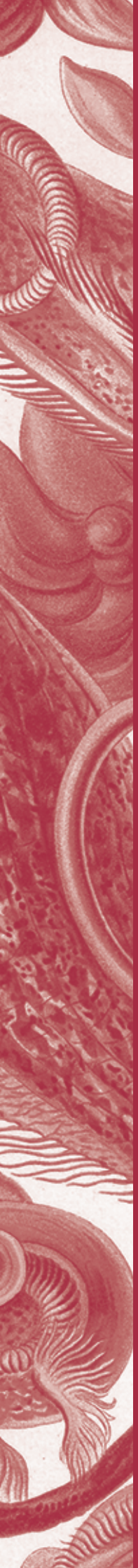


PROTOCOLOS DE DIAGNÓSTICO NORMAS INTERNACIONALES PARA MEDIDAS FITOSANITARIAS 27

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

Convención Internacional de Protección Fitosanitaria
Proteger de las plagas los recursos vegetales del mundo

NIMF 27
ANEXO 16

ESP

PD 16: Género *Liriomyza*

Producido por la Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF)

Esta página se ha dejado en blanco intencionalmente

Este protocolo de diagnóstico fue adoptado por el Comité de Normas, en nombre de la Comisión de Medidas Fitosanitarias, en agosto de 2016.

Este anexo es una parte prescriptiva de la NIMF 27.

NIMF 27
Protocolos de diagnóstico para plagas reglamentadas

PD 16: Género *Liriomyza*

Adoptado en 2016; publicado en 2016

ÍNDICE

1. Información sobre la plaga 3
2. Información taxonómica 4
3. Detección 5
   3.1 Recogida y conservación de los especímenes 6
   3.1.1 Recogida de adultos 6
   3.1.2 Recogida de etapas de desarrollo inmaduras 7
4. Identificación 7
   4.1 Identificación morfológica de los adultos de *Liriomyza* 8
   4.1.1 Preparación de la genitalia de los machos adultos de *Liriomyza* para el examen microscópico 8
   4.1.1.1 Determinación del sexo de las moscas 8
   4.1.1.2 Preparación del distifalo del macho para su examen 8
   4.1.2 Identificación de la familia Agromyzidae 9
   4.1.3 Identificación del género *Liriomyza* 9
   4.1.4 Identificación de las especies de *Liriomyza* 10
   4.1.4.1 Caracteres morfológicos de los adultos de *Liriomyza* spp. 10
   4.1.4.2 Estructura del distifalo de los machos adultos de *Liriomyza* spp. 13
   4.1.4.3 Características morfológicas de las etapas inmaduras de las cuatro especies objetivo de *Liriomyza* 14
   4.2 Identificación molecular de las especies de *Liriomyza* 14
   4.2.1 Controles para las pruebas moleculares 15
   4.2.2 Extracción de ADN 15
   4.2.3 Identificación de las cuatro especies objetivo mediante PCR-RFLP 15
   4.2.3.1 Amplificación del gen *COII* 16
   4.2.3.2 Digestión mediante enzimas de restricción y separación de los productos 16
   4.2.4 Cebadores de PCR específicos para la identificación de las cuatro especies objetivo 17
   4.2.4.1 Amplificación del gen *COI* 17
   4.2.5 Diferenciación de las especies crípticas *L. langei* y *L. huidobrensis* 18
   4.2.5.1 PCR-RFLP 18

4.2.5.2 Comparación de secuencias de ADN 19
4.2.6 Código de barras de ADN 19
5. Registros 20
6. Puntos de contacto para información adicional 20
7. Agradecimientos 20
8. Referencias 21
9. Figuras 24

1. Información sobre la plaga

Agromyzidae es una familia de pequeñas moscas cuyas larvas se alimentan de tejidos internos de plantas, a menudo como minadoras o perforadoras de hojas y tallos. La mayoría de las especies de agromícidos infestan específicamente a un hospedante determinado o se restringen a un pequeño grupo de plantas emparentadas entre sí. Sin embargo, unas pocas especies muy polífagas se han convertido en plagas agrícolas y hortícolas en muchos lugares del mundo. Es el caso de cuatro especies de Liriomyza incluidas en la legislación sobre cuarentena vegetal de diversos países: *L. bryoniae*, *L. huidobrensis*, *L. sativae* y *L. trifolii*, todas ellas plagas polífagas tanto de cultivos ornamentales como hortícolas. En el presente protocolo, la identificación hasta el nivel de la especie se limita a estas cuatro especies.

El género *Liriomyza* está presente sobre todo en la zona templada del hemisferio norte, pero hay también especies en las regiones afrotropical, neotropical y oriental. En las más de 300 especies de *Liriomyza*, las moscas adultas tienen un aspecto muy similar: todas son pequeñas (1–3 mm de longitud) y, en vista superior, son en buena medida negras con frons (frente) y escutelo (escudete) amarillos en la mayoría de las especies (Figura 1). Por lo tanto, la diferenciación de las especies del género puede resultar difícil. Además, para identificar las cuatro especies de interés cuarentenario, el especialista responsable del diagnóstico no solo debe distinguir entre estas cuatro especies, sino que también debe distinguirlas de otras especies de *Liriomyza* pertinentes de la fauna local.

L. bryoniae es, fundamentalmente, una especie paleártica, de la que hay registros en toda Europa y Asia, así como en Egipto y Marruecos, en África del Norte (CABI, 2013). Es muy polífaga y se ha registrado su presencia en 16 familias de plantas (Spencer, 1990). Es una plaga del tomate, las cucurbitáceas (en particular del melón, la sandía y el pepino) y de la lechuga, el frijol (judía) y el altramuz cultivados en invernadero (Spencer, 1989, 1990).

L. huidobrensis, que se considera originaria de América del Sur, se ha dispersado actualmente por gran parte del mundo, en particular por partes de América del Norte, Europa, África, Asia y el Pacífico (Lonsdale, 2011; CABI, 2013). Sin embargo, la definición taxonómica de la especie se ha modificado recientemente y se ha separado en dos especies crípticas —*L. huidobrensis* y *L. langei*— y existe incertidumbre en cuanto a la delimitación precisa de sus distribuciones relativas. Actualmente, *L. langei* se ha confirmado solamente en los Estados Unidos y es muy probable que todas las poblaciones invasoras de fuera de los Estados Unidos correspondan a la especie ahora definida taxonómicamente como *L. huidobrensis* (Scheffer y Lewis, 2001; Scheffer *et al.*, 2001; Takano *et al.*, 2008; Lonsdale, 2011). *L. huidobrensis* es muy polífaga y se ha registrado su presencia en 14 familias de plantas (Spencer, 1990). Los cultivos de más importancia económica a los que infesta son la remolacha azucarera, la espinaca, el guisante (arveja), el frijol (judía), la patata (papa) y plantas ornamentales (sobre todo del género *Gypsophila* y rara vez el clavel y el crisantemo) (Spencer, 1989).

L. sativae es originaria de América del Norte, Central y del Sur y actualmente se ha dispersado a muchos lugares de Asia, África y el Pacífico, pero no a Europa ni a Australia (Lonsdale, 2011; CABI, 2013). Sin embargo, es probable que las notas sobre la distribución de *L. sativae* estén incompletas, ya que hay datos que indican que el área de distribución de la especie continúa ampliándose rápidamente. Esta especie, también muy polífaga, es plaga de muchas hortalizas y flores cultivadas (Spencer, 1973, 1990). Se ha registrado su presencia en nueve familias de plantas, aunque sus principales hospedantes son las familias Cucurbitaceae, Fabaceae y Solanaceae (Spencer, 1973, 1990).

L. trifolii, también originaria de América del Norte, Central y del Sur, se ha dispersado a grandes zonas de Europa, África, Asia y el Pacífico, muy probablemente como consecuencia del comercio de esquejes de crisantemo (Martinez y Etienne, 2002; Lonsdale, 2011; CABI, 2013). Es muy polífaga y se ha registrado su presencia en 25 familias de plantas (Spencer, 1990). Los cultivos de mayor importancia económica a los que infesta son el frijol (judía), el apio, el crisantemo, el pepino, las gerberas, la *Gypsophila*, la lechuga, la cebolla, la papa (patata) y el tomate (Spencer, 1989).

En el protocolo de diagnóstico se ha incluido una última (quinta) especie, *L. strigata*, debido a que está emparentada estrechamente tanto con *L. bryoniae* como con *L. huidobrensis* y, por lo tanto, el especialista responsable del diagnóstico debe ser capaz de descartarla para identificar con certeza las cuatro especies cuarentenarias. *L. strigata* es una especie euroasiática (Pitkin *et al.* [s. f.], citando a Spencer [1976], Dempewolf [2001], Ellis [2013] y Pape *et al.* [2013]). Aunque los límites orientales no están definidos claramente, su área de distribución se extiende más allá de los montes Urales (Spencer, 1976) y se ha registrado su presencia, con dudas, en Asia sudoriental (Dempewolf, 2004). Es muy polífaga, habiéndose registrado su presencia en 29 familias de plantas de todo el mundo (Spencer, 1990).

2. Información taxonómica

Nombre: *Liriomyza* Mik, 1894

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

Posición taxonómica: Insecta, Diptera, Agromyzidae, Phytomyzinae

Nombre: *Liriomyza bryoniae* (Kaltenbach, 1858)

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

Nombres comunes en español: minador del tomate, minador de hojas, minador de la hoja, mosca minadora, submarino

Nombre: *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard, 1926)

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

La relación taxonómica entre *L. huidobrensis* (Blanchard) y *L. langei* Frick es compleja. *L. huidobrensis* fue descrita originalmente por Blanchard (1926) a partir de especímenes capturados en Cineraria en la Argentina. Frick (1951) describió *L. langei* de California como una especie que, según señaló, era principalmente una plaga del guisante (arveja), aunque también había producido daños en *Aster*. Luego, en 1973, Spencer consideró que las dos especies eran sinónimas, ya que eran indistinguibles morfológicamente (y, de hecho, siguen siéndolo). Las dos especies fueron separadas formalmente en dos especies crípticas (Lonsdale, 2011) tras el estudio de sus secuencias de ADN mitocondrial y nuclear (Scheffer, 2000; Scheffer y Lewis, 2001) y con el respaldo de experimentos posteriores de cría (Takano *et al.*, 2008). El nombre *L. langei* Frick se rescató para la especie críptica de California, y el nombre *L. huidobrensis* (Blanchard) se aplicó a la especie críptica de América del Sur y Central.

Lonsdale (2011) intentó esbozar unos caracteres morfológicos de diagnóstico que sirvieran para diferenciar la "mayoría" de los especímenes de las dos especies, pero comprobó que los caracteres eran "sutiles y a veces se solapaban", por lo que recomendó basar la identificación en datos moleculares siempre que fuera posible. Scheffer y sus colaboradores consideran que las áreas de distribución de las dos especies no se solapan (aunque Lonsdale [2011] registró *L. huidobrensis* en California, una vez en 1968 y otra en 2008, afirma que se desconoce si las poblaciones se establecieron) y que todas las poblaciones invasoras que habían estudiado eran de *L. huidobrensis* definida como tal (Scheffer y Lewis, 2001; Scheffer *et al.*, 2001). Esto significa que debe considerarse que las menciones de especímenes de California en artículos anteriores a los de Scheffer se refieren, con casi total certeza, a *L. langei*. *L. langei* es predominantemente una especie californiana, aunque ha sido introducida, según parece, en Hawái, Oregón y Washington; las poblaciones halladas en Florida, Utah y Virginia a mediados de la década de 1990 no se establecieron (Lonsdale, 2011). En México solamente se ha confirmado *L. huidobrensis* (Lonsdale, 2011), pero Takano *et al.* (2005) informaron de que se interceptaron especímenes de *L. langei* (descrito como el clado californiano) en una inspección en el Japón sobre hortalizas frescas procedentes de México.

Nombres comunes en español: minador sudamericano del guisante, minadora de los crisantemos, minador serpentina, minador de la papa, minador de las chacras, minador de la hoja, minador de hojas, mosca minadora, submarino

Nombre: *Liriomyza sativae* Blanchard, 1938

Sinónimos: *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 y de la Cruz, 1981.

