المعيار الدولي 27
الملحق1

المعايير الدولية لتدابير الصحة النباتية

المعيار الدولي 27 برتوكولات التشخيص

برتوكول تشخيصي 1

تربس البطيخ:*Thrips palmi* Karny

إصدار (2010)

المحتويات

1. معلومات حول الآفة ..... بروتوكول تشخيص 1-3

2. معلومات تصنيفية ..... بروتوكول تشخيصي 1-5

3. الكشف ..... بروتوكول تشخيصي 1-5

4. تحديد الهوية ..... بروتوكول تشخيصي 1-7

1.4 التحديد المظهري/المورفولوجي لحشرة تربس بالغة ..بروتوكول تشخيصي 1-7

1.1.4 تحضير حشرة تربس للفحص المجهري ..... بروتوكول تشخيصي 1-7

2.1.4 تحديد فصيلة التربس Thripidae ..... بروتوكول تشخيصي 1-7

3.1.4 تحديد جنس حشرة تربس *Thrips* ..... بروتوكول تشخيصي 1-8

4.1.4 تحديد هوية حشرة *Thrips palmi* ..... بروتوكول تشخيصي 1-9

1.4.1.4 المواصفات الشكلية (المورفولوجية) لحشرة *Thrips palmi* بروتوكول تشخيصي 1-9

2.4.1.4 مقارنة مع أنواع مماثلة (أنواع بلون أصفر بدون علامات جسمية أغمق، أو صفراء بشكل سائد، أو صفراءأحياناً)..... بروتوكول تشخيصي 1-10

2.4 الاختبارات الجزيئية لتحديد هوية حشرة *Thrips palmi* بروتوكول تشخيصي 1-21

1.2.4 اختبار منطقة التكبير متخصصة التسلسل (SCAR) لحشرة *Thrips palmi* بالارتكاز على تفاعل البوليميريز المتسلسل في الوقت الحقيقي(real-time PCR) بروتوكول تشخيصي 1-21

2.2.4 اختبار تتابع الوحدة الفرعية لسيتوكروم أوكسيداز (COI) بالارتكاز على تفاعل البوليميريز المتسلسل (PCR) في الوقت الحقيقي ..... بروتوكول تشخيصي 1-22

3.2.4 اختبار تتابع مباعد النسخ الداخلي 2 (ITS2) لتسعة أنواع من حشرات التربس من بينها حشرة *Thrips palmi* بالارتكاز على تفاعل البوليميريز المكسر والمكبر بروتوكول تشخيصي 1-22

4.2.4 اختبار تتابع الوحدة الفرعية لأوكسيداز السيتوكروم (COI) لعشرة أنواع من حشرات التربس من بينها *Thrips palmi* بروتوكول تشخيصي 1-23

5. السجلات ..... بروتوكول تشخيصي 1-24

6. نقاط الاتصال للحصول على معلومات إضافية ..... بروتوكول تشخيصي 1-24

7. الاعتراف والشكر ..... بروتوكول تشخيصي 1-24

8. المراجع ..... بروتوكول تشخيصي 1-24

1. معلومات حول الآفة

يعد Thrips palmi Karny (Thysanoptera:Thripidae) أو تربس البطيخ آفة نباتية متعددة العوائل، وبخاصةٍ على الأنواع الموجودة في الفصائل القرعية والباذنجانية. ويبدو أن هذه الآفة نشأت في جنوب آسيا وانتشرت من هناك خلال الجزء الأخير من القرن العشرين. وقد سُجِل وجودها في جميع أنحاء آسيا وهي واسعة الانتشار في كافة أنحاء إقليمي المحيط الهادي والبحر الكاريبي. كما سجلت هذه الآفة محلياً في أمريكا الشمالية والوسطى والجنوبية وأفريقيا. وللحصول على مزيد من المعلومات العامة حول Thrips palmi، أنظر منظمة وقاية النباتات في أوروبا والبحر المتوسط EPPO/المكتب الدولي الزراعي CABI (1997) أو Murai (2002)؛ كما تتوافر صحائف بيانات إلكترونية عن الآفات في مكتبة صور الآفات والأمراض (PaDIL, 2007) ومنظمة وقاية النباتات في أوروبا والبحر المتوسط (EPPO, 2008).

يسبب هذا النوع أضراراً اقتصادية للمحاصيل النباتية كنتيجة مباشرة لنشاطه الغذائي، وبسبب مقدرته على نقل فيروسات توسبو مثل فيروس موت براعم الفول السوداني (*Groundnut bud necrosis virus*)، وفيروس البقعة الميتة للشمام/البطيخ الأصفر (*Melon yellow spot virus*)، وفيروس التبرقش الفضي للبطيخ الأحمر (*Watermelon silver mottle virus*). وهذا النوع متعدد العوائل، وسجلت إصابته لأكثر من 36 عائلة نباتية. تصيب الآفة عدداً من المحاصيل في الحقل منها القرع (*Benincasa hispida*)، والفلفل الحار/الفليفلة (*Capsicum annuum*)، والحنظل (*Citrullus lanatus*)، والقثاء (*Cucumis melo*)، والخيار (*Cucumis sativus*)، وأنواع القرع العسلي (*Cucurbita* spp.)، وفول الصويا (*Glycine max*)، وأنواع القطن (*Gossypium* spp.)، وعبّاد/دوّار الشمس (*Helianthus annuus*)، والتبغ (*Nicotiana tabacum*)، والفاصولياء (*Phaseolus vulgaris*)، والبازلاء (*sativum Pisum*)، والسمسم (*Sesamum indicum*)، والباذنجان (*Solanum melongena*)، والبطاطا/البطاطس (*Solanum tuberosum*)، واللوبياء (*Vigna unguiculata*). والعوائل المهمة اقتصادياً لهذه الآفة هي الفلفل الحار/الفليفلة، وأنواع الأقحوان (*Chrysanthemum* spp.)، والخيار (*Cucumis sativus*)، وأنواع العرطنثيا/بخور مريم (*Cyclamen* spp.)، وأنواع التين (*Ficus* spp.)، والفصيلة الأوركيدية (Orchidaceae)، والباذنجان. وقد ينقل التربس على نباتات الغرس، وأزهار القطف، وثمار الأنواع العائلة وكذلك على أو مرافقاً لمواد التغليف.

يكاد يكون لون حشرة Thrips tabaci أصفر كلياً تقريباً (الأشكال 1-3) كما أن صغر حجمها (1-1.3 ميلليمتر) وتشابهها الكبير مع بعض الأنواع الأخرى الصفراء أو التي يغلب عليها اللون الأصفر من حشرات التربس.يعيق تحديد هويتها بسهولة.

شكل 1: أنثى *Thrips palmi*(إلى اليسار) والذكر (الصورة من: A. J. M. Loomans، نظم الإنتاج النباتي، جامعة Wageningen، هولندا؛ شريط القياس = 500 ميكرومتر =0.5 مم).

شكل 2: أنثى *Thrips palmi*

شكل 3: ذكر *Thrips palmi*

(الصور من: W. Zijlstra، نظم الإنتاج النباتي، جامعة Wageningen، هولندا؛ شريط القياس = 300 ميكرومتر)

2. معلومات تصنيفية

- الاسم: *Thrips palmi* Karny 1925
- المرادفات: *Thrips clarus* Moulton, 1928
  Thrips leucadophilus Priesner, 1936
  Thrips gossypicola Ramakrishna & Margabandhu, 1939
  Chloethrips aureus Ananthakrishnan & Jagadish, 1967
  Thrips gracilis Ananthakrishnan & Jagadish, 1968
- الوضع التصنيفي: Insecta, Thysanoptera, Terebrantia, Thripidae.
- الاسم الشائع: تربس البطيخ

3. الكشف

قد يوجد تربس البطيخ في مواقع مختلفة تبعاً لمراحل الحياة الموجودة.

- البيض يوجد في الأوراق والزهور ونسج الثمرة

- العمراليرقي 1 يوجد على الأوراق والزهور والثمار
- العمراليرقي 2 يوجد على الأوراق والزهور والثمار
- عمر العذراء 1 يوجد في التربة، صناديق التعبئة ووسط النمو
- عمر العذراء 2 يوجد في التربة، صناديق التعبئة ووسط النمو
- الآفة البالغة توجد على الأوراق والزهور والثمار

وعلى المادة النباتية، يحتمل أن يوجد *T. palmi* على معظم الأجزاء النباتية فوق سطح الأرض؛ ويمكن أن تختلف أجزاء النبات المصابة وفقاً لبعض المتغيرات مثل العائل وخصائص كل عشيرة من *T. palmi*

وأثناء المعاينة البصرية للمادة النباتية بحثا عن وجود *T. palmi*، يجب توجيه الاهتمام الى ندوب (خدوش) التغذية الفضية على أسطح أوراق النباتات العائلة، وبخاصة على امتداد العرق الأوسط للورقة وعروقها الفرعية.

تتسم أوراق النباتات المصابة بشدة بالمظهر الفضي أو البرونزي، تقزّم الأوراق والنهايات، أو تكون الثمار مخدوشة أو مشوهة. ويمكن أن يعاق الكشف عن الآفة في الظروف التالية:

- - الإصابة بمستو منخفض كونها قد تنتج أعراضاً قليلة أو أعراضاً غير قابلة للكشف
- - وجود البيض داخل النسيج النباتي فقط (مثلا بعد العلاج الخارجي الذي قد يزيل مراحل الحياة المرئية).

وأفضل طريقة للاعتيان/لجمع العينات للفحص الشكلي/المورفولوجي هو وضعها في سائل يعرف باسم AGA، وهو خليط مكوّن من عشرة أجزاء من الكحول الإيثيلي بتركيز 60 في المئة مع جزء واحد من الجليسرين وجزء واحد من حمض الخل. وعندما يُرغب بحفظ العينات، يتعيّن نقلها إلى كحول إيثيلي بتركيز 60 في المئة وتركها في الظلام، ويفضل وضعها في مجمدة لمنع فقدان اللون. على أن عديداً من المختبرات أشارت إلى أن سائل AGA قد يغيّر الخصائص الطبيعية لحمض DNA لحشرات التربس، وهو ما يُعيق أي أعمال جزيئية قد يتم إجراؤها لاحقاً. والبديل عن ذلك الكحول الإيثيلي بتركيز يتراوح ما بين 80 و95 في المئة كسائل تجميع حيث قد تستخدم بعد ذلك أي عينات غير موضوعة على شرائح في الأعمال الجزيئية. على أنه يجب في هذه الحالة تخزين العينات في مجمدة لحين استخدامها، وإلا فقد يصعب تحميلها على شرائح.

