

美洲斑潜蝇 SS-PCR 检测技术研究

张桂芬^{1,2}, 刘万学^{1,2}, 郭建英^{1,2}, 吕志创^{1,2}, 万方浩^{1,2}, 申香菊³

¹ 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193;

² 农业部外来入侵生物预防与控制研究中心, 北京 100081;

³ 北京市顺义区植保植检站, 北京 101300

摘要:【背景】美洲斑潜蝇是一种严重威胁瓜果蔬菜、烟草、棉花等经济作物和花卉生产的入侵性害虫。由于潜叶蝇类害虫体型较小、生活方式隐蔽、形态相似, 本文针对其难以快速准确地进行形态鉴别的问题, 以美洲斑潜蝇为研究对象, 以菜园常见的 4 种潜叶蝇类害虫为参照, 采用种特异性 PCR 方法 (species-specific PCR, SS-PCR), 研究其快速分子检测鉴定技术。【方法】调用 GenBank 中一段 936 bp 的美洲斑潜蝇线粒体 DNA (mtDNA) 细胞色素氧化酶亚基 I 基因 (COI) 的序列 (GenBank 登录号为 EU219613), 并根据此基因片段的碱基序列设计引物 1 对, 其扩增片段大小为 294 bp。【结果】种特异性检验结果显示, 该引物只对美洲斑潜蝇的 COI 基因具有扩增能力, 对其他种类如南美斑潜蝇、三叶斑潜蝇、葱斑潜蝇、豌豆潜叶蝇等没有扩增能力。该引物不仅对成虫具有良好的扩增效果, 对蛹、幼虫以及单粒卵也具有同样的扩增效果, 其最低检出阈值为 1/3840 头成虫。【结论与意义】SS-PCR 技术体系可用于美洲斑潜蝇的鉴定识别与检测监测, 对阻止其进一步扩散蔓延具有重要意义。

关键词: 美洲斑潜蝇; 线粒体 DNA 细胞色素氧化酶亚基 I 基因; 快速鉴定; 种特异性引物; 分子检测

Species-specific PCR primers for identification of *Liriomyza sativae* Blanchard

Gui-fen ZHANG^{1,2}, Wan-xue LIU^{1,2}, Jian-ying GUO^{1,2}, Zhi-chuang LÜ^{1,2}, Fang-hao WAN^{1,2}, Xiang-ju SHEN³

¹ State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy

of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; ² Center for Management of Invasive Alien Species,

Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China; ³ Plant Protection and Quarantine

Station of Shunyi County, Beijing 101300, China

Abstract: 【Background】*Liriomyza sativae* Blanchard (Diptera: Agromyzidae), an invasive alien species, is an important pest on many vegetables, flowers, tobacco, and cotton in many agricultural areas in China. Morphological identification of *L. sativae* is limited by small size, the high degree of similarity to related species and polymorphism. In this study, a method was described for the development of DNA marker for the identification of *L. sativae*. 【Method】A pair of species-specific PCR (SS-PCR) primers based on a fragment of known mitochondrial DNA cytochrome oxidase I (mtDNA COI) sequence (936 bp, GenBank accession no.: EU219613) was designed for *L. sativae*. 【Result】The SS-PCR primers amplified a single band of 294 bp of *L. sativae*. The specificity of the primers was validated using four other leafminer species, including *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard), *Liriomyza trifolii* (Brugess), *Liriomyza chinensis* (Kato) and *Phytomyza horticola* Goureau, all of them commonly occurring in China. All *L. sativae* specimens were correctly identified, and no cross-reactions with other leafminer species were observed. The method was tested on single individuals in the egg, first-, second- and third-instar larvae, pupa and adult (male and female) stages, and proved to be applicable for all life stages. Moreover, the 294 bp mtDNA fragment could be clearly identified even at the dilution as low as 1/3840 of a whole female adult of *L. sativae*. 【Conclusion and significance】The SS-PCR method developed is promising, effective, fast and economic identification, hence proposed as a valuable alternative to traditional identification of this insect species. This technique should be applicable in quarantine testing for *L. sativae* during transportation of seedlings of flowers and vegetables and also in monitoring and management of this insect pest.