Nombres comunes en español: minador de las hortalizas, minadora de los crisantemos, minador del frijol, minador serpentina, minador de la hoja, minador de hojas, mosca minadora, minador de los vegetales, submarino

Nombre: *Liriomyza trifolii* (Burgess, 1880)

Sinónimos: *Agromyza phaseolunulata* Frost, 1943; *Liriomyza alliovora* Frick, 1955

Nombres comunes en español: minador americano de las hojas, minador pequeño del frijol, minador común, mosca minadora, minador de la hoja, minador de hojas, minador de las hojas, submarino

3. Detección

Las perforaciones de alimentación y las galerías (o minas) suelen ser los primeros signos, y los más obvios, de la presencia de *Liriomyza.* Aunque los funcionarios encargados de la cuarentena deberían poder percibir claramente las galerías completamente formadas, los signos tempranos de la infestación son mucho menos obvios y se pasan por alto con facilidad (Spencer, 1989). Las galerías permanecen intactas y prácticamente sin variación durante semanas. La forma de las galerías se suele considerar una guía fiable para la identificación de las especies de agromícidos (dado que muchas de ellas son específicas con respecto al hospedante). No obstante, en el caso de las especies de plagas polífagas influyen en la forma de las galerías el hospedante, el estado físico y fisiológico de cada hoja y el número de larvas que minan una misma hoja. Dada esta mayor variabilidad, la identificación basada exclusivamente en la forma de las galerías debe interpretarse con cautela (EPPO, 2005). En las figuras 2 a 4 se proporcionan ejemplos de formas de las galerías de las cuatro especies cuarentenarias y de *L. strigata*.

Las hembras de mosca perforan las hojas de las plantas hospedantes con el ovipositor y producen unas lesiones que sirven como lugares de alimentación (de las moscas hembras y también de los machos) o de oviposición. Las perforaciones de alimentación de las especies de *Liriomyza* son redondeadas, habitualmente de 0,2 mm de diámetro, y se perciben como puntos blancos en el haz de la hoja. Las perforaciones de oviposición suelen ser más pequeñas (0,05 mm) y con una forma circular más uniforme. Las perforaciones de alimentación que realizan las especies de plagas de agromícidos polífagas *Chromatomyia horticola* y *Chromatomyia syngenesiae* son claramente más grandes y ovaladas que las que producen las moscas *Liriomyza*. No hay diferencias en el aspecto de las perforaciones de alimentación y de oviposición de las distintas especies de *Liriomyza* y no es posible identificar las especies basándose en el patrón de distribución de las perforaciones en la hoja. Las perforaciones de alimentación destruyen un gran número de células y son claramente visibles a simple vista (EPPO, 2005).

Las larvas se alimentan sobre todo del haz de la hoja, minando a través del clorénquima en empalizada. Las galerías suelen ser blanquecinas, con rastros de deyecciones que forman líneas negras discontinuas a lo largo de la hoja. Las repetidas circunvoluciones en una misma zona pequeña de la hoja generan a menudo un cambio de color de la galería, siendo habitual la aparición de áreas negras húmedas o marrones secas como resultado de las reacciones al minador de las hojas inducidas en la planta (EPPO, 2005).

Existen tres estadios larvarios y todos ellos se alimentan dentro de las hojas. Las larvas se alimentan predominantemente en la planta en la que se han depositado los huevos. Las larvas de *Liriomyza spp*. abandonan la hoja cuando están preparadas para pupar (Parrella y Bethke, 1984) y el orificio de salida tiene una forma característica de hendidura semicircular, a diferencia de las larvas de *C. horticola* y *C. syngenesiae* que pupan dentro de la hoja, en el extremo final de la galería larvaria, y suelen proyectar sus espiráculos anteriores hacia el exterior por el envés de la hoja. Por tanto, podrán encontrarse puparios de *Liriomyza* en los restos de cosechas, en el suelo o, a veces, sobre la superficie foliar.

Las distintas etapas de desarrollo de las especies se podrán encontrar en distintos lugares de la planta o de sus alrededores:

- huevos: insertados justo por debajo de la superficie foliar
- larvas: dentro de galerías en las hojas
- pupas: en los restos de cosechas, en el suelo o, a veces, en la superficie foliar
- adultos: volando libres o en la superficie de las hojas cuando realizan perforaciones de alimentación o de oviposición.

3.1 Recogida y conservación de los especímenes

Los especímenes de *Liriomyza* se pueden recoger en etapas de desarrollo inmaduras, presentes en muestras de hojas con galerías, o en su estadio adulto. Para confirmar la identificación de la especie se necesitan machos adultos, ya que los caracteres morfológicos que se utilizan para el diagnóstico se basan en la genitalia de los machos. Las hembras adultas a menudo solo son identificables con certeza hasta el nivel del género. La recogida de múltiples especímenes de una planta o procedencia aumentará la probabilidad de obtener moscas macho, lo cual es importante a no ser que se vayan a realizar pruebas moleculares para el diagnóstico de etapas de desarrollo inmaduras.

3.1.1 Recogida de adultos

Las moscas adultas normalmente se encuentran en el follaje y se pueden recoger a mano o barrerse del follaje con una red de mano para introducirlas en frascos de vidrio, o bien pueden recogerse con un muestreador de succión. Otra opción es recogerlas con trampas adhesivas amarillas, sobre todo en los invernaderos. Sin embargo, el método más práctico y fiable para obtener especímenes de minador de las hojas de especies como las del género *Liriomyza* es recoger hojas con galerías que contengan larvas vivas. Las larvas se pueden introducir en un frasco grande para criarlas en el laboratorio hasta su transformación en moscas adultas. Las técnicas de cría de agromícidos se describen en Griffiths (1962) y en Fisher *et al.* (2005). 2005.

Los adultos y las larvas se pueden sumergir en etanol al 70% y almacenarse indefinidamente, aunque perderán su color gradualmente. Los frascos con especímenes en etanol deberían cerrarse herméticamente para prevenir fugas y embalarse con material de acolchado en una caja resistente. También es posible almacenar los especímenes adultos en seco, por ejemplo, fijados con alfileres.

Los especímenes que se utilizarán en pruebas de diagnóstico moleculares deberían matarse y conservarse en etanol al 96 %–100 %, almacenarse congelados (a aproximadamente –20 °C o –4,0 °C) o conservarse en tarjetas FTA (Whatman)1 (Blacket et al., 2015).

3.1.2 Recogida de etapas de desarrollo inmaduras

Si la finalidad es recoger y conservar muestras vegetales, se deberían seleccionar hojas con perforaciones o galerías que se sospecha que son de alimentación y colocarlas entre hojas de periódico para que se sequen lentamente.

Las hojas con galerías ocupadas por larvas que se quieran destinar a la cría en el laboratorio de otras etapas de desarrollo, en particular de adultos, para su identificación, se deben empaquetar en papel tisú de laboratorio ligeramente humedecido, pero no excesivamente empapado, y enviarse por correo en bolsas acolchadas y selladas. En el laboratorio, las hojas con galerías que contienen larvas vivas se pueden disponer en placas de Petri selladas herméticamente, en las que se introducen porciones de papel de filtro humedecido, y las placas se almacenan en una incubadora a aproximadamente 23 °C (vigilando cada dos o tres días para retirar las hojas en las que hayan crecido hongos, bacterias, etc.).

4. Identificación

Solo los especímenes macho adultos de minador de las hojas se pueden identificar mediante examen morfológico, dado que no hay claves adecuadas para la identificación hasta el nivel de la especie de las hembras adultas, ni de los huevos, larvas o pupas. Los machos de mosca adultos se pueden identificar examinando sus caracteres morfológicos, en concreto, la genitalia. Los caracteres morfológicos de la genitalia de los machos se examinan con un microscopio de gran resolución (con un aumento de aproximadamente 100×). La aplicación de este protocolo con preparaciones de buena calidad debería permitir identificar con certeza, exclusivamente mediante examen morfológico, los adultos de las cuatro especies cuarentenarias de *Liriomyza* (con la excepción de *L. huidobrensis* y *L. langei* por los motivos expuestos en la Sección 1).

Para las pruebas de identificación moleculares puede utilizarse cualquiera de las etapas de desarrollo, incluidos los estadios inmaduros en los que no es posible la identificación morfológica hasta el nivel de la especie. Además, en los casos en que se cuente con especímenes adultos atípicos o dañados, las pruebas moleculares podrán proporcionar más información de interés sobre su identidad. Sin embargo, la especificidad de las pruebas moleculares podrá ser limitada, ya que se han desarrollado con una finalidad y se han evaluado con un número limitado de especies y utilizando muestras de regiones geográficas distintas. Por lo tanto, los resultados de las pruebas moleculares deben interpretarse con precaución.

4.1 Identificación morfológica de los adultos de *Liriomyza*

Para identificar con certeza cualquiera de las cuatro especies objetivo de *Liriomyza* es necesario examinar la genitalia de los machos (en concreto, el distifalo: Figura 5). A continuación se describe brevemente un método adecuado de preparación de los especímenes (basado en Malipatil y Ridland, 2008). En Spencer (1981, 1992), Spencer y Steyskal (1986) y EPPO (2005) se aportan otros pormenores o variaciones del método. Para confirmar la identificación de la especie, los datos de la estructura del distifalo deberían compararse con los caracteres de la morfología externa (Cuadro 1).

4.1.1 Preparación de la genitalia de los machos adultos de *Liriomyza* para el examen microscópico

4.1.1.1 Determinación del sexo de las moscas

En los machos, los lóbulos del epandrio, que son oscuros y pubescentes y no están tan esclerotizados como el tubo de la hembra, se curvan alrededor del postabdomen y hacia abajo, de la parte dorsal hacia la ventral (Figura 6a). Entre los lóbulos se observa una abertura longitudinal, triangular cuando está completamente abierta, a través de la cual puede observarse el resto de la genitalia del macho. Los lóbulos apenas se extienden más allá del último terguito. En las hembras, los segmentos abdominales posteriores al sexto forman un tubo negro fuertemente esclerotizado que se extiende por detrás del terguito 6 (Figura 6b), con una abertura circular al final del tubo, visible en la vista posterior. El terguito 6 cubre la mitad basal del tubo en vista superior, aunque es visible en las vistas lateral y ventral.

4.1.1.2 Preparación del distifalo del macho para su examen

Para permitir la limpieza de los tejidos y la observación, el abdomen debería retirarse del cuerpo. El abdomen se separa con cuidado del resto del cuerpo de la mosca con unas agujas de disección finas (que se pueden fabricar pegando el extremo romo de microalfileres puntiagudos al extremo de una cerilla de madera, haciendo primero un agujero poco profundo con un alfiler normal). Para limpiar los tejidos, el abdomen se puede hervir en una solución al 10 % de hidróxido de potasio (KOH) o hidróxido de sodio (NaOH) durante 2–4 min, o bien puede dejarse en KOH o NaOH frío al 10 % de un día para otro. Tras transferirlo a un baño de agua destilada para neutralizar el KOH o el NaOH, el abdomen tratado está preparado para transferirlo a una gota de glicerol sobre un portaobjetos con cavidad.

Con ayuda de una lupa binocular y de las agujas de disección finas se diseca cuidadosamente el complejo genital de las membranas que lo rodean, la cutícula y la musculatura asociada. El complejo genital se coloca con las agujas de disección finas para su observación en vista lateral con un microscopio compuesto, con un aumento de hasta 400×. Luego se recoloca el complejo genital para la observación del distifalo en vista ventral, con un aumento de 400×, sin cubreobjetos. El distifalo se debe observar en varias posiciones (p. ej., lateral, dorsal y ventral), para lo cual es necesario recolocarlo con menos aumentos.

Para realizar preparaciones semipermanentes (p. ej., para las identificaciones sistemáticas), el complejo genital se debería transferir a una gota de glicerol sobre un portaobjetos plano limpio. La genitalia se sumerge suavemente en el líquido de montaje y se cubre cuidadosamente con un cubreobjetos circular para dispersar el líquido de manera uniforme.

Si se necesitan preparaciones permanentes, el abdomen se debería limpiar en KOH y neutralizarse en ácido acético glacial frío de la forma antes descrita. A continuación, el abdomen puede transferirse a etanol al 70 % y, con ayuda de una lupa binocular y de las agujas de disección finas, se diseca cuidadosamente el complejo genital de las membranas que lo rodean, la cutícula y la musculatura asociada. La genitalia disecada se debería transferir primero a etanol puro durante 2–4 min y luego a esencia de clavo (en la cual, si es necesario, puede almacenarse indefinidamente). La genitalia se transfiere a etanol al 70 % (durante aproximadamente 10 min), luego a etanol al 95 % (durante aproximadamente 10 min) y, finalmente, a esencia de clavo (durante al menos 5 min). A continuación, la genitalia se puede montar permanentemente

sobre un portaobjetos en una gota de bálsamo del Canadá bajo un cubreobjetos. Todas las preparaciones deben etiquetarse con la información pertinente en la que detalle el lugar de obtención, el hospedante, la fecha de obtención, el nombre del colector (si se conoce), el nombre de la especie, el nombre del identificador y un código que permita vincular la muestra con el resto del espécimen.

El resto del espécimen de mosca se debería montar en una tarjeta triangular con una etiqueta adecuada que permita vincularlo con su genitalia montada en portaobjetos.

4.1.2 Identificación de la familia Agromyzidae

La familia *Agromyzidae* engloba unas 2 500 especies distribuidas por todo el mundo (Spencer, 1989, 1990). Spencer (1972, 1973, 1987), Dempewolf (2004) y Boucher (2010) han publicado descripciones detalladas de la morfología de los agromícidos.

