



梅昭利, 曹成全, 童超, 刘方庆, 徐丹阳. 不同温度对三叶虫萤卵孵化和初孵幼虫发育的影响 [J]. 环境昆虫学报, 2020, 42 (2): 306–310.

不同温度对三叶虫萤卵孵化和初孵幼虫发育的影响

梅昭利, 曹成全, 童超^{*}, 刘方庆, 徐丹阳

(乐山师范学院生命科学院, 四川乐山 614004)

摘要: 本文研究了三叶虫萤 *Emeia pseudosauteri* 在不同恒温设置和室内变温条件下卵孵化率和初孵幼虫存活率, 并通过直接最优法和直线回归法计算出了三叶虫萤卵的发育起点温度和有效积温。结果表明: 12 ~ 30℃ 恒温条件下, 卵的孵化率随着温度升高显著下降 ($P < 0.05$), 且均低于室内变温条件 ($P < 0.05$) 下的孵化率; 初孵幼虫在恒温 15℃ 下的存活率最高, 为 73.13%; 低于 12℃ 和高于 30℃ 恒温中初孵幼虫均无法存活; 在恒温条件 12 ~ 30℃ 下, 卵的发育历期随温度升高而缩短, 其中恒温 12℃ 下最长, 发育历期为 42.96 d ($n=3$), 恒温 30℃ 下最短, 发育历期仅 12.75 d ($n=3$)。通过直接最优法计算出三叶虫萤卵的发育起点温度为 3.52℃, 有效积温分别为 382.20 d·℃。上述结果为三叶虫萤的人工繁育提供了参考。

关键词: 三叶虫萤; 温度; 孵化; 发育; 有效积温

中图分类号: Q968.1; S476

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2020) 02-0306-05

Effects of different temperatures on the hatching of eggs and development of newly hatched larvae of *Emeia pseudosauteri*

MEI Zhao-Li, CAO Cheng-Quan, TONG Chao^{*}, LIU Fang-Qing, XU Dan-Yang (College of Life Science, Leshan Normal University, Leshan 614004, Sichuan Province, China)

Abstract: This paper studied the hatching rate of the eggs and the survival rate of the first hatched larvae of *Emeia pseudosauteri* under different permanent temperatures and indoor changing temperatures, and determined the development threshold temperature and effective accumulated temperatures, by the direct optimal method and linear regression method. The results showed that the hatch rates of the eggs decreased significantly with the increase of the temperature under 12 ~ 30℃ ($P < 0.05$), and lower than that at room temperature ($P < 0.05$). The newly hatched larvae had the highest survival rate of 73.13% at constant temperature of 15℃, and were unable to survive under below 12℃ and above 30℃. The development period of the eggs was shortened with the increase of temperature under the constant temperatures of 12 ~ 30℃, the longest development period of 42.96 d ($n=3$) under constant temperatures of 12℃ and the shortest development period of 12.75 d ($n=3$) under constant temperatures of 30℃. The development threshold temperature was 3.52℃ and the effective accumulated temperature was 382.20 d·℃. These results provide the reference for artificial breeding of *Emeia pseudosauteri*.

Key words: *Emeia pseudosauteri*; temperature; hatching; development; effective accumulated temperature

基金项目: 校企合作科研项目 (LHX190767、LHX191201); 四川省 2018–2020 年高等教育人才培养质量和教学改革项目 (JG2018–717); 四川省科技创新苗子工程资助项目 (2018023)

作者简介: 梅昭利, 本科, 主要研究方向为萤火虫研究, E-mail: 2115706667@qq.com

^{*} 通讯作者 Author for correspondence: 童超, 硕士, 实验师, 主要研究方向为资源昆虫学, E-mail: 1316144632@qq.com

收稿日期 Received: 2020–02–04; 接受日期 Accepted: 2020–03–11

作为一类著名的景观昆虫,萤火虫在旅游和农业等领域具有重要的应用价值,其人工繁育研究和产业应用也逐步成为行业热点(曹成全, 2016, 2019; 陈政颐, 2016; 叶超, 2016)。

