



张锦坤, 胡可炎, 张国祥, 范凌华, 林子杰, 温秀军, 马涛. 异斑酷大蚕蛾幼虫、蛹和成虫的性别鉴定 [J]. 环境昆虫学报, 2020, 42 (6): 1525 - 1530.

异斑酷大蚕蛾幼虫、蛹和成虫的性别鉴定

张锦坤¹, 胡可炎¹, 张国祥¹, 范凌华¹, 林子杰², 温秀军¹, 马涛^{1*}

(1. 华南农业大学林学与风景园林学院, 广东省森林植物种质创新与利用重点实验室, 广州 510642;

2. 增城区林业和园林局, 广州 511300)

摘要: 本文描述了一种准确、快速鉴定异斑酷大蚕蛾末龄幼虫、蛹和成虫性别的方法。通过对蛹和成虫性别特征比较可知, 雌虫生殖孔位于第8和第9腹节, 且第8腹节不愈合, 雄虫生殖孔仅位于第9腹节上, 且生殖孔两侧有瘤状突起。雌性末龄幼虫头壳的蜕裂线附近浅色区域较多, 雄性浅色区域较少, 且雌性后唇基区域的颜色较雄性更浅。雌雄成虫差异较大, 雄虫触角羽状, 前翅一般无透明斑或透明斑很小; 雌虫为近丝状的羽状触角, 前翅有3个较大且连续排列的透明斑。经过对30对雌雄蛹的测量后, 发现在蛹长、蛹宽与蛹重等体型数据上, 雌雄蛹之间都存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

关键词: 异斑酷大蚕蛾; 幼虫; 蛹; 成虫; 性别鉴定

中图分类号: Q968.1; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2020) 06-1525-06

Sex identification of *Cricula variabilis* larvae, pupae and adults

ZHANG Jin-Kun¹, HU Ke-Yan¹, ZHANG Guo-Xiang¹, FAN Ling-Hua¹, LIN Zi-Jie², WEN Xiu-Jun¹, MA Tao^{1*} (1. Guangdong Key Laboratory for Innovative Development and Utilization of Forest Plant Germplasm, College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Bureau of Forestry and Landscape of Zengcheng District, Guangzhou 511300, China)

Abstract: This study describes a method for accurately and quickly identifying the sex of the *Cricula variabilis* old-instar larvae, pupae and adults. And it compares the characteristics of adults and pupae, male and female. The female genital pore is located in the 8th and 9th abdominal segments, and the 8th abdominal segment is not closed. The male genital pore is located only on the 9th abdominal segment, and there are lumps on both sides of the genital pore. There are more light-colored areas near the ecdysial line of the female larvae's head shell, and there are fewer male light-colored areas. And the color of the female postclypeus area is also lighter than that of the male. The male and female adults differ greatly. The antennae of the male are pinnately shaped. The forewings are generally without transparent spots, or spots are small. The antennae of the female are short and pinnate which looks like filament, and the forewings have three large and continuous transparent spots. After measuring 30 pairs of pupae, it was found that there were significant differences between the male and female pupae ($P < 0.05$) in the morphological characteristics data such as pupae length, pupae width and pupae weight.

Key words: *Cricula variabilis*; larva; pupa; adult; sex identification

基金项目: 广东省林业科技创新项目 (2019KJ CX016)

作者简介: 张锦坤, 男, 硕士研究生, 主要研究方向森林害虫综合防治, E-mail: m18819427405@qq.com

* 通讯作者 Author for correspondence: 马涛, 男, 博士, 主要研究方向昆虫信息化控制技术及天然活性产物的研究, E-mail: matao@scau.edu.cn

收稿日期 Received: 2019-11-27; 接受日期 Accepted: 2020-03-06

异斑酷大蚕蛾 *Cricula variabilis* (Naumann & Löffler, 2010), 隶属鳞翅目 *Lepidoptera* 大蚕蛾科 *Saturniidae* 小字大蚕蛾属 *Cricula*, 近期在广东省广州市增城区派潭镇大封门林场大量发生, 严重危害各种阔叶树种的生长 (陈刘生等, 2019)。异斑酷大蚕蛾以食叶为害, 严重时可能造成寄主全枝枯死, 在大封门林场主要危害中华润楠 *Machilus chinensis*、樟树 *Cinnamomum camphora*、阴香 *C. burmanni*、鬃菊 *Castanopsis fissa* 等植物, 其中以中华润楠受害最为严重。

