2010 年 1 月

植物检疫措施委员会
第五届会议
2010 年 3 月 22－26 日，罗马
通过国际标准：采用特别程序（棕榈蓟马诊断规程）
暂定议程议题 9.3

1. 棕榈蓟马诊断规程由标准委员会（标准委）在2004年11月列入工作计划，由植检委第一届会议（2006年）批准作为《国际植保公约》标准制定工作计划的一部分。草案于2007年6月送交成员磋商，采用快速标准制定程序。已收到正式反对意见，秘书处就如何推进该项工作寻求植检委第三届会议（2008年）提供指导。植检委第三届会议决定按照特别标准制定程序来推进棕榈蓟马诊断规程草案。因此诊断规程技术小组于2008年6月对文本草案进行了审议，并以电邮方式送交标准委审批然后进行第二轮成员磋商。

2. 该草案于2009年6月送交成员磋商。标准委在2009年11月获悉，已收到大约200分意见，决定将这些意见转交诊断规程技术小组。

3. 诊断规程技术小组审议了这些意见，对草案做了修订，标准委以电邮形式批准了修订的草案提交植检委第五届会议通过。

4. 请植检委：

   1. 通过附件一中所含的棕榈蓟马诊断规程，作为第 27 号国际植检措施标准（限定有害生物诊断规程）的附件。

为尽量减轻粮农组织工作过程对环境的影响，促进实现对气候变化零影响，
本文件印数有限。谨请各位代表、观察员携带文件与会，勿再索取副本。
粮农组织大多数会议文件可从互联网www.fao.org网站获取。

国际植物检疫措施标准

第 27 号国际植检措施标准附件－2006 年

棕榈蓟马

(201-)

目 录

通 过 2

1. 有害生物信息 2

2. 分类学信息 3

3. 检测 3

4. 鉴定 5

4.1 蓟马成虫的形态学鉴定 5

4.1.1 供显微镜检查的蓟马标本的制备 5

4.1.2 蓟马科的鉴定 6

4.1.3 蓟马属的鉴定 6

4.1.4 棕榈蓟马的鉴定 8

4.1.4.1 棕榈蓟马的形态特征 8

4.1.4.2 与类似种比较（黄色无暗色体斑，或主要为黄色，或有时黄色的种） 9

4.2 鉴定棕榈蓟马的分子化验 19

4.2.1 棕榈蓟马以 SCRA 标记产生的序列为依据的实时 PCR 检测 20

4.2.2 棕榈蓟马以 COI 序列为依据的实时 PCR 检测 20

4.2.3 包括棕榈蓟马在内的 9 种蓟马的以 ITS2 序列为依据的 PCR-RELP 检测 21

4.2.4 包括棕榈蓟马在内的 10 种蓟马的以 COI 序列为依据的 PCR-RFLP 检测 21

5. 记录 22

6. 进一步提供情况的联络点 22

7. 致谢 23

8. 参考文献 23

通 过

本诊断规程由植物检疫措施委员会于---通过

1. 有害生物信息

棕榈蓟马(Thysanoptera: Thripidae)是一种多食性害虫，主要为害葫芦科和茄科植物。棕榈蓟马起源于南亚并于二十世纪后期从南亚开始蔓延。在整个亚洲都有记录并在整个太平洋和加勒比海地区广泛分布。该虫害还在北美、中美和南美洲及非洲局部地区记录。关于棕榈蓟马的更多综合信息，请查阅EPPO/CABI (1997年) 或 Murai (2002年),在线有害生物数据单也可通过有害生物及病害图库(PaDIL，2007)和EPPO(EPPO,2008)查询。

棕榈蓟马通过直接取食作物及传播落花生芽坏疽病毒(Groundnut bud necrosis virus)、甜瓜黄斑病毒(Melon yellow spot virus)和西瓜银灰斑驳病毒(Watermelon silver mottle virus)等斑萎病毒属病毒造成农作物经济损失。棕榈蓟马的食性极杂，其已记录的危害植物超过36个科。棕榈蓟马是以下大田作物的有害生物：冬瓜、辣椒、西瓜、甜瓜、黄瓜、南瓜、大豆、棉花、向日葵,烟草,菜豆,豌豆,芝麻,茄子,马铃薯和豇豆。在温室中，具有经济重要性的寄主作物包括辣椒、茼蒿属、黄瓜、仙客来属、榕属、兰科和茄子。蓟马可以随寄主作物的繁殖材料、切花和果实及包装材料和土壤中传播。

棕榈蓟马几乎遍体黄色（图1-3），由于其个体较小（1.0–1.3毫米）并与其它黄色的或以黄色为主的蓟马属种非常相似而很难辨认。

图 1: 棕榈蓟马;雌虫（左）和雄虫 (照片: A. J. M. Loomans，PPS，Wageningen，荷兰; 比例尺= 500 µm = 0.5 mm)

图 2：棕榈蓟马，雌虫　　图 3:棕榈蓟马，雄虫

(照片: W. Zijlstra，PPS，Wageningen，荷兰；比例尺：300 µm)

2.　分类学信息

- 学名:　Thrips palmi Karny，1925
- 异名:　Thrips clarus Moulton，1928

  Thrips leucadophilus Priesner，1936

  Thrips gossypicola Ramakrishna & Margabandhu，1939

  Chloethrips aureus Ananthakrishnan & Jagadish，1967

  Thrips gracilis Ananthakrishnan & Jagadish，1968
- 分类地位：昆虫纲，缨翅目,锯尾亚目,蓟马科,蓟马属
- 俗名:　melon thrips

3.　检 测

棕榈蓟马在不同的生长阶段通常生活在不同栖息地:

- 卵　在叶片、花和果实组织内
- 1龄若虫　在叶片、花和果实上

- 2龄若虫　　在叶片、花和果实上
- 蛹 I　　在土壤、包装箱和生长媒介中
- 蛹 II　　土壤、包装箱和生长媒介中
- 成虫　　叶片、花和果实上

在植物材料上，大部分地上部位都可能潜在的携带棕榈蓟马；植物被侵害的部位可因寄主及棕榈蓟马种群特性不同而有差异。

在目检植物材料上是否存在棕榈蓟马时，必须注意寄主植物叶片表面的银色取食疤痕，特别是叶中脉和侧脉附近。被严重侵害的植株通常表现为叶片呈银灰色或青铜色，叶片和顶端叶鞘发育受阻，果实上有疮痂和缺刻。下列情况可能妨碍检测:

- 低度侵害仅产生轻度症状或无法检测的症状
- 仅有虫卵存在于植物组织内(例如在外部处理后，可能已经除去处于可见生长阶段的棕榈蓟马)

供形态学检测的样品最好保存在一种称为AGA的液体中，该液体是由60%的乙醇、甘油和乙酸按10：1：1的比例配制而成。如要保存样品，应将样品移至60%乙醇溶液中避光保存，为防止退色，最好在0°C以下保存样品。然而，几个试验室已报告AGA可能引起蓟马DNA的变性，从而干扰随后的分子检测工作。鉴于任何未被封固的样品可被用于随后的分子检测，一种替代方法是使用80-95%的乙醇作为保存液。然而，此种情况下样品必须在0°C以下保存直至使用，否则样品将很难被封固。

收集蓟马样品可采用下列几种方法（Mantel and Vierbergen，1996年;修订版）：

- 使用潮湿的细刷将蓟马从植物（叶片、花或果实）上分别移至装有AGA溶液的微型离心管中。
- 将蓟马从植株部位上敲落到小塑料盘上 (例如使用白盘采集深色样品或使用黑盘采集浅色样品) 。在较冷条件下，蓟马通常会在盘子上爬行而不是飞离，从而有时间使用潮湿的细刷将蓟马粘取下来,然而在温暖条件下,由于蓟马会更快地飞离,必须更迅速地完成收集。使用手持放大镜即可轻易看到盘子上的蓟马，但有经验的观测者也可凭肉眼见到它们。
- 将植株部分密封在塑料袋中24小时，内置一张滤纸吸收水分。大多数蓟马会离开植株部分，然后可从塑料袋内部采集蓟马。

