

## Diagnostyka<sup>1</sup> Diagnostic

### *Thrips palmi*

#### Zakres

Niniejszy standard opisuje protokół diagnostyczny dotyczący *Thrips palmi*. Uzupełnia on oraz zastępuje standard EPPO PM 7/3 (1).

#### Zatwierdzenie i nowelizacja

Zatwierdzony po raz pierwszy we wrześniu 2000 r. Zmiana zatwierdzona we wrześniu 2005 r., włączony materiał został opracowany w ramach projektu UE DIAGPRO (SMT 4-CT98-2252) poprzez współdziałanie zaangażowanych w projekt laboratoriów oraz współpracę laboratoriów z państw europejskich.

#### Wprowadzenie

*Thrips palmi* jest szkodnikiem polifagicznym, w szczególności atakuje rośliny z rodzin: *Cucurbitaceae* i *Solanaceae*. Gatunek pochodzi z południowej Azji i został rozprzestrzeniony z tego obszaru na inne rejony świata w XX w. Obecnie występuje w Azji oraz jest szeroko rozprzestrzeniony w Ameryce Środkowej i na Karaibach. Poza tym występuje lokalnie w Ameryce Północnej i Południowej, Afryce oraz Oceanii. Nie występuje w Europie, ale istniało kilka ognisk szkodnika w Holandii oraz jedno ognisko w Wielkiej Brytanii, które to zostały następnie zlikwidowane. Więcej informacji ogólnych dotyczących *T. palmi* podaje EPPO/CABI (1997).

#### Tożsamość

**Nazwa:** *Thrips palmi* Karny, 1925

**Synonimy:** *Thrips clarus* Moulton, 1928; *Thrips leucadophilus* Priesner, 1936; *Thrips gossypicola* Ramakrishna & Margabandhu, 1939; *Chlothrips aureus* Ananthakrishnan & Jagadish, 1967; *Thrips gracilis* Ananthakrishnan & Jagadish, 1968.

**Stanowisko taksonomiczne:** *Insecta: Thysanoptera: Terebrantia: Thripidae: Thripini.*

**Komputerowy kod EPPO:** THRIPL

---

<sup>1</sup> Ryciny w niniejszym standardzie oznaczone „Web Fig.” zostały opublikowane na stronie internetowej EPPO [www.eppo.org](http://www.eppo.org).

**Kategoria fitosanitarna:** lista A1 EPPO: nr 175, Załączniki do Dyrektywy Rady 2000/29/WE z dnia 8 maja 2000 r. w sprawie środków ochronnych przed wprowadzaniem do Wspólnoty organizmów szkodliwych dla roślin lub produktów roślinnych i przed ich rozprzestrzenianiem się we Wspólnocie: I/A1

## Wykrywanie

*T. palmi* jest szkodnikiem gruntowych upraw: oberżyny, *Benincasa hispida*, *Capsicum annuum*, bawelny, wspanięci chińskiej, ogórka, *Cucurbita* spp., melona, grochu, fasoli, ziemniaków, sezamu, soi, słonecznika, tytoniu oraz arbuza. W uprawach pod osłonami, gospodarczo ważnymi roślinami żywicielskimi szkodnika są: oberżyna, *Capsicum annuum*, ogórek, *Cyclamen*, *Dendranthema*, *Ficus* oraz *Orchidaceae*. *T. palmi* może być przenoszony z sadzonkami i owocami roślin żywicielskich oraz wraz z materiałem opakowaniowym.

Podczas prowadzenia inspekcji materiału roślinnego w celu wykrycia obecności *T. palmi*, należy zwrócić uwagę na obecność srebrzących się plamek na powierzchni liści roślin żywicielskich szkodnika, szczególnie wzdłuż nerwacji liści. silnie porażone rośliny charakteryzują się srebrzącymi się lub brązowiejącymi liśćmi, karłowaceniem liści, zahamowaniem wzrostu wierzchołków pędów oraz zdeformowanymi i owocami pokrytymi bliznami.

*T. palmi* posiada 6 stadiów rozwojowych, które zazwyczaj są znajduwane na różnych organach rośliny lub w podłożu:

- jaja, w tkankach liści, kwiatów i owoców;
- larwa I, na liściach, kwiatach i owocach;
- larwa II, na liściach, kwiatach i owocach;
- poczwarka I, w podłożu;
- poczwarka II, w podłożu;
- postać dorosła, na liściach, kwiatach i owocach.

Pojedyncze okazy najlepiej zbierać i umieszczać w płynie AGA, który jest mieszaniną 10 części alkoholu etylowego (60%) z 1 częścią gliceryny oraz 1 częścią kwasu octowego. W celu zebrania wciornastków z organów roślinnych, takich jak kwiaty cięte, może zostać użytych kilka metod (Mantel i Vierbergen, 1996; zmodyfikowane):

- przeniesienie z rośliny do próbek za pomocą wilgotnego pędzelka;
- otrząsanie poprzez uderzanie roślin nad białym papierem, w celu znalezienia okazów ciemno zabarwionych oraz nad papierem czarnym, w celu znalezienia okazów zabarwionych jasno;
- czerpakowanie roślinności z użyciem jasno zabarwionego czerpaka entomologicznego,
- zebranie części roślin do zamkniętej plastikowej torby zawierającej kawałek bibuły filtracyjnej (w celu absorpcji wilgoci); po upływie 24 godziny większość wciornastków opuszcza części roślin i przemieszcza się po wewnętrznej stronie ścianek zamkniętej torby;
- umieszczenie fragmentów roślin (np. kwiatów) w aparacie Berlese'a (lejek zaopatrzony w sito, prowadzący do naczynia zawierającego 10% alkoholu); lejek jest umieszczany pod lampą z żarówką (60W), a temperatura oraz światło sprawiają, że wszystkie wciornastki uciekają z fragmentów rośliny i wpadają do naczynia z alkoholem; po 8 godzinach (w przypadku kwiatów ciętych) zawartość naczynia jest przeglądana pod mikroskopem stereoskopowym;

- wykorzystanie barwnych tablic lepowych (zazwyczaj niebieskich lub białych dla *T. palmi*) w osłonie z przezroczystego tworzywa sztucznego; okazy wciornastków zdejmuje się poprzez wycięcie fragmentu tablicy lepowej i rozpuszczeniu kleju dichlorometanem.