Key words: *Liriomyza sativae*; mtDNA COI; rapid identification; species-specific primer; molecular detection

美洲斑潜蝇 *Liriomyza sativae* Blanchard, 属双翅目潜蝇科斑潜蝇属, 是一种世界性检疫害虫。欧洲和地中海植物保护组织 (European and Mediterranean Plant Protection Organization, EPPO) 将其列为 A2 类检疫性有害生物 (<http://www.eppo.org/>); 我国农业部于 1995 年将其列为进境地植物检疫潜在性害虫, 并制定了美洲斑潜蝇“九五”监测治理规划 (陈文龙和张润杰, 2003)。美洲斑潜蝇为多食性害虫, 寄主广泛, 如仅在北京地区其寄主已涉及 20 科 130 多种植物 (雷仲仁和王音, 2005)。

美洲斑潜蝇原产于巴西, 20 世纪 40 年代以来陆续暴发于佛罗里达、夏威夷等地, 70 年代后又于大洋洲的一些岛屿和阿拉伯半岛南部地区发现该虫。多年来该虫随寄主植物及其他介质在世界范围内传播蔓延, 现已在 40 多个国家和地区严重发生 (EPPO/CABI, 2011)。由于美洲斑潜蝇具有繁殖能力强, 发育周期短, 寄主范围广, 能传播多种植物病毒, 可在较短时间暴发成灾等特点, 许多国家将其列为植物检疫一类危险性害虫 (Deeming, 1992; EPPO/CABI, 2011; Zitter & Tsai, 1980)。我国于 1994 年初在海南省三亚市蔬菜上首次发现美洲斑潜蝇, 同年底即在华南、华中等地普遍发生 (问锦曾等, 1996), 1997 年蔓延至全国 25 个省/直辖市/自治区; 到目前为止, 该虫已广泛分布于我国 29 个省/直辖市/自治区, 对瓜果、蔬菜、烟草、棉花等经济作物和花卉造成严重危害, 已成为我国农业生产上的一个突出问题 (陈兵等, 2002; 范文中和王中武, 2005; 胡长效和苏新林, 2003; 雷仲仁和王音, 2005; 王军等, 1999)。因此, 加强对美洲斑潜蝇的检疫和监测成为维护我国对外贸易信誉, 保障人民健康生活的必要前提。美洲斑潜蝇以卵和幼虫藏匿在寄主植物组织内, 随切花、切条、带叶的瓜、果、豆、菜、其他寄主叶片以及盆景植物进行远距离传播; 蛹随寄主植株土壤传播 (EPPO/CABI, 2011)。因此, 要加强对美洲斑潜蝇的检疫与监测必需建立一套快速准确的分子检测技术。

目前, 世界上的斑潜蝇属昆虫约有 300 种, 但真正危害农作物的仅有 23 种 (Parrella, 1987), 我国已知有 14 种 (杨龙龙, 1995)。斑潜蝇属害虫体型较小 (如美洲斑潜蝇成虫体长 1.3~2.3 mm, 卵 0.2~0.3 mm), 且外部形态极为相似, 卵、幼虫和蛹更

难以从形态上加以区分 (附录)。然而, 检疫工作中截获的斑潜蝇多为卵、幼虫或蛹。通常斑潜蝇属害虫幼期阶段多因形态不稳定或特征不明显而难以鉴定分类, 无法及时进行种类识别, 为检疫工作带来诸多不便 (陈萍等, 2002; Frick, 1952; Sasakawa, 1961), 而分子生物学技术的发展与应用为检疫害虫的及时鉴定提供了快捷而准确的途径。本研究以重要检疫害虫美洲斑潜蝇为靶标, 以我国菜田常见潜叶蝇类害虫, 包括南美斑潜蝇 *Liriomyza huidobrensis* Blanchard、三叶斑潜蝇 *Liriomyza trifolii* Brugess、葱斑潜蝇 *Liriomyza chinensis* Kato、豌豆潜叶蝇 *Phytomyza horticola* Goureau 等为参照, 采用种特异性 PCR (species-specific PCR, SS-PCR) 进行快速鉴定技术的研究, 旨在为有效阻截美洲斑潜蝇的进一步传播扩散, 保障国家贸易信誉和农业生产安全提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

