



Продовольственная и
сельскохозяйственная организация
Объединенных Наций



Международная конвенция по карантину и защите растений
Защита растительных ресурсов мира от вредных организмов

МЕЖДУНАРОДНЫЕ СТАНДАРТЫ ПО ФИТОСАНИТАРНЫМ МЕРАМ 27

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПРОТОКОЛЫ

МСФМ 27
ПРИЛОЖЕНИЕ 16

RUS

ДП 16: Род *Liriomyza*

Эта страница намеренно оставлена пустой

МСФМ 27

Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов

ДП 16: Род *Liriomyza*

Принят в 2016 году; опубликован в 2018 году

СОДЕРЖАНИЕ

1.	Информация о вредном организме	3
2.	Таксономическая информация	4
3.	Выявление	5
3.1	Сбор и сохранение образцов	6
3.1.1	Сбор имаго	7
3.1.2	Сбор преимагинальных стадий	7
4.	Идентификация	7
4.1	Идентификация имаго <i>Liriomyza</i> по морфологическим признакам	8
4.1.1	Препарирование гениталий имаго самца <i>Liriomyza</i> для микроскопического исследования	8
4.1.1.1	Определение пола мух	8
4.1.1.2	Подготовка дистифаллуса к исследованию	8
4.1.2	Идентификация семейства Agromyzidae	9
4.1.3	Идентификация рода <i>Liriomyza</i>	10
4.1.4	Идентификация видов <i>Liriomyza</i>	10
4.1.4.1	Морфологические признаки имаго <i>Liriomyza</i> spp.	10
4.1.4.2	Строение дистифаллуса имаго <i>Liriomyza</i> spp.	14
4.1.4.3	Морфологические признаки преимагинальных стадий четырех целевых видов <i>Liriomyza</i>	15
4.2	Молекулярная идентификация видов <i>Liriomyza</i>	16
4.2.1	Контроли молекулярных анализов	16
4.2.2	Выделение ДНК	16
4.2.3	Идентификация четырех целевых видов на основе ПЦР-ПДРФ анализа	17
4.2.3.1	Амплификация гена COI	17
4.2.3.2	Рестрикция и разделение продуктов рестрикции	17
4.2.4	Видоспецифичные ПЦР-праймеры для идентификации четырех целевых видов ..	18
4.2.4.1	Амплификация гена COI	19
4.2.5	Дифференциация криптических видов <i>L. langei</i> и <i>L. huidobrensis</i>	20

4.2.5.1	ПЦР-ПДРФ	20
4.2.5.2	Сравнение последовательностей ДНК.....	20
4.2.6	Баркодинг ДНК	21
5.	Данные.....	21
6.	Контактные лица для получения дополнительной информации	21
7.	Выражение признательности	21
8.	Справочные материалы	22
9.	Рисунки	25

1. Информация о вредном организме

Минирующие мухи (Agromyzidae) – семейство насекомых отряда двукрылых, мелкие мухи, чьи личинки питаются внутренними тканями растений, часто как листовые минеры и стеблевые минеры. Большинство видов агромизид специфичны для определенных растений-хозяев либо ограничиваются небольшой группой родственных растений. Тем не менее несколько видов, являющихся широкими полифагами, стали сельскохозяйственными и садово-огородными вредителями во многих частях света. К ним относятся четыре вида *Liriomyza*, которые, согласно законодательству о карантине растений разных стран, внесены в перечень карантинных объектов: *L. bryoniae*, *L. huidobrensis*, *L. sativae* и *L. trifolii*. Все они являются полифаговыми вредителями декоративных и овощных культур. В настоящем протоколе на видовом уровне идентифицируются только названные четыре вида.

Представители рода *Liriomyza* встречаются преимущественно в северной части зоны умеренного климата, но отдельные виды обнаружены также в Афротропической, Неотропической и Восточной (Индо-Малайской) зоогеографических областях. У более чем 300 видов, входящих в род *Liriomyza*, взрослые особи внешне очень схожи: это мелкие (1–3 мм длиной) мухи, с верхней стороны выглядят почти полностью черными, у большинства видов с желтыми лбом и скутеллумом (рис. 1). В результате дифференциация видов в роду может представлять затруднение. Кроме того, для идентификации четырех карантинных видов проводящий диагностику специалист должен не только провести различие между этими видами, но и отличить их от сопутствующей фауны – местных видов *Liriomyza*.

L. bryoniae является преимущественно палеарктическим видом, зарегистрированным по всей Европе и Азии и в Северной Африке – в Египте и Марокко (CABI, 2013). Это широкий полифаг, зарегистрированный на представителях 16 семейств растений (Spencer, 1990), вредитель томатов, тыквенных (в частности, дынь, арбузов и огурцов) и парниковых салата, бобов и люпина (Spencer, 1989, 1990).

L. huidobrensis, как считается, происходит из Южной Америки и в настоящее время распространился по значительной части Земли, включая районы Северной Америки, Европы, Африки, Азии и Тихоокеанского региона (Lonsdale, 2011; CABI, 2013). Однако этот вид, ранее определенный таксономически, недавно был разделен на два морфокриптических вида, *L. huidobrensis* и *L. langei*, и существует некоторая неопределенность в отношении точного разграничения их ареалов. В настоящее время *L. langei* подтвержден только в Соединенных Штатах, и весьма вероятно, что все инвазивные популяции за пределами Соединенных Штатов являются *L. huidobrensis* в его современном таксономическом определении (Scheffer and Lewis, 2001; Scheffer *et al.*, 2001; Takano *et al.*, 2008; Lonsdale, 2011). *L. huidobrensis* – широкий полифаг, зарегистрированный на представителях 14 семейств растений (Spencer, 1990). Из поражаемых этим вредителем культур наибольшее экономическое значение имеют сахарная свекла, шпинат, горох, бобы, картофель и декоративные растения (чаще всего гипсофила, в редких случаях гвоздика и хризантемы) (Spencer, 1989).

L. sativae происходит из Северной, Центральной и Южной Америки и в настоящее время распространился во многие районы Азии, Африки и Тихоокеанского региона, но в Европе и Австралии не обнаружен (Lonsdale, 2011; CABI, 2013). Однако данные о распространении *L. sativae*, вероятно, неполны, поскольку есть свидетельства того, что этот вид продолжает быстро расширять свой ареал. Это еще один широкий полифаг, поражающий многие овощные и цветочные культуры (Spencer, 1973, 1990). Зарегистрирован на представителях девяти семейств растений, но встречается главным образом на хозяевах из семейств тыквенных, бобовых и пасленовых (Spencer, 1973, 1990).

L. trifolii, также происходящий из Северной, Центральной и Южной Америки, распространился в значительные части Европы, Африки, Азии и Тихоокеанского региона, скорее всего, в результате торговли срезанными хризантемами (Martinez and Etienne, 2002; Lonsdale, 2011; CABI, 2013). Это еще один широкий полифаг, зарегистрированный на представителях 25 семейств растений (Spencer, 1990). Из поражаемых этим вредителем культур наибольшее экономическое значение имеют бобы, сельдерей, хризантемы, огурцы, герберы, гипсофила, салат, лук, картофель и томаты (Spencer, 1989).

Еще один, пятый вид, *L. strigata*, включен в настоящий диагностический протокол, поскольку близок к *L. bryoniae* и *L. huidobrensis* и, значит, является видом, который специалист должен учитывать при проведении дифференцирующего диагноза четырех карантинных видов. *L. strigata* является евразийским видом (Pitkin *et al.* (n.d.), цит. Spencer (1976), Dempewolf (2001), Ellis (2013) и Rare *et al.* (2013). Восточные границы распределения этого вида не определены с точностью, но его ареал простирается за Уральские горы (Spencer, 1976); недостоверные находки зарегистрированы в Юго-Восточной Азии (Dempewolf, 2004). Это широкий полифаг, зарегистрированный на представителях 29 семейств растений во всем мире (Spencer, 1990).

2. Таксономическая информация

Название: *Liriomyza* Mik, 1894

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

Таксономическое положение: Insecta, Diptera, Agromyzidae, Phytomyzinae

Название: *Liriomyza bryoniae* (Kaltenbach, 1858)

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

Общепринятое название: пасленовый минер; tomato leafminer (англ.)

Название: *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard, 1926)

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

Таксономическое отношение между *L. huidobrensis* (Blanchard) и *L. langei* Frick является сложным. *L. huidobrensis* был впервые описан по образцам, обнаруженным Blanchard на растениях рода *Cineraria* в Аргентине (1926). Frick (1951) описал *L. langei* из Калифорнии как вид, который, как он отметил, был вредителем главным образом гороха, хотя повреждал также растения семейства астровых. В 1973 году Spencer синонимизировал два этих вида, поскольку они были (и фактически остаются) морфологически неразличимы. После изучения последовательностей их митохондриальной и ядерной ДНК (Scheffer, 2000; Scheffer and Lewis, 2001), позднее подтвержденного экспериментами по выращиванию преимагинальных стадий (Takano *et al.*, 2008), два эти вида были разделены формально как два криптических вида (Lonsdale, 2011). Название *L. langei* Frick было восстановлено и применено к криптическому виду из Калифорнии, название *L. huidobrensis* (Blanchard) было применено к криптическому виду из Южной и Центральной Америки.

Lonsdale (2011) попытался описать диагностические морфологические признаки, по которым можно было бы дифференцировать "большинство" экземпляров этих двух видов, но обнаружил, что признаки "слабо выражены и в ряде случаев частично совпадают", поэтому рекомендовал по мере возможности использовать для подтверждения идентификации данные молекулярного анализа. Scheffer и ее соавторы считают, что ареалы двух видов не пересекаются (хотя Lonsdale (2011) обнаружил *L. huidobrensis* в Калифорнии, один раз в 1968 году и один раз в 2008 году, он пишет, что неизвестно, закрепились ли популяции) и все из инвазионных популяций, которые они изучали, относились к *L. huidobrensis* (Scheffer and Lewis, 2001; Scheffer *et al.*, 2001). Это означает, что сообщения из Калифорнии в литературе, предшествовавшие статьям Scheffer, следует почти с полной уверенностью считать относящимися к *L. langei*. *L. langei* является преимущественно калифорнийским видом, хотя он явно был интродуцирован в штатах Гавайи, Орегон и Вашингтон; популяции, обнаруженные во Флориде, Юте и Виргинии в середине 1990-х, не закрепились (Lonsdale, 2011). В Мексике подтверждено нахождение только *L. huidobrensis* (Lonsdale, 2011), но Takano *et al.* (2005) сообщили, что экземпляры *L. langei* (определенные как калифорнийская клада) были выявлены в Японии при фитосанитарной проверке на свежих овощах мексиканского происхождения.

Общепринятые названия: южноамериканский листовой минер; serpentine leafminer, pea leafminer, potato leafminer fly (англ.)

Название: *Liriomyza sativae* Blanchard, 1938

Синонимы: *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 guytana* Freeman, 1958; *Lemurimyza lycopersicae* Pla and de la Cruz, 1981

Общепринятые названия: овощной листовой минер; vegetable leafminer, American leafminer, chrysanthemum leafminer, serpentine vegetable leafminer, melon leafminer (англ.)

Название: *Liriomyza trifolii* (Burgess, 1880)

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

Общепринятые названия: американский клеверный минер; American serpentine leafminer, serpentine leaf miner, broad bean leafminer, Californian leafminer, celery leafminer, chrysanthemum leaf miner (англ.)

3. Выявление

Как правило, первыми и наиболее очевидными признаками присутствия *Liriomyza* являются пищевые проколы и листовые мины. В то время как полностью сформированные мины должны быть хорошо заметны сотрудникам карантинной службы, ранние симптомы поражения гораздо менее очевидны и их легко проглядеть (Spencer, 1989). Мины остаются целыми и в относительно неизменном виде в течение недель. Конфигурацию мин часто считают надежным ключом к идентификации видов агромизид (поскольку во многих случаях речь идет о специфичных к хозяину видах). Однако в случае с вредителями-полифагами на конфигурацию мин влияют растение-хозяин, физическое и физиологическое состояние листа и количество личинок,

минирующих один лист. Такая широкая вариабельность означает, что к идентификации только по конфигурации мин следует относиться с осторожностью (EPPO, 2005). Примеры конфигурации мин для четырех карантинных видов и *L. strigata* приводятся на рис. 2–4.