- 伯利斯漏斗可用于处理诸如鳞茎、花、草皮、树叶、苔藓甚至树木枯枝。漏斗中有一个筛网，可将植物材料堆放在上面。筛网下的漏斗底部连接一个装有70-96%乙醇的接收容器。一种替代方法是使用10%的乙醇加润湿剂，因为一些工作人员发现这使优质显微玻片的制备比较容易。将漏斗放在电灯泡下(60 W)，植株上的蓟马畏光受热后向下爬逃到容器中。经过适当的时间（如切花8小时），即可在立体显微镜下检查容器中收集到的蓟马。
- 还可使用彩色诱捕粘板或其它适当方法监测蓟马（仅适用于有翅成虫）。不同颜色对不同蓟马种类的吸引度不同，蓝色或白色粘板适用于棕榈蓟马，黄色的也有一定效果。制备显微玻片和鉴定,必须使用基于柑橘油、二氯甲烷或松节油替代品的胶水去除液将蓟马从粘板上移走。

从检疫性土壤中采集蓟马蛹尚无得到认可的办法。

4. 鉴 定

由于缺乏足够的形态学特征来鉴定卵、若虫或蛹，采用形态学鉴定蓟马种类仅适用于成虫样品。然而，若虫样品能提供诸如其在寄主作物上的生长发育情况等重要辅助信息。从形态特征加以鉴定是鉴定成虫材料的首选方法。为了完成品种鉴定，必须使用高倍数显微镜（如X400）。有优质玻片标本时，使用本规程仅通过形态学检测方法即可准确鉴定出棕榈蓟马的成虫。

分子检测可适用于各种虫态，包括无法使用形态学进行品种鉴定的未成熟阶段。此外，当成虫样品不够典型或已损坏时，分析检测可提供有关其身份的相关信息。然而，由于分子检测是为特定目的制订，并利用不同地区的样品对少数蓟马种类进行过评价，因此分子检测特异性有限；从而需要对上述信息进行仔细判读。

4.1 蓟马成虫的形态学鉴定

4.1.1 供显微镜检测的蓟马标本的制备

为进行高倍数显微镜检测，蓟马成虫必须被封固在显微镜玻片上。收集保存的样品最好浸软，脱水并用加拿大树胶封固，Mound and Kibby（1998年)对这一过程进行了详细描述。然而，用于存档封固的完整的玻片制备过程需要3天时间才能完成。

对于常规鉴定，诸如霍耶氏封固剂 (50 ml 水，30 g 阿拉伯胶，200 g 水合三氯乙醛，20 ml 甘油)等水溶性封固剂更为快捷且相对便宜。Mound 和 Kibby (1998年)提出了一个比较通用的常规玻片制备方法并推荐按下列步骤操作（不同实验室可能发现其它方法也同样有效）：

将样品从收集液中移至洁净的70%乙醇溶液中，如果样品较软，尽量用挑针将腿、翅和触角展开。将单只蓟马腹部向上移至一滴在直径为13 mm盖玻片上的霍耶氏封固剂中，如有必要使用挑针重新整理蓟马，将载玻片慢慢地放在封固剂上，使盖玻片和封固剂粘附到玻片中间，当封固剂延展到盖玻片边缘后立即将载玻片翻转过来，对载玻片进行标记，包括位置、收集日期和寄主植物等详细资料，盖玻片在上，将载玻片放进烘箱在35–40°C下烘烤至少6个小时后才能用于检测。在使用树胶或指甲油封固盖玻片前，将玻片置于烘箱中在35–40°C条件下存放3周以干燥封固剂。

4.1.2 蓟马科的鉴定

棕榈蓟马属于蓟马科，蓟马科包括大约276个属2000个种。种具有表1所列特征。

表 1：蓟马科-共同特征

身体部位	特征
触角	7-8 节（个别 6 节或 9 节）
	触角第 3 和 4 节具突起的感觉锥（感觉中枢）
前翅（如果完全发育）	通常细长，有 2 条纵向翅脉，各具一列刚毛
腹部-雌虫	有锯状产卵器，端部向下弯曲
中部腹片-雄虫	有或没有腹腺域

4.1.3 蓟马属的鉴定

尽管蓟马属主要分布在全北区和旧世界热带，其包括分布在世界各地的280多种蓟马。蓟马属成员具有表2所列的共同特征。

表 2：蓟马属-共同特征，成虫样品

身体部位	特 征
体形（雌虫）	大翅或小翅
触角	7 或 8 节
	第 3 和 4 节有叉状的感觉锥
单眼刚毛	仅有两对单眼刚毛（第 1 对缺失）
	第 2 对比第 3 对短（至少不长于）
背板	2 对（很少 1 对或没有）主后侧刚毛，
	通常有 3 对，有时 4 对后缘刚毛
前胸前缘	无刚毛
前翅	第一翅脉具间距不同的刚毛排，第二翅脉具完整刚毛排
	脉结有 5 个脉刚毛（偶尔 6 个）
后胸盾片	中央一对刚毛在前缘上或前缘后
	线状或网状刻纹，
	钟状感觉器存在或缺失
后胸叉	无刺
前胫骨	无端爪
跗节	2 节
腹部背片和腹板	没有后缘梳 （凸缘）
腹部背片	第 5-8 节背片有一对栉齿状突起（“梳”-每个含有一系列背状突）（偶尔在第 4 节）
	第 8 背片：栉齿状突起延伸至气门附近
腹片或侧背片	有或无中域（附属的）刚毛
腹片（雄虫）	3-7 或更少腹板，每腹板都有一个腺域

表 4 给出了主要特征的简要概述，并附有线图说明和显微照片（图 4 到 5.12）

可使用检索表鉴定成虫。Mound 和 Kibby (1998年) 发表了包括棕榈蓟马在内的具有经济重要性的14种蓟马的检索表。此外，还有一张辅助鉴定蓟马的光盘，该光盘包括基于光学显微镜检测技术对全世界100种有害生物种类进行鉴定的系统(Moritz et等，2004年)。

已制定以地区为基础的更全面的蓟马属检索表（尚未为非洲热带地区制定这种检索表）

亚洲：Bhatti (1980年) 和 Palmer (1992年)提出了鉴定亚洲热带地区发生的蓟马种类的检索表。Mound & Azidah (2009年)提出马来西亚半岛蓟马种类检索表。

欧洲：zur Strassen (2003 年)已经制定出包括棕榈蓟马在内的欧洲种的最新综合检索表（德语）

北美洲、中美洲和南美洲：Nakahara (1994年)制订了来自新大陆的蓟马种检索表。Mound and Marullo (1996年)制定了在中南美洲发现的蓟马种检索表，尽管这些种中只有一个种是本地种。

大洋洲：Mound 和 Masumoto (2005年)提出了澳洲蓟马种类的检索表（文章作者已知在42页“关系”一节错误地将黄蓟马的特征-第3对单眼刚毛在第1单眼后距离很近作为棕榈蓟马的特征。上文提供了关于蓟马种描述的正确信息并在图72中进行了标注）。

4.1.4 棕榈蓟马的鉴定

4.1.4.1 棕榈蓟马的形态学特征

Bhatti (1980年)，Bournier (1983年)，Sakimura 等 (1986年)，zur Strassen (1989年)，Nakahara (1994年)，Mound 和Masumoto (2005年)均对棕榈蓟马进行了详细的描述。Sakimura 等 (1986年)列出了棕榈蓟马与蓟马属其它已知种的主要诊断特征，表3列出了修订后的内容。

通过表3列出的所有特征，可以准确地将棕榈蓟马与蓟马属的其它种区分开。然而，即使同一种内的蓟马形态也不相同，此处列出的有些特征有时有轻微变异。例如，触角的颜色以及前翅端刚毛的数量可能与最常见的情况不同。如果样品与这些陈述特征中的一项或多项不同，则应通过参考如4.1.3节中列出的相应的地区要素进行鉴定。

