

本诊断规程于 2016 年 8 月由标准委代表植检委通过。

本附件是 ISPM 27 号标准规定的一部分。

ISPM 27 号标准

限定有害生物诊断规程

DP 16: 斑潜蝇属 (*Liriomyza*)

2016 年通过; 2018 年出台

目录

1. 有害生物信息	3
2. 分类信息	4
3. 检测	6
3.1 标本的采集与保存	7
3.1.1 成虫采集	7
3.1.2 未成熟生命阶段的采集	7
4. 鉴定	7
4.1 斑潜蝇成虫的形态学鉴定	8
4.1.1 用于显微镜检验的斑潜蝇雄性成虫外生殖器的制备	8
4.1.1.1 斑潜蝇性别的确定	8
4.1.1.2 检验用雄虫端阳体的制备	8
4.1.2 潜蝇科的鉴定	9
4.1.3 斑潜蝇属的鉴定	10
4.1.4 斑潜蝇属的种的鉴定	11
4.1.4.1 斑潜蝇属成虫的形态特征	11
4.1.4.2 斑潜蝇雄性成虫的端阳体构造	14
4.1.4.3 斑潜蝇属四个目标种未成熟阶段的形态特征	15
4.2 斑潜蝇属的种的分子鉴定	16
4.2.1 分子检测的对照	16

4.2.2	DNA 提取	16
4.2.3	四个目标种的 PCR-RFLP 鉴定	17
4.2.3.1	COII 基因的扩增	17
4.2.3.2	产物的限制性酶切和分离	18
4.2.4	用于四个目标种鉴定的种特异性 PCR 引物	18
4.2.4.1	COI 基因的扩增	19
4.2.5	隐存种豌豆潜叶蝇和南美斑潜蝇的鉴别	20
4.2.5.1	PCR-RFLP	20
4.2.5.2	DNA 序列比较	21
4.2.6	DNA 条形码	21
5.	记录	21
6.	获取进一步信息的联系点	21
7.	致谢	22
8.	参考文献	22
9.	图	26

1. 有害生物信息

潜蝇科（Agromyzidae）是一类体形微小，以幼虫取食植物内部组织的蝇类，通常被称为潜叶蝇和潜茎蝇。潜蝇科大多数种类具有寄主专化性，或寄主范围局限于少数几个近缘种。潜蝇科内个别种类具有高度杂食性，并已成为全球范围内的农业或园艺害虫，其中包括四个被多数国家列入植物检疫名录的斑潜蝇种 *Liriomyza*：番茄斑潜蝇（*L. bryoniae*）、南美斑潜蝇（*L. huidobrensis*）、美洲斑潜蝇（*L. sativae*）和三叶斑潜蝇（*L. trifolii*）。这些斑潜蝇均为观赏性和蔬菜作物的杂食性害虫。本规程中种水平的鉴定仅限于这四个种类。

斑潜蝇主要分布于北温带地区，但有些种类在非洲区、新热带区和东洋区也有分布。斑潜蝇属中 300 多个种类的成虫外形非常相似：它们体形都很小（长度 1-3 mm），从背面看基本为黑色，大多数种类的额和小盾片为黄色（如图 1 所示）。因此，区分斑潜蝇属的不同种类会有较大难度。此外，为鉴定检疫关注的四种斑潜蝇，诊断专家不仅要区分这四个种类，还要将其从各种本地斑潜蝇的相关背景动物群中区分出来。

番茄斑潜蝇实际上是一种古北区物种，发生记录遍布欧洲和亚洲，以及北非的埃及与摩洛哥（CABI, 2013）。该斑潜蝇具有高度杂食性，已报道在 16 个科的植物上发生（Spencer, 1990）。，主要为害番茄、瓜类（尤其是甜瓜、西瓜和黄瓜）和温室种植的生菜、豆类及羽扇豆（Spencer, 1989, 1990）。

一般认为，南美斑潜蝇起源于南美洲，现已遍布全球大部分地区，包括北美洲、欧洲、非洲、亚洲和太平洋的部分地区（Lonsdale, 2011; CABI, 2013）。然而，之前分类学上定义南美斑潜蝇最近被分成两个形态相似的隐存种：南美斑潜蝇和豌豆潜叶蝇（*L. langei*）；关于它们相对分布区的精确划定还存在一些不确定性。目前，豌豆潜叶蝇仅在美国得到证实，美国以外的所有入侵种群很可能都是现在分类学上定义的南美斑潜蝇（Scheffer and Lewis, 2001; Scheffer 等, 2001; Takano 等, 2008; Lonsdale, 2011）。南美斑潜蝇具有高度杂食性，已报道在 14 个科的植物上发生（Spencer, 1990）。受其危害的最具经济重要性的作物包括甜菜、菠菜、豌豆、豆类、马铃薯和观赏植物（石头花属（*Gypsophila*）最为常见，偶见康乃馨和菊花）（Spencer, 1989）。

美洲斑潜蝇起源于北美洲、中美洲和南美洲，目前已扩散到亚洲、非洲和太平洋很多地区，但尚未扩散到欧洲和澳大利亚（Lonsdale, 2011; CABI, 2013）。然而，有关美洲斑潜蝇的分布记录可能并不完整，因为有证据显示，该害虫一直在持续快速地扩大其分布范围。它是另一种为害很多蔬菜和花卉作物的高度杂食性害虫（Spencer, 1973, 1990）。已报道在九个科的植物上发生，但主要寄主为葫芦科（Cucurbitaceae）、蝶形花科（Fabaceae）和茄科（Solanaceae）植物（Spencer, 1973, 1990）。

三叶斑潜蝇也起源于北美洲、中美洲和南美洲，现已扩散到欧洲、非洲、亚洲和太平洋的大部分地区，扩散的原因很可能是菊花鲜切花贸易（Martinez 和 Etienne, 2002; Lonsdale, 2011; CABI, 2013）。该害虫具有高度杂食性，已报道在 25 个科的植物上发生（Spencer, 1990）。受其危害的最具经济重要性的作物包括豆类、芹菜、菊花、黄瓜、非洲菊、石头花属、生菜、洋葱、马铃薯和番茄（Spencer, 1989）。

本诊断规程还包含了另一种（第五种）斑潜蝇-线斑潜蝇（*L. strigata*），因为它与番茄斑潜蝇和南美斑潜蝇都密切相关，是诊断专家在鉴定四种检疫性斑潜蝇时必须有能力排除的一种斑潜蝇。线斑潜蝇是一个欧亚种（Pitkin 等(n.d.)引自 Spencer, 1976; Dempewolf, 2001; Ellis, 2013; 和 Pape 等, 2013）。其分布的东部边界尚不明确，但范围跨越了乌拉尔山脉（Spencer, 1976），而且在东南亚有存疑记录（Dempewolf, 2004）。线斑潜蝇具有高度杂食性，已报道在世界范围内 29 个科的植物上发生（Spencer, 1990）。

2. 分类信息

学名: *Liriomyza* Mik, 1894

异名: *Agrophila* Lioy, 1864; *Antineura* Melander, 1913; *Haplomyza* Hendel, 1914; *Praspedomyza* Hendel, 1931; *Craspedomyza* Enderlein, 1936; *Triticomyza* Blanchard, 1938

分类地位: 昆虫纲（Insecta）、双翅目（Diptera）、潜蝇科（Agromyzidae）、植潜蝇亚科（Phytomyzinae）

学名: *Liriomyza bryoniae* (Kaltenbach, 1858) (Kaltenbach, 1858)

异名: *Liriomyza solani* Hering, 1927; *Liriomyza hydrocotylae* Hering, 1930; *Liriomyza mercurialis* Hering, 1932; *Liriomyza triton* Frey, 1945; *Liriomyza citrulli* Rohdendorf, 1950; *Liriomyza nipponallia* Sasakawa, 1961

通用名: 番茄斑潜蝇

学名: *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard, 1926) (Blanchard, 1926)

异名: *Liriomyza cucumifoliae* Blanchard, 1938; *Liriomyza decora* Blanchard, 1954; *Liriomyza dianthi* Frick, 1958

南美斑潜蝇和豌豆潜叶蝇之间的分类关系较为复杂。南美斑潜蝇最早由 Blanchard (1926) 对从阿根廷瓜叶菊属（*Cineraria*）上采集到的标本进行描述。Frick (1951) 将采自加利福尼亚州的豌豆潜叶蝇描述为一个种，据其记载主要是豌豆上的一种害虫，

但是也会危害紫菀属 (*Aster*) 植物。由于这两种斑潜蝇以往 (实际上目前仍然如此) 在形态上难以区分, Spencer 于 1973 年将其定为同种异名。根据对其线粒体和核 DNA 序列 (Scheffer, 2000; Scheffer 和 Lewis, 2001) 的研究, 并得到了后续饲养实验的支持 (Takano 等, 2008), 这两种斑潜蝇被正式分为两个隐存种 (Lonsdale, 2011)。学名 “*L. langei* Frick” 被重新启用, 专指加利福尼亚的隐存种, 而学名 “*L. huidobrensis* (Blanchard)” 则用于南美洲和中美洲的隐存种。

Lonsdale (2011) 曾试图描述可区分这两个种类的 “大多数” 标本的诊断性形态特征, 但那些特征 “差异微小, 而且有时候相互重叠”, 因此, 他建议尽可能使用分子数据进行鉴别。Scheffer 及其同事认为, 这两个种类的分布范围没有重叠 (虽然 Lonsdale (2011) 报道了采自加利福尼亚的南美斑潜蝇, 一次是 1968 年, 另一次是 2008 年, 但他指出尚不清楚种群是否已经定殖), 而且他们研究过的所有入侵种群均符合南美斑潜蝇的定义 (Scheffer 和 Lewis, 2001; Scheffer 等, 2001)。这意味着, 几乎应肯定地认为, 早于 Scheffer 论文的所有文献中来自加利福尼亚的报道针对的都是豌豆潜叶蝇。豌豆潜叶蝇主要是分布在加利福尼亚的一个种类, 但它显然已经传入夏威夷、俄勒冈和华盛顿; 上世纪 90 年代中期在佛罗里达、犹他和弗吉尼亚发现的种群并未定殖 (Lonsdale, 2011)。墨西哥目前仅证实有南美斑潜蝇发生 (Lonsdale, 2011), 但据 Takano 等 (2005) 报道, 日本一检疫所在产自墨西哥的新鲜蔬菜上曾截获到豌豆潜叶蝇 (被称作加利福尼亚进化枝) 的标本。

- 通用名:** 蛇形斑潜蝇、豌豆斑潜蝇、南美斑潜蝇、马铃薯斑潜蝇
- 学名:** *Liriomyza sativae* Blanchard, 1938
- 异名:** *Agromyza subpusilla* Frost, 1943; *Liriomyza verbenicola* Hering, 1951; *Liriomyza pullata* Frick, 1952; *Liriomyza canomarginis* Frick, 1952; *Liriomyza minutiseta* Frick, 1952; *Liriomyza propepusilla* Frost, 1954; *Liriomyza munda* Frick, 1957; *Liriomyza guytona* Freeman, 1958; *Lemurimyza lycopersicae* Pla and de la Cruz, 1981
- 通用名:** 蔬菜斑潜蝇、美洲斑潜蝇、菊花斑潜蝇、蛇形蔬菜斑潜蝇、瓜斑潜蝇
- 学名:** *Liriomyza trifolii* (Burgess, 1880)
- 异名:** *Agromyza phaseolunulata* Frost, 1943; *Liriomyza alliovora* Frick, 1955
- 通用名:** 美洲蛇形斑潜蝇、蛇形斑潜蝇、蚕豆斑潜蝇、加利福尼亚斑潜蝇、芹菜斑潜蝇、菊花斑潜蝇