Самки используют яйцеклад для прокалывания листьев растений-хозяев, вызывая повреждения, которые служат участками для питания и самцов, и самок или для откладывания яиц. Пищевые проколы, сделанные видами *Liriomyza*, закругленные, обычно около 0,2 мм в диаметре и выглядят как белые пятнышки на верхней стороне листовой пластинки. Проколы для откладывания яиц (яйцевые проколы) обычно меньше (0,05 мм) и более правильной округлой формы. Пищевые проколы, сделанные полифаговыми вредителями из семейства агромизид *Chromatomyia horticola* и *Chromatomyia syngenesiae*, по форме ближе к овалу и заметно больше, чем сделанные мухами из рода *Liriomyza*. Вид пищевых и яйцевых проколов у видов *Liriomyza* не отличается, и рисунок их распределения на листе не может использоваться для идентификации видов. Пищевые проколы вызывают разрушение большого числа клеток и хорошо заметны невооруженным глазом (EPPO, 2005).

Личинки питаются главным образом в верхней части листовой пластинки, прокладывая мины в зеленой палисадной паренхиме. Мины обычно грязно-белые, с экскрементами, которые выглядят как черные прерывистые полоски вдоль хода мины. Множественные повороты мины, сосредоточенные на одном небольшом участке листа, часто приводят к изменению цвета мины, с влажными черными и высохшими бурыми участками, как правило, появляющимися в результате индуцированных растением реакций на листового минера (EPPO, 2005).

Все три личиночные стадии питаются внутренними тканями листьев. Личинки преимущественно питаются на растении, в котором отложены яйца. Личинки *Liriomyza* spp. покидают лист, когда готовы к образованию пупария (Parrella and Bethke, 1984), и их выходные отверстия обычно имеют форму полукруглой щели; напротив, личинки *C. horticola* и *C. syngenesiae* окукливаются внутри листа в конце личиночной мины, с передними дыхальцами, обычно выступающими из нижней поверхности листа. Поэтому пупарии *Liriomyza* spp. можно обнаружить в растительных остатках, в почве и иногда на поверхности листа.

В зависимости от стадии развития образцы собирают на различных участках растения и под растением:

- яйца: непосредственно под поверхностью листа;
- личинки: внутри листовых мин;
- куколки: в растительных остатках, в почве и иногда на поверхности листьев;
- имаго: свободнолетающие или на поверхности листьев, где они делают проколы для питания или откладывания яиц.

3.1 Сбор и сохранение образцов

Образцы мух *Liriomyza* можно собирать на преимагинальных стадиях вместе с образцами минированных листьев или на стадии имаго. Поскольку морфологические признаки, используемые для видовой диагностики, основываются на анализе гениталий самцов, для подтверждения идентификации вида необходимы самцы в стадии имаго. Зачастую самок в стадии имаго можно с уверенностью идентифицировать только на уровне рода. Массовый сбор образцов с растения или участка повысит вероятность получения самцов, что важно в тех случаях, когда для диагностики преимагинальных стадий молекулярные анализы не используются.

3.1.1 Сбор имаго

Обычно имаго можно обнаружить на листьях и собрать вручную или сачком смеси с листьев в стеклянные банки, либо использовать эксгаустер. Другим способом является сбор на желтые клеевые ловушки, в особенности в теплицах. Однако самым практичным и надежным методом сбора таких листовых минеров, как виды *Liriomyza*, является сбор листьев с минами, содержащими живых личинок. Листья помещают в большой сосуд для выращивания имаго в лабораторных условиях. Методы выращивания агромизид описаны у Griffiths (1962) и Fisher *et al.* (2005).

Имаго и личинок можно поместить в 70%-й раствор этилового спирта и хранить неопределенно долгое время, хотя со временем их окраска постепенно тускнеет. Пробирки с заспиртованными образцами герметически закрывают во избежание протечек и, проложив амортизирующим материалом, укладывают в прочную коробку. Возможно также хранение имаго в сухом виде, например, смонтированными на булавках.

Образцы для молекулярной диагностики замаривают и помещают в 96–100%-й этиловый спирт, хранят в замороженном виде (при температуре около -20 или $-4,0$ °C) или на картах FTA (ватман)¹ (Blackett *et al.*, 2015).

3.1.2 Сбор преимагинальных стадий

Если предполагается сбор и хранение образцов растений, листья с подозрительными проколами в местах питания или с минами срывают и помещают между газетными страницами, чтобы обеспечить медленное высыхание.

Листья с минами, из которых в целях идентификации планируется вырастить образцы в лаборатории для получения насекомых на разных стадиях развития, в особенности имаго, необходимо завернуть в увлажненную, но не мокрую, лабораторную салфетку и отправить в лабораторию в запечатанных пакетах, ламинированных амортизирующим материалом. В лаборатории листья с минами, содержащими живых насекомых, помещают в чашки Петри с вкладышами из влажной фильтровальной бумаги, закрывают и ставят в инкубатор с температурой около 23 °C (чашки проверяют каждые 2 или 3 дня, удаляя листья с признаками появления плесени, бактерий и т.д.).

4. Идентификация

Идентификация видов листовых минеров по морфологическим признакам ограничивается взрослыми самцами, поскольку не существует надежных ключей для определения вида взрослых самок или яиц, личинок и куколок. Идентификация имаго возможна по морфологическим признакам, в частности, по гениталиям самца. Морфологические признаки гениталий самца изучают под микроскопом с большим увеличением (около 100×). Использование настоящего протокола с препаратами хорошего качества позволяет с уверенностью идентифицировать имаго четырех карантинных видов *Liriomyza* только по морфологическим признакам (за исключением *L. huidobrensis* и *L. langei*, по причинам, описанным в разделе 1).

Молекулярные анализы для идентификации можно проводить с образцами на всех стадиях развития, включая преимагинальные, для которых морфологическая идентификация до уровня вида невозможна. Кроме того, в случаях атипичных или поврежденных образцов имаго молекулярные анализы могут предоставить дополнительную информацию. Однако специфичность молекулярных анализов может быть ограниченной, поскольку такие анализы придется разрабатывать в соответствии с требуемой целью и оценивать на основе ограниченного числа видов, используя образцы из различных географических регионов. Поэтому результаты молекулярных анализов необходимо интерпретировать с осторожностью.

4.1 Идентификация имаго *Liriomyza* по морфологическим признакам

Для положительной идентификации любого из четырех определяемых видов *Liriomyza* необходимо изучение гениталий самцов (в частности, дистифаллуса (рис. 5)). Ниже приводится краткое описание метода препарирования образцов (основан на работе Malipatil и Ridland, 2008), который дает удовлетворительные результаты. Более подробное описание метода и его варианты приводится у Spencer (1981, 1992), Spencer and Steyskal (1986) и EPPO (2005). Для подтверждения идентификации вида данные изучения дистифаллуса следует сопоставить с данными анализа внешних морфологических признаков (таблица 1).

4.1.1 Препарирование гениталий имаго самца *Liriomyza* для микроскопического исследования

4.1.1.1 Определение пола мух

У самца лопасти эпандрия (эпандрий темный, покрыт щетинками, не так сильно склеротизирован, как трубка яйцеклада самки) огибают заднюю часть брюшка от дорсальной к вентральным сторонам (рис. 6(a)). Между лопастями заметно щелеобразное, треугольное при более широком раскрытии отверстие, в котором можно видеть остальной генитальный аппарат. Лопастии слегка выступают за последний тергит. У самки брюшные сегменты за 6-м сегментом образуют черную, сильно склеротизированную трубку, которая выступает за 6-й тергит (рис. 6(b)), с круглым отверстием, заметным при виде сзади на конце трубки. Шестой тергит покрывает базальную половину трубки сверху, но заметен при виде сбоку и снизу.

4.1.1.2 Подготовка дистифаллуса к исследованию

Для осветления тканей и исследования брюшко следует аккуратно отделить с помощью тонких препаровальных игл (иглы можно изготовить, приклеив микробулавки тупыми концами к спичкам, предварительно сделав в спичках небольшие углубления с помощью обычной булавки). Брюшко в течение 2–4 мин кипятят в 10%-м растворе едкого кали (КОН) или едкого натра (NaOH) либо оставляют на ночь в холодном 10%-м растворе КОН или NaOH для просветления тканей. Обработанный брюшко переносят в ванночку с дистиллированной водой для нейтрализации КОН или NaOH. После этого брюшко готов к помещению в каплю глицерина на предметном стекле с лункой.

Тонкими препаровальными иглами под стереомикроскопом генитальный комплекс аккуратно отделяют от окружающих мембран, кутикулы и мышц. При помощи препаровальных игл генитальный комплекс располагают для просмотра в латеральной проекции под прямой микроскоп с увеличением до 400 раз. Генитальный комплекс поворачивают для просмотра дистифаллуса с вентральной стороны при увеличении в 400 раз, без покровного стекла. Дистифаллус необходимо рассматривать в различных проекциях (например, латеральной, дорсальной, вентральной), что требует поворачивания при меньшем увеличении.

Для приготовления полупостоянных препаратов (например, для рутинной идентификации) генитальный комплекс помещают в каплю глицерина на чистом плоском предметном стекле. Гениталии аккуратно погружают в гистологическую среду и плавно накрывают круглым покровным стеклом, равномерно распределяя среду.

Если требуются постоянные препараты, брюшко осветляют в КОН и нейтрализуют в холодной ледяной уксусной кислоте, как описано выше. Затем брюшко переносят в 70%-й раствор этилового спирта и, используя тонкие препаровальные иглы под бинокулярным стереомикроскопом, аккуратно отделяют от окружающих мембран, кутикулы и мышц. Препарированные гениталии сначала на 2–4 мин помещают в абсолютный этиловый спирт, затем

в гвоздичное масло (в котором они при необходимости могут храниться в течение неограниченного времени). Гениталии помещают в 70%-й этиловый спирт (примерно на 10 мин), затем в 95%-й этиловый спирт (примерно на 10 мин) и в конце в гвоздичное масло (не меньше чем на 5 мин). После этого гениталии можно монтировать для постоянного хранения на предметном стекле в капле канадского бальзама под покровным стеклом. Все микропрепараты должны быть снабжены этикеткой с указанием точного места и даты сбора, растения-хозяина, фамилии сборщика (если известно), названия вида, фамилии проводившего идентификацию специалиста и с перекрестной ссылкой на оставшийся образец.

Оставшийся образец монтируют на плашку с соответствующей этикеткой, содержащей ссылку на препарат гениталий.

4.1.2 Идентификация семейства *Agromyzidae*

Семейство *Agromyzidae* распространено во всем мире и насчитывает около 2500 видов (Spencer, 1989, 1990). Подробное описание морфологии агромизид приводится у Spencer (1972, 1973, 1987), Dempewolf (2004) и Boucher (2010).

В настоящем протоколе морфологическая терминология придерживается терминологии, используемой Yeates *et al.* (2004); на указанном онлайн-ресурсе также представлены четкие иллюстрации по анатомии типичной мухи группы *Acalyrtratae* (в которую входят *Agromyzidae*).

Семейство *Agromyzidae* определяется следующим сочетанием признаков (Hennig, 1958; Spencer, 1987; Boucher 2010) (рис. 7):

- имаго небольшого размера, от 1 до 6 мм длиной, но обычно 1–3 мм;
- вибриссы присутствуют;
- фронтальные щетинки от 1 до 7 присутствуют;
- перерыв костальной жилки у вершины субкостальной жилки присутствует;
- задняя кубитальная ячейка маленькая; жилки A_1+CuA_2 не доходят до края крыла;
- у самца прегенитальные склериты со сросшимся дорсальным комплексом из тергитов 6–8, всего с двумя дыхальцами между 5-м тергитом и генитальным сегментом;
- у самок передняя часть 7-го абдоминального сегмента образует яйцеклад.