美洲斑潜蝇饲养于中国农业科学院植物保护研究所南区温室, 寄主植物为菜豆 *Phaseolus vulgaris* L.; 南美斑潜蝇采自云南省昆明市呈贡县蔬菜生产基地, 寄主植物为芹菜 *Apium graveolens* L.; 三叶斑潜蝇由华南农业大学资源环境学院昆虫生态研究室提供; 葱斑潜蝇采自市售大葱 *Allium fistulosum* L., 产地为山东省章丘市; 豌豆潜叶蝇采自北京市密云县河南寨乡, 寄主植物为二月兰 *Orychophragmus violaceus* (L.) Schulz。

1.2 潜叶蝇总 DNA 的制备

参照王莉萍等 (2007) 和周志湘等 (2007) 的方法并稍加改动。取美洲斑潜蝇、南美斑潜蝇、三叶斑潜蝇、葱斑潜蝇和豌豆潜叶蝇各 1 头 (粒), 置于滴有 20 μL DNA 提取缓冲液 (pH 8.0, 0.05 mol Tris-HCl、0.001 mol EDTA、0.02 mol NaCl、1% SDS) 的 Parafilm 膜上, 用 0.2 mL 的 PCR 管底部作为匀浆器充分研磨匀浆, 匀浆液用微量移液器移入 1.5 mL 离心管; 然后用 100 μL 提取缓冲液分 2 次冲洗匀浆器, 并移入同一离心管, 混匀; 向管中加入 8 μL (20 mg $\cdot$ mL⁻¹) 蛋白酶 K, 充分混匀后, 于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1.5 h (中途混匀 1 次); 然后沸水浴 8 min, 加入 220 μL 氯仿/异戊醇 ($v:v=24:1$) 抽提液, 轻柔混匀数 10 次后, 冰浴 30 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 20 min, 取上清液,

加入 440 μL 预冷无水乙醇,轻轻混匀,待出现少量絮状沉淀后于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,弃去上清液。加入 400 μL 75% 预冷乙醇洗涤, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,弃去上清液;然后将离心管倒扣于洁净滤纸上,自然干燥 30 min 后每管加入 30 μL 超纯水(其中美洲斑潜蝇的蛹以及 1~3 龄幼虫以 20 μL 超纯水复溶,卵以 10 μL 超纯水复溶),充分溶解后于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 美洲斑潜蝇 SS-PCR 引物的设计

在 GenBank 中调用已知的美洲斑潜蝇线粒体 DNA 细胞色素氧化酶亚基 I 基因(mitochondrial DNA cytochrome oxidase I, mtDNA COI)序列(GenBank 登录号为 EU219613)(Shang *et al.*, 2008),运用 Primer Premier 5 软件将美洲斑潜蝇 COI 序列与其近缘种南美斑潜蝇、三叶斑潜蝇、葱斑潜蝇的 COI 序列进行比较分析,选取美洲斑潜蝇与其他潜叶蝇类昆虫同源性最低的区段,根据该区段的碱基序列设计 1 对美洲斑潜蝇特异性引物 LSCZE1/LSCZF1,上游引物碱基序列为 TCGAGCAGAATTAGGACAT,下游引物碱基序列为 ATTGAAGAAAGTGGAGGGT(上海生物工程技术有限公司协助合成),引物扩增片段大小为 294 bp。

