



枯叶蛱蝶越冬雌成虫的生殖休眠特征研究^{*}

栗 婧^{**} 周成理^{***} 石 雷^{***} 姚 俊 廖怀建 杜 婷

(中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 国家林业局资源昆虫培育与利用重点实验室, 昆明 650224)

摘 要 【目的】 为了开展枯叶蛱蝶 *Kallima inachus* (Doyère, 1840)野生种群保育、人工繁育与利用, 研究了近自然实验种群越冬雌成虫生殖休眠的性质、自然休眠期及其进展过程。【方法】 根据卵母细胞的成熟度, 划分繁殖季直接发育雌成虫的生殖发育进度等级; 主要根据越冬早期雌成虫是否即时响应适宜条件恢复发育, 判定其休眠性质为滞育或静息; 通过定期检查放养在近自然条件下的越冬雌成虫的生殖发育进度, 阐明其自然休眠期; 通过定期将越冬成虫转至 25℃、光照 L:D=15:9 和 RH70%条件下保育不同天数后解剖检查其生殖细胞的发育情况, 判断其滞育期和后滞育静息期。【结果】 (1) 繁殖季雌成虫在 2 日龄即开始卵黄沉积, 至 14 日龄均已发育出成熟卵母细胞, 其生殖发育被划分为 4 个等级, 日龄与发育等级呈显著线性相关。(2) 将羽化于 10 月上旬、放养在近自然条件下的越冬雌成虫从其 11 日龄开始, 保育在 25℃ 条件下 12 d, 其生殖发育仍无启动迹象。(3) 羽化于 9 月 8 日、放养于近自然条件下的雌成虫, 在其 10 日龄时, 绝大多数处于休眠状态, 少量个体继续发育; 羽化于 10 月 1 日的雌成虫, 从 10 月中旬至 12 月下旬, 几乎所有个体均处于休眠状态; 次年 1 月上旬, 部分个体的卵母细胞发育开始启动。(4) 12 月上旬, 所有检查的近自然实验种群雌成虫均不能在 25℃ 条件下迅速恢复生殖发育; 12 月下旬, 大部分个体在 25℃ 条件下恢复发育。但仍有少量个体未显示发育恢复迹象, 体现了个体间存在滞育强度的差异。【结论】 枯叶蛱蝶的越冬生殖休眠为典型的滞育; 近自然条件下, 绝大多数雌成虫从 9 月中旬到 1 月下旬处于休眠状态, 部分个体在次年 1 月初开始生殖发育; 越冬雌成虫在 12 月上旬前处于滞育维持阶段, 自 12 月下旬开始逐渐进入后滞育静息期。

关键词 枯叶蛱蝶, 生殖休眠, 卵母细胞发育, 滞育, 越冬

Characteristics of reproductive dormancy in overwintering adult female *Kallima inachus*

LI Jing^{**} ZHOU Cheng-Li^{***} SHI Lei^{***} YAO Jun LIAO Huai-Jian DU Ting

(Research Institute of Resources Insects, Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Cultivating and Utilization of Resources Insects of State Forestry Administration, Kunming 650224, China)

Abstract [Objectives] To investigate reproductive, overwintering dormancy, including the natural duration of dormancy and its successive stages, to improve the conservation, artificial cultivation and utilization of wild populations of *Kallima inachus* (Doyère, 1840). [Methods] The reproductive development of female adults in a semi-natural experimental population in early summer was graded according to the degree of oocyte development. The stage of dormancy (i.e. diapause or quiescence) was determined mainly by whether female adults in the early overwintering period resumed ovarian development under suitable environmental conditions. The developmental status of overwintering females held in conditions similar to the natural environment was inspected at regular intervals to determine the period of natural dormancy.

^{*}资助项目 Supported projects: 中国林业科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目 (CAFYBB2017MB015); 林业公益性行业科研专项项目“开放式蝴蝶景观构建关键技术研究及应用” (201504305)

^{**}第一作者 First author, E-mail: 820073871@qq.com

^{***}共同通讯作者 Co-corresponding authors, E-mail: buttzhou@163.com; leishi@139.com

收稿日期 Received: 2018-07-13, 接受日期 Accepted: 2018-08-31

Overwintering females were transferred to experimental conditions of 25 °C (L : D = 15 : 9 and RH 70 %) at regular intervals to determine when diapause was terminated, as indicated by the resumption of ovarian development. **[Results]** (1) 2-day-old female adults developed oocytes with yolk in early summer, and all females had mature oocytes on the 14th day after eclosion. There was a significant linear relationship between reproductive development and age that could be divided into four stages. (2) After incubation for 12 days in conditions similar to that of the natural environment in early summer (25 °C, L : D = 15 : 9 and RH 70 %), 11 day-old overwintering adults that had eclosed in early October did not initiate reproductive development. (3) Most ten-day-old female adults that had eclosed on September 8 became reproductively dormant when held under semi-natural environmental conditions, although a few still continued reproductive development. All but one of the female adults that eclosed on October 1 were reproductively dormant from mid-October to late December when held under semi-natural environmental conditions but ovarian development began in some individuals in early January of the following year. (4) Female adults could not resume reproductive development rapidly at 25 °C until mid to late December, but by late December most individuals had resumed development at 25 °C, although a small number still showed no sign of ovarian development, indicating individual differences in diapause intensity. **[Conclusion]** The overwintering, reproductive dormancy of *K. inachus* is a typical diapause. While the majority of female adults in a semi-natural experimental population were reproductively dormant from mid-September to late January, some individuals began ovarian development in early January. Overwintering female adults were at the stage of diapause maintenance till the beginning of December, and gradually entered a period of post-diapause quiescence from late December.

Key words *Kallima inachus*, reproductive dormancy, oocyte development, diapause, overwintering

休眠 (Dormancy) 是昆虫用以应对极端温度、食物匮乏、干旱等不利环境条件的常见生存对策,在昆虫的生活史中占有重要地位。一般认为,昆虫的休眠大体上可分为静息 (Quiescence) 和滞育 (Diapause) 两种基本类型 (Košťál, 2006)。生殖休眠即发生在昆虫成虫期的休眠,广泛存在于各种昆虫类群中,其外在特征主要表现为生殖发育停滞、交配和产卵活动停止等 (王满囤和李周直, 2004)。已知许多昆虫的成虫休眠为典型滞育 (程丽媛等, 2017; 赖锡婷等, 2017), 但也有不少种类呈现为静息或所谓“寡兼性滞育 (Oligopause)”的特征 (Musolin and Saulich, 2000; Barker, 2013; Pocius, 2014)。掌握昆虫的休眠特性,对于开展其人工繁育和利用具有重要意义 (Denlinger, 2008)。