Как правило, личинки (рис. 8(a)) цилиндрической формы, суживающейся кпереди, с выростами, несущими передние и задние дыхальца (рис. 8(b) и (d)), передние дыхальца находятся на дорсальной поверхности проторакса, задние направлены кзади. У личинок имеется сильно склеротизированный ротовой аппарат; мандибулы с их продольной осью расположены под почти прямыми углами к остальному цефалофарингеальному скелету (рис. 8(c)) и обычно несут две или более пары направленных кпереди зубцов одинакового размера, с вентральными рогами (направленные кзади парные выросты), которые обычно короче дорсальных.

На практике агромизид распознают по личинкам, которые питаются тканями живых растений (три четверти представителей семейства являются листовыми минерами). Однако листовые минеры есть и в других семействах отряда *Diptera*, таких как *Anthomyiida* и *Drosophilidae*. Сводную информацию о морфологии и биологии преимагинальных стадий агромизид, обширную библиографию и рисунки цефалофарингеального скелета и задних дыхалец ряда видов см. у Ferrar (1987).

4.1.3 Идентификация рода *Liriomyza*

Имаго видов рода *Liriomyza* отличаются следующими морфологическими признаками (EPPO, 2005; Spencer, 1976):

- фронтоорбитальные щетинки отклонены кзади;
- у большинства видов темный участок перед скутеллумом одного цвета со скутеллумом, изредка желтый;
- скутеллум желтый у большинства видов, изредка темный;
- субкостальная жилка на дистальном крае крыла заканчивается складкой и впадает в костальную жилку отдельно от радиальной жилки;
- костальная жилка доходит до жилки M_{1+2} ;
- дискальная ячейка (dm) маленькая;
- вторая (внешняя) поперечная жилка (dm-cu) у большинства видов присутствует;
- у самцов имеется стридуляционный орган (т.н. "скребок", хитинизированный гребень на задних бедрах, и "напильник", полоска невысоких хитинизированных чешуек на соединительной перепонке между абдоминальными тергитами и стернитами).

На практике большинство видов *Liriomyza* (в том числе четыре вида, включенных в настоящий диагностический протокол) сверху окрашены по большей части в черный цвет, с желтым лбом и ярко-желтым скутеллумом. Ноги различных оттенков желтого. Целевые виды обладают типичными особенностями жилкования крыльев (рис. 9) и типичным для рода строением гениталий самца.

Несколько родов можно спутать с *Liriomyza*. Близкородственные роды *Phytomyza*, *Chromatomyia* и *Phytoliriomyza* в целом можно отличить от *Liriomyza* по их наклоненным кпереди фронтоорбитальным щетинкам (всегда наклоненным кзади или изредка вертикальным либо отсутствующим у *Liriomyza*), и скутеллуму, как правило, серого или черного цвета, но изредка слегка желтоватому в центральной части (полностью желтому у большинства *Liriomyza*). У *Phytomyza* и *Chromatomyia* костальная жилка доходит только до R_{4+5} , тогда как у *Phytoliriomyza* и *Liriomyza* она доходит до жилки M_{1+2} (Spencer, 1977). Питающийся внутренними тканями растений вид *Phytoliriomyza* является галлообразующим (галлы на стебле или листе), в то время как виды *Chromatomyia*, *Phytomyza* и *Liriomyza* являются обычно листовыми минерами.

4.1.4 Идентификация видов *Liriomyza*

4.1.4.1 Морфологические признаки имаго *Liriomyza* spp.

Упрощенное описание основных диагностических признаков для *L. bryoniae*, *L. huidobrensis*, *L. sativae* и *L. trifolii* (а также, в целях исключения при диагностике, для *L. strigata*) приведено в Таблице 1. Описание сопровождается изображениями (микрофотографии) дистифаллуса на рис. 10 и 11.

Более подробные описания и изображения морфологических признаков данных видов приводятся у Spencer (1965, 1973), Dempewolf (2004), Malipatil *et al.* (2004) и Shiao (2004). Ключевые диагностические признаки приводятся в библиотеке изображений Pest and Disease Image Library (PaDIL) (Malipatil 2007a, 2007b, 2007c).

Идентифицировать имаго также можно, используя определительную таблицу. Malipatil and Ridland (2008) представили ключи к определению 17 имеющих экономическое значение видов, включая несколько видов, эндемичных для Австралии. Кроме того, основанная на микрофотографиях система идентификации видов-вредителей из разных регионов мира приводится в работе Dempewolf (2004). Что касается ключей для видов *Liriomyza*, в работах Spencer представлен

обширный перечень справочников, изданных в регионах за разные годы, и определительных таблиц. Они охватывают сопутствующую фауну, которая, безусловно, различается от региона к региону и влияет на процесс исключения нецелевых таксонов. Полный перечень этих публикаций приводится Spenser (1973). Кроме того, информация о растении-хозяине, на котором были обнаружены предположительно карантинные виды *Liriomyza*, может помочь идентификации, исключив из рассмотрения другие виды агромизид, которые могут встречаться в тех же биологических условиях (например, для Европы см. Ellis (n.d.)).

Таблица 1. Морфологические признаки имаго отдельных видов *Liriomyza*[†]

	<i>L. bryoniae</i>	<i>L. huidobrensis</i> [†]	<i>L. sativae</i>	<i>L. strigata</i>	<i>L. trifolii</i>
Дистифаллус самца	Два дистальных бульбуса; края бульбусов круглые	Два дистальных бульбуса смыкаются только краями; края бульбусов вытянуты антеровентрально	Один дистальный бульбус с легкой перетяжкой между верхней и нижней половинами в дорсовентральной проекции; бульбус выглядит более склеротизированным, с более коротким базальным стволем	Два дистальных бульбуса смыкаются от краев до оснований; края бульбусов вытянуты антеровентрально	Один дистальный бульбус с четко выраженной перетяжкой между верхней и нижней половинами в дорсовентральной проекции; бульбус выглядит менее склеротизированным, с удлиненным базальным стволем
Вертикальные щетинки	Обе теменные щетинки на желтом фоне	Обе теменные щетинки на черном фоне	Наружная вертикальная щетинка на черном фоне, который может достигать вплоть до внутренней вертикальной щетинки, расположенной на желтом фоне	Черная окраска за глазами достигает как минимум до наружной вертикальной щетинки, но внутренняя вертикальная щетинка на желтом фоне	Обе теменные щетинки на желтом фоне
Мезоплебра	Преимущественно желтый, небольшое черное пятнышко на передней стороне нижнего края	Желтый с черным пятном, размеры которого варьируют, обычно охватывающим нижние три четверти	Преимущественно желтый, с темным участком, размер которого варьирует от маленькой полоски вдоль нижнего края до пятна по всему нижнему краю, сильно заходящему на переднюю часть и слегка – на заднюю	Желтый, с черным пятном, размеры которого варьируют, на нижнем и переднем краях пятно может простирается вдоль всей нижней половины	Желтый, с маленьким черновато-серым пятнышком на передней стороне нижнего края
Жилка Cu1A	a вдвое больше b	a в 2–2,5 раза больше b	a в 3–4 раза больше b	a в 2–3 раза больше b	a в 3–4 раза больше b
Третий сегмент усика	Маленький желтый	Слегка увеличен, обычно затемнен	Маленький желтый	Маленький желтый	Маленький желтый

	<i>L. bryoniae</i>	<i>L. huidobrensis</i> [†]	<i>L. sativae</i>	<i>L. strigata</i>	<i>L. trifolii</i>
Лоб и орбиты	Лоб ярко-желтый, орбиты слегка светлее	Лоб желтый, как правило, более оранжевый, чем бледно-лимонно-желтый; верхние орбиты слегка затемнены по меньшей мере до верхних орбитальных щетинок	Лоб и орбиты ярко-желтые	Лоб и орбиты желтые	Лоб и орбиты желтые
Бедро	Ярко-желтое с отдельными коричневатыми штрихами	Желтое, с варьирующим затемнением, с черными штрихами	Ярко-желтое	Желтое с отдельными коричневатыми штрихами	Желтое, иногда со слабо выраженными коричневатыми штрихами
Мезонотум	Черный, по большей части блестящий, но с отчетливым матовым оттенком	Черный матовый	Черный блестящий	Черный блестящий, но слегка матовый	Черный матовый с серым оттенком
Абдоминальные тергиты самца	Второй и третий видимые тергиты разделены желтым медиальным швом	Только второй видимый тергит разделен желтым медиальным швом	Только второй видимый тергит разделен желтым медиальным швом	–	Видимые тергиты со второго по пятый разделены желтым медиальным швом
Длина крыла	1,75–2,1 мм	1,7–2,25 мм	1,3–1,7 мм	1,8–2,1 мм	1,3–1,7 мм

Источник: на основе данных Spencer (1973, 1976), с информацией по дистифаллусу из EPPO (2005) и информацией по абдоминальным тергитам самца из Shiao (2004) (который не включил *L. strigata* в свой анализ).

[†] См. также рис. 7–11.

[‡] *L. langei* морфологически не отличим от *L. huidobrensis*.

4.1.4.2 Строение дистифаллуса имаго *Liriomyza* spp.

Рассматриваемые в настоящем диагностическом протоколе виды *Liriomyza* разделяются на две отдельные естественные группы на основании строения гениталий самца (в частности, дистифаллуса), а также по окраске тела и строению задних дыхалец личинки:

- группа 1: *L. bryoniae*, *L. huidobrensis* и *L. strigata*;
- группа 2: *L. sativae* и *L. trifolii*.

Тем не менее внешние признаки имаго, пригодные для идентификации (таблица 1), в частности, те, что основаны на окраске, не могут быть однозначно соотнесены ни с одной из этих двух групп.

Дистифаллус – очень маленькая, хрупкая структура, окруженная мембранами. Это конечная часть эдеагуса (копулятивный орган, часть гениталий самца) (рис. 5), и его сложное трехмерное строение имеет большую диагностическую ценность. Фактически дистифаллус является единственным признаком, по которому все четыре целевых вида могут быть достоверно идентифицированы. Основа строения дистифаллуса различается у двух естественных групп видов: в группе 1 у дистифаллуса имеются два дистальных расширения (бульбусы), расположенных рядом (рис. 10), тогда как в группе 2 имеется только один дистальный бульбус, с перетяжкой в середине, разделяющей его на четко выраженные нижнюю и верхнюю части (рис. 11). Ниже приводится определитель, облегчающий идентификацию четырех целевых видов на основе строения дистифаллуса. Для удобства пользования определитель также включает *L. strigata*, вид, который находится в тесном родстве с *L. bryoniae* и *L. huidobrensis* и также является полифагом, поэтому может быть обнаружен на тех же растениях-хозяевах.

Тем не менее различия между некоторыми парами видов малозаметны, и во избежание неверной диагностики по дистифаллусу подтверждающие данные по структуре дистифаллуса должны пройти перекрестную проверку с подтверждающими морфологическими данными (Таблица 1). Если все подтверждающие данные согласуются, все другие виды *Liriomyza*, в том числе не обсуждающиеся здесь, можно исключить.

Определительная таблица для идентификации *Liriomyza* spp. по дистифаллусу

Данная определительная таблица должна использоваться вместе с рис. 10 и 11.

1. С одним дистальным бульбусом (рис. 11 е, ф)).....2
- С парой дистальных бульбусов (рис. 10 а)–с), г)–к)).....3
2. С четко выраженной перетяжкой между верхней и нижней половинами бульбуса: базальная часть заметно закруглена (рис. 11 ф)).....*L. trifolii*
- Со слабо выраженной перетяжкой только между верхней и нижней половинами бульбуса: базальная часть закруглена незначительно (рис. 11 е)).....*L. sativae*
3. Края бульбусов круглые (не вытянуты антеровентрально); равномерно склеротизированы (рис. 10(а)).....*L. bryoniae*
- Края бульбусов закручиваются по спирали (вытянуты антеровентрально) (рис. 10 б), с)).....4

4. Бульбусы смыкаются по осевой линии только краями (рис. 10 h)).....*L. huidobrensis**

– Бульбусы смыкаются по осевой линии от краев до оснований (рис. 10 i)).....*L. strigata*

* *L. langei* морфологически неотличим от *L. huidobrensis*.