1.4 SS-PCR 引物的种特异性检验

分别以单头南美斑潜蝇、三叶斑潜蝇、葱斑潜蝇、豌豆潜叶蝇的 DNA 为模板,美洲斑潜蝇为阳性对照,检验美洲斑潜蝇特异片段扩增引物 LSCZE1/LSCZF1 的种特异性。PCR 反应体系为 20 μL ,其中超纯水 11.4 μL 、 $10\times$ 缓冲液 2.0 μL 、 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP 0.4 μL 、 $5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ *Taq* 聚合酶 0.2 μL (美国 NEB 公司)、 $20\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 上游引物和下游引物各 2.0 μL 、模板 DNA 2.0 μL 。扩增程序: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 s, $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 s, 40 个循环;最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。扩增反应在 ABI-9700 PCR 基因扩增仪上运行。取 5 μL PCR 扩增产物在 1.5% (重量) 琼脂糖(amresco)凝胶上以 80 V 电泳(Bio-Rad Power-Pac Basic)分离 50 min,然后以 GelDoc Universal Hood II 型凝胶成像系统(Bio-Rad Laboratories)分析电泳结果。每个种类分别检测 10 头,并随机以其他 2 种型号(Bio-Rad iCycler 和 ABI Veriti)的 PCR 仪进行验证。

1.5 SS-PCR 引物对不同虫态的扩增效果以及最低检测阈值的测定

分别以提取的不同性别(雌性成虫、雄性成虫)与虫态(卵、1~3 龄幼虫和蛹)的美洲斑潜蝇 DNA 为模板,进行靶标片段扩增效果检验,每种性别或虫态分别检测 10 头。此外,取单头雌性成虫原模板 DNA 溶液 2 μL (即 1/15 头成虫)以 2 倍浓度递减梯度稀释至 1/30720 头成虫 DNA,然后以不同浓度的成虫 DNA 模板(即 1/15、1/30、1/60、1/120、1/240、1/480、1/960、1/1920、1/3840、1/7680、1/15360、1/30720 头成虫)进行最低检出阈值的测定,每个浓度共计检测 10 头。

2 结果与分析

2.1 美洲斑潜蝇 SS-PCR 引物的种特异性检验

以美洲斑潜蝇及其近缘种属潜叶蝇类昆虫的 DNA 为模板,以所设计的特异性引物 LSCZE1/LSCZF1 进行 PCR 扩增。检测结果显示,该引物只对美洲斑潜蝇具有扩增能力,对其他种类的潜叶蝇没有扩增能力,表明该引物为美洲斑潜蝇的特异性引物(图 1)。

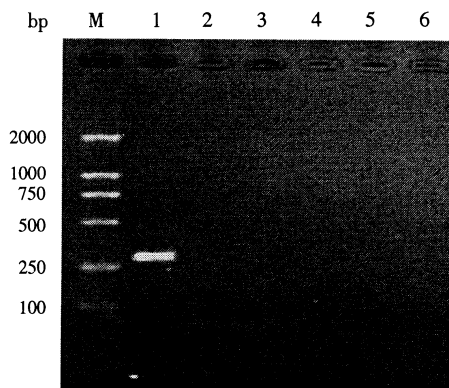


图 1 SS-PCR 引物 LSCZE1/LSCZF1 对美洲斑潜蝇及其近缘种属潜叶蝇的 PCR 扩增结果

Fig. 1 Amplification pattern of mitochondrial DNA of *L. sativae* and its related leafminer species using SS-PCR primers LSCZE1/LSCZF1

M: 标准 DNA 分子质量; 1~6: 美洲斑潜蝇、南美斑潜蝇、豌豆潜叶蝇、三叶斑潜蝇、葱斑潜蝇、阴性对照(模板为水)。
M: DNA marker; Line 1~6: *L. sativae*, *L. huidobrensis*, *P. horticola*, *L. trifolii*, *L. chinensis*, negative control (using ultra pure water as the template).

2.2 SS-PCR 引物对美洲斑潜蝇不同虫态的扩增效果

以不同性别和虫态的美洲斑潜蝇 DNA 为模板,以 SS-PCR 引物 LSCZE1/LSCZF1 进行扩增,结果显示,不同性别与虫态的美洲斑潜蝇均能稳定扩增出 294 bp 的特异性片段(图 2)。

2.3 SS-PCR 引物对美洲斑潜蝇成虫的最低检测阈值

当将单头雌性成虫的 DNA 模板进行递减梯度稀释至 1/3840 头时,所有的个体均能扩增出特异性的靶标片段;当稀释为 1/7680 头时,仍有 60% 的个体可扩增出清晰的条带(图 3)。