三叶虫萤 *Emeia pseudosauteri* Fu (Ballantyne & Lambkin, 2012) 隶属于萤科 Lampyridae 峨眉萤属 *Emeia*, 是发现于四川省乐山市峨眉山市的新种, 在四川省广泛分布于乐山、峨眉、邛崃等地 (Fu *et al.*, 2012)。三叶虫萤的基础研究主要集中在该幼虫和成虫的形态特征、行为习性、生殖生理、栖境分析和夜间活动规律等方面 (Fu *et al.*, 2012; 陈申芝等, 2014; 季现莹, 2014; 卢聪聪等, 2017; 陈申芝等, 2018; 童超等, 2018; 陈郑伟等, 2019)。

由于成虫起飞时间早、养殖较为容易等优点 (陈申芝等, 2014; 卢聪聪等, 2017), 三叶虫萤目前成为人工繁育的优选种类。卢聪聪等 (2017) 研究了不同环境和介质对三叶虫萤卵孵化的影响。本文研究了不同温度对三叶虫萤卵孵化和初孵幼虫发育的影响, 以期在丰富三叶虫萤生物学资料的同时, 为其人工繁育和产业化提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 虫源及试验材料

1.1.1 成虫选取

根据相关报道 (陈申芝等, 2014; 童超等, 2018), 成虫选取地点位于四川省乐山市绿心公园 (103°42'42.00" ~ 103°45'10.57"E, 29°33'44.37" ~ 29°35'40.11"N) 内的停耕农田, 采集时间为3月中旬至4月中旬。

1.1.2 成虫处理

成虫室内产卵环境模拟野外产卵介质, 由下到上分别为湿润土层、苔藓层、蕨类植物层, 然后喷水至苔藓湿润后放入成虫, 等待其交配产卵。当发现产卵, 用铲子连带土和苔藓一起取其卵块, 放入培养皿中分组处理。

1.1.3 饲料

成虫人工饲养时可用直径约为 0.5 cm 的棉球蘸取 5% 蜂蜜水放入环境中代替野外露水, 以确保其能正常生存和交配产卵。

1.1.4 器材

经高压灭菌处理的培养皿, 恒温培养箱 (型号: 郑州生元仪器有限公司 MGC-250H), 卫生纸,

硫酸纸, 滴管等。

1.2 方法

1.2.1 孵化环境

以当天采集的土和苔藓为孵化介质, 加入少量湿润卫生纸巾以保湿遮阴, 湿度以其野外生存环境湿度为宜 (介质湿度为 40%, 纸巾湿度约为 50%)。将取回的卵随机分配, 每个培养皿中放入 30 粒。将湿润的卫生纸铺在卵粒上方, 尽量减少对卵粒的移动和破坏。上述设置完成之后, 将培养皿随机分组, 每组 3 个培养皿, 分别标号为 1、2、3, 将分组后的培养皿分别放置到 5 个恒定温度下和室内常温条件下, 其中 12℃、15℃、20℃、25℃、30℃通过恒温箱控制, 控温误差在 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。在试验期间, 光照为 12L: 12D, 空气湿度约为 90%。常温组为室内自然通风条件且减少外界条件 (如天敌伤害、自然强光、恶劣天气、人为践踏、重物冲击、洪水等) 对卵粒伤害以作为对照组, 该组温度随自然温度变化而变化, 不作特殊处理; 昼夜变化范围 16 ~ 28℃。

1.2.2 孵化处理

每天定时检查卵粒情况, 并且对其喷水保湿。每次浇水量约为每个培养皿 2 mL。观察记录卵粒发霉破碎、孵化等情况。

当出现卵粒孵化时, 每天定时统计不同温度下卵粒的孵化情况。待卵粒孵化完成后, 统计其孵化率, 以及 20 d 以内 (20 d 内三叶虫萤幼虫状态不稳定, 容易死亡) 的存活率。

1.2.3 幼虫养殖

将同一天孵化出的幼虫放在孵化温度下进行养殖, 且同一温度下同一天孵化的幼虫设为 1 组, 并标明孵化日期和数量。将幼虫直接放置在处理过的培养皿中, 培养皿中放置 1 张折叠为 0.5 mm 的湿润卫生纸, 其湿度为 50%。在投饵时根据其湿度情况适当浇水, 以保持湿度, 并且对其环境及时清理, 1 ~ 3 d 更换 1 次纸巾。

