为龄期划分的重要指标。体长不符合 Crosby 法则, 不宜用于区分龄期。

关键词 柠条绿虎天牛; 幼虫; 龄期; 前胸背板; 触角孔间距

中图分类号: S 763.38 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2017439

Determination of the larval instars of *Chlorophorus caragana* Xie & Wang (Coleoptera: Cerambycidae)

ZHANG Yanru^{1,2}, LI Juewen³, ZHAO Tingting¹, PAN Long⁴, JIN Shulei⁵, XU Shujing², LUO Youqing²

- (1. College of Forestry, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019, China; 2. The Key Laboratory for Silviculture and Conservation of Ministry of Education, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 3. Graduate Department of Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 4. Laboratory of Forest Pathogen Integrated Biology Science, Research Institute of Forestry New Technology, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 5. Inner Mongolia Forest Corps of Armed Police, Hohhot 010010, China)

Abstract To determine the instars of *Chlorophorus caragana* Xie & Wang (Coleoptera: Cerambycidae) larvae for forecasting and scientific management of this pest, *C. caragana* larvae were collected in the field, and three body parameters (pronotum width, antennal ring spacing, body length) were measured. The parameters were analyzed by frequency distribution and then tested by the Crosby growth law and linear regression. The results showed that the larva of *C. caragana* had seven instars. The pronotum width and antennal ring spacing conformed to the Dyar and Crosby rules, with obvious linear relations, making them important criteria for identifying larval instars. The body length did not conformed to the Crosby rule, and should not be used for defining larval instars.

Key words *Chlorophorus caragana*; larva; instar; pronotum; antennal ring spacing

柠条绿虎天牛 *Chlorophorus caragana* Xie & Wang 属鞘翅目 Coleoptera 天牛科 Cerambycidae 绿虎天牛属 *Chlorophorus*, 是荒漠柠条灌木林的重要蛀干害虫, 主要为害中间锦鸡儿 *Caragana intermedia* Kuang et H. C. Fu 和小叶锦鸡儿 *Caragana microphylla* Lam.。该虫在宁夏地区 1 年 1 代, 近年来柠条绿虎天牛在西北地区对柠条的为害程度逐年加重, 其

幼虫在树木韧皮部和木质部取食为害, 隐蔽性强, 因此, 很难系统地观察幼虫的生活习性。虽然目前对该虫的生物学特性有过一些报道^[1-3], 但均未涉及幼虫的分龄以及龄期的划分问题。本研究通过林间采样并结合数据分析的方法, 测定自然条件下柠条绿虎天牛幼虫的龄数, 明确各龄幼虫形态指标, 为进一步研究其发生规律、预测预报和林间防控奠定基础。

收稿日期: 2017-11-17 修订日期: 2018-01-16

基金项目: 内蒙古农业大学高层次人才科研启动计划(203206038); 内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJZZ18047); “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD19B07)

* 通信作者 E-mail: youqingluo@126.com

1 材料与方法

1.1 调查地描述

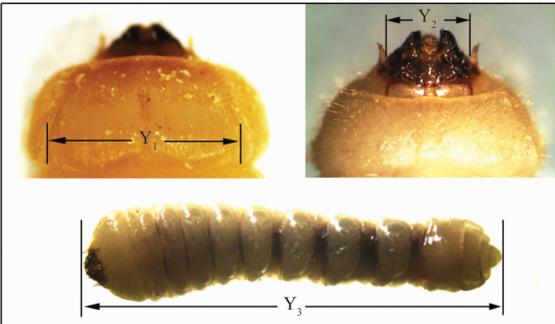
柠条绿虎天牛于 2013—2014 年采自宁夏灵武雁知山荒漠林内, $38^{\circ}5'N$, $106^{\circ}23'E$, 海拔 1 263 m。在荒漠林内随机调查受害严重的中间锦鸡儿, 树龄 5~15 年, 平均地径约为 2 cm, 平均树高 145 cm。

