اعتمدت لجنة المعايير بالنيابة عن هيئة تدابير الصحة النباتية بروتوكول التشخيص هذا في أغسطس/آب 2016.
هذا الملحق جزء مُلزم من المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية رقم 27.

المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية رقم 27
بروتوكولات تشخيص الآفات الخاضعة للوائح

بروتوكول التشخيص 16: نقابّات الورق (جنس ليريوميزا) (Genus *Liriomyza*)

اعتُمد في 2016؛ نُشر عام 2018

بيان المحتويات

1- معلومات عن الآفة 3
2- المعلومات التصنيفية 5
3- الكشف 6
3-1 جمع العيّنات وحفظها 7
3-1-1 جمع الذُّباب البالغ 8
3-1-2 جمع الآفات في مراحل النمو غير المكتمل 8
4- تحديد الهوية 9
4-1 تحديد هوية نقابة الورق (ليريوميزا) *Liriomyza* البالغة استناداً إلى الخصائص المورفولوجية 9
4-1-1 تحضير الأعضاء التناسلية للذكر البالغ لآفة ليريوميزا *Liriomyza* للفحص المجهري 9
4-1-1-1 تحديد جنس الذباب 9
4-1-2 تحديد هوية فصيلة ذبابات الورق *Agromyzidae* 11
4-1-3 تحديد جنس ليريوميزا *Liriomyza* 12
4-1-4 تحديد هوية أنواع ليريوميزا *Liriomyza* 13
4-1-4-1 الخصائص المورفولوجية لذباب ليريوميزا *Liriomyza* spp البالغ 13
4-1-4-2 بنية الجزء الطرفي من قضيب الذكر البالغ لذباب ليريوميزا *Lyriomiza* 16
4-1-4-3 الخصائص المورفولوجية لأنواع ليريوميزا *Liriomyza* الأربعة المستهدفة في مراحل ما قبل النضج 18
4-2 تحديد هوية أنواع ليريوميزا Lyriomiza بالاستناد إلى الاختبارات الجزيئية 19
4-2-1 شواهد الاختبارات الجزيئية 19
4-2-2 استخلاص الحمض النووي 20
4-2-3 تحديد هوية الأنواع الأربعة المستهدفة بواسطة التفاعل المتسلسل للبوليميراز - تعدد أشكال طول الشظايا المحَدِّدة 20
4-2-4 بوادئ التفاعل المتسلسل للبوليميراز المرتبطة بالأنواع لتحديد الأنواع الأربعة المستهدفة 22
4-2-5 تمييز النوعين المموهين ل. لانجاي *L. langei* ول. هويدوبرنسيس *L. huidobrensis* 24
4-2-5-1 التفاعل المتسلسل للبوليميراز - تعدد أشكال طول الشظايا المحَدِّدة 24
4-2-5-2 مقارنة تسلسل الحمض النووي 25
4-2-6 التشفير الشريطي للحمض النووي 26

5- السجلاّت.....26
6- جهات الاتصال للحصول على معلومات إضافية.....26
7- شكر وتقدير.....27
8- المراجع.....27
9- الأشكال 31

1- معلومات عن الآفة

تتكوّن فصيلة ذبابات الورق (أغروميزيدا) Agromyzidae من ذبابات صغيرة تتغذى يرقاتها بالأنسجة الداخلية للنبات، وتكون في غالب الأحيان نقابّاتٍ للورق أو نقابات للسيقان. وتكون غالبية أنواع ذبابات الورق إما متخصصة في عوائل معينة وإما مقتصرة على مجموعة صغيرة من النباتات المرتبطة الواحدة بالأخرى. إلا أن بعض أنواعها التي تتميز بارتفاع عدد عوائلها قد تحولت إلى آفات زراعية وبستانية في العديد من أنحاء العالم؛ وتتضمن هذه الأخيرة أربعة أنواع من آفة ليريوميزا (*Liriomyza*) نقّابات الورق الواردة في لوائح الحجر الزراعي لدى بلدان مختلفة، وهي: ليريوميزا بريونيا *L. bryoniae*، وليريوميزا هويدوبرنسيس *L. huidobrensis*، وليريوميزا ساتيفا *L. sativae* وليريوميزا تريفوليي *L. trifolii*. وهي كلها آفات متعددة العوائل تقتات بمحاصيل الزينة والخضروات. أما عملية تحديد هوية الآفة على مستوى الأنواع في هذا البروتوكول فتقتصر على هذه الأنواع الأربعة.

توجد نقّابات الورق (ليريوميزا) *Liriomyza* أساساً في المنطقة المعتدلة الشمالية، إلا أنّ أنواعاً منها قد ظهرت أيضاً في المناطق المحجرية الإفريقية، والمناطق المحجرية الجديدة والمناطق الشرقية. وذبابات الأنواع الـ 300 من نقّابات الورق (ليريوميزا) *Liriomyza* على قدر كبير من التشابه: فجميعها صغير الحجم (يتراوح طولها بين 1 و3 مليمترات) وتبدو سوداء عامة حين ينظر إليها من فوق، مع وجود جبهة وقصيعة صفراوين في معظم الأنواع، (مثال على ذلك الشكل 1). ولهذا السبب قد يكون من الصعب الفصل بين أنواع هذا الجنس. فضلاً عن ذلك، من أجل تحديد الأنواع الأربعة المشمولة بلوائح الحجر الزراعي، يتعيّن على المشخّص ألاّ يكتفي بالتمييز بين هذه الأنواع الأربعة، إذ ينبغي تمييزها كذلك عن الحيوانات الأساسية ذات الصلة بالأنواع الأصلية لنقّابات الورق (ليريوميزا) *Liriomyza*.

نقّابة ورق القرع (ل. بريونيا) *L. bryoniae* في الأساس من الأنواع المنتشرة في المنطقة القطبية الشمالية، وأفيد عن ظهورها في جميع أنحاء أوروبا وآسيا، وفي مصر والمغرب في شمال أفريقيا (CABI، 2013). يتميز هذا النوع بالعدد المرتفع جداً لعوائله إذ قد سجلت إصابته لأكثر من 16 نوعاً من النبات (Spencer، 1990). وهي من الآفات التي تصيب الطماطم والقرعيات (لاسيما الشمام والبطيخ والخيار) والخس المزروع في البيوت الزجاجية والفاصوليا ونباتات الترمس (Spencer، 1989، 1990).

ويُعتقد أن تكون ذبابة العروق (ل. هويدوبرنسيس) *L. huidobrensis* قد نشأت في أمريكا الجنوبية وهي اليوم منتشرة في أنحاء كثيرة من العالم، بما في ذلك بعض المناطق من أمريكا الشمالية وأوروبا وأفريقيا وآسيا والمحيط الهادئ (Lonsdale، 2011؛ CABI، 2013). غير أنّ الأنواع التي كان تمّ تحديدها تصنيفياً في السابق قد قُسّمت مؤخراً إلى نوعين يتسمان بمظهر مموه وهما: ذبابة العروق (ل. هويدوبرنسيس) *L. huidobrensis* وذبابة ورق بازلاء كاليفورنيا (ل. لانجاي) *L. langei* - أما توزيعهما النسبي المحدد فغير أكيد. ففي الوقت الراهن، لم يُؤكّد وجود ذبابة ورق بازلاء كاليفورنيا (ل. لانجاي) *L. langei* إلا من جانب الولايات المتحدة، ومن المرجح جداً أن تكون جميع الأعداد الغازية الموجودة خارج الولايات المتحدة من نوع ذبابة العروق (ل. هويدوبرنسيس) *L. huidobrensis* بحسب ما هي معرّفة الآن تصنيفياً (Scheffer و Lewis، 2001؛ Scheffer وآخرون، 2001؛ Takano وآخرون، 2008؛ Lonsdale، 2011). وتعدّ ذبابة العروق (ل.

هويدوبرنسيس) *L. huidobrensis* من الأنواع متعددة العوائل، إذ سجلت إصابتها لـ 14 نوعاً من النبات (Spencer، 1990). أما المحاصيل الأكثر أهمية اقتصادياً التي تهاجمها هذه الآفة فهي شمندر السكر والسبانخ والبازلاء والفول والبطاطس ونباتات الزينة (من أكثرها شيوعاً نبتة الجصية (جيبسوفيلا) *Gypsophila*، وفي حالات نادرة، القرنفل والأقحوان) (Spencer، 1989).

نشأت ذبابة ورق الخضروات (ل. ساتيفاي) *L. sativae* في أمريكا الشمالية وأمريكا الوسطى والجنوبية، وأصبحت اليوم منتشرة في أنحاء كثيرة من آسيا وأفريقيا وبلدان المحيط الهادئ، لكنها لم تبلغ أوروبا أو أستراليا (Lonsdale، 2011؛ CABI، 2013). ولكن يحتمل أن تكون المعلومات المتعلّقة بتوزيع ذبابة ورق الخضروات (ل. ساتيفاي) *L. Sativa* غير مكتملة إذ إن هناك أدلة تشير إلى أن هذا النوع يواصل توسيع نطاقه بسرعة. وهي أيضاً من الآفات الأخرى التي تتميز بالعدد المرتفع لعوائلها وهي تهاجم العديد من محاصيل الخضر والأزهار (Spencer، 1973، 1990). وقد تم تسجيل إصابتها لتسعة أنواع من النبات وإن كانت توجد أساساً في عوائل من فصيلة القرعيات والبقوليات والباذنجانيات (Spencer، 1973، 1990).

نشأت ذبابة ورق النفل (ل. تريفوليي) *L. trifolii*، أيضاً في أمريكا الشمالية وأمريكا الوسطى والجنوبية وقد انتشرت من ثم في أنحاء كثيرة من أوروبا وأفريقيا وآسيا والمحيط الهادئ، على الأرجح نتيجة التجارة بعقلات الأقحوان (Martinez وEtienne، 2002؛ Lonsdale، 2011، CABI، 2013). وهي من الأنواع التي تتميز بالارتفاع الملحوظ لعدد عوائلها إذ سُجّلت إصابتها لأكثر من 25 نوعاً من النبات (Spencer، 1990). أما أكثر المحاصيل التي تهاجمها أهميةً من الناحية الاقتصادية فهي الفاصوليا والكرفس والأقحوان والخيار ونباتات الجربارة gerberas، والجصية والخس والبصل والبطاطس والطماطم (Spencer، 1989).

وهناك نوع آخر (نوع خامس) اسمه (ل. ستريغاتا) *L. strigata*، من بين الأنواع الواردة ضمن بروتوكول التشخيص لارتباطه الوثيق بنوعي *L. bryoniae* و*L. huidobrensis*، ما يجعله من الأنواع التي على المشخص استبعادها لدى السعي إلى التحديد الإيجابي للأنواع الأربعة المشمولة بلوائح الحجر الزراعي. وتعدّ آفة (ل. ستريغاتا) *L. strigata* من الأنواع الأوراسية (Pitkin وآخرون (بدون تاريخ) نقلاً عن Spencer (1976)، وDempewolf (2001)، وEllis (2013)، وPape وآخرون 2013). ولا تُعرف الحدود الشرقية لتوزيعها بشكل واضح، لكن نطاقها يمتد إلى ما بعد جبال الأورال (Spencer، 1976) وثمة إفادات مشكوك فيها عن ظهورها في جنوب شرق آسيا (Dempewolf، 2004). وهي تتميز بالارتفاع الملحوظ لعدد عوائلها إذ سجلت إصابتها لـ 29 نوعاً من النبات حول العالم (Spencer، 1990).

2- المعلومات التصنيفية

الاسم: ليريوميزا (*Liriomyza*)، Mik، 1894

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

الوضع التصنيفي: حشرة، من ذوات الجناحين (Diptera)، ذبابة ورق Agromyzidae، Phytomyzinae

الاسم: ليريوميزا بريونيا *Liriomyza bryoniae* (Kaltenbach، 1858)

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

الاسم الشائع: نقّابة ورق الطماطم (Tomato leafminer)

الاسم: *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard ، 1926)

المرادفات: *Liriomyza cucumifoliae*، Blanchard، 1938؛ *Liriomyza decora*، Blanchard، 1954؛ *Liriomyza dianthi*، Frick، 1958

تتسم العلاقة التصنيفية بين ذبابة العروق (ل. هويدوبرنسيس) *L. huidobrensis* (Blanchard) وذبابة ورق بازلاء كاليفورنيا (ل. لانجاي) *L. langei* (Frick) بتعقيدها. فقد وصف Blanchard (1926) ذبابة العروق (ل. هويدوبرنسيس) *L. huidobrensis* في الأصل انطلاقاً من عينات مأخوذة من نبتة الرمادية *Cineraria* في الأرجنتين. ووصف Frick (1951) ذبابة ورق بازلاء كاليفورنيا (ل. لانجاي) *L. langei* الموجودة في ولاية كاليفورنيا الأمريكية كنوع لاحظ أنه يصيب البازلاء في المقام الأول على الرغم من أنه قد أضرّ كذلك بنبات النجمية *Aster*. ومن ثمّ في عام 1973، اعتبر Spencer النوعين كمرادفين لتعذر التمييز بينهما على المستوى المورفولوجي (ولا تزال هذه الحالة قائمة حكماً). وبعد دراسة أُجريت حول سلاسل الحمض النووي والحمض النووي المتقدّري (Scheffer، 2000؛ Scheffer وLewis، 2001)، وبدعم من تجارب التربية التي أُجريت عليهما لاحقاً (Takano وآخرون، 2008)، تم فصل النوعين رسمياً بوصفهما نوعين اثنين من الأنواع المموهة (Lonsdale، 2011). ثمّ استُعيد اسم ل. لانجاي *L. langei* (Frick) وأُطلق على الأنواع المموهة من ولاية كاليفورنيا، فيما أطلق اسم ل. هويدوبرنسيس *L. huidobrensis* (Blanchard) على الأنواع المموهة من الأمريكتين الجنوبية والوسطى.

حاول Lonsdale (2011) تحديد الصفات المورفولوجية التشخيصية التي يمكن بواسطتها تمييز "معظم" العيّنات التي تعود لهذين النوعين، لكنه وجد أن سماتها "دقيقة جداً ومتداخلة أحياناً" فأوصى باستخدام بيانات جزيئية لدعم تحديد هويتها كلما أمكن ذلك. وتعتبر Scheffer والمتعاونون معها أن نطاقي النوعين لا يتداخلان (وإن كان Lonsdale (2011) قد سجل ظهور ل. هويدوبرنسيس *L. huidobrensis* في ولاية كاليفورنيا، مرّةً في عام 1968 ومرةً أخرى في عام 2008، وأفاد بأنه لا يُعرف ما إذا كانت تلك الأعداد مستقرّة في المكان)، وأن جميع الأنواع الغازية التي سبق أن درسوها كانت تنتمي إلى مجموعة ل. هويدوبرنسيس *L. huidobrensis* بحكم تعريفها (Scheffer وLewis، 2001؛ Scheffer وآخرون، 2001). وهذا يعني أنه ينبغي بالتأكيد اعتبار التقارير الواردة من

ولاية كاليفورنيا في المؤلفات التي سبقت أعمال Scheffer على أنها تنطبق على آفة ل. لانجاي *L. langei* وتعتبر هذه الأخيرة نوعاً مهيمناً في كاليفورنيا مع أنها أُدخلت إلى ولايات هاواي وأوريغون وواشنطن على ما يبدو؛ أما الأعداد التي كانت موجودة في ولايات فلوريدا ويوتاه وفيرجينيا في منتصف التسعينات فلم تستقرّ فيها (Lonsdale، 2011). ولم يؤكّد غير وجود ل. هويدوبرنسيس *L. huidobrensis* في المكسيك (Lonsdale، 2011)، لكن Takano وآخرون (2005) أفادوا أن عينات من ل. لانجاي *L. langei* (الموصوفة على أنها الفرع الحيوي الكاليفورني) قد عثر عليها في موقع تفتيش ياباني على الخضروات الطازجة القادمة من المكسيك.

الأسماء الشائعة:	Serpentine leafminer, pea leafminer, South American leafminer, potato leafminer fly
الاسم:	*Liriomyza sativae* Blanchard, 1938
المرادفات:	*Agromyza subpusilla* Frost, 1943; *Liriomyza verbenicola* Hering, 1951; *Liriomyza pullata* Frick, 1952; *Liriomyza canomarginis* Frick, 1952; *Liriomyza minutiseta* Frick, 1952; *Liriomyza propepusilla* Frost, 1954; *Liriomyza munda* Frick, 1957; *Liriomyza guytona* Freeman, 1958; *Lemurimyza lycopersicae* Pla and de la Cruz, 1981.
الأسماء الشائعة:	Vegetable leafminer، American leafminer، chrysanthemum leafminer، serpentine melon leafminer، vegetable leafminer
الاسم:	*Liriomyza trifolii* (Burgess, 1880)
المرادفات:	*Agromyza phaseolunulata* Frost, 1943; *Liriomyza alliovora* Frick, 1955
الأسماء الشائعة:	American serpentine leafminer, serpentine leaf miner, broad bean leafminer, Californian leafminer, celery leafminer, chrysanthemum leaf miner

3- الكشف

تشكّل ثقوب التغذية والأنفاق الموجودة في الأوراق عادة العلامات الأولى والأكثر وضوحاً الدالّة على وجود نقّابة الورق (ليريوميزا) *Liriomyza*. وفيما أن تلك الأنفاق تكون مرئية بسهولة للمسؤولين عن الحجر الزراعي، فالمؤشرات المبكرة إلى الإصابة تكون أقل وضوحاً بدرجة كبيرة، ويمكن السهو عنها بسهولة (Spencer، 1989). تبقى تلك الأنفاق على حالها وبدون أي تغيير على مدى أسابيع من الزمن. وغالباً ما يعتبر شكل هذه الأنفاق دليلاً موثوقاً على تحديد هوية أنواع ذباب الورق agromyzid (في الكثير من هذه الحالات تقتصر هذه الأنواع على عوائل محددة). ولكن، في حال الأنواع متعددة العوائل يتأثر شكل الأنفاق بالعائل وبالوضع المادي والفيزيولوجي لكل ورقة، وبعدد اليرقات التي تنقّب أنفاقاً في الورقة نفسها. ويعني هذا التنوّع الأكبر أنه ينبغي تناول تحديد الهوية القائم على شكل الأنفاق وحده بحذر (EPPO، 2005). وترد أمثلة على شكل الأنفاق الخاصة بالأنواع الأربعة المشمولة بالحجر الزراعي وبنوع ل. ستريغاتا *L. strigata* في الأشكال من 2 إلى 4.