初孵幼虫用处理好后剁碎的灰巴蜗牛 *Bradybaena ravida* 肉进行喂养 (陈申芝等, 2014; 童超等, 2018), 剁碎食物以每头幼虫提供 0.1 g 的量盛放在大小适宜的硫酸纸上, 避免食物直接放置在其环境中, 污染生存环境, 影响实验结果。幼虫饲养每天投饵 1 次, 投饵时间模拟野生三叶虫萤进食时间, 约为每天的 17:00 - 20:00。

1.2.4 数据记录

观察并记录不同温度下的孵化率和 20 d 内初

孵化幼虫的存活率。

1.3 计算方法

1.3.1 直线回归法 (张孝羲, 2002; 郭昆等, 2018)

用直线回归法推算三叶虫萤卵的发育起点温度 (°C) 和有效积温 (K), 所有公式如下:

$$C = \frac{\sum V^2 \sum T - \sum V \sum VT}{n \sum V^2 - (\sum V)^2}$$

$$K = \frac{n \sum VT - \sum V \sum T}{N \sum V^2 - (\sum V)^2}$$

$$S_c = \sqrt{\frac{\sum (T - \bar{T})^2}{n - 2} \left[\frac{1}{n} + \frac{V^2}{\sum (V - \bar{V})^2} \right]}$$

$$S_k = \sqrt{\frac{\sum (T - \bar{T})^2}{(n - 2) \sum (V - \bar{V})^2}}$$

式中的 T 、 $\bar{T}$ 、 $\bar{V}$ 、 n 、 V 、 N 分别为实验设置温度 (°C)、理论温度、温度处理组数、温度 T 下的发育速率、生长期所需的时间; S_c 和 S_k 分别为发育起点温度和有效积温的标准差。

1.3.2 直接最优法 (David W, 1986)

运用直接最优法计算三叶虫萤卵的发育起点温度 (°C) 和有效积温 (K)。该方法的基本原理是利用极值法, 将理论有效积温与实际测得的有效积温误差缩减到最小的目标上。理论算得的有效积温和试验测得的有效积温的误差极小为目标的目标函数, 再用极值理论方法直接计算发育起点温度 (°C), 涉及公式为:

$$C = \frac{\sum_{i=1}^n D_i^2 T_i - \bar{D} \sum_{i=1}^n D_i T_i}{\sum_{i=1}^n D_i^2 - n \bar{D}^2}$$

$$K = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n D_i^2 (T_i - C)$$

式中的 D_i 为第 i 组处理温度 (T_i) 下的发育历期, T 为温度 (°C), i 为处理数。

2 结果与分析

2.1 温度对三叶虫萤卵孵化的影响

室内变温条件下 (通风室内环境, 温度在 16 ~ 28°C 变化) 每组卵的孵化率都高于 96.00%, 且个别组的孵化率为 100%, 平均孵化率达 98.00% ± 1.57%, 高于其他组别孵化率 ($P < 0.001$)。恒温下 12 ~ 25°C 三叶虫萤卵的孵化率随

着温度的升高而降低; 恒温 12°C 下的孵化率是上述温度中孵化率最高的 1 个, 平均孵化率为 94.44% ± 4.16% ($n = 3$); 在恒温 15°C 时的平均孵化率较高为 92.22% ± 5.67%, 个别组的孵化率达到 100%; 恒温 20°C 下的平均孵化率为 76.67% ± 7.20%, 且在此温度下孵化率的最大值为 83.33%, 最小值为 66.67%; 恒温 25°C 下的孵化率普遍较低, 平均孵化率只有 44.44% ± 11.00%; 恒温 30°C 时, 卵孵化率最低, 平均孵化率仅有 13.33% ± 1.62% (图 1)。