1.2 供试虫源

为确保采集到初龄幼虫, 2013 年 6 月下旬在柠条绿虎天牛产卵高峰期观察成虫产卵, 雌虫将卵产在周皮缝隙中, 解剖后收集卵置于滤纸双面保湿的培养皿中, 室温下遮光培养, 待其自然孵化后, 收集初孵幼虫(1 龄)。自柠条绿虎天牛幼虫孵化时起, 每月从林间采集 2 次受害严重的中间锦鸡儿枝干, 室内解剖获得幼虫, 采样截至幼虫越冬期。第 2 年(2014 年)在生长季节每周取样一次, 直到幼虫全部化蛹为止。

1.3 柠条绿虎天牛幼虫分龄特征

选取柠条绿虎天牛幼虫身体骨化程度较高的部位及体长作为分龄形态指标:(1)前胸背板宽(Y_1 : 前胸背板“凸”形斑宽度);(2)触角孔间距(Y_2 : 头壳上触角基部坚硬的触角环之间的最短距离);(3)体长(Y_3 : 从口器至腹末的长度)(图 1)。为保证测量指标的准确性, 将虫体装入移液枪枪头内, 使虫体平展, 然后将枪头垂直插入碎冰块中冷冻, 降低幼虫活跃度, 待虫体不扭动时进行拍照。应用双目连续变倍体视显微镜(LEICA-EZ4HD, Singapore)进行图像拍摄, 使用 Leica LAS EZ 图像处理软件进行测定分析。测量体长参数是为了在林间调查中便于快速判断幼虫的大致发育进度。



Y_1 : 前胸背板宽; Y_2 : 触角孔间距; Y_3 : 体长
 Y_1 : Prothoracic plate width; Y_2 : Distance between antennal rings; Y_3 : Body length

图 1 柠条绿虎天牛幼虫分龄的 3 个测量指标

Fig. 1 Three variables measured for defining larval instars

1.4 数据处理与分析

根据 Dyar 规律划分幼虫虫龄。首先利用不同形态结构指标进行频次分布分析, 并绘制每项指标相应的频数分布图, 确定幼虫虫龄。龄期划分后, 利用 Excel 软件计算各项形态结构指标的均值、标准误差及变异系数等。利用 Crosby 生长法则、回归分析进行筛选, 判断幼虫龄期和所测部位的相关性, 获得最佳分龄构造。使用 Crosby 指数验证划分龄期的合理性, 当 Crosby 指数小于 10% 分龄期划分分组合理, 当 Crosby 指数大于 10% 分龄指标分组合不合理^[4], Crosby 指数和 Brooks 指数按照如下公式计算。各龄幼虫指标之间的差异统计采用 LSD 检验的多重比较法进行。所有统计分析采用 SPSS 21.0 分析软件进行处理。

Crosby 指数 = $\frac{B_n - B_{n-1}}{B_{n-1}}$ (其中 B_n 和 B_{n-1} 分别表示第 n 和 $n-1$ 个 Brooks 指数);

Brooks 指数 = $\frac{X_n}{X_{n-1}}$ (其中 X_n 和 X_{n-1} 分别表示 n 龄和 $n-1$ 龄幼虫各个测量指标的平均值)。

2 结果与分析

2.1 柠条绿虎天牛幼虫龄期的确定

根据对 546 头柠条绿虎天牛幼虫 3 项指标的测量结果进行统计, 其中触角孔间距和前胸背板宽度的测定数据出现频次相对集中的 7 个区域, 触角孔间距的 7 个峰值分别在 0.30、0.60、0.80、1.10、1.40、1.60 和 1.80 mm 左右(图 2a)。前胸背板宽度的 7 个峰值分别在 0.80、1.50、2.00、2.30、2.70、3.10 和 4.10 mm 左右(图 2b)。由此, 根据 Dyar 氏法则可以断定, 柠条绿虎天牛幼虫为 7 个龄期。触角孔间距和前胸背板宽度的均值、标准误差、变化幅度和变异系数见表 1。这两项指标在不同龄数之间的平均值具有显著差异, 分龄指标的变异系数均小于 20%, Crosby 指数均小于 10%, 表明将柠条绿虎天牛幼虫划分为 7 个龄期是合理的。触角孔间距和前胸背板宽度是比较理想的分龄指标。