在鳞翅目 Lepidoptera 蝶类中,生殖休眠较为普遍,其中大部分已知实例发生在越冬期间 (Fujita, 2009; Noriyuki et al., 2011; Leong et al., 2016), 也有少数发生在夏季 (薛芳森和朱杏芬, 1994; Kida et al., 1997; Kopper et al., 2001)。成虫越冬主要见于蛱蝶科 Nymphalidae 和粉蝶科 Pieridae 种类中。虽然目前文献中将大多数蝴蝶的生殖休眠都被归为“滞育”,但实际上许多实例并未经过严格的检验,甚至对于同一物

种的同一种群,不同研究者得出的结论也很不一致。例如,对于研究较为深入的北美君主斑蝶 *Danaus plexippus* 的迁移-越冬生殖休眠, Herman 等指出,越冬成虫具有滞育特有的“不应期”(将休眠成虫保育在适宜发育的夏季条件下,生殖发育仍不能即时恢复) (Herman, 1981; Herman et al., 1989), 肯定了北美越冬君主斑蝶成虫的生殖休眠属于滞育。但 Pocius (2014) 的实验则并未发现这个不应期的存在 (在堪萨斯采集的越冬雌雄成虫,在 28-22 °C 条件下,6 d 内交配,交配发生 3 d 后开始产卵)。目前在蝶类中,仅黄钩蛱蝶 *Polygonia caureum*、斑豹蛱蝶 *Speyeria idalia* 和密纹矍眼蝶 *Ypthima multistriata* 等少数几个蝶种的生殖休眠经严格实验证实为典型滞育 (Kopper et al., 2001; Fujita, 2009; Noriyuki et al., 2011), 而澳大利亚西南威尔士君主斑蝶种群则被确认为寡兼性滞育 (James, 1982)。另外一些种类的生殖休眠属性则明显存在疑问 (Canzano et al., 2003; Leong et al., 2012)。

枯叶蛱蝶 *Kallima inachus* (Doyère, 1840), 属鳞翅目 Lepidoptera, 蛱蝶科 Nymphalidae, 枯叶蛱蝶族 Kallimini, 枯叶蛱蝶属 *Kallima* Doubleday (周尧, 1999)。其成虫精巧地模仿枯叶的形态,是著名的伪装昆虫,深受人们喜爱,

是当前国内外蝴蝶生态观赏园中的主流蝶种之一,也是目前国内开展人工繁育的主要观赏蝶种之一。同时,作为典型的森林内部及森林边缘栖息物种,枯叶蛱蝶在昆虫等无脊椎动物保护工作中也是一个适宜的旗舰物种。在四川峨眉山地区,枯叶蛱蝶一年发生3代,以成虫越冬(周成理,2008)。近自然实验种群中,8月中下旬羽化的成虫绝大部分停止交配,同时取食活动强化并积累大量脂肪,直到次年3月初才恢复繁殖活动。而8月下旬至9月下旬,当地平均气温远高于枯叶蛱蝶春季繁殖期间的平均气温,且其主要寄主植物仍处于生长阶段。成虫休眠发生的时间显然大大超前于不利环境条件的实际发生。据此推测,枯叶蛱蝶越冬成虫的生殖休眠可能为典型滞育。

易传辉(2007)初步研究了光周期和温度对枯叶蛱蝶成虫生殖休眠的诱发作用,并测定了成虫冬季休眠期间部分生化物质的含量变化。结果表明,枯叶蛱蝶成虫羽化后,在低温、短光照条件下卵巢发育缓慢,高温、长光照则促进雌成虫生殖发育,故而推测枯叶蛱蝶成虫滞育的光敏感虫期为成虫羽化初期。但易传辉(2007)的实验结果也可解释为,不同条件下的生殖发育速率是温度和光周期直接作用的结果,而并不一定意味着这两个因素被实验昆虫作为环境信号,提前用于抉择自身的发育路径(从直接发育切换到滞育)。故而迄今还没有严格的实验证明枯叶蛱蝶的冬季生殖休眠的性质。要确认枯叶蛱蝶成虫的越冬休眠是否为滞育,需要回答一个根本性的问题:越冬成虫在其越冬早期是否即时响应适宜发育的环境条件而恢复发育,也即其生殖发育是否存在明显的不应期?此外,弄清枯叶蛱蝶越冬期间的休眠进展,包括疑似滞育的强度变化、自然解除时间等,对于其人工繁育和利用也具有重要价值。

本研究通过定期解剖放养在近自然条件下的雌成虫的生殖发育状况,掌握越冬成虫的自然生殖休眠起始和结束期;通过比较保育在同样的模拟初夏温度、光照和空气湿度条件下的繁殖季直接发育成虫与越冬初期成虫的生殖发育进程,根据越冬成虫生殖发育对适宜环境条件的响应

特征,明确枯叶蛱蝶成虫的越冬休眠是生殖滞育或静息;通过越冬期间不同时期成虫生殖发育对适宜环境条件的响应特征,判断其休眠状态及疑似滞育的进展情况。研究结果可为人工调控枯叶蛱蝶的生殖休眠、开展其人工繁育和活体利用等提供依据,同时也可为其其它蝶种的生殖休眠特性研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验蝴蝶

实验枯叶蛱蝶成虫来源于四川省峨眉山区人工繁育种群,人工种群种源采自当地野外。实验蝴蝶卵、幼虫及蛹期均在当地自然温湿光照条件下饲养,幼虫以当地主要野生寄主植物板蓝 *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek [马蓝 *Strobilanthes cusia* (Nees) O. Kuntze] (爵床科 Acanthaceae) 为食料。参照周成理(2008)的观察结果,将9月上旬及之后羽化的成虫视作越冬个体并放养保存在遮阳网网室(遮光率为80%)内,以含有5%乙醇的20%蔗糖水溶液,外加葡萄、梨等半腐烂水果作为补充营养源(周成理等,2006)。由于实验成虫越冬期间经历的环境条件与野生成虫相近,故称为“近自然实验种群”成虫。

各次实验开始前,将试虫装入三角纸袋中快递至昆明,次日开展实验。在需要将试虫放入人工气候箱内控制条件下保育的实验中,用三角纸袋将试虫包住,仅让其头部露出,将装有试虫的纸袋置于中部掘有凹槽(深度约1.5 cm)的泡沫板上,让成虫头部朝向凹槽;凹槽内加入足量含有约5%乙醇的10%蜂蜜水溶液,让成虫取食(图1)。所有控制条件下的成虫均保育在人工气候培养箱(RTOD-800D,杭州托普)内。

1.2 成虫越冬生殖休眠的性质研究

1.2.1 直接发育成虫的生殖发育进程观察

2017年6月,将在四川峨眉山近自然条件下饲养的新化蛹200头及其羽化成虫,保育在气候箱内,设置温度为 (25 ± 1) 、光周期 L:D=15:9(24 h 循环光周期;亮期光照强度设定值为3 000 lx)和相对湿度 RH70%。分别取0、