تستخدم أنثى الذباب مسرأها (أو جهازها لحمل البيض) من أجل إحداث ثقب في أوراق النباتات العائلة، فتتسبب بجروح تُستخدَم كمواقع للتغذية (لكل من الذباب الإناث والذكور) أو لوضع البيض. وتكون ثقوب تغذية أنواع ليريوميزا *Liriomyza* مستديرة، يبلغ قطرها عادة 0.2 ملم، وتبدو كبقع بيضاء تعتري السطح العلوي للورق. وتكون الثقوب المخصصة لوضع البيض أصغر حجماً بالعادة (0.05 ملم) وشكلها أكثر ميلاً إلى الاستدارة. وتكون نقر التغذية التي تحدثها أنواع ذباب الورق *agromyzid* المتعددة العوائل أي كروماتوميا هورتيكولا *Chromatomyia horticola* وكروماتوميا سينجينيسيا *Chromatomyia syngenesiae* أكبر حجماً وشكلها بيضاوي أكثر من تلك التي يحدثها ذباب ليريوميزا *Liriomyza*. لا يختلف شكل نقر التغذية عن شكل ثقوب وضع البيض لدى أنواع*ليريوميزا Liriomyza*، ولا يمكن استخدام نمط توزيعها على الورقة لتحديد هوية الأنواع. وتتسبّب نقر التغذية بتدمير عدد كبير من الخلايا وتكون ظاهرة بوضوح للعين المجردة (EPPO، 2005).

تتغذى اليرقات بشكل رئيسي من الجزء العلوي للورقة عبر حفر أنفاق داخل الأنسجة الخضراء الحاضنة. ويكون لون هذه الأنفاق عادة أبيض ضارباً إلى الصفرة، مع مسالك من البراز تبدو كخطوط سوداء متكسّرة على طول الورقة. وتؤدي التلافيف المتكررة في المنطقة الصغيرة نفسها من الورقة في كثير من الأحيان إلى تغيّر لون النفق، مع ظهور مناطق سوداء مبللة ومناطق بنية جافّة، وذلك عادة كنتيجة لردود فعل النبتة لنقّابة الورق (EPPO، 2005).

هناك ثلاث مراحل يرقية، تتغذى اليرقات خلالها كلها داخل الأوراق. وتتغذى اليرقات بشكل رئيسي من النبتة التي وُضع فيها البيض. وتغادر يرقات نوع ليريوميزا *Liriomyza* spp. الأوراق عندما تكون جاهزة لكي تصبح خادرات (Parrella وBethke، 1984)، وتكون فتحة مخرجها عادة على شكل شق نصف دائري؛ وعلى العكس من يرقات ك. هورتيكولا *C. horticola* وك. سينجينيسيا *C. syngenesiae* التي تخدر داخل الورقة في الجزء الأخير من النفق اليرقي، مع نتوء فتحات التنفس الأمامية عادة من السطح السفلي للورقة. يمكن بالتالي العثور على خادرات ليريوميزا *Liriomyza*، في مخلفات المحاصيل وفي التربة أو في بعض الأحيان على سطح الورقة.

وقد توجد بعض الأنواع في مواقع مختلفة من النبتة ومحيطها، بحسب مراحل تطوّرها، على النحو التالي:

- البيض: يغرس تواً تحت سطح الورقة
- اليرقات: داخل أنفاق الورق
- الشرانق: في بقايا المحاصيل أو في التربة أو في بعض الأحيان على سطح الورقة
- الذباب البالغ: يطير في الجو أو يقبع على سطح الأوراق فيما تُنتج ثقوباً للتغذية ولوضع البيض.

1-3 جمع العيّنات وحفظها

يمكن جمع ذباب ليريوميزا *Liriomyza* في المراحل السابقة لنضوجه مقترناً بعينات من ورق ينطوي على أنفاق، كما يمكن جمعه عندما يكتمل نموّه. وبما أن الخصائص المورفولوجية

المستخدمة لتشخيص الأنواع تعتمد على الأعضاء التناسلية الذكرية، فهناك حاجة إلى ذكور بالغة من أجل التثبت من تحديد هوية الأنواع. أما الإناث البالغة فلا يمكن تمييزها بيقين في كثير من الأحيان إلا على مستوى الجنس. ومن شأن جمع عينات متعددة من نبتة أو من موقع ما أن يزيد من احتمال الحصول على ذباب ذكور، وهذا أمر مهمّ ما لم يكن من المزمع إجراء اختبارات جزيئية لتشخيص مراحل النمو غير المكتمل.

3-1-1 جمع الذُّباب البالغ

يوجد الذباب البالغ عادة على ورق الأشجار، ويمكن جمعه باليد أو كسحه عن أوراق الشجر بواسطة شبكة يدوية ووضعه من ثمّ داخل قوارير زجاجية، أو يمكن جمعه باستخدام مضخّة خوائية لجمع العينات. وعوضاً عن ذلك، يمكن جمعه باستخدام المصائد الصفراء اللاصقة، وخاصة في البيوت الزجاجية. غير أنّ الطريقة الأكثر عملية وموثوقية لجمع نقّابات الورق مثل أنواع ليريوميزا *Liriomyza* تتمثل في جمع أوراق حفرت فيها أنفاق وتحتوي على يرقات حية. فتوضع في مستوعب كبير من أجل تربيتها حتى تصبح ذباب بالغ في المختبر. ويرد وصف تقنيات تربية ذباب الورق agromyzids عند Griffiths (1962) وFisher وآخرون (2005).

يمكن وضع الذباب البالغ واليرقات في محلول يحتوي على إيثانول بنسبة 70 في المائة وتخزينها إلى أجل غير مسمى، ولو أن لونها يبهت تدريجياً مع مرور الوقت. وينبغي أن تكون القوارير التي تضم العينات المنقوعة في الإيثانول، مقفلة بإحكام لتجنب تسرب السائل وموضبة في مواد مخففة للصدمات داخل صندوق مقوّى. ويمكن حفظ الذباب البالغ أيضاً حفظاً جافاً عبر تعليق العينات بواسطة دبابيس مثلاً.

أما العينات اللازمة للتشخيص الجزيئي فينبغي حفظها في محلول يحتوي على إيثانول بنسبة 96 إلى 100 في المائة، وتخزينها مجمدة (على حرارة تتراوح بين 20 و4.0 درجة مئوية تحت الصفر) أو حفظها على بطاقات FTA (Whatman)[1] (Blacket وآخرون، 2015).

3-1-2 جمع الآفات في مراحل النمو غير المكتمل

إذا كان القصد هو جمع عينات من النباتات وحفظها، ينبغي قطف الأوراق التي يشتبه باحتوائها على نقر للتغذية أو على أنفاق ووضعها بين ورقتي جريدة بما يتيح تجففها ببطء.

أمّا الأوراق التي تأوي أنفاقها يرقات يُعتَزَم تربيتها في المختبر من أجل الحصول على مختلف مراحل تطوّرها، ولا سيما ذباب بالغ، بغية تحديد هويتها فينبغي تغليفها بأنسجة مخبرية مبتلّة قليلاً ولكن غير مفرطة الرطوبة، وتُرسل بالبريد ضمن أكياس مبطّنة ومختومة. وفي المختبر، توضع الأوراق ذات الأنفاق التي تسكنها يرقات حية في أطباق بيتري (Petri) مختومة مع أوراق ترشيح رطبة ثم تخزينها في حاضنة على حرارة 23 درجة مئوية تقريباً (يجب أن تُفحص كل يومين أو ثلاثة أيام لإزالة الأوراق التي تنمو فيها فطريات وبكتيريا وغيرها).

4- تحديد الهوية

يقتصر تحديد هوية نقّابات الورق بالمعاينة المورفولوجية على عينات ذكور بالغة، إذ لا توجد أدلة ملائمة على تحديد هوية الإناث البالغة على مستوى النوع أو البيض أو اليرقات أو الشرانق. ويمكن تحديد هوية الذباب البالغ عن طريق معاينة الصفات المورفولوجية، وبخاصة الأعضاء التناسلية للذكور. ويتم فحص الخصائص المورفولوجية للأعضاء التناسلية الذكرية تحت مجهر عالي القدرة (بقدرة تضخيم تبلغ حوالي 100 مرة). ومن شأن استخدام هذا البروتوكول مع عينات حسنة الإعداد، أن يسمح بالتعرّف إلى الأنواع البالغة المشمولة بالحجر الزراعي الأربعة لليريوميزا *Liriomyza* بشكل أكيد من خلال المعاينة المورفولوجية وحدها. (باستثناء ل. هويدوبرنسيس *L. huidobrensis* ول. لانجاي *L. Langei* للأسباب التي نوقشت في القسم 1).

ويمكن استخدام الاختبارات الجزيئية في جميع مراحل التطوّر، بما في ذلك مراحل النمو غير المكتمل، عندما يتعذر تحديد الأنواع استناداً إلى الخصائص المورفولوجية. وبالإضافة إلى ذلك، فإن الاختبارات الجزيئية قد توفر مزيداً من المعلومات المهمّة حول هوية تلك الأنواع عندما تكون العينات البالغة غير اعتيادية أو تالفة. ولكن يتعين تفسير تلك المعلومات بدقة لأن تخصص الاختبارات الجزيئية محدود، وقد وضعت هذه الاختبارات لأغراض معينة وتم تقييمها على أساس عدد محدود من الأنواع، باستخدام عينات من مناطق جغرافية مختلفة. لذا يتعين تفسير نتائج تلك الاختبارات الجزيئية بحذر.

4-1 تحديد هوية نقابة الورق (ليريوميزا) *Liriomyza* البالغة استناداً إلى الخصائص المورفولوجية

من الضروري معاينة الأعضاء التناسلية الذكرية (على وجه الخصوص، الجزء الطرفي من القضيب distiphallus (الشكل 5))، من أجل تحديد الهوية بشكل إيجابي فيما يخص أي نوع من الأنواع الأربعة المستهدفة لليريوميزا *Liriomyza*. ويرد أدناه عرض موجز لطريقة جيدة لإعداد العينات (استناداً إلى Malipatil وRidland، 2008). ويرد مزيد من التفاصيل حول الطريقة أو الاختلافات في الأسلوب لدى Spencer (1981، 1992)، Spencer وSteyskal (1986) وEPPO (2005). وينبغي للقرائن الدالة على هيكل الجزء الطرفي من قضيب الذكر distiphallus أن تقارن بالسمات المورفولوجية (الجدول 1) من أجل تأكيد تحديد هوية الأنواع.

4- 1-1 تحضير الأعضاء التناسلية للذكر البالغ لآفة ليريوميزا *Liriomyza* للفحص المجهري

4-1-1-1 تحديد جنس الذباب

لدى الذباب الذكور، تكون فصوص العضو المسمى epandrium داكنة اللون ومزغبة وأقل تصلباً من أنبوب الإناث، وهي تلتف حول الجزء الخلفي من البطن وصولاً إلى أسفله، من جانبي الظهر والبطن (الشكل 6 (أ)). وهناك فتحة على شكل شقّ صغير بين الفصوص، تصبح مثلثة الشكل عندما تفتح بالكامل، ويمكن من خلالها رؤية بقية الأعضاء التناسلية الذكرية. وبالكاد تمتدّ الفصوص لما بعد الصفيحة الظهرية الأخيرة. ولدى الذبابة الأنثى، تشكّل أقسام البطن ما بعد القسم 6 أنبوباً أسود شديد التصلّب يمتد إلى ما بعد الصفيحة الظهرية السادسة (الشكل 6 (ب))، وهناك

فتحة دائرية واضحة للعيان من الخلف في نهاية الأنبوب. وتغطي الشريحة الظهرية السادسة النصف القاعدي للأنبوب من فوق، على الرغم من أنها مرئية من الناحيتين الجانبية والبطنية.

2-1-1-4 تحضير الجزء الطرفي من قضيب الذكر *distiphallus* للمعاينة

ينبغي فصل البطن عن الجسم لكي يتسنى تنظيف الأنسجة والمراقبة. ويمكن تحقيق ذلك باستخدام إبر التشريح الدقيقة (والتي يمكن صنعها بلصق الطرف المستدير للدبابيس المصغرة المروسة وإدخاله بطرف عود ثقاب خشبي، بعد حفر ثقب سطحي بدبوس عادي)، لفصل البطن عن بقية بدن الذبابة بعناية. ويمكن غلي البطن في محلول يحتوي 10 في المائة من هيدروكسيد البوتاسيوم(KOH) أو هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) لمدة 2-4 دقائق، أو بدلاً من ذلك، تركه في محلول بارد يحتوي على 10 في المائة هيدروكسيد البوتاسيوم (KOH) أو هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) لليلة كاملة من أجل تبيان الأنسجة. إن نقل البطن المعالَج إلى الماء المقطر كفيل بتحييد هيدروكسيد البوتاسيوم أو هيدروكسيد الصوديوم. وبعد ذلك يصبح البطن جاهزاً لنقله إلى قطرة من الغليسرين على شريحة مجوّفة.

تحت مجسام ثنائي العينين وباستخدام إبر التشريح الدقيقة، يُفصل مجموع الأعضاء التناسلية بعناية عن الأغشية المحيطة والقشيرات والعضلات المرتبطة بها. وبواسطة إبر التشريح الدقيقة، توضع الأعضاء التناسلية بشكل يتيح مشاهدتها من الجنب تحت مجهر مركب بقدرة تضخيم تبلغ حتى 400 مرة. ثم يتم تغيير وضعية الأعضاء التناسلية بشكل يتيح رؤية الجزء الطرفي من قضيب الذكر distiphallus من جهة البطن بقدرة تضخيم تبلغ 400 مرة، بدون إضافة الساترة. وينبغي مشاهدة الجزء الطرفي من قضيب الذكر distiphallus من وجهات مختلفة (مثلاً، عرض جانبي وظهري وبطني)، الأمر الذي يتطلب تغيير وضعيته تحت المجهر بقوة تضخيم أقلّ.

ولكي تصبح الشرائح شبه دائمة (لغرض تحديد الهوية الروتيني مثلاً)، ينبغي نقل الأعضاء التناسلية ووضعها في قطرة من الغليسرين على شريحة مسطحة نظيفة. فتُغطَس الأعضاء التناسلية برفق في المحلول، وتوضع عليها ساترة مستديرة من أجل مدّ المحلول بالتساوي.

وإذا دعت الحاجة إلى شرائح دائمة، فيجب تنظيف البطن في محلول هيدروكسيد البوتاسيوم KOH وتحييد مفعوله في حمض الخليك الجليدي البارد كما هو موضح أعلاه. ثم يمكن نقل البطن ووضعه في محلول يحتوي على إيثانول بنسبة 70 في المائة، وباستخدام إبر التشريح الدقيقة تحت مجسام ثنائي العينين، يفصل مجموع الأعضاء التناسلية بعناية عن الأغشية المحيطة والقشيرات والعضلات المرتبطة بها. وينبغي في مرحلة أولى نقل الأعضاء التناسلية المفصولة ووضعها في الإيثانول المطلق لمدة 2-4 دقائق، ثم في زيت القرنفل (التي يمكن إن اقتضى الأمر تخزينها فيه لأية مدة من الوقت). ويتم نقل الأعضاء التناسلية إلى محلول يحتوي إيثانول بنسبة 70 في المائة (لحوالي 10 دقائق)، ثم إلى محلول يحتوي إيثانول بنسبة 95 في المائة (لحوالي 10 دقائق)، وأخيراً إلى زيت القرنفل (لمدة خمس دقائق على الأقل). ويمكن بعد ذلك وضع الأعضاء التناسلية بشكل دائم على شريحة، في قطرة من بلسم كندا تحت ساترة. ويجب توسيم كل الشرائح الدائمة ببيانات وافية تفصّل المكان واسم العائل وتاريخ الجمع واسم الجهة القائمة على الجمع (إن كانت معروفة) واسم النوع، وعلامة التعريف، وكود لتضمينه إشارات مرجعية فيما يخصّ بقية العينة.

وينبغي وضع ما تبقى من عينة الذباب على بطاقة بالتسمية المناسبة، مع وضع رقعة مناسبة على الشريحة تنطوي على إشارات مرجعية إلى الأعضاء التناسلية.