Pierwsze dwie metody są odpowiednie do zbierania: larw, przedpoczwerek, poczwerek oraz postaci dorosłych. Pozostałe trzy mogą być zastosowane do zbierania larw i postaci dorosłych. Ostatnia jest przeznaczona tylko do odłowu uskrzydłych postaci dorosłych.

Okazy powinny być przechowywane w 60% etanolu w ciemności, najlepiej w temperaturze poniżej 0°C, w celu zapobiegnięcia utracie barwy.

## **Identyfikacja**

### **Identyfikacja postaci dorosłych w oparciu o budowę morfologiczną**

Identyfikację wciornastków prowadzi się w oparciu o postaci dorosłe, ponieważ do chwili obecnej brak jest odpowiednich kluczy do identyfikacji gatunków w oparciu o cechy charakterystyczne jaj, larw lub poczwerek. Jednakże obecność larw w próbce może dać ważne informacje dodatkowe dotyczące rozwoju szkodnika na roślinie żywicielskiej. W celu analizy mikroskopowej, postaci dorosłe wciornastków powinny zostać zamknięte w preparacie mikroskopowym. Do rutynowych badań stosuje się preparaty sporządzone z użyciem płynów utrwalających rozpuszczalnych w wodzie, które są szybkie do wykonania i stosunkowo mało kosztowne. Następująca procedura jest zalecana przez Mound i Kibby (1998). Okazy przenosi się z płynu konserwującego do czystego 70% etanolu. Kiedy są odpowiednio elastyczne, za pomocą małych igieł rozkłada się skrzydła i wyprostowuje czułki. Wciornastki umieszcza się w kropli płynu Hoyer'a (50 ml wody, 30 g gumy arabskiej, 200 g wodzianu chloralu, 20 ml gliceryny) na szkiełku nakrywkowym (ok. 13 mm średnicy), stroną brzuszną do góry, a następnie na krople opuszcza się szkiełko podstawowe i całość odwraca skoro tylko płyn odpowiednio wypełni przestrzeń pomiędzy szkiełkami. Preparat natychmiast umieszcza się w suszarce w temperaturze 35–40°C i pozostawia przez 6 godzin, po czym można poddać go ocenie. W celu zakonserwowania materiału, preparat pozostawia się w suszarce na około 3 tygodnie, po czym krawędź szkiełka nakrywkowego pokrywa się lakierem do paznokci.

## **Rodzina *Thripidae***

*T. palmi* należy do rodziny *Thripidae*, która obejmuje około 1850 gatunków w 260 rodzajach. U większości gatunków czułki składają się z siedmiu lub ośmiu członów, skrzydła przednie (jeżeli występują) są zazwyczaj smukłe, z dwiema podłużnymi żyłkami, z których każda jest zaopatrzona w serię szczecin.

## **Rodzaj *Thrips***

Rodzaj *Thrips* obejmuje ponad 200 gatunków we wszystkich częściach świata. Przedstawiciele rodzaju mają tylko 2 pary szczecin przyoczkowych. Czułki siedmio- lub ośmioczłonowe, na segmencie III i IV znajdują się widełkowate stożki czuciowe. Przedplecze zaopatrzone w dwie pary dużych szczecin zewnętrznych. Stopy złożone z dwóch członów. Na tergitach odwłokowych V–VIII, z boku, obecna para ktenidiów; sternity oraz pleurotergity ze szczecinami dodatkowymi lub bez nich (patrz Dodatek 1).

## **Gatunek *Thrips palmi***

Identyfikacja postaci dorosłych może być przeprowadzona z wykorzystaniem kluczy: Bhatti (1980) i Palmer (1992) dla tropikalnych rejonów Azji; Mound i Kibby (1998) dla 14 ważnych ekonomicznie gatunków; Nakahara (1994) dla obu Ameryk. Szczegółowy opis *T. palmi* podaje Bournier (1983), Sakimura i in. (1986) oraz zur Strassen (1989). Sakimura i in. (1986) przedstawiają kilka ważnych cech morfologicznych pozwalających odróżnić *T. palmi* od innych znanych gatunków z rodzaju *Thrips*:

- ciało jasnożółte bez szarawych lub brązowych plam, ale z lekko pogrubionymi czarniawymi szczecinami ciała;
- szczeciny międzyprzyoczkowe ustawione tuż poza trójkątem przyoczkowym, lub dotykają linii stycznej pomiędzy przyoczkami przednim a przyoczkami tylnymi;
- zaplecze prążkowane w środkowej części i zazwyczaj w części tylnej linii rzeźby symetrycznie zbieżne;
- tergit odwłokowy II z czterema szczecinami brzeżnymi;
- sternity odwłokowe bez szczecin dodatkowych;
- tergit odwłokowy VIII z kompletnym grzebieniem;
- u samca każdy sternit III–VII z poprzecznym, gruczołowatym obszarem.

W dodatku 1 przedstawiono schematycznie te oraz inne cechy diagnostyczne.