En el presente documento se utiliza la nomenclatura morfológica descrita en Yeates *et al.* (2004); un recurso en línea en el que se muestran ilustraciones claras de la anatomía de una mosca *Acalyptratae* típica (como las *Agromyzidae*).

La siguiente combinación de caracteres define a la familia *Agromyzidae* (Hennig, 1958; Spencer, 1987; Boucher 2010) (Figura 7):

- pequeño tamaño, de 1 a 6 mm, pero habitualmente de 1 a 3 mm
- presencia de vibrisas
- presencia de una a siete setas frontales
- ala con discontinuidad costal en el ápice de la vena subcostal (Sc)
- ala con la celda cubital pequeña; venas alares A_1+CuA_2 que no alcanzan el margen del ala
- escleritos pregenitales del macho con terguitos 6-8 fusionados en un complejo, con solo dos espiráculos entre el terguito 5 y el segmento genital
- la parte anterior del séptimo segmento abdominal de la hembra forma un oviscapto.

Generalmente, las larvas (Figura 8a) son cilíndricas, más estrechas en su parte anterior, con sendas proyecciones en las que se ubican los espiráculos anterior y posterior (figuras 8b y d), el primero situado en la superficie dorsal del protórax y el segundo en la parte trasera, orientados hacia atrás. Las larvas tienen también piezas bucales fuertemente esclerotizadas; las mandíbulas, cuyo eje longitudinal está aproximadamente en ángulo recto en relación con el resto del esqueleto cefalofaríngeo (Figura 8c), normalmente poseen dos o más pares de dientes del mismo tamaño dirigidos hacia delante, con los cornos ventrales (“astas” pareadas dirigidas hacia atrás) normalmente más cortos que los dorsales.

En la práctica, los agromícidos son reconocibles porque sus larvas se alimentan del tejido vivo de las plantas (tres cuartas partes de ellos son minadores de las hojas). Sin embargo, hay también minadores de hojas en otras familias de dípteros, como *Anthomyiidae* y *Drosophilidae*. En Ferrar (1987) se ofrece información resumida sobre la morfología y la biología de los estadios inmaduros de los agromícidos, con una amplia bibliografía e ilustraciones del esqueleto cefalofaríngeo y de los espiráculos posteriores de varias especies.

4.1.3 Identificación del género *Liriomyza*

Las moscas adultas del género *Liriomyza* poseen los siguientes caracteres morfológicos (EPPO, 2005; Spencer, 1976):

- sétulas frontorbitales reclinadas (que apuntan hacia atrás)
- área prescutelar oscura concolora con el escudo en la mayoría de las especies, raramente amarilla
- escutelo amarillo en la mayoría de las especies, raramente oscuro

- la vena subcostal se pliega en la parte distal y termina independientemente de la costal
- la vena costal se extiende hasta la vena M_{1+2}
- celda discal (dm) pequeña
- presencia de segunda vena transversa (dm-cu) (posterior) en la mayoría de las especies
- presencia de órgano estridulador en los machos (constituido por un "rascador", un reborde quitinizado en los fémures posteriores y una "lima", una línea de escamas quitinizadas bajas en la membrana que une los terguitos y los esternitos abdominales).

En la práctica, la mayoría de las especies de *Liriomyza* (también de las cuatro especies objetivo incluidas en este protocolo de diagnóstico), vistas desde arriba, son primordialmente negras con frons amarillo y escutelo amarillo intenso. Las patas son amarillas de tonos diversos. Las especies objetivo presentan una venación alar típica (Figura 9) y la genitalia de los machos es la habitual del género.

Varios géneros podrán confundirse con *Liriomyza*. Los géneros estrechamente emparentados *Phytomyza, Chromatomyia y Phytoliriomyza* generalmente se pueden distinguir de *Liriomyza* por las sétulas frontorbitales proclinadas (inclinadas hacia delante) —en *Liriomyza* siempre son reclinadas, aunque ocasionalmente son erectas o ausentes— y por el escutelo, que generalmente es gris o negro y ocasionalmente ligeramente amarillento en el centro —pero completamente amarillo en la mayoría de las especies de *Liriomyza*—. En *Phytomyza* y *Chromatomyia*, la vena costal se extiende solamente hasta la R_{4+5}, mientras que en *Phytoliriomyza y Liriomyza* se extiende hasta la M1+2 (Spencer, 1977). Las especies de *Phytoliriomyza* son galígenas (forman agallas en tallos u hojas) y se alimentan de los tejidos internos, mientras que las especies de *Chromatomyia, Phytomyza* y *Liriomyza* son típicamente minadoras de las hojas.

4.1.4 Identificación de las especies de *Liriomyza*

4.1.4.1 Caracteres morfológicos de los adultos de *Liriomyza* spp.

En el Cuadro 1 se ofrece un resumen simplificado de los principales caracteres de diagnóstico de *L. bryoniae, L. huidobrensis, L. sativae* y *L. trifolii* (así como de *L. strigata*, a efectos de su descarte). El cuadro se complementa con las imágenes ilustrativas (microfotografías) del distifalo de las figuras 10 y 11.

En Spencer (1965, 1973), Dempewolf (2004), Malipatil et al. (2004) y Shiao (2004) se aportan descripciones e ilustraciones más detalladas de la morfología de estas especies. *Los* rasgos de diagnóstico claves se muestran en la Biblioteca de imágenes de plagas y enfermedades (PaDIL) (Malipatil 2007a, 2007b, 2007c).

Los adultos también se pueden identificar mediante claves. En Malipatil y Ridland (2008) se describe una clave para 17 especies de importancia económica, algunas endémicas de Australia. Además, en Dempewolf (2004) se ofrece un sistema de identificación mediante microfotografías de especies de plagas de todo el mundo. En lo que respecta concretamente a las claves para las especies de *Liriomyza*, los estudios de Spencer aportan varias claves y catálogos regionales exhaustivos. En ellos se describe la fauna local de cada región, que obviamente varía de unas regiones a otras, y esta información influye de forma diferencial en la eliminación positiva de taxones no buscados. Una lista completa de estas obras puede encontrarse en Spencer (1973). Además, puede resultar útil tener en cuenta la planta hospedante en la que se ha detectado la posible especie cuarentenaria de *Liriomyza*, puesto que se reduce así el número de otras especies de agromícidos que podrán estar presentes en el mismo contexto biológico y cuya consideración podrá ser necesario descartar (p. ej., para Europa, véase Ellis [s. f.]).

Cuadro 1. Caracteres morfológicos de los adultos de las especies de Liriomyza seleccionadas†

	L. bryoniae	*L. huidobrensis*‡	*L. sativae*	*L. strigata*	*L. trifolii*
Distifalo del macho	Dos lóbulos distales, con bordes redondeados	Dos lóbulos distales que se juntan solo en los bordes; bordes de los lóbulos prolongados anteroventralmente	Un solo lóbulo distal con una ligera constricción en su parte media en vista dorsoventral; el lóbulo está más esclerosado y su parte basal es más corta	Dos lóbulos distales que se juntan desde los bordes hasta las bases; bordes de los lóbulos prolongados anteroventralmente	Un lóbulo distal con una constricción profunda en su parte media en vista dorsoventral; lóbulo menos esclerosado y con una parte basal más larga
Setas verticales	Ambas setas verticales sobre fondo amarillo	Ambas setas verticales sobre fondo negro	Setas verticales externas sobre fondo negro, que podrá extenderse justo hasta las setas verticales internas situadas, en caso contrario, sobre fondo amarillo	Coloración negra detrás de los ojos que se extiende al menos hasta las setas verticales externas, pero setas verticales internas sobre fondo amarillo	Ambas setas verticales sobre fondo amarillo
Anepisterno	Predominantemente amarillo con una pequeña marca negra en la parte frontal del margen inferior	Amarillo con una mancha negra variable, generalmente en las tres cuartas partes inferiores	Predominantemente amarillo con un área oscura de tamaño variable, desde una pequeña barra a lo largo del margen inferior hasta una mancha a lo largo de todo el margen inferior, con una extensión ascendente amplia por el margen frontal y una extensión ascendente estrecha por el margen posterior	Amarillo pero con una mancha negra variable en los márgenes inferior y frontal, que puede extenderse por la mitad inferior	Amarillo con una pequeña marca gris negruzca en la parte frontal del margen inferior
Vena CuA_1	longitud de *a* doble que la de *b*	longitud de *a 2–2,5 veces mayor que* b	longitud de *a 3-4 veces mayor que* b	longitud de *a 2-3 veces mayor que* b	longitud de *a 3-4 veces mayor que* b
Tercer segmento antenal	Pequeño y amarillo	Ligeramente dilatado, normalmente oscurecido	Pequeño y amarillo	Pequeño y amarillo	Pequeño y amarillo
Frons y órbitas	Frons de color amarillo intenso, órbitas ligeramente más pálidas	Frons amarillo, generalmente más anaranjado que amarillo limón pálido; parte superior de las órbitas ligeramente oscura al	Frons y órbitas de color amarillo intenso	Frons y órbitas amarillos	Frons y órbitas amarillos

	L. bryoniae	*L. huidobrensis*‡	*L. sativae*	*L. strigata*	*L. trifolii*
		menos hasta las setas orbitales superiores			
Fémures	De color amarillo intenso con algunas estriaciones parduzcas	Amarillos, variablemente oscurecidos con estriaciones negras	De color amarillo intenso	Amarillos con algunas estriaciones parduzcas	Amarillos, ocasionalmente con ligeras estriaciones parduzcas
Mesonoto	Negro, predominantemente brillante pero con fondo mate perceptible	Negro mate	Negro brillante	Negro, brillante pero ligeramente mate	Negro mate con tono de fondo gris
Terguitos abdominales de los machos	Segundo y tercer terguitos visibles divididos por una estriación amarilla en su parte media	Solamente el segundo terguito visible dividido por una estriación amarilla en su parte media	Solamente el segundo terguito visible dividido por una estriación amarilla en su parte media	–	Del segundo al quinto terguitos visibles divididos por una estriación amarilla en su parte media
Longitud alar	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

Fuente: Recopilado a partir de Spencer (1973, 1976), con información sobre el distifalo de EPPO (2005) e información sobre los terguitos abdominales del macho de Shiao (2004) (que no incluyó a *L. strigata* en su análisis).

† Véanse también las figuras 7 a 11.

‡ *L. langei* es imposible de distinguir morfológicamente de *L. huidobrensis.*

4.1.4.2 Estructura del distifalo de los machos adultos de *Liriomyza* spp.

Las especies de *Liriomyza* consideradas aquí se dividen en dos grupos naturales diferenciados por la estructura de la genitalia de los machos (en concreto, del distifalo), así como por el color del cuerpo y la estructura de los espiráculos posteriores de las larvas:

- grupo 1: L. bryoniae, L. huidobrensis y L. strigata
- grupo 2: L. sativae y L. trifolii.

Sin embargo, los caracteres externos de las moscas adultas que son útiles para la identificación (Cuadro 1), en especial los que se basan en el color, no encajan perfectamente en estos dos grupos.

El distifalo es una estructura muy pequeña y frágil recubierta por membranas. Se trata de la parte terminal del edeago (u órgano intromitente, que forma parte de la genitalia del macho) (Figura 5) y su compleja estructura tridimensional tiene un valor considerable para el diagnóstico. De hecho, el distifalo proporciona un único rasgo que permite identificar de manera fiable las cuatro especies objetivo. La estructura básica del distifalo difiere en los dos grupos naturales de especies: en el grupo 1 presenta dos lóbulos distales situados uno al lado del otro (Figura 10), mientras que en el grupo 2 tiene un único lóbulo distal con una constricción en su parte media que lo divide en dos secciones definidas, la inferior y la superior (Figura 11). A continuación se proporciona una clave que permite la identificación de las cuatro especies objetivo basándose en el distifalo. Por motivos prácticos, se incluye también en la clave *L. strigata*, que está estrechamente emparentada con *L. bryoniae* y *L. huidobrensis* y que también es polífaga y, por tanto, puede encontrarse en plantas hospedantes similares.

No obstante, las diferencias entre algunos de los pares de especies son sutiles y las observaciones de la estructura del distifalo debería cotejarse con las de la morfología externa (Cuadro 1) para asegurarse de que no se ha malinterpretado la estructura del distifalo. Si todas las observaciones se corresponden, se pueden descartar todas las demás especies de *Liriomyza*, incluidas las no descritas aquí.

Clave diagnóstica para la identificación de *Liriomyza spp*. basándose en el distifalo del macho

Esta clave se complementa con las figuras 10 y 11.