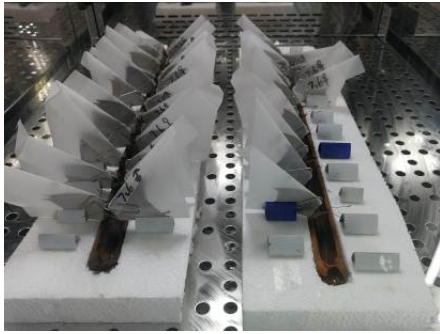


图 1 枯叶蛱蝶成虫饲养方式

Fig. 1 The feeding method of *Kallima inachus* adults

2、4、6、8、10、12、14 及 16 日龄雌成虫各 5-10 头, 解剖检查内生殖器官及卵母细胞发育情况。根据卵母细胞的成熟程度, 对雌成虫的生殖发育进度进行分级。

采用 VHX-1000 超景深三维显微镜 (KEYENCE, 日本) 采集卵巢发育图像。拍照时, 利用显微镜的实时 2D 图像合成功能, 在放大 20 倍的情况下, 将局部图片合成为内生殖系统的完整图片。

1.2.2 越冬早期成虫的生殖发育对适宜条件的响应研究 2017 年 9 月中旬, 将羽化于 9 月 8 日、放养保存在四川峨眉山的 9 日龄近自然实验种群雌成虫 120 头, 快递至昆明。次日 (即成虫 10 日龄), 将试虫保育在人工气候箱内, 设置温度 25℃、光周期 L:D=15:9 和 RH70%。从试虫进入气候箱保育 2 日起, 每 2 日解剖检查 5-10 头雌成虫的生殖发育状况, 直至成虫 24 日龄或连续 2 次解剖均发现成熟卵母细胞为止。

2017 年 10 月中旬, 将羽化于 10 月 1 日并放养在四川峨眉山的 10 日龄近自然实验种群雌成虫 120 头, 快递至昆明。次日 (即成虫 11 日龄), 将其保育在人工气候箱内, 设置温度 25℃、光周期 L:D=15:9 和 RH70%。从保育后的第 2 日 (即成虫 13 日龄) 起, 每 2 日解剖检查 5-10 头雌成虫的生殖发育状况进度, 直至雌成虫 24 日龄或连续 2 次解剖均发现成熟卵母细胞为止。

对比直接发育成虫在同等条件下的生殖发育进程, 根据越冬成虫在其越冬初期的生殖发育是否即时或延时响应适宜发育条件, 判定成虫的越冬生殖休眠是典型滞育或静息。

1.3 越冬成虫的自然休眠期检查

取羽化于 9 月 8 日、放养保存在峨眉山近自然条件越冬网室内的雌成虫快递至昆明。次日, 解剖检查内生殖系统发育状况, 共解剖 10 头。

将羽化于 10 月 1 日的雌成虫编号标记, 放养在峨眉山近自然条件下的网室内越冬。自 2017 年 10 月上旬至 2018 年 1 月下旬, 每约 15 d 1 次, 将试虫快递至昆明。次日, 解剖检查内生殖系统发育状况, 每次解剖约 10 头。

1.4 越冬成虫生殖休眠的自然进展阶段判定

从 2017 年 10 月上旬至 2018 年 1 月下旬, 每约 15 d 1 次, 从峨眉山近自然实验种群中随机抽取羽化于 10 月 1 日的雌成虫 50 头, 保育在气候箱内, 设置温度 25℃、光周期 L:D=15:9 和 RH70%。每 4 日解剖检查雌成虫各 10 头的生殖发育进度, 直至雌成虫在气候箱内保育至第 16 日或连续 2 次解剖均发现成熟卵母细胞为止。

1.5 数据分析

利用统计分析软件 SPSS 23.0 对各实验内容所得数据进行统计分析, 获得平均值及标准误。不同日龄间的差异采用单因素方差分析和 Duncan's 多重比较。根据各日期发育等级的差异采用卡方检验进行统计分析。保育天数与发育进度的相关性用 Pearson 相关分析进行统计检验。

2 结果与分析

2.1 成虫越冬生殖休眠的性质

2.1.1 直接发育雌成虫的生殖发育进程 雌成虫内生殖器官由 1 对卵巢、1 对侧输卵管、1 根中输卵管、交配囊和受精囊组成。卵巢位于腹部 3-6 节, 左右对称, 每侧由 4 根多滋式卵巢管组成, 通过微气管缠绕在一起, 在基部合并后汇入侧输卵管, 2 条侧输卵管在中间合并成中输卵管; 中输卵管直而粗, 沿体中线伸向腹部末端, 开口于生殖腔; 受精囊基部以生殖孔与中输卵管相连接, 端部以输卵管与交配囊相连接。卵巢管分为端丝、生殖区、生长区、卵巢管柄 4 部分 (图 2)。

在所有解剖检查个体中,直接发育雌成虫在羽化当日即具有无卵黄沉积的卵母细胞。2 日龄即具有卵黄沉积的卵母细胞。根据卵母细胞的成熟度,将雌成虫生殖发育分为 4 个等级:1 级,

仅具无卵黄沉积的透明卵母细胞;2 级,具有 $\leq 1/2$ 卵黄沉积的未成熟卵母细胞;3 级,具有 $>1/2$ 卵黄沉积的未成熟卵母细胞;4 级,具有成熟卵母细胞(图 3)。在 25 条件下,生殖细胞持

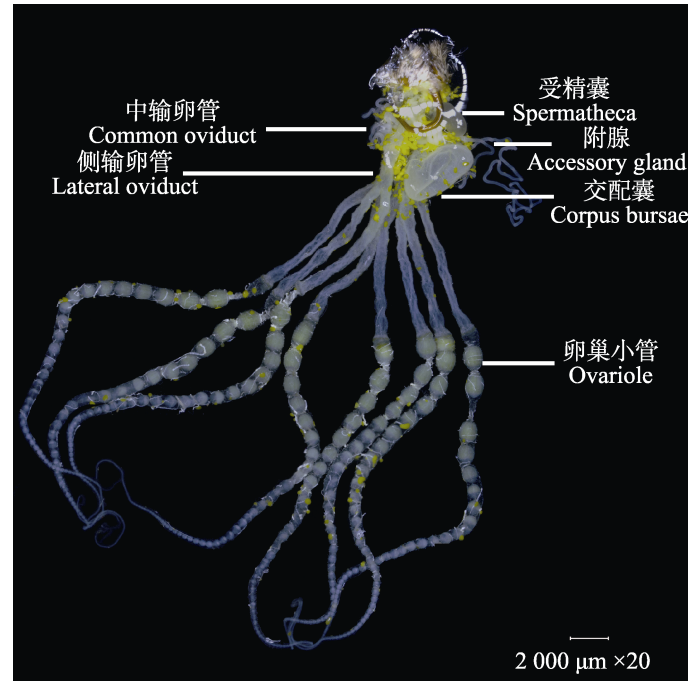


图 2 枯叶蛱蝶雌成虫内生殖器官形态结构

Fig. 2 The morphological characters of female internal reproductive organs of *Kallima inachus*

