应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2015, 52(1): 184−192. DOI: 10.7679/j.issn.2095−1353.2015.019

冷藏对美洲斑潜蝇蛹期发育和生存的影响*

张金钰[1, 2**] 葛 瑾[2] 魏佳宁[2***]

（1. 安徽大学生命科学学院，合肥 230039；2. 中国科学院动物研究所农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室，北京 100101）

摘 要 **【目的】** 美洲斑潜蝇 *Liriomyza sativae* Blanchard 自 20 世纪 90 年代入侵我国后已经成为蔬菜和观赏植物的重要害虫。然而，近些年该昆虫已经逐渐成为研究植物和昆虫、昆虫抗寒性和寄主适应性等热点课题的模式种类。因此，为了实验室条件下更好保藏该虫的种群，本文研究了冷藏（世代发育起点温度 8℃）对该斑潜蝇蛹发育和生存的影响。**【方法】** 以化蛹后第 3 天的蛹为实验对象，8℃低温冷藏，并以冷藏时间（0、7、14、21、28 和 35 d）为参试因子研究了冷藏时间对美洲斑潜蝇蛹羽化率的影响；化蛹后每 24 h 解剖观察一次蛹并对蛹期发育阶段进行划分；根据划分的蛹期阶段，对处理中未羽化的蛹进行解剖比对，得到对低温最敏感的蛹期。**【结果】** 随着冷藏时间的增长，美洲斑潜蝇的蛹羽化率逐渐降低。超过 14 d 后，羽化率明显下降。冷藏至 35 d 时羽化率为零。解剖正常发育的美洲斑潜蝇的蛹，将蛹期分为预蛹期、隐头蛹期、显头蛹初期、半透明眼期、浅黄色到琥珀色眼期、红褐色眼期、鬃毛蛹期。不同冷藏时间条件下，未羽化的蛹死亡时间主要为鬃毛蛹期，且鬃毛蛹期死亡的蛹的数量与贮藏时间呈正比例关系。**【结论】**在室内冷藏美洲斑潜蝇时，3 日龄蛹 8℃贮藏少于 14 d 为宜；鬃毛蛹期（10~11 日龄蛹）对低温比较敏感，冷藏过程中，应避免鬃毛蛹期的蛹。

关键词 美洲斑潜蝇，冷藏，羽化率，发育形态，鬃毛蛹期

Impact of cold storage on the pupal development and survivorship of *Liriomyza sativae*

ZHANG Jin-Yu[1,2**] GE Jin[2] WEI Jia-Ning[2***]

(1. School of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230039, China; 2. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract **[Objectives]** *Liriomyza sativae* Blanchard, the vegetable leafminer, has been an important insect pest of vegetables and ornamentals since it was introduced in China in the 1990's and has also become a model for the study of plant-insect interactions, cold tolerance, and host adaptation. To improve its captive husbandry, we studied the effect of cold storage at its developmental threshold (8℃) on pupal development and survivorship. **[Methods]** Three-day pupae of *L. sativae* were collected and stored at 8℃ and the effect of different periods (0, 7, 14, 21, 28 and 35 days) of cold storage on pupal development and survivorship monitored. The morphology of developing pupae was observed by dissection at 24 h intervals and pupae were categorized to different development stages on the basis of morphology. In order to determine the causes of mortality, we dissected and compared dead pupae from pupal stage and treatment. **[Results]** Eclosion rates decreased with the duration of cold storage. Emergence rates significantly declined after 14 days, and fell to zero on day 35. Pupal development was divided into 7 stages; the prepupal, cryptocephalic, early phanerocephalic, yellow-eyed, amber, red-eyed, and bristle stages. We found that most mortality occurred in the bristle stage, and that the percentage of dead pupae increased with duration of cold storage. **[Conclusion]** The optimal duration of cold storage for pupae was <14 days at 8℃

* 资助项目 Supported projects：国家自然科学基金（31170361，31221091）

**第一作者 First author，E-mail: 1900985154@qq.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail: weijn@ioz.ac.cn

收稿日期 Received：2014-04-15，接受日期 Accepted：2014-10-23

and the bristle stage of pupal development is the most sensitive to cold temperature.