يمكن استخدام عدة طرائق لجمع عينات التربس (Mantel and Vierbergen، 1996؛ معدل):

- - يمكن إزالة الحشرة فردياً من النبات (الأوراق الزهور أو الثمار) ونقلها إلى أنابيب دقيقة تحتوي على سائل AGA باستخدام فرشاة ناعمة مبللة.
- - يمكن الحصول على الآفة من أجزاء النبات بالضرب على الأجزاء فوق صينية بلاستيكية صغيرة (مثلا صينية بيضاء للأنواع ذات اللون الداكن أو صينية سوداء للأنواع ذات اللون الفاتح). وفي الظروف الأكثر برودة، تبدأ حشرة التربس عادة بالسير عبر الصينية بدلاً من الطيران منها، وهذا يتيح وقتاً لالتقاط حشرت التربس بوساطة فرشاة ناعمة مبللة، في حين يتعيّن في المناطق المدارية أن تتم عملية الجمع بسرعة أكبر حيث من المرجح أن تطير حشرات التربس بسرعة أكبر. ويمكن رؤية حشرات التربس بسهولة على الصينية باستخدام عدسة يدوية مع أن مراقباً مجرباً يمكن أن يراها بسهولة بالعين المجردة.
- - يمكن الاحتفاظ بأجزاء النبات المصابة داخل كيس بلاستيكي مغلق لمدة 24 ساعة، مع قطعة من ورق الترشيح لامتصاص التكثف. تترك معظم حشرات التربس أجزاء النبات ويمكن جمعها بعد ذلك من داخل الكيس.
- - يمكن استخدام قمع Berlese لتحضير المادة النباتية مثل الأبصال،الأزهار، الخضّير، بقايا الأوراق، الطحالب/الآشنة وحتى أفرع الأشجار الميتة. ويحتوي القمع على مصفاة توضع عليها المادة النباتية. وتحت المصفاة، يُوصِل الطرف السفلي للقمع إلى وعاء يحتوي على كحول إيثيلي بتركيز 70-95 في المئة. وكبديل، يمكن استخدام كحول إيثيلي بتركيز 10% مع عامل ترطيب على اعتبار أن بعض العاملين وجد أن ذلك يسهّل إعداد محضرات مجهرية جيدة وتحميلها. يوضع القمع تحت مصباح كهربائي (60 واط)، وتؤدي الحرارة والضوء إلى دفع معظم حشرات التربس الموجودة على النبات باتجاه الوعاء. وبعد فترة ملائمة (مثل 8 ساعات لأزهار القطف)، يُمكن فحص محتوى الوعاء بوساطة مجسام.
- - يمكن رصد حشرات التربس (البالغات المجنحة فقط)، باستخدام مصائد لاصقة ملونة. وتختلف قدرة اللون على اجتذاب حشرات التربس باختلاف الأنواع ، وتعدّ المصائد ذات اللون الأزرق أو الأبيض جيدة بالنسبة لـ *Thrips palmi* مع أن المصائد الصفراء تفي بالغرض أيضا. ولتحضير الشرائح المجهرية وتحديد هويتها، يتعين إزالة

حشرات التربس من المصائد باستخدام السوائل المزيلة للصمغ كتلك المرتكزة على زيوت الليمون أو الميثان ثنائي الكلور أو بديل تربنتين.

لا توجد طرائق معترف بها لاستخلاص عذارى/خادرات حشرات التربس من التربة.

4. تحديد الهوية

يقتصر تحديد هوية أنواع حشرات التربس بوساطة الفحص الشكلي/المورفولوجي على عينات البالغات لأنه لا توجد مفاتيح كافية لتحديد هوية البيض أو اليرقات أو العذارى/الخادرات. غير أن وجود يرقات في العينات يمكن أن يوفر معلومات إضافية هامة مثل تأكيد تطورها على النباتات العائلة. والطريقة الأولية لتحديد هوية المادة البالغة تكون من خلال الصفات الشكلية/المورفولوجية. ولكي يتم تحديد هوية البالغة، يجب فحصها باستخدام مجهر بقوة تكبير عالية (مثل x 400). ويتعيّن باستخدام هذا البروتوكول مع محضرات شرائح جيدة تحديد هوية بالغات *Thrips palmi* بصورة مؤكدة عن طريق الفحص الشكلي/المورفولوجي بمفرده.

يمكن تطبيق الاختبارات الجزيئية على جميع مراحل الحياة، بما في ذلك المراحل غير الناضجة، التي يتعذر تحديد هوية نوعها شكلياً/مورفولوجياً. وإضافة لما تقدّم، قد توفّر الاختبارات الجزيئية معلومات أخرى مهمة تتعلق بهوية تلك الأنواع عندما تكون عينات البالغة غير نمطية أو تالفة. على أنه يتعيّن تفسير تلك المعلومات بدقة لأن خصوصية الاختبارات الجزيئية محدودة، وقد تم وضع هذه الاختبارات لأغراض معينة وتم تقويمها على عدد محدود من الأنواع من مناطق جغرافية مختلفة.

1.4 التحديد المظهري/المورفولوجي لحشرة تربس بالغة

1.1.4 تحضير حشرة تربس للفحص المجهري

لأغراض الفحص المجهري بقوة تكبير عالية، يجب تحميل الآفات البالغة على شرائح مجهرية. أما المواد المراد الاحتفاظ بها ضمن مجموعة مرجعية فيفضل نقعها، تجفيفها ووضعها في بلسم كندا؛ وقدّم Mound and Kibby (1998) وصفاً كاملاً لهذه العملية على أن البروتوكول الكامل لتحضير شرائح العينات التي يتم حفظها يستغرق ثلاثة أيام حتى يستكمل.
وبالنسبة للتحديد الروتيني للهوية، يعدّ المحلول القابل للذوبان في الماء، مثل محلول Hoyer (50 ميلليترا من الماء، و30 غراماً من الصمغ العربي، و 200 غرام من هيدررات الكلور، و 20 ميلليترا جليسرين) طريقة أسرع ورخيصة نسبياً. ووصف Mound and Kibby (1998) طريقة شائعة للتحضير الروتيني للشرائح موصوفة أدناه (قد تجد المختبرات المختلفة أن متغيرات أخرى تعمل بدرجة الكفاءة نفسها):

إنقل العينات من سائل التجميع إلى كحول إيثيلي نظيف بتركيز70%؛ وإذا كانت العينات مرنة بالقدر المعقول، حاول بسط الأرجل والأجنحة وقرون الاستشعار باستخدام دبابيس مجهرية؛ إنقل حشرة واحدة، على أن يكون بطنها إلى أعلى، إلى قطرة من محلول Hoyers فوق ساترة قطرها 13 ميلليمتراً واستخدم دبابيس مجهرية لإعادة ترتيب الحشرة حسب الضرورة؛ قم بإنزال شريحة المجهر برفق فوق القطرة بحيث تلتصق الساترة وقطرة المحلول بمنتصف الشريحة؛ إقلب الشريحة فور انتشار المحلول على حواف الساترة؛ ضع لصاقة على الشريحة بتفصيلات المكان، وتاريخ الجمع، والنبات العائل؛ ضع الشريحة، على أن تكون الساترة إلى أعلى، داخل فرن تجفيف بدرجة حرارة 35 - 40° سلزيوس، واتركها لمدة ست ساعات على الأقل قبل محاولة إجراء الدراسة؛ إترك الشريحة داخل الفرن قرابة ثلاثة أسابيع لتجفيف سائل التحميل، قبل إغلاق الساترة بالراتينج أو بطلاء أظافر.

2.1.4 تحديد فصيلة التربس Thripidae

تنتمي حشرة *T. palmi* إلى فصيلة Thripidae التي تضم أكثر من 2000 نوع في 267 جنس. وتشترك الأنواع في الخصائص المبينة في الجدول 1.

جدول 1: فصيلة Thripidae- الخصائص المشتركة

الجزء من الجسم	الخصائص
قرون الاستشعار	سبع أو ثمانية عقل (وأحيانا ست أو تسع عقل)
الأجنحة الأمامية (إذا كانت مكتملة النمو)	العقلتان الثالثة والرابعة تحتويان على مخاريط ناتئة (مراكز الإحساس)
بطن الأنثى	رهيفة في العادة، وبها عرقان طوليان يحمل كل منهما سلسلة من الأشواك الحسية

أسترنة/درع البطن الأوسط للذكر	ينتهي بآلة وضع بيض مسننة تتجه إلى أسفل عند القمة مع أو بدون مناطق غدية

3.1.4 تحديد جنس حشرة تربس *Thrips*

يضم *جنس Thrips* أكثر من 280 نوعاً من جميع أنحاء العالم، غير أن منشأ الجنس يرجع في المقام الأول إلى منطقة الهولأركتيك الجغرافية الحيوانية والمناطق المدارية في العالم القديم. ويقتسم أفراد النوع الخصائص المبينة في الجدول 2.

جدول 2: جنس حشرة تربس *Thrips* - الخصائص المشتركة، عينات الآفات البالغة

الجزء من الجسم	الخصائص
الأنثى	مجنحة أو ذات أجنحة رهيفة
قرنا الاستشعار	سبع أو ثماني عقل
	تتكون العقلتان الثالثة والرابعة من مخاريط حسية متشعبة ناتئة
الأشواك الحسية العينية	زوجان فقط موجودان(الزوج الأول غائب)
	الزوج الثاني أقصر (على الأقل) من الزوج الثالث
الصفيحة الظهرية الأمامية	زوجان (نادراً واحد أو بدونه) من الأشواك الزاوية الخلفية الرئيسية
	عادة ثلاثة أزواج، أحياناً أربعة، من الأشواك الزاوية الخلفية الرئيسية
حلقات الصدر الخلفية	لا توجد أشواك حسية
الأجنحة الأمامية	صف من الأشواك الحسية، متباعدة في العادة، على العرق الأول للعرق الثاني صف كامل من الأشواك الحسية
	خمس أشواك الحسية (نادراً ستة) على الجزء الخلفي المثلث
صفيحة ترجية وسطية خلفية (Metascutum)	زوج أوسط من الأشواك الحسية على الحافة الخلفية أو وراءها
	بنقوش محززة أو شبكية
	مستقبلات حسية جرسية الشكل(ثقوب في الصدر الأمامي) موجودة أو غير موجودة
الساق الأمامية	المخلب القمي غائب
الرسغ	مكون من عقلتين
الصفائح الظهرية/الترجات من الأعلى والبطنية من الأسفل	بدون حواف هامشية خلفية (انتفاخات قاعدية/شفاه)
الصفائح الظهرية من الأعلى	الصفائح الظهرية من الأعلى من الخامسة إلى الثامنة ذات أشواك مزدوجة مفلطحة جانبياً (أمشاط يضم كل منها صفاً تحت الحافة من أشواك مفلطحة) (أحياناً على الصفيحة الظهرية الرابعة)
	الصفيحة الظهرية الثامنة من الأعلى: تتصل الأشواك المفلطحة بالثغور التنفسية عند الخلف
الصفائح البطنية/السترنات من	مع أو بدون شعيرات مفلطحة قرصية (إضافية)

الأسفل والظهرية البلورية الصفائح/السترنات البطنية (للذكر)	الصفائح /الأسترنات البطنية 3-5 أو أقل، لكل منها منطقة غدية

ويرد في الجدول 4 ملخص مبسط للصفات الرئيسية مصحوباً برسوم توضيحية وصور مجهرية (الأشكال 4 إلى 5-12).