3. 检测

取食刻点和叶片上的潜道通常是斑潜蝇存在的最初且最明显的症状。虽然完全形成后的潜道应该很容易被检疫人员发现，但侵染的早期症状不太明显，很容易被忽略（Spencer, 1989）。潜道可以在数周时间内保持完好和相对无变化。潜道构造通常被认为是潜蝇科各种蝇类进行鉴定的可靠指南（因为在此类情况下很多种类具有寄主专化性）。然而，对于杂食性种类而言，潜道构造会受宿主、每片叶片的物理和生理条件，以及在同一叶片中潜食的幼虫数量的影响。较大的变异性说明，仅根据潜道构造进行鉴定时应特别谨慎（EPPO, 2005）。四种检疫性斑潜蝇和线斑潜蝇 *L. strigata* 的潜道构造示例见图 2 至 4。

雌蝇用其产卵器刺穿寄主植物的叶片，造成的创伤被用于取食（雌蝇和雄蝇）或产卵。各种斑潜蝇的取食刻点均为圆形，直径通常约为 0.2 mm，在叶片正面表现为白色斑点。产卵刻点通常较小（0.05 mm），呈更规则的圆形。和斑潜蝇造成的取食刻点相比，杂食性潜蝇科害虫豌豆彩潜蝇（*Chromatomyia horticola*）和 *Chromatomyia syngenesiae* 的取食刻点明显更大，更接近于椭圆形。各种斑潜蝇的取食刻点和产卵刻点看起来差异不大，其在叶片上的分布模式不能用于种的鉴定。取食刻点会使大量细胞遭到破坏，肉眼清晰可见（EPPO, 2005）。

幼虫主要取食叶片正面，在绿色栅栏组织中形成潜道。潜道通常为近白色，粪便轨迹沿叶片纵向呈不连续的黑色线状。在叶片的同一小区域内反复来回潜食往往会导致潜道变色，出现潮湿的黑色和干燥的褐色区域，这通常是植物受潜叶蝇诱导而产生的反应的结果（EPPO, 2005）。

幼虫有三个龄期，均在叶片内取食。幼虫主要在产卵的植株上取食。斑潜蝇幼虫在即将化蛹时出叶（Parrella 和 Bethke, 1984），其典型的弹出孔为半圆形裂缝；相反，豌豆彩潜蝇 *C. horticola* 和 *C. syngenesiae* 的幼虫在叶片内潜道末端化蛹，前气门通常从叶片下表面伸出。因此，可以在作物碎屑和土壤中，有时也可以在叶片表面找到斑潜蝇的蛹壳。

取决于其所处的生命阶段，可以在植物的不同部位和周围环境中发现斑潜蝇，具体如下：

- 卵：叶片内紧贴叶片表面
- 幼虫：叶片上的潜道内
- 蛹：作物碎屑和土壤中，有时在叶片表面上
- 成虫：自由飞行，或在形成取食刻点和产卵刻点时在叶片表面。

3.1 标本的采集与保存

可以采集斑潜蝇的成虫或和被潜食的叶片样品一起采集其未成熟的虫态。用于鉴定到种的形态特征主要基于雄虫的外生殖器，因此需要有雄性成虫来确认对种的鉴定。雌性成虫通常只能确切地鉴定到属的水平。从一株植物或一个地点采集多头标本可以增加捕获雄蝇的可能性，这一点非常重要，除非要使用分子检测方法鉴定未成熟的生命阶段。

3.1.1 成虫采集

成虫通常见于叶片上，可用手捕捉，或用手持捕虫网扫入小玻璃瓶中，也可以使用真空采样器采集。此外，它们还可使用黄色粘板采集，在温室中时尤其如此。然而，采集斑潜蝇等潜叶蝇的最实用和最可靠的方法是采集带有成活幼虫的被潜食叶片。可以把它们带回实验室，在大瓶中饲养至成虫。

可以将成虫和幼虫置于 70% 的乙醇溶液中长期保存，但它们的颜色会随着时间的推移逐渐褪去。应对乙醇标本瓶进行密封，以避免泄漏，并用衬垫材料包装后放入结实的盒子中。也可以通过针插标本等方法在干燥条件下保存标本。

分子鉴定工作所需的标本应杀死后放入 96%-100% 的乙醇溶液中冷冻保存（约 -20 °C 或 -4 °C），或保存在 FTA 卡（Whatman¹）（Blacket 等，2015）上。

3.1.2 未成熟生命阶段的采集

如果是为了采集并保存植物标本，应摘下带有疑似取食刻点或潜道的叶片，夹在报纸中，让其缓慢干燥。

对于潜道中有幼虫的叶片，如果是为了在实验室中进行饲养，以获得用于鉴定的不同的生命阶段，特别是成虫，就需要用略微潮湿而未湿透的实验室材料进行包装，并置于装有衬垫的密封袋中邮寄。在实验室中，可将带有成活幼虫的被潜食的叶片放进插有潮湿滤纸的密封培养皿中，置于 23 °C 左右的培养箱中（每两天或三天检查一次，取出长有真菌、细菌等的叶片）。

4. 鉴定

通过形态学检验对潜叶蝇进行种的鉴定仅限于雄性成虫标本，因为尚无适宜的检索表可用于对雌性成虫、卵、幼虫或蛹进行种水平的鉴定。可通过对形态特征的检验，尤其是对雄蝇外生殖器的检验，对成虫材料进行鉴定。可在高倍显微镜（约放大 100×）下检验雄蝇外生殖器的形态特征。使用本规程和质量良好的标本，仅凭形态学检验就能确切地鉴定出四种检疫性斑潜蝇成虫（由于 1 节所讨论的原因，南美斑潜蝇和豌豆潜叶蝇除外）。

分子鉴定方法适用于所有虫态，包括无法用形态学方法鉴定到种水平的未成熟阶段。此外，在成虫标本不典型或已损坏的情况下，分子检测可提供有关鉴定的更多的有用信息。然而，分子检测的特异性可能有限，因为它们被开发用于特定目的，而且只使用采自不同地区的样品，针对有限数量的种类进行过评估。因此，应小心解读分子检测的结果。

4.1 斑潜蝇成虫的形态学鉴定

为了确切地鉴定出四种目标斑潜蝇中的任何一种，有必要对雄虫外生殖器（尤其是端阳体，图 5）进行检验。下文简要介绍了一种被认可的标本制备方法（依据 Malipatil 和 Ridland, 2008）。Spencer（1981, 1992）、Spencer 和 Steyskal（1986）以及 EPPO（2005）提供了该方法的更多细节或改进。有关端阳体构造的检验结果应与外部形态特征（表 1）进行比较，以确认对种的鉴定。

4.1.1 用于显微镜检验的斑潜蝇雄性成虫外生殖器的制备

4.1.1.1 斑潜蝇性别的确定

雄蝇第九背板叶突呈黑色，被短柔毛，骨化程度不如雌蝇管状构造，后腹部从背面向腹面弯曲，呈圆弧形（图 6(a)）。叶突间可见狭缝状开口，充分张开时呈三角形，通过它可以看见雄蝇外生殖器的其他部位。叶突延伸仅超过最后一背片。雌蝇第 6 节之后的腹部各节形成高度骨化的黑色管状构造，延伸超过第六背片（图 6(b)），管状构造末端后面观可见一个圆形开口。第六背片从上面覆盖了管状构造基半部，但侧面观和腹面观均可看见该构造。

4.1.1.2 检验用雄虫端阳体的制备

应从虫体上取下腹部，以便清理组织并进行观察。可使用细解剖针（先用普通针在火柴梗末端打个浅孔，再将尖锐小针的钝端粘接到火柴梗末端）小心将腹部和雄蝇的其他部分分开。腹部置于 10% 的 KOH 或 NaOH 溶液中煮 2-4 min，也可以置于 10% 的 KOH 或 NaOH 冷却溶液中过夜，以清除腹部组织。将处理过的腹部转移至蒸馏水浴中，中和 KOH 或 NaOH。然后将腹部转移至凹穴玻片上的甘油滴中。

在双目体视显微镜下，用细解剖针仔细从周围的膜、表皮和相关的肌肉组织中剥离出生殖器复合体。用细解剖针固定生殖器复合体供侧面观，在最多达 400x 放大倍率的复式显微镜下观察。重新固定生殖器复合体，不加盖盖玻片，在 400x 放大倍率下从侧面观察端阳体。要从不同方向（如侧面、背面、腹面）观察端阳体，这就需要在较低的放大倍率下对其重新进行固定。

制作半永久玻片（如用于常规鉴定）时，应将生殖器复合体转移至干净平玻片上的甘油滴中。将外生殖器轻轻浸入封固剂中，小心盖下圆形盖玻片，使封固剂均匀散布。

如需制作永久封固玻片，应如上文所述，使用 KOH 清理腹部，并在冷却的冰醋酸中进行中和。然后将腹部转移至 70% 的乙醇溶液中，在双目体视显微镜下用细解剖针仔细从周围的膜、表皮和相关的肌肉组织中剥离出生殖器复合体。首先应将解剖出的外生殖器转移至纯乙醇中保持 2-4 min，再转移至丁香油中（如有必要，可在其中保存任意时长）。将外生殖器转移至 70% 的乙醇溶液中（保持约 10 min），再转移至 95% 的乙醇溶液中（保持约 10 min），最后转移至丁香油中（至少保持 5 min）。随后可以用一滴加拿大树胶将外生殖器永久封固在载玻片上盖玻片下。所有封固玻片必须加贴标签，详细标明地点、寄主、采集日期、采集人姓名（如果已知）、种名、鉴定人员姓名等信息，以及与剩余标本交叉引用的条码标签。

剩余的斑潜蝇标本应固定在卡片尖端，并加贴适当的标签，供交叉引用其封固在玻片上的外生殖器。

4.1.2 潜蝇科的鉴定

全球范围内潜蝇科包含大约 2500 个种（Spencer, 1989, 1990）。Spencer（1972, 1973, 1987）、Dempewolf（2004）和 Boucher（2010）发表了潜蝇形态的详细描述。

本规程的形态学命名遵循 Yeates 等（2004）的研究。也可通过这一在线资源查阅典型无瓣蝇（如潜蝇科）身体结构的清晰示图。

潜蝇科的形态特征如下：（Hennig, 1958; Spencer, 1987; Boucher, 2010）（图 7）：

- 体形较小，体长达 1-6 mm，但通常为 1-3 mm
- 具髭
- 具 1 至 7 根额毛
- 翅前缘在 Sc 末端处具一缺刻
- cup 室小；翅脉 $A_1 + CuA_2$ 未达翅缘
- 雄蝇具前殖片，为第 6-8 背片融合形成的背片复合体，仅第 5 背片和生殖节之间具两个气门
- 雌蝇第 7 腹节前部形成产卵器基节。

通常情况下，幼虫（图 8(a)）呈圆柱形，前部变细，具突起，上生前、后气门（图 8(b)和(d)），前者位于前胸背面，后者直接向后位于尾部。幼虫同样具有高度骨化的口器；上颚纵轴与头咽骨的其他部分大致成直角（图 8(c)），通常具两对或更多大小相同的指向前方的齿，腹角（成对指向后方的“臂”）通常短于背角。

实际上，潜蝇易于辨识，因为它们的幼虫取食植物的成活组织（其中四分之三为潜叶蝇）。然而，花蝇科（*Anthomyiidae*）和果蝇科（*Drosophilidae*）等双翅目其他科中也有潜叶蝇。有关潜蝇科多种潜叶蝇未成熟阶段的形态学和生物学信息概述，以及有关头咽骨和后气门的大量参考书目与图示可参看 Ferrar（1987）。

4.1.3 斑潜蝇属的鉴定

斑潜蝇属成虫具有以下形态特征（EPPO, 2005; Spencer, 1976）：

- 额眶鬃下垂（后倾）
- 多数种类的黑色盾片前区和盾片同色，少数呈黄色
- 多数种类小盾片呈黄色，少数呈黑色
- 亚前缘脉端部退化为一皱褶，独立结束于前缘脉
- 前缘脉伸达 M_{1+2} 脉
- 中室（dm）小
- 多数种类具第二（外）横脉（dm-cu）
- 雄蝇具有摩擦发音器（“摩擦器”，即后足腿节上几丁化的脊状突起；“音锉”，即腹部背片和腹片之间连接膜上几丁化程度较低的一排鳞片）。