表 3：综合区分棕榈蓟马与蓟马属其它种的形态特征表

	形态特征
1.	身体亮黄色，头、胸或腹部无暗色区域（少量粗黑身体刚毛）：第 1 节和第 2 节触角为淡白色，第 3 节黄色并在顶点处变暗，第 4-7 节褐色但通常第 4-5 节基部黄色，前翅均匀变暗，突出的暗色刚毛。
2.	触角总是 7 节
3.	第 2 对和第 4 对眼后刚毛明显小于其它刚毛
4.	第 3 对单眼刚毛位于单眼三角区之外或触及前单眼和每一个后单眼连成的三角形切线。
5.	后胸背板上的刻纹渐次聚合，前缘后中央一对刚毛，一对钟状感觉器
6.	前翅第一翅脉上有 3 根末梢刚毛（偶尔 2 根）
7.	腹部第 2 背片有 4 根侧刚毛
8.	腹部第 2 至第 5 背片上的 S2 刚毛呈深色或与 S3 刚毛颜色相近
9.	雌虫腹部第 8 背片有完整的栉齿状突起（或称“梳”），雄虫大体长在后部
10.	腹部第 9 背片通常有 2 对钟状感觉器（气孔）
11.	腹部腹片没有中域刚毛或纤毛
12.	腹部侧腹片没有中域刚毛
13.	雄虫腹部第 3-7 腹片上各有 1 个狭窄的腹腺域

表 4 对主要特征进行了简要总结并附有线图说明和显微照片（图 4 至 5.12）

4.1.4.2 与相似种比较（黄色无暗色体斑，或主要为黄色，或有时黄色的种）

对于此处列出的每个种，均给出了可以将它们与棕榈蓟马区分开的主要特征。如有任何疑问，参考4.1.3节中列出的相应的地区要素。4.1.3节还列出了下文未列出的其它蓟马种类。

两个印度种（(T. alatus 和 T. pallidulus)与棕榈蓟马非常相似，尽管对他们的生物学特性了解很少。

Thrips alatus

- 触角第 5 节完全为褐色
- 雌雄虫的腹部第 3 和第 4 背片 S2 刚毛比 S3 刚毛色淡且细小得多
- 后胸盾片上的刻纹通常不在后部聚合
- 分布在印度、马来西亚和尼泊尔

Thrips pallidulus

- 触角第 4 节色淡
- 后胸背板刻纹呈平均网状，而非条纹状
- 分布于印度

可能与棕榈蓟马混淆的三个常见的古北区种（分布也更广）是黄蓟马（T. flavus）、豆黄蓟马（T. nigropilosus Uzel）和烟蓟马（T. tabaci Lindeman）：

黄蓟马

- 第 3 对单眼刚毛在单眼三角形内，就在前面单眼后
- 第 6 节触角长 54–60 µm (棕榈蓟马 42–48 µm)
- 后胸背板刻纹后部不聚合
- 分布：遍及亚洲和欧洲的常见的花卉蓟马

豆黄蓟马

- 胸、腹部通常有暗色斑点
- 后胸背板有不规划的中间网线（棕榈蓟马是纵向刻纹），无钟状感觉器

- 腹部第 2 背片上有 3 根侧刚毛
- 腹部第 4-5 节背片有一对中央刚毛（S1），其长度是这些背片中线长度的 0.5 倍（棕榈蓟马小于 0.3 倍）
- 分布：是常见的食叶种，有时是温室害虫，分布在亚洲、大洋洲、东部非洲、欧洲和北美洲

烟蓟马

- 有各种颜色，但通常具有或多或少的褐色或浅灰色斑点
- 所有的眼后刚毛几乎等长
- 后胸背板有不规划的纵向网纹，通常具细小的中间皱纹，无钟状感觉器
- 前翅第一翅脉端半部通常有 4 根（偶尔 2-6 根）末梢刚毛
- 腹部第 2 背片上有 3 根侧刚毛
- 腹部第 9 背片后部仅具一对钟状感觉器
- 腹部侧背片从刻纹线处具大量纤毛微刺
- 雄虫：腹部第 3-5 腹片上有狭窄的腹腺域
- 分布：全世界范围分布的杂食性害虫

两个不太常见的品种，一个古北区种（T.alni Uzel）和一个欧洲种（T.urticae Fabricius）也容易和棕榈蓟马混淆。梨蓟马的雌虫与棕榈蓟马在形态上极其相似。

Thrips alni

- 触角第 5 节呈均匀褐色
- 腹部第 2-4 背片 S2 刚毛呈淡白色
- 腹部第 5 背片 S2 刚毛比 S3 刚毛细小（棕榈蓟马的这些刚毛几乎相同）
- 腹部第 8 背片 S1 刚毛与 S2 刚毛几乎相同（棕榈蓟马的 S1 远比 S2 细小）
- 雄虫：腹部第 3-4 节腹片有狭窄的卵形腹腺域
- 分布：仅食赤杨叶片，分布在欧洲、西伯利亚和蒙古

Thrips urticae

- 位于前胸背板前缘的一对刚毛几乎是背板上其它刚毛长度的 2 倍（通常超过 30 μm，棕榈蓟马不同，总是小于 25μm）
- 后胸背板有纵向中间网线
- 腹部背片通常在灰色的中间区域
- 腹部第 9 背片仅后部具一对钟状感觉器
- 分布：仅食异株荨麻，分布在欧洲

表 4：用于快速识别的形态特征简要清单：**(a) 蓟马属 (b) 棕榈蓟马**

(不同特征的位置见图 4)

(a)可以通过下列综合特征认定样品为蓟马属		
触角	包括 7 或 8 个明显的节：第 3 节和第 4 节上有叉状感应锥	图 5.1，5.2
头	2 对单眼刚毛（第 2 对和第 3 对）；第 1 对缺失，第 2 对比第 3 对短	图 5.3
前胸背板	有 2 对主要的后角刚毛	图 5.4
前翅	第 1 翅脉-刚毛间有缺口或没有缺口	图 5.5
腹部第 5 至 8 背片	有一对栉齿状突起	图 5.6
腹部第 8 背片	气门后向中有栉齿状突起	图 5.6
（b）具有下列特征的样品可认定为棕榈蓟马		
虫体颜色	身体亮黄色，头、胸或腹部无暗色区域，第 1 节和第 2 节触角为淡白色	图 1–3
第 5 节触角	基部的 1/3 至 1/2 处通常为微黄色	图 5.1
第 6 节触角	长度=42–48μm	图 5.1
头：第 3 对单眼刚毛	基部位于单眼三角区之外或触及前单眼和每一个后单眼连成的三角形切线。	图 5.3
背板	两对主要侧刚毛	图 5.4
前翅：第 1 翅脉	有 3 根（偶尔 2 根）末梢刚毛	图 5.5
后胸背板	中央一对刚毛在前缘后，有一对钟状感觉器，有线形刻纹，通常在后部聚合	图 5.7

腹部侧背片	脊上无纤毛；侧刚毛缺失	图 5.8
腹部第 2 节背片	4 根侧刚毛	图 5.9
腹部第 3 和 4 节背片	S2 几乎与 S3 相等	图 5.10
腹部第 8 背片	雌虫后缘具完整的微毛梳；雄虫的后缘微毛梳主要在中部	图 5.6
腹部第 9 背片	有前后 2 对钟状感觉器（气孔）	图 5.11
雄虫腹片	第 3-7 腹片上有横腹腺域	图 5.12

图 4：蓟马属一般特征的部位(雌虫-背面)