ويمكن تحديد هوية الآفات البالغة بوساطة مفاتيح. وقد قدم Mound and Kibby (1998) مفتاحا لأربعة عشر نوعاً من التربس ذي الأهمية الاقتصادية، بما فيها *Thrips palmi*. وبالإضافة إلى ذلك، يتوافر قرص مدمج كوسيلة مساعدة لتحديد هوية حشرات التربس ويتضمن نظاماً لتحديد هوية مئة نوع من الآفات من جميع أنحاء العالم استناداً إلى صور مجهرية (Moritz *et al.*، 2004).

وتتاح مفاتيح أكثر شمولية للجنس، ويتم إنتاجها على أساس إقليمي (ولم يتم إنتاج مثل هذه المفاتيح للمنطقة الأفريقية المدارية):

آسيا: يقدم Bhatti (1980) و Palmer (1992) مفاتيح لتحديد هوية أنواع التربس المنتشرة في المناطق الآسيوية المدارية. كما يقدم Mound و Azidah (2009) مفتاحاً للأنواع في شبه جزيرة ماليزيا.

أوروبا: أنتج zur Strassen (2003) أحدث مفتاح شامل لأنواع الآفة في أوروبا، بما في ذلك التربس (باللغة الألمانية).

أمريكا الشمالية والوسطى والجنوبية: قدم Nakahara (1994) مفتاحاً لأنواع التربس من العالم الجديد. ويقـدم Mound وMarullo (1996) مفتاحا لأنواع التربس الموجودة في أمريكا الوسطى والجنوبية مع أن نوعاً واحداً فقط من هذه الآفات أصيل في المنطقة.

أوقيانوسيا: يقدم Mound و Masumoto (2005) مفتاحا لأنواع التربس في أوقيانوسيا (يُدرك المؤلفان الخطأ غير المقصود في القسم المعنون "العلاقات" في صفحة 42 حيث "ينسبان" لحشرة تربس البطيخ إحدى صفات *T. flavus* Schrank، وهي أن الشوكة العينية الثالثة تتقارب وراء العين الأولى. وترد المعلومات الصحيحة في وصف أنواع آفة تربس البطيخ أعلاه مباشرة ويوضحها الشكل 72).

4.1.4 تحديد هوية حشرة *Thrips palmi*

1.4.1.4 المواصفات الشكلية (المورفولوجية) لحشرة *Thrips palmi*

يقدم كل من Bhatti (1980)، Bournier (1983)، Sakimura *et al.* (1986)، zur Strassen (1989)، Nakahara (1994)، و Mound و Masumoto (2005) أوصافا مفصلة لـ *T. palmi*. وقدّم Sakimura *et al.* (1986) قائمة بالصفات التشخيصية الرئيسية التي تميّز *T. palmi* عن الأنواع المعروفة الأخرى من جنس *Thrips* ، ويتضمن الجدول 3 نسخة معدلة من هذه الصفات.

يمكن تمييز *Thrips palmi* بطريقة موثوقة عن غيره من الأنواع الأخرى لجنس *Thrips* بامتلاكه كافة الصفات الواردة في الجدول 3. على أن الخصائص الشكلية/المورفولوجية للـ *Thrips* تتفاوت حتى في النوع الواحد وقد تخضع بعض الصفات الواردة هنا إلى تفاوت عَرَضي طفيف. ومثال ذلك أن لون قرون الاستشعار أو عدد الأشواك الظهرية على الجناح الأمامي يمكن أن يختلف عن الحالات الأكثر شيوعا الملاحظة. وإذا اختلفت العينة في واحدة أو أكثر من تلك الصفات، فينبغي التحقّق من الهوية عن طريق الرجوع إلى مفتاح إقليمي ملائم من قبيل المفاتيح المدرجة في القسم 4-1-3.

جدول 3: قائمة بالخصائص الشكلية/المورفولوجية التي تميز معاً *Thrips palmi* عن الأنواع الأخرى من جنس *Thrips*

	الصفة المورفولوجية
1-	جسم أصفر واضح بدون مناطق داكنة على الرأس أو الصدر أو البطن (مع أشواك سميكة نوعاً ما على الجسم ذات لون أسود خفيف)؛ لون العقلتين الأولى والثانية من قرن الاستشعار شاحب، لون العقلة الثالثة أصفر بقمة مظللة، والعقل من الرابعة حتى السابعة بلون بني، ولكن قاعدة العقلتين الرابعة والخامسة صفراء في العادة؛ والأجنحة الأمامية مظللة نوعاً ما بشكل متجانس، والشعيرات البارزة داكنة اللون
2-	تتألف قرون الاستشعار دائماً من سبع عقل
3-	الأشواك العينية الثانية والرابعة خلف العينيين أصغر بكثير الأشواك الباقية
4-	الشوكة العينية الثالثة موجودة إما خارج المثلث العيني، أو تلامس الخطوط المماسية التي تصل بين العين الأمامية وكل من العيون الخلفية

5-	للصفيحة الترجية الوسطية الخلفية نقش يتلاقى عند الخلف؛ ويوجد زوج أوسط من الأشواك خلف الحافة الأمامية؛ يوجد زوج من المستقبلات الحسية جرسية الشكل
6-	على العرق الأول من الجناح الأمامي ثلاثة أشواك (أحياناً اثنتين) بعيدة
7-	للصفيحة الظهرية/الترجة الثانية أربعة أشواك طرفية جانبية
8-	للصفائح الظهرية/الترجات من الثالثة إلى الخامسة أشواك S2 داكنة وشبه متساوية مع S3
9-	للصفيحة الظهرية/الترجة الثامنة مشط طويل ودقيق كامل في الطرف الخلفي في الأنثى، ومتطور على نحو واسع خلفياً في الذكر
10	تضم الصفيحة الظهرية/الترجة التاسعة عادة زوجين من المستقبلات الحسية جرسية الشكل (ثقوب)
11-	الصفائح البطنية/الإسترنات بدون أشواك قُرصية
12-	الصفائح البطنية/الإسترنات البلورية بدون أشواك قُرصية
13-	الصفائح البطنية/الإسترنات الذكرية الثالثة إلى السابعة تحمل كل منها منطقة غدية عرضية ضيقة

ويرد في الجدول 4 ملخص مبسط للصفات الرئيسية مصحوباً برسوم توضيحية وصور مجهرية (الأشكال من 4 إلـــى 5-12).

2.4.1.4 مقارنة مع أنواع مماثلة (أنواع بلون أصفر بدون علامات جسمية أغمق، أو صفراء بشكل سائد، أو صفراء أحياناً)

نورد فيما يلي الفروق الرئيسة التي تميّز كل نوع من الأنواع الواردة هنا التي يمكن بوساطتها فصلها عن *Thrips palmi*. وإذا كان ثمة ريب، يمكن الرجوع إلى مفتاح إقليمي ملائم من قبيل المفاتيح الواردة في القسم 3.1.4. وتتضمن هذه المفاتيح أيضا تفاصيل أنواع أخرى من التربس غير مدرجة أدناه.

هناك نوعان هنديان (*Thrips alatus* Bhatti و *T. pallidulus* Bagnall) يشبهان كثيرا *T. palmi*، مع أنه لا يُعرف الكثير عن تطورهما البيولوجي:

Thrips alatus

- العقلة الخامسة لقرن الاستشعار ذات لون بني متجانس
- للصفيحتين الظهريتين/الترجتين الثالثة والرابعة أشواك S2 أكثر شحوباً وأضعف بكثير من S3 في كلا الجنسين
- لا يتلاقى النقش المحزّز على البطن الخلفي عادة عند الخلف
- التوزيع: يوجد هذا النوع في الهند وماليزيا ونيبال.

Thrips pallidulus

- العقلة الرابعة من قرن الاستشعار بلون شاحب
- النقش على البطن الخلفي شبكي في الوسط وليس محززاً
- التوزيع: يوجد هذا النوع في الهند.

وهناك ثلاثة أنواع شائعة في منطقة البليأركتيك الجغرافية الحيوانية. (ولكنها ذات توزيعات أوسع أيضاً) يمكن أن تختلط مع *T. palmi* وهي *T. flavus*. ، *T. nigropilosus* Uzel، وتربس التبغ *T. tabaci* Lindeman:

Thrips flavus

- الزوج الثالث من الأشواك العينية بداخل المثلث العيني خلف العين الأمامية مباشرة
- يبلغ طول العقلة الرابعة من قرن الاستشعار 54 – 60 ميكروناً (42 - 48 ميكروناً في *T. palmi*)
- لا تتلاقى خطوط النقش في البطن الخلفي خلفياً
- التوزيع: يعد تربس زهور شائع في جميع أنحاء آسيا وأوروبا.

Thrips nigropilosus

- عادة ذو علامات داكنة على الصدر والبطن
- على البطن الخلفي نقوش شبكية غير منتظمة في الوسط (شرائط طولية في *T. palmi*) وبدون مستقبلات حسية جرسية الشكل
- للصفيحة الظهرية/الترجة الثانية ثلاث أشواك طرفية جانبية
- للصفيحتين الظهريتين/الترجتين الرابعة والخامسة زوج أوسط من الأشواك (S1) أطول نصف مرة من الطول المتوسط للصفائح الظهرية/الترجات الأخرى (أقل 0.3 مرة في *T. palmi*)
- التوزيع: نوع شائع يتغذى عادة على الأوراق، أحيانا آفة على نباتات من الفصيلة المركبة (Compositae) ، يوجد في آسيا، شرق أفريقيا، أوروبا، أمريكا الشمالية وأوقيانوسيا.

Thrips tabaci

- لونه متغير بدرجة عالية، ولكنه يحتوى عادة على بعض العلامات ذات اللون البني أو الرمادي بدرجات متفاوتة
- جميع الأشواك خلف العينية متجانسة في الطول
- على البطن الخلفي نقش شبكي طولاني غير منتظم، تتوسطه في العادة تجاعيد صغيرة، وليس به أي مستقبلات حسية جرسية الشكل
- على العرق الأول من الجناح الأمامي في العادة أربع أشواك بعيدة (أحياناً اثنتين أو ست أشواك)
- يوجد على الصفيحة الظهرية/الترجة البطنية الثانية ثلاثة أشواك طرفية جانبية
- يوجد على الصفيحة الظهرية/الترجة البطنية التاسعة زوج خلفي من المستقبلات الحسية جرسية الشكل فقط
- على الصفائح الظهرية/الترجات البلورية البطنية عديد من الشعيرات الدقيقة المهدبة تنشأ من خطوط النقش
- الذكر: منطقة غدية عرضية ضيقة على الصفائح البطنية/الإسترنات الثالثة إلى الخامسة فقط
- التوزيع: آفة متعددة العوائل ذات توزّع عالمي.

وهناك نوعان آخران، أحدهما منطقة البليأركتيك الجغرافية الحيوانية (*T. alni* Uzel) والآخر أوروبي (*T. urticae* Fabricius) يصادفان بصورة أقل شيوعاً وقد يختلطا مع *T. palmi*. وتتشابه إناث *T. alni* من الناحية الشكلية/المورفولوجية بشكل خاص مع إناث *T. palmi*.