实际上，从上方看时，斑潜蝇属多数种类（包括纳入本诊断规程的四个目标种类）基本为黑色，额黄色，小盾片明黄色。虫卵也呈黄色，但深浅不一。目标种类的翅具典型脉序（图 9）和该属常见的雄虫外生殖器。

有几个属可能会和斑潜蝇属混淆。植潜蝇属（*Phytomyza*）、彩潜蝇属（*Chromatomyia*）和植斑潜蝇属（*Phytoliriomyza*）等几个密切相关的属一般可通过其前倾（指向前方）的额眶鬃与斑潜蝇属进行区分（斑潜蝇属的总是下垂，或偶尔直立或缺如），还可通过小盾片进行区分，这些属的小盾片通常为灰色或黑色，偶尔中部呈浅黄色（斑潜蝇属多数种类全为黄色）。植潜蝇属和彩潜蝇属的前缘脉仅伸达 R_{4+5} 脉，而植斑潜蝇属和斑潜蝇属的则伸达 M_{1+2} 脉（Spencer, 1977）。植斑潜蝇属各个种类会（在茎或叶上）形成虫瘿，在虫瘿内取食，而彩潜蝇属、植潜蝇属和斑潜蝇属的各个种类则为典型的潜叶蝇。

4.1.4 斑潜蝇属的种的鉴定

4.1.4.1 斑潜蝇属成虫的形态特征

表 1 提供了番茄斑潜蝇、南美斑潜蝇、美洲斑潜蝇和三叶斑潜蝇（以及出于排除目的的线斑潜蝇）主要诊断特征的简明概述。图 10 和 11 配套提供了端阳体的示意图（显微照片）。

Spencer（1965，1973）、Dempewolf（2004）、Malipatil 等（2004）和 Shiao（2004）提供了有关这些种类的更详细的形态描述和示图。关键的鉴定特征可参见病虫害图像库（PaDIL）（Malipatil，2007a，2007b，2007c）。

也可根据检索表对成虫进行鉴定。Malipatil 和 Ridland（2008）发表了 17 个具有经济重要性的种类，其中包括几个澳大利亚特有种类的检索表。此外，Dempewolf（2004）提供了一个基于显微照片的全球有害种类的鉴定系统。需要特别参考各种斑潜蝇的检索表时，可通过 Spencer 的研究获得大量以往的区域性目录和检索表。这些资料涵盖了区域性背景动物群，它们在不同地区间明显不同，这样做会对排除非目标动物群的实证过程产生不同的影响。Spencer（1973）列出了这些研究的完整清单。此外，认真研究已检出的疑似检疫性斑潜蝇种类的寄主植物也会有所帮助，这样可以缩小在同一生物背景下可能发生的其他潜在的潜蝇的范围，这些潜蝇在研究时可能需要排除（例如，有关欧洲的情况参见 Ellis(n.d.)）。

表 1. 几种斑潜蝇成虫的形态特征[†]

	番茄斑潜蝇	南美斑潜蝇 [‡]	美洲斑潜蝇	线斑潜蝇	三叶斑潜蝇
雄虫端阳体	端部具两个球状物，球状物前缘圆形	端部具两个球状物，仅前缘处接触；球状物前缘向前腹部突出	端部具一个球状物，背腹观上下部分之间轻微缢缩；球状物骨化程度较强，基柄部较短	端部具两个球状物，前缘至基部均有接触；球状物前缘向前腹部突出	端部具一个球状物，背腹观上下部分之间明显缢缩；球状物骨化程度相对不明显，基柄部较长
顶鬃	顶鬃均着生于黄色区域	顶鬃均着生于黑色区域	外顶鬃着生于黑色区域，该黑色区域可能刚好触及内顶鬃，除此以外内顶鬃着生于黄色区域	眼后方黑色区域至少延伸至外顶鬃，但内顶鬃着生于黄色区域	顶鬃均着生于黄色区域
中侧片	以黄色为主，下缘中部具黑色小斑点	黄色，下部四分之三区域具大小不一的黑色斑	以黄色为主，黑色区域大小有变化，有的是沿下缘的一长条，有的是沿整个下缘的一大块，有的伸达前缘，有的限于后缘一狭窄区域	黄色，但下缘和前缘具大小不一的黑色斑，黑色斑沿下半部延伸	黄色，下缘中部具有灰黑色小斑点
Cu1 A 脉	a 长度为 b 长度的 2 倍	a 长度为 b 长度的 2-2.5 倍	a 长度为 b 长度的 3-4 倍	a 长度为 b 长度的 2-3 倍	a 长度为 b 长度的 3-4 倍
触角第三节	较小，黄色	略膨大，通常黑色	较小，黄色	较小，黄色	较小，黄色
额和眼眶	额亮黄色，眼眶颜色较浅	额黄色，一般比浅柠檬色深；上眼眶浅黑色，至少达上眶鬃	额和眼眶均为亮黄色	额和眼眶均为黄色	额和眼眶均为黄色
腿节	亮黄色，具一些褐色条纹	黄色，具深浅不一的黑色条纹	亮黄色	黄色，具一些褐色条纹	黄色，偶尔具淡褐色条纹

	番茄斑潜蝇	南美斑潜蝇 [‡]	美洲斑潜蝇	线斑潜蝇	三叶斑潜蝇
中胸背板	黑色，大部光亮，但具有明显的浅色区	黑色，无光泽	黑色，光亮	黑色，光亮，但光泽度稍差	黑色，无光泽，具浅灰色区
雄虫腹部背板	第二和第三背板由一黄色中沟纹明显隔开	仅第二背板由一黄色中沟纹明显隔开	仅第二背板由一黄色中沟纹明显隔开	—	第二至第五背板由一黄色中沟纹明显隔开
翅长	1.75–2.1 mm	1.7–2.25 mm	1.3–1.7 mm	1.8–2.1 mm	1.3–1.7 mm

来源：汇编自 Spencer（1973，1976），其中有关端阳体的信息源自 EPPO（2005），有关雄虫腹部背板的信息源自 Shiao（2004）（其分析中未包含线斑潜蝇）。

[†] 另见图 7 至 11。

[‡] 无法根据形态特征区分豌豆潜叶蝇和南美斑潜蝇。

4.1.4.2斑潜蝇雄性成虫的端阳体构造

本规程涉及的斑潜蝇可根据雄虫外生殖器（尤其是端阳体）构造，以及虫体颜色和幼虫的后气门结构分成两个不同的自然类群：

- 类群 1：番茄斑潜蝇、南美斑潜蝇和线斑潜蝇
- 类群 2：美洲斑潜蝇和三叶斑潜蝇。

然而，对鉴定有用的成虫外部特征（表 1），尤其是基于颜色的外部特征，并不完全符合两个类群的划分。

端阳体是由膜包裹的很小且脆弱的构造。它是阳茎的端部构造（即插入器官，雄虫外生殖器的组成部分）（图 5），其复杂的三维构造具有相当重要的诊断价值。事实上，仅根据端阳体这单一特征就可以准确地鉴别出四个目标种。两个自然类群的端阳体基本构造不同：在类群 1 中，端部有两个并排的球状物（图 10）；而在类群 2 中，端部只有一个球状物，球状物中部缢缩，将其分隔为明显的上下两个部分（图 11）。下文提供了一个检索表，可使用端阳体帮助鉴定四个目标种类。为方便起见，该检索表也包含了线斑潜蝇，它和番茄斑潜蝇、南美斑潜蝇密切相关，也是杂食性，因此可在类似的寄主植物上发现。

然而，一些种类两两比较时差异微小，因此对端阳体构造的观察结果应与对外部形态的观察结果（表 1）相互验证，以确保端阳体构造未被错误解读。如所有观察结果相互印证，则可排除斑潜蝇属所有的其他种类，包括本规程未涉及的种类。

用雄虫端阳体鉴定斑潜蝇的检索表

本检索表应与图 10 和 11 结合使用。

- | | |
|--|---------------|
| 1. 端部只有一个球状物（图 11e、f） | 2 |
| – 端部具有一对球状物（图 10a-c, g-k） | 3 |
| 2. 球状物顶部和基部间具明显缢缩：基部呈明显弧形（图 11f） | 三叶斑潜蝇 |
| – 球状物顶部和基部间具轻微缢缩：基部不呈明显弧形（图 11e） | 美洲斑潜蝇 |
| 3. 球状物前缘圆形（未向前腹部突出）；骨化均匀（图 10a） | 番茄斑潜蝇 |
| – 球状物前缘螺旋形（向前腹部突出）（图 10b、c） | 4 |
| 4. 球状物仅前缘中线处接触（图 10h） | 南美斑潜蝇* |

– 球状物前缘至基部中线处均接触（图 10i） **线斑潜蝇**

* 无法根据形态特征区分豌豆潜叶蝇和南美斑潜蝇。

4.1.4.3 斑潜蝇属四个目标种未成熟阶段的形态特征

在斑潜蝇的四个生命阶段（卵、幼虫、蛹和成虫）中，只有雄性成虫可使用形态特征（雄虫外生殖器的形状）确切地鉴定到种的水平。幼虫和蛹的形态特征可用以区分 4.1.4.2 节所描述的两个自然类群。此类信息有助于种的鉴定，但其本身不足以鉴定到种。作为对形态鉴定的补充，分子检测可用于区分本规程所包含的各个种类（4.2 节）。

卵

卵产在叶片组织中。它们呈白色椭圆形，长度约为 0.25 mm。无法据此对属和种进行鉴定。

幼虫和蛹

幼虫有三个龄期，它们在叶片组织中蛀道潜食。初孵幼虫长约 0.5 mm，发育完全后可达 3.0 mm。幼虫总体具有典型的潜蝇形态（见 4.1.2 节）。蛹（图 12）呈长椭圆形，长约 2.0 mm，腹面扁平，具突出的前、后气门。在实际工作中，对于幼虫和蛹，可根据以下形态区分两个自然类群（而非类群内的种）。

类群 1 幼虫

番茄斑潜蝇、南美斑潜蝇和线斑潜蝇的幼虫呈奶油色，但末龄幼虫在背面前端会形成橘黄色斑，并围绕虫体延伸至腹面（图 13）。每个后气门都有一个椭圆形突起，边缘具气门孔。气门孔数量难以观察，根据 Spencer（1973）分别为：番茄斑潜蝇 7-12 个；南美斑潜蝇约 6-9 个；线斑潜蝇 10-12 个。蛹壳颜色从橘黄色到深褐色变化不一。多数番茄斑潜蝇和线斑潜蝇的蛹壳颜色偏浅，但并非总是如此。南美斑潜蝇的蛹壳基本趋于煤灰色。围蛹会保持幼虫的气门形态，但气孔更难识别。

类群 2 幼虫

美洲斑潜蝇和三叶斑潜蝇的初孵幼虫为半透明，随后通体呈橘黄色。每个后气门均呈三叉状突起，具三个气门孔，每一个气门孔分布在不同的突起上，外侧两个气门孔呈细长形。蛹壳浅橘黄色，有时呈深金褐色。围蛹会保持幼虫的气门形态，但相对不明显。

4.2 斑潜蝇属的种的分子鉴定

已有多种基于聚合酶链式反应（PCR）的分子检测方法被用于鉴定斑潜蝇的种类，包括聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性（PCR-RFLP）、使用种特异性引物的终点 PCR、实时 PCR，以及 DNA 序列比较。在这些检测方法中，有几种方法可用于鉴别四个目标种（即番茄斑潜蝇，南美斑潜蝇，美洲斑潜蝇和三叶斑潜蝇），或用于区分南美斑潜蝇与豌豆潜叶蝇，现描述如下。