2-1-4 تحديد هوية فصيلة ذبابات الورق *Agromyzidae*

تضم فصيلة ذباب الورق حوالي 500 2 نوع في جميع أنحاء العالم (Spencer، 1989، 1990). ويرد وصف تفصيلي لمورفولوجيا ذباب الورق لدى Spencer (1972، 1973، 1987)، وDempewolf (2004)، وBoucher (2010).

وتتبع التسميات الشكلية في هذه الوثيقة Yeates وآخرين (2004). ويمكن أيضاً الرجوع إلى هذا المصدر على الإنترنت للاطّلاع على الرسوم التوضيحية التي تعرض بشكل واضح تشريحاً نموذجياً لذبابة acalyptrate (مثل نقابات الأوراق).

تتسم فصيلة نقابات الأوراق بالمجموعة التالية من الخصائص (Hennig، 1958؛ Spencer، 1987؛ Boucher 2010) (الشكل 7):

- صغيرة الحجم يتراوح طولها بين 1-6 ملم ولكنه يكون عادة ما بين 1 و3 ملم
- وجود شعيرات في الأنف
- من واحد إلى سبعة قرون استشعار في الجبهة
- جناح مع فاصل في الضلع عند قمة الترس الصدري
- خلية الجناح الإبطية صغيرة؛ عرقا الجناح CuA_2 + A1 لا يصلان إلى حافة الجناح
- توجد لدى الذكر صلبات في المنطقة الواقعة ما قبل الأعضاء التناسلية يندمج معها مجمع من الصفائح الظهرية المتصلبة يتراوح عددها بين 6 و8، مع فتحتين تنفسيتين فقط بين الصفيحة الظهرية 5 والجزء الذي يضم الأعضاء التناسلية.
- القسم الأمامي من الجزء البطني 7 لدى الأنثى يشكل المسرأ (جهاز وضع البيض).

تكون اليرقات عموماً (الشكل 8 (أ)) أسطوانية الشكل، مسنونة في قسمها الأمامي، مع نتوءات تحمل الفتحات التنفسية الأمامية والخلفية (الشكل 8 (ب) و(د))، بحيث تقع الأمامية منها على السطح الظهري للجزء الداخلي من الصدر، فيما الأخيرة موجهة إلى الخلف. وتكون أجزاء فمها أيضاً جدّ متصلّبة؛ يكون الفك السفلي عند الزاوية القائمة في اتّجاه المحور الطولي إلى بقية الهيكل الرأسي - البلعومي cephalopharyngeal (الشكل 8 (ج))، وعادة ما تحمل اثنين أو أكثر من أزواج أسنان متساوية الحجم موجهة إلى الأمام، وقرون بطنية (عبارة عن "ذراعين" مقترنتين موجهتين نحو الخلف) تكون عادة أقصر من القرون الظهرية.

يسهل التعرف على ذبابات الورق في الممارسة العملية لأن يرقاتها تتغذى من الأنسجة الحية للنباتات (ثلاثة أرباعها نقّابات للورق). لكن توجد نقّابات ورق ضمن فصائل أخرى من الحشرات المزدوجة الجناح dipteran مثل ذباب الأزهار Anthomyiidae وذباب الخلّ Drosophilidae. للحصول

على موجز المعلومات عن خصائص ذباب الورق agromyzids المورفولوجية والبيولوجية في أطوارها غير الناضجة، إضافة إلى ببليوغرافيا واسعة النطاق ورسوم توضيحية للهيكل الرأسي - البلعومي cephalopharyngeal والفتحات التنفسية لعدد من الأنواع، أنظر Ferrar (1987).

3-1-4 تحديد جنس ليريوميزا *Liriomyza*

يتميّز الذباب المكتمل النمو من جنس ليريوميزا *Liriomyza* بالسمات المورفولوجية التالية (EPPO، 2005؛ Spencer، 1976):

- شعيرات مائلة على الجبهة والمحجر (متّجهةً إلى الخلف)
- منطقة ما قبل الصدر داكنة ومن نفس لون الصدر لدى معظم الأنواع، ونادراً ما يكون لونها أصفر
- لون الصدر أصفر لدى معظم الأنواع، ونادراً ما يكون داكناً
- الجزء السفلي للضلع ينثني عند الطرف وينتهي داخل الضلوع بصورة منفصلة
- يمتد الضلع إلى العرق M_{1+2}
- الخلية القرصية (dm) صغيرة الحجم
- يوجد عرق مستعرض (خارجي) ثان (dm-cu) في معظم الأنواع
- جهاز الصرير موجود لدى الذكور ("مكشطة"، حافات قرنية على الفخذ الخلفي؛ و"مبرد" يتكون من سلسلة من القشور القرنية المنخفضة على الغشاء الذي يربط الصفائح الظهرية بالصفائح البطنية السفلية).

في الممارسة العملية، تبدو معظم أنواع ليريوميزا *Liriomyza* (بما في ذلك الأنواع المستهدفة الأربعة الواردة في هذا البروتوكول التشخيصي) سوداء في معظمها بجبهة صفراء وحرشفة صفراء زاهية، حين تشاهد من فوق، وسيقانها صفراء بنِسب مختلفة. وتمتلك هذه الأنواع المستهدفة التعرّق الاعتيادي للجناحين (الشكل 9) والأعضاء التناسلية الذكرية التي توجد عامة لدى كافة أفراد هذا الجنس.

قد يطرأ التباس بين عدة أجناس وبين جنس ليريوميزا *Liriomyza*. يمكن الفصل بين الأصناف وثيقة الترابط فيما بينها، أي فيتوميزا *Phytomyza*، وكروماتوميا *Chromatomyia* وفيتوليريوميزا *Phytoliriomyza* وبين ليريوميزا *Liriomyza* عامة من خلال الشعيرات على الجبهة والمحجر المائلة إلى الأسفل (متّجهةً إلى الأمام) (تكون دائماً متّجهة إلى أسفل وأحياناً مستقيمة أو منعدمة لدى ليريوميزا *Liriomyza*)، وبالحرشفة الصغيرة التي تكون عموماً رمادية أو سوداء لكنها تظهر أحياناً مع لونٍ أصفر فاتح في وسطها (يكون الوسط أصفر بشكل تام لدى معظم ذبابات ليريوميزا *Liriomyza*). ولدى نوعي فيتوميزا *Phytomyza* و*Chromatomyia*، لا يمتدّ الضلع إلا إلى العرق R_{4+5}، في حين يمتد لدى آفتي فيتوليريوميزا *Phytoliriomyza* وليريوميزا *Liriomyza* إلى العرق M_{1+2} (Spencer، 1977). وتشكّل أنواع *Phytoliriomyza* عفصات (على الجذع أو الورقة) وتتغذى من الداخل، في حين تعدّ أنواع *Chromatomyia* و*Phytomyza* و*Liriomyza* عادة من نقّابات الورق.

4-1-4 تحديد هوية أنواع ليريوميزا *Liriomyza*

1-4-1-4 الخصائص المورفولوجية لذباب ليريوميزا *Liriomyza* spp البالغ

يرد ملخص مبسط بالخصائص الرئيسية لتشخيص ل. بريونيا *L. bryoniae*، ول. هويدوبرنسيس *L. huidobrensis*، ول. ساتيفا *L. sativae* ول. تريفوليي *L. trifolii* (وكذلك لآفة ل. ستريغاتا *L. strigata* لأغراض استبعادها) في الجدول 1، مصحوباً برسوم توضيحية وصور مجهرية للجزء الطرفي من قضيب الذكر distiphallus في الشكلين 10 و11.

ويرد وصف أكثر تفصيلاً ورسوم توضيحية للتشكيلة المورفولوجية لهذه الأنواع عند Spencer (1965، 1973)، وDempewolf (2004)، وMalipatil وآخرون (2004)، وShiao (2004). وتظهر سمات التشخيص الرئيسية في مكتبة صور الآفات والأمراض (PaDIL) (Malpatil 2007أ، 2007ب، 2007ج).

ويمكن أيضاً تحديد هوية الذبابات البالغة باستخدام المفاتيح. وقد قدم Malipatil وRidland (2008) مفتاحاً لسبعة عشر نوعاً من الآفات ذات الأهمية الاقتصادية، بما فيها بعض الأنواع المتوطّنة في أستراليا. وبالإضافة إلى ذلك، يتوفر في Dempewolf (2004) نظام لتحديد أنواع الآفات من جميع أنحاء العالم استناداً إلى صور مجهرية. وهناك إشارة خاصة إلى مفاتيح تعني أنواع ليريوميزا *Liriomyza* في بعض الكاتالوغات الإقليمية الواسعة ومفاتيح متاحة من خلال أعمال Spencer. وتشمل هذه الأعمال الكائنات الحيوانية الإقليمية الأساسية، التي تختلف طبعاً من منطقة إلى أخرى، وهي بذلك تؤثر بصور متفاوتة في العملية الإيجابية الرامية إلى استبعاد الأنواع غير المستهدفة. وترد قائمة كاملة بهذه الأعمال في Spencer (1973). بالإضافة إلى ذلك، فإن مراعاة النبات العائل الذي اكتُشفت فيه أنواع ليريوميزا *Liriomyza* المشتبه بها والمشمولة بالحجر الزراعي، يمكن أن تساعد في تقليص أنواع ذباب الورق agromyzid المحتملة الأخرى التي قد تظهر في السياق البيولوجي نفسه والتي ينبغي عدم وضعها في الحسبان (على سبيل المثال في أوروبا، أنظر Ellis (بدون تاريخ).

الجدول 1- الخصائص المورفولوجية لدى أنواع مختارة من ذباب ليريوميزا *Liriomyza*†

	L. bryoniae	*L. huidobrensis*‡	*L. sativae*	*L. strigata*	*L. trifolii*
الجزء الطرفي من قضيب الذكر distiphallus	بصلتان طرفيتان؛ حواشي البصلة مستديرة.	بصلتان طرفيتان لا تلتقيان إلا عند حاشيتيهما، تمتدّ حاشية البصلة نحو الأمام على مستوى البطن	بصلة طرفية واحدة مع انقباض طفيف بين النصفين العلوي والسفلي على المستوى الظهري والبطني؛ تبدو البصلة أكثر تصلّباً بساق قاعدية أقصر	بصلتان طرفيتان، تلتقيان من الحاشية إلى القاعدة، تمتدّ حواشي البصلة نحو الأمام على مستوى البطن	بصلة طرفية مع انقباض بارز بين النصفين العلوي والسفلي على المستوى الظهري والبطني؛ تبدو البصلة أقلّ تصلّباً بساق قاعدية أطول
قرون استشعار عمودية	قرنا استشعار عموديان على أرضية صفراء	قرنا استشعار عموديان على أرضية سوداء	قرون استشعار عمودية خارجية على أرضية سوداء قد تصل إلى قرون الاستشعار العمودية الداخلية، التي تكون فيما عدا ذلك على أرضية صفراء	لون أسود خلف العينين يمتدّ على الأقلّ حتّى قرون الاستشعار العمودية الخارجية، لكن قرون الاستشعار العمودية الداخلية تكون على أرضية صفراء	قرنا الاستشعار العموديان على أرضية صفراء
الجزء الظهري من عظم القص Anepisternum	أصفر في الغالب، علامة سوداء صغيرة على الهامش السفلي الأمامي	أصفر ببقعة سوداء متفاوتة الشكل تمتد عموماً على ثلاثة أرباع الجزء السفلي	أصفر في معظمه، بمنطقة داكنة تتراوح في حجمها من شريط صغير على طول الهامش السفلي إلى طول الجزء السفلي الأمامي بأكمله من الهامش، ثمّ إلى الهامش الأمامي ويضيق ليصل إلى هامش الفصّ	أصفر ولكن مع بقعة سوداء متفاوتة الشكل في الهوامش السفلى ولأمامية، وقد تمتد على طول النصف السفلي	أصفر، علامة صغيرة رمادية تميل إلى اللون الأسود على الهامش الأسفل الأمامي
العرق Cu 1A	طول (أ) ضعف طول (ب)	طول (أ) 2-2.5 مرة طول (ب)	طول (أ) 3-4 مرات طول (ب)	طول (أ) 2-3 مرات طول (ب)	طول (أ) 3-4 مرات طول (ب)
المقطع الثالث من قرون الاستشعار	صغير، أصفر	مضخم بعض الشيء، داكن عادة	صغير- أصفر	صغير، أصفر	صغير، أصفر

	L. bryoniae	*L. huidobrensis*‡	*L. sativae*	*L. strigata*	*L. trifolii*
الجبهات والمحاجر	الجبهة بلون أصفر لامع، المحجران أكثر شحوباً	الجبهة صفراء، تميل عموماً أكثر إلى اللون البرتقالي منها إلى اللون الأصفر الليموني الشاحب؛ المحجران العلويان داكنان بعض الشيء، على الأقل عند قرن الاستشعار المحجري العلوي	الجبهة والمحجران بلون أصفر زاه	الجبهة والمحجران صفراوان	الجبهة والمحجران صفراوان
الفخذ	أصفر زاهي بخطوط تميل إلى اللون البنّي	أصفر، داكن أحياناً بخطوط سوداء	أصفر زاهي	أصفر بخطوط تميل إلى اللون البنّي	أصفر تتخلله أحياناً خطوط رقيقة تميل إلى اللون البنّي
الجانب الظهري لوسط الصدر	أسود، لماع بنسبة كبيرة مع مسحة من لون خفيف كامد	أسود، كامد	أسود، لامع	أسود لامع مع لمسة كامدة طفيفة	أسود كامد مع لمسة رمادية طفيفة
الصفائح البطنية للذكور	الصفيحتان الثانية والثالثة مرئيتان يفصل بينهما أخدود وسطي أصفر	وحدها الصفيحة الثانية المرئية مقسمة بأخدود وسطي أصفر	وحدها الصفيحة الثانية المرئية مقسمة بأخدود وسطي أصفر	–	الصفائح من الثانية إلى الخامسة مقسمة بأخدود وسطي أصفر
طول الجناح	1.75 – 2.1 ملم	1.7 – 2.25 ملم	1.3 – 1.7 ملم	1.8 – 2.1 ملم	1.3 – 1.7 ملم

المصدر: تم تجميع المعلومات الواردة في الجدول من Spence (1973، 1976)، والمعلومات المتعلقة بالجزء الطرفي من قضيب الذكر distiphallus من: EPPO (2005) والمعلومات عن صفائح بطن الذكور من Shiao (2004) (الذي لم يتناول *L. Strigata* في تحليله).

† أنظر أيضاً الأشكال 7 إلى 11.

‡ لا يمكن التمييز بين *L. Langei* و *L. Huidobrensis* من الناحية المورفولوجية.

2-4-1-4 بنية الجزء الطرفي من قضيب الذكر البالغ لذباب ليريوميزا *Lyriomiza*

تنقسم أنواع ليريوميزا *Liriomyza* المدروسة في هذا الفصل إلى مجموعتين طبيعيتين تختلف إحداهما عن الأخرى بحسب بنية الأعضاء التناسلية الذكرية (ولا سيما الجزء الطرفي من القضيب) فضلاً عن لون الجسم وبنية الفتحات التنفسية الخلفية لليرقات:

- االمجموعة 1: ل. بريونيا *L. bryoniae*، ول. هويدوبرنسيس *L. huidobrensis*، ل. ستريغاتا *L. strigata*
- المجموعة 2: ل. ساتيفا *L. sativae* ول. تريفوليي *L. trifolii*

غير أن السمات الخارجية للذباب البالغ المفيدة في تحديد هويته (الجدول 1)، ولا سيما السمات القائمة على اللون، لا تندرج بوضوح في هاتين المجموعتين.

والجزء الطرفي من القضيب عبارة عن بنية صغيرة جداً وهشة تحيط بها الأغشية. وهو الجزء الطرفي من القضيب (جهاز الإيلاج، وهو جزء من الأعضاء التناسلية الذكرية) (الشكل 5) وتتسم بنيته المعقدة ثلاثية الأبعاد بقيمة تشخيصية عالية. فالجزء الطرفي من القضيب يتميز بسمة فريدة يمكن من خلالها تحديد جميع الأنواع الأربعة المستهدفة تحديداً موثوقاً. وتختلف البنية الأساسية للجزء القمي من القضيب بين المجموعتين الطبيعيتين من هذا النوع من الآفات: ففي المجموعة 1، هناك بصيلتان طرفيتان جنباً إلى جنب (الشكل 10)، أما في المجموعة 2، فهناك بصيلة طرفية واحدة، منقبضة في الوسط بحيث تنقسم إلى قسمين، سفلي وعلوي (الشكل 11). ويرد أدناه مفتاح لتسهيل التعرف على الأنواع الأربعة المدروسة باستخدام الجزء الطرفي من القضيب. وتيسيراً للفهم، يشمل المفتاح أيضاً *ليريوميزا ستريغاتا* *L. strigata*، التي ترتبط ارتباطاً وثيقاً *بليريوميزا بريونيا* *L. bryoniae*، *وليريوميزا هويدوبرنسيس* *L. huidobrensis*، وهي أيضاً آفة متعددة العوائل ويمكن بالتالي العثور عليها في نباتات عائلة مماثلة.