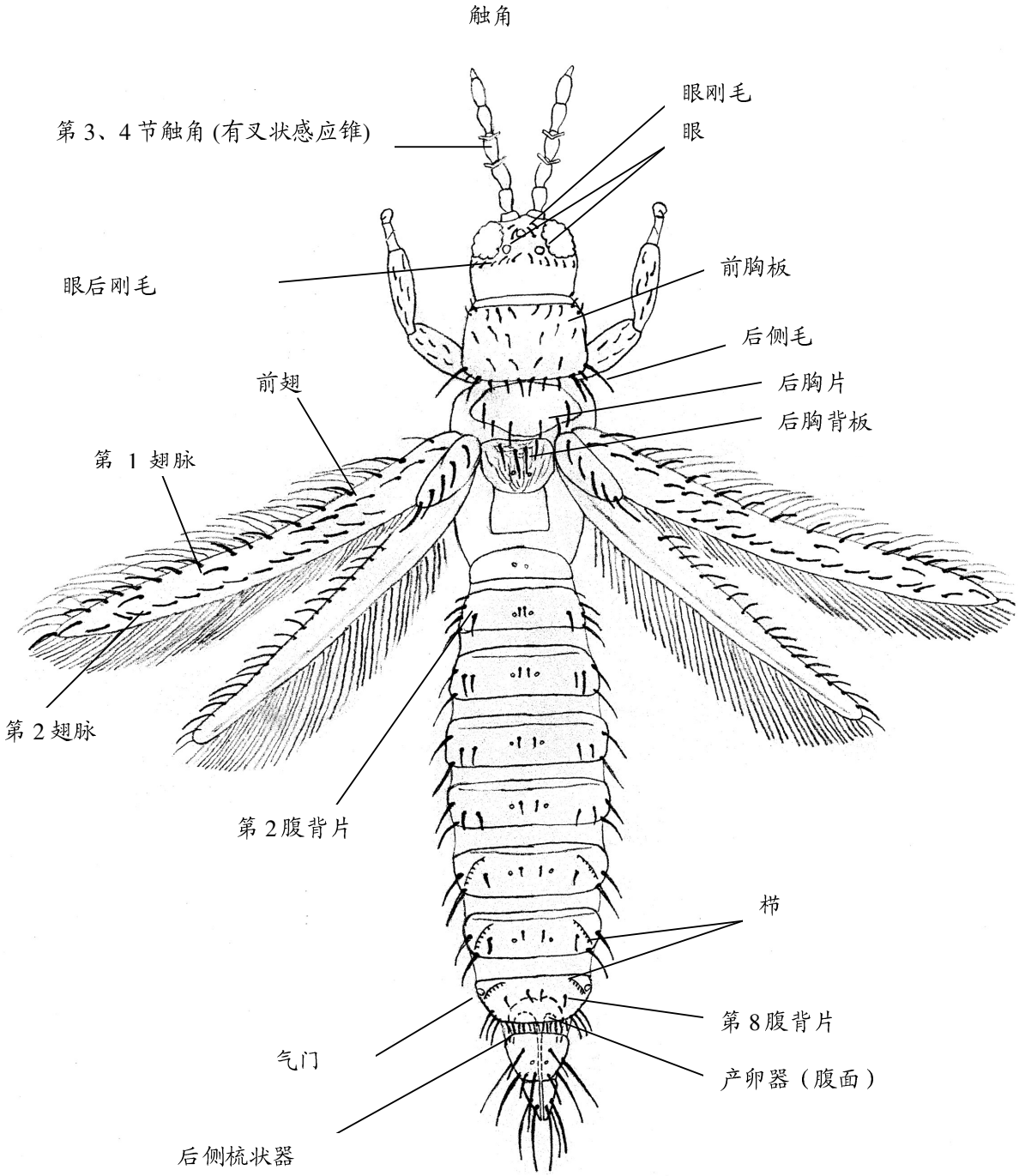
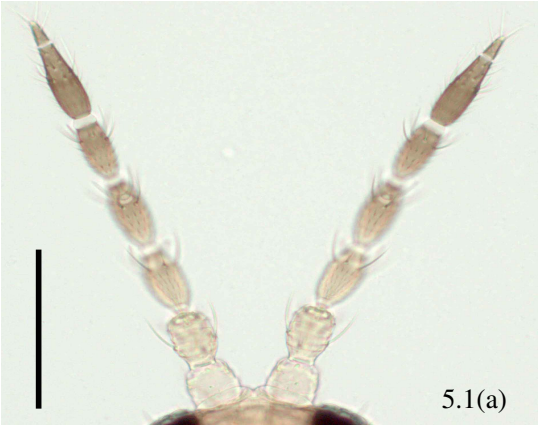


图 5(图 5.1 到 5.12):棕榈蓟马的特征(照片: G. Vierbergen，PPS，荷兰; 挪威植物保护所 S. Kobro 绘图)



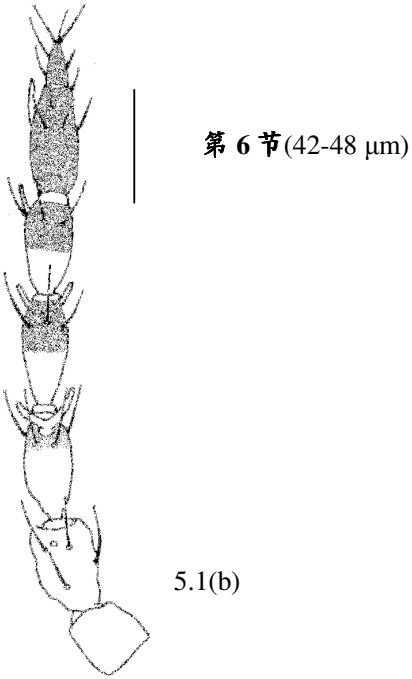
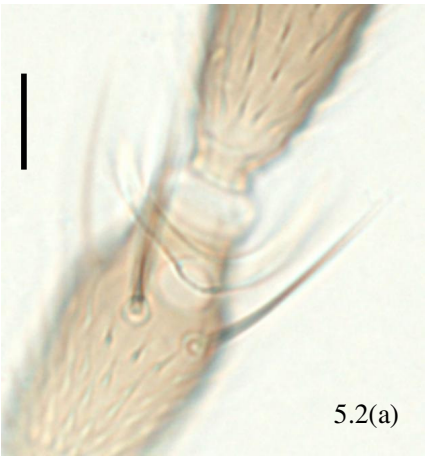
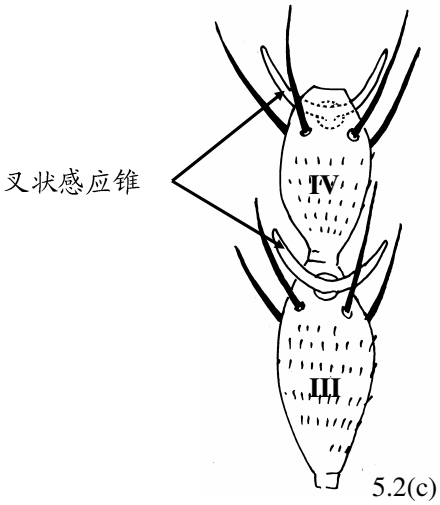


图 5.1(a)，(b): 触角: 7 节（比例尺 100 μm）





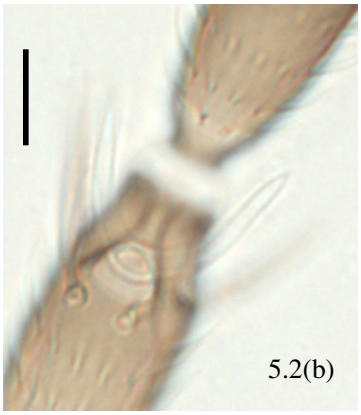


图 5.2(a)，(c): 触角，叉状感应锥；(a) 第 3 节，背片；(b) 第 4 节，腹片；(c) 第 3、4 节，背片(比例尺：10 μm)