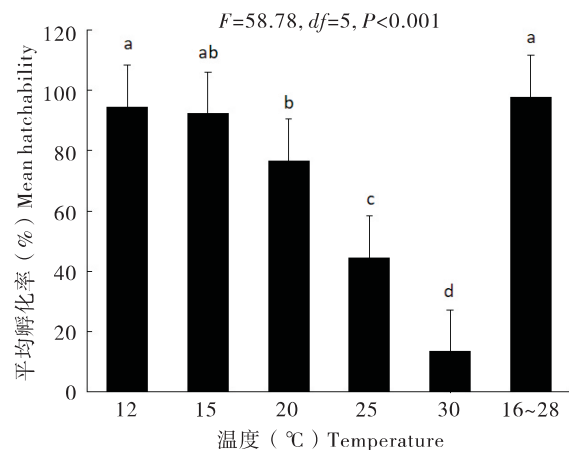


图 1 不同温度下三叶虫萤卵的平均孵化率

Fig. 1 Average hatching rates of *Emeia pseudosauteri* eggs under different temperatures

注: 不同小写字母表示不同温度下孵化率差异显著。Note: Different lowercase letters indicate significant differences in hatching rates at different temperatures.

2.2 温度对三叶虫萤初孵幼虫存活率的影响

温度对三叶虫萤初孵幼虫的成活率影响显著负相关 ($P < 0.05$)。不同温度下, 相同时间内孵化的幼虫存活率差别很大: 在开始孵化后的 20 d 内, 温度条件为 15 ~ 30°C 的初孵幼虫存活率随着温度的升高而降低; 恒温 12°C 和 30°C 下初孵幼虫难以生存, 存活率为 0%; 25°C 下初孵幼虫的存活率仅为 21.95%; 20°C 下初孵幼虫的成活率为 53.62%; 15°C 下初孵幼虫的成活率 73.17% (图 2)。

2.3 温度对三叶虫萤卵发育历期的影响

温度对三叶虫萤卵的发育历期有显著的影响。随着温度的升高, 卵的发育历期逐渐变短。在 12°C 下, 卵的发育历期达到 42.96 ± 1.49 d; 在 15°C 下, 卵的发育历期达到 33.47 ± 1.87 d; 在

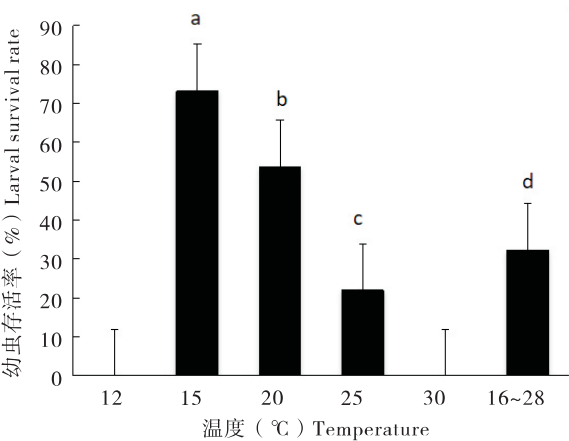


图2 不同温度下三叶虫萤幼虫存活率

Fig. 2 Survival rates of *Emeia pseudosauteri* larvae under different temperatures

注：不同小写字母表示不同温度下存活率差异显著。
Note: Different lowercase letters indicate significant differences in survival rates at different temperatures.

20℃下，卵的发育历期达到 24.05 ± 0.32 d；在25℃下，卵的发育历期为 19.92 ± 0.65 d；当温度在30℃时，由于温度过高，卵大部分发霉或损坏，少数能孵化，发育历期为 12.75 ± 0.25 d ($P < 0.001$)；常温（16~28℃）条件下，卵的发育历期为 20.63 ± 1.82 d，较恒温25℃时的数值相差不大（图3）。