غير أن الاختلافات بين بعض أزواج هذه الآفة طفيفة وينبغي التحقق من بنية الجزء الطرفي من القضيب باستخدام الدلائل المورفولوجية (الجدول 1) للتأكد من عدم الخطأ في تفسير بنية الجزء الطرفي من القضيب. وإذا تطابقت جميع الأدلة، يمكن آنذاك استبعاد جميع الأنواع الأخرى من*ليريوميزا* *Liriomyza*، بما فيها الأنواع التي لا تتناولها هذه الوثيقة.

المفتاح التشخيصي لتحديد هوية أنواع ليريوميزا *Liriomyza* من خلال الجزء الطرفي من القضيب الذكري

ينبغي استخدام هذا المفتاح بالاقتران مع الشكلين 10 و11.

1- بصيلة طرفية واحدة (الشكل 11(ه) و(و)) .... **2**.....

- بصيلتان طرفيتان (الشكل 10(أ)-(ج) و(ز)-(ك)) ..... **3**.....

2- انقباض شديد بين الجزء الطرفي والجزء القاعدي من البصيلة: القسم القاعدي شديد التقوس (الشكل 11(و) ....***ليريوميزا تريفوليي*** ***L. trifolii***

- انقباض طفيف فقط بين الجزء الطرفي والجزء القاعدي من البصيلة: القسم القاعدي ليس شديد التقوس (الشكل 11(ه)) ....***ليريوميزا ساتيفا*** ***L.sativae***

3- حاشيتا البصيلتين دائريتين (غير ممتدتين نحو الأمام على مستوى البطن)؛ ومتصلبتان على نحو متكافئ (الشكل 10(أ)) .....***ليريوميزا بريونيا*** ***L.bryoniae***

- حافتا البصيلتان حلزونيتان (ممتدتان نحو الأمام على مستوى البطن) (الشكل 10(ب) و(ج) ..... **4.**

4- البصيلتان تلتقيان في الوسط عند حافتيهما فقط (الشكل 10(ح)) ....***ليريوميزا هويدوبرنسيس*** ***L. huidobrensis**

- البصيلتان تلتقيان في الوسط من حاشيتيهما إلى قاعديتهما (الشكل 10(ط)) .....***ليريوميزا ستريغاتا*** ***L. strigata***

* يتعذر التمييز بين *ليريوميزا لانجاي* *L. langei* و*ليريوميزا هويدوبرنسيس* *L. huidobrensis* بالاستناد إلى الخصائص المورفولوجية

3-4-1-4 الخصائص المورفولوجية لأنواع ليريوميزا *Liriomyza* الأربعة المستهدفة في مراحل ما قبل النضج

إن الذباب الذكر البالغ هو وحده الذي يمكن التعرف عليه بشكل قاطع في مراحل الحياة الأربع (البيضة واليرقة والشرنقة والحشرة البالغة) على مستوى النوع بالاستناد إلى السمات المورفولوجية (شكل الأعضاء التناسلية الذكرية). ويمكن استخدام الخصائص المورفولوجية لليرقة والشرنقة للتمييز بين أعضاء المجموعتين الطبيعيتين من هذا النوع الموصوفتين في القسم 4-1-4-2. ويمكن أن تساهم هذه المعلومات في تحديد هوية الأنواع، ولكنها لا تكفي لوحدها من أجل تلك الغاية. وبغية استكمال تحديد الهوية على أساس مورفولوجي، يمكن استخدام الاختبارات الجزيئية للتمييز بين الأنواع المذكورة في البروتوكول (القسم 4-2).

البيض

تضع الذبابات البيض في أنسجة الورق. ويكون البيض أبيض اللون وبيضاوي الشكل، ويبلغ طول البيضة حوالي 0.25 ملم. ولا يمكن في هذه المرحلة تحديد الجنس أو النوع.

اليرقة والشرنقة

تمر اليرقة بثلاثة أطوار، وتتغذى من خلال شقّ نفق في نسيج الورقة. يبلغ طول اليرقة حديثة النشوء حوالي 0.5 ملم، ولكنه يصل إلى 3.0 ملم عندما يكتمل نموها. وهي مثال نموذجي على ذباب الورق agromyzids من حيث شكلها الإجمالي (أنظر القسم 4-1-2). أما الشرنقة (الشكل 12) فهي عبارة عن أسطوانة بيضاوية الشكل، يبلغ طولها حوالي 2.0 ملم، بطنها مسطح بعض الشيء، ولها فتحات تنفسية أمامية وخلفية ناتئة. ويمكن التمييز عملياً في مرحلتي اليرقة والشرنقة بين المجموعتين الطبيعيتين (ولكن لا يمكن التمييز بين الأنواع داخل المجموعتين) بناءً على الخصائص المورفولوجية على النحو التالي.

يرقات المجموعة 1

تكون يرقات *ليريوميزا بريونيا* *L. bryoniae* *وليريوميزا هويدوبرنسيس* *L. huidobrensis* *وليريوميزا ستريغات* *L. strigata* ذات لون قشدي، ولكن في الطور النهائي تتشكل بقعة صفراء برتقالية على القسم الأمامي من ظهرها يمكن أن تمتد لتشمل سطح البطن (الشكل 13). وتتألف كل فتحة تنفسية خلفية من إهليج توجد على هامشه مسام. وقد تصعب ملاحظة عدد المسام التي يحددها Spencer (1973) كالآتي: *ليريوميزا بريونيا* *L. bryoniae*، ما بين 7 مسامات و12 مساماً، *وليريوميزا هويدوبرنسيس* *L. huidobrensis*، ما بين 6 و9 مسامات؛ *وليريوميزا ستريغاتا* *L. strigata*، ما بين 10 مسامات و12 مساماً. يتخذ غلاف الشرنقة ألواناً مختلفة، تتراوح ما بين الأصفر البرتقالي والبني الداكن. ويميل لون غلاف شرنقة *ليريوميزا* بريونيا *L. bryoniae* *وليريوميزا ستريغاتا* *L. strigata*، عامةً وليس حصراً، إلى الجانب الأخف من فئة اللون. أما لون غلاف *ليريوميزا هويدوبرنسيس* *L. huidobrensis* فيميل في الغالب إلى الفاحم. ويحتفظ غلاف شرنقة *ليريوميزا هويدوبرنسيس* *L. huidobrensis* بشكل الفتحات التنفسية التي تتكون في مرحلة اليرقة وإن كان يتعذر تمييز المسام بوضوح.

يرقات المجموعة 2

تكون يرقات *ليريوميزا ساتيفا* *L. sativae* *وليريوميزا تريفوليي* *L. trifolii* عند نشوئها حديثاً شفافة، ثم يعم جسدها كله فيما بعد لون أصفر – برتقالي. وتتخذ كل فتحة تنفسية خلفية شكلاً مثلث الزوايا مع ثلاثة مسام، يقع كل واحد منها في موقع أمامي بارز، فيما يكون المسامان الخارجيان ممدودين. ويتخذ غلاف الشرنقة لوناً برتقالياً يميل إلى الأصفر، ويكون لونها أحياناً بنياً ذهبياً أغمق. ويحتفظ غلاف الشرنقة بشكل الفتحات التنفسية التي تتكون في مرحلة اليرقة، ولكن التفاصيل الدقيقة لا تعود ظاهرة بوضوح للعيان.

2-4 تحديد هوية أنواع ليريوميزا *Lyriomiza* بالاستناد إلى الاختبارات الجزيئية

استُخدمت اختبارات جزيئية شتى استناداً إلى التفاعل المتسلسل للبوليميراز من أجل تحديد أنواع *ليريوميزا* *Liriomyza*، بما في ذلك التفاعل المتسلسل للبوليميراز - تعدد أشكال طول الشظايا المحَدِّدة (RFLP)، والتفاعل المتسلسل للبوليميراز في نقطة النهاية باستخدام البوادئ المرتبطة بالأنواع، والتفاعل المتسلسل للبوليميراز الآني، ومقارنة تسلسل الحمض النووي. وترد أدناه الاختبارات التي يمكن استخدامها للتمييز بين الأنواع الأربعة المستهدفة (أي ل. بريونيا *L. bryoniae*، ول. هويدوبرنسيس *L. huidobrensis*، ول. ساتيفا *L. sativae*، ول. تريفوليي *L. trifolii*) أو بين ل. هويدوبرنسيس *L. huidobrensis* ول. لانجاي *L. langei*.

في البروتوكول التشخيصي هذا جرى وصف الطرق (بما فيها الإشارة إلى الأسماء التجارية) بحسب ما هي منشورة، إذ أنها تحدد المستوى الأصلي للحساسية أو التخصص و/أو قابلية النسخ الذي تم بلوغه. وإن استخدام أسماء الكواشف أو المواد الكيميائية أو التجهيزات في البروتوكولات التشخيصية هذه لا ينطوي على تأييدها من أجل استثناء أخرى قد تكون مناسبة هي أيضاً. ويجوز تعديل الإجراءات المخبرية الواردة في البروتوكولات لكي تتواءم مع معايير المختبرات الفردية، شريطة المصادقة عليها بالشكل المناسب.

يرد أدناه تخصص كل طريقة. ويشير ذلك إلى نوع *ليريوميزا* *Liriomyza* الذي قُيّمت على أساسه كل طريقة والاستخدام الأصلي الذي صُمم الاختبار من أجله. ونظراً إلى القيود المحددة المفروضة على الاختبارات الجزيئية، فإن الحصول على نتيجة سلبية للاختبار الجزيئي لا يستبعد إمكانية التوصل إلى تحديد إيجابي عن طريق الاختبارات المورفولوجية.

1-2-4 شواهد الاختبارات الجزيئية

لكي يؤخذ بنتيجة الاختبار التي تم التوصل إليها، ينبغي تناول شواهد ملائمة - بحسب نوع الاختبار المستخدم ودرجة اليقين المطلوبة - لكل سلسلة من سلاسل عزل حمض النواة وتضخيمه للآفة المستهدفة أو حمض النواة المستهدف. وبالنسبة إلى التفاعل المتسلسل للبوليميراز، يتألف الحد الأدنى من الشواهد واجبة الاستخدام من شاهد إيجابي لحمض النواة وشاهد سلبي للتضخيم (لا شاهد نموذج)، وعند الاقتضاء، شاهد سلبي للاستخلاص.

4-2-2 استخلاص الحمض النووي

إن الحمض النووي المناسب لتطبيقات التفاعل المتسلسل للبوليميراز يمكن أن يستخلص بنجاح من عينة واحدة من يرقات *ليريوميزا Liriomyza* أو شرانقها أو ذباباتها البالغة، باستخدام مجموعات منوعة من أدوات استخلاص الحمض النووي المتاحة تجارياً وباتباع تعليمات الجهة المصنّعة (Scheffer وآخرون، 2001 و2006؛ وKox وآخرون، 2005؛ وNakamura وآخرون، 2013). وللحصول على معلومات إضافية عن مجموعة الأدوات المستخدمة في كل واحد من الاختبارات المعروضة أدناه، يرجى الرجوع إلى الوثيقة المصدرية. وقد تستنتج مختبرات معينة أن تقنيات الاستخلاص البديلة مناسبة بالمثل؛ فبالإمكان استخلاص الحمض النووي باستخدام أية طريقة من طرائق الاستخلاص المناسبة للحشرات المدروسة. وتُسحق الأنسجة المعالجة أو تُطحن باستخدام أداة طحن دقيقة معقمة أو جهاز مماثل في جميع البروتوكولات المنشورة.

الشاهد الإيجابي للحمض النووي. يُستخدم هذا الشاهد لرصد ما إذا كان الاختبار قد نُفذ أو لم يُنفَّذ وفقاً للتوقعات في ظل الظروف والبارامترات الاختبارية. ويمكن أن يكون الشاهد الإيجابي أي حمض نووي يحتوي على التسلسل المستهدف (أي حمض *ليريوميزا Liriomyza* النووي الذي سبق تحليله).

الشاهد السلبي للتضخيم (بدون شاهد نموذج). هذا الشاهد ضروري للتفاعل المتسلسل للبوليميراز من أجل استبعاد النتائج الإيجابية الكاذبة الناجمة عن التلوث أثناء تحضير خليط التفاعل أو تضخيم غير محدد. ويُضاف الماء الملائم للتفاعل المتسلسل للبوليميراز الذي سبق أن استُخدم لتحضير خليط التفاعل بدلاً من حجم الحمض النووي في مرحلة التضخيم.

الشاهد السلبي للاستخلاص. يُستخدم هذا الشاهد لرصد التلوث خلال استخلاص الحمض النووي و/أو التفاعل المتبادل مع نسيج العائل. ويشمل الشاهد تفاعلاً في مرحلة الاستخلاص بدون إضافة عينة من النسيج.

4-2-3 تحديد هوية الأنواع الأربعة المستهدفة بواسطة التفاعل المتسلسل للبوليميراز - تعدد أشكال طول الشظايا المحَدِّدة

أفاد Kox وآخرون، (2005) عن اختبار التفاعل المتسلسل للبوليميراز – تعدد أشكال طول الشظايا المحدِّدة شمل جزءاً من جينة *سيتوكروم أوكسيداز الثاني Cytochrome oxidase II* (*COII*) يمكن استخدامه للتمييز بين الأنواع الأربعة المستهدفة. ثم دُرس تخصص الاختبار بتحليل أربعة أنواع إضافية من *ليريوميزا Liriomyza* هي: ل. ستريغاتا *L. strigata*، ول. لانجاي *L. langei*، ول. كيننسيس *L. chinensis*، ول. سكورزونيرا *L. scorzonerae*. ولم يتسن التمييز بين عينتي *ل. لانجاي L. langei*، ول. هويدوبرنسيس *L. huidobrensis* بواسطة هذا الاختبار. أما الأنواع الثلاثة الأخرى فقد تسنى الفصل بينها.

1-3-2-4 تضخيم جينة سيتوكروم أوكسيداز الثاني (COII)

وفقاً لما أورده Kox وآخرون (2005)، تُضخَّم العينات في خليط تفاعل مقداره 50 ميكرولتراً يتكون من الكميات النهائية التالية من الكواشف: 0.6 ميكرومتر من كل بادئ، و0.2 مليمولار من النكليوتيدات ثلاثية الفوسفات، ووحدة من بوليميراز الحمض النووي HotStarTaq[1]، وx1 دارئ للتفاعل المتسلسل للبوليميراز، و1.5 مليمولار من كلوريد المغنيزيوم $MgCl_2$. ويتضمن كل تفاعل إما 1-5 ميكرولترات من الحمض النووي كنموذج وإما ماء مناسباً للتفاعل المتسلسل للبوليميراز كشاهد سلبي. ويُنفَّذ التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام زوج البوادئ التالي:

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

K-N-3785Lir-reverse (R): 5´-GTT(A/T)AAGAGACCATT(A/G)CTTG-3´ (Kox *et al.*, 2005)

أما بارامترات التدوير الحراري للتفاعل المتسلسل للبوليميراز فهي مرحلة أولية لإزالة الخواص الطبيعية على حرارة 95 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة، تليها 35 دورة (على حرارة 94 درجة مئوية لمدة 15 ثانية، ثم 55 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة، فـ 72 درجة مئوية لمدة 45 ثانية)، وتعقبها مرحلة استطالة أخيرة على حرارة تبلغ 72 درجة مئوية لمدة 10 دقائق، قبل أن تبّرد على درجة حرارة البيئة المحيطة. وبعد التضخيم بالتفاعل المتسلسل للبوليميراز، تخضع 5 ميكرولترات من مُنتج التفاعل للرحلان الكهربائي على هلام الأجاروز بنسبة 1.5 في المائة في دارئ من ثلاثي أسيتات حمض الإيثيليندياميـن رباعي الخليك (TAE) (EDTA) على سلم حمض نووي يبلغ حجمه 100 زوج قواعد (bp) لتأكيد وجود منتجات التفاعل المتسلسل للبوليميراز قبل تحليل تعدد أشكال طول الشظايا المحَدِّدة.

ولا يُعتبر التفاعل المتسلسل للبوليميراز لسيتوكروم أوكسيداز الثاني صالحاً إلا في الحالتين التاليتين:

- إذا أدى الشاهد الإيجابي إلى منتج تضخيم بالحجم المتوقع لجينة سيتوكروم أوكسيداز الثاني المستهدفة
- إذا لم يؤد الشاهد السلبي للاستخلاص والشاهد السلبي للتضخيم إلى منتج تضخيم بالحجم المتوقع لجينة سيتوكروم أوكسيداز الثاني المستهدفة.

2-3-2-4 هضم المنتجات بأنزيمات القطع والفصل بينها

في كل عينة، تُهضم 5 ميكرولترات من منتج التفاعل المتسلسل للبوليميراز بأنزيمات القطع *Dde*I و*Hinf*I و*Ssp*I و*Taq*I، كل منها في تفاعل مستقل، وفقاً لتعليمات الجهة المصنّعة. ثم يُفصَل منتج التفاعل المتسلسل للبوليميراز المفكَّك بالرحلان الكهربائي على هلام الأجاروز بتركيز 3 في

[1] في هذا البروتوكول التشخيصي، تُعرض الطرق المتبعة (بما في ذلك الإشارة إلى الأسماء التجارية) بالصيغة التي نُشرت بها، لأنها هي التي تحدد مستوى الحساسية والتخصص و/أو قابلية التكرار الذي أحرز في البداية. ولا يعني استخدام أسماء الكواشف أو المواد الكيمائية أو الأجهزة في هذه البروتوكولات التشخيصية المصادقة عليها واستبعاد غيرها مما قد يكون مناسباً أيضاً. ويمكن تعديل الإجراءات المخبرية الواردة في هذه البروتوكولات لتتوافق مع معايير كل مختبر على حدة، شريطة التحقق من صحتها على نحو كاف.