1. Con un solo lóbulo distal (Figura 11e, f) **2**

– Con un par de lóbulos distales (Figura 10a–c, g–k) **3**

2. Con constricción profunda entre las partes apical y basal del lóbulo: sección basal fuertemente curvada (Figura 11f) .....***L. trifolii***

– Con constricción poco profunda solamente entre las partes apical y basal del lóbulo: la sección basal no está fuertemente curvada (Figura 11e) .....***L. sativae***

3. Bordes de los lóbulos circulares (no prolongados anteroventralmente); uniformemente esclerosados (Figura 10a) .....***L. bryoniae***

– Bordes de los lóbulos proyectados (prolongados anteroventralmente) (Figura 10b, c) **4**

4. Lóbulos que se juntan en la parte media solamente por los bordes (Figura 10h).....***L. huidobrensis****

– Lóbulos que se juntan en la parte media desde los bordes hasta las bases (Figura 10i).....***L. strigata***

* *L. langei* es imposible de distinguir morfológicamente de *L. huidobrensis*.

4.1.4.3 Características morfológicas de las etapas inmaduras de las cuatro especies objetivo de *Liriomyza*

De las cuatro etapas de desarrollo (huevo, larva, pupa y adulto) solo los machos de mosca adultos pueden identificarse con certeza hasta el nivel de la especie por sus características morfológicas (la forma de su genitalia). Las características morfológicas de las larvas y de las pupas se pueden utilizar para distinguir entre los miembros de los dos grupos naturales de especies descritos en la Sección 4.1.4.2. Esta información puede ayudar en la identificación de la especie, pero es insuficiente por sí misma. Para distinguir entre las especies incluidas en el protocolo, la identificación morfológica se puede complementar con ensayos moleculares (Sección 4.2).

Huevos

Los huevos se depositan dentro del tejido foliar. Son blancos y ovalados, de unos 0,25 mm de longitud. No permiten identificar ni el género ni la especie.

Larvas y pupas

Hay tres estadios larvarios que se alimentan a medida que excavan a través del tejido foliar. Las larvas recién emergidas tienen unos 0,5 mm de largo, pero al terminar su desarrollo alcanzan los 3,0 mm. Su forma macroscópica es la típica de los agromícidos (véase la Sección 4.1.2). Las pupas (Figura 12) son cilíndricas ovaladas, de unos 2,0 mm de longitud, muy ligeramente aplanadas ventralmente y con espiráculos anteriores y posteriores protuberantes. En la práctica, se pueden distinguir morfológicamente las larvas y las pupas de los dos grupos naturales (pero no las especies dentro de los grupos) de la manera siguiente:

Larvas del grupo 1

Las larvas de *L. bryoniae*, *L. huidobrensis* y *L. strigata* son de color crema pero en el estadio final desarrollan una mancha dorsal de color amarillo anaranjado en el extremo anterior, que puede extenderse por los lados hasta la superficie ventral (Figura 13). Los espiráculos posteriores son elípticos, con poros en el borde. El número de poros puede resultar difícil de observar; según Spencer (1973): *L. bryoniae* tiene 7–12 poros, *L. huidobrensis* unos 6–9 poros, y *L. strigata* 10–12 poros. Los puparios son de color variable, de amarillo anaranjado a marrón oscuro. *En L. bryoniae y L. strigata* el color de los puparios corresponde, en su mayor parte, aunque no exclusivamente, al extremo más claro de la gama de colores. Los puparios de *L. huidobrensis* son, por lo general, gris antracita. La forma de los espiráculos larvarios se mantiene en el pupario, aunque los poros son más difíciles de discernir.

Larvas del grupo 2

Las larvas de *L. sativae* y *L. trifolii* son translúcidas cuando acaban de emerger; posteriormente, todo el cuerpo se vuelve amarillo anaranjado. Los espiráculos posteriores tienen forma de tricornio; cada espiráculo tiene tres poros, cada uno en una proyección diferente, los dos exteriores elongados. Los puparios son naranjas amarillentos, en ocasiones más oscuros, de color marrón dorado. La forma de los espiráculos larvarios se mantiene en el pupario pero los detalles son menos patentes.

4.2 Identificación molecular de las especies de *Liriomyza*

Para identificar las especies de *Liriomyza* se han utilizado diversas pruebas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), como la PCR combinada con el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés); la PCR con detección en el punto final (*end-point PCR*) mediante cebadores específicos de la especie; la PCR en tiempo real (*real-time PCR*), y la comparación de secuencias de ADN. De todas estas pruebas, a continuación se describen las que se pueden utilizar para distinguir entre las cuatro especies objetivo (*L. bryoniae*, *L. huidobrensis*, *L. sativae* y *L. trifolii*) o entre *L. huidobrensis* y *L. langei*.

En este protocolo de diagnóstico, las pruebas (con inclusión de las referencias a nombres comerciales) se describen según se publicaron, ya que en ellas se definió el nivel inicial de sensibilidad, especificidad y/o reproducibilidad alcanzado. No se han validado formalmente la sensibilidad ni la reproductibilidad analíticas de ninguno de los métodos publicados para estas especies. El uso de nombres de reactivos, productos químicos o equipo en estos protocolos de diagnóstico no implica su aprobación ni la exclusión de otros que también podrán ser adecuados. Los procedimientos de laboratorio presentados en los protocolos podrán ajustarse a las normas de los laboratorios individuales, siempre que estén adecuadamente validadas.

En las secciones siguientes se describe la especificidad de cada método: la especie de *Liriomyza* utilizada en la evaluación de cada método y la finalidad original para la que se diseñó el análisis. Teniendo en cuenta las limitaciones específicas de las pruebas moleculares, un resultado negativo en una prueba molecular no excluye la posibilidad de identificación positiva mediante pruebas morfológicas.

4.2.1 Controles para las pruebas moleculares

Para considerar fidedigno el resultado de las pruebas, en cada serie de aislamiento de ácidos nucleicos y de amplificación del ácido nucleico de la plaga objetivo se deberían tener en cuenta los controles adecuados, que dependerán del tipo de prueba utilizada y del grado de certidumbre necesario. Para la PCR, deberían utilizarse, como mínimo, un control positivo de ácido nucleico, un control negativo de amplificación (control sin molde) y, cuando sea pertinente, un control negativo de extracción.

4.2.2 Extracción de ADN

Puede extraerse ADN adecuado para pruebas de PCR de un único espécimen de *Liriomyza*, ya sea una larva, pupa o adulto, con diversos equipos (kits) comerciales de extracción de ADN, siguiendo las instrucciones del fabricante (Scheffer *et al.*, 2001, 2006; Kox *et al.*, 2005; Nakamura *et al.*, 2013). Para obtener más información sobre los kits utilizados en cada una de las pruebas descritas a continuación, consulte el artículo original. Los laboratorios podrán determinar que otras técnicas de extracción son igual de eficaces; el ADN se podrá extraer mediante cualquier método de extracción de ADN adecuado para insectos. En todos los protocolos publicados, el tejido tratado se tritura o se muele con un micropistilo estéril o un aparato similar.

Control positivo del ácido nucleico. Este control se utiliza para determinar si la prueba se desarrolló o no según lo previsto en las condiciones experimentales y con los parámetros establecidos. El control positivo puede ser cualquier ácido nucleico que contenga la secuencia objetivo (es decir, ácido nucleico de *Liriomyza* que haya sido analizado previamente).

Control negativo de la amplificación (control sin molde). Este control es necesario para la PCR a fin de descartar falsos positivos por contaminación durante la preparación de la mezcla de reacción o por amplificación inespecífica. En la fase de amplificación se añade, en lugar del volumen correspondiente al ADN, agua de calidad apta para PCR que se utilizó para preparar la mezcla de reacción.

Control negativo de la extracción. Este control se utiliza para controlar la contaminación durante la extracción del ácido nucleico o la reacción cruzada con el tejido hospedante. Consiste en una reacción de extracción en la que no se añade la muestra de tejido.

4.2.3 Identificación de las cuatro especies objetivo mediante PCR-RFLP

Kox *et al.* (2005) describen un análisis mediante PCR-RFLP de una región del gen de la *citocromo oxidasa* II (*COII*) que se puede utilizar para distinguir las cuatro especies objetivo. La especificidad del análisis se investigó más a fondo analizando otras cuatro especies de *Liriomyza: L. strigata, L. langei, L. chinensis* y *L. scorzonerae*. Este análisis no permitió distinguir entre los especímenes de *L. langei* y los de *L. huidobrensis*, pero las otras tres especies pudieron identificarse satisfactoriamente.

4.2.3.1 Amplificación del gen *COII*

Según Kox *et al.* (2005), las muestras se amplifican en 50 µl de una mezcla de reacción compuesta por las siguientes concentraciones finales de reactivos: 0,6 µM de cada cebador, 0,2 mM de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP), 1 U de polimerasa de ADN HotStarTaq[1] , tampón de PCR 1× y 1,5 mM de $MgCl_2$. En cada reacción se incluye o bien 1–5 µl de ADN como molde o agua de calidad apta para PCR como control negativo. La PCR se lleva a cabo utilizando el siguiente par de cebadores:

TL2-J-3037-directo (F): 5´-ATGGCAGATTAGTGCAATGG-3´ (Simon *et al.*, 1994)

K-N-3785Lir-inverso (R): 5´-GTT(A/T)AAGAGACCATT(A/G)CTTG-3´ (Kox *et al.*, 2005)

Los parámetros de termociclado para la PCR son una etapa de desnaturalización de 15 min a 95 °C seguida de 35 ciclos de 15 s a 94 °C, 1 min a 55 °C y 45 s a 72 °C, y una etapa de extensión final de 10 min a 72 °C antes del enfriamiento a temperatura ambiente. Después de la amplificación, se someten 5 µl del producto de la PCR a electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 % en tampón tris-acetato-EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) (tampón TAE) con un marcador de peso molecular de ADN de 100 pares de bases (pb) para confirmar la presencia de productos de la PCR antes del análisis del RFLP.

La PCR del gen *COII* solo se considera válida si:

- el control positivo genera un producto de la amplificación del tamaño esperado para el gen *COII* objetivo
- el control negativo de extracción y el control negativo de amplificación no generan un producto de la amplificación del tamaño esperado para el gen *COII* objetivo.

4.2.3.2 Digestión mediante enzimas de restricción y separación de los productos

Para cada una de las muestras, se digieren 5 µl de producto de la PCR con las enzimas de restricción *DdeI, HinfI, SspI* y *TaqI*, cada una en una reacción independiente, siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, el producto de la PCR digerido se separa mediante electroforesis en un gel de agarosa al 3 % en tampón TAE junto con un marcador de peso molecular de ADN de 100 pb como referencia para determinar el tamaño de los fragmentos.

En las condiciones electroforéticas descritas, no es posible determinar el tamaño exacto de los fragmentos de los productos digeridos separados, pero se utilizan los valores de separación relativos para comparar los resultados con los perfiles de RFLP esperados para la especie. Para lograr una comparación más precisa de los tamaños se pueden analizar, junto con las muestras de ensayo, muestras de control positivo que generan fragmentos de tamaños y patrones conocidos. Por cada enzima de digestión utilizada en el análisis se debería incluir un control positivo para comprobar que la enzima digiere el ADN según lo previsto. La prueba de RFLP solo se considera válida si el control positivo produce fragmentos del tamaño esperado para el gen *COII* objetivo. Los patrones de RFLP que se observan en el gel de agarosa permiten la diferenciación de las cuatro especies objetivo de *Liriomyza*. En el Cuadro 2 se presentan los perfiles diagnósticos para las distintas especies correspondientes a cada enzima. Si el perfil compuesto de fragmentos de una muestra se corresponde con el perfil de fragmentos conocido de una de las cinco especies del cuadro, el análisis permite determinar que la muestra pertenece a esa especie. Si el perfil de fragmentos no se corresponde con alguno de los perfiles de fragmentos conocidos de las especies, el análisis no permite determinar a qué especie pertenece la muestra. Si una muestra se diagnostica como *L. huidobrensis*, podrá ser necesario realizar un análisis adicional para confirmar que no se trata de la especie críptica *L. langei* (Sección 4.2.5).

---

[1] En este protocolo de diagnóstico, los métodos (con inclusión de las referencias a nombres comerciales) se describen según se publicaron, ya que en ellos se definió el nivel inicial de sensibilidad, especificidad y/o reproducibilidad alcanzado. El uso de nombres de reactivos, productos químicos o equipo en estos protocolos de diagnóstico no implica su aprobación ni la exclusión de otros que también podrán ser adecuados. Los procedimientos de laboratorio presentados en los protocolos podrán ajustarse a las normas de los laboratorios individuales, siempre que estén adecuadamente validadas.