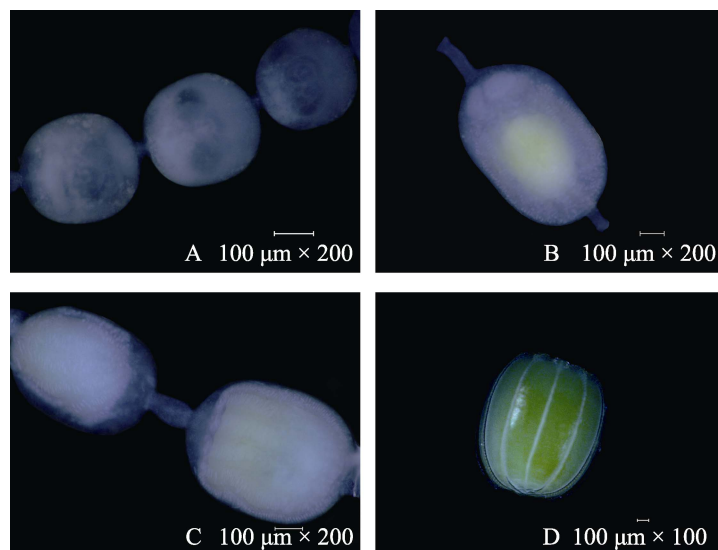


图 3 枯叶蛱蝶雌成虫的生殖发育分级标准

Fig. 3 The standard for grading the reproductive development of female *Kallima inachus*

- A. 1 级: 仅具无卵黄沉积的透明卵母细胞; B. 2 级: 具 $\leq 1/2$ 卵黄沉积的未成熟卵母细胞;
C. 3 级: 具 $>1/2$ 卵黄沉积的未成熟卵母细胞; D. 4 级: 具成熟卵母细胞。

A. Level 1: Having only transparent oocytes with no yolk deposition; B. Level 2: Having immature oocytes with $\leq 1/2$ yolk deposition; C. Level 3: Having immature oocytes with $> 1/2$ yolk deposition; D. Level 4: Having mature oocytes.

续发育,部分个体至 12 日龄已见成熟卵母细胞。等级显著线性相关 ($F_{8,51}=139.856$, Pearson Correlation=0.925, $R^2=0.912$, $P<0.001$)(图 4)。

表 1 枯叶蛱蝶直接发育雌成虫的生殖发育进程										
Table 1 Reproductive development process of directly developing female adults of <i>Kallima inachus</i>										
		日龄 Age								
		0	2	4	6	8	10	12	14	16
发育等级 #	Development level	1[9]	2[8]	2[8]	3[3]/2[3]	3[6]	3[5]	4[2]/3[3]	4[7]	4[6]
样本量	Number of individual	9	8	8	6	6	5	5	7	6
平均值	Average	1.00 f	2.00 e	2.00 e	2.50±0.22 d	3.00 c	3.00 c	3.40±0.24 b	4.00 a	4.00 a

: 方括号前的粗体数字,代表卵母细胞发育级别,括号内数字表示该发育级别的个体数量(表 2-表 4 同); : 羽化当日; “±” 前为加权平均值,后为标准误。同行数据后标有相同字母表示差异不显著。
#: Bold numbers before square brackets represent the level of oocyte development, numbers in brackets indicate the number of individual at the developmental level (The same for table 2-table4); : The day of eclosion; : Data are shown as weighted average ± standard error, and followed by the same letters in a row indicate no significant difference.

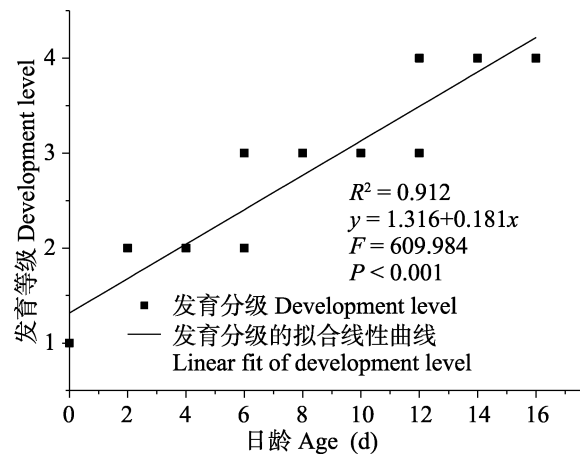


图 4 枯叶蛱蝶直接发育雌成虫的生殖发育进程与日龄的相关曲线
Fig. 4 Correlational curve of reproductive developmental process of directly developing female *Kallima inachus* with the age of adults

2.1.2 越冬早期成虫的生殖发育对适宜条件的响应 在 25 条件下保育 2-14 d,羽化于 9 月上旬的绝大多数 12-24 日龄越冬雌成虫的内生殖系统持续处于休眠状态,仅具有无卵黄沉积的卵母细胞(表 2),表明这些雌成虫绝大部分进入滞育休眠状态。随着日龄的增加发育等级无显著差异 ($P>0.05$)。但在每次解剖中,均有少量雌成虫卵母细胞发育成熟,表明部分羽化于 9 月上旬的雌成虫仍未进入生殖休眠。随着气候箱内保育日期的延长,发育个体比例有增多的趋势,

保育天数与平均发育进度相关性不显著 (Pearson Correlation=0.093, $P=0.446$)。

在 25 条件下保育 2-12 d 后,羽化于 10 月上旬的 14-24 日龄雌成虫发育等级均为 1 级,表明全部雌成虫的内生殖系统均持续处于深度休眠状态(图 5),存在典型滞育特有的不应期,即其生殖细胞的发育并未响应适宜条件下而迅速恢复。

2.2 越冬成虫的自然休眠期

9 月 8 日羽化、放养在近自然条件下的枯叶蛱蝶雌成虫,在 9 月 18 日解剖中发现存在 2 头高度发育的 3 级个体,其余 8 头雌成虫的卵巢均处于休眠状态。10 月 1 日羽化、放养在近自然条件下的雌成虫,从 10 月 12 日到 12 月 27 日,共抽查了 6 批次共 62 头雌成虫。除 1 头在 11 月 29 日解剖时被发现卵巢发育至 3 级,其余个体均处于 1 级休眠状态(表 3)。在此后分别于 2018 年 1 月 9 日和 1 月 22 日进行的两次取样检查中,均出现了 2 级发育个体。不同日龄间的发育等级无显著差异 ($P>0.05$)(图 6)。结果表明,在 9 月中旬至 1 月下旬这段时期,近自然种群中的绝大多数雌成虫处于生殖休眠状态,而从 2018 年 1 月上旬开始,部分个体在峨眉山当地条件下开始缓慢的生殖发育。

表 2 枯叶蛱蝶越冬雌成虫在适宜条件下的生殖发育进程

Table 2 Reproductive development of female overwintering adults of *Kallima inachus* under suitable conditions