目前, 已有研究者报道夜蛾科、螟蛾科、蝠蛾科、袋蛾科等鳞翅目害虫的雌雄蛹鉴别方法 (张蒙等, 2014; 张媛媛等, 2016; 王岩等, 2018; 陈琦等, 2019), 异斑酷大蚕蛾的各虫态特征也有部分描述 (陈刘生等, 2019), 但尚无报道该害虫各虫态雌雄的准确鉴定方法, 特别是幼虫期性别的区分。本研究对雌雄异斑酷大蚕蛾末龄幼虫进行解剖, 详细描述雌雄末龄幼虫生殖孔位于第8和第9腹节特征, 进而寻找一种快速鉴定不同性别的蛹与成虫性别的方法。本研究结果将为基层林业工作人员和广大科研人员在野外快速准确识别不同虫态的雌雄个体提供了科学依据和理论方法, 有利于明确该害虫在野外幼虫期的性比, 监测林间种群动态, 为后续防控提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 供试虫源及饲养方法

所用虫源采自广东省广州市增城区大封门森林公园 (23°34′~23°37′N, 113°44′~113°51′E), 总面积为 3 202.92 hm²。该林场为典型热带湿润季风气候, 大部分植被属于次生林, 虫害发生中心植被主要由中华润楠 *M. chinensis* 为主的樟科 *Lauraceae* 植物以及山茶科 *Theaceae*、大戟科 *Euphorbiaceae*、蔷薇科 *Rosaceae* 的植物组成。

在野外大量采集带有虫体的植物枝条, 带回实验室暗室内进行饲养 (温度 26 ± 1℃, 相对湿度 75% ± 5%, 光周期 L:D = 12 h:12 h, 其中光期 19:00–7:00, 暗期 7:00–19:00), 将幼虫分装在收纳箱内进行饲养, 每天定时将做茧的幼虫挑出进行记录。

1.2 观察与验证方法

将挑出的虫茧剪开, 在体视显微镜下观察蛹体的腹部末端第8–10节, 并将区分好的雌雄蛹分别单独放置在网笼内并加以标记, 待羽化后收集成虫再次进行观察与性别区分, 以验证前期的结果。另取部分末龄幼虫, 在其化蛹前区分雌雄并标记, 结合上一步雌雄蛹的鉴定结果确定其化蛹后的性别, 以此验证幼虫性别鉴定的准确性。实验共选取 162 头虫蛹与 69 头幼虫。

1.3 测量与数据分析

选取上述步骤后得到的雌雄蛹体各 30 头, 使用游标卡尺测量裸蛹的蛹长与蛹宽 (蛹体长度最大值与宽度最大值), 同时使用万分之一分析天平测量蛹重, 并用 SPSS 22.0 软件进行数据处理, 将雌雄蛹的各项体征参数进行独立样本 *t* 检验。

2 结果与分析

2.1 虫蛹体型特征分析

通过观察异斑酷大蚕蛾蛹的特征后, 发现雌雄蛹无论是在蛹长 ($t = -36.23, P = 0.008$)、蛹宽 ($t = -30.18, P = 0.005$) 还是蛹重 ($t = -43.84, P = 0.000$) 上, 都存在显著性差异 ($P < 0.05$) (表1), 其中雄蛹的长宽比为 2.34:1。雌蛹的长宽比为 2.44:1。雄雌蛹长比为 1:1.35, 蛹宽比为 1:1.29, 蛹重比为 1:2.40, 雌蛹体型稍大于雄蛹。