图 5 续

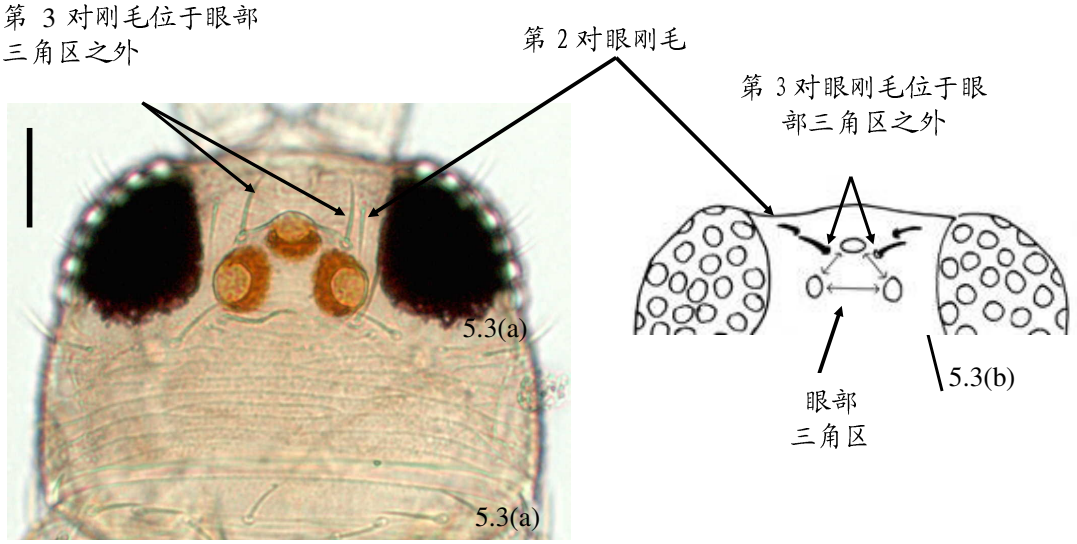


图 5.3(a)，(b): 头: 有两对眼刚毛（第 1 对退化）。
第 3 对眼刚毛位于眼部三角区之外(比例尺: 30μm)

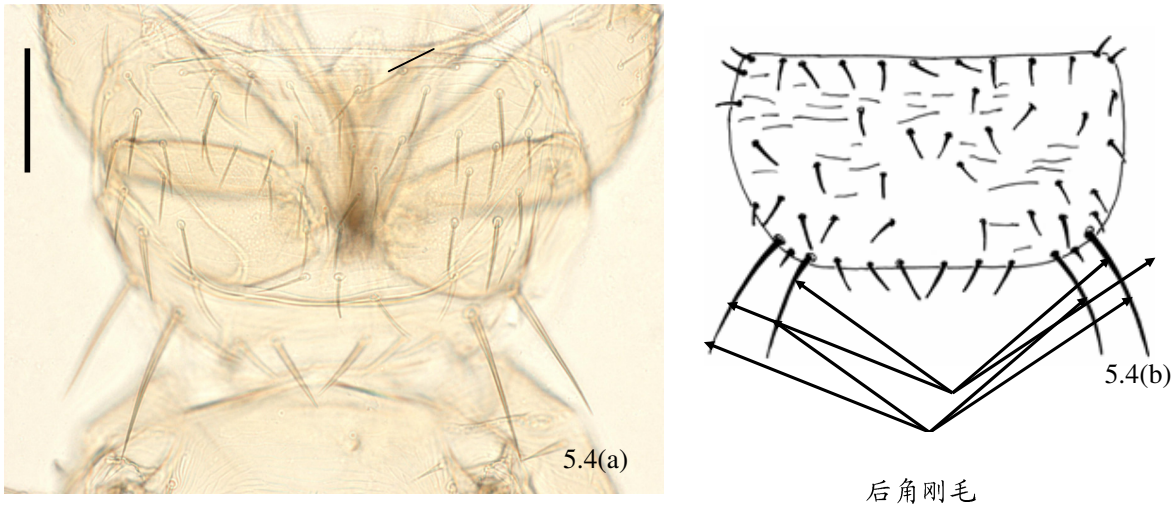


图 5.4(a)，(b): 背板，两对主要的后角刚毛（比例尺 = 50 μm）

图 5 续

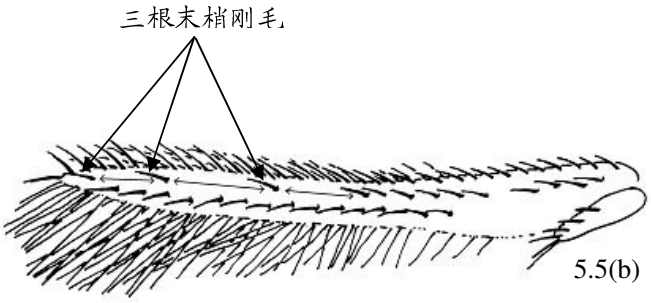
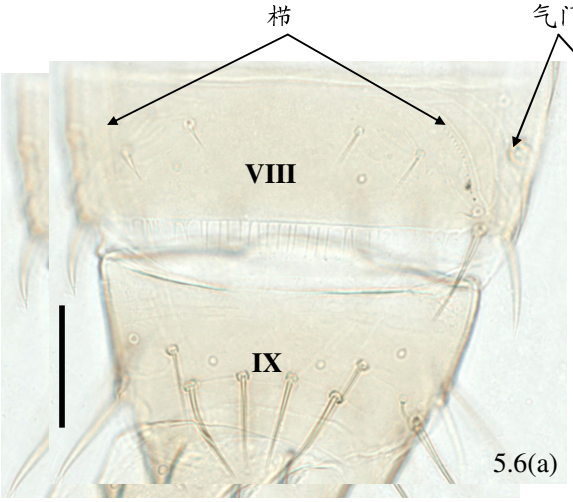
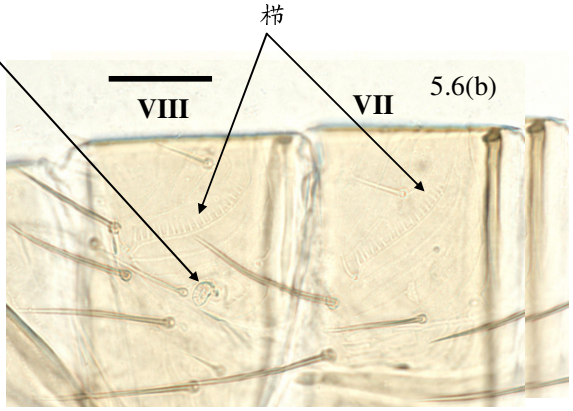


图 5.5(a)，(b): 前翅，第 1 对翅脉 – 在末梢一半处三根有间距的刚毛（比例尺：100 µm）





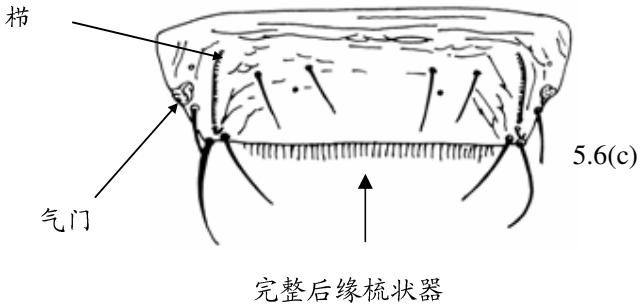
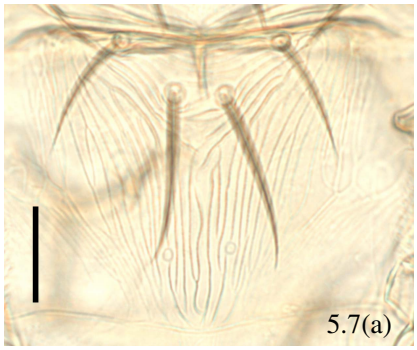


图 5.6(a)–(c): 第 8 腹背片：栉位于气门后向中；完整的后缘梳状器；(a) 雄虫第 8 和第 9 节背片，背面，中部完整梳状器；(b) 雌虫第 7 和第 8 节背片，侧面；(c) 雌虫第 8 背片，背面，完整梳状器（比例尺：30 µm）