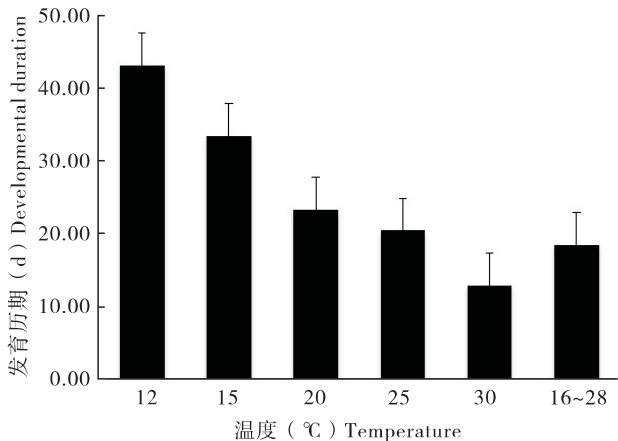


图3 不同温度下三叶虫萤卵的发育历期

Fig. 3 Developmental duration of *Emeia pseudosauteri* eggs under different temperatures

2.4 三叶虫萤卵的发育起点温度和有效积温

本研究根据运用直线回归法和直接最优法推算出三叶虫萤卵的发育起点温度为5.71℃和3.52℃，算出了三叶虫萤卵的有效积温分别为328.78 d·℃和382.20 d·℃。两种方法得出的发育起点温度相差2.19℃，有效积温相差了53.42 d·℃；直接最优法的变异系数c. v.（15.70%），小于直线回归法的变异系数（25.52%），见表1。因此，对于三叶虫萤卵的发育起点温度和有效积温，直接最优法的计算结果较直线回归法更优。

表1 三叶虫萤卵的发育起点温度和有效积温

Table 1 The development zero and effective accumulated temperature of *Emeia pseudosauteri* eggs

方法 Method	有效积温 K (d·℃) Effective accumulated temperature K	回归方程 Regression equation	变异系数 c. v. (%) Variable coefficient c. v.
直线回归法 Linear regression method	329.56	$T = 5.71 + 328.78V$	25.52
直接最优法 Direct optimization method	318.17	$T = 3.52 + 382.20V$	15.70

3 结论与讨论

本研究结果表明，温度是影响三叶虫萤卵孵化和生长发育的关键因素：温度在室内常温（16~28℃之间变化）情况下的孵化率最高，但其20 d内的存活率较低，且室内变温条件不可控。在恒温12~30℃范围内，三叶虫萤卵均能孵化，

其孵化率随温度升高而降低，发育历期也随温度升高而降低，发育速率随温度升高加快，且在高温环境下，其孵化率不稳定。温度对三叶虫萤卵的孵化率的影响与温度对小金蝠蛾卵孵化情况相似（涂永勤等，2011），最适孵化温度也相近，为恒温15℃左右。

温度对三叶虫萤初孵幼虫的存活率影响显著。在15~25℃，初孵幼虫的成活率随着温度的升高

而降低。当温度达到恒温 30℃ 时, 初孵幼虫无法长期生存, 所有幼虫在 24 ~ 48 h 内全部死亡。初孵幼虫在恒温 15℃ 时存活率相对较高, 20 d 内的存活率达到 73.17%; 20℃ 下初孵幼虫 20 d 内的存活率为 53.62%, 其它恒温温度和常温条件下的存活率都较低; 恒温 12℃ 时, 由于温度太低, 初孵幼虫无法长期在此温度下生存, 20 d 内的存活率为 0%。因此, 温度对三叶虫萤初孵幼虫的适温范围比较狭窄。

本研究中用直接最优法得到的三叶虫萤卵的发育起点温度为 3.52℃, 有效积温为 382.20 d · °C, 回归直线方程为 $T = 3.52 + 382.20V$, 计算结果优于直线回归法。

综上所述, 温度显著影响三叶虫萤卵孵化、存活率和发育历期。因此, 人工繁育孵化时需考虑好温度等条件。建议人工孵化温度在恒温 15 ~ 20℃ 状态下, 初孵幼虫养殖尽量避免超过 30℃ 的高温 and 低于 12℃ 的低温。

参考文献 (Reference)