在本诊断规程中，各种方法（包括引用的商标名）的描述和发表时一样，因为它们决定了最初获得的灵敏度，特异性和/或再现性水平。至于已报道的适用于这些种类的其他方法，尚无任何一种已正式通过分析灵敏度和再现性验证。本诊断规程对试剂、化学品或设备名称的使用，并不意味着对它们的认可，而排斥可能同样适用的其他品牌。只要经过充分验证，本规程提供的实验室程序可根据各个实验室的标准进行调整。

下文会对每种方法的特异性作出描述。具体说明用于评估每种方法的斑潜蝇种类，以及该方法最初的设计用途。考虑到分子检测在特异性方面的不足，阴性分子检测结果并不能排除通过形态学检验获得阳性鉴定结果的可能性。

4.2.1 分子检测的对照

为了获得可靠的检测结果，取决于所使用的检测类型和所要求的确定性水平，应考虑为每组核酸分离和目标有害生物核酸扩增设置适宜的对照。就 PCR 而言，最少应使用一个阳性核酸对照、一个阴性扩增对照（无模板对照），并在相关时使用一个阴性提取对照。

4.2.2 DNA 提取

可使用各种商业化 DNA 提取试剂盒，并按照生产商的说明（Scheffer 等，2001，2006；Kox 等，2005；Nakamura 等，2013），从单个斑潜蝇幼虫，蛹或成虫标本中成功提取适用于 PCR 应用的 DNA。有关下文描述的每种检测方法所使用的试剂盒的更多信息，请参阅原始文献。有些实验室可能会发现其他提取技术同样有效；可使用适于昆虫的任何 DNA 提取方法提取 DNA。在所有公开发表的规程中均使用无菌微型小杵或类似设备粉碎或研磨待处理组织。

阳性核酸对照。本对照用于监测在实验条件和参数下检测是否按预期进行。阳性对照可以是含有目标序列（即以前已分析过的斑潜蝇核酸）的任何核酸。

阴性扩增对照（无模板对照）。PCR 必须设置本对照来排除因为反应混合液制备过程中的污染或非特异性扩增引起的假阳性。在扩增阶段加入等体积用于制备反应混合液的 PCR 级水，代替 DNA。

阴性提取对照。本对照用于监测核酸提取过程中的污染和/或与寄主组织的交叉反应。本对照由不添加样品组织的提取反应液构成。

4.2.3 四个目标种的 PCR-RFLP 鉴定

Kox 等（2005）报道了一种针对细胞色素氧化酶 II（*COII*）基因上某个区域的 PCR-RFLP 检测方法，可用于区分四个目标种。已通过分析线斑潜蝇，豌豆潜叶蝇，葱斑潜蝇（*L. chinensis*）和 *L. scorzonerae* 等另外四种斑潜蝇进一步研究了本检测方法的特异性。使用本检测方法不能区分豌豆潜叶蝇和南美斑潜蝇的标本。其他三种均可被成功区分。

4.2.3.1 *COII* 基因的扩增

根据 Kox 等（2005），样品在 50 µl 反应混合液中扩增，具体包含以下最终浓度的反应物：0.6 µM 各引物、0.2 mM dNTPs、1 U HotStarTaq¹ DNA 聚合酶、1× PCR 缓冲液和 1.5 mM MgCl₂。每反应包含 1-5 µl DNA 作为模板，或 PCR 级水作为阴性对照。使用以下引物对进行 PCR 反应：

TL2-J-3037-正向引物（F）：TL2-J-3037-forward (F)：

5'-ATGGCAGATTAGTGCAATGG-3' (Simon 等，1994)

K-N-3785Lir-反向引物（R）：K-N-3785Lir-reverse (R)：

5'-GTT (A/T) AAGAGACCATT (A/G) CTTG-3' (Kox 等，2005)

PCR 的热循环参数为：95 °C 15 min 的变性步骤，继以 35 个循环（94 °C 15 s，55 °C 1 min 和 72 °C 45 s），以及最后的延伸步骤 72 °C 10 min，然后冷却至室温。PCR 扩增后，取 5 µl PCR 产物和 100 个碱基对（bp）DNA 梯度一起，用 1.5% 琼脂糖凝胶和 Tris-乙酸-乙二胺四乙酸（EDTA）（TAE）缓冲液电泳，以便在 RFLP 分析前确认有 PCR 产物存在。

COII PCR 可判为有效，如果：

- 阳性对照产生目标 *COII* 基因的预期大小的扩增产物
- 阴性提取对照和阴性扩增对照不产生目标 *COII* 基因的预期大小的扩增产物。

¹ 在本诊断规程中，各种方法（包括引用的商标名）的描述和发表时一样，因为它们决定了最初获得的灵敏度、特异性和/或再现性水平。本诊断规程对试剂、化学品或设备名称的使用，并不意味着对它们的认可，而排斥可能同样适用的其他品牌。只要经过充分验证，本规程提供的实验室程序可根据各个实验室的标准进行调整。

4.2.3.2 产物的限制性酶切和分离

对于每个样品，按照生产商的说明，在单独的反应中分别用限制性内切酶 *DdeI*、*HinfI*、*SspI* 和 *TaqI* 对 5 µl PCR 产物进行酶切。随后，取酶切后的 PCR 产物和 100 bp DNA 梯度一起，用 3% 琼脂糖凝胶和 TAE 缓冲液进行电泳分离，以确定片段大小。

在所描述的电泳条件下，不可能确定分离开的酶切产物的确切片段大小，但相对分离值可用于对结果和目标种预期的 RFLP 图谱进行比较。可用具有已知片段大小和图谱的阳性对照样品与检测样品一起电泳，以便更精确地对大小进行比较。检测用的每个内切酶均应设置阳性对照，以确保按预期进行 DNA 酶切。只有当阳性对照产生目标 *COII* 基因的预期大小的片段时，RFLP 检测才可判为有效。在琼脂糖凝胶上观察到的 RFLP 图谱可用于鉴别四种目标斑潜蝇。表 2 提供了各种酶的诊断性图谱。如果一个样品的整套片段图谱与表中五种斑潜蝇中某一种的已知片段图谱相匹配，则可基于本检测将样品鉴定为该种类。如片段图谱与已知种类的片段图谱中的任何一个都不匹配，则基于本检测不能将样品鉴定到种。如一个样品被鉴定为南美斑潜蝇，可能需做进一步检测，以确认不是隐存种豌豆潜叶蝇（4.2.5 节）。

表 2. 几种斑潜蝇的限制性片段长度多态性图谱

种	限制酶的预测片段大小（碱基对）			
	<i>DdeI</i>	<i>HinfI</i>	<i>SspI</i>	<i>TaqI</i>
番茄斑潜蝇	790	421、369	392、326、72	486、163、111、30
南美斑潜蝇 [†]	790	421、369	399、391	306、163、159、111、30、21
美洲斑潜蝇 “美国” [‡]	567、223	421、282、59、27	399、391	306、210、163、81、30
美洲斑潜蝇 “亚洲” [‡]	790	421、310、59	717、73	306、210、163、81、30
线斑潜蝇	790	421、342、27	399、391	267、219、141、72、67
三叶斑潜蝇	619、171 或 386、223、171	421、310、59	391、326、73	306、163、159、141、21 或 306、163、159、111、30、21

来源：数据引自 Kox 等（2005）。

[†] 包括隐存种豌豆潜叶蝇。

[‡] 美国和亚洲是已知的替代变种；两者都是美洲斑潜蝇。

4.2.4 用于四个目标种鉴定的种特异性 PCR 引物

Nakamura 等（2013）报道了一种不需要在 PCR 反应后实施限制性酶切程序即能区分四个目标种的多重 PCR 检测方法。本检测方法使用以细胞色素氧化酶 I（*COI*）

基因为目标的六种引物。其中五种分别结合到一种斑潜蝇独特的序列上，被用作正向引物。第六种引物结合到各种斑潜蝇均有的一段保守的 *COI* 基因上，被用作反向引物，以完成引物配对。PCR 产物的大小可用于区分番茄斑潜蝇、南美斑潜蝇、美洲斑潜蝇、三叶斑潜蝇和葱斑潜蝇。与 Kox 等（2005）的 PCR-RFLP 检测方法（4.2.3 节）不同，本检测方法对线斑潜蝇的特异性尚未经过验证。

4.2.4.1 *COI* 基因的扩增

根据 Nakamura 等（2013），样品在 10 μ l 反应混合液中扩增，具体包含以下最终浓度的反应物：0.5 μ M 各引物（共六种）、0.2 mM dNTPs、1 U TaKaRa1Ex Taq DNA 聚合酶、1 \times TaKaRa¹ Ex Taq PCR 缓冲液和 2 mM MgCl₂。每反应包含 0.5 μ l DNA 作为模板，或 PCR 级水作为阴性对照。使用 Nakamura 等（2013）设计的以下六种引物进行 PCR 反应：

Lb600-F: 5'-CTAGGAATGATTTATGCAATG-3'

Lc920-F: 5'-CATGACACTTATTATGTTGTTGCA-3'

Lh1150-F: 5'-CAATCGGATCTTCAATTTCCCTTC-3'

Ls1040-F: 5'-TTATTGGTGTAATTTAACC-3'

Lt780-F: 5'-TTATACACCAACTACTTTGTGAA-3'

L1250-R: 5'-GAATWGGRWAAATYACTTGACGTTG-3'

PCR 热循环参数为：94 $^{\circ}$ C 1 min 的变性步骤，继以 32 个循环（94 $^{\circ}$ C 30 s，55 $^{\circ}$ C 30 s 和 72 $^{\circ}$ C 2 min）。PCR 产物和 100 bp DNA 梯度一起通过 1.8% 琼脂糖凝胶电泳进行观察，以确定产物大小。

多重 *COI* PCR 可判为有效，如果：

- 阳性对照产生目标 *COI* 基因的预期大小的扩增产物
- 阴性提取对照和阴性扩增对照不产生目标 *COI* 基因的预期大小的扩增产物。

五种斑潜蝇预期的 PCR 产物大小分别为 649 bp（番茄斑潜蝇）、359 bp（葱斑潜蝇）、107 bp（南美斑潜蝇/豌豆潜叶蝇）、207 bp（美洲斑潜蝇），以及 461 bp（三叶斑潜蝇）。在所描述的电泳条件下，不可能确定分离开的 PCR 产物的确切片段大小，但相对分离值可用于对结果和目标种预期的种特异性引物图谱进行比较。可用具有目标种已知条带大小的阳性对照样品与检测样品一起电泳，以便更精确地对大小进行比较。

一个样品可被鉴定五个目标种中的一种，如果它产生该种斑潜蝇预期大小的单一 PCR 产物。本检测方法不能区分南美斑潜蝇和豌豆潜叶蝇。如果怀疑一个样品是南美斑潜蝇，可能需要做进一步的检测来确认它不是隐存种豌豆潜叶蝇(4.2.5 节)。本检测

方法系为日本的斑潜蝇鉴定而开发，其特异性同样限于该目的。因此，和线斑潜蝇及日本之外的三叶斑潜蝇种群的交叉反应并未得到验证。

4.2.5 隐存种豌豆潜叶蝇和南美斑潜蝇的鉴别

4.2.5.1 PCR-RFLP

Scheffer 等（2001）描述了一种用于鉴别南美斑潜蝇和豌豆潜叶蝇的 PCR-RFLP 检测方法，依据的是包括部分 *COI* 基因、亮氨酸 tRNA 和所有 *COII* 基因在内的某一个线粒体位点的变化。使用 Simon 等（1994）报道的引物进行 1 031 bp 区域的扩增：

C1-J-2797-F: 5'-CCTC-GACGTTATTTCAGATTACC-3'

TK-N-3785-R: 5' - GTTTAAGAGACCAGTACTTG-3'

PCR 的热循环参数为：92 °C 2 min 的变性步骤，继以 35 个循环（92 °C 1 min 30 s，50 °C 1 min 30 s 和 72 °C 2 min 30 s），以及 72 °C 7 min 的最终延伸步骤。PCR 扩增后，在 RFLP 分析前取 PCR 产物和 DNA 梯度一起通过电泳检查 PCR 成功与否。