Thrips alni

- العقلة الخامسة من قرن الاستشعار بنية متجانسة
- الصفائح الظهرية/الترجات البطنية الثانية إلى الخامسة ذات أشواك S2 شاحبة
- الصفيحة الظهرية/الترجة البطنية الخامسة ذات أشواك S2 أضعف بكثير من أشواك S3 (تكون هذه الأشواك متشابهة في *T. palmi*)
- الصفيحة الظهرية/الترجة البطنية الثامنة تكاد تتشابه مع أشواك S1 المشابهة جزئياً لأشواك S2 (أشواك S1 أضعف بكثير من أشواك S2 في *T. palmi*)
- الذكر: على كلٍ من الصفائح البطنية/الإسترنات البطنية من الثالثة إلى السادسة منطقة غدية بيضاوية صغيرة
- التوزيع: تقتصر هذه الآفة في تغذيتها على أوراق شجر الألنوس والبتولا والصفصاف، وتوجد في أوروبا وسيبيريا ومنغوليا

Thrips urticae

- يوجد زوج من الأشواك عند حافة الصفيحة الظهرية الأمامية يزيد طولها مرتين تقريباً (أكثر من 30 ميكروناً عادة؛ والأمر ليس كذلك في *T. palmi* ، إذ يقل طول الأشواك دائما عن 25 ميكروناً)

- للبطن الخلفي تزيينات شبكية طولية في المنطقة الوسطى

الصفائح الظهرية /الترجات البطنية بلون رمادي عادة في المنطقة الوسطى

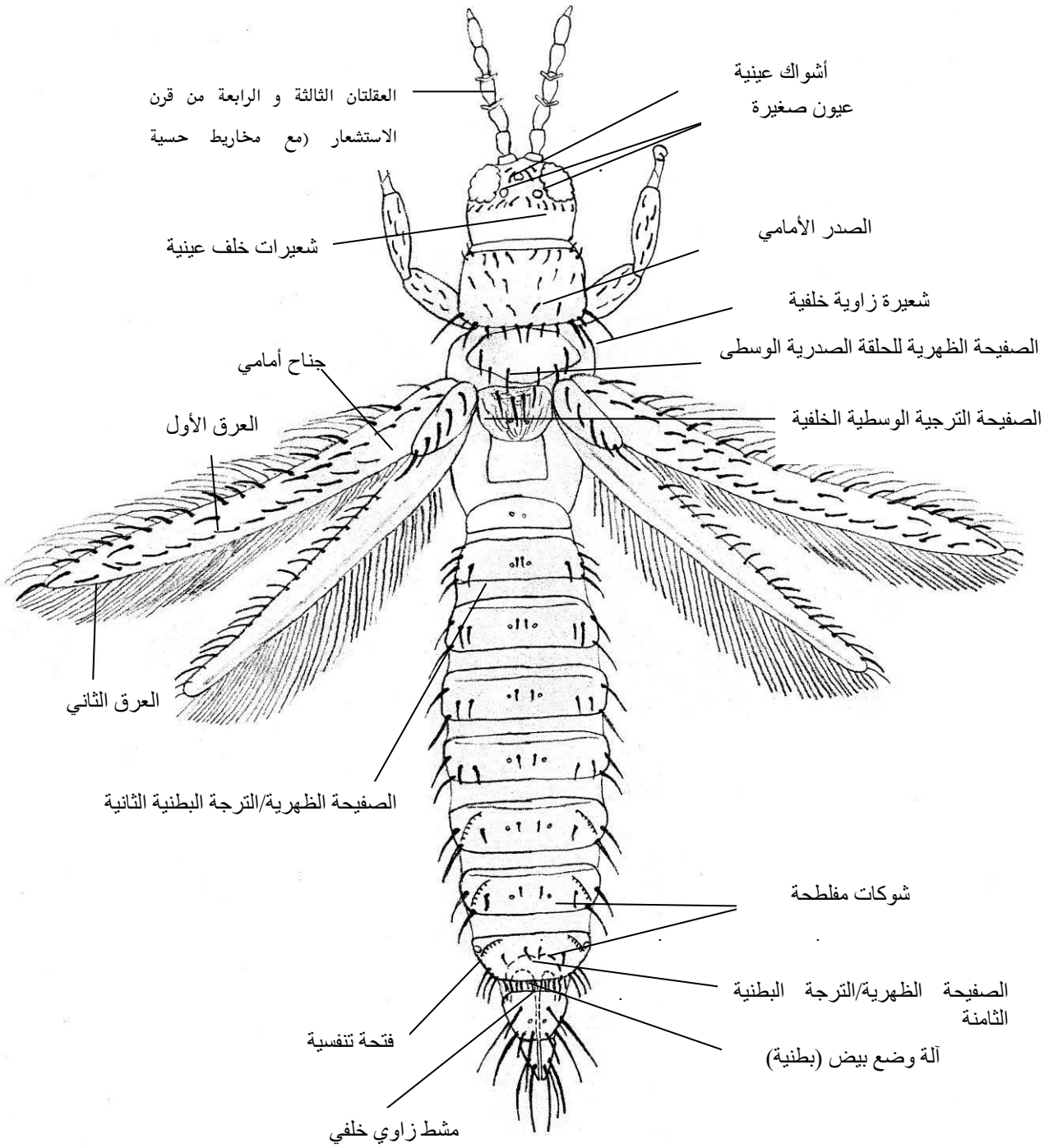
- للصفيحة الظهرية /الترجة البطنية التاسعة زوج خلفي من المستقبلات الحسية جرسية الشكل فقط
- التوزيع: تقتصر تغذيتها على أشجار *Urtica dioica* ؛ أوروبا

جدول 4: قوائم مرجعية مبسطة بالسمات التشخيصية للتعرف بسرعة على: (أ) جنس *Thrips*؛ (ب) *Thrips palmi* (انظر الشكل 4 لتحديد السمات المختلفة.)

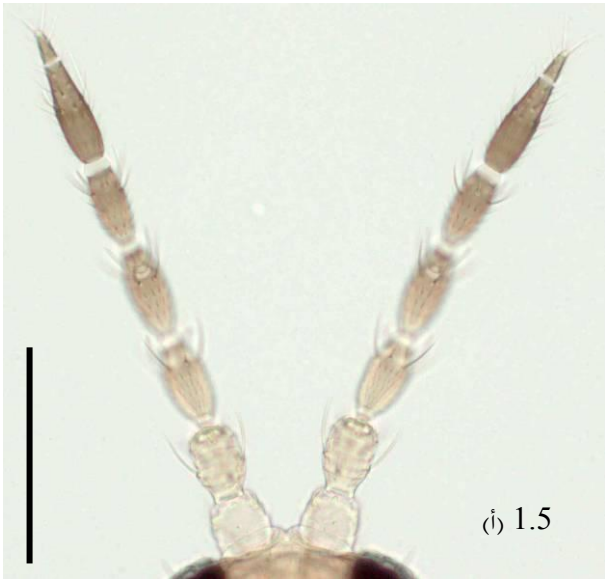
(أ) عينات يمكن اعتبارها *Thrips palmi* عن طريق مجموعة الصفات التالية		
قرون الاستشعار	ذات سبع أو ثماني عقل واضحة: العقلتان الثالثة والرابعة بمخاريط حسية متشعبة	الشكلان 1.5، و2.5
الرأس	به زوجان من الأشواك العينية (الثاني والثالث)؛ الزوج الأول غير موجود	الشكل 3.5
الجناح الأمامي	صف من الأشواك على العرق الأول مستمرة أو متقطعة	الشكل 5.5
الصفائح الظهرية/الترجات البطنية من الخامسة إلى الثامنة	مع زوج من الشويكات المفلطحة	الشكل 6.5
الصفيحة الظهرية/الترجة البطنية الثامنة	مع شويكات مفلطحة في الخلف وباتجاه الوسط بالنسبة للثغور التنفسية	الشكل 6.5
(ب) عينات يمكن تحديدها على أنها *Thrips palmi* بوجود الصفات التالية:		
لون الجسم	جسم أصفر صافي بدون مناطق داكنة على الرأس، الصدر أو البطن: العقلتان الأولى والثانية من قرن الاستشعار بلون شاحب	الأشكال من 1 إلى 3
العقلة الخامسة من قرن الاستشعار	تميل للاصفرار عادة في ⅓ إلى ½ الجزء القاعدي	شكل1.5
العقلة السادسة من قرن الاستشعار	الطول = 42 إلى 48 ميكروناً	شكل 1.5
الرأس: الزوج الثالث من الأشواك العينية	تقع قواعدها خارج المثلث العيني أو ملامسة لخطوط التماس فيما يخص العين الأمامية بالنسبة لكلٍ من العيون الخلفية	شكل 3.5
الصفيحة الظهرية الأمامية	مع زوجين من الأشواك الزاوية الخلفية الرئيسية	شكل 4.5
الجناح الأمامي: العرق الأول	به ثلاثة (اثنتان في بعض الأحيان) من الأشواك البعيدة	الشكل 5.5
الصفيحة الترجية الوسطية الخلفية	مع زوج أوسط من الأشواك خلف الحافة الأمامية وزوج من الأعضاء الحسية جرسية الشكل؛ مع نقوش شريطية تتلاقى في الخلف	الشكل 7.5
الصفائح الظهرية /الترجات البلورية	الأشواك القرصية غير موجودة؛ خطوط النقش بدون شعيرات دقيقة ثابتة هدبية	الشكل 8.5
الصفيحة الظهرية/الترجة البطنية الثانية	ذات أربع أشواك طرفية جانبية	الشكل 9.5
الصفيحتان الظهريتان/الترجتان البطنيتان الثالثة والرابعة	S2 مساوية تقريباً لـ S3	الشكل 10.5
الصفيحة الظهرية/الترجة البطنية الثامنة	في الأنثى مشط كامل في الحافة الخلفية؛ في الذكر مشط في الحافة الخلفية واسع التطور في الوسط	الشكل 6.5

الصفيحة الظهرية/الترجة البطنية التاسعة	مع زوجين من الأعضاء الحسية جرسية الشكل في الأمام والخلف (ثقوب)	الشكل 11.5
الذكر: الصفائح/الاستمرارات البطنية	مناطق غدية جنسية عرضية على الصفائح من الثالثة إلى السابعة	الشكل 12.5

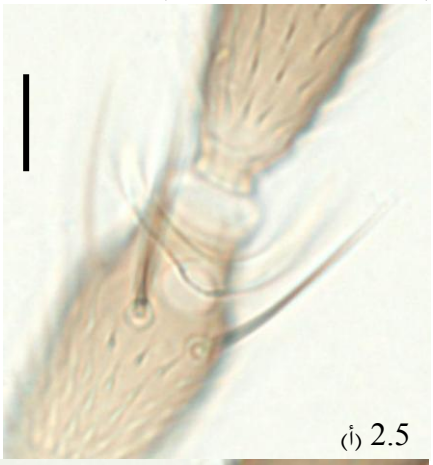
شكل 4. موقع الصفات العامة للتربس (لاتني- منظر علوي)