Key words *Liriomyza sativae*, low-temperature storage, eclosion rate, developmental morphology, bristle stage

美洲斑潜蝇 *Liriomyza sativae* Blanchard 属于双翅目 Diptera 潜蝇科 Agromyzidae 植潜蝇亚科 Phytomyzinae 斑潜蝇属 Liriomyza Mik，原产于南美洲，属于温带种，以农作物、蔬菜和花卉等植物为食（Parrella，1987）。该虫于 20 世纪 90 年代中期传入我国，传播速度惊人，不受季节和地域限制，南至我国的三亚，北达大庆，蔓延至我国的 12 个省市自治区，分布广泛，我国已经将其列为主要的检疫对象（康乐，1996；Chen and Kang，2005）。据报道美洲斑潜蝇能够取食多种豆科、葫芦科、茄科、菊科和十字花科等蔬菜、花卉或杂草（张慧杰等，2000）。美洲斑潜蝇的危害主要以幼虫在叶片内取食叶肉，形成蛇形隧道，降低叶片的光合作用，造成养分流失。另外，雌成虫以产卵器刺破叶片，产生许多刻点，并在周围取食，形成肉眼可见的取食斑，造成了作物的减产。高密度的斑潜蝇为害甚至能直接造成寄主植物的死亡（Spencer and Steyskal，1986）。1985 年，美国夏威夷蔬菜因为美洲斑潜蝇的侵害，损失达到 1 170 万美元，佛罗里达州的番茄产量显著减少（Spencer，1973），1981—1985 年，菊花业在加州也损失了 9 300 万美元（Parrella，1987）。近几年，该物种在入侵我国之后对农业生产造成的危害已经引起了人们的普遍关注。

温度是影响昆虫地理分布和扩散的重要因素之一，适宜的温度是昆虫正常生长发育的必要条件，温度过高或过低都会对昆虫的生长、生存以及后代产生不利的影响（Kang *et al.*，2009；Costa-Lima *et al.*，2010；Régnière *et al.*，2012）。在温度刺激下昆虫的生态可塑性反应和昆虫抗性耐受性都会发生相应的变化（王艳敏等，2010）。昆虫的世代完成、越冬和对生境的探索过程中都需要对抗低温的影响（Hoffmann *et al.*，2003）。与其他种斑潜蝇相比，美洲斑潜蝇从卵到成虫的发育起点温度是 7.3℃，蛹的发育起点温度是 7.2℃，幼虫可低至 3.4℃（Costa-Lima *et al.*，2009）。实验室种群中，美洲斑潜蝇的蛹过冷却点的平均值为 －11℃，而南美斑潜蝇 *Liriomyza huidobrensis* Blanchard 的则可至 －20.9℃，明显低于美洲斑潜蝇（Chen *et al.*，2002）。美洲斑潜蝇蛹较耐高温，在 34℃条件下能较顺利发育、羽化，但对低温较敏感，0℃以下不能羽化（周福才等，2000）。为适应温度变化，斑潜蝇蛹随着纬度的升高，其过冷却点也随之显著增加（陈兵和康乐，2003）。而且分子生物学研究显示，斑潜蝇低温耐受性与热休克蛋白（Hsp）基因表达密切相关。Huang 等（2009）研究了低温诱导热激蛋白与美洲斑潜蝇生长发育的关系，结果表明 *hsp19.5*、*hsp20.8* 和 *hsp21.7* 3 个基因能被低温诱导表达；*hsp19.5*、*hsp20.8*、*hsp21.7*、*hsp60* 和 *hsp90* 5 个基因的相对表达量在不同生长发育阶段差异显著，*hsp19.5*、*hsp20.8* 和 *hsp21.7* 在蛹期表达量最高，而 *hsp60* 和 *hsp90* 的表达量则随着生长发育而递增，成虫期最高。无论在冷或热的胁迫条件下，南美斑潜蝇 *hsp* 基因诱导表达的温度阈值总比美洲斑潜蝇低，南美斑潜蝇比美洲斑潜蝇更抗寒（Huang and Kang，2007）。鉴于近些年斑潜蝇在抗寒性等生态学方面取得的显著研究进展，它们已经成为这些领域研究的模式昆虫（Kang *et al.*，2009）。在实验室大量繁殖饲养美洲斑潜蝇时，需要通过低温贮藏来解决一些饲养繁殖等应用上的问题。如贮藏不当，会降低美洲斑潜蝇的羽化率以及成虫的活力（Petitt and Wietlisbach，1994；Haghani *et al.*，2007）。以往关于美洲斑潜蝇实验种群冷藏的最佳时间，以及这个过程中个体的死亡原因等问题缺少深入的研究和分析。因此，为了实验室条件下更好保藏该虫的种群，本文研究了美洲斑潜蝇冷藏（世代发育起点温度 8℃）对该斑潜蝇的蛹发育和生存羽化的影响。同时，也可以为斑潜蝇的防治提供一定科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

芸豆 *Phaseolus vulgaris* L.栽培在直径约 12 cm 的塑料花盆中，每 3 株一盆，栽培基质为营养土和蛭石（比例 3∶1），生长温度（25±5）℃。生长至具有完全发育的两片真叶时，用于斑潜蝇的饲养。美洲斑潜蝇来自海南，已经在实验室饲养 8 年，成虫在养虫笼（40 cm×40 cm×40 cm）内群养，接种 24 h 后芸豆植株移出，人工气候箱的条件设置为温度（25±1）℃，相对湿度 60%±10%，光周期 16 L∶8 D。