COI-*COII* PCR 可判为有效，如果：

- 阳性对照产生目标 *COII* 基因的预期大小的扩增产物
- 阴性提取对照和阴性扩增对照不产生目标 *COII* 基因的预期大小的扩增产物。

根据生产商的说明，在单独的反应中分别用限制性内切酶 *SpeI* 和 *EcoRV* 对 PCR 产物进行酶切。随后，取酶切后的 PCR 产物和 100 bp DNA 梯度一起，用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳分离，以确定片段大小。

在所描述的电泳条件下，不可能确定分离开的酶切产物的确切片段大小，但相对分离值可用于对结果和目标种预期的 RFLP 图谱进行比较。可用具有已知片段大小和图谱的阳性对照样品与检测样品一起电泳，以便更精确地对大小进行比较。检测用的每个内切酶均应设置阳性对照，以确保按预期进行 DNA 酶切。只有当阳性对照产生目标基因预期大小的片段时，RFLP 检测才可判为有效。

南美斑潜蝇样品用 *SpeI* 酶切时产生一个未切割的（1 031 bp）片段，用 *EcoRV* 酶切时产生两个切割开的（175 bp 和 856 bp）片段。与此相对，豌豆潜叶蝇样品用 *SpeI* 酶切时产生两个切割开的（420 bp 和 611 bp）片段，用 *EcoRV* 酶切时产生一个未切割的（1 031 bp）片段。如果一个样品的整套片段图谱与这些已知的片段谱相匹配，则可基于本检测将样品鉴定为该种类。

4.2.5.2 DNA 序列比较

Scheffer (2000 年) 报道了可区分两个隐存种南美斑潜蝇和豌豆潜叶蝇的某个线粒体位点的 PCR 与 DNA 序列信息, 该位点包括 *COI* 和 *COII* 基因的部分序列。Scheffer 等 (2006) 随后发表的文献包括了 *COI* 基因 3'端的其他序列, 可用于研究物种的多样性。已用分子系统进化技术对这些数据做过分析, 但没有形成诊断规程。

4.2.6 DNA 条形码

正在努力研发动物 DNA 条形码研究所用的斑潜蝇 *COI* 基因 5'区的 DNA 序列记录的更全面的分类用资源 (例如, Bhuiya 等, 2011; Maharjan 等, 2014)。目前可从生命条形码数据库系统 (BOLD) 获取 31 种斑潜蝇 (包括四个目标种) 的 DNA 条形码记录 (<http://www.boldsystems.org>)。Q-bank (www.q-bank.eu) 也提供了其他的条形码和程序, 这是一个包括了从参考材料获取的序列的专业数据库。最近一项研究 (Maharjan 等, 2014) 包含了区分南美斑潜蝇、三叶斑潜蝇、美洲斑潜蝇、番茄斑潜蝇和葱斑潜蝇的详细信息。尽管在 DNA 测序资源方面已有这些进展, 但因为这些资源的解释规则尚未在科学文献中公开发表, 所以在此不对该方法如何用于斑潜蝇的种的鉴定做详细描述。应小心解释 DNA 条形码鉴定结果, 因为可能存在一些问题, 例如: (1) 拟寄生物可能优先进行 PCR 扩增或 *COI* 基因的核基因组线粒体拷贝 (即核基因组线粒体假基因(numt)); (2) 可能对密切相关的姊妹种 (即种复合体) 作出错误鉴定; 以及 (3) 序列数据库中参考标本的地理覆盖范围不同。

5. 记录

应按照 ISPM 27 (限定有害生物诊断规程) 2.5 节的要求保存记录和证据。

在其他缔约方可能受到诊断结果不利影响的情况下, 应将以下记录、证据和其他材料至少妥善保存一年, 以确保可追溯性: 经过防腐处理或用玻片封固的标本、不同分类学构造的照片、DNA 提取物和凝胶照片。

6. 获取进一步信息的联系点

有关本诊断规程的进一步信息可获自:

维多利亚州政府经济发展、就业、运输与资源部农业生物中心, 澳大利亚, Vic.
3083, 邦杜拉区 5 环路 (Mallik Malipatil;
电子邮箱: mallik.malipatil@ecodev.vic.gov.au; 电话: +61 3 9032 7302;
传真: +61 3 9032 7604)。

粮食与环境研究院（Fera）国家农业食品创新园区，英国，YO41 1LZ，约克 Sand Hutton（Dominique Collins；电子邮箱：dom.collins@fera.co.uk；电话：+44 1904 462215；传真：+44 1904 462111）。

国家植物保护组织（NPPOs）、区域植物保护组织（RPPOs）或植物检疫措施委员会（CPM）附属机构可通过国际植物保护公约秘书处（ippc@fao.org）提出对诊断规程进行修订的申请，此类申请会被转交给诊断规程技术小组（TPDP）。

7. 致谢

本规程初稿由 Mallik B. Malipatil（澳大利亚维多利亚州政府经济发展、就业、运输与资源部）、Dominique W. Collins（英国粮食与环境研究院）和 Mark Blacket（澳大利亚维多利亚州政府经济发展、就业、运输与资源部）起草，Norman Barr（美国农业部动植物检疫局）起草了有关分子检测的部分。

以下审稿人对本规程草案提出了意见：Stephen Gaimari（美国加利福尼亚食品与农业部）、Anthony Rice（澳大利亚农业与水资源部）、Ren Iwaizumi（日本农林渔业部横滨植物保护站）和 Ramona Vaitkevica（拉脱维亚国家植物保护局）。

8. 参考文献

本附件同时引用了国际植物检疫措施标准（ISPMs）。ISPMs 可从国际植检门户网站（IPP）获取：<https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/ispm>。

- Bhuiya, B.A., Amin, S. & Mazumdar, S.** 2011. First report of vegetable leafminer *Liriomyza sativae* Blanchard (Diptera: Agromyzidae) through DNA barcoding from Bangladesh. *Journal of Taxonomy and Biodiversity Research*, 5: 15–17.
- Blacket, M.J., Rice, A.D., Semeraro, L. & Malipatil, M.B.** 2015. DNA-based identifications reveal multiple introductions of the vegetable leafminer *Liriomyza sativae* (Diptera: Agromyzidae) into the Torres Strait Islands and Papua New Guinea. *Bulletin of Entomological Research*, doi: 10.1017/S0007485315000383
- Blanchard, E.E.** 1926. A dipterous leaf-miner on *Cineraria*, new to science. *Revista de la Sociedad Entomologica Argentina*, 1: 10–11.
- Boucher, S.** 2010. Family Agromyzidae (leaf-mining flies). In B.V. Brown, A. Borkent, J.M. Cumming, D.M. Wood, N.E. Woodley & M. Zumbado, eds. *Manual of Central American Diptera*, Vol. 2, pp. 1057–1071. Ottawa, National Research Council. 728 pp.
- CABI.** 2013. Crop protection compendium. Wallingford, UK, CABI. Available at <http://www.cabicompndium.org/cpc/home.asp> (last accessed 24 August 2014).
- Dempewolf, M.** 2001. Larvalmorphologie und Phylogenie der Agromyzidae (Diptera). University of Bielefeld, Germany (Dissertation)
- Dempewolf, M.** 2004. Arthropods of economic importance: Agromyzidae. Amsterdam, Netherlands Biodiversity Information Facility. Available at <http://wbd.etibioinformatics.nl/bis/agromyzidae.php> (last accessed 24 August 2014).

- Ellis, W.N. n.d.** Leafminers and plant galls of Europe. Available at <http://www.bladmineerders.nl/> (last accessed 24 August 2014) (in English and Dutch).
- EPPO** (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2005. *Liriomyza* spp. PM 7/53(1). *EPPO Bulletin*, 35: 335–344.
- Ferrar, P.A.** 1987. A guide to the breeding habits and immature stages of Diptera: Cyclorrhapha. *Entomograph*, 8: 1–907.
- Fisher, N., Ubaidillah, R., Reina, P. & La Salle, J.** 2005. *Liriomyza* parasitoids of Southeast Asia. Melbourne, Australia, CSIRO. Available at http://www.ento.csiro.au/science/Liriomyza_ver3/index.html (last accessed 24 August 2014).
- Frick, K.E.** 1951. *Liriomyza langei*, a new species of leaf-miner of economic importance in California. *Pan-Pacific Entomologist*, 21: 81–88.
- Griffiths, G.C.D.** 1962. Breeding leaf-mining flies and their parasites. *Entomologist's Record and Journal of Variation*, 74: 178–185, 203–206.
- Hennig, W.** 1958. Die Familien der Diptera Schizophora und ihre phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen. *Beiträge zur Entomologie*, 8: 505–688.
- Kox, L.F.F., van den Beld, H.E., Lindhout, B.I. & de Goffau, L.J.W.** 2005. Identification of economically important *Liriomyza* species by PCR-RFLP analysis. *EPPO Bulletin*, 35: 79–85.
- Lonsdale, O.** 2011. The *Liriomyza* (Agromyzidae: Schizophora: Diptera) of California. *Zootaxa*, 2850: 1–123.
- Maharjan, R., Oh, H-W. & Jung, C.** 2014. Morphological and genetic characteristics of *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard) (Diptera: Agromyzidae) infesting potato crops in Korea. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 17: 281–286.
- Malipatil, M.B.** 2007a. Chickpea leafminer (*Liriomyza cicerina*). Pest and Disease Image Library (PaDIL). Available at <http://www.padil.gov.au/pests-and-diseases/pest/main/136238> (last accessed 24 August 2014).
- Malipatil, M.B.** 2007b. Pea leafminer (*Liriomyza huidobrensis*). Pest and Disease Image Library (PaDIL), images and fact sheets. Available at <http://www.padil.gov.au/pests-and-diseases/pest/main/136237> (last accessed 24 August 2014).
- Malipatil, M.B.** 2007c. American serpentine leafminer (*Liriomyza trifolii*). Pest and Disease Image Library (PaDIL), images and fact sheets. Available at <http://www.padil.gov.au/pests-and-diseases/pest/main/136236> (last accessed 24 August 2014).
- Malipatil, M. & Ridland, P.** 2008. *Polyphagous agromyzid leafminers: Identifying polyphagous agromyzid leafminers (Diptera: Agromyzidae) threatening Australian primary industries*. Canberra, Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, Australian Government. Available at <http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/leafminers/> (last accessed 24 August 2014).
- Malipatil, M.B., Ridland, P.M., Rauf, A., Watung, J. & Kandowanko, D.** 2004. New records of *Liriomyza* Mik (Agromyzidae: Diptera) leafminers from Indonesia. *Formosan Entomologist*, 24: 287–292.
- Martinez, M. & Etienne, J.** 2002. Liste systématique et biogéographique des Agromyzidae (Diptera) de la région néotropicale. *Bollettino di Zoologia Agraria e di Bachicoltura (Serie II)*, 34: 25–52 (in French).
- Nakamura, S., Masuda, T., Mochizuki, A., Konishi, K., Tokumaru, S., Ueno, K. & Yamaguchi, T.** 2013. Primer design for identifying economically important *Liriomyza*