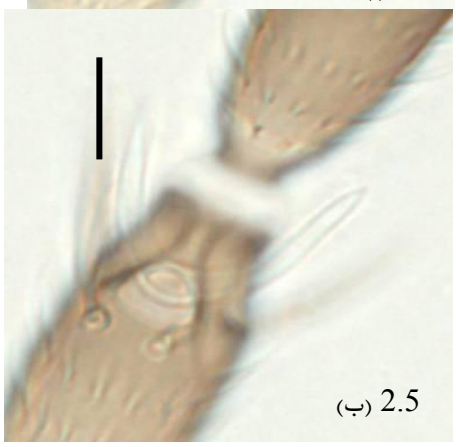


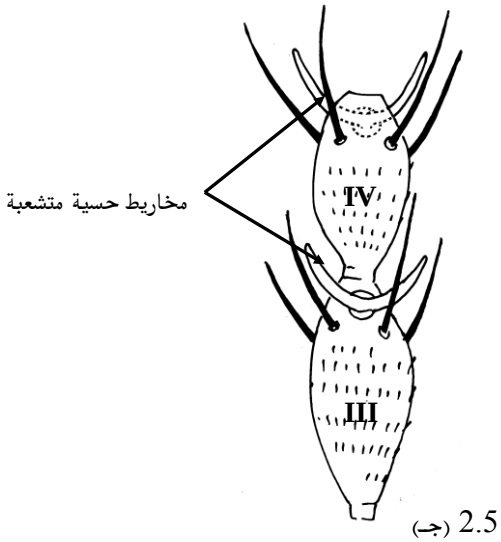
شكل 5 (الأشكال 1.5 إلى 12.5) صفات *Thrips palmi* (الصور: G. Vierbergen, نظم الإنتاج النباتـي، هولنـدا (الأشكال مرسومة من قبل S. Kobro، المعهد النرويجي لوقاية المحاصيل، النرويج)



شكل 1.5 (أ) و (ب): قرنا الاستشعار: سبع عقل
(شريط القياس: 100 ميكرون)

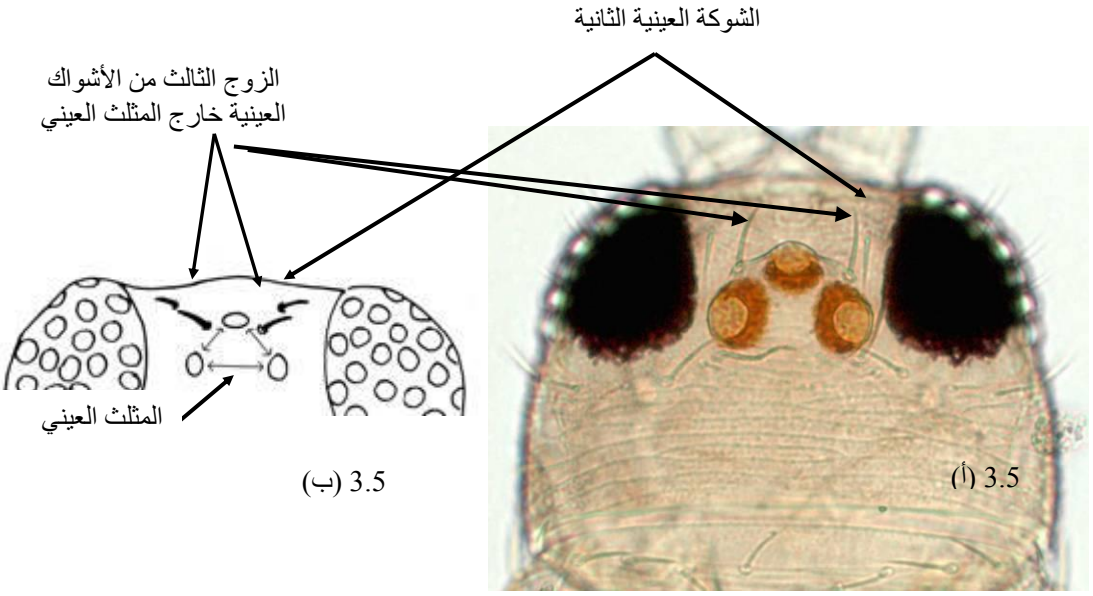




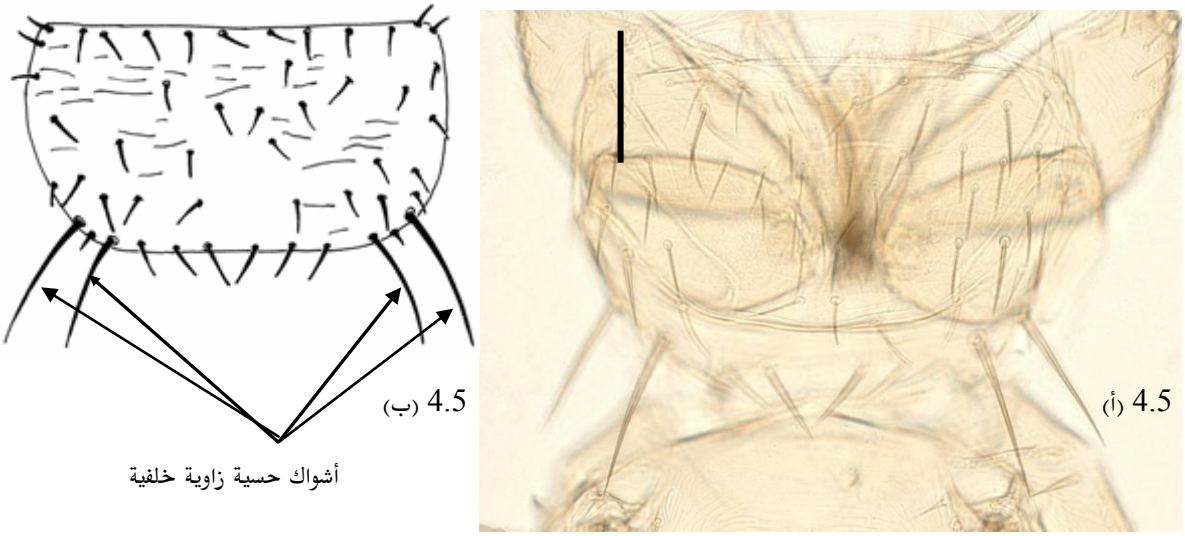


شكل 2.5 (أ) – (جـ) قرن الاستشعار،مخاريط حسية متشعبة؛ (أ) العقلة الثالثة، ظهرياً؛ (ب) العقلة الرابعة، بطنياً؛ (جـ) العقلتين الثالثة والرابعة، ظهرياً (شريط القياس: 10 ميكرونات)

تتمة **شكل 5**

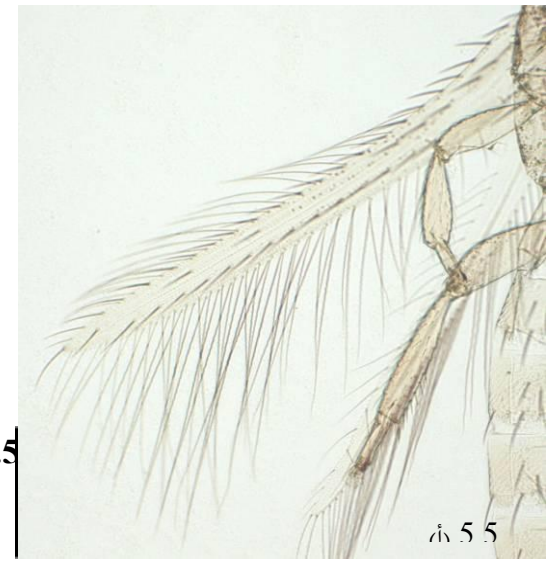


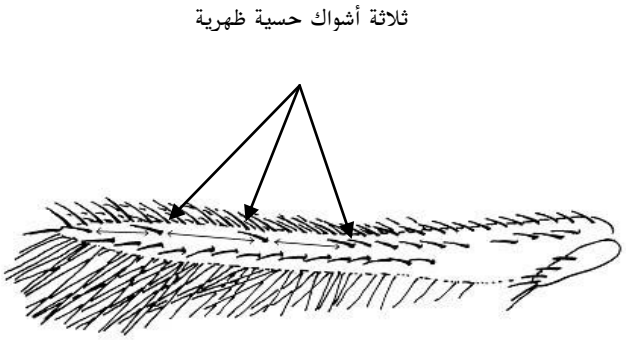
شكل 3.5 (أ)، (ب): الرأس: مع زوجين من الأشواك الحسية العينية (الزوج الأول غائب). الزوج الثالث من الأشواك الحسية العينية متوضع خارج المثلث العيني (شريط القياس: 30 ميكرون)



شكل 4.5 (أ)، (ب): الصفيحة الظهرية الأمامية: زوجان من الأشواك الحسية الزاوية الخلفية الرئيسية (شريط القياس = 50 ميكرون)

تتمة **شكل 5**



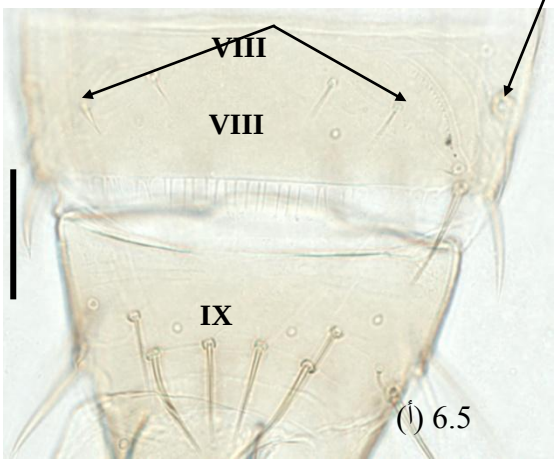


5.5 (

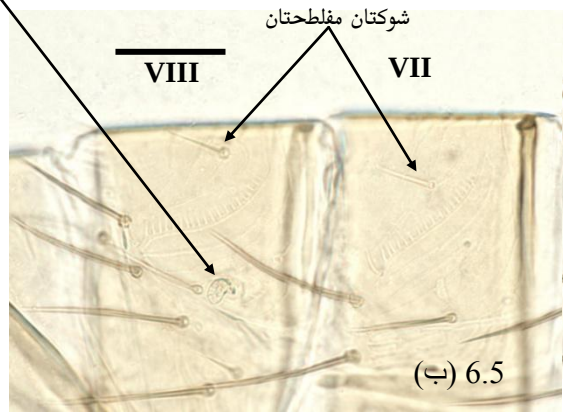
5.5 (ب)

5.5 (أ)

شكل 5.5 (أ)، (ب) الجناح الأمامي، العصب الأول-ثلاثة أشواك مع غيابات في النصف الظهري