图 5 续



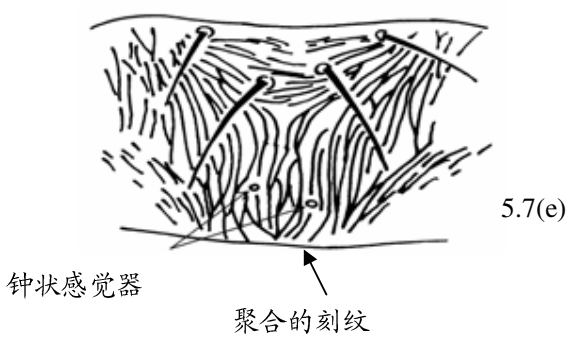
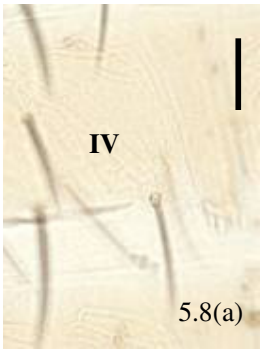
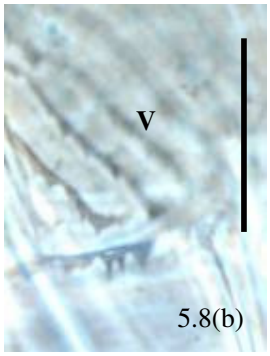


图 5.7(a)–(e): 后胸背板，刻纹的变化；钟状感觉器（比例尺：20μm）

图 5.8(a)–(c): 腹部第 4 和第 5 侧背片： 微刺和侧刚毛缺失；**(a)** 明视场；**(b)** 相衬; **(c)** 完整背片（比例尺： 20 μm)





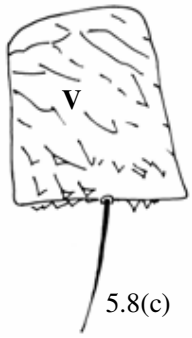
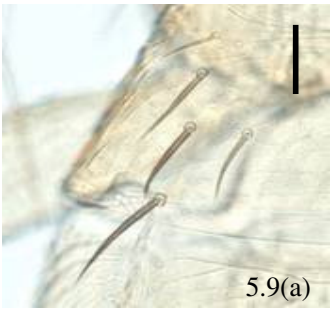
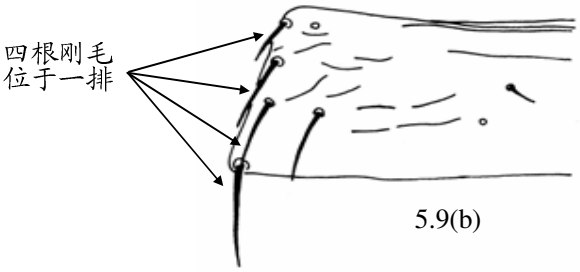
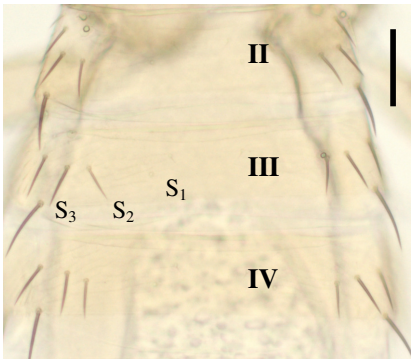


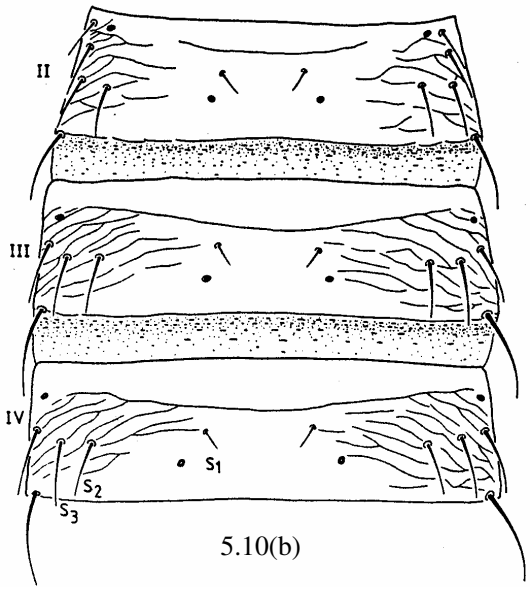
图 5.9(a)，(b): 第 2 腹背片，四根侧刚毛（比例尺：20 μm)





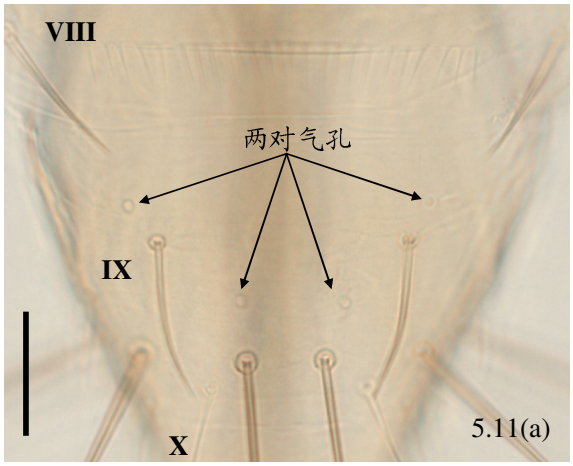


5.10(a)



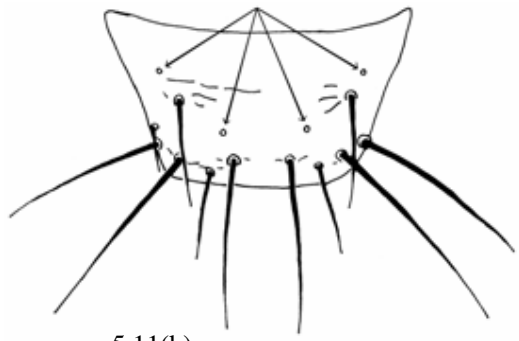
5.10(b)

图 5.10(a)，(b): 雌虫,第 2-4 背片，S2 刚毛和 S3 刚毛大小几乎一样 (5.10b 由 zur Strassen 提供，1989) (比例尺: 50 µm)



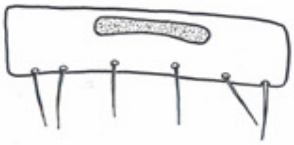
5.11(a)

两对气孔(钟状感觉器)

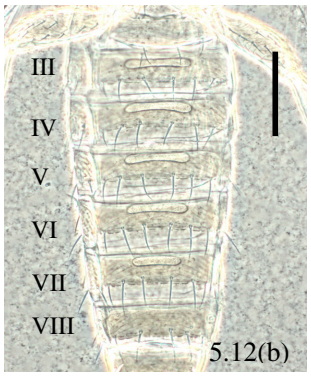


5.11(b)

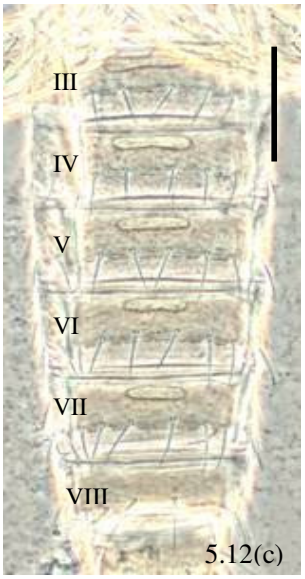
图 5.11(a)，(b): 第 9 腹背片（背面**）**，两对钟状感觉器(比例尺: 30 µm)



5.12(a)



5.12(b)



5.12(c)

图 5.12(a)–(c):雄性腹腺域(变化示意)；(a) 第 5 背片；**(b)–(c):**第 3－8 背片，相衬(比例尺：100µm)

4.2 鉴定棕榈蓟马的分子检测方法

下文将介绍已公布的四种有助于对棕榈蓟马进行形态鉴定的分子检测方法。还指出了每种检测方法的特异性。方法的特异性阐述了每种方法所检测的蓟马种和该检测方法设计所针对的最初应用对象。还开发了一套了包括多种蓟马种的分子学数据的光盘鉴定系统（Mortiz等，2004年）。考虑到分子方法的具体局限，分子检测得出的阴性结果并不排除形态方法鉴定阳性的可能性。