羽化 日期 Eclosion date		日龄 Age						
		12	14	16	18	20	22	24
9.8	发育等级 Development level	4[1]/2[1]/ 1[8]	4[3]/1[7]	4[1]/3[1]/ 2[1]/1[7]	4[1]/2[1]/ 1[8]	4[1]/2[2]/ 1[7]	4[2]/3[1]/ 2[1]/1[6]	4[1]/3[1]/ 2[4]/1[4]
	样本量 Number of individual	10	10	10	10	10	10	10
	平均值 Average	1.40±0.31	1.90±0.46	1.60±0.34	1.40±0.31	1.50±0.31	1.90±0.41	1.90±0.31
10.1 #	发育等级 Development level	1[10]	1[11]	1[12]	1[10]	1[10]	1[10]	1[10]
	样本量 Number of individual	10	10	10	10	10	10	10
	平均值 Average	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

: 9 月 8 日羽化, 9 月 18 日到达昆明, 次日保育在 25 条件下; #: 10 月 1 日羽化, 10 月 12 日到达昆明, 次日保育在 25 条件下; “±” 前为加权平均值, 后为标准误。

: Adults eclosed on September 8, arrived in Kunming on September 18, and incubated at 25 from September 19; #: Adults eclosed on October 1, arrived in Kunming on October 12, and incubated at 25 from October 13. : Data are shown as weighted average ± standard error.

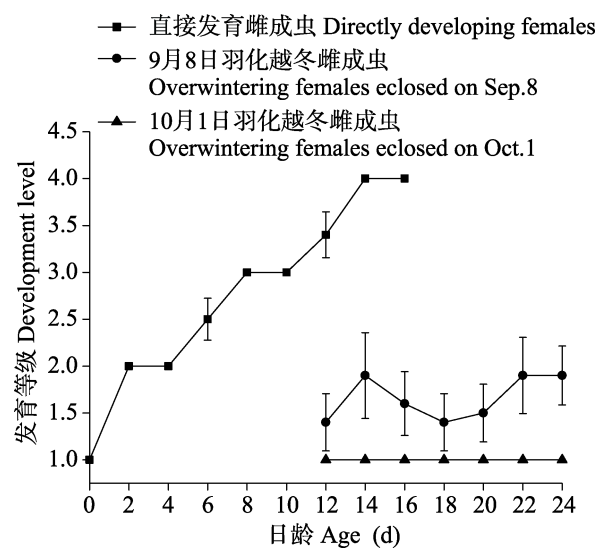


图 5 枯叶蛱蝶直接发育及越冬雌成虫在相同适宜条件下的生殖发育进程比较

Fig. 5 Comparison of reproductive development between direct developmental and overwintering female adults of *Kallima inachus* under the same suitable conditions

2.3 越冬成虫生殖休眠的自然进展阶段

自 2017 年 10 月 3 日至 2018 年 1 月 21 日, 每约 15 d 一次, 从羽化于 2017 年 9 月 30 日并放养保存在四川峨眉山近自然条件下的枯叶蛱

蝶越冬成虫群体中随机抽取约 10 头雌成虫, 保育在 25 条件下 4 d 至 17 d 后解剖。在自 10 月 4 日至 12 月 8 日期间的 5 次取样检查中, 除在第 4 次取样 (试虫于 11 月 28 日寄出, 11 月 29 日抵达实验室), 并于 25 下保育 9 d 后 (12 月 7 日) 检查时, 发现有一头个体卵巢发育至 3 级外, 其余试虫的卵巢均维持在 1 级发育状态 (表 4), 占全部检查试虫的 1.20%。结果表明, 在这段时期, 近自然实验种群中绝大多数雌成虫均处于深度休眠 (即滞育) 状态。但极少数个体并未进入滞育, 或滞育强度较低且能存活至 12 月上旬。而在自 12 月 28 日至 2018 年 1 月 20 日期间的 3 批次取样检查中, 均有 50% 以上的试虫在保育 5 d 后开始卵母细胞的发育, 且卵母细胞的平均发育等级都呈现出随着保育日数的增加而升高的趋势 (图 7)。随着日龄的增加, 发育分级存在极显著差异 ($F_{24,224}=11.697, P<0.001$)。结果表明, 在近自然实验种群中, 大部分个体的滞育在 12 月下旬已经解除或强度明显降低, 在适宜条件下迅速或逐渐恢复生殖发育。尽管如此, 仍有少量个体在保育 10 d 后仍未显示发育恢复迹象, 体现了个体之间在滞育强度上存在差异。

表 3 枯叶蛱蝶越冬雌成虫不同时期的自然生殖发育状态
Table 3 Development status of oocytes in female overwintering adults of *Kallima inachus* under semi-natural conditions

		解剖日期 Anatomical date									
		9.18 ^A	10.05 ^B	10.12 ^B	10.26 ^B	11.10 ^B	11.29 ^B	12.10 ^B	12.27 ^B	1.09 ^B	1.22 ^B
发育等级	Development level	4[2]/1[8]	1[12]	1[11]	1[11]	1[10]	4[1]/1[9]	1[10]	1[10]	2[1]/1[9]	2[1]/1[9]
样本量	Number of individual	10	12	11	11	10	10	10	10	10	10
平均值	Average	1.60±0.40	1.00	1.00	1.00	1.00	1.30±0.30	1.00	1.00	1.10±0.10	1.10±0.10

^A: 试虫羽化于 9 月 8 日; ^B: 试虫羽化于 10 月 1 日; “±” 前为加权平均发育等级, 后为标准误。
^A: Adults eclosed on September 8; ^B: Adults eclosed on October 1; : Data are shown as weighted average±standard error.

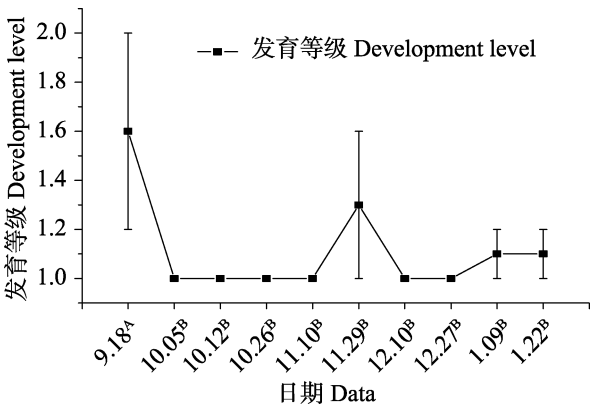


图 6 枯叶蛱蝶越冬雌成虫不同时期的自然生殖发育状态
Fig. 6 Development status of oocytes in female overwintering adults of *Kallima inachus* under semi-natural conditions

^A: 试虫羽化于 9 月 8 日; ^B: 试虫羽化于 10 月 1 日。
^A: Adults eclosed on September 8;
^B: Adults eclosed on October 1.