2.2 虫蛹外部特征对比

异斑酷大蚕蛾的蛹体为黄褐色, 腹部颜色较深, 腹部末端的臀棘 15~23 个。在体视显微镜下观察, 其雌雄蛹形态特征区别明显 (图1)。

雌蛹的体型较大, 触角不发达, 鞭节主干处隆起不明显, 前足与中足在蛹体表面所占区域的面积比例较雄蛹更大, 复眼周围的头部区域所占比例也更大 (图3), 腹部第8腹节不愈合, 第8和第9腹节上有一条黑色的生殖孔, 且第9腹节无瘤状突起, 腹部末端整体较圆润 (图2)。而雄蛹的体型较小, 触角发达, 鞭节主干处有两道隆起, 前足与中足等区域较小 (图3), 腹部第8腹节愈合, 生殖孔位于第9腹节上, 且生殖孔两侧具有瘤状突起, 腹部末端整体较尖锐 (图2)。

表 1 异斑酷大蚕蛾虫蛹的体型数据

Table 1 Morphological characteristics data of *Cricula variabilis* pupa

性别 Sex	蛹长 (mm) Length			蛹宽 (mm) Width			蛹重 (g) Weight		
	最小值 Min.	最大值 Max.	均值 ± 标准误差 Mean ± SE	最小值 Min.	最大值 Max.	均值 ± 标准误差 Mean ± SE	最小值 Min.	最大值 Max.	均值 ± 标准误差 Mean ± SE
♂	14.12	21.59	17.70 ± 0.06 b	5.41	9.21	7.56 ± 0.03 b	0.2542	0.8524	0.500 ± 0.005 b
♀	17.31	27.2	23.87 ± 0.19 a	7.22	11.62	9.79 ± 0.08 a	0.4865	1.6593	1.202 ± 0.025 a

注: 表中均值 ± 标准误差中不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。Note: Data of Mean ± SE with different letters are significantly different ($P < 0.05$) .

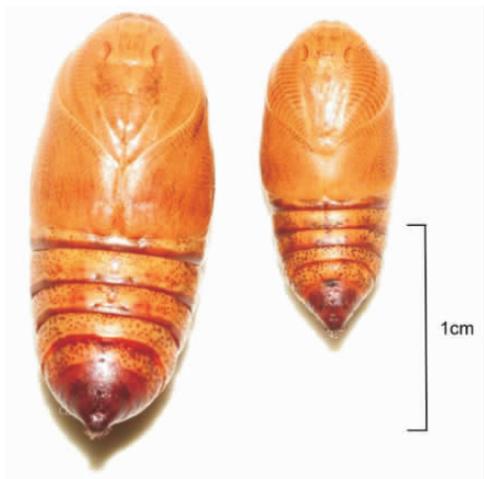


图 1 异斑酷大蚕蛾雌雄蛹对比

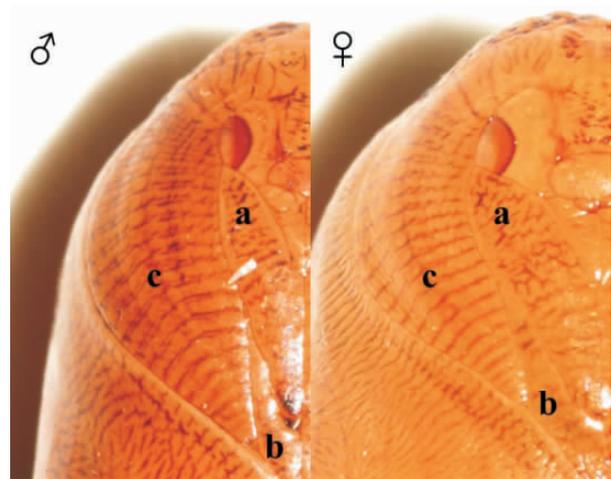
Fig. 1 Pupae comparison between male and female of *Cricula variabilis*

图 3 异斑酷大蚕蛾蛹的头部细节

Fig. 3 Head detail of *Cricula variabilis* pupae

注: a, 前足; b, 中足; c, 触角。Note: a, Forefoot; b, Midfoot; c, Antenna.