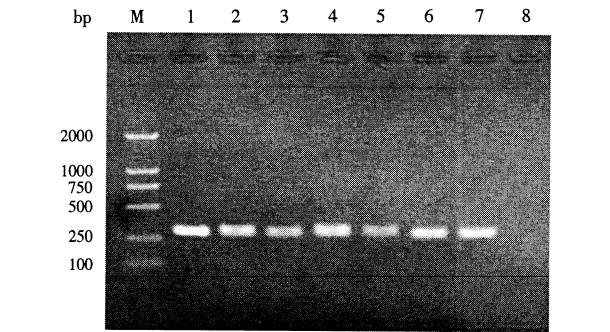


图 2 SS-PCR 引物 LSCZE1/LSCZF1 对美洲斑潜蝇不同虫态和性别的 PCR 扩增结果

Fig.2 Amplification pattern of mitochondrial DNA from different developmental stages and sexes of *L. sativae* using SS-PCR primers LSCZE1/LSCZF1

M: 标准 DNA 分子质量; 1~8: 雌性成虫、雄性成虫、蛹、1 龄幼虫、2 龄幼虫、3 龄幼虫、单粒卵、阴性对照(模板为水)。

M: DNA marker; Line 1~8: adult female, adult male, pupa, 1st instar larva, 2nd instar larva, 3rd instar larva, egg (a single egg), negative control (using ultra pure water as the template).

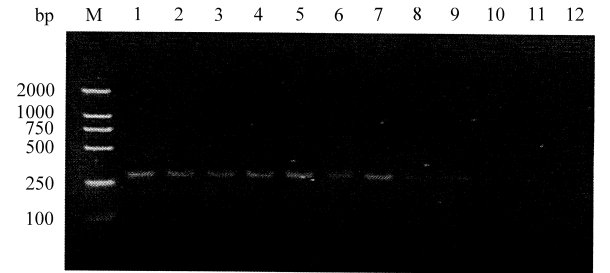


图 3 SS-PCR 引物 LSCZE1/LSCZF1 对美洲斑潜蝇的最低检出阈值

Fig.3 The detection efficiency for *L. sativae*, using a dilution series of mitochondrial DNA isolated from a single adult, using the specifically designed SS-PCR primers LSCZE1/LSCZF1

M: 标准 DNA 分子质量; 1~12 分别为 1/15、1/30、1/60、1/120、1/240、1/480、1/960、1/1920、1/3840、1/7680、1/15360、1/30720 头雌成虫。

M: DNA marker; Line 1~12 represent dilution series: 1/15, 1/30, 1/60, 1/120, 1/240, 1/480, 1/960, 1/1920, 1/3840, 1/7680, 1/15360, 1/30720.

3 讨论

种类鉴定是害虫检疫的首要工作。目前,斑潜蝇属昆虫的识别主要依据成虫的形态特征(Sasakawa,1961; Shiao *et al.*,1991; Spencer,1986);成虫前各时期(卵、幼虫、蛹)的鉴定由于形态不稳定或特征不明显而无法实施(陈萍等,2002; Frick,1952;

Sasakawa,1961),通常的做法是将其进行室内饲养,待羽化后再做鉴定,不仅耗时长,而且常因标本数量少而使鉴定工作无法完成(邱一中等,2000)。因此,研究开发快速、简便、准确且适用于昆虫不同发育时期的害虫鉴定新技术,是有效阻止危险性害虫进一步传播扩散,增强检验检疫和检测监测能力的必要前提。