- species (Diptera: Agromyzidae) by multiplex PCR. *Molecular Ecology Resources*, 13: 96–102.
- Pape, T., Beuk, P. & Martinez, M., eds.** 2013. Fauna Europaea, version 2.6. Available at <http://www.faunaeur.org> (last accessed 24 August 2014).
- Parrella, M.P. & Bethke, J.A.** 1984. Biological studies of *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae) on chrysanthemum, aster and pea. *Journal of Economic Entomology*, 77: 342–345.
- Pitkin, B., Ellis, W., Plant, C. & Edmunds, R.** n.d. *The leaf and stem mines of British flies and other insects*. Available at <http://www.ukflymines.co.uk> (last accessed 24 August 2014).
- Scheffer, S.J.** 2000. Molecular evidence of cryptic species within the *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). *Journal of Economic Entomology*, 93: 1146–1151.
- Scheffer, S.J. & Lewis, M.L.** 2001. Two nuclear genes confirm mitochondrial evidence of cryptic species within *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 94: 648–653.
- Scheffer, S.J., Lewis, M.L. & Joshi, R.C.** 2006. DNA barcoding applied to invasive leafminers (Diptera: Agromyzidae) in the Philippines. *Annals of the Entomological Society of America*, 99: 204–210.
- Scheffer, S.J., Wijesekara, A., Visser, D. & Hallett, R.H.** 2001. Polymerase chain reaction-restriction fragment-length polymorphism method to distinguish *Liriomyza huidobrensis* from *L. langei*. *Journal of Economic Entomology*, 94: 1177–1182.
- Shiao, S.F.** 2004. Morphological diagnosis of six *Liriomyza* species (Diptera: Agromyzidae) of quarantine importance in Taiwan. *Applied Entomology and Zoology*, 39: 27–39.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi B., Liu, H. & Flook, P.** 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87: 651–701.
- Spencer, K.A.** 1965. A clarification of the status of *Liriomyza trifolii* (Burgess) and some related species (Diptera: Agromyzidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 67: 32–40.
- Spencer, K.A.** 1972. *Diptera, Agromyzidae*. Royal Entomological Society of London Handbooks for the Identification of British Insects, Vol. 10, Part 5(g). London, Royal Entomological Society of London. 136 pp.
- Spencer, K.A.** 1973. *Agromyzidae (Diptera) of economic importance*. Series Entomologica 9. The Hague, W. Junk. 418 pp.
- Spencer, K.A.** 1976. The Agromyzidae (Diptera) of Fennoscandia and Denmark. *Fauna Entomologica Scandinavica*, 5: parts 1 and 2.
- Spencer, K.A.** 1977. *A revision of the Australian Agromyzidae (Diptera)*. Western Australian Museum Special Publication No. 8. 255 pp.
- Spencer, K.A.** 1981. *A revisionary study of the leaf-mining flies (Agromyzidae) of California*. University of California, Division of Agricultural Sciences Publication 3273. 489 pp.
- Spencer, K.A.** 1987. Agromyzidae. In J.F. McAlpine, ed. *Manual of Nearctic Diptera*, Vol. 2. Monograph no. 28, pp. 675–1332. Ottawa, Research Branch Agriculture Canada.
- Spencer, K.A.** 1989. Leaf miners. In R.P. Kahn, ed. *Plant protection and quarantine*, Vol. 2, Selected pests and pathogens of quarantine significance, pp. 77–98. Boca Raton, FL, CRC Press.

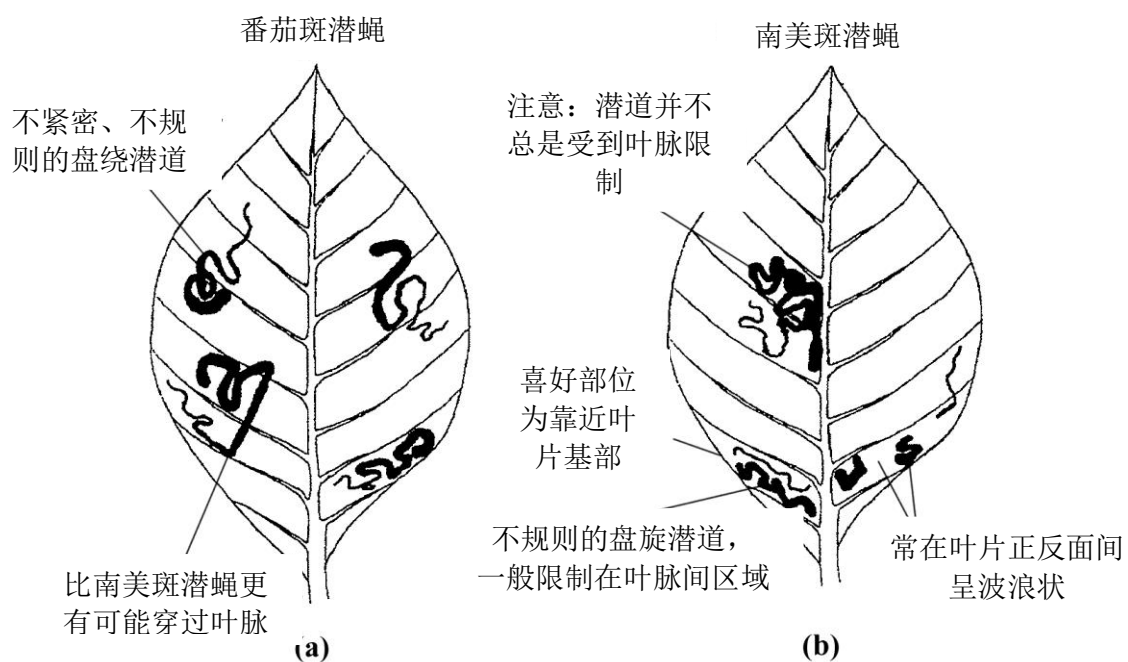
- Spencer, K.A.** 1990. *Host specialization in the world Agromyzidae (Diptera)*. Series Entomologica 45. Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publishers. 444 pp.
- Spencer, K.A.** 1992. *Flycatcher: Memoirs of an amateur entomologist*. The Hague, Netherlands, SPB Academic Publishing. 414 pp.
- Spencer, K.A. & Steyskal, G.C.** 1986. *Manual of the Agromyzidae (Diptera) of the United States*. Agriculture Handbook 638. Washington, DC, United States Department of Agriculture. 478 pp.
- Stehr, F.W.** 1991. *Immature Insects*. Vol.2 Kendall/Hunt Publishing company, USA. 974 pp
- Takano, S.I., Iwaizumi, R., Nakanishi, Y. & Someya, H.** 2008. Laboratory hybridization between the two clades of *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). *Applied Entomology and Zoology*, 43: 397–402.
- Takano, S.I., Iwaizumi, R., Nakanishi, Y., Someya, H. & Iwasaki, A.** 2005. Genetic differentiation and morphological comparison between two clades of *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard) (Diptera: Agromyzidae). *Research Bulletin of the Plant Protection Service, Japan*, 41: 43–46 (in Japanese with English summary).
- Yeates, D.K., Hastings, A., Hamilton, J.R., Colless, D.H., Lambkin, C.L., Bickel, D., McAlpine, D.K., Schneider, M.A., Daniels, G. & Cranston, P.** 2004. *Anatomical atlas of flies*. Melbourne, Australia, CSIRO. Available at <http://www.ento.csiro.au/biology/fly/fly.html> (last accessed 24 August 2014).