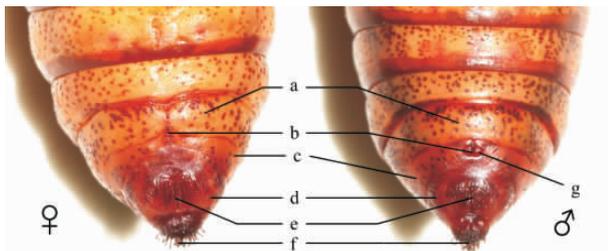


图 2 异斑酷大蚕蛾蛹的腹部细节

Fig. 2 Abdomen detail of *Cricula variabilis* pupae

注: a, 第 8 腹节; b, 生殖孔 (产卵孔); c, 第 9 腹节; d, 第 10 腹节; e, 肛门; f, 臀棘; g, 瘤状突起。
Note: a, The 8th abdominal segment; b, Genital pore (Oviporus); c, The 9th abdominal segment; d, The 10th abdominal segment; e, Anus; f, Hip thorn; g, Lump.

2.3 虫蛹镜检验证与成虫形态区分

经统计, 共鉴定 162 头虫蛹性别, 其中有 119 头雄蛹, 43 头雌蛹。羽化的成虫共 114 头, 鉴定准确率为 100.00%。

在正常情况下, 雌雄成虫形态差异明显, 易

于区分 (图 4)。雄成虫的体色多变, 由黄褐、褐色到黑褐色过渡, 触角羽状, 翅展 40~60 mm, 腹部较小, 前翅一般无透明斑或透明斑很小。而雌成虫的体色单一, 多为红褐色, 触角羽状但不发达, 近丝状触角, 翅展 50~80 mm, 初羽化雌蛾腹部膨大, 随雌蛾产卵而慢慢变小, 前翅通常有 3 个较大且连续排列的透明斑。

2.4 幼虫性别鉴定与验证

经大量观察, 发现末龄幼虫的性别可以从外壳上的蜕裂线来区分, 如图 5 所示, 蜕裂线浅色区域较宽的为雌性, 浅色区域较窄的为雄性, 且雌性后唇基区域的颜色也较雄性更浅。将幼虫头部简化后形成图 6 幼虫头部特征模式图, 显然, 可以看出雌雄幼虫在蜕裂线上有着明显的性别差异。

经过初步鉴定, 在 69 头幼虫中分出雌性 24 头, 雄性 45 头, 待羽化后对成虫验证发现准确率分别为 100% 和 90.63% (表 3)。

表 2 异斑酷大蚕蛾雌雄蛹性别鉴定结果

Table 2 Gender identification result of *Cricula variabilis* pupae

性别 Sex	观察数量 (头) Number of observations	羽化数量 (头) Number of emerging adults	鉴定成虫 (头) Number of adults identified	准确率 (%) Correct rate
雄虫 Male	119	83	83	100.00
雌虫 Female	43	31	31	100.00