1.2 不同龄期蛹相同冷藏时间下的死亡率

接种 24 h 后芸豆植株置于人工气候箱，等待卵孵化成为幼虫，幼虫以叶片为食，将带有 3 日龄幼虫潜道的叶片采摘保存，置于人工气候箱等待老熟幼虫化蛹，人工气候箱条件设置同 1.1。为了研究低温对美洲斑潜蝇不同龄期蛹的影响，取成虫在 24 h 内所产卵的植株进行收集，用于得到整齐度一致的蛹。根据周亦红等（2001）的结果，我们将冷藏温度选取为美洲斑潜蝇的世代发育最低临界温度 8℃，低于这个温度，生长则停止甚至死亡。老熟幼虫在中午钻出芸豆叶面，在叶面 3 h 后虫体变硬形成蛹，将这段时间作为预蛹期。从化蛹到晚间的零点，为化蛹第 1 天，之后每 24 h 为一个龄期。收集化蛹后第 1 天的蛹（1 日龄蛹）、第 3 天的蛹（3 日龄蛹）、第 5 天的蛹（5 日龄蛹）、第 7 天的蛹（7 日龄蛹）各 50 头装到指形管中，以脱脂棉塞住管口，将指形管置于 8℃恒温箱冷藏 14 d。然后将每个龄期的蛹分装到 5 mL 规格的冻存管中，每管一头，转移到（25±1）℃人工气候箱羽化。每天观察记录羽化的成虫数目，直至全部羽化或死亡。不同龄期蛹各重复 3 次。

1.3 不同冷藏时间对 3 日龄期蛹羽化率的影响

观察发现 1 日龄蛹全部死亡，因此选择 3 日龄蛹做进一步的实验。收集 3 日龄蛹，装到指形管中，以脱脂棉封口。在 10℃条件下分别冷藏 0、7、14、21、28 和 35 d，然后将蛹分装到 5 mL 规格的冻存管中，每管一头，转移到（25±1）℃人工气候箱羽化。每天观察记录羽化的成虫数目，直至全部羽化或死亡。每组处理 100 头，重复 5 次。

1.4 不同冷藏时间对 3 日龄期蛹发育的影响

除了成虫期，蛹期占据了美洲斑潜蝇世代的最长时间（Araujo *et al.*，2013），这一时期对温度的变化相对较敏感（周亦红等，2001）。Spbeam（1981）早在 19 世纪末就通过视觉可见的 51 种形态变化将果蝇的蛹期划分为 24 个时期。国内也相继对巨尾阿丽蝇 *Aldrichina grahami* Aldrich（王江峰等，2002）和葱蝇 *Delia antiqua*（陈斌等，2012）的蛹期发育形态做过较为详细的划分。但是美洲斑潜蝇蛹期的详细研究相对缺乏，仅将蛹期划分为三个阶段：发育初期、发育中期和发育末期（王音等，2000）。我们将对美洲斑潜蝇的蛹期进行较为详细的划分。根据划分的蛹期阶段，解剖并比对未羽化的蛹，以期发现对冷藏最为敏感的时期。

1.4.1 蛹期阶段的划分 取有老熟幼虫的芸豆叶片，收集要化蛹的老熟幼虫。取 3 h 内形成的预蛹 60 头，装在铺有湿润滤纸的培养皿（直径为 12 cm）中，置于人工气候箱培养（条件同成虫饲养温度）。从化蛹后 0.5 h 起，每隔 24 h 观察一次外部形态（重复 3 头），同时用解剖针仔细挑开蛹壳，观察蛹期的形态变化，进行阶段划分，直至羽化为成虫（化蛹后到头外翻前，蛹壳与组织紧密结合，以观察外部形态为主）。使用 Leica DFC490（Leica，Wetzlar，Germany）体式显微镜进行解剖观察，并用体视显微镜自带的照相机拍照记录。蛹各期的命名参考 Spbeam（1981）和陈斌（2012）。

1.4.2 未羽化的 3 日龄期蛹统计 将 3 日龄期蛹在不同冷藏时间死亡的个体解剖，用解剖针挑开蛹壳后，对失水的个体加水浸泡 12 h，使其形态尽量饱满。使用 Leica DFC490（Leica，Wetzlar，Germany）体视显微镜进行解剖观察形态，划分蛹期阶段。

1.5　数据处理与分析

用以上方法获得原始数据，然后作单因素方差分析（One-Way ANOVA）和多重比较（LSD），此前，不同冷藏时间对 3 日龄期蛹羽化率的数据做过反正弦变换，使之符合方差分析的条件。方差分析使用软件 SPSS17.0。