9. 图



图 1. 番茄斑潜蝇成虫

照片由英国环境、食品与农村事务部提供。



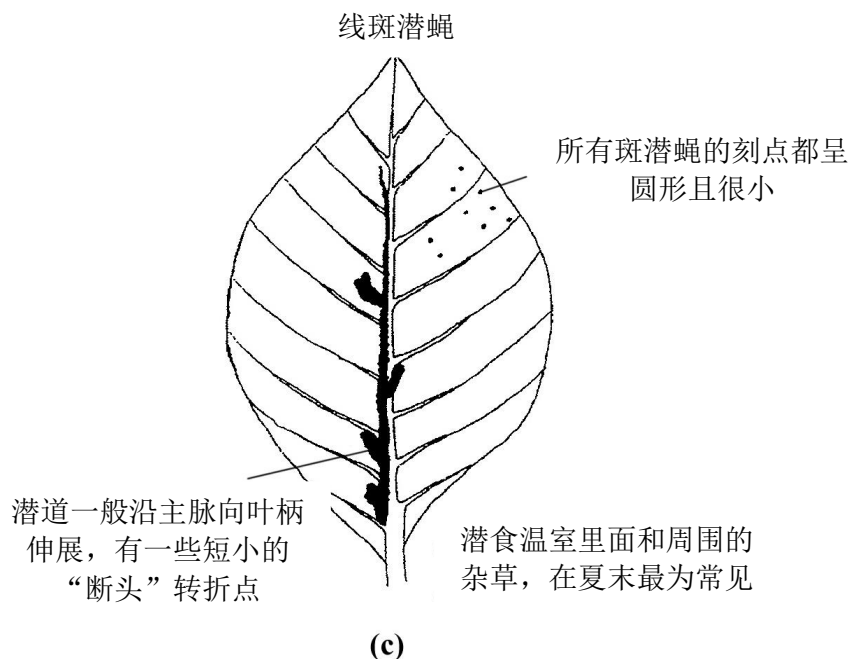


图 2. (a) 番茄斑潜蝇、(b) 南美斑潜蝇和 (c) 线斑潜蝇潜道的典型特征
来源：EPPO (2005)。

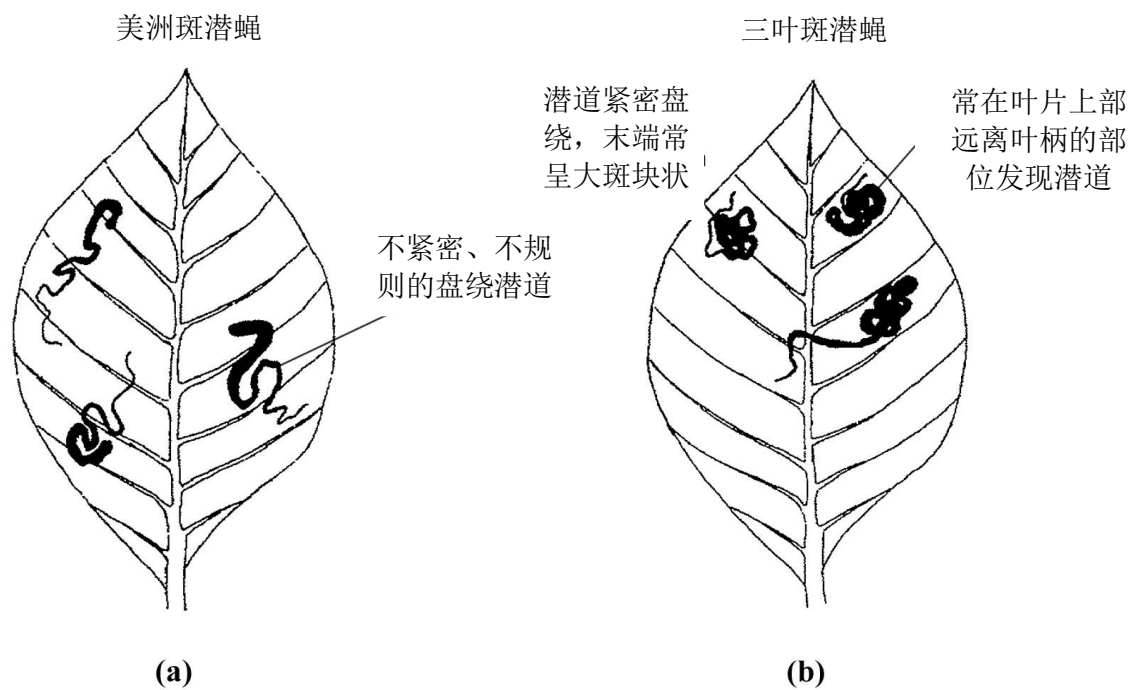


图 3 (a) 美洲斑潜蝇和 (b) 三叶斑潜蝇潜道的典型特征
来源：EPPO (2005)。

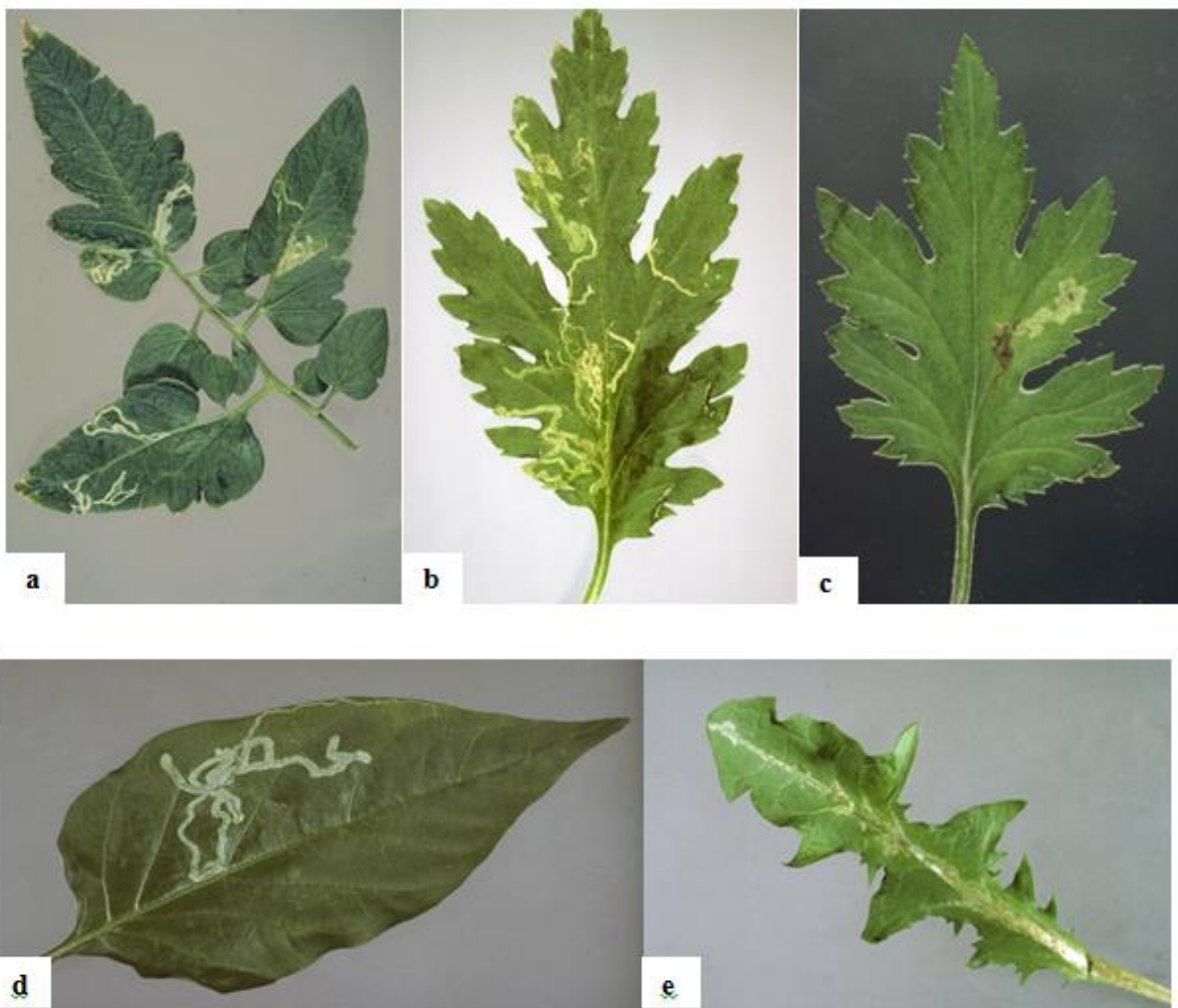


图 4. 斑潜蝇属的典型潜道：（a）番茄上的番茄斑潜蝇；（b）菊花上的南美斑潜蝇；（c）菊花上的三叶斑潜蝇；（d）胡椒上的美洲斑潜蝇；（e）未知寄主上的线斑潜蝇
照片由英国环境、食品与农村事务部提供。

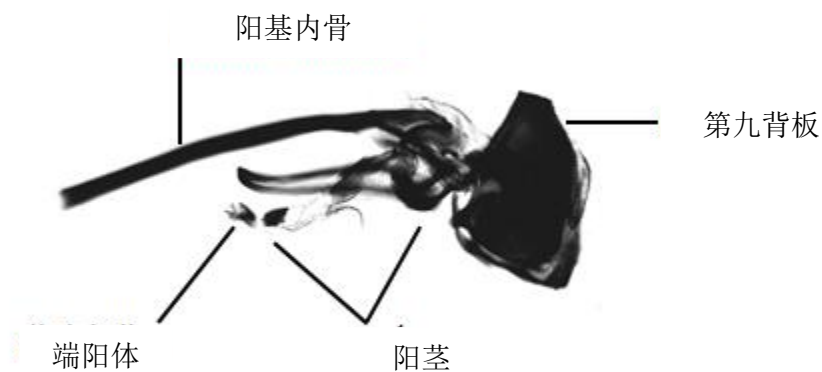


图 5. 南美斑潜蝇的雄虫外生殖器（侧面观）
照片由英国环境、食品与农村事务部提供。

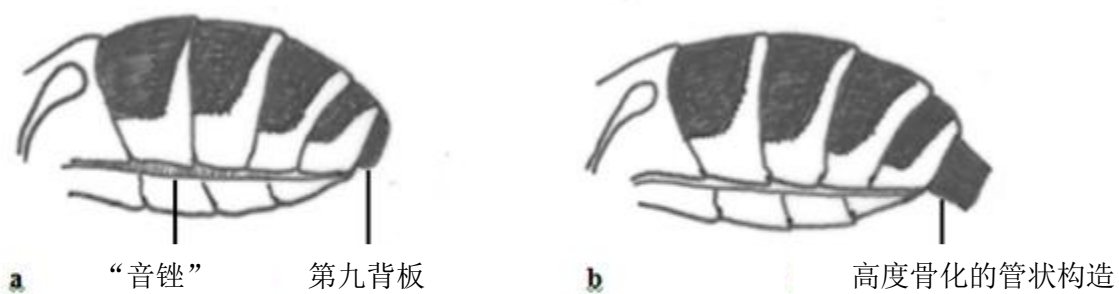
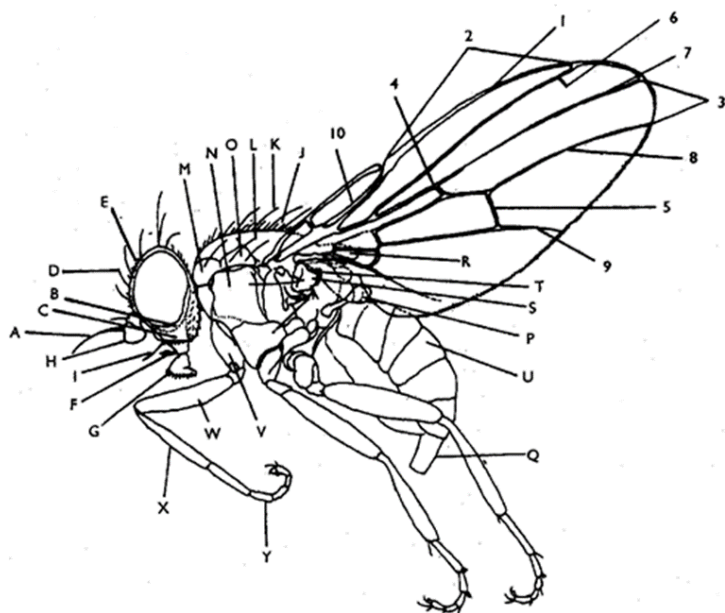


图 6. (a) 雄性和 (b) 雌性斑潜蝇的腹部
照片由英国环境、食品与农村事务部提供。



典型潜蝇的侧面观（仿 SASAKAWA）：A=触角芒，B=侧颜，C=颌，D=眶鬃，E=眶毛，F=下颚须，G=喙，H=触角第三节，I=鬃，J=中鬃，K=背中鬃，L=中胸背板，M=肩胛，N=中侧片区，O=背侧片区，P=平衡棒，Q=产卵器鞘，R=小盾片，S=腋瓣，T=缘缨，U=背片，V=足基节，W=腿节，X=胫节，Y=跗节。1=前缘脉，2=前缘脉第二段，3=前缘脉第四段，4=第一横脉，5=第二横脉，6=第一径脉（ R_1 ），7=第四、五合径脉（ R_{4+5} ），8=第一、二合中脉（ M_{1+2} ），9=第三、四合中脉（ M_{3+4} ），10=亚前缘脉

图 7. 潜蝇科成虫的形态

来源：Spencer (1973)。

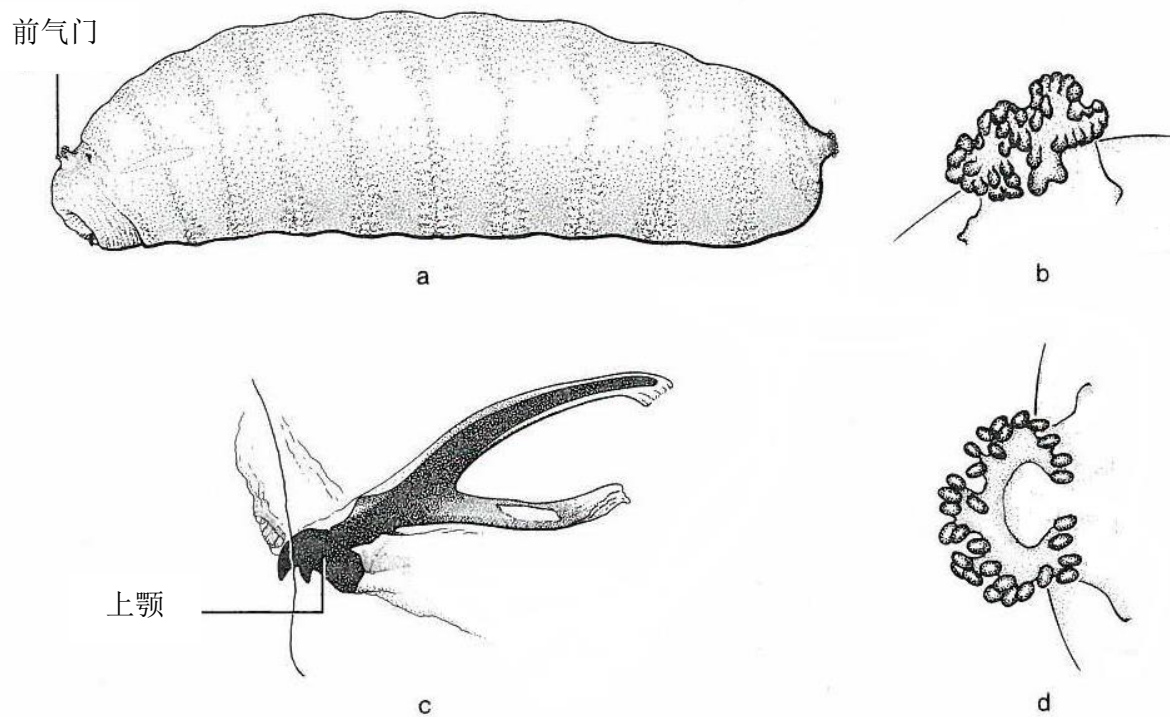


图 8. 潜蝇科幼虫 (*Phytomyza chelonei*) 的形态: (a) 侧面观; (b) 前气门;
(c) 头咽骨和 (d) 后气门
来源: Stehr (1991)。