在本诊断规程中，检测方法 (包括提及的商标)按已发表的，已规定最初的敏感水平、特征和/ 或已实现的再现性的进行介绍。在本诊断规程中使用的化学品或设备的名称并不暗示赞成它们而排除其它可能适合的化学品或设备。本规程提及的实验室程序在充分等效的前提下，可按个别实验室的标准进行调整。

对照要求

在所有的分子检测方法中，使用合理的对照至关重要；必须用一个确证了的棕榈蓟马的阳性提取液作为一个附加样本，确保验证扩增反应取得成功。无论是采用实时PCR还是采用PCR-RFLP方法进行PCR扩增，必须还对一个不含DNA的样本进行。这种阴性对照可以避免试剂污染和假阳性反应。

DNA 提取

可以从单个卵、成虫、蛹或若虫中提取DNA。下文介绍的每个方法提及了最初使用特定DNA提取技术的来源文献。各实验室可发现替代的提取技术同样有效，DNA可能通过任何适用于昆虫的DNA提取方法被提取出来。例如：

- 蓟马可以在一个加有裂解缓冲液（lysis buffer）的试管中用一个小细棒研磨。然后根据相应的产品指南，通过蛋白酶-K 基 DNA 提取箱提取组织匀浆。
- 此外，可以将一个蓟马放入 50 µl 的无核酸水中研磨，然后加入 50µl 的 1：1（体积对体积）Chelex100 树脂（bio-rod）悬浮液和无核酸水，95℃加热 5 分钟，然后 11，000g 离心 5 分钟。上清液转移至一支新的离心管中，在-20℃的条件下储存备用。

最近的几篇文献介绍了从蓟马体中提取DNA的非破坏性技术，该技术具有在提取DNA后仍可保留洁净样品供玻片封固的优点（例如，Rugman-Jones 等.，2006年; Mound 和 Morris，2007年）

4.2.1 基于 SCAR 标记产生的序列的棕榈蓟马 PCR 检测方法

本检测方法是Walsh等（2005年）设计的针对棕榈蓟马种的特异性检测方法，供英格兰和威尔士的植物检疫机构使用。该方法通过包括蓟马属的10个种(T. flavus，T. major Uzel，T. minutissimus L.，T. nigropilosus，T. sambuci Heeger，T. tabaci，T. trehernei (T. physapus)，T. urticae，T. validus Uzel，T. vulgatissimus Haliday)在内的缨翅目的21个其它种进行了筛选评估。这些种主要但不全部是欧洲种。

方法

本检测方法使用的棕榈蓟马特导性 PCR 引物和 TaqMan 探针是：

PCR 引特: P4E8-362F (5’-CCGACAAAATCGGTCTCATGA-3’)

PCR 引物: P4E8-439R (5’-GAAAAGTCTCAGGTACAACCCAGTTC-3’)

TaqMan 探针：P4E8-385T (FAM 5’-AGACGGATTGACTTAGACGGGAACGGTT-3’ TAMRA)

实时PCR反应是使用TaqMan PCR核心试剂盒（Applied Biosystems）,以及 1µl（10-20 ng）的DNA提取液，每种引物7.5 pmol和2.5 pmol的探针，总体积调至25µl后进行的。在ABI Prism 7700或者ABI 7900HT序L列检测系统中（Applied Biosystems），将试管置于常规条件下（95℃10分钟，然后60℃ 1分钟，95℃ 15秒，进行40个循环），应用实时数据检测程序。Ct值低于40表明样本中存在棕榈蓟马DNA。

4.2.2 基于 COI 序列的棕榈蓟马的实时 PCR 检测

本检测方法是Kox等（2005年）设计的针对棕榈蓟马种的特异性检测方法，供荷兰植物检疫机构使用。本检测方法通过包括蓟马属的11个种在内的23种其它种类的蓟马进行了筛选评估。这些种主要但不全部是欧洲种。

方法:

本检测方法使用的棕榈蓟马特异性 PCR 引物和 TaqMan 探针是：

PCR 引物: Tpalmi 139F* (5’-TCA TGC TGG AAT TTC AGT AGA TTT AAC-3’)

PCR 引特: Tpalmi 286R* (5’-TCA CAC RAA TAA TCT TAG TTT TTC TCT TG-3’)

TaqMan 探针: TpP (6-FAM 5’-TAG CTG GGG TAT CCT CAA-3’ MGB)

* 自首次公布后，为提高灵敏度已对引物进行了调整。

（已将来自于印度的一些基于形态学(Asokan 等，2007年)被认为是棕榈蓟马的种，在本方法中与TaqMan 探针不匹配的COI序列存入GenBank 序列数据库。这些序列使用本方法不能产生阳性结果。这一序列差异在分类学上的意义目前尚不清楚。)

25 µl 反应混合液包括有：12.5 µl的 2x Taqman Universal Master Mix (Applied Biosystems)，0.9 µM 的各种引物，0.1 µM Taqman 探针，1.0 µl DNA。 实时PCR反应使用ABI Prism7700或7900HT Sequence Detection Systems（Applied Biosystems）在以下条件下进行：94℃10分钟，然后60℃1分钟和94℃15秒进行40个循环。Ct值少于40表明存在棕榈蓟马DNA。

4.2.3 基于 ITS2 序列的对包括棕榈蓟马在内的 9 种蓟马的 PCR-RFLP 检测方法

本检测方法是为了区分在日本果树上发现的包括棕榈蓟马在内的9种蓟马而设计:这9种蓟马是Frankliniella occidentalis (Pergande)，F. intonsa (Trybom)，T. hawaiiensis Morgan，T. coloratus Schmutz，T. flavus，T. tabaci，T. palmi，T. setosus Moulton，Scirtothrips dorsalis Hood.

方法

本检测方法使用的 PCR 引物(定位于 5.8s 和 28s 区段核糖体 DNA 侧面 ITS2 区域)如下:

5’-TGTGAACTGCAGGACACATGA-3’

5’-GGTAATCTCACCTGAACTGAGGTC-3’.

棕榈蓟马可以产生一个588 bp的PCR产物（更长或更短的片段由其它种类的蓟马产生）。20 µl的反应液由以下成份组成：1 µM各种引物，250µM dNTPs，1单位的AmpliTaq Gold DNA聚合酶(Applied Biosystems)，2 µl 10 x 反应缓冲液 [含有 25 mM $MgCl_2$]，0.5 µl DNA.。 使用9600 DNA thermocycler(Applied Biosytems)，应用以下参数进行PCR反应： 95°C 9 分钟，94°C 1分钟，50°C 30秒，72°C 1分钟进行35个循环，72°C 最后延伸 7分钟后，迅速冷却至室温。通过琼脂糖凝胶电泳分析PCR产物。

按照厂商的实验指南，采用内切酶Rsa I来酶切5µl PCR产物（无需提纯）。通过琼脂糖凝胶电泳分离酶切后的PCR产物。

当 ITS2 片段被 Rsa I 酶切后，由棕榈蓟马产生的酶切片段大小为：371，98，61 和 58bp。

4.2.4 基于 COI 序列的对包括棕榈蓟马在内的 10 种蓟马的分子检测方法

本检测方法是Brunner等设计（2002年）的，用于区分包括棕榈蓟马在内的10种蓟马。这些种主要但不全是欧洲种：Anaphothrips obscurus (Müller)，Echinothrips

americanus Morgan，Frankliniella occidentalis，Heliothrips haemorrhoidalis (Bouché)，Hercinothrips femoralis (Reuter)，Parthenothrips dracaenae (Heeger)，Taeniothrips picipes (Zetterstedt)，Thrips angusticeps Uzel，T. palmi，T. tabaci.