## **Identyfikacja molekularna**

Metody biologii molekularnej mogą być wykorzystane w celu identyfikacji wszystkich żywych stadiów rozwojowych wciornastków. Mogą być używane do potwierdzenia wyników badań morfologicznych postaci dorosłych. W przypadku jaj, larw lub poczwerek stanowią jedyne narzędzie umożliwiające ich wiarygodną identyfikację. W tym przypadku, zaleca się wykonanie co najmniej dwóch oddzielnych analiz z wykorzystaniem różnych sekwencji docelowych.

## **Ekstrakcja DNA**

Ekstrakcję DNA z wciornastków (jaj, larw, poczwerek lub postaci dorosłych) prowadzi się w buforze do lizy komórek z wykorzystaniem mikrohomogenizatora ręcznego (plastikowej pałeczki do rozcierania materiału). DNA jest izolowane z użyciem standardowych metod ekstrakcji DNA, np.: z wykorzystaniem zestawu do izolacji DNA High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche), zgodnie z instrukcjami producenta zawartymi w protokole dotyczącym tkanek ssaków. DNA jest wmywane przy użyciu 50 µl 10mM Tris o pH 8,5. Alternatywnie, DNA jest ekstrahowane z pojedynczych okazów wciornastków z wykorzystaniem metody opartej na zastosowaniu żywicy Chelex 100. Pojedynczy okaz wciornastka przenoszony jest do probówki wirówkowej o pojemności 0,5 ml, dodaje się 50 µl wody do biologii molekularnej (wolnej od nukleaz), a następnie owad jest rozcierany za pomocą mikrohomogenizatora ręcznego (plastikowej pałeczki) lub miksera elektrycznego. Po dodaniu 50 µl żywicy Chelex 100 (Biorad) i wody wolnej od nukleaz, w proporcji 1:1, homogenat ogrzewa się przez 5 min. w temp. 95°C i wiruje przez 5 min. z prędkością 13000 obr/min. Następnie supernatant przenosi się do nowej probówki wirówkowej i przechowuje do momentu badania w temperaturze – 20°C.

## COI-PCR

Starterami w reakcji COI-PCR (Kox i in., 2005) są R4 (5'-CCC TCT TAA TTA TGG GTT TAT A-3') i F5 (CAC AAA TAA TCT TAG YTTT TTC TCT T) powielające fragmenty genu mitochondrialnej oksydazy I cytochromowej (COI) o wielkości 220-bp. Startery te są specyficzne dla *T. palmi*. 50 µl mieszaniny reakcyjnej składa się z: 0,76 µM każdego ze starterów, 200 µM dNTPs (Promega), 1 jednostki polimerazy Taq DNA (Roche), 5 µl buforu reakcyjnego 10x (z 15 mM MgCl<sub>2</sub>) oraz 1 µl DNA. Reakcja PCR odbywa się w termocyklerze wykonanym w technologii Peltier (np. PTC200, MJ Research) zgodnie z następującymi parametrami: 1 min. w 94°C, 40 15-sekundowych cykli w 94°C, 30-sek. w 55°C i 45-sek. w 72°C, po czym następuje końcowe wydłużanie przez 10 min. w 72°C i szybkie schładzanie do temperatury pokojowej. Po amplifikacji, 5 µl produktu PCR poddawane jest rozdzielaniu elektroforetycznemu w 1,5 % żelu agarozowym zgodnie z metodą standardową (Sambrook i in., 1989), wraz ze wzorcem wielkości DNA 100-bp umożliwiającym określenie wielkości produktów reakcji (np. marker 100-bp firmy Fermentas). Produkt reakcji PCR jest wizualizowany i fotografowany w świetle UV.

## COI-real-time PCR, z wykorzystaniem sondy Taqman

Starterami w reakcji COI-real-time PCR (Kox i in., 2005) są R4E (5'-CCC TCT TAA TTA TGG TAT ATA AAG AA-3') i F5E (5'-TGA TCA CAC AAA TAA TCT TAG TTT TTC TCT T-3'). Sondą Taqman MGB TpP jest (z 5' do 3') 6-FAM-TAG CTG GGG TAT CCT CAA-MGB. Startery i sonda Taqman MGB są specyficzne dla *Thrips palmi*. 25 µl mieszaniny reakcyjnej zawiera: 12,5 µl uniwersalnego mastermiks Taqman 2x (Applied Biosystems), 0,9 µM każdego ze starterów, 0,05 µM sondy Taqman TpP oraz 1 µl DNA. Reakcja real-time PCR odbywa się w odpowiednim aparacie wykrywającym światło emitowane przez reporter, na przykład ABI Prism 7700 lub 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems) w następujących warunkach: 10 min. w 94°C, następnie 40 15-sekundowych cykli w 94°C i 60-sek. w 60°C. Wartość cyklu progowego (Ct) poniżej 40 oznacza, że powielane jest DNA *T. palmi*.