4.1.4.3 Морфологические признаки преимагинальных стадий четырех целевых видов *Liriomyza*

Из четырех стадий развития (яйцо, личинка, куколка и имаго) только имаго самцов могут быть положительно идентифицированы по морфологическим признакам (форма гениталий самца) до уровня вида. Морфологические особенности личинок и куколок можно использовать для различения представителей двух естественных групп, описанных в разделе 4.1.4.2. Такое различие может помочь идентификации видов, но само по себе не является достаточным для такой идентификации. Чтобы дополнить идентификацию по морфологическим признакам, для дифференциации видов, включенных в настоящий диагностический протокол, могут использоваться молекулярные анализы (раздел 4.2).

Яйца

Яйца откладываются в листовую ткань. Яйца белые, овальные, около 0,25 мм в длину. Родовая и видовая идентификация по яйцам невозможна.

Личинки и куколки

В процессе развития личинка проходит три стадии, которые питаются, прокладывая туннели в листовой ткани. Свежеотрожденные личинки около 0,5 мм длиной, личинки последнего возраста достигают 3,0 мм в длину. На последней стадии развития личинки типичны для агромизид (см. раздел 4.1.2). Куколки (рис. 12) овальные, цилиндрической формы, около 2,0 мм длиной, очень слабо уплощены с вентральной стороны, с выступающими передними и задними дыхальцами. На практике естественные группы 1 и 2 можно морфологически различить по личинкам и куколкам (но не на уровне видов в группах) по следующим признакам.

Личинки группы 1

Личинки *L. bryoniae*, *L. huidobrensis* и *L. strigata* кремового цвета, но на последней стадии развития у них на дорсальной стороне переднего конца появляется желто-оранжевое пятно, которое может заходить на вентральную сторону (рис. 13). Каждое заднее дыхальце представляет собой овал с порами по краям. Подсчет числа пор может представлять затруднение; согласно Spence (1973), их число составляет: *L. bryoniae* – 7–12 пор; *L. Huidobrensis* – около 6–9 пор; *L. Strigata* – 10–12 пор. Окраска пупариев варьирует от желто-оранжевой до темно-коричневой. Окраска пупариев *L. bryoniae* и *L. strigata* преимущественно, но не всегда, находится в более светлой части этого цветового диапазона. Окраска пупариев *L. huidobrensis* преимущественно стремится к угольно-черной. Форма дыхалец личинки сохраняется на пупарии, хотя поры менее четко различимы.

Личинки группы 2

Личинки *L. sativae* и *L. trifolii* при отрождении прозрачные, затем все тело желтеет до желто-оранжевого цвета. Задние дыхальца имеют форму треугольника с выпуклыми гранями и вытянутыми углами, с тремя порами, каждая на отдельном выступе, две внешние поры вытянутые. Пупарии желтовато-оранжевые, иногда темно-золотисто-коричневые. Форма дыхалец личинки сохраняется на пупарии, но детали менее выражены.

4.2 Молекулярная идентификация видов *Liriomyza*

Для идентификации видов *Liriomyza* использовались различные молекулярные анализы, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР), включая анализ полиморфизма длин фрагментов рестрикции (ПДРФ) ПЦР, анализ по конечной точке с использованием видоспецифических праймеров, ПЦР в режиме реального времени и сравнение последовательностей ДНК. Ниже описываются те из этих методов, которые могут использоваться для выявления различий между четырьмя целевыми видами (т.е. *L. bryoniae*, *L. huidobrensis*, *L. sativae* и *L. trifolii*) или между *L. huidobrensis* и *L. langei*.

В настоящем диагностическом протоколе анализы (включая ссылки на названия торговых марок) описаны так, как они опубликованы, поскольку по ним определяется первоначально достигнутый уровень чувствительности, специфичности и/или воспроизводимости. Ни один из методов, описанных для данных видов, не проходил официальную валидацию на аналитическую чувствительность и воспроизводимость. Использование названий реагентов, химикатов или оборудования в данных диагностических протоколах не подразумевает их предпочтение и исключение других, которые также могут быть подходящими. Представленные в протоколах лабораторные процедуры могут быть адаптированы к стандартам отдельных лабораторий при условии, что они должным образом прошли процедуру валидации.

Детали каждого из методов описываются ниже, с указанием видов *Liriomyza*, в отношении которых проводилась оценка анализа, а также первоначального использования, для которого был разработан анализ. Учитывая специфические ограничения молекулярных анализов, отрицательный результат молекулярного анализа не исключает возможность положительной идентификации по морфологическим признакам.

4.2.1 Контроли молекулярных анализов

Чтобы результат анализа считался надежным, каждая серия выделения нуклеиновых кислот и амплификации нуклеиновой кислоты организма-мишени должна сопровождаться постановкой надлежащих контролей, выбор которых зависит от типа использованного анализа и требуемого уровня достоверности. Для ПЦР положительный контроль выделения нуклеиновой кислоты, отрицательный контроль амплификации (контроль без матрицы) и, при необходимости, отрицательный контроль выделения являются тем минимумом, который следует использовать.

4.2.2 Выделение ДНК

ДНК, пригодная для постановки ПЦР, может быть успешно выделена из отдельной личинки, куколки или имаго *Liriomyza*, с использованием различных коммерческих наборов для выделения ДНК и в соответствии с инструкциями производителя (Scheffer *et al.*, 2001, 2006; Кох *et al.*, 2005; Nakamura *et al.*, 2013). Дополнительную информацию о наборах, использовавшихся для каждого из описанных ниже анализов, можно найти в первоисточнике. Лаборатории могут прийти к выводу, что другие методы выделения ДНК работают так же эффективно; ДНК можно выделять с использованием любого метода, пригодного для насекомых. Во всех опубликованных протоколах обрабатываемую ткань измельчают или растирают, используя стерильный микростик или аналогичное устройство.

Положительный контроль выделения нуклеиновой кислоты. Данный контроль ставится для мониторинга соответствия проведения анализа заданным условиям и параметрам. Положительным контролем может служить любая нуклеиновая кислота, которая содержит целевую последовательность (т.е. нуклеиновую кислоту *Liriomyza*, которая предварительно анализировалась).

Отрицательный контроль амплификации (контроль без матрицы). Данный контроль необходим, чтобы исключить ложноположительные результаты, обусловленные загрязнением при приготовлении реакционной смеси или неспецифической амплификацией.

Использовавшаяся при подготовке реакционной смеси высокочистая вода добавляется на этапе амплификации вместо раствора ДНК в том же объеме.

Отрицательный контроль выделения. Данный контроль ставится для отслеживания загрязнения в процессе выделения нуклеиновой кислоты и/или перекрестной реакции с тканью хозяина. Контроль включает реакцию выделения без добавления ткани образца.

4.2.3 Идентификация четырех целевых видов на основе ПЦР-ПДФ анализа

Кох *et al.* (2005) описали анализ участка гена 2-й субъединицы цитохромоксидазы (*COII*) методом ПЦР-ПДФ, который может использоваться для идентификации четырех целевых видов. Специфичность данного анализа была в дальнейшем исследована путем анализа еще четырех видов *Liriomyza*: *L. strigata*, *L. langei*, *L. chinensis* и *L. scorzonerae*. Дифференцировать образцы *L. langei* и *L. huidobrensis* с помощью этого анализа оказалось невозможным. Три остальных вида были успешно дифференцированы.

4.2.3.1 Амплификация гена COII

По Кох *et al.* (2005) пробы амплифицируют в 50 мкл реакционной смеси, состоящей из следующих конечных концентраций: по 0,6 мкМ каждого праймера, 0,2 мМ смеси dNTP, 1 ед. HotStarTaq¹ ДНК-полимеразы, 1× ПЦР-буфера и 1,5 мМ MgCl₂. Каждая реакция включает либо 1–5 мкл ДНК в качестве матрицы, либо высокочистую воду в качестве отрицательного контроля. ПЦР ставится со следующей парой праймеров:

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

обратный: K-N-3785Lir (R): 5'-GTT(A/T)AAGAGACCATT(A/G)CTTG-3' (Кох *et al.*, 2005)

Условия амплификации : этап денатурации 15 мин при 95 °С; 35 циклов (15 с при 94 °С, 1 мин при 55 °С и 45 с при 72 °С); завершающий этап элонгации 10 мин при 72 °С перед охлаждением до комнатной температуры. После ПЦР-амплификации 5 мкл ПЦР-продукта подвергают электрофорезу в 1,5%-м агарозном геле в Трис-ацетат-ЭДТА (ТАЕ) буфере с маркером молекулярной массы (100 п.о.) для подтверждения присутствия ПЦР-продуктов перед ПДФ-анализом.

ПЦР локуса *COII* считается достоверной только при соблюдении следующих двух условий:

- положительный контроль производит продукт амплификации ожидаемого размера для целевого гена *COII*;
- отрицательный контроль выделения и отрицательный контроль амплификации не производят продукт ожидаемого размера для целевого гена *COII*.

4.2.3.2 Рестрикция и разделение продуктов рестрикции

Для каждой пробы 5 мкл ПЦР-продукта расщепляют рестриктазами *DdeI*, *HinfI*, *SspI* и *TaqI* в отдельных реакциях, следуя инструкциям производителя. Затем обработанный рестриктазами ПЦР-продукт подвергают электрофорезу в 3%-м агарозном геле в ТАЕ-буфере с маркером молекулярного веса (100 п.о.) для определения размеров фрагментов.

¹ В настоящем диагностическом протоколе методы (включая ссылки на названия торговых марок) описаны так, как они опубликованы, поскольку по ним определяется первоначально достигнутый уровень чувствительности, специфичности и/или воспроизводимости. Использование названий реагентов, химикатов или оборудования в данных диагностических протоколах не подразумевает их предпочтение и исключение других, которые также могут быть подходящими. Представленные в протоколах лабораторные процедуры могут быть адаптированы к стандартам отдельных лабораторий при условии, что они должным образом прошли процедуру валидации.

Определить точный размер фрагментов продуктов рестрикции ПЦР в описанных условиях электрофореза невозможно, но относительные значения разделения используются для сравнения с ожидаемыми ПДРФ-профилями для определяемых видов. Положительные контроли с пробами с известными размерами фрагментов и профилей можно ставить параллельно с пробами для анализа, чтобы обеспечить более точное сравнение размеров. Следует включить в анализ положительный контроль для каждой используемой рестриктазы, чтобы убедиться, что фермент расщепляет ДНК как ожидается. ПДРФ-анализ считается достоверным только если положительный контроль производит фрагменты ожидаемого размера для целевого гена *COI*. Визуализированные в агарозном геле ПДРФ-профили позволяют дифференцировать четыре целевых вида *Liriomyza*. Диагностические профили для видов приводятся в таблице 2 в разбивке по рестриктазам. Если сводный профиль фрагментов образца соответствует известному профилю одного из пяти видов, представленному в таблице, образец можно идентифицировать. Если профиль фрагментов не совпадает с одним из профилей известных видов, образец на основании данного анализа не диагностируется как этот вид. Если образец диагностирован как *L. huidobrensis*, может потребоваться дальнейшее исследование, позволяющее подтвердить, что образец не является криптическим видом *L. langei* (раздел 4.2.5).