Cuadro 2. Perfiles de polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción de las especies de *Liriomyza*

	Tamaños esperados de los fragmentos (pares de bases) en función de la enzima de restricción			
Especie	*Dde*I	*Hinf*I	*Ssp*I	*Taq*I
L. bryoniae	790	421, 369	392, 326, 72	486, 163, 111, 30
L. huidobrensis†	790	421, 369	399, 391	306, 163, 159, 111, 30, 21
L. sativae tipo "estadounidense"‡	567, 223	421, 282, 59, 27	399, 391	306, 210, 163, 81, 30
L. sativae tipo "asiático"‡	790	421, 310, 59	717, 73	306, 210, 163, 81, 30
L. strigata	790	421, 342, 27	399, 391	267, 219, 141, 72, 67
L. trifolii	619, 171 o 386, 223, 171	421, 310, 59	391, 326, 73	306, 163, 159, 141, 21 o 306, 163, 159, 111, 30, 21

Fuente: Datos de Kox *et al.* (2005).
† Incluida la especie críptica *L. langei.*
‡ Los tipos estadounidense y asiático son variantes conocidas de *L. sativae*.

4.2.4 Cebadores de PCR específicos para la identificación de las cuatro especies objetivo

Nakamura *et al.* (2013) publicaron un análisis mediante PCR múltiplex para distinguir las cuatro especies objetivo sin necesidad de una digestión posterior con enzimas de restricción. En el análisis se utilizan seis cebadores específicos para el gen de la *citocromo oxidasa* I (*COI*). Cinco de ellos se unen a secuencias exclusivas de cada especie de *Liriomyza* y se usan como cebadores directos. El sexto cebador se une a un segmento del gen COI conservado en todas las especies de *Liriomyza* y se usa como cebador inverso en los distintos pares de cebadores. El tamaño de los productos de la PCR permite discriminar entre *L. bryoniae*, *L. huidobrensis*, *L. sativae*, *L. trifolii* y *L. chinensis*. A diferencia del análisis mediante PCR-RFLP de Kox *et al.* (2005) (Sección 4.2.3), no se ha verificado la especificidad de este análisis para *L. strigata*.

4.2.4.1 Amplificación del gen *COI*

Según Nakamura et al. (2013), las muestras se amplifican en 10 µl de una mezcla de reacción compuesta por las siguientes concentraciones finales de reactivos: 0,5 µM de cada uno de los seis cebadores, 0,2 mM de dNTP, 1 U de polimerasa de ADN TaKaRa Ex Taq1, tampón de PCR TaKaRa Ex Taq1 1× y 2 mM de MgCl2. En cada reacción se incluye o bien 0,5 µl de ADN como molde o agua de calidad apta para PCR como control negativo. La PCR se lleva a cabo con los siguientes seis cebadores diseñados por Nakamura et al. (2013):

Lb600-F: 5′-CTAGGAATGATTTATGCAATG-3′

Lc920-F: 5′-CATGACACTTATTATGTTGTTGCA-3′

Lh1150-F: 5′-CAATCGGATCTTCAATTTCCCTTC-3′

Ls1040-F: 5′-TTATTGGTGTAAATTTAACC-3′

Lt780-F: 5′-TTATACACCAACTACTTTGTGAA-3′
L1250-R: 5′-GAATWGGRWAAATYACTTGACGTTG-3′

Los parámetros de termociclado para la PCR son una etapa de desnaturalización de 1 min a 94 °C seguida de 32 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C y 2 min a 72 °C. Los productos de la PCR se visualizan mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,8 % con un marcador de peso molecular de ADN de 100 pb para poder determinar el tamaño de los productos.

La PCR múltiplex del gen *COI* solo se considera válida si:

- el control positivo genera un producto de la amplificación del tamaño esperado para el gen *COI* objetivo
- el control negativo de extracción y el control negativo de amplificación no generan un producto de la amplificación del tamaño esperado para el gen *COI* objetivo.

Los tamaños esperados de los productos de la PCR para las cinco especies son: 649 pb (*L. bryoniae*), 359 pb (*L. chinensis*), 107 pb (*L. huidobrensis*/*L. langei*), 207 pb (*L. sativae*) y 461 pb (*L. trifolii*). En las condiciones electroforéticas descritas, no es posible determinar el tamaño exacto de los fragmentos de los productos de la PCR separados, pero se utilizan los valores de separación relativos para comparar los resultados con los perfiles esperados correspondientes a los cebadores específicos para la especie. Para lograr una comparación más precisa de los tamaños se pueden analizar, junto con las muestras de ensayo, muestras de control positivo con tamaño de banda conocido para la especie.

Una muestra se identifica como perteneciente a una de las cinco especies si produce un único producto de la PCR del tamaño esperado para esa especie. Esta prueba no permite distinguir entre *L. huidobrensis* y *L. langei*. Si se sospecha que una muestra es *L. huidobrensis*, podrá ser necesario realizar un análisis adicional para confirmar que no se trata de la especie críptica *L. langei* (Sección 4.2.5). Esta prueba se desarrolló para la identificación de *Liriomyza* en el Japón y su especificidad tiene esa finalidad concreta. Por lo tanto, no se ha verificado la reactividad cruzada con *L. strigata* ni con poblaciones de *L. trifolii* de fuera del Japón.

4.2.5 Diferenciación de las especies crípticas *L. langei* y *L. huidobrensis*

4.2.5.1 PCR-RFLP

Scheffer *et al.* (2001) describieron un análisis mediante PCR-RFLP para distinguir entre *L. huidobrensis* y *L. langei* basado en una variación en un locus mitocondrial que incluye parte del gen *COI*, el ARNt de leucina y el gen *COII* completo. Esta región de 1 031 pb se amplifica utilizando los cebadores publicados en Simon *et al.* (1994):

C1-J-2797-F: 5′-CCTC-GACGTTATTCAGATTACC-3′

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

Los parámetros de termociclado para la PCR son una etapa de desnaturalización de 2 min a 92 °C seguida de 35 ciclos de 1 min 30 s a 92 °C, 1 min 30 s a 50 °C y 2 min 30 s a 72 °C, y una etapa de extensión final de 7 min a 72 °C. Después de la amplificación, el producto de la PCR se somete a electroforesis con un marcador de peso molecular de ADN para comprobar si la PCR ha sido eficaz, antes del análisis del RFLP.

La PCR de los genes *COI* y *COII* solo se considera válida si:

- el control positivo genera un producto de la amplificación del tamaño esperado para el gen *COII* objetivo
- el control negativo de extracción y el control negativo de amplificación no generan un producto de la amplificación del tamaño esperado para el gen *COII* objetivo.

El producto de la PCR de cada una de las muestras se digiere con las enzimas de restricción *SpeI* y *EcoRV*, cada una en una reacción independiente, siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, el producto de la PCR digerido se separa mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 % junto con un marcador de peso molecular de ADN de 100 pb para poder determinar el tamaño de los fragmentos.

En las condiciones electroforéticas descritas, no es posible determinar el tamaño exacto de los fragmentos de los productos digeridos separados, pero se utilizan los valores de separación relativos para comparar los resultados con los perfiles de RFLP esperados para la especie. Para lograr una comparación más precisa de los tamaños se pueden analizar, junto con las muestras de ensayo, muestras de control positivo que generan fragmentos de tamaños y patrones conocidos. Por cada enzima de digestión utilizada en el análisis se debería incluir un control positivo para comprobar que la enzima digiere el ADN según lo previsto. La prueba de RFLP solo se considera válida si el control positivo produce fragmentos del tamaño esperado para el gen objetivo.

Las muestras de *L. huidobrensis* producen un único fragmento intacto (de 1 031 pb) cuando se digieren con *Spe*I y dos fragmentos (de 175 pb y 856 pb) cuando se digieren con *Eco*RV. Por el contrario, las muestras de *L. langei* producen dos fragmentos (de 420 pb y 611 pb) cuando se digieren con *Spe*I y un único fragmento intacto (de 1 031 pb) cuando se digieren con *Eco*RV. Si el perfil compuesto de fragmentos de una muestra se corresponde con estos perfiles de fragmentos conocidos, el análisis permite determinar que la muestra pertenece a esa especie.

4.2.5.2 Comparación de secuencias de ADN

Scheffer (2000) publicó información sobre la PCR y las secuencias de ADN de un locus del ADN mitocondrial que incluía secuencias parciales de los genes *COI* y *COII* que permiten diferenciar las dos especies crípticas *L. huidobrensis* y *L. langei*. En un artículo posterior, Scheffer *et al.* (2006) publicaron nuevas secuencias del extremo 3' del gen *COI* para la investigación de la diversidad de las especies. Estos datos se analizaron mediante técnicas filogenéticas moleculares, pero no se utilizaron para elaborar protocolos de diagnóstico.

4.2.6 Código de barras de ADN

Se está trabajando en la elaboración de un recurso más exhaustivo desde el punto de vista taxonómico de registros de secuencias de ADN de la región 5' del gen *COI* de *Liriomyza* utilizados en estudios de códigos de barras de ADN de animales (p. ej. Bhuiya *et al.*, 2011; Maharjan *et al.*, 2014). Actualmente, la base de datos de códigos de barras biológicos BOLD (Barcode of Life Data System: http://www.boldsystems.org) contiene registros de códigos de barras de ADN de 31 especies de *Liriomyza* (incluidas las cuatro especies objetivo). También proporciona códigos de barras y procedimientos Q-bank (www.q-bank.eu), una base de datos curada que incluye secuencias obtenidas a partir de material de referencia. En un estudio reciente (Maharjan *et al.*, 2014) se proporcionó información para la separación de *L. huidobrensis, L. trifolii, L. sativae, L. bryoniae* y *L. chinensis.* A pesar de estos avances en los recursos relacionados con la secuenciación del ADN, en el presente documento no se describe con detalle la metodología para la identificación de las especies de *Liriomyza* porque aún no se han publicado en la bibliografía científica reglas para la interpretación de los recursos. Los resultados de la identificación mediante códigos de barras de ADN deberían interpretarse con cautela, teniendo en cuenta los siguientes posibles problemas: 1) la posibilidad de una amplificación preferente en la PCR de copias del gen *COI* del genoma mitocondrial nuclear (es decir, pseudogenes mitocondriales del núcleo de la célula o NUMT, por su acrónimo inglés) o de parasitoides; 2) la

posibilidad de confusión en la identificación con una especie hermana estrechamente emparentada (en los complejos de especies), y 3) distinto alcance geográfico de los especímenes de referencia de las bases de datos de secuencias.

5. Registros

Los registros y las pruebas deberían conservarse según lo descrito en la Sección 2.5 de la NIMF 27 (*Protocolos de diagnóstico para las plagas reglamentadas*).

En los casos en que los resultados del diagnóstico puedan repercutir en forma desfavorable sobre otras partes contratantes, deberían conservarse los siguientes registros, pruebas y material adicional por lo menos durante un año de un modo que garantice su rastreabilidad: especímenes preservados o montados en portaobjetos, fotografías de estructuras taxonómicas distintivas, extractos de ADN y fotografías de los geles.

6. Puntos de contacto para información adicional

Puede obtenerse información adicional sobre este protocolo en las siguientes fuentes:

State Government of Victoria Department of Economic Development, Jobs, Transport and Resources, AgriBio, 5 Ring Road, Bundoora, Vic. 3083, Australia (Mallik Malipatil; correo electrónico: mallik.malipatil@ecodev.vic.gov.au; tel.: +61 3 9032 7302; fax: +61 3 9032 7604).

Fera Science Ltd (Fera), National Agri-Food Innovation Campus, Sand Hutton, York, YO41 1LZ, Reino Unido (Dominique Collins; correo electrónico: dom.collins@fera.co.uk; tel.: +44 1904 462215, fax: +44 1904 462111).

Podrán presentar una solicitud de revisión de un protocolo de diagnóstico las organizaciones nacionales de protección fitosanitaria (ONPF), las organizaciones regionales de protección fitosanitaria (ORPF) o los órganos auxiliares de la Comisión de Medidas Fitosanitarias (CMF) a través de la Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (ippc@fao.org), que a su vez remitirá la solicitud al Grupo técnico sobre protocolos de diagnóstico (GTPD).

7. Agradecimientos

El primer proyecto de este protocolo fue redactado por Mallik B. Malipatil (Departamento de Desarrollo Económico, Trabajo, Transporte y Recursos [DEDJTR] del Gobierno del Estado de Victoria, Australia), Dominique W. Collins (Fera, Reino Unido) y Mark Blacket (DEDJTR del Gobierno del Estado de Victoria, Australia); Norman Barr (Servicio de Inspección Zoosanitaria y Fitosanitaria [APHIS] del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos [USDA]) redactó la sección sobre identificación molecular.

Los siguientes revisores formularon observaciones sobre la versión preliminar de este documento: Stephen Gaimari (Departamento de Alimentación y Agricultura de California [CDFA], Estados Unidos), Anthony Rice (Departamento de Agricultura y Recursos Hídricos [DAWR], Australia), Ren Iwaizumi (Estación de Protección Fitosanitaria de Yokohama, Ministerio de Agricultura, Silvicultura y Pesca del Japón) y Ramona Vaitkevica (Servicio Estatal de Protección Fitosanitaria de Letonia).