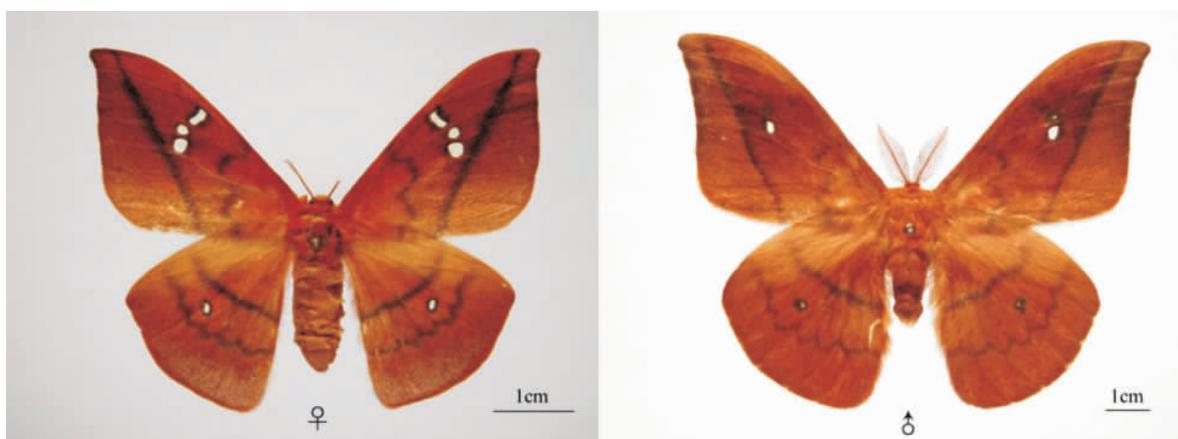


图 4 异斑酷大蚕蛾成虫

Fig. 4 *Cricula variabilis* adults

表 3 异斑酷大蚕蛾幼虫性别鉴定结果

Table 3 Gender identification result of *Cricula variabilis* larvae

性别 Sex	观察数量 (头) Number of observations	羽化数量 (头) Number of emerging adults	鉴定成虫 (头) Number of adults identified	准确率 (%) Correct rate
雄虫 Male	45	32	29	90.63
雌虫 Female	24	15	15	100.00