Таблица 2. ПДРФ-профили для видов *Liriomyza*

Вид	Ожидаемые размеры фрагментов (пары оснований) по рестриктазам			
	<i>DdeI</i>	<i>HinfI</i>	<i>SspI</i>	<i>TaqI</i>
<i>L. bryoniae</i>	790	421, 369	392, 326, 72	486, 163, 111, 30
<i>L. huidobrensis</i> [†]	790	421, 369	399, 391	306, 163, 159, 111, 30, 21
<i>L. sativae</i> "США" [‡]	567, 223	421, 282, 59, 27	399, 391	306, 210, 163, 81, 30
<i>L. sativae</i> "Азия" [‡]	790	421, 310, 59	717, 73	306, 210, 163, 81, 30
<i>L. strigata</i>	790	421, 342, 27	399, 391	267, 219, 141, 72, 67
<i>L. trifolii</i>	619, 171 или 386, 223, 171	421, 310, 59	391, 326, 73	306, 163, 159, 141, 21 или 306, 163, 159, 111, 30, 21

Источник: данные, приведенные Koh *et al.* (2005).

[†] Включая криптический вид *L. langei*.

[‡] "США" и "Азия" – известные альтернативные варианты; оба являются *L. sativae*.

4.2.4 Видоспецифичные ПЦР-праймеры для идентификации четырех целевых видов

Мультиплексная ПЦР, позволяющая дифференцировать четыре целевых вида без необходимости обработки рестриктазами продуктов ПЦР, описана Nakamura *et al.* (2013). В анализе используются шесть праймеров для гена субъединицы 1 цитохромоксидазы (*COI*). Каждый из пяти праймеров связывается с последовательностью, уникальной для того или иного вида *Liriomyza*, и используется в качестве прямого праймера. Шестой праймер связывается с участком гена *COI*, сохранившимся у всех видов *Liriomyza*, и используется как обратный праймер для завершения связывания праймеров. Размер ПЦР-продуктов можно использовать для дифференциации *L. bryoniae*, *L. huidobrensis*, *L. sativae*, *L. trifolii* и *L. chinensis*. В отличие от ПЦР-ПДРФ анализа, описанного Koh *et al.* (2005) (раздел 4.2.3), специфичность данного анализа к *L. strigata* не была верифицирована.

4.2.4.1 Амплификация гена COI

По Nakamura *et al.* (2013) пробы амплифицируют в 10 мкл реакционной смеси, состоящей из следующих конечных концентраций реагентов: по 0,5 мкМ каждого из шести праймеров, 0,2 мМ смеси dNTP, 1 ед. TaKaRa¹ Ex Taq ДНК-полимеразы, 1× TaKaRa¹ Ex Taq ПЦР-буфера и 2 мМ MgCl₂. Каждая реакция включает либо 0,5 мкл ДНК в качестве матрицы, либо высокочистую воду в качестве отрицательного контроля. ПЦР проводится с использованием следующих шести праймеров, разработанных Nakamura *et al.* (2013):

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'

Условия термоциклирования для ПЦР: этап денатурации 1 мин при 94 °С; 32 цикла (30 с при 94 °С, 30 с при 55 °С и 2 мин при 72 °С). Продукты ПЦР визуализируются посредством электрофореза в 1,8%-м агарозном геле с маркером молекулярного веса (100 п.о.), что позволяет определить размер ПЦР-продукта.

Мультиплексный ПЦР-анализ с использованием *COI* считается достоверным только при соблюдении двух условий:

- положительный контроль производит продукт амплификации ожидаемого размера для целевого гена *COI*;
- отрицательный контроль выделения и отрицательный контроль амплификации не производят продукт ожидаемого размера для целевого гена *COI*.

Ожидаемые размеры ПЦР-продуктов для пяти видов составляют: 649 п.о. (*L. bryoniae*), 359 п.о. (*L. chinensis*), 107 п.о. (*L. huidobrensis/L. langei*), 207 п.о. (*L. sativae*) и 461 п.о. (*L. trifolii*). Определить точный размер фрагментов ПЦР-продуктов, разделенных электрофорезом в описанных условиях, невозможно, но относительные значения разделения используют для сравнения результатов с ожидаемыми профилями видоспецифических праймеров. Положительные контроли (образцы с известным размером фрагментов) можно ставить параллельно с исследуемыми образцами, что позволит более точно сравнивать размеры фрагментов.

Образец считается идентифицированным как принадлежащий к одному из пяти видов, если производит один ПЦР-продукт ожидаемого для данного вида размера. Описанный анализ не позволяет дифференцировать *L. huidobrensis* и *L. langei*. Если образец предположительно является *L. huidobrensis*, может потребоваться дальнейшее исследование для подтверждения, что это не криптический вид *L. langei* (раздел 4.2.5). Данный анализ был разработан для идентификации *Liriomyza* в Японии и его специфичность определялась этой задачей. Поэтому перекрестная специфичность с *L. strigata* и популяциями *L. trifolii* за пределами Японии не верифицировалась.

4.2.5 Дифференциация криптических видов *L. langei* и *L. huidobrensis*

4.2.5.1 ПЦР-ПДФ

Scheffer *et al.* (2001) описали ПЦР-ПДФ анализ для дифференциации *L. huidobrensis* и *L. langei*, основанный на вариации в митохондриальном локусе, включающем часть гена *COI*, лейцин-тРНК и весь ген *COII*. Этот регион длиной в 1031 п.о. амплифицируется с использованием праймеров, описанных в работе Simon *et al.* (1994):

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

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

Условия амплификации для ПЦР: этап денатурации 2 мин при 92 °С; 35 циклов (1 мин 30 с при 92 °С, 1 мин 30 с при 50 °С и 2 мин 30 с при 72 °С); завершающий этап элонгации 7 мин при 72 °С. После ПЦР-амплификации ПЦР-продукт подвергают электрофорезу с маркером молекулярного веса для проверки успешности ПЦР перед ПДФ-анализом.

ПЦР *COI–COII* считается достоверной только при соблюдении следующих двух условий:

- положительный контроль производит продукт амплификации ожидаемого размера для целевого гена *COI*;
- отрицательный контроль выделения и отрицательный контроль амплификации не производят продукт амплификации ожидаемого размера для целевого гена *COI*.

Для каждой пробы ПЦР-продукт расщепляют рестриктазами *SpeI* и *EcoRV* в отдельных реакциях, следуя инструкциям производителя. Расщепленный ПЦР-продукт подвергают электрофорезу в 1,5%-м агарозном геле с маркером молекулярного веса (100 п.о.) для определения размеров фрагментов.

Определить точный размер фрагментов рестрикционных продуктов, разделенных электрофорезом в описанных условиях, невозможно, но относительные значения разделения используют для сравнения результатов с ожидаемыми для видов профилями ПДФ. Положительные контроли (образцы с известным размером фрагментов и профилем) можно ставить параллельно с исследуемыми образцами, что позволит более точно сравнивать размеры. Для каждой используемой в анализе рестриктазы в анализ включают положительный контроль, подтверждающий, что фермент расщепляет ДНК должным образом. ПДФ-анализ считается достоверным только в том случае, если положительный контроль производит фрагменты ожидаемого размера для целевого гена.

Образцы *L. huidobrensis* производят один неразрезанный (1031 п.о.) фрагмент при расщеплении с *SpeI* и два разрезанных (175 п.о. и 856 п.о.) фрагмента при расщеплении с *EcoRV*. Напротив, образцы *L. langei* производят два разрезанных (420 п.о. и 611 п.о.) фрагмента при расщеплении с *SpeI* и один неразрезанный (1031 п.о.) фрагмент при расщеплении с *EcoRV*. Если профиль образца совпадает с известными профилями фрагментов, образец можно идентифицировать как относящийся к этому виду.

4.2.5.2 Сравнение последовательностей ДНК

Scheffer (2000) приводит данные о ПЦР и последовательности ДНК для локуса митохондриальной ДНК, включающей частичные последовательности для генов *COI* и *COII*, с помощью которых можно различить два криптических вида – *L. huidobrensis* и *L. langei*. В следующую публикацию Scheffer *et al.* (2006) включили дополнительные последовательности 3'-конца гена *COI* для исследования видового разнообразия. Эти данные проанализировали с использованием методов молекулярной филогенетики, но диагностические протоколы на их основе не были выработаны.

4.2.6 Баркодинг ДНК

Усилия по созданию более таксономически всеобъемлющего ресурса записей последовательностей ДНК для 5'-конца гена *COI Liriomyza*, использующихся в исследованиях баркодинга ДНК животных, продолжают (например, Bhuiya *et al.*, 2011; Maharjan *et al.*, 2014). В настоящее время в базе данных проекта Barcode of Life Data System (BOLD) (<http://www.boldsystems.org>) содержатся баркоды ДНК для 31 вида рода *Liriomyza* (включая четыре целевых вида). Также данные баркоды и процедуры представлены в альтернативной базе данных карантинных организмов Q-bank (www.q-bank.eu), включая последовательности, полученные из референсных образцов. Недавнее исследование (Maharjan *et al.*, 2014) включает сведения по разделению *L. huidobrensis*, *L. trifolii*, *L. sativae*, *L. bryoniae* и *L. chinensis*. Несмотря на эти достижения в области секвенирования ДНК, в настоящем протоколе не описывается методология для видов *Liriomyza*, поскольку правила интерпретации данных до сих пор не опубликованы в научной литературе. Результаты идентификации методом баркодинга ДНК следует интерпретировать с осторожностью из-за таких проблем, как: 1) возможная избирательная ПЦР-амплификация паразитоидов или ядерно-митохондриальных копий гена *COI* (т.е. ядерно-митохондриальных псевдогенов (numt-псевдогенов); 2) возможность ошибочной идентификации с близкородственными сестринскими видами (т.е. комплексами видов);

3) различный масштаб географической представленности референсных образцов в базах данных последовательностей.

5. Данные

Данные и результаты исследований должны храниться, как описано в разделе 2.5 МСФМ 27 (*Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов*).

В тех случаях, когда результаты диагностики могут отрицательно отразиться на других договаривающихся сторонах, следующие данные и свидетельства и дополнительные материалы должны храниться в течение по меньшей мере одного года способом, обеспечивающим отслеживаемость: законсервированные или фиксированные на предметных стеклах образцы, фотографии отличительных таксономических признаков, образцы ДНК и фотографии электрофореграмм.

6. Контактные лица для получения дополнительной информации

Дополнительную информацию по данному протоколу можно получить в:

State Government of Victoria Department of Economic Development, Jobs, Transport and Resources, AgriBio, 5 Ring Road, Bundoora, Vic. 3083, Australia (Mallik Malipatil; e-mail: 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, United Kingdom (Dominique Collins; e-mail: dom.collins@fera.co.uk; tel.: +44 1904 462215; fax: +44 1904 462111).

Запрос на пересмотр диагностического протокола может быть направлен национальными организациями по карантину и защите растений (НОКЗР), региональными организациями по карантину и защите растений (РОКЗР) или вспомогательными органами Комиссии по фитосанитарным мерам (КФМ) через Секретариат МККЗР (ippc@fao.org), который, в свою очередь, направит его в Техническую группу по разработке диагностических протоколов (ТГДП).

7. Выражение признательности

Первый проект настоящего протокола был написан Mallik B. Malipatil (State Government of Victoria Department of Economic Development, Jobs, Transport and Resources, Australia), Dominique W. Collins (Fera, United Kingdom) и Mark Blacket (State Government of Victoria Department of Economic Development, Jobs, Transport and Resources, Australia). Norman Barr

(United States Department of Agriculture – Animal and Plant Health Inspection Service, United States) подготовил раздел по молекулярным методам.

Следующие рецензенты представили комментарии к проекту настоящего документа: Stephen Gaimari (California Department of Food and Agriculture, United States), Anthony Rice (Department of Agriculture and Water Resources, Australia), Ren Iwaizumi (Yokohama Plant Protection Station, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan) и Ramona Vaitkevica (State Plant Protection Service of Latvia).

8. Справочные материалы

Настоящее приложение относится к международным стандартам по фитосанитарным мерам (МСФМ). МСФМ размещены на Международном фитосанитарном портале (МФП): <https://www.ippc.int/ru/core-activities/standards-setting/ispms>.