羽化率（%）=（羽化为成虫的数目/蛹的总数）×100，

各蛹期的死亡率（%）=（各蛹期死亡个体/所有死亡个体）×100。

2　结果与分析

2.1　相同冷藏时间对不同龄期蛹的影响

美洲斑潜蝇不同龄期蛹在 8℃条件下冷藏 14 d，1 日龄蛹、3 日龄蛹、5 日龄蛹和 7 日龄蛹的羽化率分别是 0、67.8%±5.1%、71.0%±3.9%和 73.6%±5.3%（图 1）。1 日龄蛹全部死亡，与其他 3 个龄期蛹的羽化率相对比差异极显著（ANOVA，$F_{3,16}$=364.866，P<0.01），而其他 3 个龄期蛹的羽化率之间无显著差异（ANOVA，$F_{3,16}$=364.866，P>0.05）。说明，除 1 日龄蛹，其他 3 个龄期的蛹对低温处理都具有一定的耐受性，而且耐寒的程度无显著差异。

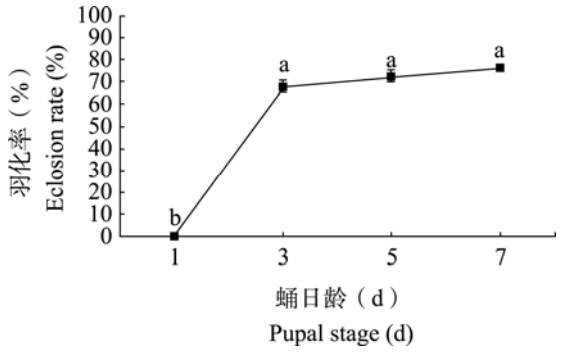

图 1　8℃低温对不同龄期蛹的羽化率影响

Fig. 1　The eclosion rate of *Liriomyza sativae* pupae in different stages at 8℃

数据为平均值±标准误，标有不同字母表示经方差分析和多重比较有显著性差异(P < 0.05)。下图同。

Data are mean±SE, with different letters indicate significant difference (P < 0.05, ANOVA and LSD). The same below.

2.2　不同冷藏时间对 3 日龄期蛹羽化率的影响

美洲斑潜蝇的 3 日龄蛹在低温下冷藏，随着冷藏时间的延长，羽化率降低，死亡率增高（图 2）。在 8℃下，冷藏 0、7、14、21、28 和 35 d 后，羽化率分别为 83.4%±8.6%、69.0%±16.9%、57.0%±16.4%、30.2%±15.8%、3.4%±2.6%和 0。冷藏 7 d 的蛹羽化率，与冷藏 0 d 和 14 d 的对比无显著差异（ANOVA，P>0.05），但是与冷藏 21 d 之后的比较差异极显著（ANOVA，$F_{5,24}$=56.564，P<0.01）；冷藏 14 d 的蛹与冷藏 7 d 的对比差异不显著（ANOVA，P>0.05），与冷藏 0 d 和冷藏 21 d 之后的对比差异极显著（ANOVA，$F_{5,24}$=56.564，P<0.01）；冷藏 21 d 的蛹与其他 5 个冷藏时间的羽化率相比，均有极显著差异（ANOVA，$F_{5,24}$=56.564，P<0.01）；冷藏 28 d 和 35 d 的蛹羽化率差异不显著（ANOVA，P>0.05），但是与冷藏 0、7、14 和 21 d 的对比，差异极显著（ANOVA，$F_{5,24}$=56.564，P<0.01）。

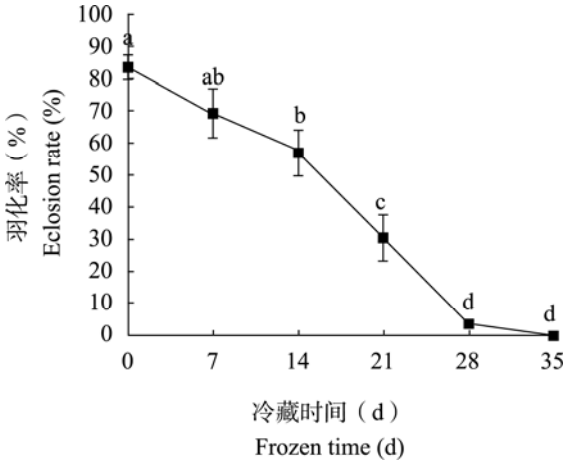

图 2　美洲斑潜蝇 3 日龄蛹 8℃低温处理不同时间的羽化率

Fig. 2　The eclosion rate of the *Liriomyza sativae* third day instar pupa after treatment at 8℃ for different times

2.3　不同冷藏时间对 3 日龄期蛹发育的影响

2.3.1　蛹期阶段的划分　美洲斑潜蝇从老熟幼虫化蛹直到羽化为成虫，依其形态将蛹期分为预蛹期、隐头蛹期、显头蛹初期、半透明眼期、浅黄色到琥珀色眼期、红褐色眼期和鬃毛蛹期。各发育阶段形态（图 3）描述如下。