8. Referencias

En el presente anexo se hace referencia a las NIMF. Las NIMF están disponibles en el Portal fitosanitario internacional (PFI): https://www.ippc.int/es/core-activities/standards-setting/ispms.

Bhuiya, B.A., Amin, S. y 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. y 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 Entomológica Argentina,* 1: 10–11.

Boucher, S. 2010. Family Agromyzidae (leaf-mining flies). *En* B.V. Brown, A. Borkent, J.M. Cumming, D.M. Wood, N.E. Woodley y M. Zumbado, eds. *Manual of Central American Diptera,* Vol. 2, págs. 1057–1071. Ottawa, National Research Council. 728 págs.

CABI. 2013. Crop protection compendium. Wallingford (Reino Unido), CABI. Disponible en http://www.cabicompendium.org/cpc/home.asp (último acceso: 24 de agosto de 2014).

Dempewolf, M. 2001. Larvalmorphologie und Phylogenie der Agromyzidae *(Diptera).* Universidad de Bielefeld, Alemania (tesis)

Dempewolf, M. 2004. Arthropods of economic importance: Agromyzidae. Ámsterdam, Netherlands Biodiversity Information Facility. Disponible en http://wbd.etibioinformatics.nl/bis/agromyzidae.php (último acceso: 24 de agosto de 2014).

Ellis, W.N. s. f. Leafminers and plant galls of Europe. Disponible en http://www.bladmineerders.nl/ (último acceso: 24 de agosto de 2014) (en inglés y neerlandés).

EPPO (Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas, OEPP). 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. y La Salle, J. 2005. *Liriomyza* parasitoids of Southeast Asia. Melbourne, Australia, CSIRO. Disponible en http://www.ento.csiro.au/science/Liriomyza_ver3/index.html (último acceso: 24 de agosto de 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 Verwandschaftsbeziehungen. *Beiträge zur Entomologie,* 8: 505-688.

Kox, L.F.F., van den Beld, H.E., Lindhout, B.I. y 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. y 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). Disponible en http://www.padil.gov.au/pests-and-diseases/pest/main/136238 (último acceso: 24 de agosto de 2014).

Malipatil, M.B. 2007b. Pea leafminer (*Liriomyza huidobrensis*). Pest and Disease Image Library (PaDIL), images and fact sheets. Disponible en http://www.padil.gov.au/pests-and-diseases/pest/main/136237 (último acceso: 24 de agosto de 2014).

Malipatil, M.B. 2007c. American serpentine leafminer (*Liriomyza trifolii*). Pest and Disease Image Library (PaDIL), images and fact sheets. Disponible en http://www.padil.gov.au/pests-and-diseases/pest/main/136236 (último acceso: 24 de agosto de 2014).

Malipatil, M. y 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. Disponible en http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/leafminers/ (último acceso: 24 de agosto de 2014).

Malipatil, M.B., Ridland, P.M., Rauf, A., Watung, J. y Kandowangko, D. 2004. *New records of* Liriomyza Mik (Agromyzidae: Diptera) leafminers from Indonesia. *Formosan Entomologist,* 24: 287-292.

Martinez, M. y Etienne, J. 2002. Liste systématique et biogéographique dês Agromyzidae (Diptera) de la région néotropicale. *Bollettino di Zoologia Agraria e di Bachicoltura (Serie II),* 34: 25–52 (en francés).

Nakamura, S., Masuda, T., Mochizuki, A., Konishi, K., Tokumaru, S., Ueno, K. y 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. y Martinez, M., eds. 2013. Fauna Europaea, versión 2.6. Disponible en http://www.faunaeur.org (último acceso: 24 de agosto de 2014).

Parrella, M.P. y 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. y Edmunds, R. s. f. *The leaf and stem mines of British flies and other insects.* Disponible en http://www.ukflymines.co.uk (último acceso: 24 de agosto de 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. y 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. y 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. y 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. y 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, Parte 5(g). Londres, Royal Entomological Society of London. 136 págs.

Spencer, K.A. 1973. *Agromyzidae (Diptera) of economic importance.* Series Entomologica 9. La Haya, W. Junk. 418 págs.

Spencer, K.A. 1976. The Agromyzidae (Diptera) of Fennoscandia and Denmark. *Fauna Entomologica Scandinavica,* 5: partes 1 y 2.

Spencer, K.A. 1977. *A revision of the Australian Agromyzidae (Diptera).* Western Australian Museum Special Publication No. 8. 255 págs.

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 págs.

Spencer, K.A. 1987. Agromyzidae. *En* J.F. McAlpine, ed. *Manual of Nearctic Diptera,* Vol. 2. Monografía núm. 28, págs. 675–1332. Ottawa, Research Branch Agriculture Canada.

Spencer, K.A. 1989. Leaf miners. *En* R. P. Kahn, ed. *Plant protection and quarantine,* Vol. 2, Selected pests and pathogens of quarantine significance, págs. 77–98. Boca Ratón, Florida (Estados Unidos), CRC Press.

Spencer, K.A. 1990. *Host specialization in the world Agromyzidae (Diptera).* Series Entomologica 45. Dordrecht (Páises Bajos), Kluwer Academic Publishers. 444 págs.

Spencer, K.A. 1992. *Flycatcher: Memoirs of an amateur entomologist.* La Haya (Países Bajos), SPB Academic Publishing. 414 págs.

Spencer, K.A. y Steyskal, G.C. 1986. *Manual of the Agromyzidae (Diptera) of the United States.* Agriculture Handbook 638. Washington, DC, United States Department of Agriculture. 478 págs.

Stehr, F.W. 1991. Immature Insects. Vol. 2 Kendall/Hunt Publishing company, Estados Unidos de América. 974 págs.

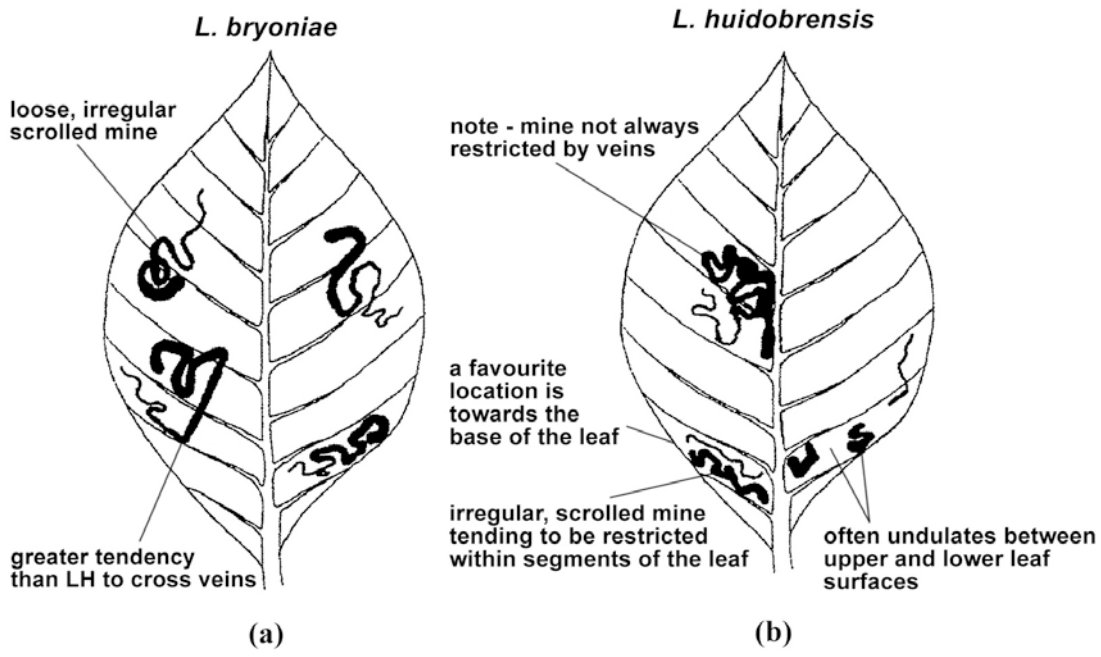
Takano, S.I., Iwaizumi, R., Nakanishi, Y. y Someya, H. 2008. Laboratory hybridization between the two clades of *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). *Applied Entomology and Zoology,* 43: 397-402.

Takano, S.I., Iwaizumi, R. Nakanishi, Y., Someya, H. y 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 (en japonés con resumen en inglés).

Yeates, D.K., Hastings, A., Hamilton, J.R., Colless, D.H., Lambkin, C.L., Bickel, D., McAlpine, D.K., Schneider, M.A., Daniels, G. y Cranston, P. 2004. *Anatomical atlas of flies.* Melbourne (Australia), CSIRO. Disponible en http://www.ento.csiro.au/biology/fly/fly.html (último acceso: 24 de agosto de 2014).

9. Figuras

Figura 1. Adulto de *Liriomyza bryoniae*.
Fotografía por gentileza del Departamento de Medio Ambiente, Alimentación y Asuntos Rurales (DEFRA) del Reino Unido



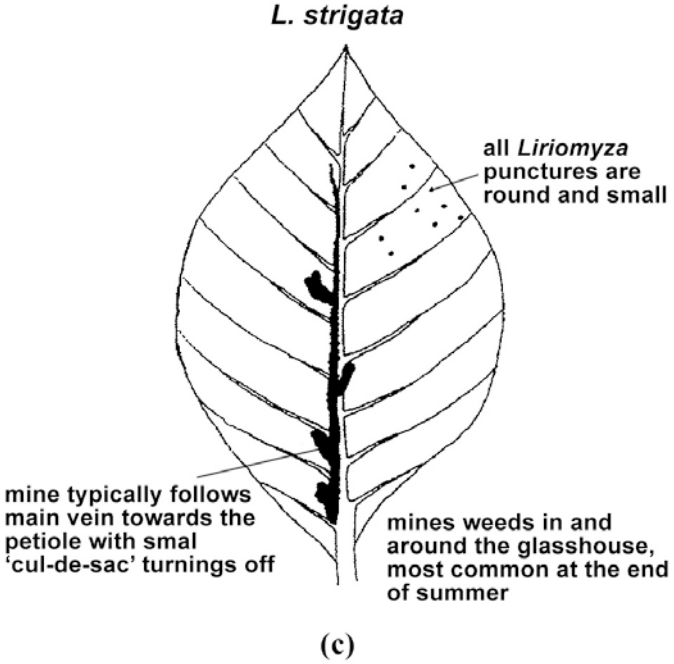


Figura 2. Características típicas de las galerías de a) *Liriomyza bryoniae*, b) *Liriomyza huidobrensis* y c) *Liriomyza strigata.*
Fuente: EPPO (2005).

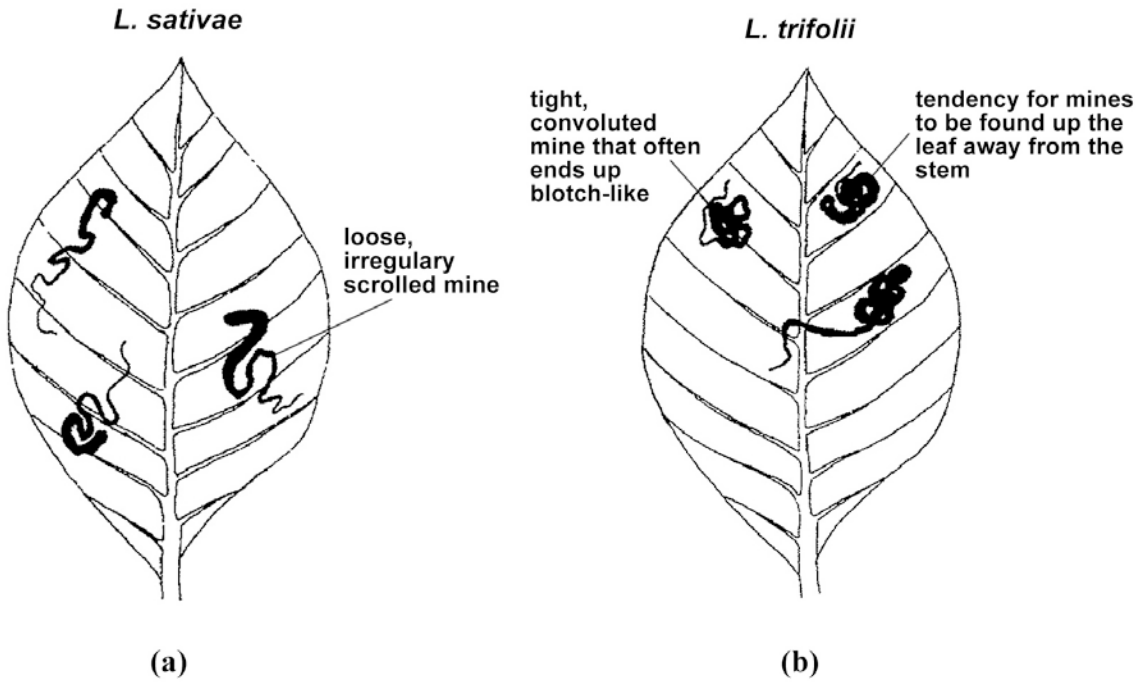


Figura 3. Características típicas de las galerías de a) *Liriomyza sativae* y b) *Liriomyza trifolii*.
Fuente: EPPO (2005).