3 讨论

3.1 枯叶蛱蝶越冬雌成虫的生殖休眠属于典型的滞育

按照多数学者的观点,昆虫的休眠一般分为静息和滞育两种基本类型(Koštál, 2006; 吴坤君, 2002)。静息是指昆虫在不利环境条件超出其适宜范围后,生长发育即时或显著减缓的中止,而在环境条件恢复到适宜区间后,又能快速恢复生长发育。滞育是指昆虫预先受到不利环境变化将要到来的某种信号的诱导,在内在中枢指令调控下,将昆虫个体的直接发育模式切换至滞育模式而后发生的发育停滞(Koštál, 2006)。

滞育的开始通常大大提前于不利环境的到来,滞育一旦发生,通常都会持续一段时间,并不因有利条件的到来而立即结束,但其终止也往往提前于不利环境条件的结束(Danks, 1987)。是否有预见性(Anticipation)和不应期(Refractory phase),是滞育和静息在外在表现形式上的主要区别。

本研究中,在 25℃ 条件下,夏季直接发育的枯叶蛱蝶雌成虫在其 2 日龄即具有卵黄沉积的卵母细胞,部分个体至 12 日龄已见成熟卵母细胞,至 14 日龄已全部发育出成熟卵母细胞。而羽化于 10 月 1 日的越冬成虫,在其原生地近自然条件下放养 10 d 后,从其 11 日龄开始在 25℃ 条件下保育 13 d(至 24 日龄)仍无发育启动迹象,卵巢发育停滞在羽化初期无卵黄沉积阶段。实验结果表明,枯叶蛱蝶越冬成虫在其休眠早期存在一个较长时间的不应期,其生殖休眠属于典型的滞育。

休眠是昆虫度过不利环境条件时期的一种生活史对策。在已知存在越冬生殖休眠的其它蝶种中,目前仅在黄钩蛱蝶 *P. caureum*、密纹矍眼蝶 *Y. multistriata* 等少数几个蝶种中经严格实验证实为典型滞育(Fujita, 2009; Noriyuki *et al.*, 2011)。这些滞育蝶种/种群的共同特点是其主要分布于温带资源条件季节性强烈变化的地区,且没有远距离迁飞的习性,冬季的长期低温、食物缺乏等不利环境条件对其生存构成严酷的挑战,为此进化出了滞育这种深度休眠、能耗较低的越冬策略(Goehring and Oberhauser, 2004)。

表 4 越冬期间不同时期雌成虫生殖发育对适宜条件的响应
Table 4 Developmental response of female adults of *Kallima inachus* to suitable conditions within different periods during overwintering

试虫批次 Sample batch	解剖日期 Anatomical date	成虫日龄/保育时长 (d) The adult age (d)/Feeding days	发育进度 Development level	解剖个体数 (头) Number of individual	平均值 Average
I ^A	10.09	9/5	1[12]	12	1.00 d
	10.13	13/9	1[10]	10	1.00 d
	10.17	17/13	1[10]	10	1.00 d
	10.21	21/17	1[10]	10	1.00 d
II ^B	10.30	30/5	1[10]	10	1.00 d
	11.03	34/9	1[10]	10	1.00 d
	11.07	38/13	1[11]	11	1.00 d
C	11.14	45/5	1[11]	11	1.00 d
	11.18	49/9	1[10]	10	1.00 d
	11.22	53/13	1[12]	12	1.00 d
D	12.03	64/5	1[10]	10	1.00 d
	12.07	68/9	4[2]/1[9]	11	1.55±0.38 cd
	12.10	71/12	1[10]	10	1.00 d
V ^E	12.15	76/5	1[10]	10	1.00 d
	12.19	80/9	1[10]	10	1.00 d
	12.23	84/13	1[11]	11	1.00 d
VI ^F	12.31	92/5	4[1]/2[4]/1[5]	10	1.70±0.30 cd
	1.04	96/9	4[2]/3[2]/2[1]/1[2]	7	2.57±0.48 ab
	1.08	100/13	4[2]/3[1]/2[3]/1[2]	8	2.38±0.42 ab
G	1.13	105/5	3[3]/2[4]/1[3]	10	2.00±0.26 bc
	1.17	109/9	4[3]/3[1]/2[2]/1[1]	7	2.86±0.46 a
	1.21	113/13	4[4]/3[2]/2[2]/1[1]	9	3.00±0.37 a
VIII ^H	1.25	117/4	3[2]/2[3]/1[5]	10	1.70±0.26 cd
	1.29	121/7	4[1]/3[3]/2[5]/1[1]	10	2.50±0.27 ab
	2.02	125/11	4[4]/3[1]/2[4]/1[1]	10	2.80±0.36 a

^A: 试虫羽化于 2017 年 9 月 30 日 (后同), 于 2017 年 10 月 3 日寄出, 4 日到达实验室; ^B: 试虫 10 月 25 日到达; ^C: 试虫 11 月 9 日到达; ^D: 试虫 11 月 29 日到达; ^E: 试虫 12 月 9 日到达; ^F: 试虫 12 月 26 日到达; ^G: 试虫 1 月 8 日到达; ^H: 试虫 1 月 21 日到达; “±” 前为加权平均值, 后为标准差。

^A: Adults eclosed on September 30, 2017 (The same hereinafter), expressed on October 3 arrived at the laboratory on October 4; ^B: Adults arrived on October 25; ^C: Adults arrived on November 9; ^D: Adults arrived on November 29; ^E: Adults arrived on December 9; ^F: Adults arrived on December 26; ^G: Adults arrived on January 8, 2018; ^H: Adults arrived on January 21, 2018; : Data are shown as weighted average ± standard error.

对于一些生活在热带地区的蝶种/种群, 冬季气温很少长时期地降至限制其发育和活动的水平, 冬季干旱、寄主植物停止生长、蜜源植物减少可能是其繁殖的主要限制因素, 休眠是对这种不利

条件时期的适应。但这种不利时期的严酷程度远不及高纬度地区, 部分蜜源植物和水源在一些小生境中仍然保留下来。这些种类可能采用了一种间歇式静息或类似 Mansingh (1971) 所说的寡兼