图 3　美洲斑潜蝇蛹各发育阶段的形态

Fig. 3　Pupal morphology of *Liriomyza sativae* at different development stage

A. 预蛹期；B. 隐头期；C. 显头蛹初期；D. 显头蛹初期，腹面观；E. 半透明眼期；F. 半透明眼期，腹面观；G. 浅黄色到琥珀色眼期；H. 浅黄色到琥珀色眼期，腹面观；I. 红褐色眼期；J. 红褐色眼期，腹面观；K. 鬃毛蛹期；L. 鬃毛蛹期，腹面观。

A. Prepupal stage; B. Crypto cephalic stage; C. Early phanerocephalic stage; D. Early phanerocephalic stage, ventral view; E. Yellow-eyed stage; F. Yellow-eyed stage, ventral view; G. Amber stage; H. Amber-eyed stage, ventral view; I. Red-eyed stage; G. Red-eyed stage, ventral view; K. Bristle stage; L. Bristle stage, ventral view.

预蛹期：完全停止蠕动，保持缩短幼虫状态，由白色转为黄色，蛹壳上出现全部纹理。蛹内部活动明显，但与壳粘连，不易分离，口钩未与组织分开。定义为 1 日龄蛹（图 3：A）。

隐头蛹期：蛹的前三节明显呈现鳃盖，前端出现凹陷，蛹壳很难剥离，腹部空腔明显，口钩仍与组织紧密结合。定义为 2 日龄蛹(图 3：B)。

显头蛹初期：头胸腹明显，已经出现复眼外形，脂肪体细胞分布在整个裸蛹，头部复眼区较为明显，翅足出现轮廓。口钩在蛹壳外部肉眼可见，与蛹组织脱离，蛹壳易于剥离。定义为 3 日龄蛹(图 3：C)。

半透明眼期：背面头胸分界线、胸腹分界线明显，复眼区均匀并排着脂肪体，中央有半透明区域出现，眼睛边缘逐渐变成浅黄色。从背面可见，胸腹交界处两条马氏管中间出现黄色体，从交界偏左上方向交界处中间移动。定义为 4~6 日龄蛹（图 3：F）。

浅黄色到琥珀色眼期：整个眼由浅黄色变为琥珀色，黄色体在两条马氏管中间上移，呈三角形排列的 3 个单眼清晰地出现在两个复眼间。定义为 7—8 日龄蛹(图 3：G)。

红褐色眼期：眼睛变为红褐色，触须变黑，体节清晰可见。定义为 9 日龄蛹（图 3：I)。

鬃毛蛹期：口器和触角清晰，眼眶、单眼刚毛、腹部背面鬃毛变黑，翅和足逐渐由灰色变黑，额胞开始有节奏的收缩。定义为 10~11 日龄蛹（图 3：K)。

在整个蛹期，显头蛹期占据了整个蛹期的大部分时间，包括显头蛹初期、半透明眼期、浅黄色到琥珀色眼期、红褐色眼期和鬃毛蛹期。显头蛹期和隐头蛹期以头部外翻为分界点，而蛹壳外可见幼虫口钩是头部外翻发生的外部标识特征。

2.3.2　不同冷藏时间对 3 日龄期蛹发育的影响

美洲斑潜蝇在低温贮藏后，羽化率降低。将蛹的死亡形态划分为 7 个时期，隐头蛹期、显头蛹初期、半透明眼期、浅黄色到琥珀色眼期、红褐色眼期、鬃毛蛹期和羽化。不同冷藏时间死亡的蛹表现出相似的规律，即同一贮藏时间下死亡的蛹主要分布于鬃毛蛹期，占死亡蛹的 50%以上（表 1)，其他几个时期数量较少，所占比例较低，均低于 20%（表 1)。不同冷藏时间下，处于鬃毛蛹期死亡的蛹的数量也随着贮藏时间的增长而不断增多，鬃毛蛹期对低温敏感，时间越长越明显。