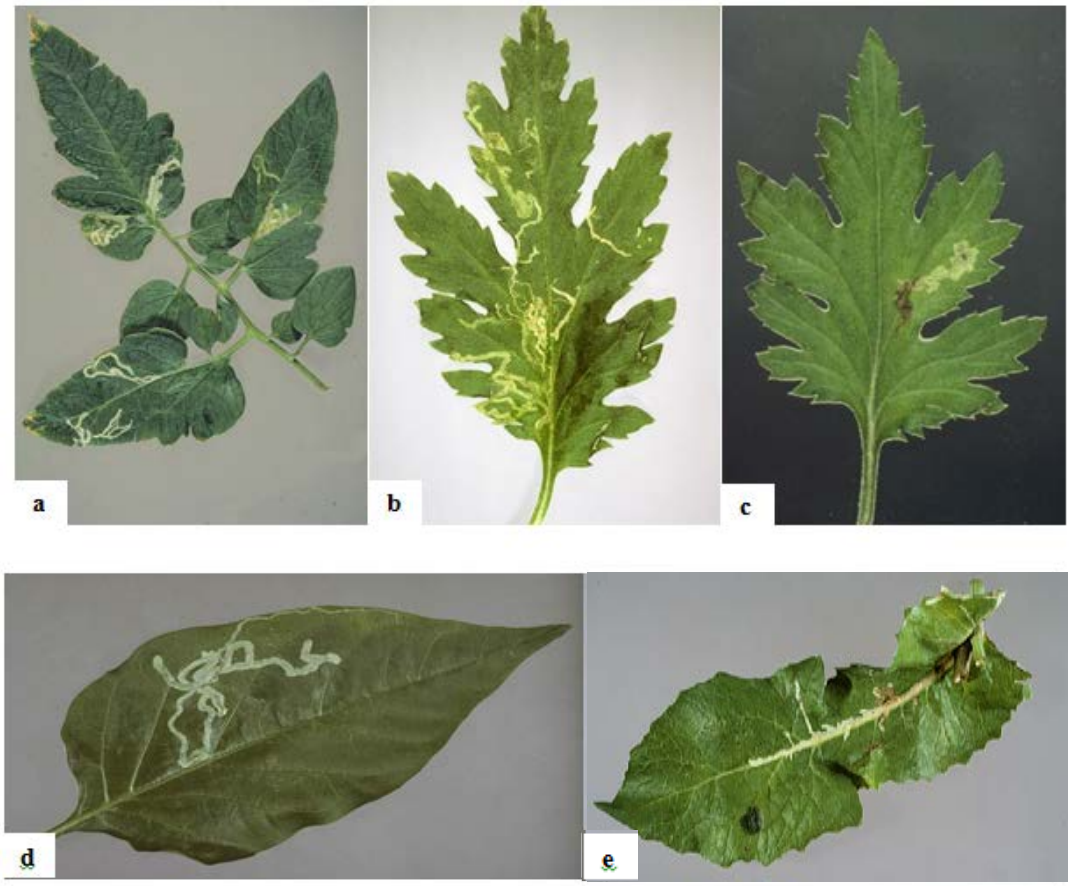


Figura 4. *Galerías típicas de* Liriomyza spp.: a) *L. bryoniae* **en tomate; b)** *L. huidobrensis* en crisantemo; c) *L. trifolii* en crisantemo; d) *L. sativae* en pimiento; y e) *L. strigata* en un hospedante sin identificar.
Fotografía por gentileza del Departamento de Medio Ambiente, Alimentación y Asuntos Rurales (DEFRA) del Reino Unido

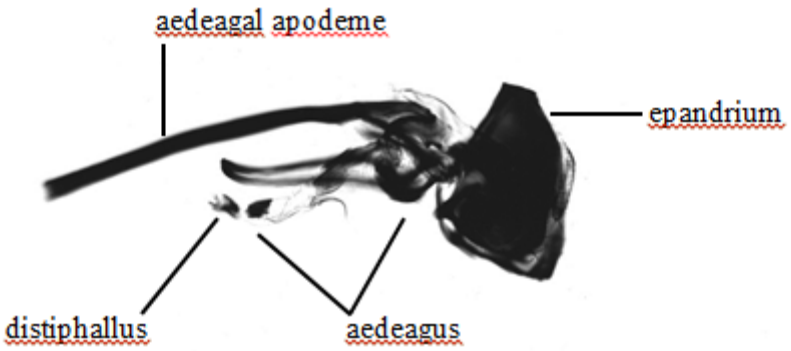


Figura 5. Genitalia de los machos de *Liriomyza huidobrensis (vista lateral)*.
Fotografía por gentileza del Departamento de Medio Ambiente, Alimentación y Asuntos Rurales (DEFRA) del Reino Unido.

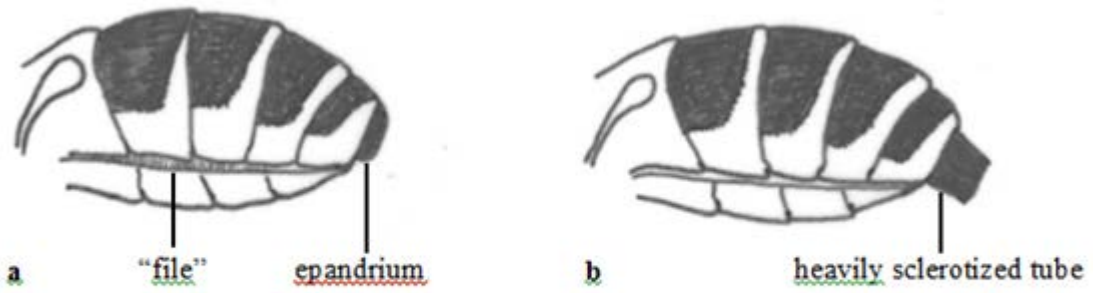
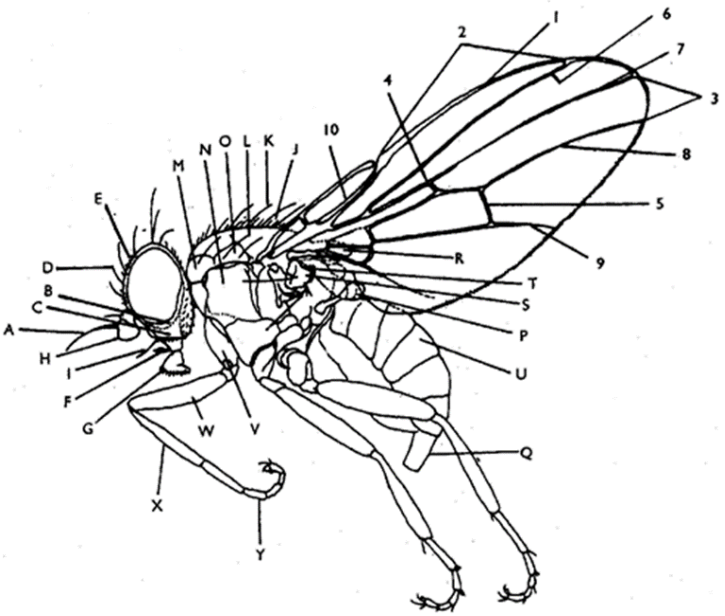


Figura 6. *Abdomen de a) macho y b) hembra de* Liriomyza.
Fotografía por gentileza del Departamento de Medio Ambiente, Alimentación y Asuntos Rurales (DEFRA) del Reino Unido.



Side view of typical *Agromyza* sp. (after SASAKAWA): A = arista, B = cheek, C = jowl, D = orbital bristles, E = orbital setulae, F = palp, G = proboscis, H = third antennal segment, I = vibrissa, J = acrostichals, K = dorso-central bristles, L = mesonotum, M = humerus, N = mesopleural area, O = notopleural area, P = haltere, Q = ovipositor sheath, R = scutellum, S = squama, T = squamal fringe, U = tergites, V = coxa, W = femur, X = tibia, Y = tarsi.
1 = costa, 2 = second costal section, 3 = fourth costal section, 4 = first cross-vein, 5 = second cross-vein, 6 = R_1, 7 = R_{4+5}, 8 = M_{1+2}, 9 = M_{3+4}, 10 = sub-costa.

Figura 7. Morfología de los adultos de Agromyzidae.
Fuente: Spencer (1973).

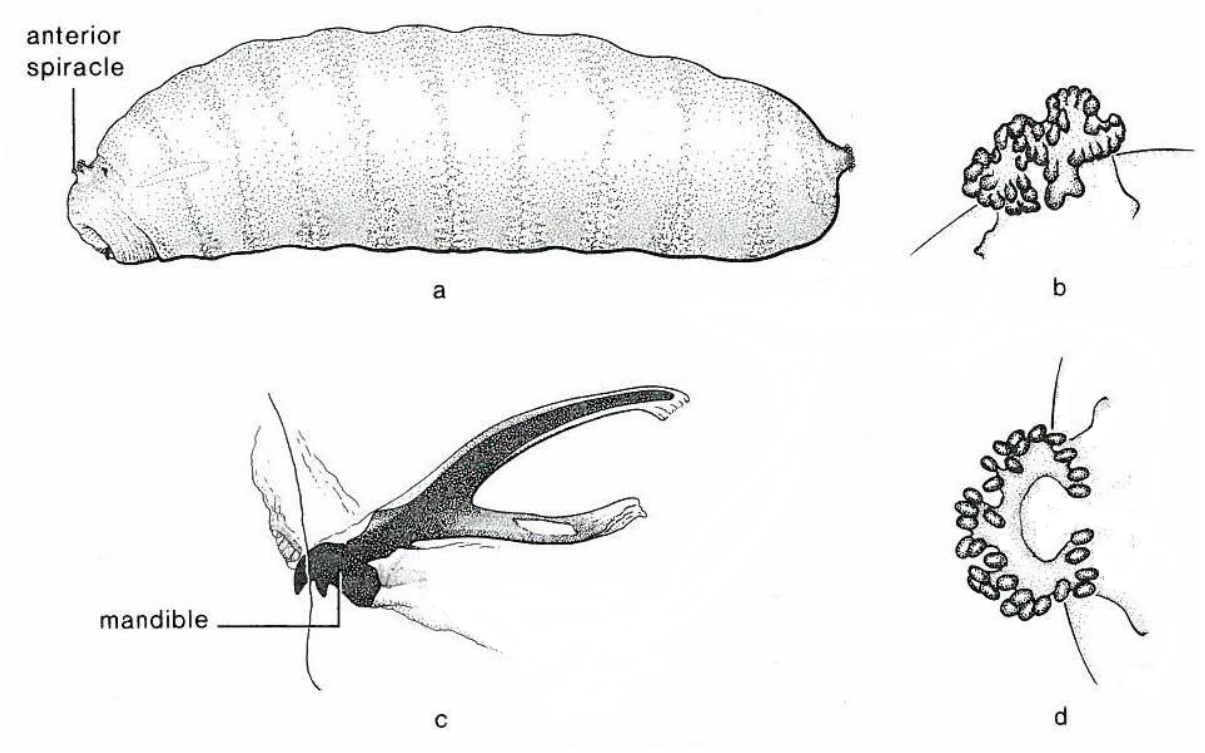


Figura 8. Morfología de las larvas de Agromyzidae (*Phytomyza chelonei*): a) vista lateral; b) espiráculo anterior; c) esqueleto cefalofaríngeo, y d) espiráculo posterior.
Fuente: Stehr (1991).