## Real-time PCR oparty na SCAR, sonda Taqman

Sekwencjami startera wiodącego i odwrotnego oraz sondy Taqman są odpowiednio: P4E8-362F (5'-CCG ACA AAA TCG GTC TCA TGA-3'), P4E8-439R (5'-GAA AAG TCT CAG GTA CAA CCC AGT TC-3') i P4E8-385T (z 5' do 3') 6-FAM-AGA CGG ATT GAC TTA GAC GGG AAC GGT T-TANRA (Walsh i in.). Reakcja zachodzi na płytkach 96-dołkowych z wykorzystaniem TaqMan 1000 Reaction Gold Plus Buffer A Pack (Applied Biosystems). Do 1 µl (10 – 20 ng) ekstraktu DNA dodaje się 2,5 µl buforu A 10x; 5,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM każdego z dATP, dTTP, dCTP i dGTP; 0,025 jednostek polimerazy Amplitaq Gold; 0,3 µM każdego ze starterów i 0,1 µM sondy w całkowitej objętości 25 µl. Reakcja przeprowadzana jest w aparacie real-time PCR np.: ABI Prism 7900HT Sequence Detection System w następujących warunkach: 10 min. w 95°C, 40 1-minutowych cykli w 60°C i 15-sek. w 95°C wraz z równoczesnym zbieraniem danych. Wartość Ct równa 40 wskazuje na wynik negatywny, zaś wartość Ct poniżej 40 świadczy o tym, że DNA *T. palmi* zostało powielone. Typowa wartość Ct dla amplifikacji DNA z *T. palmi* powinna znajdować się pomiędzy 21 a 27.

## COI-PCR-RFLP

Starterami dla reakcji COI-PCR-RFLP (Brunner i in., 2002) są mtD-7.2F (5'-ATT AGG AGC HCC HGA YAT AGC ATT-3') i mtD-9.2R (5'-CAG GCA AGA TTA AAA TAT AAA CTT CTG-3'). Zostały one zmodyfikowane z C1-J-1751 i C1-N-2191 (Simon i in., 1994) powielających fragmenty genu mitochondrialnej oksydazy I cytochromowej o wielkości 433-bp. Drugi ze starterów został zmodyfikowany poprzez degradację nukleotydów, przez co lepiej pasuje do sekwencji wciornastków. Startery te nie są specyficzne jedynie dla wciornastków, powielają one również geny COI kilku innych gatunków owadów. 50 µl mieszaniny reakcyjnej zawiera: 0,76 µM każdego ze starterów, 200 µM dNTPs (Promega), 1 jednostkę polimerazy Taq DNA (Roche), 5 µl buforu reakcyjnego 10x (z 15 mM MgCl<sub>2</sub>) oraz 1 µl DNA. Reakcja PCR zachodzi w termocyklerze wykonanym w technologii Peltier (na płytce 96-dołkowe, np.: PTC200, MJ-Research) w następujących warunkach: 1 min. w 94°C, 40 15-sekundowych cykli w 94°C, 30-sek. w 55°C i 45 sek. w 72°C, po czym następuje końcowe wydłużanie przez 10 min. w 72°C i szybkie schładzanie do temperatury pokojowej. Po amplifikacji, 5 µl produktu reakcji PCR poddawane jest rozdzielni elektroforetycznemu w 1,5 % żelu agarozowym zgodnie z metodą standardową (Sambrook i in., 1989), wraz ze wzorcem wielkości DNA 100-bp umożliwiającym określenie wielkości produktów reakcji (np. marker 100-bp firmy Fermentas). Produkt reakcji PCR jest wizualizowany i fotografowany w świetle UV.

W analizie RFLP, 5 µl produktu PCR (bez dalszego oczyszczania) jest trawione enzymami restrykcyjnymi *AluI* i *Sau3AI* w osobnych reakcjach zgodnie z instrukcjami producenta. Strawione produkty PCR poddawane są rozdzielni elektroforetycznemu w 2% żelu agarozowym wraz z wzorcem DNA 100-bp. Produkt PCR jest wizualizowany i fotografowany w świetle UV.

Próbka jest identyfikowana jako *T.palmi* gdy wielkości prążków trawionego produktu PCR wynoszą dla *AluI*: 291 i 194-bp; dla *Sau3AI*: 350 i 135-bp.

## ITS-PCR-RFLP

Sekwencjami startera wiodącego i odwrotnego w reakcji ITS-PCR-RFLP (Toda i Komazaki, 2002) są odpowiednio 5'-TGTGAAGTGCAGGACACATGA-3' i 5'-GGTAATCTCACCTGAACTGAGGTC-3', mieszczące się w regionach 5,8 S i 28 S oskrzydających ITS 2 regionu rybosomalnego DNA. W przypadku *T. palmi* tworzone są produkty PCR o wielkości 588-bp. 20 µl mieszaniny reakcyjnej zawiera: 1 µM każdego ze starterów, 250 µM dNTPs (Promega), 1 jednostkę polimerazy AmpliTaq Gold DNA (Applied Biosystems), 2 µl buforu reakcyjnego 10x (z 25 mM MgCl<sub>2</sub>) oraz 0,5 µl DNA. Reakcja PCR zachodzi w termocyklerze wykonanym w technologii Peltier (np. PTC200, MJ-Research) w następujących warunkach: 9 min. w 94°C, 30 30-sekundowych cykli w 94°C, 30-sek. w 50°C, 1 min. w 72°C, końcowe wydłużanie przez 10 min. w 72°C i szybkie schładzanie do temperatury pokojowej. Po amplifikacji, 5 µl produktu reakcji PCR poddawane jest rozdzielni elektroforetycznemu w 1,5 % żelu agarozowym zgodnie ze standardową metodą (Sambrook i in., 1989) wraz z markerem o wielkości 100-bp umożliwiającym określenie wielkości produktów reakcji (np. marker 100-bp MBI Fermentas). Produkt PCR jest wizualizowany i fotografowany w świetle UV. W analizach RFLP, 5 µl produktu PCR (bez dalszego oczyszczania) podlega trawieniu enzymem *RsaI* zgodnie z instrukcją producenta. Strawiony produkt PCR poddawany jest rozdzielni elektroforetycznemu w 2 % żelu agarozowym wraz z markerem wielkości 100-bp oraz wizualizowany i fotografowany w świetle UV. Próbka jest identyfikowana jako *T.palmi* gdy wielkości prążków wynoszą 371, 98, 61 i 58-bp.