体长的测定数据出现频次相对集中的 7 个区域。其中体长的 Crosby 指数大于 10%, 虫龄分组情况不合理, 表明体长不宜用于幼虫龄期的划分。

2.2 柠条绿虎天牛幼虫各龄测量指标与龄期之间的关系拟合

对柠条绿虎天牛幼虫各项分龄指标的实测平均值与龄期之间的关系进行回归分析, 结果显示, 3 项

指标对数值($\lg Y_i$)与龄期(X)之间呈直线关系,符合 Dyar 氏定律。经统计检验,回归曲线均达到极显著

水平(表 2)。进一步验证了柠条绿虎天牛幼虫划分为 7 个龄期是合理的。

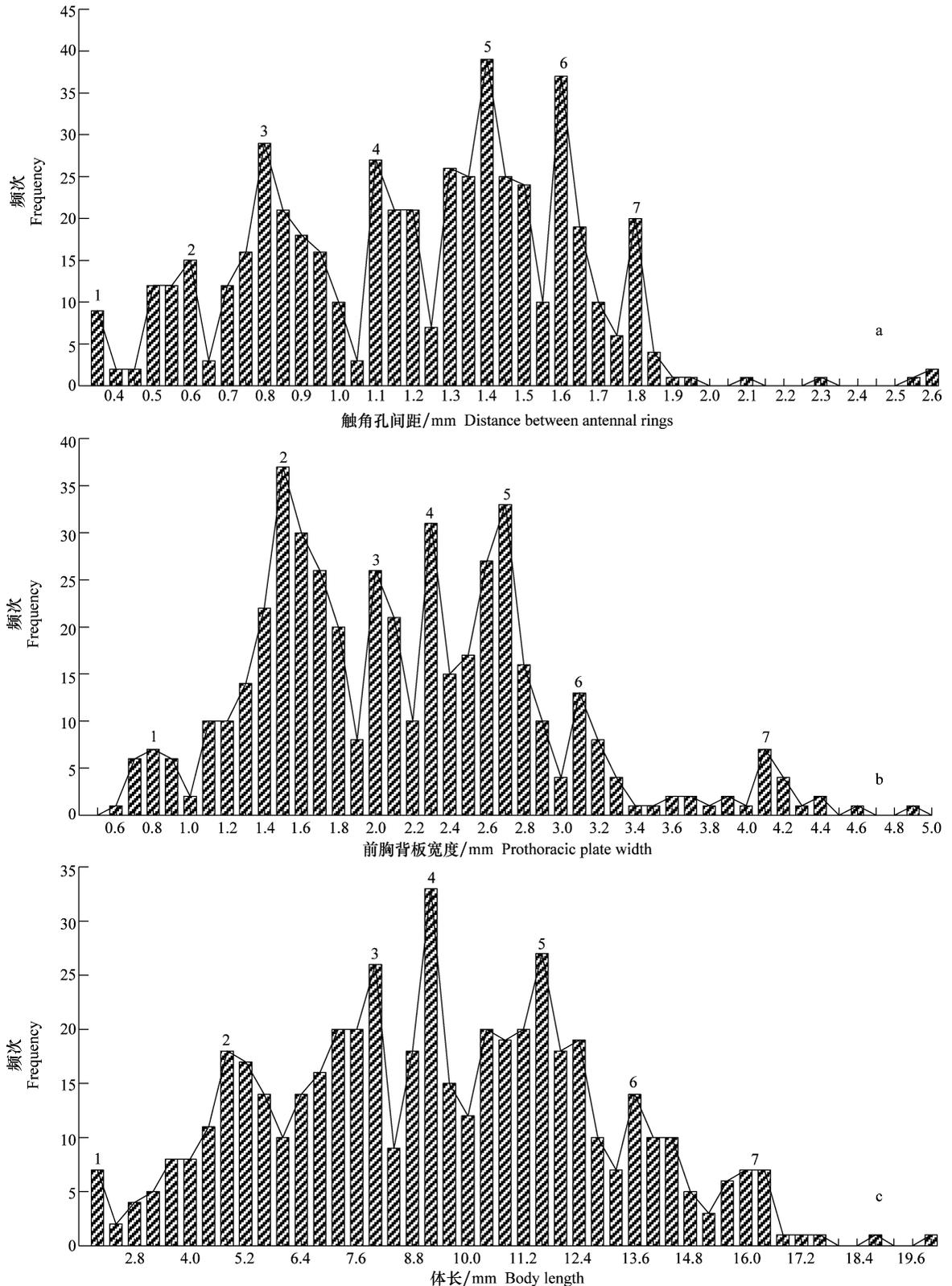


图 2 柠条绿虎天牛幼虫触角孔间距(a)、前胸背板宽度(b)和体长(c)分布频次图

Fig. 2 Frequency distribution of the distance between antennal rings (a), prothoracic plate width (b) and body length (c) in *Chlorophorus caragana* larvae

表 1 柠条绿虎天牛幼虫不同器官部位测量值的统计分析¹⁾

Table 1 Statistic analysis of the measured values at different positions of *Chlorophorus caragana* larval organs

形态结构 Morphological feature	龄数 Instar	样本数 Number of samples	变幅/mm Range	平均值/mm Mean±SE	变异系数/% CV	Brooks 指数 Brooks' ration	Crosby 指数 Crosby's ration
触角孔间距 Distance between antennae	1	11	0.26~0.35	(0.29±0.03)g	9.39	—	—
	2	39	0.37~0.55	(0.48±0.05)f	10.06	1.66	—
	3	106	0.55~0.85	(0.72±0.08)e	10.92	1.51	-0.09
	4	120	0.85~1.17	(1.02±0.09)d	8.69	1.42	-0.06
	5	122	1.18~1.40	(1.30±0.06)c	4.53	1.28	-0.10
	6	116	1.41~1.71	(1.53±0.08)b	5.05	1.17	-0.08
	7	32	1.72~2.55	(1.86±0.24)a	13.09	1.22	0.04
前胸背板宽度 Prothoracic plate width	1	19	0.59~0.89	(0.75±0.10)g	13.25	—	—
	2	128	0.90~1.59	(1.35±0.18)f	13.15	1.79	—