المائة في دارئ من ثلاثي أسيتات على سلم حمض نووي من 100 زوج قواعد (bp) ليتسنى تحديد حجم الشظايا.

ولا يمكن أن يُحدد بدقة حجم شظايا المنتجات المهضومة التي تم فصلها ضمن ظروف الرحلان الكهربائي المعروضة أعلاه، إلا أن قيم فصل نسبية تُستخدم لمقارنة النتائج بملامح تعدد أشكال طول الشظايا المحَدِّدة المتوقعة للأنواع. ويمكن اختبار عينات الشواهد الإيجابية التي تضم شظايا ذات أحجام وأنماط معروفة بموازاة عينات الاختبار كي يتسنى مقارنة الأحجام بدقة أكبر. وينبغي إدراج شاهد إيجابي في كل أنزيم قطع يخضع للاختبار للتأكد من أن الأنزيم يقطع الحمض النووي حسبما هو متوقع. ولا يُعتبر اختبار تعدد أشكال طول الشظايا المحدِّدة صحيحاً إلا إذا أنتج الشاهد الإيجابي شظايا من الحجم المتوقع لجينة سيتوكروم أوكسيداز الثاني (*COII*) المستهدفة. وتتيح أنماط تعدد أشكال طول الشظايا المحدِّدة التي تظهر على هلام الأجاروز إمكانية التمييز بين أنواع *ليريوميزا* *Liriomyza* الأربعة المستهدفة. وترد الملامح التشخيصية للأنواع في الجدول 2 بحسب الأنزيم. وإذا كانت ملامح الشظية المركبة في عيّنة ما تطابق الملامح المعروفة لشظية أحد الأنواع الخمسة الواردة في الجدول، يمكن الاستنتاج بأن العيّنة تمثل ذلك النوع بناءً على الاختبار. أما إذا لم تطابق ملامح الشظايا الملامح المعروفة لشظايا أحد الأنواع، فلا تُشخَّص العينة باعتبارها تمثل أحد الأنواع بناءً على الاختبار. وإذا شُخصت عينة باعتبارها تمثل ل. هويدوبرنسيس *L. huidobrensis*، فقد تكون هناك حاجة إلى إجراء مزيد من الاختبارات للتأكد من أنها ليست النوع المموه ل. لانجاي *L. langei* (القسم 4-2-5).

الجدول 2- ملامح تعدد أشكال طول الشظايا المحدِّدة لأنواع *ليريوميزا* *Liriomyza*

	الأحجام المتوقعة للشظايا (أزواج القواعد) بحسب أنزيمات القطع			
النوع	*DdeI*	*HinfI*	*SspI*	*TaqI*
ليريوميزا بريونيا *L. bryoniae*	*790*	*421 و369*	*392 و326 و72*	*486 و163 و111 و30*
ليريوميزا هويدوبرنسيس *L. huidobrensis*†	*790*	*421 و369*	*399 و391*	*306 و163 و159 و111 و30 و21*
ليريوميزا ساتيفا *L. sativae* *"الولايات المتحدة الأمريكية"* ‡	*567 و223*	*421 و282 و59 و27*	*399 و391*	*306 و210 و163 و81 و30*
ليريوميزا ساتيفا *L. sativae* *"آسيا"* ‡	*790*	*421 و310 و59*	*717 و73*	*306 و210 و163 و81 و30*
ليريوميزا ستريغاتا *L. strigata*	*790*	*421 و342 و27*	*399 و391*	*267 و219 و141 و72 و67*
ليريوميزا تريفوليي *L. trifolii*	*619 و171 أو 386 و223 و171*	*421 و310 و59*	*391 و326 و73*	*306 و163 و159 و141 و21 أو306 و163 و159 و111 و30 و21*

المصدر: بيانات مستقاة من Kox وآخرين (2005).

† بما في ذلك النوع المموه ل. لانجاي *L. langei*.

‡ إن "الولايات المتحدة الأمريكية" و"آسيا" من السلالات البديلة، وكلاهما من نوع ل. ساتيفا *L. sativae*.

4-2-4 بوادئ التفاعل المتسلسل للبوليميراز المرتبطة بالأنواع لتحديد الأنواع الأربعة المستهدفة

أفاد Nakamura وآخرون (2013) عن اختبار تفاعل متسلسل للبوليميراز متعدد الطبقات للتمييز بين الأنواع الأربعة المستهدفة بدون الحاجة إلى تنفيذ عملية الهضم بالقطع ما بعد التفاعل.

ويستخدم هذا الاختبار ستة بوادئ تستهدف جينة سيتوكروم أوكسيداز الأول (*COI*). وترتبط كل بادئة من هذه البوادئ الخمس بسلسلة يتفرد بها نوع محدد من أنواع *ليريوميزا Liriomyza*، وتُستخدم البوادئ الخمس باعتبارها بوادئ أمامية. أما البادئة السادسة فترتبط بجزء من جينة سيتوكروم أوكسيداز الأول (*COI*) المحفوظ لدى جميع أنواع *ليريوميزا Liriomyza*، ويستخدم بمثابة بادئة عكسية، لاستكمال مزاوجة البوادئ. ويمكن استخدام حجم منتجات التفاعل المتسلسل للبوليميراز للتمييز بين ل. بريونيا *L. bryoniae*، ول. هويدوبرنسيس *L. huidobrensis*، ول. ساتيفا *L. Sativae*، ول. تريفوليي *L. trifolii*، ول. كيننسيس *L. chinensis*. وخلافاً لاختبار التفاعل المتسلسل للبوليميراز - تعدد أشكال طول الشظايا المحَدِّدة الذي أجراه Kox وآخرون (2005) (القسم 4-2-3)، لم يتم التثبت من تخصص هذا الاختبار فيما يتعلق بـ*ل. ستريغاتا L. strigata*.

1-4-2-4 تضخيم جينة سيتوكروم أوكسيداز الأول (COI)

وفقاً لما أورده Nakamura وآخرون (2013)، تُضخَّم العينات في خليط تفاعل مقداره 10 ميكرولترات يتكون من نسب التركيز النهائية التالية للكواشف: 0.5 ميكرومتر من كل بادئة من البوادئ الستة، و0.2 مليمولار من نكليوتيدات ثلاثي الفوسفات، ووحدة من بوليميراز الحمض النووي TaKaRa Ex Taq[1]، ودارئ للتفاعل المتسلسل للبوليميراز TaKaRa Ex Taq[1] x1، و2 مليمولار من كلوريد المغنيزيوم $MgCl_2$. ويتضمن كل تفاعل إما 0.5 ميكرولتر من الحمض النووي كنموذج أو ماء صالح للتفاعل المتسلسل للبوليميراز كشاهد سلبي. ويُنفَّذ التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام البوادئ الستة التالية التي صممها Nakamura وآخرون (2013):

Lb600-F: 5′-CTAGGAATGATTTATGCAATG-3′

Lc920-F: 5′-CATGACACTTATTATGTTGTTGCA-3′

Lh1150-F: 5′-CAATCGGATCTTCAATTTCCCTTC-3′

Ls1040-F: 5′-TTATTGGTGTAAATTTAACC-3′

Lt780-F: 5′-TTATACACCAACTACTTTGTGAA-3′

L1250-R: 5′-GAATWGGRWAAATYACTTGACGTTG-3′

أما بارامترات التدوير الحراري للتفاعل المتسلسل للبوليميراز فهي مرحلة أولية لإزالة الخواص الطبيعية على حرارة تبلغ 94 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة، تليها 32 دورة (على حرارة 94 درجة مئوية لمدة 30 ثانية، ثم 55 درجة مئوية لمدة 30 ثانية، و72 درجة مئوية لمدة دقيقتين). ويمكن رؤية منتجات التفاعل المتسلسل للبوليميراز بالرحلان الكهربائي على هلام الأجاروز بتركيز 1.8 في المائة على سلم حمض نووي من 100 زوج قواعد ليتسنى تحديد حجم المنتج.

ولا يُعتبر التفاعل المتسلسل للبوليميراز المتعدد لسيتوكروم أوكسيداز الأول صحيحاً إلا في الحالتين التاليتين:

- إذا أدى الشاهد الإيجابي إلى منتج تضخيم من الحجم المتوقع لجينة سيتوكروم أوكسيداز الأول المستهدفة
- إذا لم يؤد الشاهد السلبي للاستخلاص والشاهد السلبي للتضخيم إلى منتج تضخيم بالحجم المتوقع لجينة سيتوكروم أوكسيداز الأول المستهدفة.

أما أحجام منتجات التفاعل المتسلسل للبوليميراز المتوقعة للأنواع الخمسة فهي 649 زوج قواعد (ل. بريونيا *L. bryoniae*)، و359 زوج قواعد (ل. كيننسيس *L. chinensis*)، و107 أزواج قواعد (ل. هويدوبرنسيس *L. huidobrensis*/ل. لانجاي *L. langei*)، و207 أزواج قواعد (ل. ساتيفا *L. sativae*)، و461 أزواج قواعد (ل. تريفوليي *L. trifolii*). ولا يمكن أن يُحدد بدقة حجم شظايا منتجات التفاعل المتسلسل للبوليميراز المفصولة في ظروف الرحلان الكهربائي المعروضة أعلاه، ولكن تُستخدم قيم فصل نسبية لمقارنة النتائج بملامح البوادئ المرتبطة بالأنواع والمتوقعة لها. ويمكن اختبار عينات الشواهد الإيجابية التي يُعرف حجم شريطها الخاص بالأنواع بموازاة عينات الاختبار كي يتسنى مقارنة الأحجام بدقة أكبر.

ويُستنتج أن العينة تمثل أحد الأنواع الخمسة إذا أدت إلى منتج وحيد للتفاعل المتسلسل للبوليميراز من الحجم المتوقع لهذا النوع. ولا يمكن أن يميز هذا الاختبار بين ل. هويدوبرنسيس *L. huidobrensis* ول. لانجاي *L. langei*. وإذا اشتُبه في أن عينة تمثل ل. هويدوبرنسيس *L. huidobrensis*، فقد تكون هناك حاجة إلى إجراء مزيد من الاختبارات للتأكد من أنها ليست النوع المموه من ل. لانجاي *L. langei* (القسم 4-2-5). وقد صُمم هذا الاختبار لتحديد هوية *ليريوميزا Liriomyza* في اليابان، وقد وُجّه التخصص لهذا الغرض. ونتيجة لذلك، لم يتم التحقق من تفاعل هذا النوع مع ل. ستريغاتا *L. strigata* وأعداد نوع ل. تريفوليي *L. trifolii* خارج اليابان.

4-2-5تمييز النوعين المموهين ل. لانجاي *L. langei* ول. هويدوبرنسيس *L. huidobrensis*

4-2-5-1 التفاعل المتسلسل للبوليميراز - تعدد أشكال طول الشظايا المحَدِّدة

وصف Scheffer وآخرون (2001) اختباراً للتفاعل المتسلسل للبوليميراز - تعدد أشكال طول الشظايا المحَدِّدة من أجل التمييز بين ل. هويدوبرنسيس *L.* huidobrensis ول. لانجاي *L. langei*، بناءً على تغير في الموقع المتقدري بما في ذلك جزء من جينة سيتوكروم أوكسيداز الأول، ولوسين الحمض النووي الريبي المرسال (tRNA)، وجينة سيتوكروم أوكسيداز الثاني بأكملها. ويُضخَّم هذا الموقع الذي يضم 1 031 زوج قواعد باستخدام بادئتين أوردهما Simon وآخرون (1994):

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

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

أما بارامترات التدوير الحراري للتفاعل المتسلسل للبوليميراز: مرحلة أولية لإزالة الخواص الطبيعية على حرارة 92 درجة مئوية لمدة دقيقتين، تليها 35 دورة (على حرارة 92 درجة مئوية لمدة دقيقة و30 ثانية، ثم 50 درجة مئوية لمدة دقيقة و30 ثانية، و72 درجة مئوية لمدة دقيقتين وثلاثين ثانية)، وتعقبها مرحلة استطالة أخيرة على حرارة 72 درجة مئوية لمدة 7 دقائق. وبعد تضخيم التفاعل المتسلسل للبوليميراز، يخضع مُنتجه للرحلان الكهربائي على سلم للحمض النووي من أجل التحقق من نجاح التفاعل المتسلسل للبوليميراز قبل إجراء تحليل تعدد أشكال طول الشظايا المحَدِّدة.

ولا يُعتبر التفاعل المتسلسل للبوليميراز لسيتوكروم أوكسيداز الأول – سيتوكروم أوكسيداز الثاني صحيحاً إلا في الحالتين التاليتين:

- إذا أدى الشاهد الإيجابي إلى منتج تضخيم بالحجم المتوقع لجينة سيتوكروم أوكسيداز الثاني المستهدفة
- إذا لم يؤد الشاهد السلبي للاستخلاص والشاهد السلبي للتضخيم إلى منتج تضخيم بالحجم المتوقع لجينة سيتوكروم أوكسيداز الثاني المستهدفة.

وفي كل عينة، يُهضم منتج التفاعل المتسلسل للبوليميراز بأنزيمي القطع *Spe*I و*Eco*RV، كل منهما في تفاعل منفصل عن الآخر، وفقاً لتعليمات الجهة المصنّعة. ثم يُفصَل منتج التفاعل المتسلسل للبوليميراز المهضوم بالرحلان الكهربائي على هلام الأجاروز بتركيز 1.5 في المائة على سلم حمض نووي من 100 زوج قواعد (bp) ليتسنى تحديد حجم الشظايا.

ولا يمكن أن يُحدد بدقة حجم شظايا المنتجات المهضومة المفصولة في ظروف الرحلان الكهربائي المعروضة أعلاه، ولكن قيم فصل نسبية تُستخدم لمقارنة النتائج بملامح تعدد أشكال طول الشظايا المحَدِّدة المتوقعة للأنواع. ويمكن اختبار عينات الشواهد الإيجابية التي تضم شظايا ذات أحجام وأنماط معروفة بموازاة عينات الاختبار، كي يتسنى مقارنة الأحجام بدقة أكبر. وينبغي إدراج شاهد إيجابي في كل أنزيم قطع يخضع للاختبار للتأكد من أن الأنزيم يقطع الحمض النووي بحسب ما هو متوقع. ولا يُعتبر اختبار تعدد أشكال طول الشظايا المحدِّدة صحيحاً إلا إذا أنتج الشاهد الإيجابي شظايا من الحجم المتوقع للجينة المستهدفة.

وتُنتج عينات ل. هويدوبرنسيس *L. huidobrensis* شظية واحدة غير متقطعة (1 031 زوج قواعد) عندما تُهضم بأنزيم *Spe*I وشظيتين متقطعتين (175 زوج قواعد و856 زوج قواعد) عندما تُهضم بأنزيم *Eco*RV. وفي المقابل، تُنتج عينات ل. لانجاي *L. langei* شظيتين متقطعتين (420 زوج قواعد و611 زوج قواعد) عندما تُهضم بأنزيم *Spe*I، وشظية واحدة غير متقطعة (1 031 زوج قواعد) عندما تُهضم بأنزيم *Eco*RV. وإذا كانت ملامح الشظية المركبة في عيّنة ما تطابق هذه الملامح المعروفة للشظايا، فيمكن الاستنتاج بأن العيّنة تمثل ذلك النوع بناءً على الاختبار.

2-5-2-4 مقارنة تسلسل الحمض النووي

قدم Scheffer (2000) معلومات عن التفاعل المتسلسل للبوليميراز وتسلسل الحمض النووي فيما يتعلق بموقع حمض نووي متقدري يتضمن تسلسلات جزئية لجينة سيتوكروم أوكسيداز الأول وسيتوكروم أوكسيداز الثاني، يمكن من خلالها التمييز بين النوعين المموهين ل. هويدوبرنسيس *L. huidobrensis* ول. لانجاي *L. langei*. وتضمَّن منشور لاحق أصدره Scheffer وآخرون (2006) تسلسلات إضافية للطرف 3' من جين سيتوكروم أوكسيداز الأول لفحص تنوع الأنواع. وحُللت هذه البيانات باستخدام التقنيات التاريخية العرقية الجزيئية، ولكنها لم تُطوَّر في شكل بروتوكولات تشخيصية.