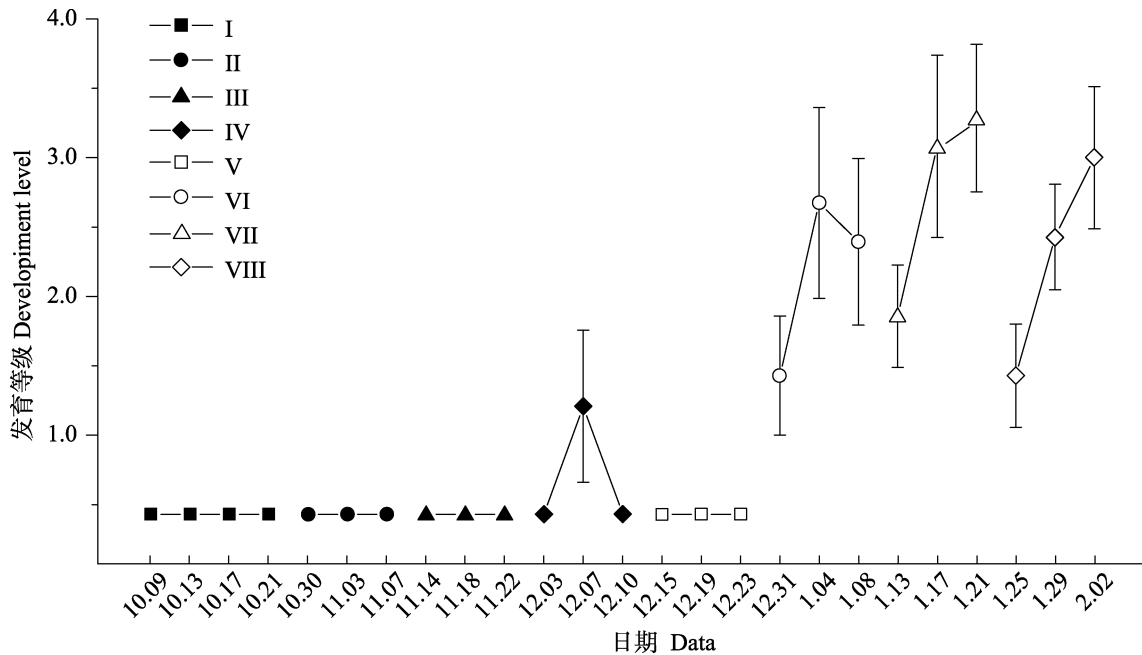


图 7 枯叶蛱蝶越冬期间不同时期雌成虫生殖发育对适宜条件的响应
 Fig. 7 Developmental response of female adults of *Kallima inachus* to suitable conditions within different periods during overwintering
 试虫批次 I-VIII见表 4. The sample batch is the same as table 4.

性滞育 (Oligopause) 方式度过不利时期, 而不需要对自身代谢做出深度调整。澳大利亚昆士兰地区幻紫斑蝶 *Euploea core*、双标紫斑蝶 *E. sylvester* 的成虫休眠可能就属于这种类型, 因为空气湿度和成虫食物迅速激活休眠成虫的生殖发育, 在缺乏进一步实验证据的情况下, 将其称为“滞育”显得牵强 (Canzano *et al.*, 2003)。而有的种类, 也许在实验室条件下能够诱发出类似滞育的休眠特征, 但这种情形未必会在自然条件下出现 (Pieloor and Seymour, 2001)。

枯叶蛱蝶的现今分布区遍及亚洲大陆东南部热带和亚热带地区, 分子系统地理研究表明, 其峨眉山种群是在末次冰期后由南方种群向北扩散建立起来的 (Zhou *et al.*, 2013)。其成虫越冬滞育特性也可能是在其定居后在适应当地气候环境的过程中逐渐进化而成, 可以预期该种南方种群的越冬休眠特性或与峨眉山种群有较大差异。

3.2 枯叶蛱蝶越冬雌成虫进入生殖休眠的时期

前期行为观察显示, 近自然实验种群中, 在 8 月中下旬以后羽化的成虫绝大部分停止交配活

动, 取食活动强化并积累大量脂肪, 直到次年 3 月初才恢复繁殖活动 (陈晓鸣, 2008; 周成理, 2008)。在本研究中, 9 月 8 日羽化、放养在近自然条件下的枯叶蛱蝶雌成虫, 在 9 月 18 日解剖中发现存在 2 头高度发育的 3 级个体, 表明羽化于 9 月上旬的少数个体并未进入生殖休眠。实验结果同时也表明, 仅仅依据行为观察结果推测休眠发生是不够的。这种反常的实验结果也可能是来源于抽样误差。对羽化于 10 月 1 日、放养在近自然条件下雌成虫, 于 10 月 12 日到 12 月 27 日的 6 批次检查中, 除 1 头在 11 月 29 日解剖时被发现卵巢发育至 3 级外, 其余个体均处于 1 级休眠状态。表明实验种群中的绝大多数成虫, 其生殖休眠始于 9 月上旬, 羽化时间越往后, 新羽化成虫的休眠比例越高。易传辉 (2007) 的研究结果, 峨眉山枯叶蛱蝶实验种群的生殖滞育始于 10 月下旬, 可能与其取样次数不足和取样时间较晚有关。

3.3 枯叶蛱蝶雌成虫越冬休眠的自然进展阶段

易传辉 (2007) 根据 RNA 等滞育相关物质

含量变化,推断枯叶蛱蝶越冬成虫在 12 月下旬开始解除滞育。本研究中,自 10 月 4 日至 12 月 8 日期间,羽化于 9 月下旬的绝大多数雌成虫均处于深度滞育状态,且大部分个体的滞育在 12 月中旬已经解除,在适宜条件下迅速恢复生殖发育。在自然条件下,由于低温的限制,越冬成虫处于后滞育静息阶段,直到次年 3 月初气温回升后才恢复取食、求偶、交配及产卵活动。此外,即便到了次年 1 月下旬,少量个体在保育 10 d 后仍未显示发育恢复迹象,表明个体之间在滞育强度上存在差异。本实验结果与易传辉的推断大体符合,表明根据生理生化指标对滞育进展进行阶段划分具有一定的合理性。同时,本研究结果也符合许多昆虫的冬季滞育在冬至(12 月下旬)前后开始解除的一般规律(Danks, 1987; Košťál, 2006)。影响枯叶蛱蝶越冬雌成虫滞育解除的因素有待进一步研究。

本研究中还对枯叶蛱蝶越冬雄成虫与繁殖季雄成虫的内生殖器官的解剖形态进行比较,发现两者并无明显差异,因而对其休眠性质的判断存在一定的难度,其休眠特性有待进一步研究。

致谢: 峨眉山市峨眉蝶文化发展有限公司袁秀萍经理和云南中林生物资源科技有限公司李红旺经理协助提供实验虫源,刘微芬硕士在解剖技术上的帮助,一并致谢。

参考文献 (References)