3　讨论

不同昆虫的抗寒性差异很大。一般情况下，处在高纬度地区的昆虫比低纬度的有更高的抗寒性。甚至处在同一地理纬度的同一种昆虫抗寒性也不相同。如美洲斑潜蝇和南美斑潜蝇种群的耐寒性均随着地理纬度的增加逐渐增强（Chen and Kang，2004，2005)。个体的不同发育阶段抗寒性也不同，通常是越冬虫态的抗寒性最强，休眠或者滞育期对低温的耐受能力较强，生长发育期的虫态抗寒性较弱。例如甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 不同抗寒性由弱至强为卵、成虫、幼虫和蛹（韩兰芝等，2005)。我们的研究显示，美洲斑潜蝇在 8℃冷藏处理 14 d 时，1 日龄蛹全部死亡，而 3 日龄蛹、5 日龄蛹和 7 日龄蛹羽化率都大于 60%，且三组之间无显著差异。这表明除 1 日龄蛹外，其他几个龄期的蛹对低温处理有一定的耐受性。Chen 和 Kang (2005)的研究结果也支持这一结论，1 日龄蛹冷藏时间越长，存活率越低，在 18 h 接近于零。Zhao 和 Kang (2000)的结果显示与 6 h 蛹、1 日龄蛹和 6.5 日龄蛹相比，4 日龄蛹最具抗寒性。本研究的结果显示 3 日龄、5 日龄和 7 日龄蛹的耐寒性无明显差异。推测原因是冷藏温度和时间不一致，诱导的 Hsp 蛋白的表达量可能存在差异，导致各龄期耐寒性的不同。在瓜叶菊上生长的美洲斑潜蝇，在 0℃和 10℃条件下，蛹存放时间越长，死亡率越高，不能越冬（刘军和等，2007)。低温条件下，蛹的羽化率随低温持续时间的延长而急剧下降（周福才等，2000)。由此可见，低温处理对美洲斑潜蝇具有致死效应，但是仍有部分蛹在低温下存活。基于以上研究结果，以美洲斑潜蝇作为实验对象，在 8℃恒定温度下，研究了不同贮藏时间美洲斑潜蝇的羽化率。 结果表明，美洲斑潜蝇的 3 日龄蛹的羽化率随着冷藏时间的延长，羽化率降低 (图 2)。冷藏 14 d 后羽化率降低幅度最为显著。因此实验室冷藏蛹时，最适冷藏时间不要超过 14 d，以免低温冷藏对蛹羽化率产生影响，降低羽化率，造成实验种群数量过低，同时也增加了养虫的成本。

昆虫蛹期的发育形态学对于了解蛹的发育和滞育有着重要的意义。黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的蛹期发育具 51 个可见形态变化（Spbeam，1981)；Pujol-Luz 和 Barros-Cordeiro（2012）对白头裸金蝇 *Chrysomya albiceps* 蛹期发育形态也做过一些研究。国内对巨尾阿丽蝇（王江峰等，2002）和葱蝇（陈斌等，2012）的蛹期发育形态也做过较为详细的划分。但是美洲斑潜蝇蛹期的详细划分在国内研究相对缺乏，仅将蛹期划分为发育初期、发育中期和发育末期三个阶段（王音等，2000)。本实验将美洲斑潜蝇从老熟幼虫化蛹直到羽化为成虫，依其发育形态将蛹期分为预蛹期、隐头蛹期、显头初期、半透

表 1 美洲斑潜蝇 3 日龄蛹 8℃处理不同时间各蛹期死亡个体占所有死亡个体的比例

Table 1 The percentage of dead *Liriomyza sativae* at different development stage after treatment at 8℃ for different time

冷藏时间 (d) Storage time (d)	蛹期和每个蛹期的死亡率（%） Pupal stages and mortality rate of each stage (%)							$F_{6,\ 28}$	P
	隐头蛹期 Prepupal stage	显头蛹初期 Early phaneroceph alic stage	半透明眼期 Yellow-eyed stage	浅黄色到琥珀色眼期 Amber stage	红褐色眼期 Red-eyed stage	鬃毛蛹期 Bristle stage	羽化 Eclosion		
0	12.12±8.82b	8.70±4.9b	6.06±4.15b	0.87±1.94b	1.43±3.19b	54.74±19.14a	16.08±11.85b	9.898	0.000
7	12.56±7.64b	6.61±7.59b	2.86±4.59b	2.82±2.80b	5.83±4.52b	55.04±9.14a	14.29±4.24b	9.354	0.000
14	7.57±7.69b	5.11±4.90b	3.91±2.16b	1.46±1.64b	2.20±3.33b	71.86±11.60a	7.89±5.10b	19.405	0.000
21	3.54±2.19b	3.57±2.90b	1.85±1.77b	1.39±1.28b	1.33±1.37b	79.52±1.64a	8.79±7.31b	83.955	0.000
28	1.63±1.55b	2.29±1.37b	2.26±2.32b	3.34±1.44b	6.78±7.24b	78.53±7.12a	5.16±2.67b	196.236	0.000
35	11.60±7.40b	6.00±4.00bc	2.80±2.28c	1.20±1.79c	1.60±2.61c	72.40±9.74a	4.40±3.85c	119.737	0.000

表中数据为平均值±标准误，同行数据后标有不同小写字母表示差异显著（P<0.05，LSD）。

Data in the table are mean ±SE, and followed by different letters in the same row indicate significant difference (P<0.05, LSD).