目前,以分子生物学技术进行检疫性害虫种类鉴定识别以及检测监测的研究时有报道并逐渐得以推广应用,其中 RAPD(random amplification of polymorphic DNA)(邱一中等,2000; Çöl *et al.*,2006)、RFLP(restriction fragment length polymorphism)(陈萍等,2002; Scheffer *et al.*,2001)、多重 PCR(mutiplex PCR)(Miura *et al.*,2004)以及 DNA 条形编码(DNA barcoding)(Scheffer *et al.*,2006)等技术均已用于斑潜蝇属害虫的鉴定研究,并取得良好成效。但是, RAPD 标记技术对环境因子的变化较为敏感,扩增产物的可重复性相对较差,结果的可靠性低,因此目前已较少使用;RFLP 技术由于所需 DNA 量大,步骤多,周期长,而且制备探针及检测中要用到放射性同位素,虽可利用非放射性同位素标记方法代替,但成本高,成功率低,因此影响了其推广使用。mtDNA COI 基因为多拷贝,母系遗传基因,既具有相对的保守性又有足够的变异性,进化速率比核 DNA 快,很少存在插入和缺失,检测灵敏度高,适用于种间鉴别(Hoelzel,1991; Hoy,1994)。基于 COI 基因的 DNA 条形编码技术尽管需要经过产物回收、纯化、测序以及序列比对等步骤,但目前已成为物种鉴定的新方法。SS-PCR 技术由 COI 标记技术转化而来,具有重现性强、谱带单一等优点,适宜于大规模快速检测分析。

本研究根据已知的美洲斑潜蝇 mtDNA COI 基因序列,设计美洲斑潜蝇特异性引物 1 对,并通过 SS-PCR 技术证实该引物只对美洲斑潜蝇 mtDNA 具有扩增能力,对同域发生的其他种类的潜叶蝇类害虫,如南美斑潜蝇、三叶斑潜蝇、葱斑潜蝇、豌豆潜叶蝇等没有扩增能力;该技术体系不仅对美洲斑潜蝇的成虫具有良好的扩增效果,而且对单头 1~3 龄幼虫、蛹以及单粒卵也具有同样的扩增效果;同时,该技术体系还具有较强的灵敏性,其最低检出阈值为 1/3840 头成虫;对靶标序列的测序及 Gen-Bank 比对结果显示,该片段与美洲斑潜蝇的同源性为 100%(Shang *et al.*,2008; Yang *et al.*,2011),而与

其他双翅目昆虫的同源性均低于 96% (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。此外,SS-PCR 分析技术操作简便快捷,缩短了通关时间,提高了工作效率。因此,该技术体系可以用于美洲斑潜蝇的检测鉴定工作,并在害虫检疫检验与检测监测中具有重要应用价值。然而,由于我国菜园常见的潜叶蝇类害虫种类较多,本研究中 SS-PCR 引物的特异性仍有待进一步验证。

致谢:北京城市学院生物技术专业的袁波同学和长江大学农学院植物保护专业的陈婷婷同学协助完成部分试验,表示感谢!