## Specyficzność metod molekularnych

Specyficzność zarówno tradycyjnej reakcji PCR, jak i reakcji real-time PCR, amplifikujących gen COI, została określona w oparciu o wyniki reakcji z wykorzystaniem 15 próbek *T. palmi* i 61 próbek zawierających 23 inne gatunki wciornastków powszechnie występujących w Europie, takich jak: *Thrips alni*, *Thrips tabaci*, *Frankiniella occidentalis*, *Frankiliella schultzei* (Kox i in., 2005). W reakcjach prawidłowo wykryto wszystkie próbki *T. palmi*. W reakcji real-time PCR nie stwierdzono reakcji krzyżowych starterów z innymi gatunkami wciornastków, natomiast w tradycyjnej reakcji PCR uzyskano identyczne wyniki, poza *Thrips major*, dającym wynik fałszywie pozytywny. Reakcja real-time PCR oparta na SCAR testowana była w odniesieniu do 10 gatunków z rodzaju *Thrips* (*flavus*, *major*, *minutissimus*, *nigropilosus*, *sambuci*, *tabaci*, *trehernei/physapus*, *urtcae*, *validus*, *vulgatissimus*), 9 gatunków z rodziny *Thripidae* (w tym *Frankiniella intonsa*, *F. occidentalis*, *F. schultzei*) oraz po jednym gatunku z rodziny *Aeolothripidae* i *Phlaeothripidae*. Żaden z tych wciornastków nie dawał wyniku pozytywnego w reakcji real-time PCR opartej na SCAR. Reakcje RFLP-PCR opracowane przez Brunner i in. (2002) (COI) oraz Tod i Komazaki (2002) (ITS) nie zostały stworzone w celu identyfikacji wyłącznie *T. palmi*. Umożliwiają one molekularną identyfikację odpowiednio dziewięciu i ośmiu różnych gatunków wciornastków, w tym *T. palmi*, *T. tabaci* i *F. occidentalis*, poprzez to, że każdy z badanych gatunków daje odmienny wzór prążków produktu trawienia enzymatycznego.

Możliwa jest pomyłka z innymi gatunkami z rodzaju *Thrips*. Identyfikacja oparta jest na cechach morfologicznych. Bardzo zbliżone do *T. palmi* są pochodzące z Indii gatunki: *T. alatus* oraz *T. pallidus* (Palmer, 1992). U *T. alatus*, człon V czułka jest jednolicie brązowy; szczecina S2 na tergitech odwłoka III–IV jest znacznie słabiej rozwinięta, niż szczecina S3, zarówno u samic, jak i samców; na tergicie IX brak przednich porów (*T. palmi*: szczeciny S2 i S3 na ww. tergitech są prawie równe, ryc. 3.10 (Web Fig.); na tergicie IX zazwyczaj obecne są oba pory, środkowy i przedni, tabela 1, ryc. 3.8 (Web Fig.)). U *T. pallidus* rzeźba zaplecza jest w części środkowej siatkowata (*T. palmi*: w części środkowej tylko podłużne linie, ryc. 3.4 (Web Fig.)).

Pospolitymi gatunkami europejskimi, które można pomylić z *T. palmi* są: *T. alni*, *T. flavus* oraz *T. tabaci* (zur Strassen, 1989). *T. alni* jest znany tylko z olchy (*Alnus*). Odróżnia go od *T. palmi* szczecina S2 na tergitech odwłoka III–IV, która jest znacznie słabiej wykształcona niż szczecina S3, zarówno u samic, jak i samców (*T. palmi*: szczeciny S2 i S3 na ww. tergitech są prawie równe, ryc. 3.10 (Web Fig.)) oraz obecność wąskich owalnych pól gruczołowatych na sternitach odwłoka u samców (*T. palmi*: szerokie poprzeczne pola, ryc. 3.9 (Web Fig.)). *T. flavus* może zostać odróżniony na podstawie położenia szczeciny międzyprzyczkowej, która znajduje się wewnątrz trójkąta przyoczkowego (*T. palmi*: na zewnątrz trójkąta, ryc. 3.2 (Web Fig.)). Dodatkowo, długość członu VI czułka u *T. palmi* wynosi 42–48  $\mu\text{m}$ , podczas gdy u *T. flavus* człon ma długość 54–65  $\mu\text{m}$ . *T. tabaci* ma trzy szczeciny brzeżne na tergicie II (*T. palmi*: 4, ryc. 3.6 (Web Fig.)), na zapleczu brak jest porów (*T. palmi*: obecne dwa pory, ryc. 3.4 (Web Fig.)).

Podobnie jak *T. tabaci*, *Thrips nigropilosus* ma trzy szczeciny brzeżne na tergicie odwłoka II, brak jest porów na zapleczu. Dodatkowo, u *T. nigropilosus* obecne są ciemne pola na odwłoku (*T. palmi*: brak ciemnych pól), na tergitech odwłoka IV–V szczeciny S1 są dużo więcej dłuższe, niż połowa długości części środkowej tych tergitów (*T. palmi*: mniej niż 0,3, ryc. 3.10 (Web Fig.)). Innym spotykanym podobnym żółtym gatunkiem jest *Thrips urticae*, który odróżnia się długością szczecin zewnętrznych (zazwyczaj ponad 30  $\mu\text{m}$ ) w tylnej części przedplecza (*T. palmi*: mniej niż 25  $\mu\text{m}$ , ryc. 2.3 (Web Fig.)), na tergitech odwłoka w występują zazwyczaj w części środkowej szare pola oraz na tergicie odwłoka IX brak jest przednich porów (*T. palmi* zazwyczaj ma przednie pory, ryc. 3.8 (Web Fig.)). W Holandii na roślinach *Serissa* (bonsai) znaleziono formę *T. palmi*, która różni się wyraźnie kilkoma ważnymi cechami identyfikacyjnymi od typowej formy *T. palmi*. Cechy te zostały przedstawione w tabeli 1.