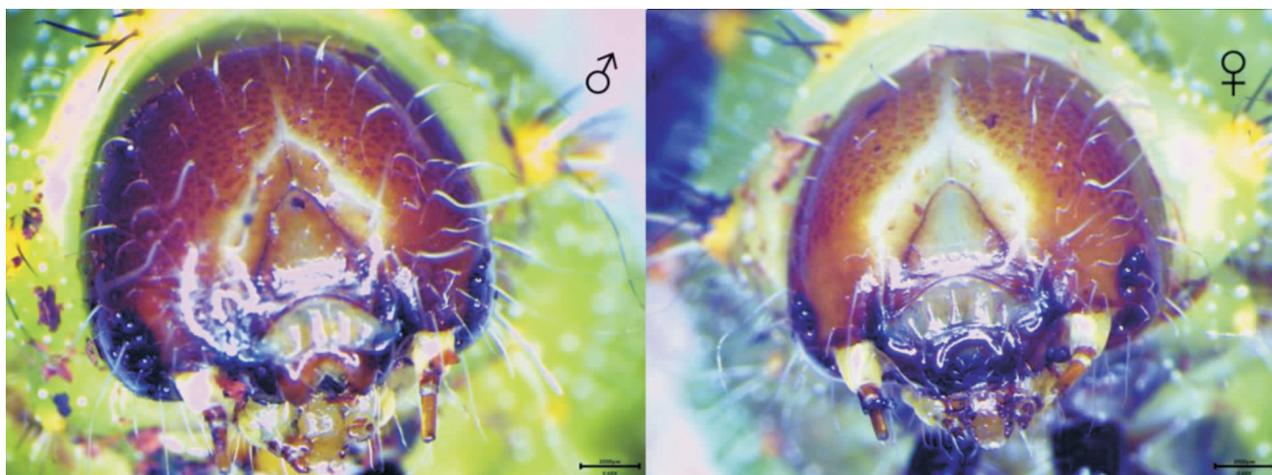


图 5 异斑酷大蚕蛾幼虫头部细节

Fig. 5 Head detail of *Cricula variabilis* larvae

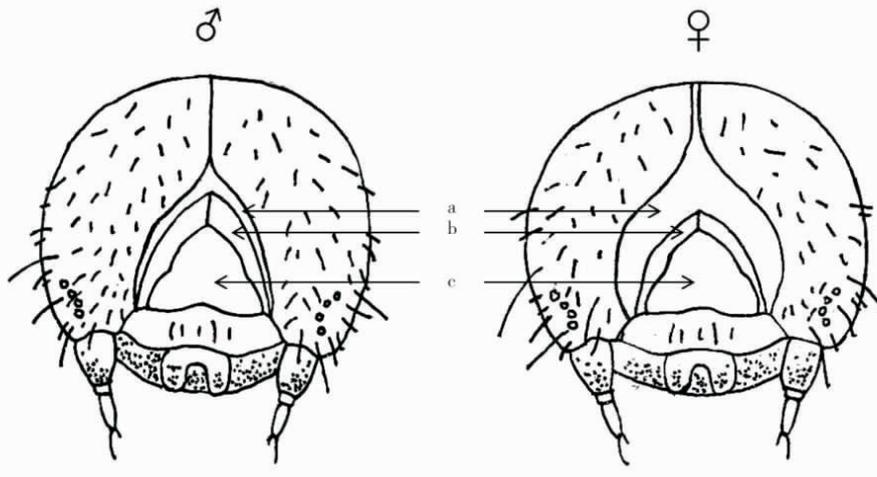


图6 异斑酷大蚕蛾幼虫头部鉴别特征模式图

Fig. 6 Identification feature of the larval head of *Cricula variabilis*

注: a, 蜕裂线; b, 额; c, 后唇基。Note: a, Ecdysial line; b, Frons; c, Postclypeus.

3 结论与讨论

3.1 蛹的性别区分

研究表明,通过观察异斑酷大蚕蛾蛹体的腹部末端第8和第9腹节来区分雌雄是一种准确且快速的方法。雌虫生殖孔位于第8和第9腹节,且第8腹节不愈合,雄虫生殖孔仅位于第9腹节上,且生殖孔两侧有瘤状突起。此外,还可以通过观察触角发达程度来区分雌雄蛹,雄性触角更发达且可以在蛹上观察到有两道隆起,雌蛹触角处仅有一道隆起。雌雄蛹在蛹长、蛹宽、蛹重这3个体征参数上均有显著性差异,表现为雌蛹体型普遍大于雄蛹,但这3个体征参数的分布范围都有重叠。近几年来,已有报道黏虫 *Mythimna separate* (陈琦等, 2019)、阿尔泰蝠蛾 *Hepinlus altaicola* (王岩等, 2018)、凤凰木夜蛾 *Pericyma cruegeri* (陆雪雷等, 2017) 等害虫的雌雄蛹鉴定方法,这些昆虫在蛹期性征上的差异均与异斑酷大蚕蛾的雌雄蛹类似,但是不同物种的雌雄蛹之间仍具有细微差异,像上述昆虫种类的雌雄蛹腹部分节明显;而麻楝蛀斑螟 *Hypsipyla robusta* (马涛等, 2013)、香梨优斑螟 *Euzophera pyriella* (张蒙等, 2014)、黑肾卷裙夜蛾 *Plecoptera oculata* (刘怡等, 2015) 等昆虫雌蛹腹部末端第8、9、10腹节分节不明显。有些昆虫可以通过对体型数据的直接测量将雌雄蛹区分开,如喻浩等人对色季拉山的色季拉钩蝠蛾 *Thitarodes sejilaensis*、蒲氏钩蝠蛾 *T. pui* 的研究表明,蛹长度、宽度、厚度及

蛹前后长度比值等体型参数可准确快速地辨别蛹的种类与性别(喻浩等, 2015, 2016),但是阿尔泰蝠蛾 *H. altaicola* 雌蛾无论在体长、体重、胸宽、腹宽等各项体征参数的分布范围都要高于雄蛾,却由于体征参数分布范围有重叠,所以不能通过测量体型数据将雌雄蛹区分开(王岩等, 2018)。这也与本实验的异斑酷大蚕蛾的研究结果一致,雌蛾体型稍大于雄蛾,雌蛹蛹在各项体型特征上都有显著性差异($P < 0.05$),但是分布范围有重叠,因此在野外实践工作中,可以不破坏蛹室,通过体型粗略地区分雌雄,但是要得到准确的结果仍需直接观察蛹体。

3.2 幼虫的性别区分

鉴定幼虫性别的方法为观察末龄幼虫的腹部,有无即将发育成型的睾丸形成的气泡突或圆斑,此特征为雄性特有,若无则为雌性,如广州小斑螟 *Oligochroa cantonella* 在腹部第5节有气泡突(文娟等, 2016),苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* 则是在第5腹节形成紫褐色“肾形”斑(冯丽凯等, 2019),马尾松毛虫 *Dendrolimus punctatus* 雄性幼虫在第9腹节所连接的附腺原基处有透明圆斑(徐世多等, 1983)。而异斑酷大蚕蛾的幼虫体型差异较大,且取食量的差异也会使体表的颜色不一致,表现为由黄绿色到翠绿色的变化,深色的体表使得无法直接观察到卵巢睾丸等性征;经观察发现末龄幼虫的性别可以从头壳上的蜕裂线来区分,浅色面积较大的为雌性,浅色面积较小的为雄性。经验证,鉴定准确性高于90%,可应用于野外幼虫性别的快速识别与确定。