6-2-4 التشفير الشريطي للحمض النووي

تُبذل حالياً جهود لتأسيس مصادر تصنيفية أشمل لسجلات تسلسل الحمض النووي فيما خص الجزء 5' من جينة سيتوكروم أوكسيداز الأول في *ليريوميزا* *Liriomyza* المستخدمة في دراسات الشفرة الشريطية للحمض النووي للحيوانات (Bhuiya وآخرون، 2011؛ وMaharjan وآخرون، 2014، على سبيل المثال). وتوجد حالياً سجلات للشفرة الشريطية للحمض النووي لـ 31 نوعاً من *ليريوميزا* *Liriomyza* (بما فيها الأنواع الأربعة المستهدفة)، وهي متاحة على نظام بيانات الشفرة الشريطية للحياة (Barcode of Life Data System (BOLD)) (http://www.boldsystems.org). وترد شفرات شريطية وإجراءات بديلة على موقع Q-bank (*www.q-bank.eu*)، وهو عبارة عن قاعدة بيانات منظمة تضم تسلسلات مستمدة من مواد مرجعية. وتضمنت دراسة أُنجزت مؤخراً (Maharjan وآخرون، 2014) تفاصيل بشأن الفصل بين ل. هويدوبرنسيس *L. huidobrensis*، ول. تريفوليي *L. trifolii*، ول. ساتيفا *L. sativae*، *ول. بريونيا* *L. bryoniae*، ول. كيننسيس *L. chinensis*. ورغم هذا التقدم في المصادر المتعلقة بتسلسلات الحمض النووي، فإن المنهجية المتبعة ليست موصوفة وصفاً مفصلاً في هذه الدراسة فيما يتعلق بتحديد أنواع *ليريوميزا* *Liriomyza* لأن قواعد تفسير هذه الموارد لم تُنشر في البحوث العلمية. وينبغي توخي العناية في تفسير نتائج تحديد التشفير الشريطي للحمض النووي، مراعاة لمسائل محتملة تشمل ما يلي: (1) تضخيم تفضيلي محتمل للتفاعل المتسلسل للبوليميراز لأشباه الطفيليات أو لنسخ متقدرية نووية لجينة سيتوكروم أوكسيداز الأول (أي جينات كاذبة متقدرية نووية (numt)؛ (2) إمكانية التصنيف خطأً مع أنواع شقيقة وثيقة الترابط (أي مُركّبات الأنواع)؛ (3) نطاق مختلف من التغطية الجغرافية للعينات المرجعية في قواعد البيانات الخاصة بتسلسل الحمض النووي.

5- السجلاّت

يجب الاحتفاظ بالسجلات والبراهين بالطريقة الموصوفة في القسم 2-5 من المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية رقم 27 (بروتوكولات تشخيص الآفات الخاضعة للوائح).

وفي الحالات التي قد تتأثر فيها أطراف متعاقدة أخرى بنتائج التشخيص ينبغي الاحتفاظ بالسجلات والأدلة والمواد الإضافية لسنة واحدة على الأقل بطريقة تضمن الاقتفاء: العينات المحفوظة أو الموضوعة على شرائح، وصور فوتوغرافية لبنى تصنيفية مميزة ومستخلصات للحمض النووي وصور فوتوغرافية لأنواع الهلام.

6- جهات الاتصال للحصول على معلومات إضافية

يمكن الحصول على معلومات إضافية بشأن هذا البروتوكول من:

State Government of Victoria Department of Economic Development, Jobs, Transport and Resources, AgriBio, 5 Ring Road, Bundoora, Vic. 3083, Australia (Mallik Malipatil; e-mail: mallik.malipatil@ecodev.vic.gov.au; tel.: +61 3 9032 7302; fax: +61 3 9032 7604).

Fera Science Ltd (Fera), National Agri-Food Innovation Campus, Sand Hutton, York, YO41 1LZ, United Kingdom (Dominique Collins; e-mail: dom.collins@fera.co.uk; tel.: +44 1904 462215; fax: +44 1904 462111).

يمكن التقدم بطلب لتنقيح بروتوكول للتشخيص من قبل المنظمات الوطنية لوقاية النباتات، أو المنظمات الإقليمية لوقاية النباتات أو الأجهزة الفرعية لهيئة تدابير الصحة النباتية من خلال أمانة الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات (ippc@fao.org) وهي بدورها تحيله إلى الفريق التقني المعني ببروتوكولات التشخيص.

7- شكر وتقدير

حرر المسودة الأولى لهذا البروتوكول كل من Mallik B. Malipatil (وزارة التنمية الاقتصادية ومناصب العمل والنقل والموارد في حكومة ولاية فيكتوريا، أستراليا)، وDominique W. Collins (Fera، المملكة المتحدة) و Mark Blacket (وزارة التنمية الاقتصادية، ومناصب العمل والنقل والموارد في حكومة ولاية فيكتوريا، أستراليا)، وقام Norman Barr (دائرة التفتيش المعنية بشؤون الصحة الحيوانية والنباتية التابعة لوزارة الزراعة في الولايات المتحدة) بصياغة القسم المتعلق بتحديد الهوية الجزيئي.

وقدم المراجعون التالية أسماؤهم تعليقات حول مسودة هذه الوثيقة: Stephen Gaimari (قسم الأغذية والزراعة بكاليفورنيا، الولايات المتحدة الأمريكية)، وAnthony Rice (وزارة الزراعة والموارد المائية، أستراليا)، وRen Iwaizumi (محطة يوكوهاما لوقاية النبات في وزارة الزراعة والغابات ومصايد الأسماك، اليابان) وRamona Vaitkevica (إدارة وقاية النباتات، لاتفيا).

8- المراجع

يشير هذا الملحق إلى المعايير الدولية لتدابير الصحة النباتية. إن المعايير الدولية لتدابير الصحة النباتية متاحة على البوابة الدولية للصحة النباتية على العنوان https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/ispms.

Bhuiya, B.A., Amin, S. & Mazumdar, S. 2011. First report of vegetable leafminer *Liriomyza sativae* Blanchard (Diptera: Agromyzidae) through DNA barcoding from Bangladesh. *Journal of Taxonomy and Biodiversity Research*, 5: 15–17.

Blacket, M.J., Rice, A.D., Semeraro, L. & Malipatil, M.B. 2015. DNA-based identifications reveal multiple introductions of the vegetable leafminer *Liriomyza sativae* (Diptera: Agromyzidae) into the Torres Strait Islands and Papua New Guinea. *Bulletin of Entomological Research*, doi: 10.1017/S0007485315000383

Blanchard, E.E. 1926. A dipterous leaf-miner on *Cineraria*, new to science. *Revista de la Sociedad Entomologica Argentina*, 1: 10–11.

Boucher, S. 2010. Family Agromyzidae (leaf-mining flies). *In* B.V. Brown, A. Borkent, J.M. Cumming, D.M. Wood, N.E. Woodley & M. Zumbado, eds. *Manual of Central American Diptera*, Vol. 2, pp. 1057–1071. Ottawa, National Research Council. 728 pp.

CABI. 2013. Crop protection compendium. Wallingford, UK, CABI. Available at http://www.cabicompendium.org/cpc/home.asp (last accessed 24 August 2014).

Dempewolf, M. 2001. Larvalmorphologie und Phylogenie der Agromyzidae *(Diptera)*.University of Bielefeld, Germany (Dissertation)

Dempewolf, M. 2004. Arthropods of economic importance: Agromyzidae. Amsterdam, Netherlands Biodiversity Information Facility. Available at http://wbd.etibioinformatics.nl/bis/agromyzidae.php (last accessed 24 August 2014).

Ellis, W.N. n.d. Leafminers and plant galls of Europe. Available at http://www.bladmineerders.nl/ (last accessed 24 August 2014) (in English and Dutch).

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2005. *Liriomyza* spp. PM 7/53(1). *EPPO Bulletin,* 35: 335–344.

Ferrar, P.A. 1987. A guide to the breeding habits and immature stages of Diptera: Cyclorrhapha. *Entomograph,* 8: 1–907.

Fisher, N., Ubaidillah, R., Reina, P. & La Salle, J. 2005. *Liriomyza* parasitoids of Southeast Asia. Melbourne, Australia, CSIRO. Available at http://www.ento.csiro.au/science/Liriomyza_ver3/index.html (last accessed 24 August 2014).

Frick, K.E. 1951. *Liriomyza langei*, a new species of leaf-miner of economic importance in California. *Pan-Pacific Entomologist,* 21: 81–88.

Griffiths, G.C.D. 1962. Breeding leaf-mining flies and their parasites. *Entomologist's Record and Journal of Variation,* 74: 178–185, 203–206.

Hennig, W. 1958. Die Familien der Diptera Schizophora und ihre phylogenetischen Verwandschaftsbeziehungen. *Beiträge zur Entomologie,* 8: 505–688.

Kox, L.F.F., van den Beld, H.E., Lindhout, B.I. & de Goffau, L.J.W. 2005. Identification of economically important *Liriomyza* species by PCR-RFLP analysis. *EPPO Bulletin,* 35: 79–85.

Lonsdale, O. 2011. The *Liriomyza* (Agromyzidae: Schizophora: Diptera) of California. *Zootaxa,* 2850: 1–123.

Maharjan, R., Oh, H-W. & Jung, C. 2014. Morphological and genetic characteristics of *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard) (Diptera: Agromyzidae) infesting potato crops in Korea. *Journal of Asia-Pacific Entomology,* 17: 281–286.

Malipatil, M.B. 2007a. Chickpea leafminer (*Liriomyza cicerina*). Pest and Disease Image Library (PaDIL). Available at http://www.padil.gov.au/pests-and-diseases/pest/main/136238 (last accessed 24 August 2014).

Malipatil, M.B. 2007b. Pea leafminer (*Liriomyza huidobrensis*). Pest and Disease Image Library (PaDIL), images and fact sheets. Available at http://www.padil.gov.au/pests-and-diseases/pest/main/136237 (last accessed 24 August 2014).

Malipatil, M.B. 2007c. American serpentine leafminer (*Liriomyza trifolii*). Pest and Disease Image Library (PaDIL), images and fact sheets. Available at http://www.padil.gov.au/pests-and-diseases/pest/main/136236 (last accessed 24 August 2014).

Malipatil, M. & Ridland, P. 2008. *Polyphagous agromyzid leafminers: Identifying polyphagous agromyzid leafminers (Diptera: Agromyzidae) threatening Australian primary industries.* Canberra, Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, Australian Government. Available at http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/leafminers/ (last accessed 24 August 2014).

Malipatil, M.B., Ridland, P.M., Rauf, A., Watung, J. & Kandowangko, D. 2004. New records of *Liriomyza* Mik (Agromyzidae: Diptera) leafminers from Indonesia. *Formosan Entomologist,* 24: 287–292.

Martinez, M. & Etienne, J. 2002. Liste systématique et biogéographique dês Agromyzidae (Diptera) de la région néotropicale. *Bollettino di Zoologia Agraria e di Bachicoltura (Serie II),* 34: 25–52 (in French).

Nakamura, S., Masuda, T., Mochizuki, A., Konishi, K., Tokumaru, S., Ueno, K. & Yamaguchi, T. 2013. Primer design for identifying economically important *Liriomyza* species (Diptera: Agromyzidae) by multiplex PCR. *Molecular Ecology Resources,* 13: 96–102.

Pape, T., Beuk, P. & Martinez, M., eds. 2013. Fauna Europaea, version 2.6. Available at http://www.faunaeur.org (last accessed 24 August 2014).

Parrella, M.P. & Bethke, J.A. 1984. Biological studies of *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae) on chrysanthemum, aster and pea. *Journal of Economic Entomology,* 77: 342–345.

Pitkin, B., Ellis, W., Plant, C. & Edmunds, R. n.d. *The leaf and stem mines of British flies and other insects.* Available at http://www.ukflymines.co.uk (last accessed 24 August 2014).

Scheffer, S.J. 2000. Molecular evidence of cryptic species within the *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). *Journal of Economic Entomology,* 93: 1146–1151.

Scheffer, S.J. & Lewis, M.L. 2001. Two nuclear genes confirm mitochondrial evidence of cryptic species within *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). *Annals of the Entomological Society of America,* 94: 648–653.

Scheffer, S.J., Lewis, M.L. & Joshi, R.C. 2006. DNA barcoding applied to invasive leafminers (Diptera: Agromyzidae) in the Philippines. *Annals of the Entomological Society of America,* 99: 204–210.

Scheffer, S.J., Wijesekara, A., Visser, D. & Hallett, R.H. 2001. Polymerase chain reaction-restriction fragment-length polymorphism method to distinguish *Liriomyza huidobrensis* from *L. langei. Journal of Economic Entomology,* 94: 1177–1182.

Shiao, S.F. 2004. Morphological diagnosis of six *Liriomyza* species (Diptera: Agromyzidae) of quarantine importance in Taiwan. *Applied Entomology and Zoology,* 39: 27–39.

Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi B., Liu, H. & Flook, P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America,* 87: 651–701.

Spencer, K.A. 1965. A clarification of the status of *Liriomyza trifolii* (Burgess) and some related species (Diptera: Agromyzidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington,* 67: 32–40.

Spencer, K.A. 1972. *Diptera, Agromyzidae.* Royal Entomological Society of London Handbooks for the Identification of British Insects, Vol. 10, Part 5(g). London, Royal Entomological Society of London. 136 pp.

Spencer, K.A. 1973. *Agromyzidae (Diptera) of economic importance.* Series Entomologica 9. The Hague, W. Junk. 418 pp.

Spencer, K.A. 1976. The Agromyzidae (Diptera) of Fennoscandia and Denmark. *Fauna Entomologica Scandinavica,* 5: parts 1 and 2.

Spencer, K.A. 1977. *A revision of the Australian Agromyzidae (Diptera).* Western Australian Museum Special Publication No. 8. 255 pp.

Spencer, K.A. 1981. *A revisionary study of the leaf-mining flies (Agromyzidae) of California.* University of California, Division of Agricultural Sciences Publication 3273. 489 pp.

Spencer, K.A. 1987. Agromyzidae. *In* J.F. McAlpine, ed. *Manual of Nearctic Diptera,* Vol. 2. Monograph no. 28, pp. 675–1332. Ottawa, Research Branch Agriculture Canada.

Spencer, K.A. 1989. Leaf miners. *In* R.P. Kahn, ed. *Plant protection and quarantine,* Vol. 2, Selected pests and pathogens of quarantine significance, pp. 77–98. Boca Raton, FL, CRC Press.

Spencer, K.A. 1990. *Host specialization in the world Agromyzidae (Diptera).* Series Entomologica 45. Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publishers. 444 pp.

Spencer, K.A. 1992. *Flycatcher: Memoirs of an amateur entomologist.* The Hague, Netherlands, SPB Academic Publishing. 414 pp.

Spencer, K.A. & Steyskal, G.C. 1986. *Manual of the Agromyzidae (Diptera) of the United States.* Agriculture Handbook 638. Washington, DC, United States Department of Agriculture. 478 pp.

Stehr, F.W. 1991. Immature Insects. Vol.2 Kendall/Hunt Publishing company, USA. 974 pp

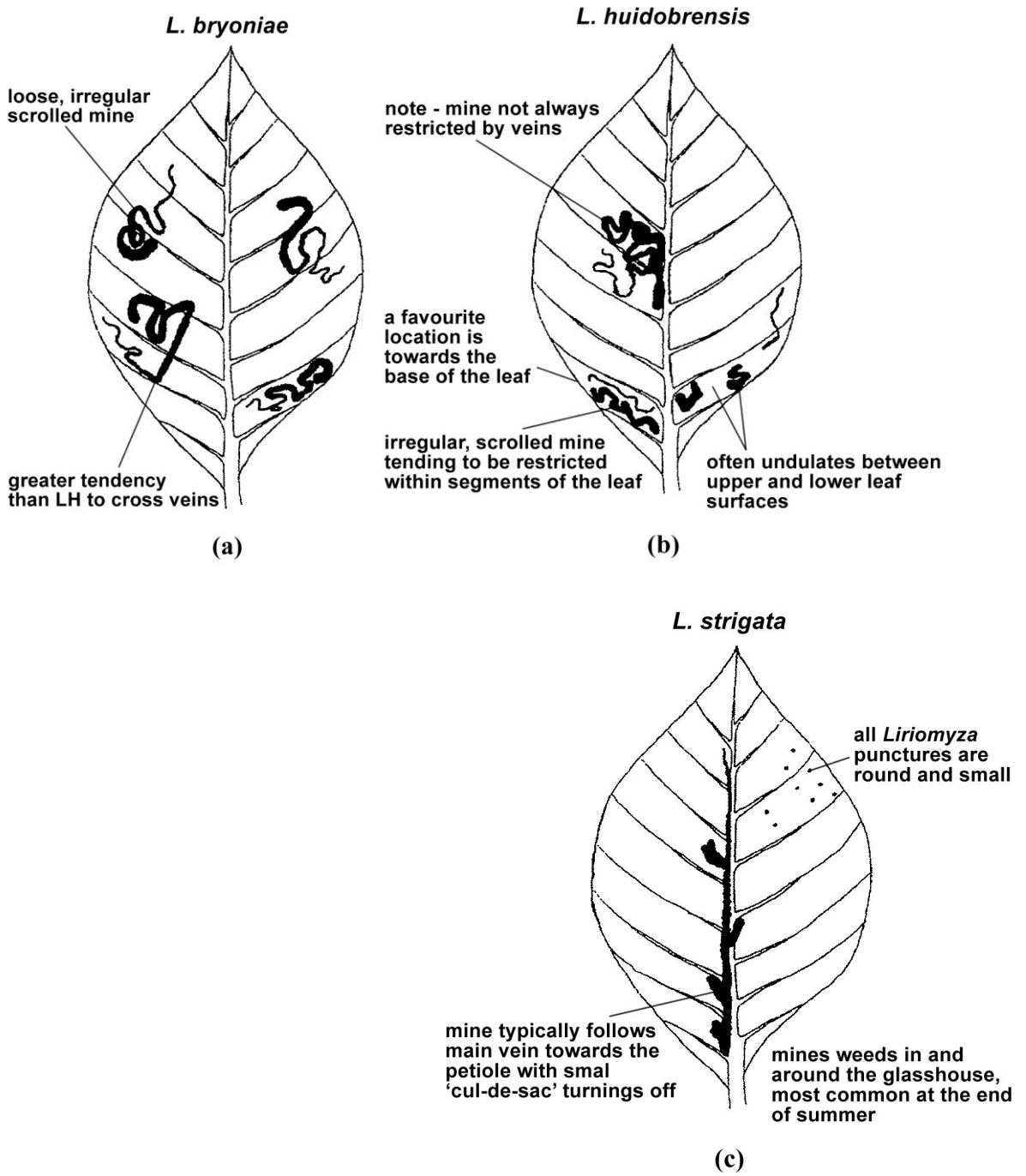
Takano, S.I., Iwaizumi, R., Nakanishi, Y. & Someya, H. 2008. Laboratory hybridization between the two clades of *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). *Applied Entomology and Zoology*, 43: 397–402.