W celu pozytywnej identyfikacji, procedury wykrywania i identyfikacji opisane w niniejszym protokole powinny być następujące. Cechy rodzaju *Thrips* oraz cechy pozwalające odróżnić *T. palmi* od gatunków podobnych, przedstawione w części dotyczącej identyfikacji oraz w Dodatku I, powinny

zostać określone jako obecne. Alternatywnie, jedna z metod molekularnych opisana powyżej (COI-PCR, COI-real time-PCR, SCAR based real-time PCR, COI-PCR-RFLP, ITS-PCR-RFLP) powinna dostarczyć właściwy sygnał (amplikon, wartość Ct lub fragment restrykcyjny).

Tabela 1. Cechy odróżniające samice form *Thrips palmi* oraz podobnych gatunków z rodzaju *Thrips* (wg Vierbergen, 2002).

	<i>Thrips palmi</i> (forma typowa)	<i>Thrips palmi</i> („Serissa”)	<i>Thrips alatus</i>	<i>Thrips alni</i>
Człon czułka IV, V całkowicie brązowy	–	+	+	+
Skrzydła przednie ciemne	–	+	–	–
Rzeźba zaplecza zbieżna	+	+/-	+/-	–
Tergity odwłoka III i IV z jasną szczecinią S2, krótszą od szczeciny S3	–	–	+	+
Tergit odwłoka IX z porami przednimi	+	+/-	–	+

## Raport z badania

Przewodnik dotyczący sprawozdań i dokumentacji został przedstawiony w standardzie EPPO PM7/- (w przygotowaniu).

## Informacje dodatkowe

Dodatkowe informacje dotyczące opisanego organizmu można uzyskać: Entomology Section, Department of Diagnostics, Plant Protection Service, PO Box 9102, 6700 Wageningen (Holandia); Invertebrate Identification Team, Central Science Laboratory, Sand Hutton, York, 1LZ (Wielka Brytania).

## Podziękowania

Niniejszy protokół został sporządzony oryginalnie przez G. Vierbergen oraz L.F.F. Kox, Plant Protection Service, Wageningen (Holandia). Protokół dotyczący SCAR-based real-time PCR został przygotowany dzięki uprzejmości D. W. Collins, Central Science Laboratory, York (Wielka Brytania).

## Materiały źródłowe<sup>2</sup>

- Bhatti JS (1980) Species of the genus *Thrips* from India. *Systematic Entomology* 5, 109–166.  
 Bournier JP (1983) Un insecte polyphage: *Thrips palmi*, important ravageur du cotonnier aux Philippines. *Cotonnier et Fibres Tropicales* 38, 286–288.  
 Brunner PC, Fleming C & Frey JE (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.

<sup>2</sup> Został zachowany oryginalny sposób zapisu tytułów. (przyp. tłum.)



- EPPO/CABI (1997) Thrips palmi. In: Quarantine Pests for Europe, 2nd edn. CAB International, Wallingford (Wielka Brytania).
- Kox LFF, van den Beld HE, Zijlstra C & Vierbergen G (2005) Real-time PCR assay for the identification of Thrips palmi. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 35, 141–148.
- Mantel WP & 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.
- Mound LA & Kibby G (1998) Thysanoptera. An Identification Guide, 2nd edn, pp. 1–70. CAB International, Wallingford (Wielka Brytania).
- Nakahara S (1994) The Genus Thrips Linnaeus of the New World. USDA Technical Bulletin no. 1822. USDA, Washington (USA).
- Palmer JM (1992) Thrips (Thysanoptera) from Pakistan to the Pacific: a review. The Bulletin of the British Museum (Natural History). Entomology Series 61, 1–76.
- Sakimura K, Nakahara LM & Denmark WA (1986) A thrips, Thrips palmi. Entomology Circular 280. Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry, Gainesville (USA).
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA).
- 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.
- Toda S & Komazaki S (2002) Identification of thrips species (Thysanoptera: Thripidae) on Japanese fruit trees by PCR and RFLP of the ribosomal ITS2 region. Bulletin of Entomological Research 92, 359–363.
- Vierbergen G (2002) Identification of the ‘Serissa’ form of Thrips palmi.
- Verslagen En Mededelingen Plantenziektenkundige Dienst Wageningen (Annual Report Diagnostic Centre 2001) 219, 49–51.
- Walsh K, Boonham N, Barker I & Collins DW (2005) Development of a sequence-specific real-time PCR to the melon thrips Thrips palmi. Journal of Applied Entomology 5, 272–279.
- zur Strassen R (1989) [What is Thrips palmi? A new quarantine pest for Europe]. Gesunde Pflanzen 41, 63–67 (w jęz. niemieckim).