明眼期、浅黄色到琥珀色眼期、红褐色眼期和鬃毛蛹期 7 个时期。因此，蛹期详细的划分对于认识斑潜蝇蛹期发育形态学具有重要意义，从发育生理上为美洲斑潜蝇抗寒性研究奠定了基础。

美洲斑潜蝇的各虫态发育历期均随温度的升高而缩短（庞保平等，2003）。温度过高、过低的条件下，蛹的发育都会受到抑制，甚至致死（郝树广和康乐，2001）。而且处于发育初、中期的蛹抗寒能力强于发育末期蛹，蛹接近羽化时耐寒能力有所下降(王音等，2000)。对低温致死后的蛹进行解剖，发现鬃毛蛹期死亡的蛹的数量占总死亡数量的很大比率，且数量与贮藏时间呈正比例关系；随着贮藏时间的延长，死亡率不断增加，鬃毛蛹的数目也在增加（表 1）。说明鬃毛蛹期是蛹期中对低温较为敏感的时期。这项结果与王音等 (2000)的研究相一致，即越接近羽化时耐寒能力越低。在冷藏过程中，应避免鬃毛蛹期在低温下贮藏。这一结果对低温下冷藏美洲斑潜蝇的蛹，如何选择贮藏时间和龄期有重要意义。

致谢：感谢中国科学院动物研究所康乐研究员的悉心指导，以及李娜在实验和数据处理中的大力帮助。感谢王秀平在植物和斑潜蝇维持和饲养方面给予的大力协助。

参考文献 (References)

Araujo EL, Nogueira CHF, Netto ACM, Bezerra CES, 2013. Biological aspects of the leafminer *Liriomyza sativae* (Diptera: Agromyzidae) on melon (*Cucumis melo* L.). *Ciencia Rural*, 43(4): 579–582.

Chen B, Kang L, 2003. Supercooling point shift of pea leafminer pupae with latitude and its implication for the population dispersion. *Zoological Research*, 24(3): 168–172. [陈兵, 康乐, 2003.南美斑潜蝇地理种群蛹过冷却点随纬度递变及其对种群扩散的意义. 动物学研究，24(3): 168–172.]

Chen B, Kang L, 2004. Variation in cold hardiness of *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae) along latitudinal gradients. *Environmental Entomology*, 33(2): 155–164.

Chen B, Kang L, 2005. Implication of pupal cold tolerance for the northern over-wintering range limit of the leafminer *Liriomyza sativae* (Diptera: Agromyzidae) in China. *Applied Entomology and Zoology*, 40(3): 437–446.

Chen B, Li WS, He ZB, 2012. Developmental morphology of non-diapausing pupae in onion maggot, *Delia antiqua*. *Journal of Southwest University* (*Nature Science Edition*), 34(4): 1–8. [陈斌, 黎万顺, 何正波, 2012. 葱蝇非滞育蛹期的发育形态学研究. 西南大学学报，34(4): 1–8.]

Chen B, Zhao YX, Kang L, 2002. Mechanisms of invasion and adaptation and management strategies of alien leafminers.

Zoological Research, 23(2): 155–160.

Costa-Lima TC, Geremias LD, Parra JR, 2009. Effect of temperature and relative-humidity on the development of *Liriomyza sativae* Blanchard (Diptera: Agromyzidae) in *Vigna unguiculata*. *Neotropical Entomology*, 38(6): 727–733.

Costa-Lima TC, Geremias LD, Parra JR, 2010. Reproductive activity and survivorship of *Liriomyza sativae* (Diptera: Agromyzidae) at different temperatures and relative humidity levels. *Environmental Entomology*, 39(1): 195–201.

Haghani M, Fathipour Y, Talebi AA, Baniameri V, 2007. Thermal requirement and development of *Liriomyza sativae* (Diptera: Agromyzidae) on cucumber. *Ecology and Behavior*, 100(2): 350–356.

Han LZ, Zhai BP, Zhang XY, 2005. Cold hardiness of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hubner). *Acta Phytophylacica Sinica*, 32(2): 169–173. [韩兰芝, 翟保平, 张孝羲, 2005. 甜菜夜蛾的抗寒力研究. 植物保护学报, 32(2): 169–173.]

Hao SG, Kang L, 2001. Effects of temperature and relative humidity on development, survivorship and food intake of *Liriomyza sativae*. *Acta Entomologica Sinica*, 44(3): 332–336. [郝树广, 康乐, 2001. 温、湿度对美洲斑潜蝇发育、存活及食量的影响. 昆虫学报, 44(3): 332–336.]

Hoffmann AA, Sorensen JG, Loeschcke V, 2003. Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: bringing together quantitative and molecular approaches. *Journal of Thermal Biology*, 28 (3): 175–216.

Huang LH, Kang L, 2007. Cloning and interspecific altered expression of heat shock protein genes in two leafminer species in response to thermal stress. *Insect Molecular Biology*, 16(4): 491–500.

Huang LH, Wang CZ, Kang L, 2009. Cloning and expression of five heat shock protein genes in relation to cold hardening and development in the leafminer, *Liriomyza sativae*. *Journal of Insect Physiology*, 55(3): 279–285.

Kang L, 1996. Ecology and Sustainable Control of *Serpentine leafminers*. Beijing: Science Press. 1–215. [康乐, 1996. 斑潜蝇的生态学与持续控制. 北京: 科学出版社. 1–215.]