	3	116	1.60~2.09	(1.83±0.15)e	8.08	1.36	-0.24
	4	73	2.10~2.39	(2.25±0.08)d	3.72	1.23	-0.10
	5	110	2.40~2.87	(2.60±0.12)c	4.74	1.16	-0.06
	6	37	2.90~3.34	(3.06±0.12)b	3.83	1.18	0.02
	7	24	3.50~4.89	(3.93±0.37)a	9.30	1.28	0.09
体长 Body length	1	15	1.72~2.92	(2.25±0.41)g	18.33	—	—
	2	76	3.07~5.37	(4.48±0.66)f	14.80	1.99	—
	3	57	5.54~6.99	(6.28±0.41)e	6.61	1.40	-0.30
	4	131	7.02~9.43	(8.30±0.76)d	9.08	1.32	-0.06
	5	149	9.65~12.92	(12.12±0.87)c	7.15	1.46	0.10
	6	40	13.05~14.48	(13.71±0.42)b	3.05	1.13	-0.23
	7	34	14.51~19.94	(16.05±1.21)a	7.53	1.17	0.04

1) 表中同一栏内平均值数据后不同字母表示经多重比较(LSD)在 5%水平上具有显著差异。

Different letters within the same column indicate significant difference between instars based on LSD at 5% level.

表 2 柠条绿虎天牛幼虫各分龄指标与龄数之间的关系拟合结果¹⁾

Table 2 Regression analysis of the number of larval instars and measured variables of *Chlorophorus caragana*

分龄指标 Variables	回归方程 Regression equation	相关系数(r) Correlation coefficient	统计参数 Significance
触角孔间距(Y ₁) Distance between antenna (Y ₁)	lgY ₁ =0.087+0.120X	0.957	P<0.000 1
前胸背板宽度(Y ₂) Prothoracic plate width(Y ₂)	lgY ₂ =0.230+0.099X	0.942	P<0.000 1
体长(Y ₃) Body length(Y ₃)	lgY ₃ =0.393+0.127X	0.955	P<0.000 1

1) X:幼虫龄数(1~7 龄)。

X: Larval instar number (1-7 instars).