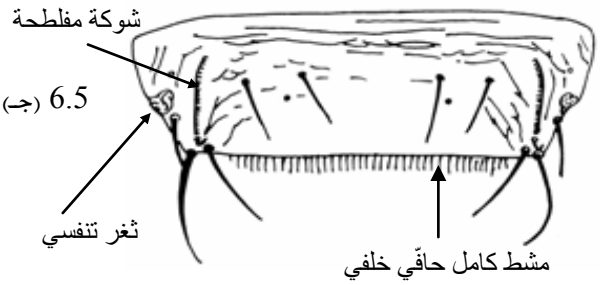


6.5 (أ)



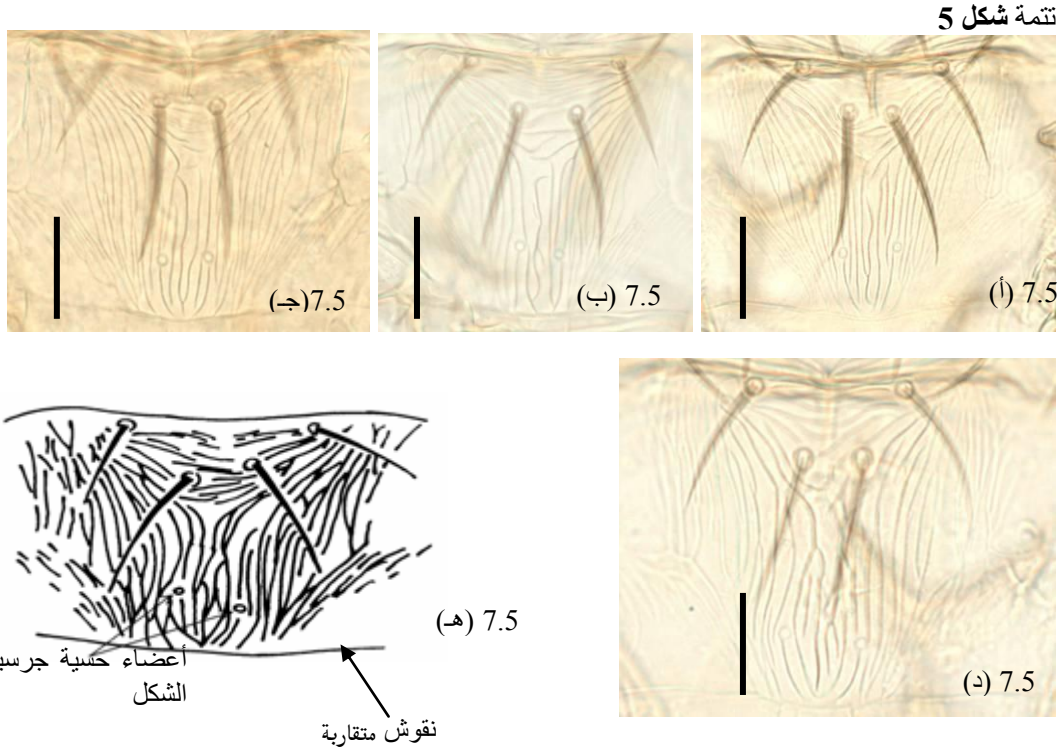
6.5 (ب)

شكل 6.5 (أ)-(جـ) الصفيحة الظهرية/الترجة البطنية الثامنة: شوكتان مفلطحتان خلف الثغر التنفسي في الوسط؛ مشط خلفي حافّي كامل؛ (أ) الذكر، ظهرياً، مشط كامل وسطي (ب) الأنثى، الصفيحة الظهريتين/الترجتين البطنيتين السابعة والثامنة، جانبياً؛ (جـ) الأنثى، الصفيحة الظهرية/الترجة البطنية الثامنة، ظهرياً. مشط كامل (شريط القياس: 30 ميكروناً)

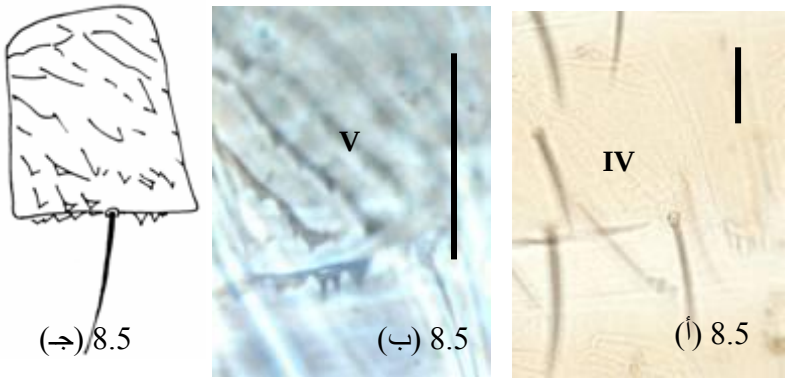


6.5 (جـ)

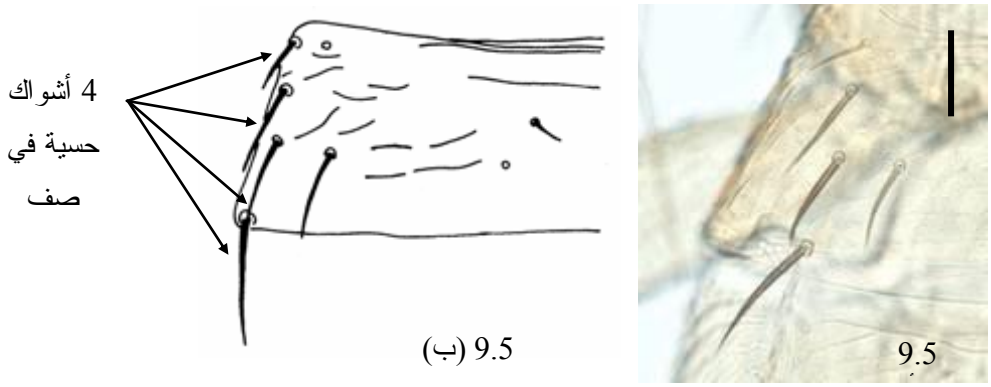
تتمة **شكل 5**



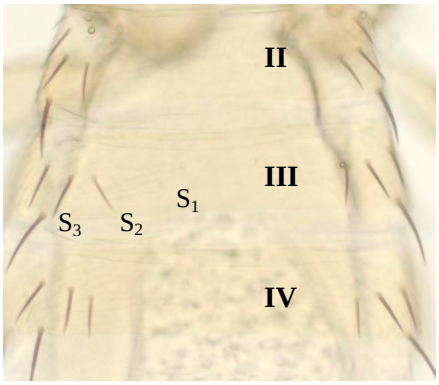
شكل 7.5 (أ)-(هـ): صفيحة ترجية وسطية خلفية، تنوّع النقش؛ أعضاء حسية جرسية الشكل (شريط القياس: 20 ميكرون)



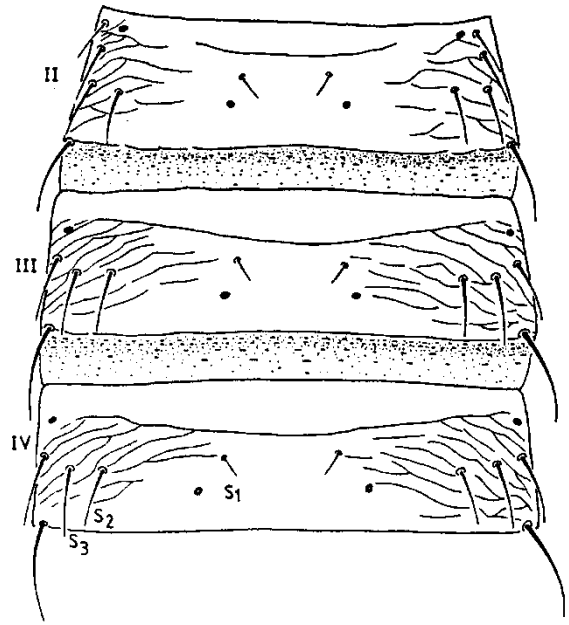
شكل 8.5 (أ)-(جـ): الصفائح الظهرية/الترجات البلورية الرابعة والخامسة، الشعيرات الدقيقة **المهدبة** والأشواك المخروطية غائبة: (أ) مجهر حقل مضئ؛ (ب) مجهرمتباين الأطوار؛ (جـ) ترجة كاملة (شريط القياس: 20 ميكروناً)



شكل 9.5 (أ)، (ب): الصفيحة الظهرية/الترجة البطنية الثانية، أربع أشواك حافيّة جانبية (شريط القياس: 20 ميكروناً

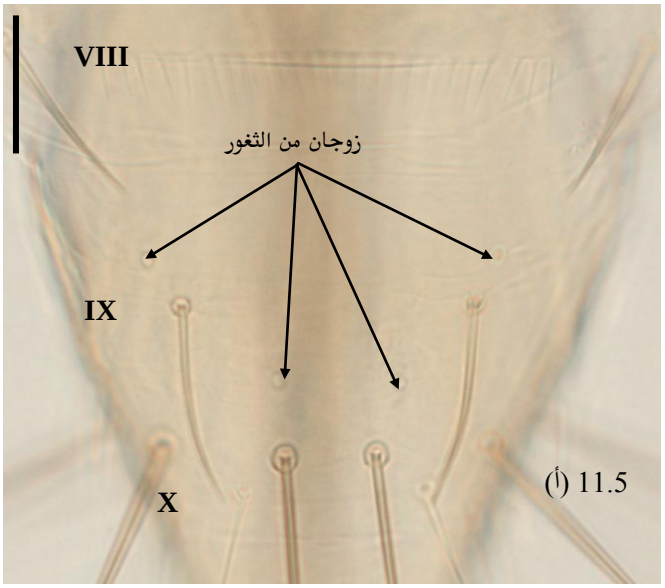


10.5 (أ)



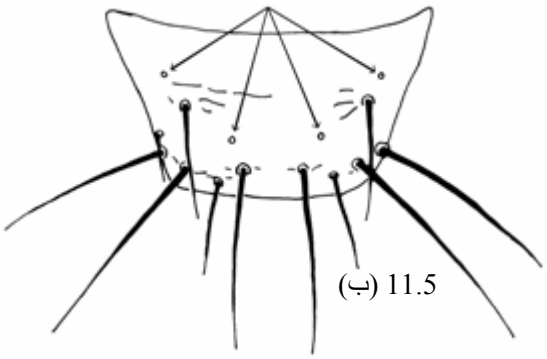
10.5 (ب)

شكل 10.5 (أ)، (ب) الترج البطنية الثانية إلى الرابعة،للأنثى الشوكتان S2 بحجم مماثل للشوكتين S3(10.5 ب من zur Strassen، 1989) (شريط القياس 50 ميكروناً)



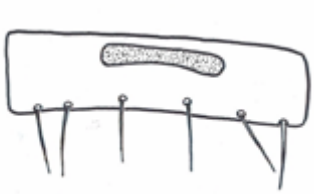
11.5 (أ)

زوجان من الثقوب
(أعضاء حسية جرسية
الشكل)