- Barker GM, 2013. Biology of the introduced biocontrol agent *Microctonus hyperodae* (Hymenoptera: Braconidae) and its host *Listronotus bonariensis* (Coleoptera: Curculionidae) in Northern New Zealand. *Environmental Entomology*, 42(5): 902–914.
- Canzano AA, Jones RE, Seymour JE, 2003. Diapause termination in two species of tropical butterfly, *Euploea core*, (Cramer) and *Euploea sylvestris*, (Fabricius) (Lepidoptera: Nymphalidae). *Australian Journal of Entomology*, 42(4): 352–356.
- Chen XM, 2008. Ornamental Butterflies in China. Beijing, China: China Forestry Publishing House. 209–210. [陈晓鸣, 2008. 中国观赏蝴蝶. 北京:中国林业出版社. 209–210.]
- Cheng LY, Zhang Y, Chen ZZ, Xu YY, 2017. Effects of photoperiod and temperature on diapause termination and post-diapause development and reproduction of the green lacewing, *Chrysopa pallens* (Neuroptera: Chrysopidae). *Acta Entomologica Sinica*, 60(3): 318–327. [程丽媛, 张艳, 陈珍珍, 许永玉, 2017. 光周期和温度对大草蛉滞育解除及滞育后发育和繁殖的影响. 昆虫学报, 60(3):318–327.]
- Danks HV, 1987. Insect Dormancy: An Ecological Perspective. Biological Survey of Canada (Terrestrial Arthropods). 3–8.
- Denlinger DL, 2008. Why study diapause?. *Entomological Research*, 38(1): 1–9.
- Fujita K, 2009. Photoperiodic regulation of reproductive activity in summer and autumn-morph butterflies of *Polygonia c-aureum* L. *Zoological Studies*, 48(3): 291–297.
- Goehring L, Oberhauser KS, 2004. Environmental factors influencing postdiapause reproductive development in monarch butterflies// The Monarch Butterfly: Biology & Conservation. 187–198.
- Herman WS, 1981. Studies on the adult reproductive diapause of the monarch butterfly, *Danaus plexippus*. *Biological Bulletin*, 160(1): 89–106.
- Herman WS, Brower LP, Calvert WH, 1989. Reproductive tract development in monarch butterflies overwintering in California and Mexico. *Journal of the Lepidopterists Society*, 43(1): 50–58.
- James DG, 2010. Ovarian dormancy in *Danaus plexippus* (L.) (Lepidoptera: Nymphalidae)-oligopause not diapause. *Austral Entomology*, 21(1): 31–35.
- Kida Y, Numata H, Fujii H, 1997. Summer Diapause in Females of *Minois dryas* (Lepidoptera: Satyridae). *Environmental Entomology*, 26(2): 201–206.
- Kopper BJ, Shu S, Charlton RE, Ramaswamy SB, 2016. Evidence for reproductive diapause in the fritillary *Speyeria idalia* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 94(3): 427–432.
- Košťál V, 2006. Eco-physiological phases of insect diapause. *Journal of Insect Physiology*, 52(2): 113–127.
- Lai XT, Zhou YC, He HM, Xue FS, 2017. The effects of photoperiod and temperature on diapause induction in the longnan population of the cabbage beetle, *Colaphellus bowringi* Baly (Coleoptera:Chrysomelidae). *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis (Natural Sciences Edition)*, 39(5): 895–899. [赖锡婷, 周昱晨, 何海敏, 薛芳森, 2017. 光周期和温度对大猿叶虫龙南种群滞育诱导的影响. 江西农业大学学报, 39(5): 895–899.]
- Leong KHL, Yoshimura MA, Williams C, 2016. Adaptive significance of previously mated monarch butterfly females (*Danaus plexippus* (Linnaeus)) overwintering at a California winter site.

- Journal of the Lepidopterists Society*, 66(4): 205–210.
- Mansingh A, 1971. Physiological classification of dormancies in insects. *Canadian Entomologist*, 103(7): 983–1009.
- Musolin DL, Saulchih AH, 2010. Summer dormancy ensures univoltinism in the predatory bug *Picromerus bidens*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 95(3): 259–267.
- Noriyuki S, Akiyama K, Nishida T, 2011. Life-history traits related to diapause in univoltine and bivoltine populations of *Ypthima multistriata* (Lepidoptera: Satyridae) inhabiting similar latitudes. *Entomological Science*, 14(3): 254–261.
- Pieloor MJ, Seymour JE, 2014. Factors affecting adult diapause initiation in the tropical butterfly *Hypolimnas bolina* L. (Lepidoptera: Nymphalidae). *Austral Entomology*, 40(4): 376–379.
- Pocius VM, 2014. A re-examination of reproductive arrest in the monarch butterfly, *Danaus plexippus*. Master dissertation. University of Kansas. 1–38.
- Wang MQ, Li ZZ, 2004. The research advance of insect diapause. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)*, 28(1): 71–76. [王满囤, 李周直, 2004. 昆虫滞育的研究进展. 南京林业大学学报(自然科学版), 28(1): 71–76.]
- Wu KJ, 2002. A consideration about dormancy in relation to diapause in insects. *Entomological Knowledge*, 39(2): 154–156. [吴坤君, 2002. 关于昆虫休眠和滞育的关系之浅见. 应用昆虫学报, 39(2): 154–156.]
- Xu WH, 1999. Advances in insect diapause studies. *Acta Entomologica Sinica*, 42(1): 100–107. [徐卫华, 1999. 昆虫滞育的研究进展. 昆虫学报, 42(1): 100–107.]
- Xue FS, Zhu XF, 1994. Geographical variations of diapause and voltinism of *Vanessa Indica* Herbst (Lepidoptera: Nymphalidae). *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, (3): 270–274. [薛芳森, 朱杏芬, 1994. 苎麻赤蛱蝶滞育和化性的地理变异. 江西农业大学学报, (3): 270–274.]
- Yi CH, 2007. The Research of diapause ecology of *Papilio memnon* L. and *P. xuthus* L. and *Kallima inachus* Doubleday. Doctoral dissertation. Beijing: Chinese Academy of Forestry. [易传辉, 2007. 美凤蝶与柑橘凤蝶和枯叶蛱蝶三种蝴蝶的滞育生态学研究. 博士学位论文. 北京: 中国林业科学研究院.]
- Zhou CL, Chen X, He R, 2013. COII phylogeography reveals surprising divergencies within the cryptic butterfly *Kallima inachus* (Doyère, 1840) (Lepidoptera: Nymphalidae: Kallimini) in southeastern Asia. *The Pan-Pacific Entomologist*, 88(4): 381–398.
- Zhou CL, Shi JY, Chen XM, Yi CH, Shi L, 2006. Large-scale artificial breeding of *Kallima inachus* Doubleday. *Journal of Beijing Forestry University*, 28(5): 107–113. [周成理, 史军义, 陈晓鸣, 易传辉, 石雷, 2006. 枯叶蛱蝶规模化人工繁育研究. 北京林业大学学报, 28(5): 107–113.]
- Zhou CL, 2008. Studies on the biological features and molecular intraspecific genetic differentiation of *Kallima inachus* (Lepidoptera: Nymphalidae). Doctoral dissertation. Beijing: Chinese Academy of Forestry. [周成理, 2008. 枯叶蛱蝶生物学特征及种内分化的分子遗传研究. 博士学位论文. 北京: 中国林业科学研究院.]
- Zhou CL, Shi JY, Yi CH, Chen XM, 2005. Research on Biology of *Kallima inachus*. *Sichuan Journal of Zoology*, 24(4): 445–450. [周成理, 史军义, 易传辉, 陈晓鸣, 2005. 枯叶蛱蝶 *Kallima inachus* 的生物学研究. 四川动物, 24(4): 445–450.]
- Zhou Y, 1999. Monographia Rhopalocerorum Sinensium (revised edition). Zhengzhou: Henan Scientific and Technological Publishing House. 28–43. 272. [周尧, 1999. 中国蝶类志 (修订版). 郑州: 河南科学技术出版社. 28–43. 272.]