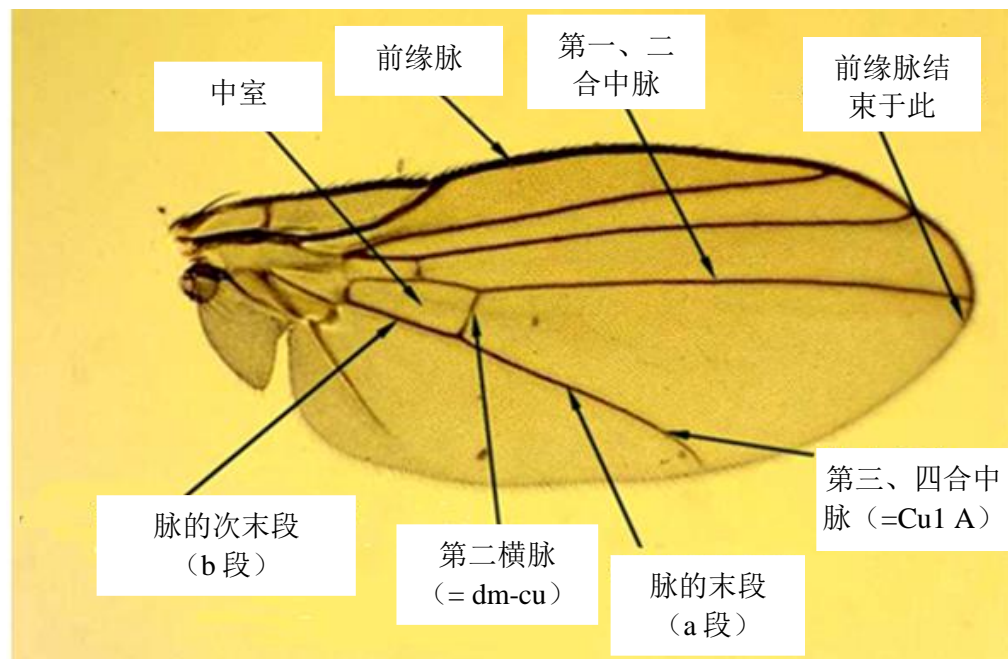


图 9. 斑潜蝇翅的脉序

照片由澳大利亚维多利亚州政府环境、土地、水与规划部提供。

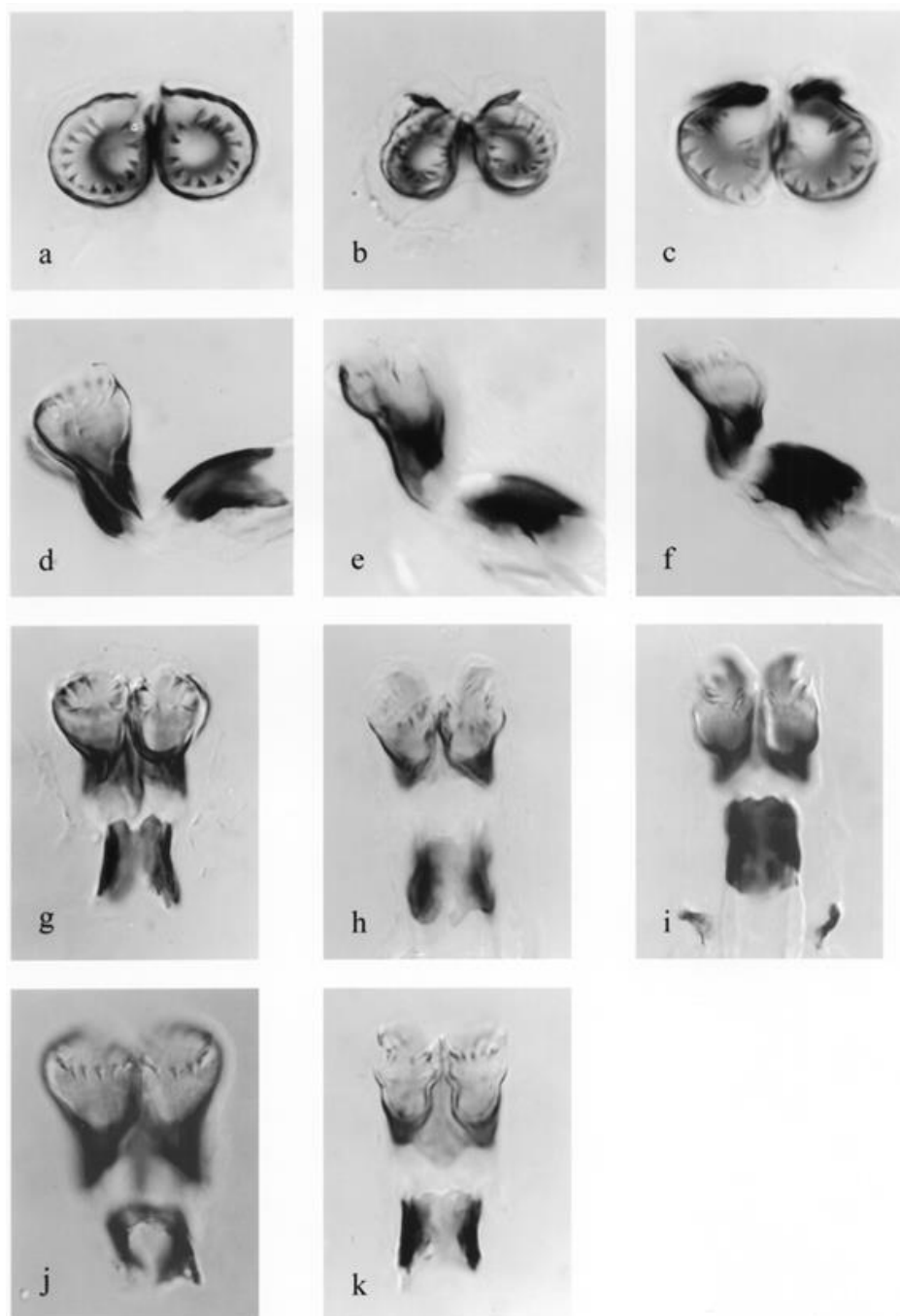


图 10. 斑潜蝇的端阳体（放大 400x）：（a）番茄斑潜蝇，前面观；（b）南美斑潜蝇，前面观；（c）线斑潜蝇，前面观；（d）番茄斑潜蝇，侧面观；（e）南美斑潜蝇，侧面观；（f）线斑潜蝇，侧面观；（g）番茄斑潜蝇，背腹观；（h）南美斑潜蝇，背腹观；（i）线斑潜蝇，背腹观；（j）番茄斑潜蝇，背腹观（与（g）在不同平面）和（k）南美斑潜蝇，背腹观（与（h）在不同平面）

照片由英国环境、食品与农村事务部提供。

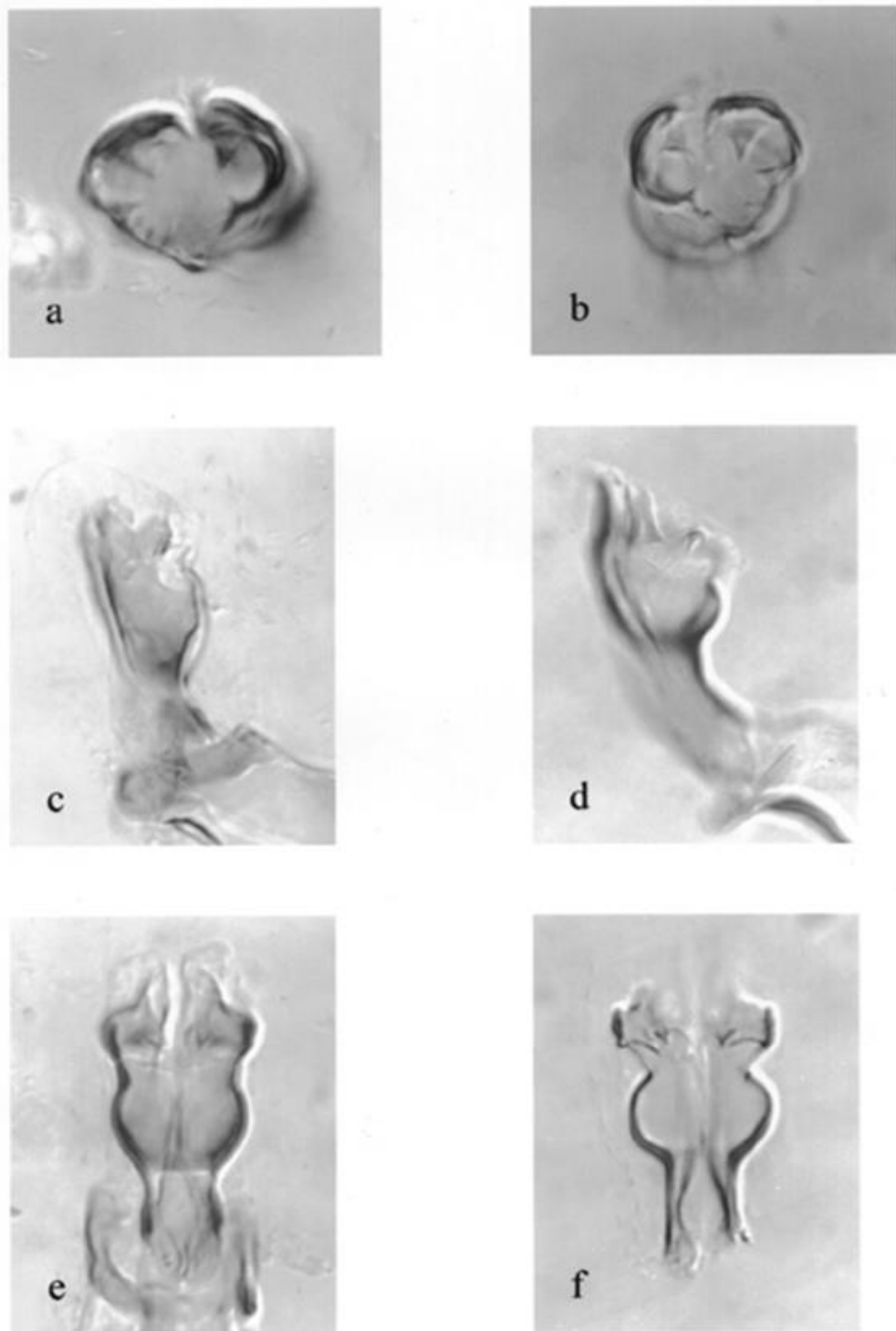


图 11. 斑潜蝇的端阳体（放大 400x）：（a）美洲斑潜蝇，前面观；（b）三叶斑潜蝇，前面观；（c）美洲斑潜蝇，侧面观；（d）三叶斑潜蝇，侧面观；（e）美洲斑潜蝇，背腹观和（f）三叶斑潜蝇，背腹观

照片由英国环境、食品与农村事务部提供。



图 12. 斑潜蝇的蛹

照片由澳大利亚维多利亚州政府环境、土地、水与规划部提供。



图 13. 番茄斑潜蝇的三龄幼虫

照片由英国环境、食品与农村事务部提供。

出台背景说明

这部分不属于本标准的正式内容。

2006 年 11 月，标准委增列最初的主题：斑潜蝇属（*Liriomyza* spp.）（2006-017）。

2007 年 3 月，植检委第二届会议在工作计划中增列主题（昆虫与螨类）。

2014 年 7 月，诊断规程技术小组审议并批准将草案提交标准委，由其通过电子决策论坛批准提交成员磋商。

2014 年 10 月，标准委通过电子决策批准提交成员磋商（2014_eSC_Nov_12）。

2015 年 2 月，成员磋商。

2016 年 2 月，诊断规程技术小组通过电子决策批准提交标准委，由其批准进入诊断规程通报期（2016_eTPDP_Feb_01）。

2016 年 3 月，标准委通过电子决策论坛批准进入为期 45 天的诊断规程通报期（2016_eSC_May_09）。

2016 年 8 月，标准委代表植检委批准诊断规程（未收到反对意见）。

ISPM 27 附件 16. 斑潜蝇属（*Liriomyza*）（2016）。罗马，国际植保公约，粮农组织。

2018 年 1 月，中文语言审核小组和联合国粮农组织翻译服务审议了这项 DP，国际植物保护公约秘书处合并了相应的修改。

2018 年 4 月，植物检疫措施委员会第 13 届会议（2018）指出中文语言审查小组已经审查了此附件。

发布背景最后更新：2018 年 10 月。