方法:

本检测方法中使用的 PCR 引物（定位于线粒体 COI 基因序列）如下：

mtD-7.2F (5'-ATTAGGAGCHCCHGAYATAGCATT-3')

mtD9.2R (5'-CAGGCAAGATTAAAATATAAACTTCTG-3')

通过本检测方法这些引物在分离的所有种中可扩增出一个433 bp的DNA片段。50µl反应液由以下成份组成：0.76µl各种引物，200 µM dNTPs，1 单位的 Taq DNA 聚合酶，5 µl 10 x 反应液冲液 （加有15 mM MgCl2），1 µl DNA。 在标准的thermocycler (如PTC200，MJ-Research)中按以下条件进行PCR反应: 94°C 1分钟，在94°C 15秒，55°C 30秒和 72°C 45秒的条件下进行40个循环，72°C最后延伸10分钟后，迅速冷却至室温。为衡量扩增后片段的大小，取5µl PCR产物通过1.0-2.0%琼脂糖凝胶电泳来分析。

根据厂商提供的实验指南，用DNA内切酶AluI和Sau3AI分别酶切5µl PCR产物(无需提纯)，通过琼脂糖凝胶电泳来分离酶切后的PCR产物。

用 AluI 和 Sau3AI 酶切 COI 片段，棕榈蓟马（DNA）经 PCR 产生的片段大小如下:

AluI: 291 and 194 bp

Sau3AI: 350 and 135 bp.

5. 记 录

记录和证据应按 ISPM 第 27 号：2006 年 2.5 节中所述进行保存。

当诊断结果可能对其它缔约方产生负面影响时，记录和证据（特别是保存的或玻片封固的样品，特异的分类学构造照片，DNA提取液和凝胶体照片，在适当情况下）应至少保存一年。

6. 进一步提供信息的联络点

Entomology Section, National Reference Laboratory, Plant Protection Service, P.O. Box 9102, 6700 HC Wageningen, Netherlands. Telephone: +31 317 496824; e-mail: g.vierbergen@minlnv.nl; fax: +31 317 423977.

Pest and Disease Identification Team, The Food and Environment Research Agency, Sand Hutton, York YO41 1LZ, United Kingdom. Telephone: +44 1904 462215; e-mail: dom.collins@fera.gsi.gov.uk; fax: +44 1904 462111.

Area Entomología, Departamento Laboratorios Biológicos, Dirección General de Servicios Agrícolas, MGAP, Av. Millán 4703, C. P. 12900, Montevideo, Uruguay. Telephone: +598 2304 3992; e-mail: ifrioni@mgap.gub.uy; fax: +598 2304 3992.

7. 鸣 谢

本规程初稿由位于Sand Hutton，York，YO41 1LZ，United Kingdom的英国食品环境研究署病虫害鉴定计划的D.W. Collins、荷兰瓦赫宁根植物保护服务局昆虫科的 G. Vierbergen和L.F.F. Kox博士，以及阿根廷 INTA-EEA Concordia 昆虫科的Ing. Agr. N.C. Vaccaro撰写。图5的线图由挪威植物保护所的 S. Kobro绘制。

8. 参考文献

Asokan, R., Krishna Kumar, N.K., Kumar, V. & Ranganath, H.R. 2007. Molecular differences in the mitochondrial cytochrome oxidase I (mtCOI) gene and development of a species-specific marker for onion thrips, *Thrips tabaci* Lindeman, and melon thrips, *T. palmi* Karny (Thysanoptera: Thripidae), vectors of tospoviruses (Bunyaviridae). *Bulletin of Entomological Research*, 97: 461–470.

Bhatti, J.S. 1980. Species of the genus *Thrips* from India (Thysanoptera). *Systematic Entomology*, 5: 109–166.

Bournier, J.P. 1983. Un insecte polyphage: *Thrips palmi* (Karny), important ravageur du cotonnier aux Philippines. *Cotonnier et Fibres Tropicales,* 38: 286–288.

Brunner, P.C., Fleming, C. & Frey, J.E. 2002. A molecular identification key for economically important thrips species (Thysanoptera: Thripidae) using direct sequencing and a PCR-RFLP-based approach. *Agricultural and Forest Entomology,* 4: 127–136.

EPPO. 2008. URL: http://www.eppo.org/. Accessed 17 June 2008.

EPPO/CABI. 1997. *Thrips palmi*. *In* I.M. Smith, D.G. McNamara, P.R. Scott & M. Holderness, eds. *Quarantine Pests for Europe*, 2nd edition. Wallingford, UK, CAB International. 1425 pp.

Kox, L.F.F., van den Beld, H.E., Zijlstra, C. & Vierbergen, G. 2005. Real-time PCR assay for the identification of *Thrips palmi*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin,* 35: 141–148.

Mantel, W.P. & Vierbergen, G. 1996. Additional species to the Dutch list of Thysanoptera and new intercepted Thysanoptera on imported plant material. *Folia Entomologica Hungarica,* 57 (Suppl.): 91–96.

Moritz, G., Mound, L.A., Morris, D.C. & Goldarazena, A. 2004. Pest thrips of the world: visual and molecular identification of pest thrips (CD-ROM), Centre for Biological Information Technology (CBIT), University of Brisbane. ISBN 1-86499-781-8.

Mound, L. A. & Azidah, A. A. (2009) Species of the genus *Thrips* (Thysanoptera) from Peninsular Malaysia, with a checklist of recorded Thripidae. *Zootaxa*, 2023: 55-68.

Mound, L.A. & Kibby, G. 1998. *Thysanoptera. An Identification Guide*. 2nd edition. Wallingford, UK, CAB International. 70 pp.

Mound, L.A. & Marullo, R. 1996. The thrips of Central and South America: an introduction (Insecta: Thysanoptera). *Memoirs on Entomology, International,* 6: 1–488.

Mound, L.A. & Masumoto, M. 2005. The genus *Thrips* (Thysanoptera, Thripidae) in Australia, New Caledonia and New Zealand. *Zootaxa,* 1020: 1–64.

Mound, L.A. & Morris, D.C. 2007. A new thrips pest of *Myoporum* cultivars in California, in a new genus of leaf-galling Australian Phlaeothripidae (Thysanoptera). *Zootaxa*, 1495: 35-45.

Murai, T. 2002. The pest and vector from the East: *Thrips palmi*. *In* R. Marullo, & L.A. Mound, eds. *Thrips and Tospoviruses: Proceedings of the 7th International Symposium on Thysanoptera*. Italy, 2–7 July 2001, pp. 19–32. Canberra, Australian National Insect Collection.

Nakahara, S. 1994. The genus *Thrips* Linnaeus (Thysanoptera: Thripidae) of the New World. USDA Technical Bulletin No. 1822. 183 pp.

PaDIL. 2007. Pests and Diseases Image Library. URL: http://www.padil.gov.au. Accessed 18 Oct 2007.

Palmer, J.M. 1992. *Thrips* (Thysanoptera) from Pakistan to the Pacific: a review. *Bulletin of the British Museum (Natural History). Entomology Series,* 61: 1–76.

Rugman-Jones, P.F., Hoddle, M.S., Mound, L.A. & Stouthamer, R. 2006. Molecular identification key for pest species of *Scirtothrips* (Thysanoptera: Thripidae). *Journal of Economic Entomology*, 99 (5): 1813–1819.

Sakimura, K., Nakahara, L.M. & Denmark, H.A. 1986. A thrips, *Thrips palmi* Karny (Thysanoptera: Thripidae). Entomology Circular No. 280. Division of Plant Industry, Florida; Dept. of Agriculture and Consumer Services. 4 pp.

Toda, S. & Komazaki, S. 2002. Identification of thrips species (Thysanoptera: Thripidae) on Japanese fruit trees by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of the ribosomal ITS2 region. *Bulletin of Entomological Research,* 92: 359–363.

Walsh, K., Boonham, N., Barker, I. & Collins, D.W. 2005. Development of a sequence-specific real-time PCR to the melon thrips *Thrips palmi* (Thysan., Thripidae). *Journal of Applied Entomology,* 129 (5): 272–279.

zur Strassen, R. 1989. Was ist *Thrips palmi*? Ein neuer Quarantäne-Schädling in Europa. *Gesunde Pflanzen,* 41: 63–67.

zur Strassen, R. 2003. Die terebranten Thysanopteren Europas und des Mittelmeer-Gebietes. *In Die Tierwelt Deutschlands. Begründet 1925 von Friedrich Dahl,* 74: 5–277. Keltern, Goecke & Evers.