- 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. См.: <http://www.cabicompndium.org/crc/home.asp> (по состоянию на 24 августа 2014 года).
- 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. См.: <http://wbd.etibioinformatics.nl/bis/agromyzidae.php> (по состоянию на 24 августа 2014 года).
- Ellis, W.N. n.d.** Leafminers and plant galls of Europe. См.: <http://www.bladmineerders.nl/> (по состоянию на 24 августа 2014 года) (на английском и голландском языках).
- 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. См.: http://www.ento.csiro.au/science/Liriomyza_ver3/index.html (по состоянию на 24 августа 2014 года).
- 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). См.: <http://www.padil.gov.au/pests-and-diseases/pest/main/136238> (по состоянию на 24 августа 2014 года).
- Malipatil, M.B.** 2007b. Pea leafminer (*Liriomyza huidobrensis*). Pest and Disease Image Library (PaDIL), images and fact sheets. См.: <http://www.padil.gov.au/pests-and-diseases/pest/main/136237> (по состоянию на 24 августа 2014 года).
- Malipatil, M.B.** 2007c. American serpentine leafminer (*Liriomyza trifolii*). Pest and Disease Image Library (PaDIL), images and fact sheets. См.: <http://www.padil.gov.au/pests-and-diseases/pest/main/136236> (по состоянию на 24 августа 2014 года).
- 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. См.: <http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/leafminers/> (по состоянию на 24 августа 2014 года).
- 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 dès Agromyzidae (Diptera) de la région néotropicale. *Bollettino di Zoologia Agraria e di Bachicoltura (Serie II)*, 34: 25–52 (на французском языке).
- 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. См.: <http://www.faunaeur.org> (по состоянию на 24 августа 2014 года).
- 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*. См.: <http://www.ukflymines.co.uk> (по состоянию на 24 августа 2014 года).
- 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

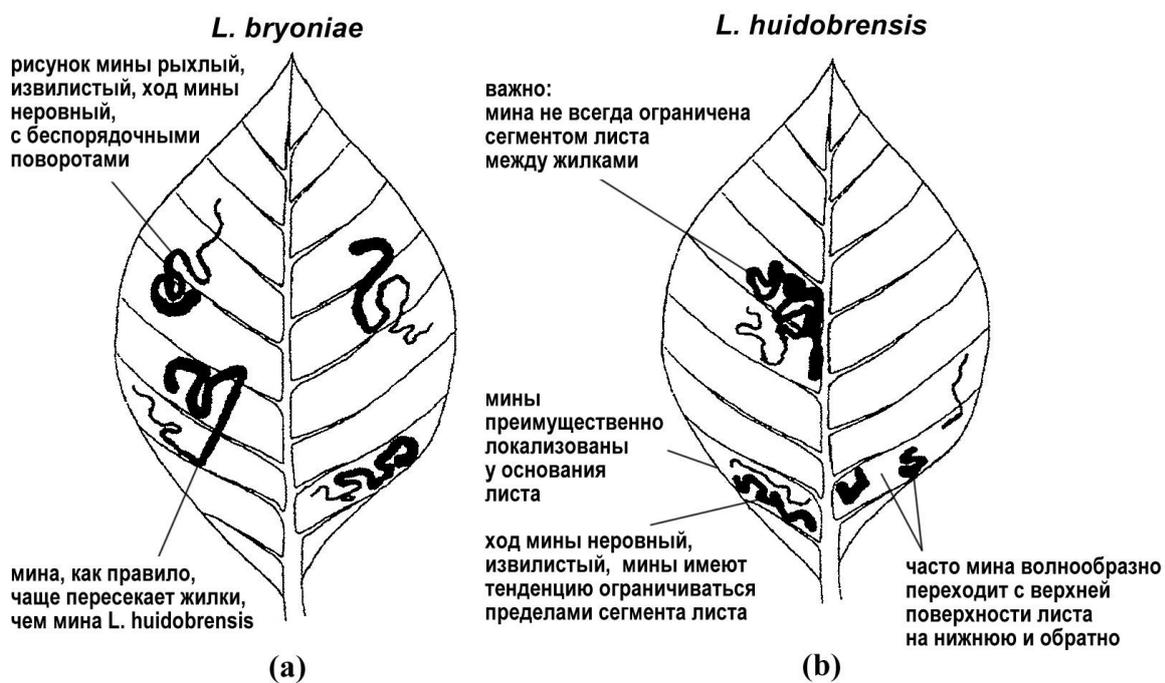
- polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87: 651–701.
- Spencer, K.A.** 1965. A clarification of the status of *Liriomyza trifolii* (Burgess) and some related species (Diptera: Agromyzidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 67: 32–40.
- 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 (на японском языке с резюме на английском языке).
- 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. См.: <http://www.ento.csiro.au/biology/fly/fly.html> (по состоянию на 24 августа 2014 года).

9. Рисунки



Рисунок 1. Имаго *Liriomyza bryoniae*.

Фотография предоставлена Департаментом окружающей среды, продовольствия и сельского хозяйства Великобритании.



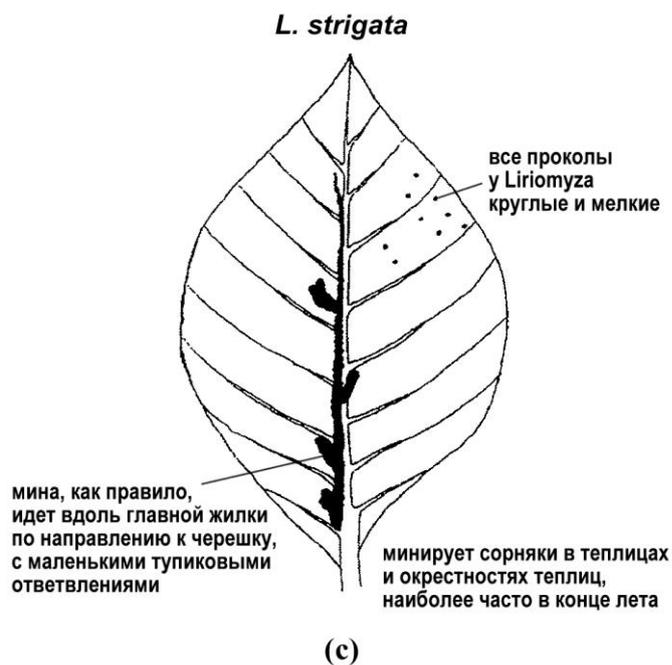


Рисунок 2. Типичные признаки мин а) *Liriomyza bryoniae*, б) *Liriomyza huidobrensis* и в) *Liriomyza strigata*.
Источник: EPPO (2005).

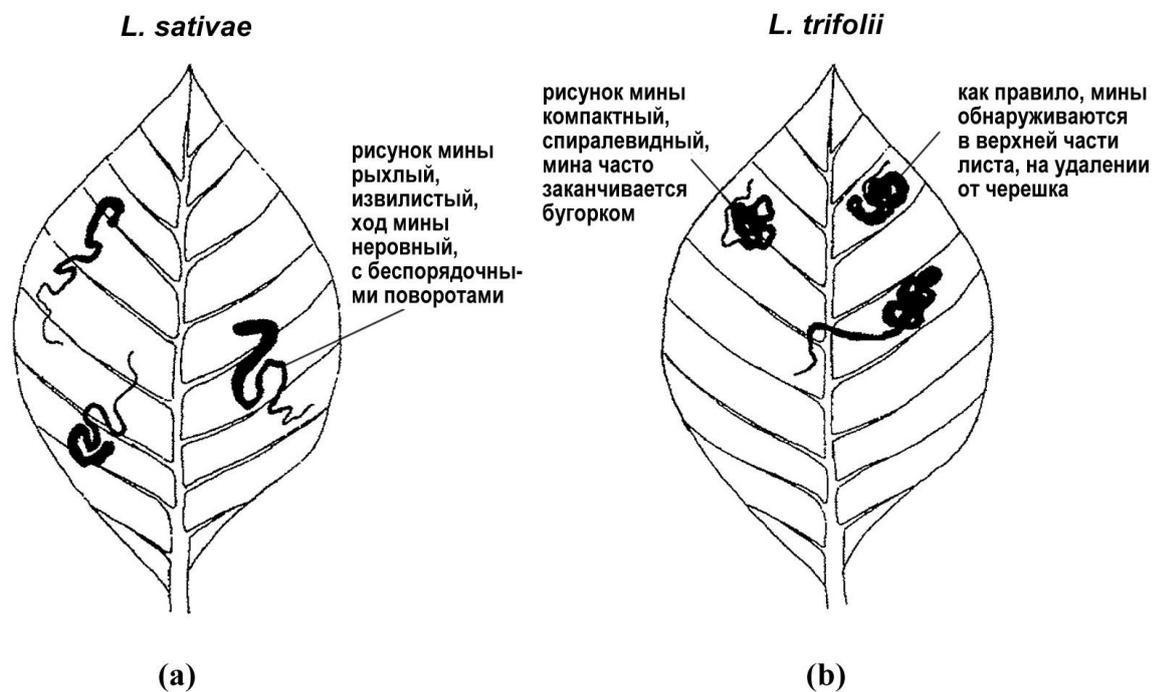


Рисунок 3. Типичные признаки мин а) *Liriomyza sativae* и б) *Liriomyza trifolii*.
Источник: EPPO (2005).

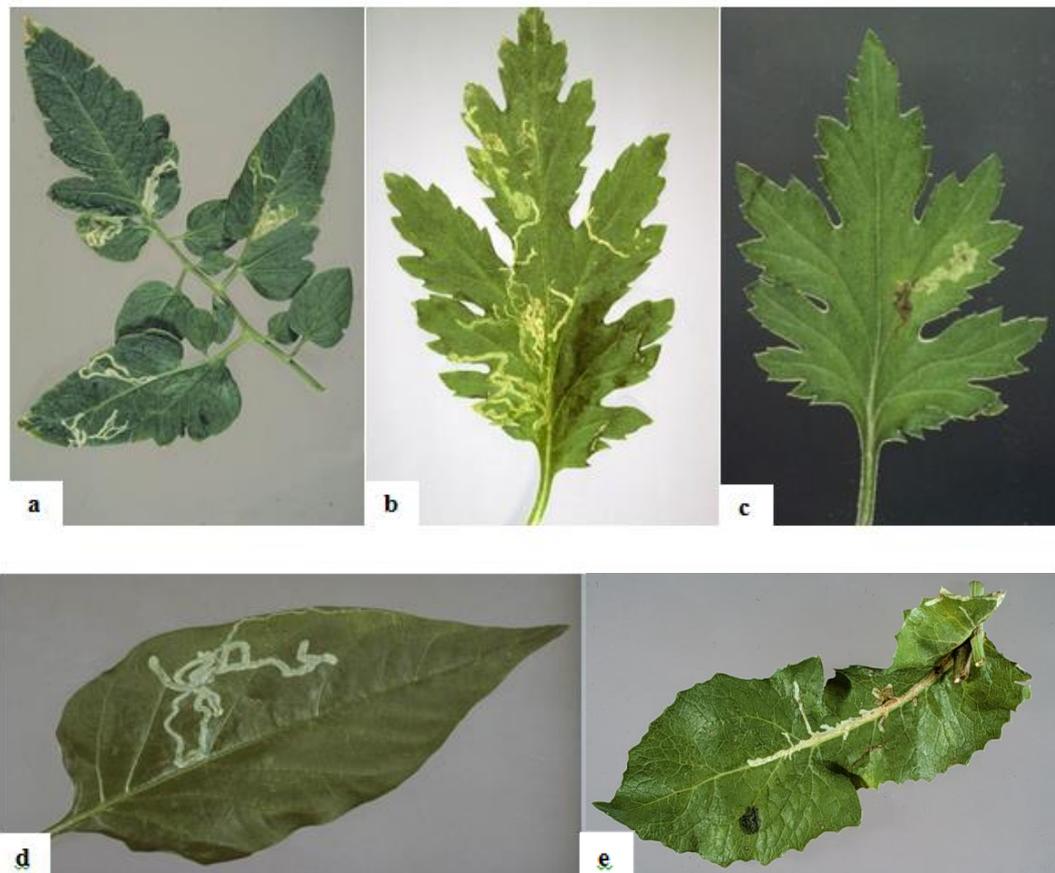


Рисунок 4. Типичные мины *Liriomyza* spp.: а) *L. bryoniae* на томате; б) *L. huidobrensis* на хризантеме; в) *L. trifolii* на хризантеме; г) *L. sativae* на перце; д) *L. strigata* на не установленном растении. Фотография предоставлена Департаментом окружающей среды, продовольствия и сельского хозяйства Великобритании.