Takano, S.I., Iwaizumi, R. Nakanishi, Y., Someya, H. & Iwasaki, A. 2005. Genetic differentiation and morphological comparison between two clades of *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard) (Diptera: Agromyzidae). *Research Bulletin of the Plant Protection Service, Japan,* 41: 43–46 (in Japanese with English summary).

Yeates, D.K., Hastings, A., Hamilton, J.R., Colless, D.H., Lambkin, C.L., Bickel, D., McAlpine, D.K., Schneider, M.A., Daniels, G. & Cranston, P. 2004. *Anatomical atlas of flies.* Melbourne, Australia, CSIRO. Available at http://www.ento.csiro.au/biology/fly/fly.html (last accessed 24 August 2014).

9-الأشكال

الشكل 1- ذبابة بالغة من نوع ليريوميزا بريونيا *Liriomyza bryoniae*.
الصورة تقدمة وزارة البيئة والأغذية والشؤون الريفية، المملكة المتحدة.



الشكل 2- الخصائص النمطية للأنفاق التي تحفرها: (أ) آفة ليريوميزا بريونيا *Liriomyza bryoniae*، (ب) ليريوميزا هويدوبرنسيس *Liriomyza huidobrensis*، (ج) ليريوميزا ستريغاتا *Liriomyza strigata*.
المصدر: EPPO (2005).

بيانات الشكل 2

ل. بريونيا (ا)
نفق رخو، غير منتظم، ملتفّ
تميل أكثر من ل. هويدوبرنسيس LH إلى عبور العروق

ل. هويدوبرنسيس (ب)
ملحوظة- لا يقيّد النفق دائما بحدود العروق
أحد مواقعها المفضلة، باتجاه قاعدة الورقة
نفق غير منتظم معوجّ يميل إلى أن يكون محددا ضمن

L. bryoniae
Loose, irregular scrolled mine
greater tendency than LH to cross veins

L. huidobrensis
note- mine not always restricted by veins
a favourite location is towards the base of the leaf
irregular scrolled mine tending to be restricted within

segments of the leaf
often undulates between upper and lower leaf surfaces

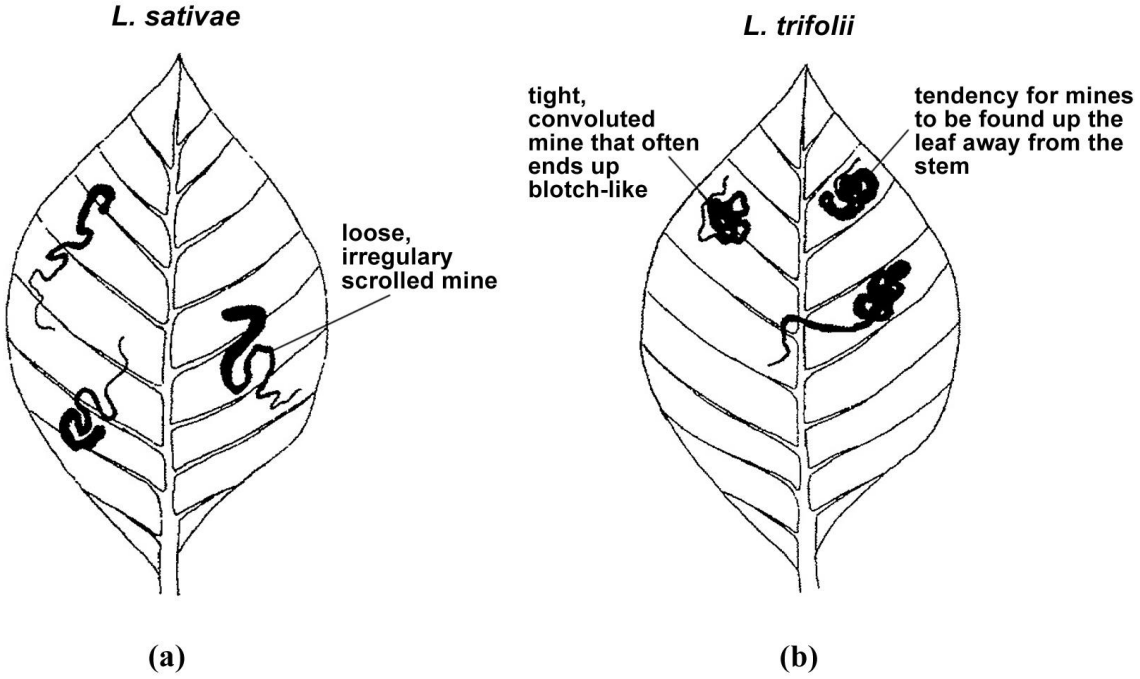
مقاطع الورقة
يتموّج في غالب الاحيان بين سطح الورقة الاعلى والاسفل

L. strigata
mine typically follows main vein towards the petiole with small 'cul-de-sac' turnings off

all Liriomyza punctures are round and small

mines weeds in and around the glasshouse, most common at the end of summer

ل. ستريغاتا (ج)
يتبع النفق عادة العرق الرئيسي نحو السويقة ويرسم منعطفات تلتف حول نفسها في "طريق مسدود"
تكون ثقوب جميع افات *ليريوميزا* *Liriomyza* *صغيرة* ومستديرة
تنتشر الانفاق في نباتات البيوت الزجاجية وحولها، واكثر ما يحدث ذلك في فصل الصيف



الشكل 3- الخصائص النمطية للأنفاق التي تحفرها (أ) آفة ليريوميزا ساتيفا *Liriomyza sativae* و(ب) ليريوميزا تريفوليي *Liriomyza trifolii*

المصدر: *EPPO* (2005).

بيانات الشكل 3

L. sativae

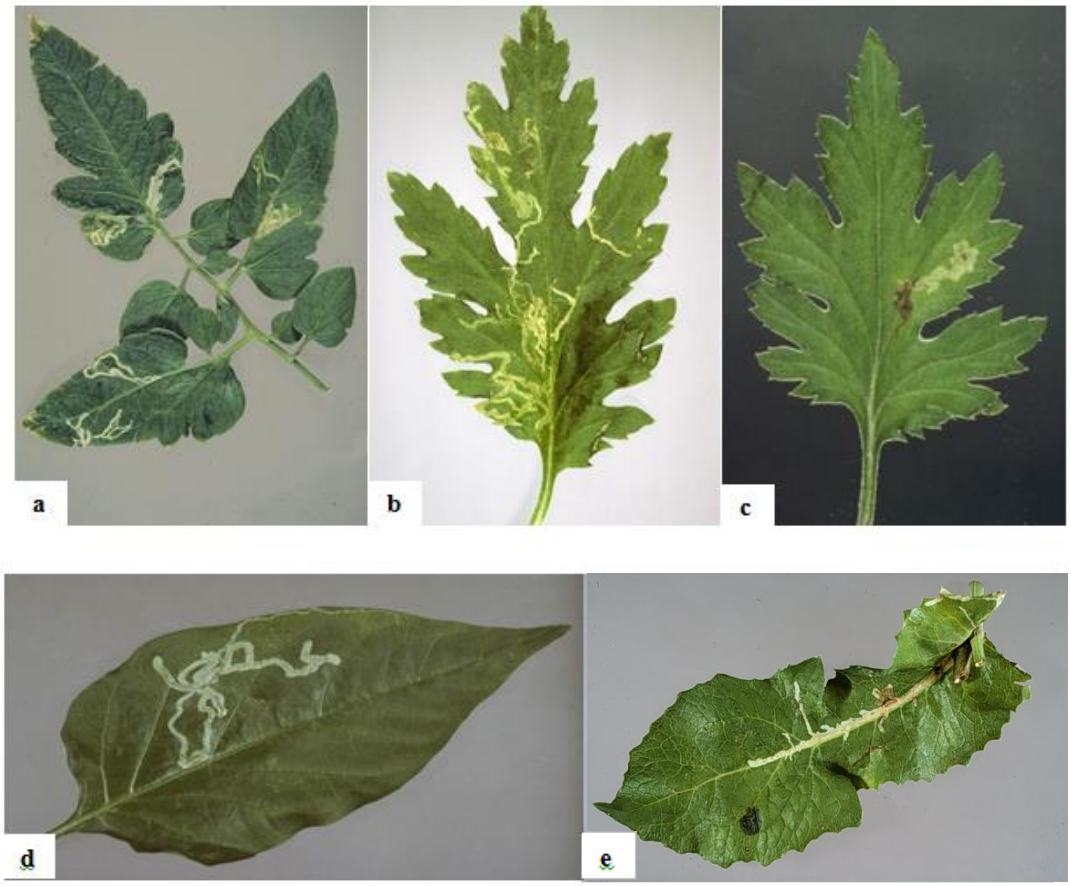
Loose, irregular scrolled mine

ل. ساتيفا

نفق رخو، غير منتظم، ملتفّ

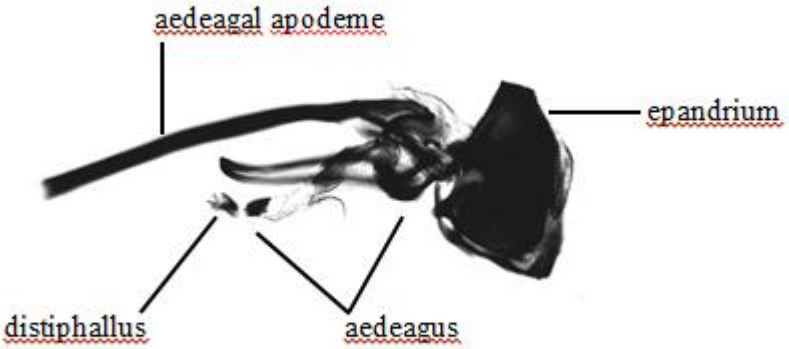
L. trifolii
tight convoluted mine that often ends up blotch-like
tendency for mines to be found up the leaf away from the stem

ل. تريفوليي
نفق ضيّق ومعقد، غالبا ما ينتهي فيما يشبه بقعة
توجد الانفاق في اعلى الورقة بعيدة عن الساق



الشكل 4ـ الأنفاق النمطية التي تحفرها آفة ليريوميزا *Liriomyza* spp.: (أ) (a) ل. بريونيا *L. Bryoniae* في الطماطم؛ و(ب) ل. هويدوبرنسيس *L. huidobrensis* على ورق الأقحوان؛ و(ج) ل. تريفوليي *L. trifolii* على ورق الأقحوان؛ و(د) ل. ساتيفا *L. sativae* على الفلفل و(ه) ل. ستريغاتا *L. strigata* على عائل غير محدّد الهوية.

الصورة تقدمة وزارة البيئة والأغذية والشؤون الريفية، المملكة المتحدة.



الشكل 5- الأعضاء التناسلية الذكرية لآفة ليريوميزا هويدوبرنسيس *Liriomyza huidobrensis* (عرض جانبي)
الصورة تقدمة وزارة البيئة والأغذية والشؤون الريفية، المملكة المتحدة.

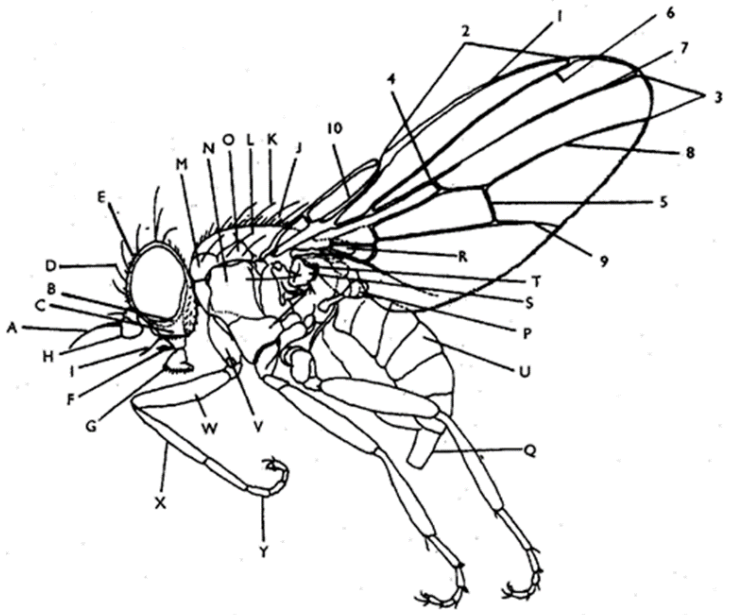
بيانات الشكل 5

الدعامة الداخلية للقضيب	aedeagal apodeme
الجزء الطرفي من القضيب	distiphallus
Epandrium	epandrium
القضيب	aedeagus

الشكل 6- بطن الذكر (أ) وبطن الأنثى (ب) لدى آفة ليريوميزا *Liriomyza*
الصورة تقدمة وزارة البيئة والأغذية والشؤون الريفية، المملكة المتحدة.

بيانات الشكل 6

"مبرد"	"file"
Epandrium	epandrium
أنبوب جدّ متصلّب	Heavily sclerotized tube



Side view of typical *Agromyza* sp. (after SASAKAWA): A = arista, B = cheek, C = jowl, D = orbital bristles, E = orbital setulae, F = palp, G = proboscis, H = third antennal segment, I = vibrissa, J = acrostichals, K = dorso-central bristles, L = mesonotum, M = humerus, N = mesopleural area, O = notopleural area, P = haltere, Q = ovipositor sheath, R = scutellum, S = squama, T = squamal fringe, U = tergites, V = coxa, W = femur, X = tibia, Y = tarsi.
1 = costa, 2 = second costal section, 3 = fourth costal section, 4 = first cross-vein, 5 = second cross-vein, 6 = R_1, 7 = R_{4+5}, 8 = M_{1+2}, 9 = M_{3+4}, 10 = sub-costa.

الشكل 7- السمات المورفولوجية لذباب الورق Agromyzidae البالغ
المصدر: *Spencer* (1973).