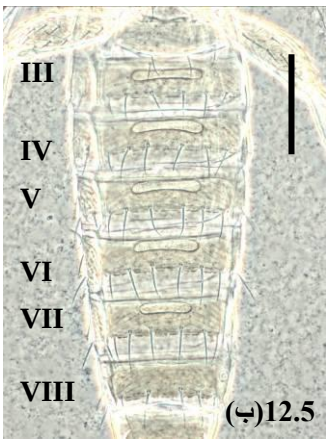


11.5 (ب)

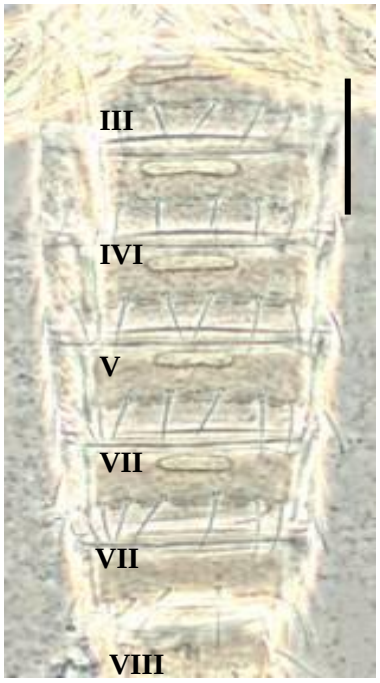
شكل 11.5 (أ)، (ب): الصفيحة الظهرية/الترجة البطنية التاسعة (ظهرياً)، زوجان من أعضاء الحس جرسية الشكل (شريط القياس: 30 ميكرون)



(أ) 12.5



(ب)12.5



.(جـ) 12.5

شكل 12.5(أ)-(جـ): المناطق الغدية للذكر (مبدية تنوعات) **(أ)** الصفيحة البطنية/الإسترنة الخامسة؛ **(ب)-(جـ)** الصفائح البطنية/الإسترنات الثالثة إلى الثامنة، بالمجهر متباين الأطوار (شريط القياس: 100 ميكرون)

2.4 الاختبارات الجزيئية لتحديد هوية حشرة *Thrips palmi*

تم نشر أربعة اختبارات جزيئية يمكن استخدامها لدعم التحديد الشكلي/المورفولوجي لـ *Thrips palmi* ، وهذه الاختبارات موصوفة أدناه. كما يتم أيضاً وصف تخصصية كل اختبار. وهذا يشير إلى أنواع آفة التربس التي تم تقويم كل اختبار على أساسها والاستخدام الأصلي الذي صُمّم الاختبار من أجله. ويتاح أيضاً نظام لتحديد الهوية على قرص مدمج يتضمن بيانات جزيئية لعدد من أنواع التربس (Moritz *et al.*، 2004). وبمراعاة التحديدات النوعية للطرائق الجزيئية فإن النتيجة السلبية لاختبار جزيئي لا تستبعد إمكانية تحديد إيجابي للهوية بالطرائق الشكلية/المورفولوجية

يتم في هذا البروتوكول التشخيصي، وصف الطرائق (بما في ذلك الإشارة إلى الأسماء التجارية) كما نشرت، حيث أنها تحدد المستوى الأصلي للحساسية، الخصوصية و/أو إمكانية االإعادة الذي تم تحقيقه.

متطلبات للشواهد

يعد استخدام الشواهد الملائمة أساسياً لجميع الطرائق الجزيئية؛ ويجب إدراج المستخلص الإيجابي لـ *T. palmi* كعينة إضافية لضمان نجاح التضخيم. ويجب أيضا إجراء تضخيم بوساطة تفاعل البوليميريز المتسلسل PCR إما في الوقت الحقيقي، أو لتفاعل إنزيم البوليميريز المكسر والمكبر (PCR-RFLP)، على عينة بدون DNA (بالماء). ويشير هذا الشاهد السلبي إلى احتمال تلوّث مادة التفاعل والخروج بنتائج إيجابية زائفة.

استخلاص حمض DNA

يمكن استخلاص الـ DNA من بيضة واحدة، حشرة بالغة، عذراء/خادرة أو يرقة. ويتعيّن العزو إلى المقالة المرجعية المتعلقة بالتقنية الأصلية المحددة المستخدمة في استخلاص الـDNA. وقد تجد المختبرات أن تقنيات الاستخلاص البديلة تعمل بالجودة ذاتها؛ ويمكن استخلاص الـ DNA باستخدام أيٍ من طرائق الاستخلاص الملائمة للحشرات. وعلى سبيل المثال:

- ـ يمكن طحن حشرات التربس في محلول حلّ منظم في أنبوبة دقيقة باستخدام هاون دقيق، وتؤخذ الجُناسة homogenate من خلال طقم/"كت" استخلاص DNA قائم على البروتيناز K طبقاً للتعليمات الملائمة المحددة من الجهة الصانعة.
- ـ وكبديل لذلك، يمكن طحن حشرات التربس في 50 ميكرولتراً من الماء الخالي من النوكلييز قبل إضافة 50 ميكرولتراً من ملاط من الـ Chelex 100 بنسبة 1 إلى 1، وماء خال من النوكلييز، ثم يسخن عند درجة حرارة 95º سلزيوس لمدة خمس دقائق ويخضع للطرد المركزي على 11000 دورة لمدة خمس دقائق. وتنقل الطفاوة إلى أنبوبة دقيقة جديدة ويتم تخزينها عند درجة حرارة 20º سلزيوس تحت الصفر.

وقد وصفت عديد من البحوث الحديثة تقنيات غير مدمرة لاستخلاص الـDNA من حشرات التربس، تمتلك مزية أنها تتيح الحصول على عينة صافية لوضعها على الشرائح بعد الانتهاء من استخلاص الـ DNA (مثلا Rugman-Jones *et al*., 2006; Mound and Morris, 2007).

1.2.4 اختبار منطقة التكبير متخصصة التسلسل (SCAR) لحشرة *Thrips palmi* بالارتكاز على تفاعل البوليميريز المتسلسل في الوقت الحقيقي(real-time PCR)

صمم الاختبار الذي أجراه Walsh *et al*. (2005) كاختبار خاص لتربس البطيخ كي تستخدمه سلطات الصحة النباتية في إنجلترا وويلز. وتم تقويمه عن طريق غربلته إزاء 21 نوعا آخر من أفراد رتبة هدبيات الأجنحة (Thysanoptera)، من بينها عشرة أنواع تنتمي إلـى جنس *Thrips* هي: *T. flavus*, *T. major* Uzel, *T. minutissimus* L., *T. nigropilosus*, *T. sambuci* (*T. physapus* L.), *T. tabaci*, *T. trehernei* Priesner, *T. urticae*, *T. validus* Uzel, *T. vulgatissimus* Heeger (Haliday). وهذه الأنواع كانت أوروبية في معظمها ولكن ليس بصورة حصرية.

المنهجية

بادئات PCR الخاصة بآفة تربس البطيخ ومسبار TaqMan المستخدمة في هذا الاختبار هي على النحو التالي:

بادئة PCR: P4E8-362F (5′-CCGACAAAATCGGTCTCATGA-3′)

بادئة PCR: P4E8-439R (5′-GAAAAGTCTCAGGTACAACCCAGTTC-3′)

مسبار TaqMan: P4E8-385T (FAM 5′-AGACGGATTGACTTAGACGGGAACGGTT-3′ TAMRA)

وتم إنشاء تفاعلات PCR في الوقت الحقيقي باستخدام طقم/ "كت" PCR TaqMan لمواد التفاعل الأساسية (النظم البيولوجية التطبيقية)[1] مع 1 ميكرولتر (10 - 20 نانو غراما) من مستخلص الـ DNA، و 7.5 وحدة من كل بادئة، و 2.5 بيكومول من المسبار في حجم كلي يبلغ 25 ميكرولترا. وتم تدوير الألواح في ظروف النظام العادية (10 دقائق بدرجة حرارة 95º سلزيوس و 40 دورة لمدة دقيقة واحدة بدرجة 60º سلزيوس، و 15 ثانية بدرجة حرارة 95º سلزيوس) سواء على ABI Prism 7700 أو ABI (7900HT) لنظم كشف التتابع (النظم البيولوجية التطبيقية)[2]، باستخدام جمع البيانات في الوقت الحقيقي. وتدل القيم المؤكدة (Ct) التي تقل عن 40 على وجود حمض الـ DNA الخاص بتربس البطيخ.

2.2.4 اختبار تتابع الوحدة الفرعية لسيتوكروم أوكسيداز (COI) بالارتكاز على تفاعل البوليميريز المتسلسل (PCR) في الوقت الحقيقي

صمم اختبار Kox *et al.* (2005) هذا كاختبار خاص بنوع *T. pami* لكي تستخدمه سلطات الصحة النباتية في هولندا. وتم تقويمه بغربلته إزاء 23 نوعا آخر من التربس، من بينها 11 نوعا ينتمي إلى جنس *Thrips* هي: *T. alliorum* (Priesner), *T. alni*, *T. angusticeps* Uzel, *T. fuscipennis* Haliday, *T. latiareus* Vierbergen, *T. major*, *T. minutissimus*, *T. parvispinus* (Karny), *T. tabaci*, *T. urticae*, *T. vulgatissimus*. وهذه الأنواع أوروبية في أغلبها ولكن ليس بصورة حصرية.

المنهجية

بادئات PCR الخاصة بتربس البطيخ ومسبار TaqMan المستخدمة في هذا الاختبار هي على النحو التالي:

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

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

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

* تم تعديل البادئات لتحقيق المزيد من الحساسية منذ نشرها لأول مرة

(تم إيداع تتابعات الوحدة الفرعية لسيتوكروم أوكسيداز (COI) التي لا تتطابق مع مسبار TaqMan في هذا الاختبار لدى بنك المورثات (GenBank) من عدد من العينات المأخوذة من الهند والتي تم تحديد هويتها على أنها تربس البطيخ على أساس صفاتها المورفولوجية (Asokan et al., 2007). ولن تحقّق هذه التتابعات نتيجة إيجابية باستخدام هذا الاختبار. وما زالت الأهمية التصنيفية أو النشوئية التطورية لتمييز هذا التتابع غير واضحة حالياً.)

ويكون خليط التفاعل البالغ 25 ميكرولترا من: 12.5 ميكرولتر من x2 خليط من Taqman Universal master (النظم البيولوجية التطبيقية)[3]، و 0.9 ميكرو مول لكل بادئة، و 0.1 ميكرو مول لمسبار TaqMan، و 1 ميكروليتر DNA. وأجرى تفاعل البوليميريز التسلسلي في الوقت الحقيقي على أي من ABI Prism 7700 أو نظم الكشف المتتابع ABI 7900HT (النظم البيولوجية التطبيقية)[4] باستخدام الظروف التالية: عشر دقائق عند درجة حرارة 94º سلزيوس؛ ثم 40 دورة في دقيقة واحدة و15 ثانية عند درجة حرارة 60º سلزيوس، و 15 ثانية بدرجة حرارة 94º سلزيوس. وتدل القيم المؤكدة Ct التي تقل عن 40 إلى وجود الـ DNA الخاص بتربس البطيخ.