3.3 成虫的性别区分

由于异斑酷大蚕蛾成虫期雌雄差异较大, 上文已有提到, 在此不再赘述。值得注意的是, 该害虫虽然雌雄差异明显, 但是同种雄性存在多型现象, 表现出种内性状差异大于种间差异等现象。而对于小字大蚕蛾属 *Cricula* 的其他物种, 其雌雄成虫区分方法仍与异斑酷大蚕蛾一致, 如危害阴香的小字大蚕蛾 *C. trifenestrata* (阮甘棣和唐月兰, 1986), 其成虫触角、腹部、斑纹、颜色等差异使雌雄虫易于区别开。经陈刘生等人 (2019) 对成虫的解剖与 DNA 条形码数据等研究证实, 确定危害增城区大封门森林公园阔叶树的种群均为异斑酷大蚕蛾, 无其他近似物种。

3.4 总结

目前, 对异斑酷大蚕蛾仍然缺乏的基础性研究。由于其主要以幼虫食叶为害, 且化蛹后蛹室筑于树枝间易于观察, 因此对幼虫期和蛹期的外观描述与性别鉴定就尤为重要。不同性别的异斑酷大蚕蛾在蛹的体型和外部特征上依然有较大的差异, 今后对其他鳞翅目害虫的雌雄蛹的鉴定仍要结合实际。对于大部分鳞翅目害虫的幼虫鉴定, 由于体色与体型的原因, 无法直接观察到雄虫典型的圆斑, 因此本研究也为这部分害虫的幼虫期性别鉴定提供了新的思路与方法, 在异斑酷大蚕蛾早期爆发的野外调查时, 即能确定该害虫野外种群幼虫期的性比, 监测林间种群动态, 更有效地制定防控策略。

参考文献 (References)

Chen LS, Li KY, Huang HH, *et al.* Primary research on *Cricula variabilis*—a new defoliator of broad-leaved trees from south China [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2019, 41 (5): 1011–1017. [陈刘生, 李琨渊, 黄焕华, 等. 阔叶树食叶新害虫—异斑酷大蚕蛾研究初报 [J]. 环境昆虫学报, 2019, 41 (5): 1011–1017]

Chen Y, Hou YH, Duan Y, *et al.* Rapid sex identification of *Mythimna separata* pupae [J]. *Plant Protection*, 2019, 45 (2): 157–159. [陈琦, 侯艳红, 段云, 等. 黏虫蛹性别的快速鉴别方法 [J]. 植物保护, 2019, 45 (2): 157–159]

Feng LK, Liu Z, Li GF, *et al.* Morphological criteria for sexing different developmental stages of the codling moth, *Cydia pomonella* (L.) [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2019, 56 (2): 354–360. [冯丽凯, 刘政, 李国富, 等. 苹果蠹蛾不同虫态体征及雌雄个体的快速鉴别方法 [J]. 应用昆虫学报, 2019, 56 (2): 354–360]

Liu Y, Li LL, Lu J, *et al.* Distinguishing the pupae and adults sexuality of *Plecoptera oculata* Moore [J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2015, 43 (3): 318–319+328. [刘怡, 李莉玲, 卢

进, 等. 黑肾卷裙夜蛾雌雄蛹和成虫的鉴别 [J]. 山西农业科学, 2015, 43 (3): 318–319+328]

Lu XL, Zhu CQ, Qin WQ, *et al.* Sex identification of pupae and adults of *Pericyma cruegeri* Butler [J]. *Forest Pest and Disease*, 2017, 36 (4): 34–36. [陆雪雷, 朱诚棋, 秦文权, 等. 凤凰木夜蛾蛹和成虫的雌雄形态鉴定 [J]. 中国森林病虫, 2017, 36 (4): 34–36]