## Dodatek 1

### Cechy diagnostyczne rodzaju *Thrips* i gatunku *T. palmi*

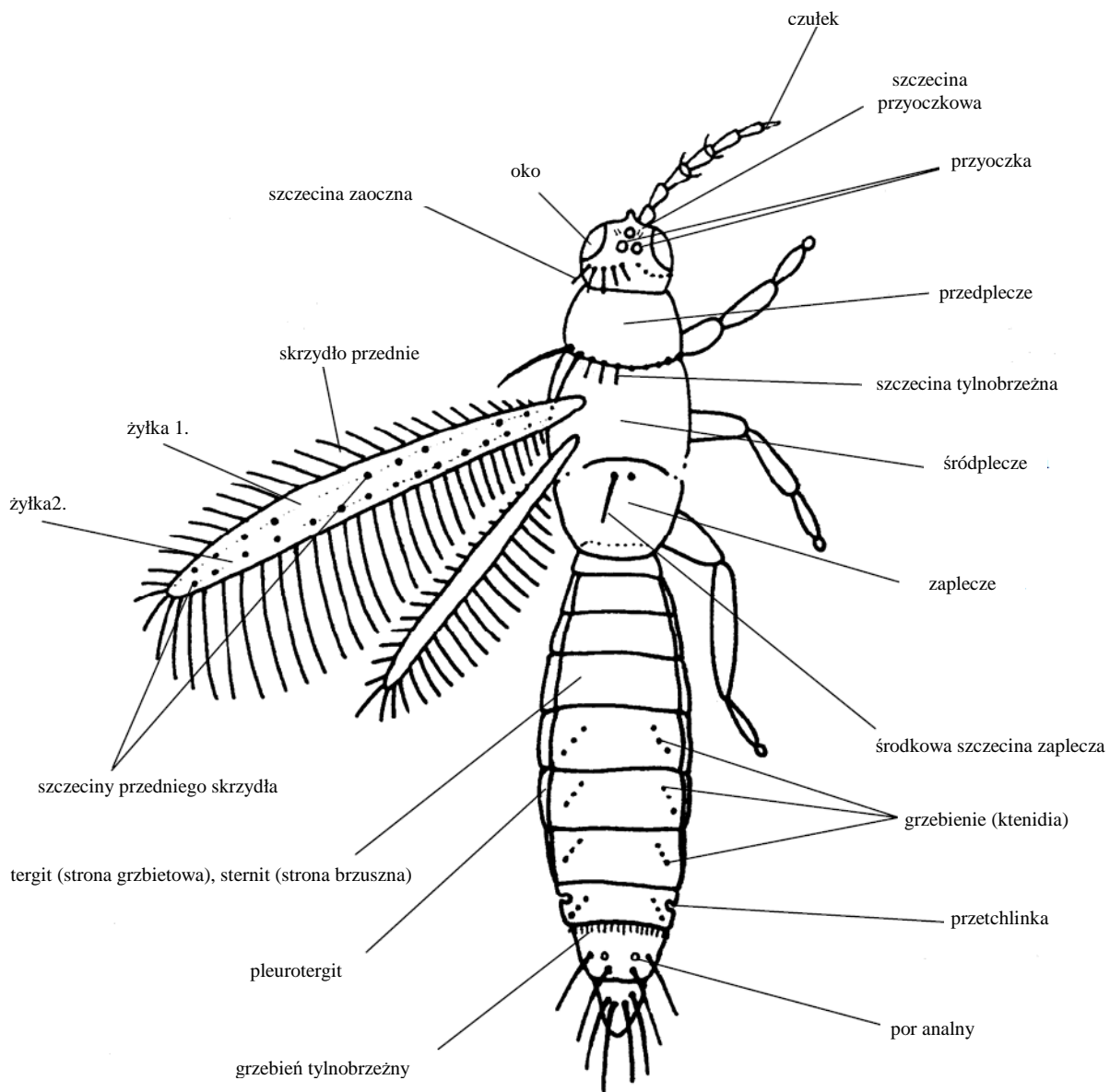
Okazy mogą zostać zidentyfikowane jako rodzaj *Thrips* w oparciu o analizę następującej kombinacji cech (patrz ryc. 1 (Web Fig.) w celu ustalenia położenia różnych cech):

Czułek	Złożony z siedmiu lub ośmiu wyraźnych członów: człon III i IV z widełkowatymi („krowi róg”) włoskami lub stożkami czuciowymi.	Ryc. 2.1, 3.1 (Web Fig.)
Głowa	Z dwiema parami szczecin przyoczkowych (II i III), pary I brak.	Ryc. 2.2 (Web Fig.)
Przedplecze	Z dwiema parami szczecin zewnętrznych.	Ryc. 2.3 (Web Fig.)
Skrzydła przednie	Pierwsza żyłka z rzędem szczecin z przerwami (gatunki europejskie).	Ryc. 2.4 (Web Fig.)

Tergity odwłokowe V–VIII	Z ktenidiami (grzebień – każdy złożony z serii prążków).	Ryc. 1 (Web Fig.)
Tergit odwłokowy VIII	Ktenidia umiejscowione przyśrodkowo z tyłu w stosunku do przetchlinek.	Ryc. 2.5 (Web Fig.)

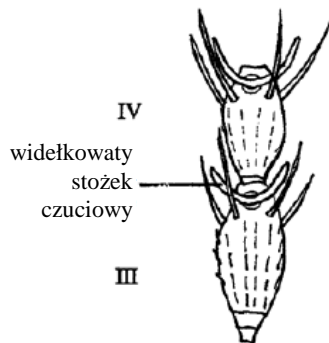
Okazy mogą zostać zidentyfikowane jako *Thrips palmi* na podstawie obecności następujących cech:

Barwa ciała	Ciało jasnożółte, brak ciemnych obszarów na głowie, tułowiu czy odwłoku, człony I i II czułków jasne.	Ryc. 3.1 (Web Fig.)
Człon V czułka	Zazwyczaj żółtawy w części przy podstawie 1/3–1/2.	Ryc. 3.1 (Web Fig.)
Człon VI czułka	Długość: 42–48 µm.	Ryc. 3.1 (Web Fig.)
Głowa: para III szczecin przyoczkowych	Nasady szczecin umieszczone na zewnątrz lub stygnie w stosunku do trójkąta przyoczkowego.	Ryc. 3.2 (Web Fig.)
Skrzydła przednie: pierwsza żyłka	Z dwiema lub trzema szczecinami w części dystalnej.	Ryc. 3.3 (Web Fig.)
Zaplecze	Z jedną parą porów (sensilli dzwonowatych), paskowato urzeźbione, zazwyczaj zbieżne w części tylnej.	Ryc. 3.4 (Web Fig.)
Pleurotergity odwłoka	Rządki bez mikrotrichiów, brak szczecin dodatkowych.	Ryc. 3.5 (Web Fig.)
Tergit odwłokowy II	Z czterema szczecinami.	Ryc. 3.6 (Web Fig.)
Tergity odwłokowe III i IV	Szczecina S2 prawie taka sama jak szczecina S3.	Ryc. 3.10 (Web Fig.)
Tergit odwłokowy VIII	Z kompletnym tylnobrzesnym grzebieniem mikrotrichiów.	Ryc. 3.7 (Web Fig.)
Tergit odwłokowy IX	Zazwyczaj z dwiema parami porów (w części przedniej i środkowej).	Ryc. 3.8 (Web Fig.)
Samiec: sternity	Z poprzecznymi gruczołowatymi obszarami na sternitach III–VII.	Ryc. 3.9 (Web Fig.)



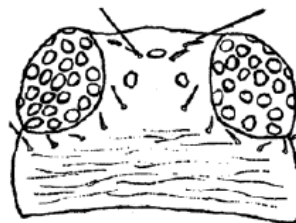
Ryc. 1. Umieszczenie ogólnych cech charakterystycznych wciornastków z rodzaju *Thrips*.

(1) Czulek: człon III i IV z widełkowatym („krowi róg”) stożkiem czuciowym.

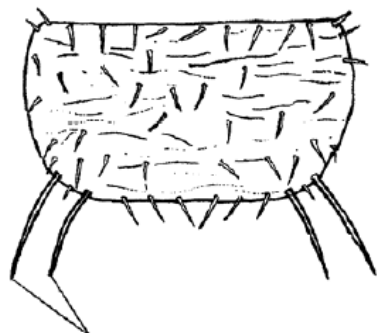
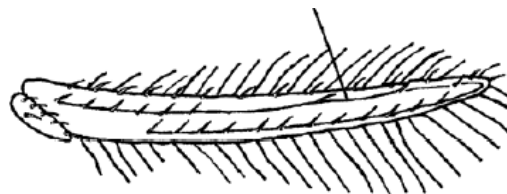


(2) Głowa: dwie pary szczecin przyoczkowych (brak I pary).

szczeciny przyoczkowe, para III      szczeciny przyoczkowe, para II



(4) Skrzydło przednie: rząd szczecin na pierwszej żyłce z przerwą w części końcowej



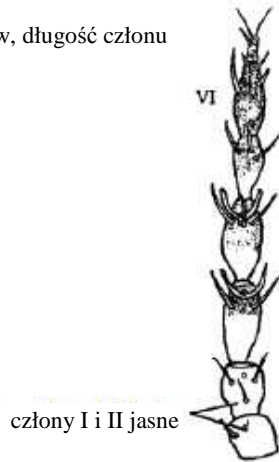
(3) Przedplecze: dwie pary szczecin zewnętrznych.



(5) Tergit odwłoka VIII: przetchlina umiejscowiona tylnobocznie w stosunku do ktenidium.

Ryc. 2. Cechy charakterystyczne wciornastków z rodzaju *Thrips*.

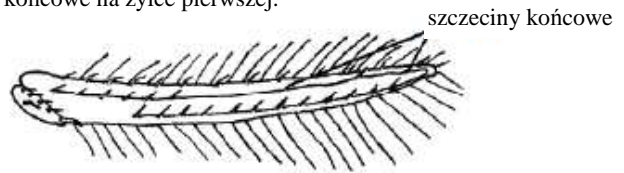
(1) Czułek: 7 członów, długość członu VI – 42–48 μm.



(2) Głowa: umiejscowienie pary III szczecin przyoczkowych.



(3) Skrzydło przednie: 3 szczeciny końcowe na żyłce pierwszej.



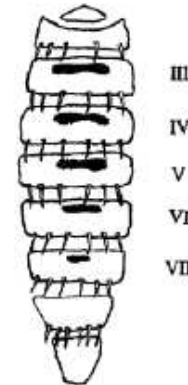
(4) Zaplecze



por zaplecza rzeźba w postaci pasków, zbieżnych ku tyłowi

(9) Samiec: gruczołowe obszary na sternitach odwłoka od III do VII.

(5) Pleurotergit



(6) Tergit odwłoka II: cztery szczeciny brzeżne.



(8) Tergit odwłoka IX.



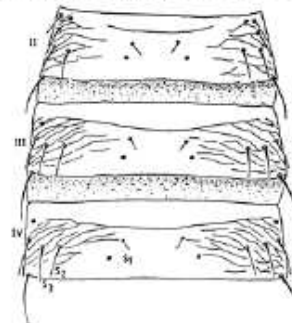
dwie pary porów

(7) Tergit odwłoka VIII



kompletny grzebień tylnobrzoźny

(10) Tergity II–IV, samica (wg Zur Strassen 1989)



Ryc. 3. Cechy charakterystyczne *Thrips palmi*.

Tłumaczenie z jęz. angielskiego:	Sprawdził:	Zatwierdził:
Tomasz Konefał (GIORiN CL).	Witold Karnkowski (GIORiN CL)	Janina Butrymowicz (GIORiN CL)
15.10.2009	26.11.2009	30.11.2009