3.2.4 اختبار تتابع مباعد النسخ الداخلي 2 (ITS2) لتسعة أنواع من حشرات التربس من بينها حشرة *Thrips palmi* بالارتكاز على تفاعل البوليميريز المكسر والمكبر

صمم (Toda and Komazaki)، 2002 هذا الاختبار لعزل تسعة أنواع من حشرات التربس ، من بينها *Thrips palmi* ، الذي يوجد على أشجار الفاكهة في اليابان وهي: *Frankliniella occidentalis* (Pergande), *F. intonsa* (Trybom), *T. hawaiiensis* Morgan, *T. coloratus* Schmutz, *T. flavus*, *T. tabaci*, *T. palmi*, *T. setosus* Moulton, *Scirtothrips dorsalis* Hood.

[1، 2] إن استخدام النظم البيولوجية التطبيقية التجارية لطقم TaqMan PCR لمواد التفاعل الأساسية ونظام ABI Prism 7700 أو ABI 7900HT لكشف التتابع في هذا البروتوكول التشخيصي لا يعني الموافقة عليها مع استبعاد النظم الأخرى التي قد تكون مناسبة. والمعلومات مقدمة هنا تيسيراً على مستخدمي هذا البروتوكول ولا تشكل مصادقة من هيئة تدابير الصحة النباتية على المواد الكيميائية، و/أو العوامل، و/أو المعدات. ويمكن استخدام منتجات مكافئة إذا ما تم إثبات أنها تؤدي إلى النتائج ذاتها.

[3،4] إن استخدام النظم البيولوجية التطبيقية التجارية لخليط TaqMan Universal Master ونظام ABI Prism 7700 أو ABI 7900HT لكشف التتابع في هذا البروتوكول التشخيصي لا يعني الموافقة عليها مع استبعاد النظم الأخرى التي قد تكون مناسبة أيضا. والمعلومات مقدمة هنا تيسيراً على مستخدمي هذا البروتوكول ولا تشكل مصادقة من هيئة تدابير الصحة النباتية على المواد الكيميائية، و/أو العوامل، و/أو المعدات. ويمكن استخدام منتجات مكافئة إذا ما تم إثبات أنها تؤدي إلى النتائج ذاتها.

المنهجية

بادئات PCR (الموجودة في المنطقتين S 5.8 و S 28 على جانبي منطقة ITS2 من الـ DNA الريبوزومي) المستخدمة في هذا الاختبار على النحو التالي:

5′-TGTGAACTGCAGGACACATGA-3′

5′-GGTAATCTCACCTGAACTGAGGTC-3′.

ولِّد تربس البطيخ ناتج PCR حجمه 588 .زوجاً قاعدياً (أُنتجت قطع أطول أو أقصر من أنواع أخرى). وتكوّن خليط التفاعل البالغ 20 ميكرولتر من العناصر التالية: 1 ميكرو مول لكل بادئة، و 250 ميكرو مول (Promega) dNTPs، ووحدة واحدة من إنزيم بلمرة الـ DNA، AmpliTaq Gold (النظم البيولوجية التطبيقية)[5]، و 2 ميكرولتر 10x منظم التفاعل [مع $MgCl_2$ 25 mM] و 0.5 ميكرولتر من الـ DNA. وأجرى تفاعل PCR في جهاز تدوير حراري من نوع 9600 DNA (النظم البيولوجية التطبيقية)[6] بالشروط التالية: 9 دقائق عند درجة حرارة 95º سلزيوس، و 35 دورة في دقيقة واحدة عند درجة حرارة 94 º سلزيوس ، و 30 ثانية عند درجة حرارة 50º سلزيوس ، ودقيقة واحدة عند درجة حرارة 72º سلزيوس ، أعقبها تمديد نهائي لمدة سبع دقائق عند درجة حرارة 72º سلزيوس وتم تبريدها بسرعة إلى درجة حرارة الغرفة. وتم تحليل نواتج PCR بواسطة الرحلان الكهربائي لهلام الأجاروز.

وتم هضم 5 ميكرولترات من نواتج PCR (بدون تنقية) بانزيم RsaI طبقا لتعليمات الجهة الصانعة. وتم فصل نواتج PCR الممتصة بواسطة الرحلان الكهربائي لهلام الأجاروز.

وأحجام القطع المقيدة التي تنتجها T. palmi عند هضم قطع ITS2 مع إنزيم RsaI كانت على النحو التالي: 371، 98، 61 و 58 زوج قاعدي.

4.2.4 اختبار تتابع الوحدة الفرعية لأوكسيداز السيتوكروم (COI) لعشرة أنواع من حشرات التربس من بينها *Thrips palmi*

صمّم Brunner *et al.* (2002) هذا الاختبار لعزل عشرة أنواع من التربس، من بينها تربس البطيخ، وأغلبها من أنواع الآفات التي توجد في أوروبا، ولكن ليس بصورة حصرية وهي: *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*.

المنهجية

بادئات PCR (الموجودة في تتابع مورث (COI) في المصورات الحيوية) المستخدمة في هذا الاختبار هي على النحو التالي:

mtD-7.2F (5′-ATTAGGAGCHCCHGAYATAGCATT-3′)
mtD9.2R (5′-CAGGCAAGATTAAAATATAAACTTCTG-3′).

وتقوم هذه البادئات بتضخيم قطعة حجمها 433 زوجاً قاعدياً في جميع الأنواع التي تم عزلها بواسطة هذا الاختبار. ويتكون خليط التفاعل البالغ 50 ميكرولتراً من العناصر التالية: 0.76 ميكرو مول لكل بادئة، و 200 ميكرو مول dNTPs ، ووحدة واحدة من البوليميريز تاكDNA و5 ميكرولترات X10 من منظم التفاعل [مع 15 ميللي مول $MgCl_2$] و 1 ميكرولتر من الـ DNA. وأجري تفاعل PCR في جهاز تدوير حراري قياسي بالشروط التالية: دقيقة واحدة بدرجة حرارة 94º سلزيوس، 40 دورة في 15 ثانية بدرجة حرارة 94º سلزيوس ، 30 ثانية بدرجة حرارة 55º سلزيوس، و 45 ثانية بدرجة حرارة 72º سلزيوس، أعقبها تمديد نهائي لمدة عشر دقائق عند درجة حرارة 72º سلزيوس وتم تبريدها بسرعة عند درجة حرارة الغرفة. ولقياس حجم القطع بعد التضخيم، تم تحليل 5 ميكرولترات من نواتج PCR بواسطة الرحلان الكهربائي لهلام الأجاروز.
وتم هضم 5 ميكرولترات من نواتج PCR (بدون تنقية) مع إنزيم *AluI* وإنزيم *Sau*3AI في تفاعلات منفصلة وفقا لتعليمات الجهة الصانعة. وتم تحليل نواتج PCR بواسطة الرحلان الكهربائي لهلام الأجاروز.

[6,5] إن استخدام النظم البيولوجية التطبيقية التجارية لإنزيم بلمرة حمض DNA، AmpliTaq Gold، ونظام ABI Prism 7700 أو ABI 7900HT لكشف التتابع في هذا البروتوكول التشخيصي لا يعني الموافقة عليها مع استبعاد النظم الأخرى التي قد تكون مناسبة. والمعلومات مقدمة هنا تيسيراً على مستخدمي هذا البروتوكول ولا تشكل مصادقة من هيئة تدابير الصحة النباتية على المواد الكيميائية، و/أو العوامل، و/أو المعدات. ويمكن استخدام منتجات مكافئة إذا ما تم إثبات أنها تؤدي إلى النتائج ذاتها.

وأحجام القطع المقيدة التي تنتجها آفة تربس البطيخ عند هضم قطع COI مع إنزيم *Alu*I وإنزيم *Sau*3AI هي على النحو التالي:

إنزيم *Alu*I: 291 و 194 كتلة زوجاً قاعدياً
إنزيم *Sau*3AI: 293، 104، 70 و 18 زوجاً قاعدياً

5. السجلات

ينبغي الاحتفاظ بالسجلات والقرائن حسب ما هو مبين في القسم 2–5 من المعيار رقم 27: 2006

وفي الحالات التي يمكن أن تتأثر فيها أطراف متعاقدة أخرى بنتائج التشخيص، يتعيّن الاحتفاظ بالسجلات والقرائن (وبخاصة العينات المحفوظة أو الموضوعة على شرائح، وصور البنيات التصنيفية المميزة، ومستخلصات الـ DNA وصور الهلام، حسب المناسب) لمدة عام على الأقل.

6. نقاط الاتصال للحصول على معلومات إضافية

Entomology Section, Department of Diagnostics, 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, Central Science Laboratory, Sand Hutton, York YO41 1LZ, United Kingdom. Telephone: +44 1904 462215; e-mail: dom.collins@csl.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. الاعتراف والشكر

كتب المسودة الأولى لهذا البروتوكول **D.W. Collins** من فريق تحديد الآفات والأمراض، مختبر العلوم المركزي: Sand Hutton, York, YO41 1LZ, United Kingdom; G. Vierbergen, Dr. L.F.F. Kox, Section of Entomology, Wageningen, Netherlands; and Ing. Agr. N.C. Vaccaro, Sección Entomología, INTA-EEA Concordia, Argentina. وأعد S. Kobro الرسوم التوضيحية في الشكل 5: Norwegian Crop Protection Institute, Norway.

8. المراجع

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., Zjilstra 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, ina 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.

تاريخ النشر

نيسان/ابريل 2006 أضافت الدورة الأولى لهيئة لتدابير الصحة النباتية موضوعاً بروتوكول تشخيصي لـ Thrips palmi (2006–038)

تشرين الأول/نوفمبر–2006 طور الفريق الفني المعني ببروتوكولات التشخيص مشروع النص

مايو/أيار–2007 اعتمدت لجنة المعايير نص المشروع لمشورة البلدان

حزيران/يونية–2007 أرسل إلى مشورة البلدان في إطار عملية المسار السريع

تشرين أول/أكتوبر–2007 راجعت اللجنة السباعية للمعايير نص المشروع

تشرين الثاني/نوفمبر–2011 طلبت لجنة المعايير من الفريق الفني المعني ببروتوكولات التشخيص المراجعة

تشرين الثاني/نوفمبر–2008 لاحظت لجنة المعايير مشروع النص في ظل مراجعة الفريق الفني المعني ببروتوكولات التشخيص

أيار/مايو–2009 أعادت لجنة المعايير نص المشروع إلى الفريق الفني المعني ببروتوكولات التشخيص

تشرين الثاني/نوفمبر–2009 اعتمدت لجنة المعايير النص المعدل لمشورة البلدان

كانون أول/2009 أرسل لمشورة البلدان وفق عملية المسار السريع

كانون أول/ديسمبر–2009 نص المشروع المعدل للاعتماد بوساطة قرار بالبريد الإلكتروني

آذار/مارس–2010 اعتمدت الدورة الخامسة للهيئة المؤقتة لتدابير الصحة النباتية الملحق 1 للمعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية 27

المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية 27: الملحق 1 (2010) Thrips palmi Karny

تاريخ النشر: عدّل آخر مرة في آب/أغسطس 2011