- Cao CQ. Methods of indoor large-scale artificial breeding of semi-aquatic firefly: CN105746441A [P]. [2016-07-13]. [曹成全. 半水生萤火虫的室内规模化人工养殖方法: CN105746441A [P]. [2016-07-13]]
- Cao CQ. The application of fireflies in characteristic agriculture and rural tourism [J]. *Biological Resources*, 2019, 41 (4): 376-379. [曹成全. 萤火虫在特色农业和乡村旅游中的应用 [J]. 生物资源, 2019, 41 (4): 376-379]
- Chen SZ, Cao CQ, Xian LM, et al. Habitat analysis and nocturnal activity of trefoil fireflies in Luxin Park, Leshan City [J]. *Journal of Leshan Teachers College*, 2014, 29 (12): 47-50. [陈申芝, 曹成全, 鲜黎明, 等. 乐山市绿心公园三叶虫萤生境分析与夜间活动规律 [J]. 乐山师范学院学报, 2014, 29 (12): 47-50]
- Chen SZ, Lu CC, Cao CQ, et al. Description of larval morphology of fireflies at all ages [J]. *Sichuan Animals*, 2018, 37 (3): 298-304. [陈申芝, 卢聪聪, 曹成全, 等. 三叶虫萤各龄期幼虫形态描述 [J]. 四川动物, 2018, 37 (3): 298-304]
- Chen ZW, Cao CQ, Mei ZL, et al. Trilobite larvae stack behavior [J]. *Bioresources*, 2019, 41 (6): 539-544. [陈郑伟, 曹成全, 梅昭利, 等. 三叶虫萤幼虫叠背行为 [J]. 生物资源, 2019, 41 (6): 539-544]
- Chen ZY. Research on Firefly Theme Rural Tourism Product Development Based on RMP Model [D]. Changsha: Central South University of Forestry Science and Technology, 2016. [陈政颐. 基于 RMP 模型的萤火虫主题乡村旅游产品开发研究 [D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2016]
- David W. Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plants cells and transgenic plants [J]. *Science*, 1986, 234: 856-859.
- Fu XH, Ballantyne LA, Lmbkin CL. *Emeia* gen. Nov, a new genus of luciolinae fireflies from China (Coleoptera: Lampyridae) with an unusual trilobitelike larva, and a redescription of the genus *Curtos* Motschulsky [J]. *Zootaxa*, 2012, 3403 (4): 1-53.
- Guo K, Zhang DC, Duan ZS, et al. Studies on the threshold temperature and effective accumulated temperature of egg development of *Blattella Americana* [J]. *Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2018, 43 (21): 4217-4219. [郭昆, 张德春, 段治尚, 等. 美洲大蠊卵发育起点温度和有效积温的研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43 (21): 4217-4219]
- Ji XY. Studies on Reproductive Physiology of Several Fireflies [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014. [季现莹. 几种萤火虫生殖生理研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2014]
- Lu CC, Tong C, Cao CQ, et al. Effects of different environments and media on fluorescent incubation [J]. *Biological Resources*, 2017, 39 (5): 386-388. [卢聪聪, 童超, 曹成全, 等. 不同环境和介质对三叶虫萤卵孵化的影响 [J]. 生物资源, 2017, 39 (5): 386-388]
- Tong C, Cao CQ, Liu FQ, et al. A large number of trilobite fireflies were found in Luxin Park, Leshan City, Sichuan Province [J]. *Sichuan Animals*, 2018, 37 (6): 708-709. [童超, 曹成全, 刘方庆, 等. 四川省乐山市绿心公园发现大量连片三叶虫萤 [J]. 四川动物, 2018, 37 (6): 708-709]
- Tu YQ, Zhang DL, Tang Y, et al. Effect of temperature on hatching rate of small golden moth eggs [J]. *Study on Chinese Herbal Medicine in Chongqing*, 2011, 1: 55-56. [涂永勤, 张德利, 唐毅, 等. 温度对小金蛾卵孵化率的影响 [J]. 重庆中草药研究, 2011, 1: 55-56]
- Ye C. An assembled larval feeding apparatus: CN205547033U [P]. [2016-09-07]. [叶超. 一种组装式萤火虫幼虫喂食器具: CN205547033U [P]. [2016-09-07]]
- Zhang XX. Insect Ecology and Prediction [M]. Beijing: China Agricultural Publishing House, 2002: 217-220. [张孝羲. 昆虫生态及预测预报 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 217-220]