Kang L, Chen B, Wei JN, Liu TX, 2009. Roles of thermal adaptation and chemical ecology in *Liriomyza* distribution and control. *Annual Review of Entomology*, 54: 127–145.

Liu JH, Yu MP, He DH, 2007. Study on biological characteristics and pupa cold tolerance of *Liriomyza sativae* on *Florists cineraria*. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 35(17): 5197–5198. [刘军和, 禹明甫, 贺达汉, 2007. 瓜叶菊上美洲斑潜蝇的生物学特性及蛹的耐寒性研究. 安徽农业科学, 35(17): 5197–5198.]

Pang BP, Bao ZS, Cheng JA, Huang EY, 2003. Infulence of temperature on development and survival of *Liriomyza sativae*. *Journal of Inner Mongolia Agricultural University*, 24(1): 60–63. [庞保平, 鲍祖胜, 程家安, 黄恩友, 2003. 温度对美洲斑潜蝇生长发育及存活的影响. 内蒙古农业大学学报, 24(1): 60–63.]

Parrella MP, 1987. Biology of Liriomyza. *Annual Review of Entomology*, 32: 201–224.

Petitt FL, Wietlisbach DO, 1994. Laboratory rearing and life history of *Liriomyza sativae* (Diptera: Agromyzidae) on Lima Bean. *Environmental Entomology*, 23(4): 1416–1421.

Pujol-Luz JR, Barros-Cordeiro KB, 2012. Intra-puparial development of the females of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 56(3): 269–272.

Régnière J, Powell J, Bentz B, Nealis V, 2012. Effects of temperature on development, survival and reproduction of insects: experimental design, data analysis and modeling. *Journal of Insect Physiology*, 58(5): 634–647.

Spbeam B, 1981. Staging the metamorphosis of *Drosophila melanogaster. Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 66 (1): 57–80.

Spencer KA, 1973. Agromyzidae (Diptera) of Economic Importance. Springer Netherlands: Series Entomology. Volume 9. 418.

Spencer KA, Steyskal GC, 1986. Manual of the Agromyzidae (Diptera) of the United States. Washington: United States Department of Agriculture. 1–478.

Wang JF, Hu C, Chen YC, Min JX, Li JT, 200. Application of the pupal morphogenesis of *Aldrichina grahami* (Aldrich) to the deduction of postmortem interval. *Acta Entomologica Sinica*, 45(5): 696–699. [王江峰, 胡萃, 陈玉川, 闵建雄, 李俊涛, 2002. 用巨尾阿丽蝇蛹期发育形态来推断死者死亡时间. 昆虫学报, 45(5): 696–699.]

Wang Y, Lei ZR, Wen JZ, Sun FZ, Wu KM, 2000. Study on the overwintering and cold-hardiness of the vegetable leafminer *Liriomyza sativae* Blanchard. *Acta Phytophylacica Sinica*, 27(1): 32–36. [王音, 雷仲仁, 问锦曾, 孙福在, 吴孔明, 2000. 美洲斑潜蝇的越冬与耐寒性研究. 植物保护学报, 27(1): 32–36.]

Wang YM, Wu JX, Wang FH, 2010. Response of insects to extreme high and low temperature stresses. *Journal of Environmental Entomology*, 32(2): 250–255. [王艳敏, 仵均祥, 万方浩, 2010. 昆虫对极端高低温胁迫的响应研究. 环境昆虫学报, 32(2): 250–255.]

Zhang HJ, Li JS, Zhang LP, Liang YH, 2000. Evaluation on the host plant species and fitness to vegetable leafminer and its harmfulness. *Acta Ecologica Sinica*, 20(1): 134–138. [张慧杰, 李建社, 张丽萍, 梁岩华, 2000. 美洲斑潜蝇的寄主植物种类、适合度及其为害性的评价. 生态学报, 20(1): 134–138.]

Zhao YX, Kang L, 2000. Cold tolerance of the leafminer *Liriomyza sativae* (Dipt., Agromyzidae). *Journal of Applied Entomology*, 124(3/4): 185–189.

Zhou FC, Chen LF, Li X, Lu ZQ, Zhu SD, Liu XR, 2000. Studies on resistance adversity of pupae of *Liriomyza sativae* Blanchard. *Journal of Yangzhou University (Nature Science Edition)*, 3(1): 45–47. [周福才, 陈丽芳, 李祥, 陆自强, 祝树德, 刘学儒, 2000. 美洲斑潜蝇蛹的抗逆性研究. 扬州大学学报, 3(1): 45–47.]

Zhou YH, Jiang WH, Zhao ZM, Deng XP, 2001. Effect of temperature on the population increase of *Liriomyza sativae* and *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). *Acta Ecologica Sinica*, 21(8): 1276–1284. [周亦红, 姜卫华, 赵志模, 邓新平, 2001. 温度对美洲斑潜蝇及南美斑潜蝇种群增长的影响. 生态学报, 21(8): 1276–1284.]