Ma T, Yang XC, Sun ZH, *et al.* A simple method for identifying sex of pupae and adults of *Hypsipyla robusta* Moore [J]. *Forest Pest and Disease*, 2013, 32 (6): 15–17. [马涛, 杨兴翠, 孙朝辉, 等. 麻楝蛀斑螟蛹和成虫的雌雄形态鉴定 [J]. 中国森林病虫, 2013, 32 (6): 15–17]

Naumann S, Löffler S. Notes on the Asian genus *Cricula* Walker, 1855, with description of new species (Lepidoptera: Saturniidae) [J]. *Neue Entomologische Nachrichten, Marktleuthen, Supplement 2*, 2010: 1–24.

Ruan GL, Tang YL. *Cricula trifenestrata* feeds on *Cinnamomum burmannii* [J]. *Guangxi Forestry*, 1986, 3: 37–38. [阮甘棣, 唐月兰. 危害阴香的小字大蚕蛾 [J]. 广西林业, 1986, 3: 37–38]

Wang Y, Tao CC, Li Q, *et al.* Non-destructive methods for sex determination of the live pupae of *Hepinlus altaicola* Wang (Lepidoptera: Hepialidae) [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2018, 40 (1): 30–35. [王岩, 陶常诚, 李琪, 等. 阿尔泰蝠蛾 (鳞翅目: 蝠蛾科) 活蛹性别的无损鉴别方法 [J]. 环境昆虫学报, 2018, 40 (1): 30–35]

Wen J, Chang MS, Li DW, *et al.* A method for identifying the sex of larva, pupa and adult of *Oligochroa cantonella* Caradja [J]. *Forest Pest and Disease*, 2016, 35 (2): 17–20. [文娟, 常明山, 李德伟, 等. 广州小斑螟幼虫、蛹和成虫的雌雄形态鉴别 [J]. 中国森林病虫, 2016, 35 (2): 17–20]

Xu SD, Xie GL, Jiang JG. Sex differentiation of *Dendrolimus punctatus* larvae [J]. *Forest Pest and Disease*, 1983, 3: 1–4. [徐世多, 谢国林, 江建国. 马尾松毛虫幼虫性别区分 [J]. 森林病虫通讯, 1983, 3: 1–4]

Yu H, Guo JX, Zhang JS, *et al.* Morphological variations and discriminant analysis on *Thitarodes* pupae in Mt. Segrila [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2015, 37 (4): 807–817. [喻浩, 郭技星, 张剑霜, 等. 色季拉山两种钩蝠蛾蛹的体型变异及判别分析 [J]. 环境昆虫学报, 2015, 37 (4): 807–817]

Yu H, Zhang JS, Zhang GR, *et al.* A simple method for identifying sexuality of *Thitarodes pui* pupae and adults [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2016, 38 (1): 43–46. [喻浩, 张剑霜, 张古忍, 等. 一种鉴别蒲氏钩蝠蛾蛹及成虫雌雄的简易方法 [J]. 环境昆虫学报, 2016, 38 (1): 43–46]

Zhang M, Ma T, Zhu XJ, *et al.* Sex identification of pupa and adult in *Euzophera pyriella* Yang [J]. *Plant Protection*, 2014, 40 (1): 119–121. [张蒙, 马涛, 朱雪姣, 等. 香梨优斑螟蛹和成虫的性别鉴定 [J]. 植物保护, 2014, 40 (1): 119–121]

Zhang YY, Shen J, Sun ZH, *et al.* A simple method for identifying sex of pupae and adults of *Acanthopsyche subferalbata* Hampson [J]. *The Journal of Hebei Forestry Science and Technology*, 2016, 3: 8–9. [张媛媛, 沈婧, 孙朝辉, 等. 袋梭蛾蛹和成虫的雌雄形态鉴定 [J]. 河北林业科技, 2016, 3: 8–9]