3 结论与讨论

昆虫幼虫身体生长具有一定的规律性,绝大多数昆虫体长增长是连续性的,身体骨化程度较高的部分伴随周期性蜕皮而呈跳跃式增长^[5-6]。Dyar 早在 1890 年通过研究 28 种鳞翅目昆虫发现相邻龄期幼虫头壳宽度存在一定的几何级数关系,这一现象被称为戴氏法则^[7]。因钻蛀性害虫具有生活隐蔽、生命周期长、室内饲养困难等特点,不易通过蜕皮观察研究幼虫虫龄,因此戴氏法则对于钻蛀性昆虫龄期的确定具有重要作用。

柳建定等和任骥对松褐天牛 *Monochamus alternatus* Hope 幼虫龄期进行研究,发现头壳宽和前胸背板宽度可作为虫龄分级指标^[8-9]。张海滨等测

量了人工饲养的星天牛 *Anoplophora chinensis* Forster 幼虫的 9 个形态结构指标,发现额宽(触角孔间距)是最佳的分龄结构,其次是上颚长和上颚宽^[10]。王小艺等研究了栗山天牛 *Massicus raddei* Blessig 幼虫上颚长、主单眼间距、前胸背板宽、中胸气门长和体长 5 项形态指标来判断其虫龄,发现上颚长、主单眼间距和前胸背板宽可用于分龄^[11]。于永浩等通过测量蔗根土天牛 *Dorysthenes granulatus* Thomson 的头口宽和前胸背板宽判断幼虫虫龄,结果表明头口宽是判定蔗根土天牛幼虫虫龄的最佳指标^[12]。潘龙等测定了青杨脊虎天牛 *Xylotrechus rusticus* Linnaeus 幼虫头壳宽、前胸背板宽、触角间距、上颚宽、体长和体宽 6 项指标,发现前胸背板宽可作为最佳分龄指标^[13]。以上天牛类钻蛀

性害虫幼虫的分龄构造有头壳宽(头宽或头口宽)、前胸背板宽、额宽(触角孔间距)、上颚长、上颚宽、主单眼间距等。使用最多的是头壳宽,是由于头壳骨化强而形态较稳定,但是头壳常缩于体内,严重影响测量的准确性。上颚虽然骨化程度强,但是形状不规则,不易测量。前胸背板宽指前胸背板“凸”形斑宽度,触角孔间距指头壳上触角基部坚硬的触角环之间的最短距离,这两项指标具有骨化程度强、特征明显、易于观察、无伸缩等优点,是最合理可靠的分龄指标。因此本研究以前胸背板和触角孔间距作为划分虫龄的指标,线性回归分析合理,说明这两项指标作为划分柠条绿虎天牛幼虫虫龄的标准是可行且可靠的。

为了方便野外快速判断柠条绿虎天牛虫龄,本研究还对体长指标进行了探索,但 Crosby 指数大于 10%,虫龄分组不合理。天牛幼虫体躯具有伸缩性,导致个体之间体长变异较大,对体长测量的准确性有所影响,另外体长的增长是连续的,各龄幼虫间体长有重叠现象,因此不宜作为虫龄划分的指标和依据。

不同虫龄阶段的柠条绿虎天牛幼虫前胸背板宽和触角孔间距值呈明显的几何级数变化,研究结果表明幼虫前胸背板宽和触角孔间距依据发育时间呈现 7 个峰形,说明柠条绿虎天牛幼虫可分为 7 龄。

参考文献

[1] 曹川健. 柠条绿虎天牛生物生态学特性及监测技术研究[D].

北京: 北京林业大学, 2010.

[2] 刘鑫海. 柠条绿虎天牛植物源引诱剂开发[D]. 北京: 北京林业大学, 2011.

[3] ZONG Shixiang, XIE Guanglin, WANG Wenkai, et al. A new species of *Chlorophorus* Chevrolat (Coleoptera: Cerambycidae: Cerambycinae) from China with description of biology [J]. *Zootaxa*, 2012, 3157: 54 - 60.

[4] LOERCH C R, CAMERON E A. Determination of larval instars of the bronze birch borer, *Agrilus anxius* (Coleoptera: Buprestidae) [J]. *Annals of the Entomological Society of America*, 1983, 76(6): 948 - 952.