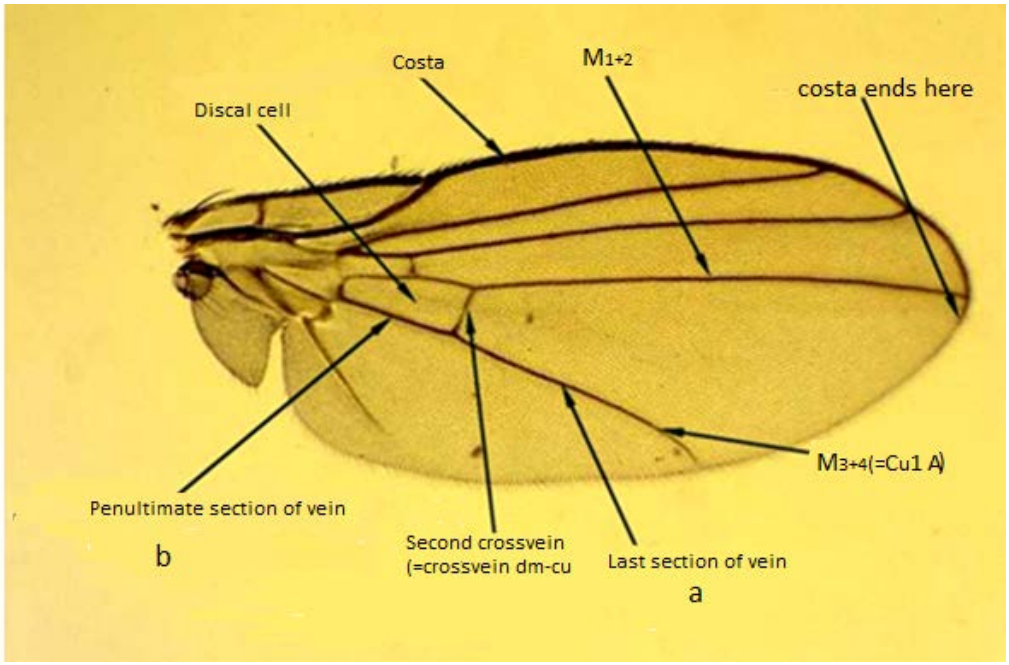


Figura 9. Venación alar de *Liriomyza*.
Fotografía por gentileza del Departamento de Medio Ambiente y Planificación de los Recursos Territoriales e Hídricos (DELWP) del Gobierno del Estado de Victoria (Australia).

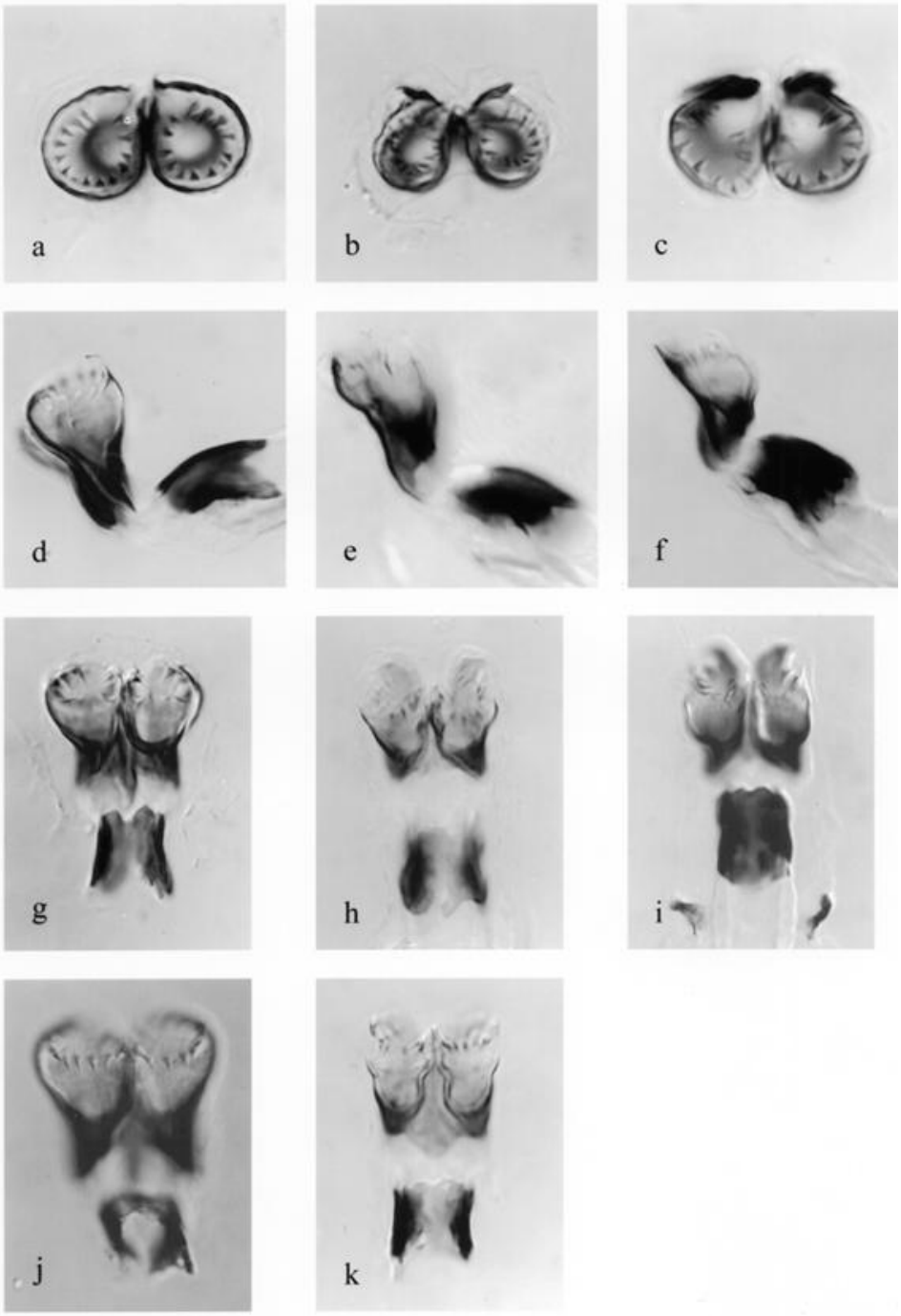


Figura 10. *Distifalo de* Liriomyza spp. (aumento de ×400): a) *L. bryoniae*, vista anterior; b) *L. huidobrensis*, vista anterior; c) *L. strigata*, vista anterior; d) *L. bryoniae*, vista lateral; e) *L. huidobrensis*, vista lateral; f) *L. strigata*, vista lateral; g) *L. bryoniae*, vista dorsoventral; h) *L. huidobrensis*, vista dorsoventral; i) *L. strigata*, vista dorsoventral; j) *L. bryoniae*, vista dorsoventral (en un plano distinto de g]), y k) *L. huidobrensis*, vista dorsoventral (en un plano distinto de h]).
Fotografía por gentileza del Departamento de Medio Ambiente, Alimentación y Asuntos Rurales (DEFRA) del Reino Unido.

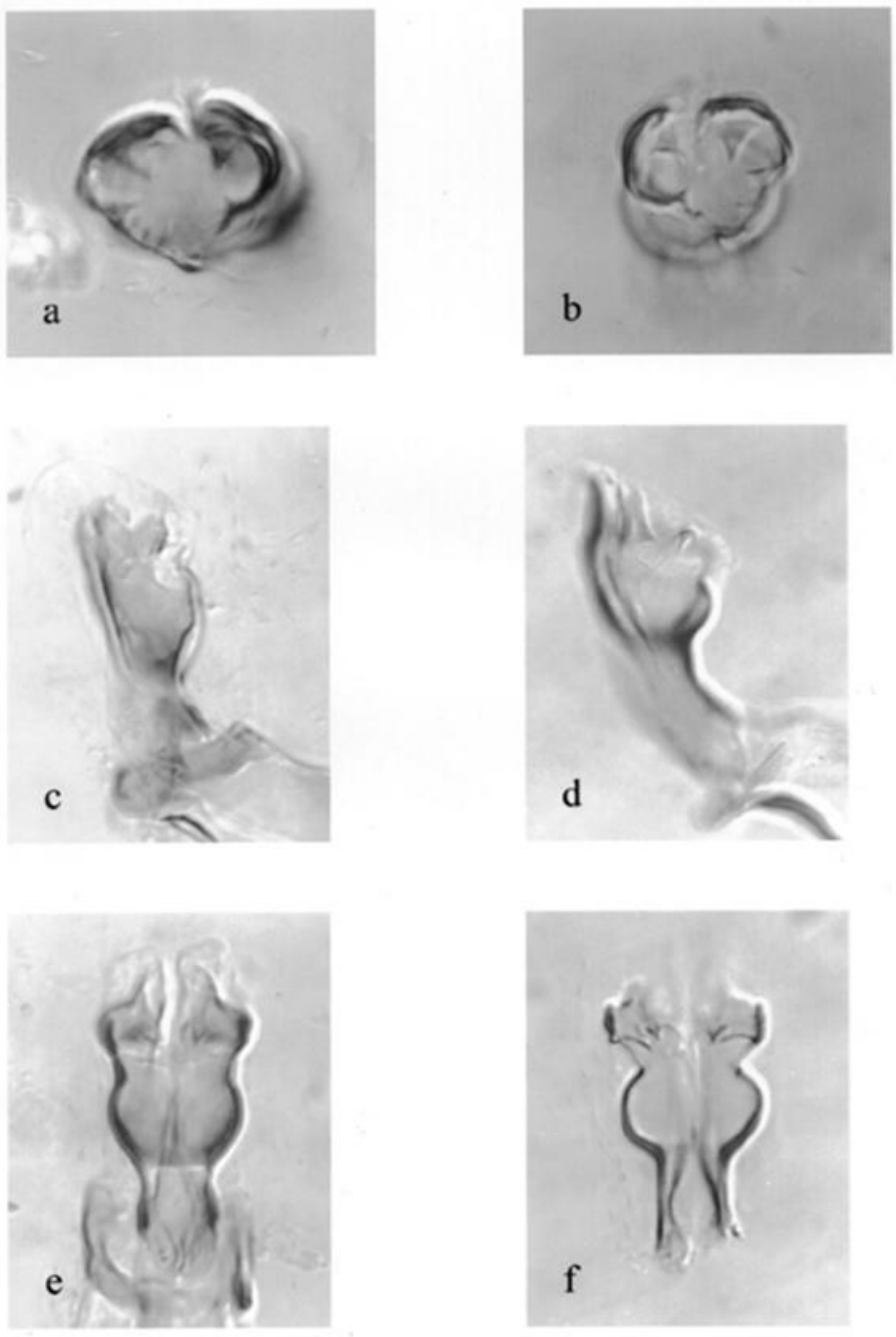


Figura 11. Distifalo de *Liriomyza* spp. (aumento de ×400): a) *L. sativae*, vista anterior; b) *L. trifolii*, vista anterior; c) *L. sativae*, vista lateral; d) *L. trifolii*, vista lateral; e) *L. sativae*, vista dorsoventral, y f) *L. trifolii*, vista dorsoventral.
Fotografía por gentileza del Departamento de Medio Ambiente, Alimentación y Asuntos Rurales (DEFRA) del Reino Unido.

Figura 12. *Pupa de* Liriomyza sp
Fotografía por gentileza del Departamento de Medio Ambiente y Planificación de los Recursos Territoriales e Hídricos (DELWP) del Gobierno del Estado de Victoria (Australia).

Figura 13. Tercer estadio larval de *L. bryoniae*
Fotografía por gentileza del Departamento de Medio Ambiente, Alimentación y Asuntos Rurales (DEFRA) del Reino Unido.

Historia de la publicación

Esta no es una parte oficial de la norma.

2006-11: El CN añadió la cuestión original: *Liriomyza spp*. (2006-017).

2007-03: En la segunda reunión de la CMF se añadió el tema al programa de trabajo (Insectos y ácaros).

2014-07: El (GTPD) examinó y aprobó el proyecto de decisión por medios electrónicos del CN con miras a su envío para consulta a los miembros.

2014-10: El CN aprobó mediante decisión por medios electrónicos el envío para consulta a los miembros (2014_eSC_Nov_12).

2015-02: Consulta a los miembros.

2016-02: Decisión por medios electrónicos del GTPD de aprobación para envío al CN a efectos de su aprobación durante el período de notificación del PD (2016_eTPDP_Feb_01).

2016-03: La decisión por medios electrónicos del CN relativa a la aprobación se presentará durante el período de notificación del PD de 45 días (2016_eSC_May_09).

2016-08: El CN aprobó el PD en nombre de la CMF (no se recibieron objeciones).

NIMF 27. Anexo 16. Género *Liriomyza* (2016). Roma, CIPF, FAO.

Última modificación de la historia de la publicación: 2017-01.

Esta página se ha dejado en blanco intencionalmente

CIPF

La Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF) es un acuerdo internacional de sanidad vegetal que tiene como objetivo proteger las plantas cultivadas y silvestres previniendo la introducción y propagación de plagas. Los viajes y el comercio internacional hoy son más abundantes que nunca antes. En el desplazamiento de personas y mercancías por todo el mundo, los acompañan organismos que representan riesgos para las plantas.

La organización

- Hay más de 180 partes contratantes de la CIPF
- Cada parte contratante tiene una organización nacional de protección fitosanitaria (ONPF) y un contacto oficial de la CIPF
- Nueve organizaciones regionales de protección fitosanitaria (ORPF) obran para facilitar la aplicación de la CIPF en los países
- La CIPF se enlaza con las organizaciones internacionales pertinentes a fin de contribuir a la creación de capacidad regional y nacional
- La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) proporciona la Secretaría de la CIPF

Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF)

Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Roma, Italia
Tel. +39 06 5705 4812 - Fax: +39 06 5705 4819
Correo electrónico: ippc@fao.org - Web: www.ippc.int