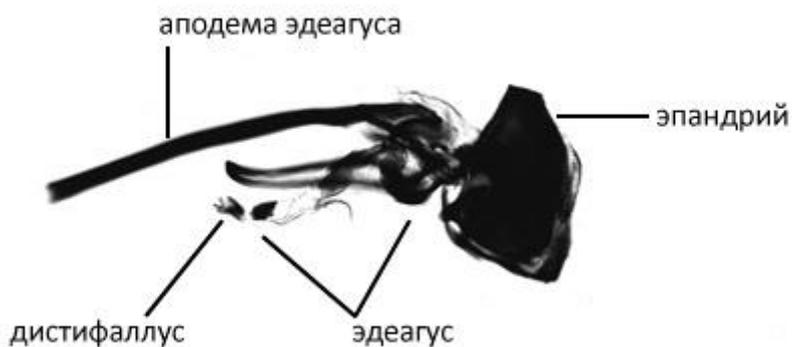


Рис. 5. Гениталии самца *Liriomyza huidobrensis* (вид сбоку). Фотография предоставлена Департаментом окружающей среды, продовольствия и сельского хозяйства Великобритании.

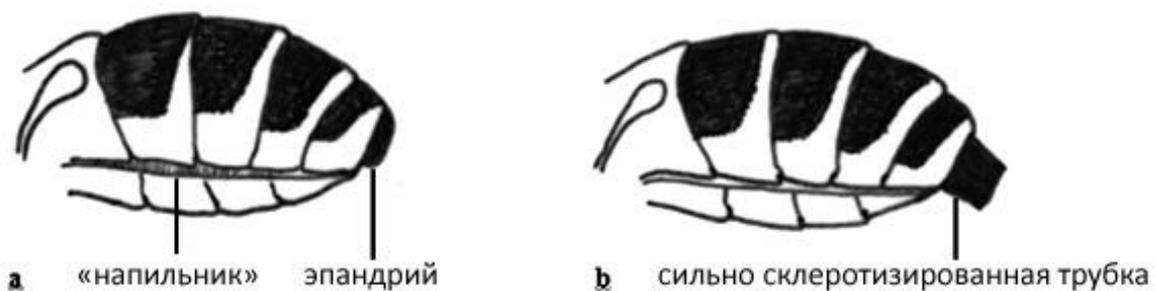
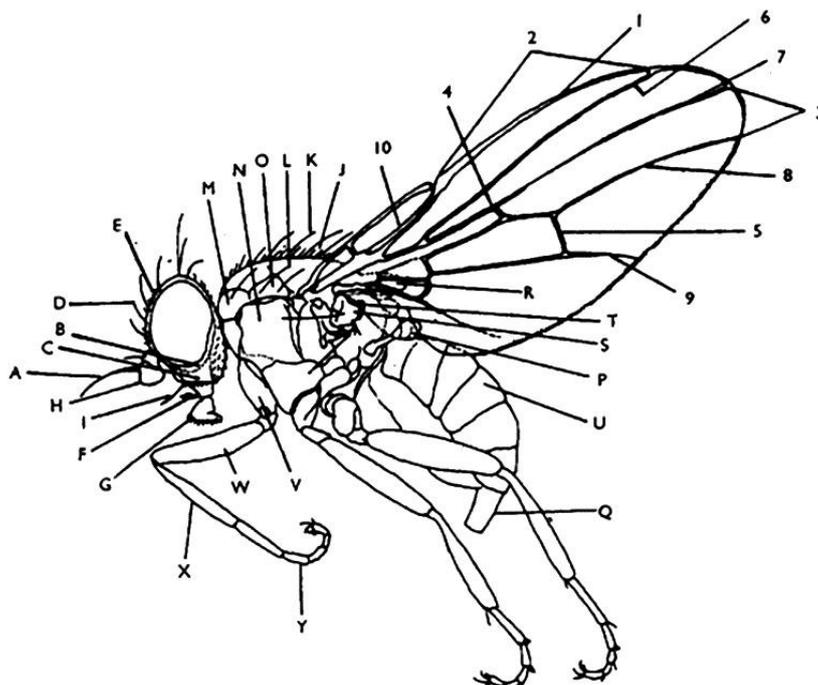


Рисунок 6. Абдомен а) самца и б) самки *Liriomyza*. Фотография предоставлена Департаментом окружающей среды, продовольствия и сельского хозяйства Великобритании.



Типичный *Agromyza* sp., вид сбоку (по SASAKAWA):

A – ариста, B – щека, C – челюсть, D – орбитальные щетинки, E – орбитальные волоски, F – щупик, G – хоботок, H – третий членик усика, I – вибрисса, J – акростихальные щетинки, K – дорсоцентральные щетинки, L – мезонотум, M – плечо, N – мезоплевра, O – нотоплевра, P – жужжальце, Q – ножны яйцеклада, R – скутеллум, S – закрыловая пластинка, T – край закрыловой пластинки, U – тергиты, V – тазик, W – бедро, X – голень, Y – лапка.
 1 – костальная жилка, 2 – второй костальный отрезок, 3 – четвертый костальный отрезок, 4 – первая поперечная жилка, 5 – вторая поперечная жилка, 6 – R₁, 7 – R₄₊₅, 8 – M₁₊₂, 9 – M₃₊₄, 10 – субкостальная жилка.

Рисунок 7. Морфология имаго *Agromyzidae*.

Источник: Spencer (1973).

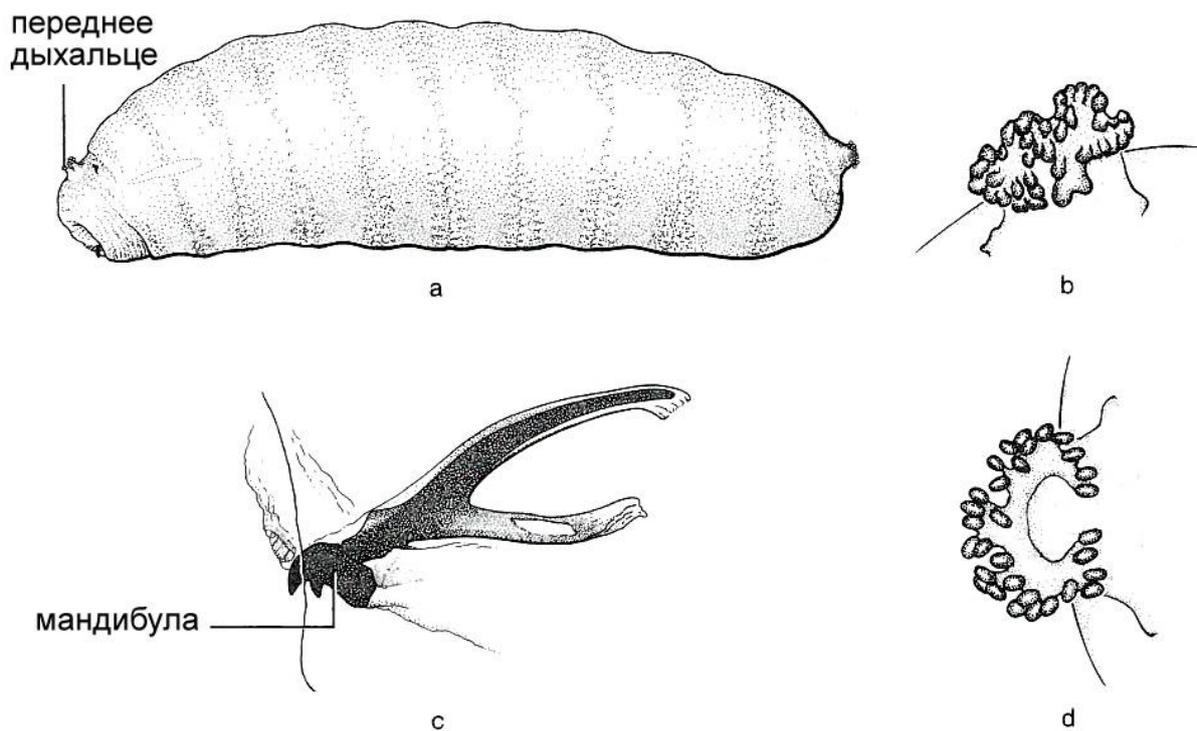


Рисунок 8. Морфология личинки Agromyzidae (*Phytomyza chelone*): а) вид сбоку; б) переднее дыхальце; с) цефалофарингеальный скелет; д) заднее дыхальце.

Источник: Stehr (1991).

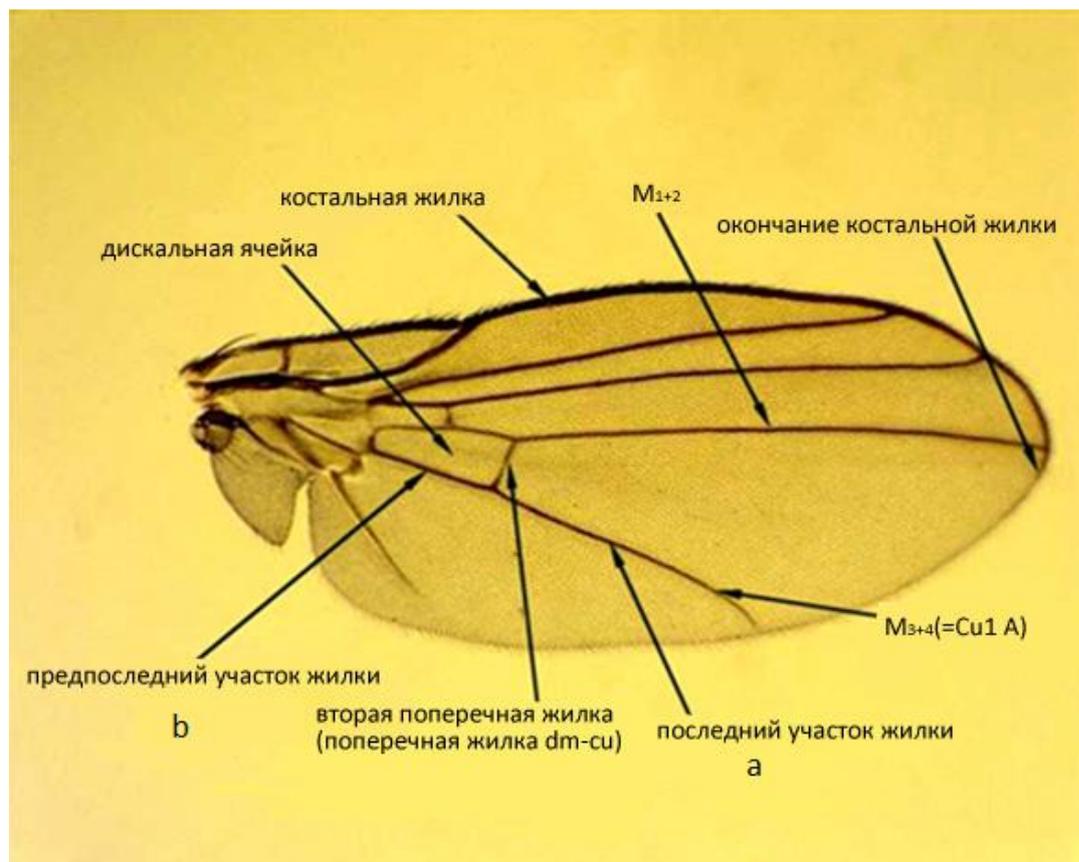


Рисунок 9. Жилкование крыла *Liriomyza*.