[5] 陈永年, 潘桐. 也谈昆虫幼虫头宽及摄食量的增长规律 [J]. *昆虫知识*, 1988 (4): 235 - 240.

[6] 王小艺, 杨忠岐, 刘桂军, 等. 白蜡窄吉丁幼虫的龄数和龄期测定 [J]. *林业科学*, 2005, 41(3): 575 - 584.

[7] DYAR H G. The number of molts of lepidopterous larvae [J]. *Psyche*, 1890, 5: 420 - 422.

[8] 柳建定, 李百万, 王菊英, 等. 松褐天牛龄级划分方法初探 [J]. *浙江林业科技*, 2008, 28(4): 84 - 86.

[9] 任骥. 松褐天牛室内饲养、幼虫龄期及成虫产卵特性的研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2014.

[10] 张海滨, 王建伟, 朱小峰, 等. 星天牛幼虫龄期的划分 [J]. *应用昆虫学报*, 2011, 48(3): 688 - 694.

[11] 王小艺, 杨忠岐, 唐艳龙, 等. 栗山天牛幼虫龄数和龄期的测定 [J]. *昆虫学报*, 2012, 55(5): 575 - 584.

[12] 于永浩, 岑冠军, 韦德卫, 等. 基于 Crosby 生长法则的蔗根土天牛幼虫龄期划分 [J]. *南方农业学报*, 2012, 43(10): 1485 - 1489.

[13] 潘龙, 李珏闻, 骆有庆. 青杨脊虎天牛幼虫龄期的划分 [J]. *东北林业大学学报*, 2015, 43(1): 110 - 113.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 69 页)

[21] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402 - 408.

[22] 张蜀秋. 植物生理学实验技术教程 [M]. 北京: 科学出版社, 2011.

[23] CHEN F, WANG M, ZHENG Y, et al. Quantitative changes of plant defense enzymes and phytohormone in biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt by *Bacillus subtilis* B579 [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 26(4): 675 - 684.

[24] GULER N S, PEHLIVAN N, KARAOGLU S A, et al. *Trichoderma atroviride* ID20G inoculation ameliorates drought stress-induced damages by improving antioxidant defence in maize seedlings [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2016, 38(6): 1 - 9.

[25] CAI F, CHEN W, WEI Z, et al. Colonization of *Trichoderma harzianum* strain SQR-T037 on tomato roots and its relationship to plant growth, nutrient availability and soil microflora [J]. *Plant Soil*, 2015, 388(1): 337 - 350.

[26] 贺字典, 吴素霞, 宋晓飞, 等. 生防菌与茄病镰刀菌在黄瓜根际动态变化 [J]. *中国生物防治学报*, 2016, 32(3): 357 - 364.

[27] 张树武, 徐秉良, 薛应钰, 等. 长枝木霉 T6 菌株对黄瓜南方根

结线虫的防治及其根际定殖作用 [J]. *应用生态学报*, 2016, 27(1): 250 - 254.

[28] 贺字典, 宋士清, 高玉峰, 等. 棘孢木霉 *Trichoderma asperellum* 在土壤中定殖量的荧光定量 PCR 检测 [J]. *植物保护学报*, 2016, 43(4): 552 - 558.

[29] SINGH U B, MALVIYA D, WASIULLAH, et al. Bio-protective microbial agents from rhizosphere eco-systems trigger plant defense responses provide protection against sheath blight disease in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Microbiological Research*, 2016, 192: 300 - 312.

[30] MALOLEPSZA U, NAWROCKA J, SZCZECHE M. *Trichoderma virens* 106 inoculation stimulates defence enzyme activities and enhances phenolic levels in tomato plants leading to lowered *Rhizoctonia solani* infection [J]. *Biocontrol Science and Technology*, 2017, 27(2): 180 - 199.

[31] NENVATH B, PANDA P, SAXENA A, et al. Studies on induction of defense related enzymes against *Macrophomina phaseolina* in Pigeon pea by phylloplane *Trichoderma* spp. [J]. *Annual Plant Protection Science*, 2015, 23(2): 332 - 336.

(责任编辑: 田 喆)