بيانات الشكل 7

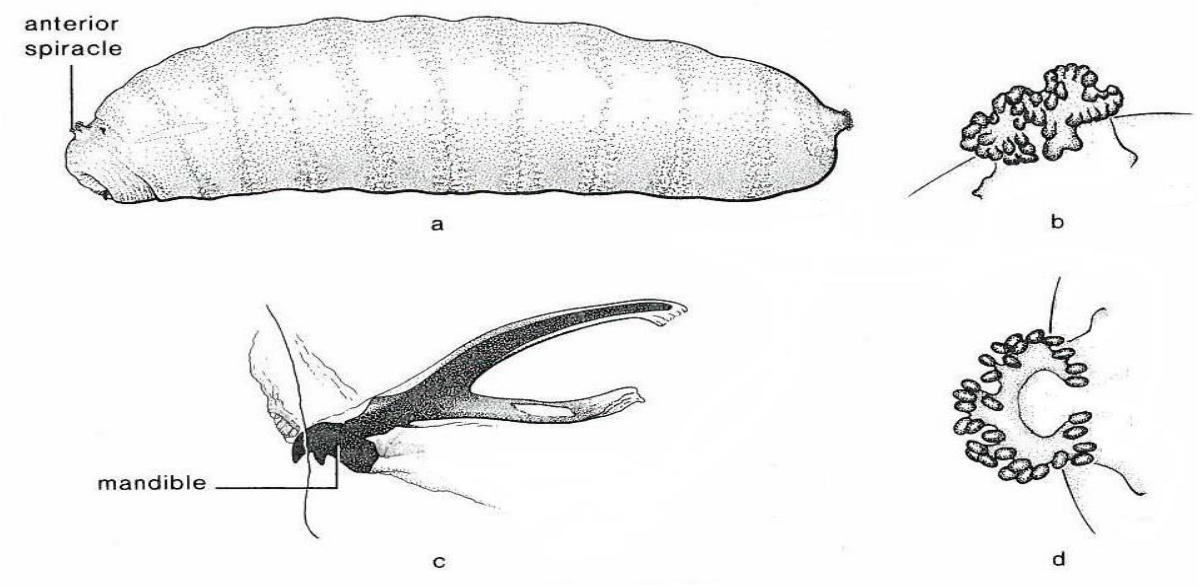
عرض جانبي لذبابة الورق Agromyza sp (بحسب Sakawa)

(ن) منطقة وسط الصدر	N=mesopleural area
(س) منطقة الصدر notopleural	O=notopleural area
(ع) أثقال	P=haltere
(ف) غمد جهاز وضع البيض	Q=ovipositor sheath
(ص) حرشفة صغيرة	R=scutellum
(ق) حراشف	S=squama
(ر) حواشي حرشفية	T=squamal fringe
(ش) ظهر البطن	U=tergites
(ت) مفصل الورك	V=coxa
(ث) فخذ	W=femur
(خ) عظم الساق	X=tibia
(ذ) القدم	Y=tarsi

Side view of typical Agromyza sp.(after Sakawa)

(أ) خيط حريري	A=arista
(ب) خدّ	B=cheek
(ج) فكّ	C=jowl
(د) شعيرات محجرية	D=orbital bristles
(ه) شعيرات محجرية	E=orbital setulae
(و) عضو للمس	F=palp
(ز) ململة	G=proboscis
(ح) المقطع الثاني من قرون الاستشعار	H=third antennal segment
(ط) شعيرات (في الأنف)	I=vibrissae
(ي) achrostichals	J=achrostichals
(ك) شعيرات وسط الظهر	K=dorso-central bristles
(ل) السطح الخارجي للجزء الأوسط من الصدر	L=mesonotum
(م) عضد	M =humerus
1= ضلع	1= costa

2=second costal section	2= الجزء الثاني من الضلع
3=fourth costal section	3= الجزء الرابع من الضلع
4=first cross-vein	4= العرق العابر الأول
5=second cross vein	5= العرق العابر الثاني
6=R1	R_1=6
7=R 4+5	R_{4+5}=7
8=M1+2	$_{+54}$=8
9=4+5	$_{+54}$=9
10=sub-costa	10= الجزء الداخلي للضلع

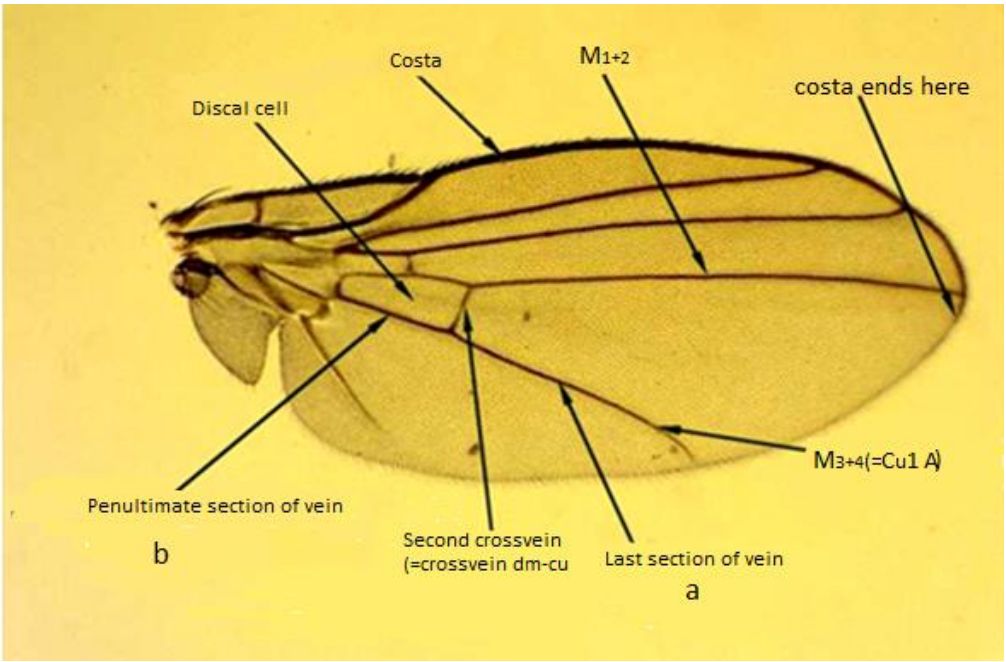


الشكل 8- السمات المورفولوجية ليرقات ذباب الورق (من نوع فيتوميزا كيلوناي *Phytomyza chelonei*): (أ) الوجهة الجانبية؛ (ب) الفتحات التنفسية الأمامية؛ (ج) الهيكل الرأسي-البلعومي cephalopharyngeal ؛ (د) االفتحات التنفسية الخلفية.

المصدر: *Stehr* (1991).

بيانات الشكل 8

فتحات تنفسية أمامية	anterior spiracle
الفكّ السفلي	mandible

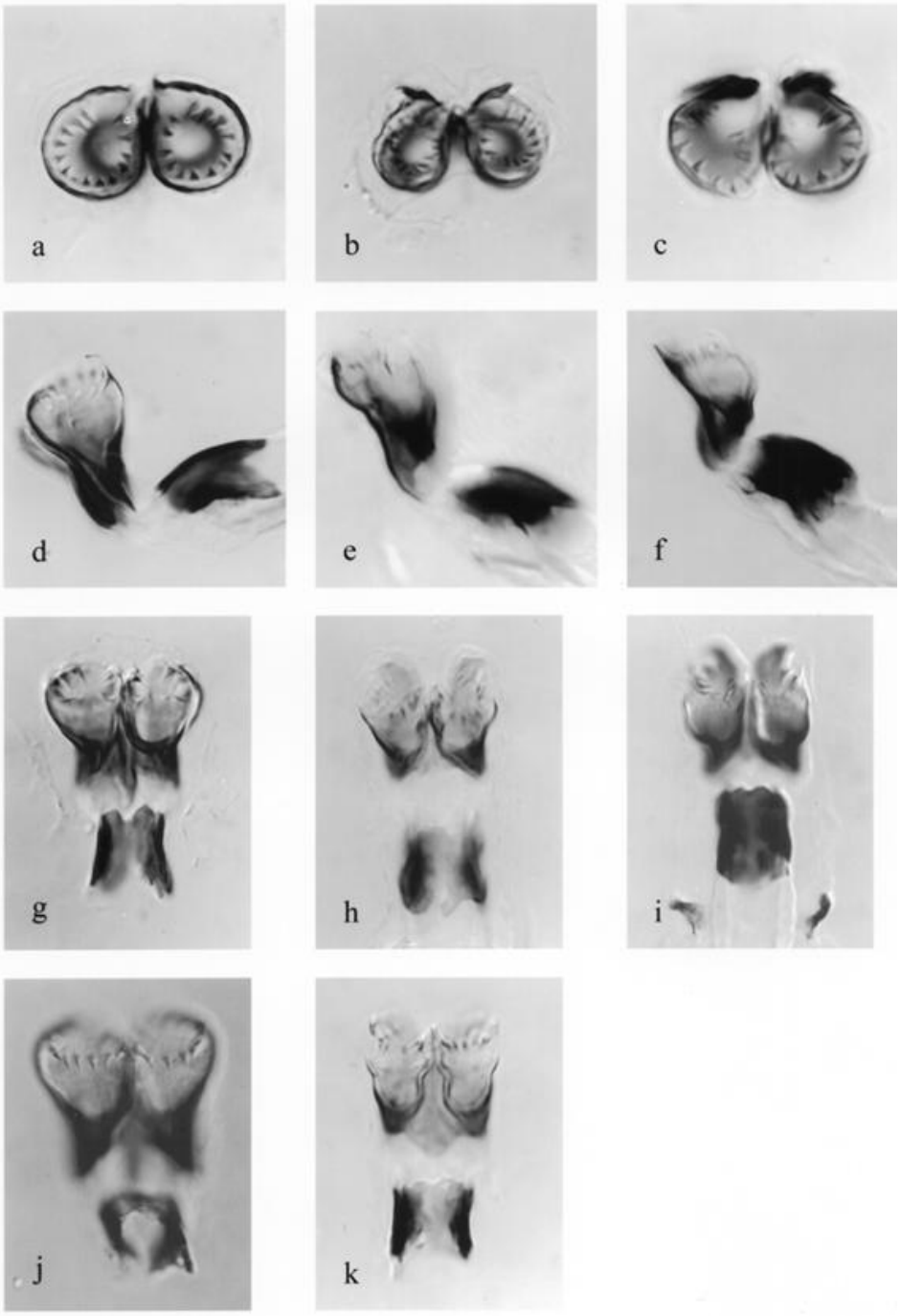


الشكل 9- تعرّق جناحي ليريوميزا *Liriomyza*

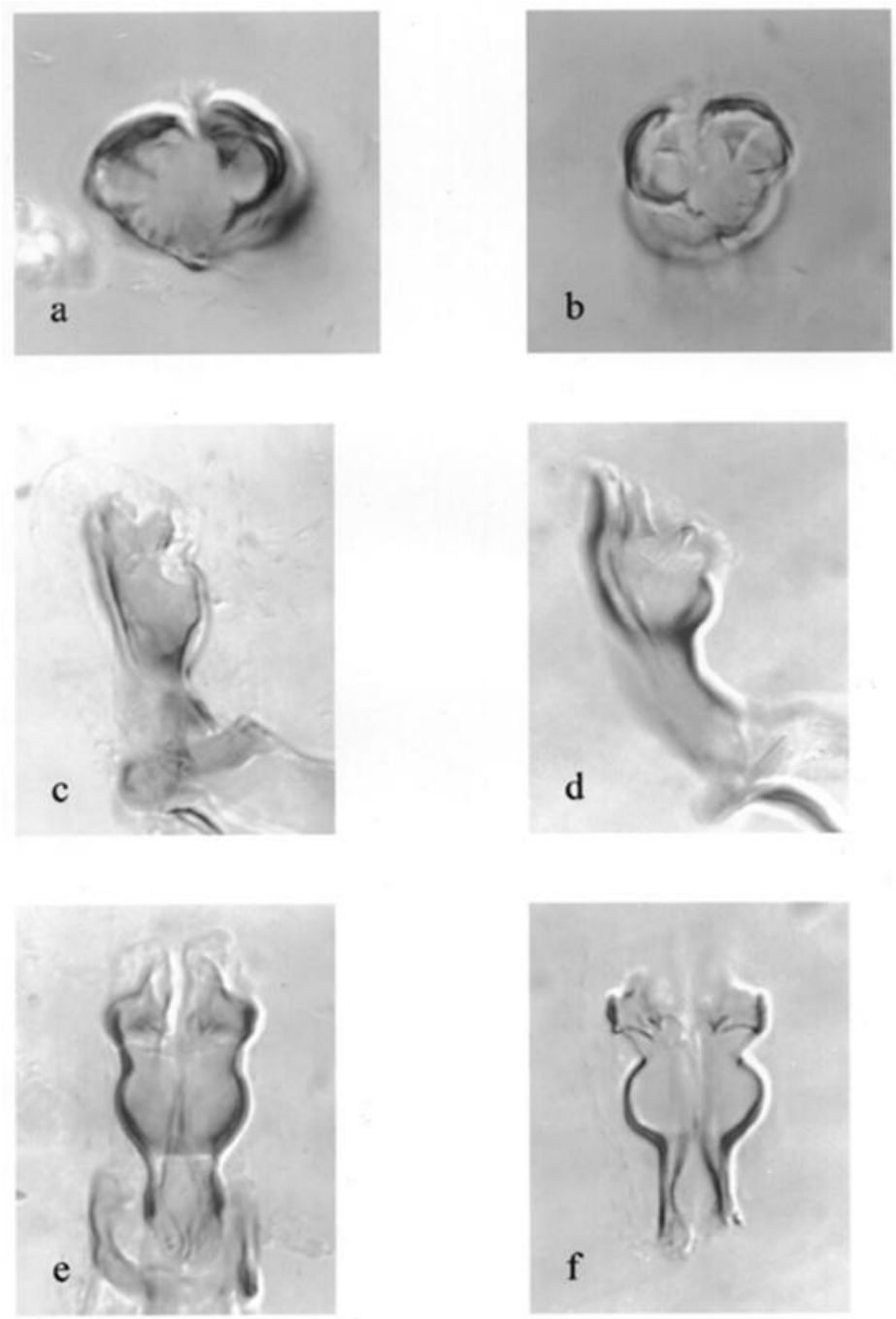
الصورة تقدمة وزارة البيئة والأراضي والمياه والتخطيط، حكومة ولاية فيكتوريا، أستراليا.

بيانات الشكل 9

الخلية القرصية	Discal cell
ضلع	Costa
M1+2	M1+2
ينتهي الضلع هنا	Costa ends here
الجزء ما قبل النهائي من العرق	Penultimate section of vein
العرق المتقاطع الثاني (= العرق المتقاطع dm-cu)	Second crossvein (=crossvein dm-cu
الجزء النهائي من العرق	Last section of vein
M3+4(=Cu1 A)	M3+4(=Cu1 A)
(ب)	B
(أ)	A



الشكل 10- الجزء الطرفي من قضيب الذكر (Distiphallus) لدى ليريوميزا *Liriomyza* (بقدرة تضخيم تبلغ 400 مرة): (أ) ل. بريونيا *L. bryoniae*، عرض للوجهة الأمامية؛ (ب) ل. هويدوبرنسيس *L. huidobrensis*، عرض للوجهة الأمامية؛ (ج) ل. ستريغاتا *L. strigata*، عرض للوجهة الأمامية؛ (د) ل. بريونيا *L. bryoniae*، عرض جانبي؛ (ه) ل. هويدوبرنسيس *L. huidobrensis*، عرض جانبي؛ (و) ل. ستريغاتا *L. strigata*، عرض جانبي؛ (ز) ل. بريونيا *L. bryoniae*، عرض ظهري بطني؛ (ح) ل. هويدوبرنسيس *L. huidobrensis*، عرض ظهري بطني؛ (ط) ل. ستريغاتا *L. strigata*، عرض ظهري بطني؛ (ي) ل. بريونيا *L. bryoniae*، عرض ظهري بطني؛ (في عرض بوجهة مختلفة عن وجهة (ز))؛ (ك) ل. هويدوبرنسيس *L. huidobrensis* ، عرض ظهري بطني (بوجهة مختلفة عن وجهة (ح)). *الصورة تقدمة وزارة البيئة والأغذية والشؤون الريفية، المملكة المتحدة.*



الشكل 11- الجزء الطرفي من قضيب الذكر (Distiphallus) لدى ليريوميزا *Liriomyza* (بقدرة تضخيم تبلغ 400 مرة): (أ) ل. ساتيفا *L. Sativae*، عرض للوجهة الأمامية؛ (ب) ل. تريفوليي *L. Trifolii*، عرض للوجهة الأمامية؛ (ج) ل. ساتيفا *L. Sativae*، عرض جانبي؛ (د) ل. تريفوليي *L. Trifolii*، عرض جانبي؛ (ه) ل. ساتيفا *L. Sativae*، عرض ظهري بطني؛ (و) ل. تريفوليي *L. Trifolii*، عرض ظهري بطني.

الصورة تقدمة وزارة البيئة والأغذية والشؤون الريفية، المملكة المتحدة.

الشكل 12- شرنقة آفة ليريوميزا Liriomyza sp
الصورة تقدمة وزارة البيئة والأراضي والمياه والتخطيط، حكومة ولاية فيكتوريا، أستراليا.

.

الشكل 13- الطور اليرقي الثالث *لآفة ل. بريونيا* *L. bryoniae*
الصورة تقدمة وزارة البيئة والأغذية والشؤون الريفية، المملكة المتحدة.

مراحل النشر

لا تشكل هذه الفقرة جزءاً رسمياً من المعيار

2006-11 أضافت لجنة المعايير الموضوع الأصل: أنواع آفة ليريوميزا *Liriomyza* spp. (2006-017).

2007-03 أضافت الدورة الثانية لهيئة تدابير الصحة النباتية الموضوع إلى برنامج العمل (الحشرات والعثّ).

2014-07 استعرض الفريق المعني ببروتوكولات التشخيص مشروع البروتوكول ووافق عليه لكي تصادق عليه لجنة المعايير بقرار إلكتروني وطرحه لمشاورة الأعضاء.

2014-10 صدر قرار إلكتروني عن لجنة المعايير للموافقة عليه في مشاورة الأعضاء (2014_eSC_Nov_12).

2015-02 مشاورة الأعضاء

2016-02 صدر قرار إلكتروني عن الفريق المعني ببروتوكولات التشخيص بالموافقة لتقديمه إلى لجنة المعايير للموافقة عليه خلال فترة الإشعار الخاصة ببروتوكولات التشخيص. (2016_eTPDP_Feb_01)

2016-03 صدر قرار إلكتروني عن لجنة المعايير بالموافقة يُقدّم لفترة الإشعار الخاصة ببروتوكولات التشخيص المحددة بخمسة وأربعين يوماً. (2016_eSC_May_09)

2016-08 اعتمدت لجنة المعايير البروتوكول التشخيصي نيابة عن هيئة تدابير الصحة النباتية (بدون تلقي أي اعتراضات)

المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية رقم 27. الملحق 16. جنس ليريوميزا Genus *Liriomyza* Mik (2016). روما، الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات، منظمة الأغذية والزراعة.

2017-04 اخدت هيئة تدابير الصحة النباتية ، في دورتها (12) ، علما بالتعديلات التحريرية المقترحة من قبل مجموعة مراجعة اللغة العربية

2018-01 راجعت خدمات الترجمة التابعة لمجموعة مراجعة اللغة الخاصة باللغة العربية برتوكول التشخيص هذا وقامت أمانة الاتفاقية الدولية لوقاية النبات بدمج التعديلات وفقاً لذلك.

أخر تحديث لتاريخ المطبوع: 2018-01