Фото предоставлено Департаментом окружающей среды, земельных и водных ресурсов и планирования штата Виктория, Австралия.

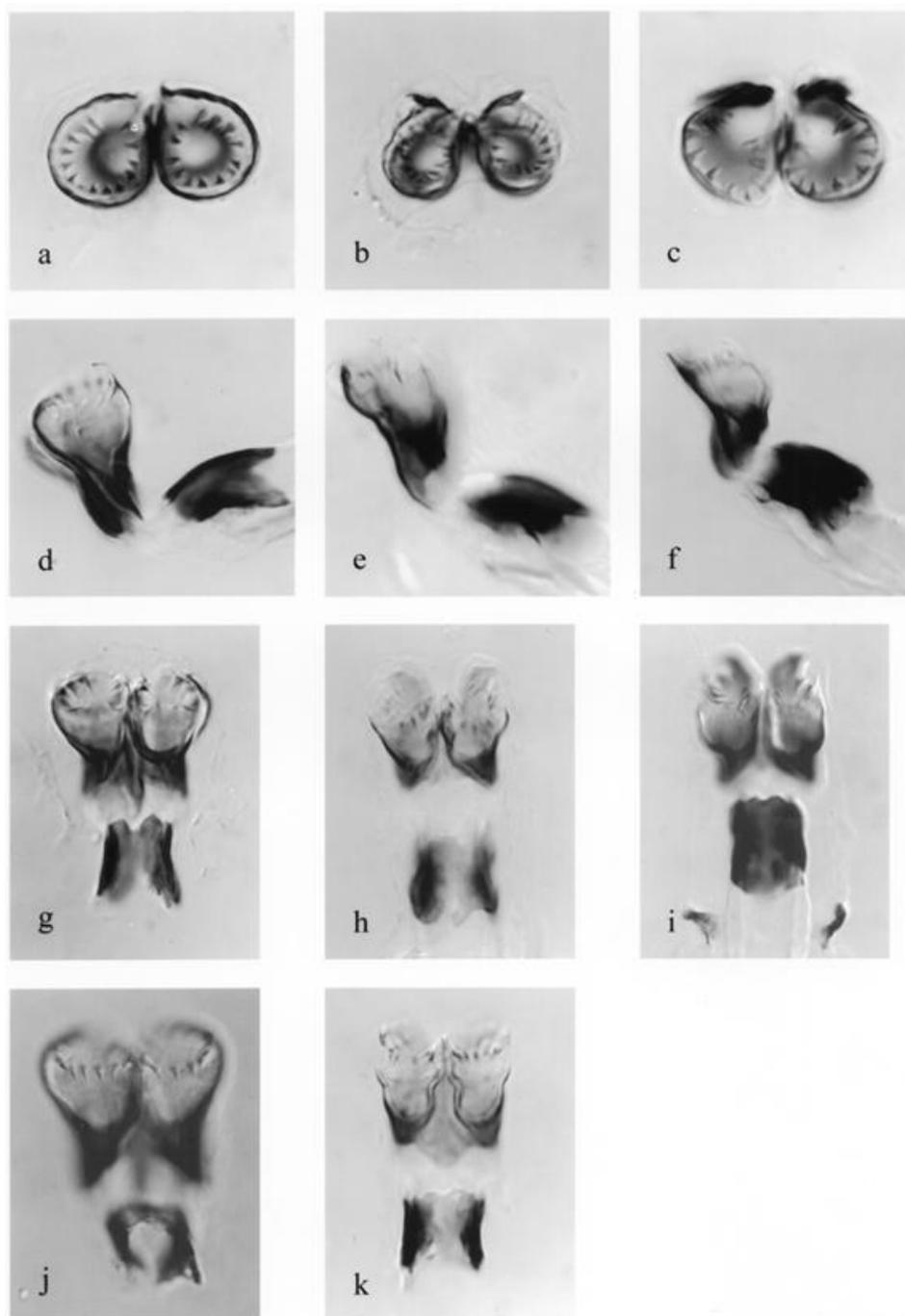


Рисунок 10. Дистифаллус *Liriomyza* spp. (увеличение $\times 400$): а) *L. bryoniae*, вид спереди; б) *L. huidobrensis*, вид спереди; в) *L. strigata*, вид спереди; д) *L. bryoniae*, вид сбоку; е) *L. huidobrensis*, вид сбоку; ф) *L. strigata*, вид сбоку; г) *L. bryoniae*, дорсовентральная проекция; h) *L. huidobrensis*, дорсовентральная проекция; и) *L. strigata*, дорсовентральная проекция; (j) *L. bryoniae*, дорсовентральная проекция (в отличной от г) плоскости); и к) *L. huidobrensis*, дорсовентральная проекция (в отличной от h) плоскости).
 Фотография предоставлена Департаментом окружающей среды, продовольствия и сельского хозяйства Великобритании.

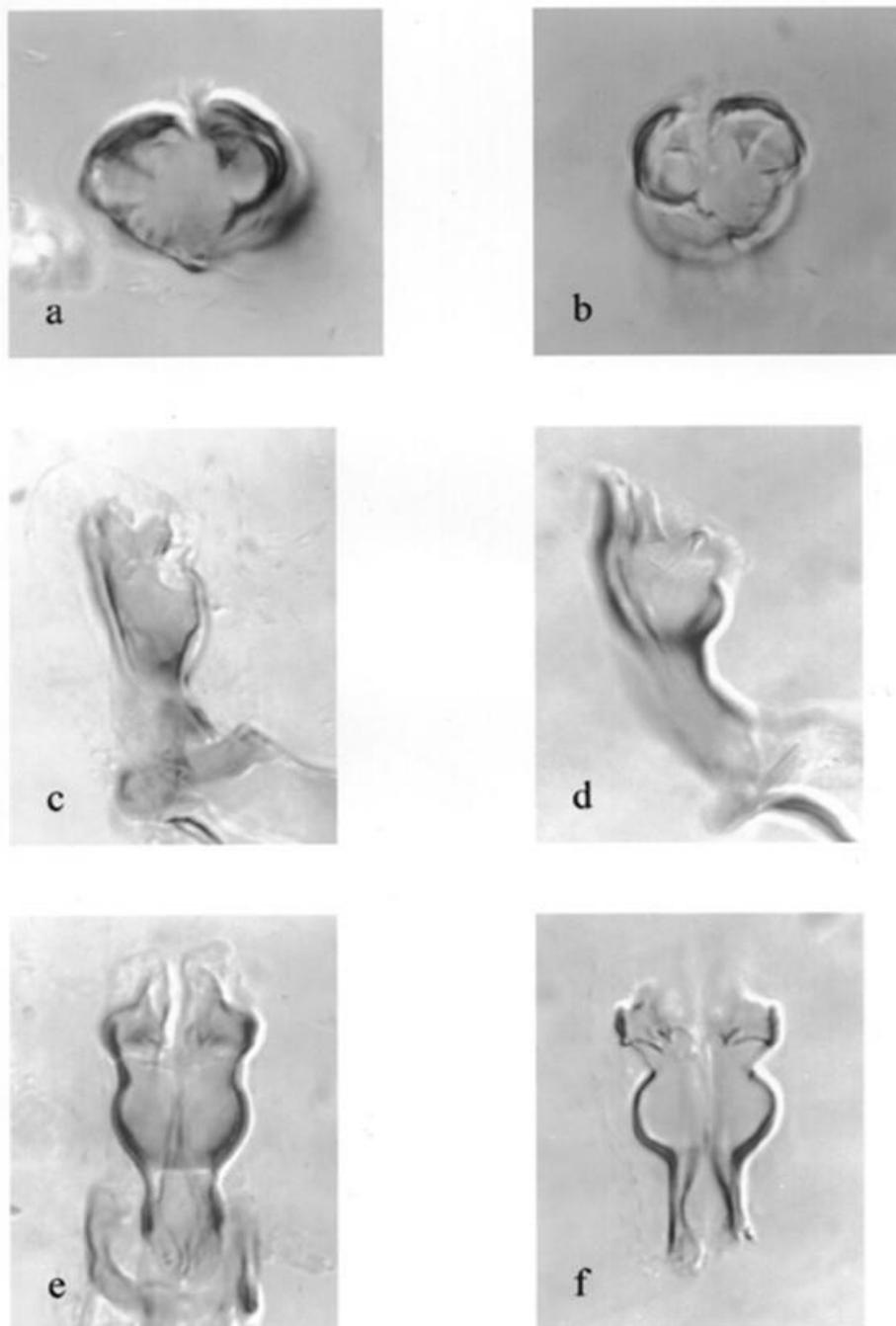


Рисунок 11. Дистифаллус *Liriomyza* spp. (увеличение $\times 400$): а) *L. sativae*, вид спереди; б) *L. trifolii*, вид спереди; в) *L. sativae*, вид сбоку; д) *L. trifolii*, вид сбоку; е) *L. sativae*, дорсовентральная проекция; ф) *L. trifolii*, дорсовентральная проекция.

Фотография предоставлена Департаментом окружающей среды, продовольствия и сельского хозяйства Великобритании.



Рис. 12. Куколка *Liriomyza* sp.

Фотография предоставлена Департаментом окружающей среды, земельных и водных ресурсов и планирования штата Виктория, Австралия.



Рис. 13. Третья личиночная стадия *L. Bryoniae*.

Фотография предоставлена Департаментом окружающей среды, продовольствия и сельского хозяйства Великобритании.

История публикации

Не является официальной частью стандарта.

2006-11 КС представил первоначальную тему: *Liriomyza* spp. (2006-017).

2007-03 КФМ-2 добавила в программу работы тему (Насекомые и клещи).

2014-07 ТГДП рассмотрела и утвердила проект текста для принятия КС электронного решения об одобрении проекта для проведения консультаций с членами.

2014-10 КС в электронном решении одобрил текст для проведения консультаций с членами (2014_eSC_Nov_12).

2015-02 Консультация с членами.

2016-02 ТГДП в электронном решении одобрила текст для передачи в КС для утверждения периода нотификации ДП (2016_eTPDP_Feb_01).

2016-03 КС в электронном решении утвердил 45-дневный период нотификации ДП (2016_eSC_May_09).

2016-08 КС утвердил ДП от лица КФМ (формальных возражений не высказывалось).

МСФМ 27. Приложение 16. Род *Liriomyza* (2016). Рим, МККЗР, ФАО.

2018-01 ГЛА для Русского языка и Служба письменного перевода ФАО пересмотрели данный ДП и Секретариат МККЗР внес соответствующие изменения.

История публикации последний раз обновлена: 2018-01.

МККЗР

Международная конвенция по карантину и защите растений (МККЗР) представляет собой международное соглашение по защите растений, целью которого является защита культивируемых и дикорастущих растений за счет предотвращения интродукции и распространения вредных организмов. Сегодня международные поездки и торговля имеют большее значение, чем когда либо раньше. По мере того, как люди и товары перемещаются по миру, они переносят с собой опасные для растений организмы.

Организация

- ◆ Более 180 стран являются договаривающимися сторонами МККЗР.
- ◆ У всех членов Конвенции имеется национальная организация по карантину и защите растений (НОКЗР) и официальный контактный адрес МККЗР.
- ◆ Девять региональных организаций по карантину и защите растений (РОКЗР) содействуют внедрению положений МККЗР в странах.
- ◆ НОКЗР взаимодействуют с профильными международными организациями с целью содействия развитию регионального и национального потенциала.
- ◆ Деятельность секретариата МККЗР обеспечивается Продовольственной и сельскохозяйственной организацией Объединенных Наций (ФАО).

Международная конвенция по карантину и защите растений (МККЗР)

Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Rome, Italy

Тел.: +39 06 5705 4812

Эл. почта: ippc@fao.org | Сайт: www.ippc.int