参考文献

- 陈兵, 赵云鲜, 康乐. 2002. 外来斑潜蝇入侵和适应机理及管理对策. 动物学研究, 23(2): 155–160.
- 陈萍, 温硕洋, 曾玲. 2002. PCR-RFLP 技术应用于鉴定美洲斑潜蝇和番茄斑潜蝇的初步研究. 武夷科学, 18(1): 60–64.
- 陈文龙, 张润杰. 2003. 美洲斑潜蝇生物学特性研究. 中山大学学报: 自然科学版, 42(6): 91–92.
- 范文中, 王中武. 2005. 美洲斑潜蝇的发生及防治. 吉林农业科技学院学报, 14(4): 11–13.
- 胡长效, 苏新林. 2003. 我国美洲斑潜蝇发生及防治研究进展. 江西农业学报, 15(1): 48–54.
- 雷仲仁, 王音. 2005. 美洲斑潜蝇//万方浩, 郑小波, 郭建英. 重要农林外来入侵物种的生物学与控制. 北京: 科学出版社, 177–205.
- 邱一中, 吴文哲, 萧旭峰, 石正人. 2000. RAPD-PCR 在六种斑潜蝇 (*Liriomyza* spp.) (双翅目: 潜蝇科) 快速鉴定技术之应用. 中华昆虫, 20(4): 293–309.
- 王军, 石宝才, 宫亚军, 廖度, 宋婧, 路虹. 1999. 美洲斑潜蝇寄主植物调查名录. 北京农业科学, 17(1): 37–39.
- 王莉萍, 杜予州, 何娅婷, 陆亚娟, 陆自强. 2007. 不同地理种群美洲斑潜蝇及近缘种的 rDNA-ITS1 序列分析和比较. 昆虫学报, 50(6): 597–603.
- 闫锦曾, 王音, 雷仲仁. 1996. 美洲斑潜蝇中国新纪录. 昆虫分类学报, 18(4): 311–312.
- 杨龙龙. 1995. 对斑潜蝇属中检疫性害虫的研究. 植物检疫, 9(1): 1–5.
- 周志湘, 万方浩, 张桂芬, 陈斌. 2007. 烟粉虱基因组 DNA 快速提取方法. 植物保护, 33(5): 131–133.
- Çöl B, Tonguç A, Özgül O, Civelek H S and Kaya B. 2006. The use of RAPD-PCR analysis in characterization of *Liriomyza trifolii* (Burgess, 1880), *Liriomyza congesta* (Becker 1903), *Agromyza apfelbecki* Strobl, 1902 and *Chromatomyia horticola* (Goureau, 1851) species collected from Turkey. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 30(4): 243–253.
- Deeming J C. 1992. *Liriomyza sativae* Blanchard (Diptera: Agromyzidae) established in the old world. *Tropical Pest Management*, 38(2): 218–219.
- EPPO/CABI. 2011. *Liriomyza sativae*. *Data Sheets on Quarantine Pests*. <http://www.eppo.org/QUARANTINE/listA2.htm> (2011–10–10).
- Frick K E. 1952. A generic revision of the family Agromyzidae (Diptera) with a catalogue of New World species. *University of California Publications in Entomology*, 8: 339–452.
- Hoelzel A R. 1991. Analysis of regional mitochondrial DNA variation in the killer whale; implications for conservation//Hoelzel A R. *Genetic Ecology of Whales and Dolphins*. Report to the International Whaling Commission. UK: Cambridge, 225–233.
- Hoy M A. 1994. *Insect Molecular Genetics: An Introduction to Principles and Applications*. San Diego, California: Academic Press.
- Miura K, Tagami Y, Ohtaishi M and Iwasaki A. 2004. Application of molecular techniques to distinguish *Liriomyza trifolii* from *L. sativae* (Diptera: Agromyzidae) on tomato cultivation in Japan. *Journal of Economic Entomology*, 97(3): 964–969.
- Parrella M P. 1987. Biology of *Liriomyza*. *Annual Review of Entomology*, 32: 201–224.
- Sasakawa M. 1961. A study of the Japanese Agromyzidae (Diptera), Part 2. *Pacific Insects*, 3: 307–472.
- Scheffer S J, Lewis M L and Joshi R C. 2006. DNA barcoding applied to invasive leafminers (Diptera: Agromyzidae) in the Philippines. *Annals of the Entomological Society of America*, 99(2): 204–210.
- Scheffer S J, Wijesekara A, Visser D and Hallett R H. 2001. Polymerase chain reaction-restriction fragment-length polymorphism method to distinguish *Liriomyza huidobrensis* from *L. langei* (Diptera: Agromyzidae) applied to three recent leafminer invasions. *Journal of Economic Entomology*, 94(5): 1177–1182.
- Shang H, Zhao Y, Cui X, Li H, Zhou J and Huang T. 2008. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assays to distinguish *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) from associated species in China. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/163867295> (2011–11–02).
- Shiao S F, Lin F J and Wu W J. 1991. Redescription of four *Liriomyza* species (Diptera: Agromyzidae) from Taiwan. *Chinese Journal of Entomology*, 11: 65–74.
- Spencer K A. 1986. Agromyzidae (Diptera) from Thailand: new species, revisionary notes and new records. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences*, 95: 487–507.
- Yang F, Du Y Z, Wang L P, Cao J M and Yu W W. 2011. The complete mitochondrial genome of the leafminer *Liriomyza sativae* (Diptera: Agromyzidae): great difference in the A + T-rich region compared to *Liriomyza trifolii*. *Gene*, 485(1): 7–15.
- Zitter T A and Tsai J H. 1980. *Flies*//Harris K F and Maramorosch K. *Vectors of Plant Pathogens*. New York, USA: Academic Press, 165–176.