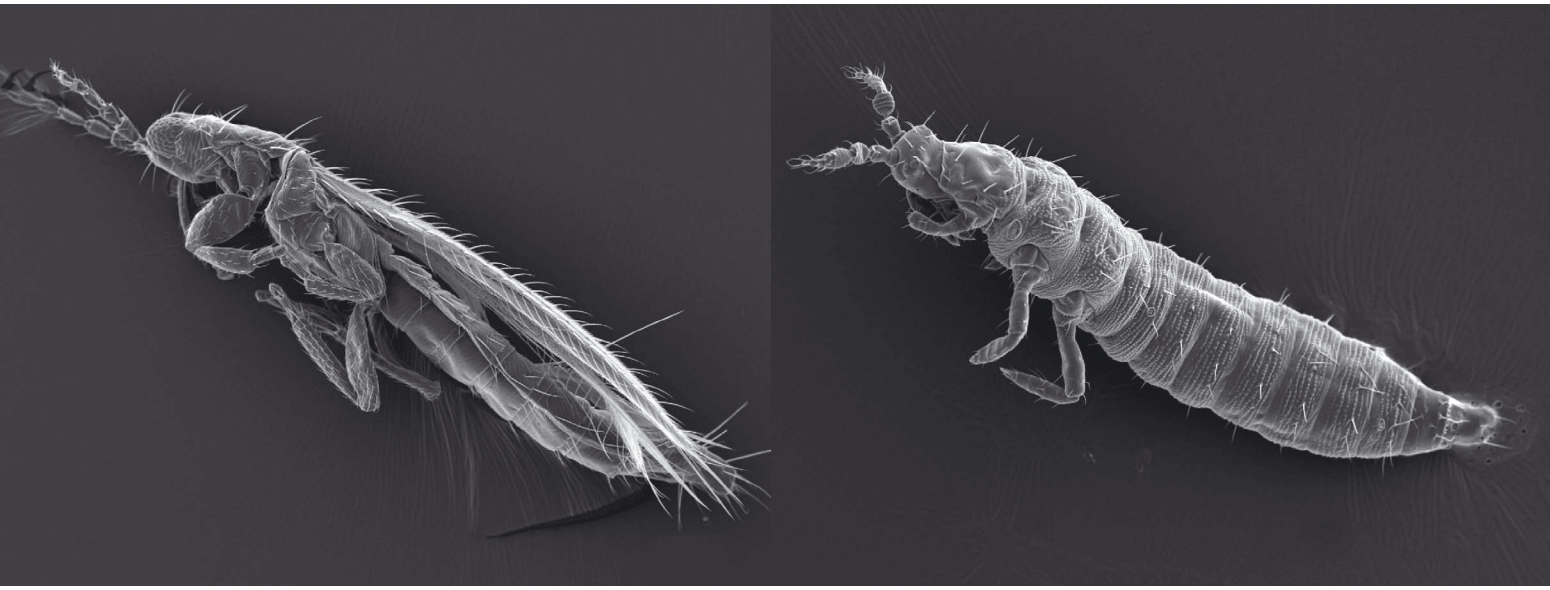
INSTYTUT OCHRONY ROŚLIN
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY

Klucze do diagnostyki
morfologicznej i molekularnej gatunków



Frankliniella occidentalis **(Pergande) i** ***Thrips palmi*** **(Karny)**

POZNAŃ 2015

INSTYTUT OCHRONY ROŚLIN
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY

Dyrektor – prof. dr hab. Danuta Sosnowska

Recenzent
prof. dr hab. Jan Nawrot

Autorzy:
mgr Arnika Przybysz
dr inż. Żaneta Fiedler
dr hab. Aleksandra Obrępalska-Stęplowska,
prof. nadzw. IOR – PIB

Korekta
dr inż. Małgorzata Maćkowiak

Broszura sfinansowana ze środków Programu Wieloletniego IOR – PIB na lata 2011–2015. Zadanie 2.7. pt.: „Charakterystyka genetyczna oraz identyfikacja wciornastków *Thrips palmi* Karny i *Frankliniella occidentalis* Pergande przy wykorzystaniu technik biologii molekularnej".

ISBN 978-83-64655-16-6

Instytut Ochrony Roślin – PIB, Zakład Transferu Wiedzy i Innowacji
ul. Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań, tel.: 61 864 90 27

Nakład: 150 egz.

Opracowanie graficzne, skład, łamanie oraz projekt okładki: mgr inż. Dominik Krawczyk
Druk: ENVELOPER S.C. ul. Wąska 33/35, 62-052 Komorniki, tel. 61 628 05 39, http://www.enveloper.pl

SPIS TREŚCI

1. IDENTYFIKACJA NA PODSTAWIE CECH MORFOLOGICZNYCH ORAZ ZDJĘĆ Z MIKROSKOPU SKANINGOWEGO. 5

1.1. Charakterystyka gatunków 5

1.1.1. *Frankliniella occidentalis* (Pergande) – wciornastek zachodni 5

1.1.2. *Thrips palmi* (Karny) – wciornastek orientalny (palmowy) 7

1.2. Przygotowanie preparatów mikroskopowych 8

1.3. Identyfikacja na podstawie charakterystycznych cech morfologicznych stadiów dorosłych z wykorzystaniem zdjęć z mikroskopu skaningowego 9

1.3.1. Klucz do oznaczania gatunku *Frankliniella occidentalis* 9

1.3.2. Klucz do oznaczania gatunku *Thrips palmi* 13

2. IDENTYFIKACJA Z WYKORZYSTANIEM METOD BIOLOGII MOLEKULARNEJ 19

2.1. Izolacja genomowego DNA 19

2.2. Identyfikacja gatunku *Frankliniella occidentalis* 20

2.3. Identyfikacja gatunku *Thrips palmi* 21

3. LITERATURA 23

4. SPIS FOTOGRAFII 24

1. IDENTYFIKACJA NA PODSTAWIE CECH MORFOLOGICZNYCH ORAZ ZDJĘĆ Z MIKROSKOPU SKANINGOWEGO

1.1. Charakterystyka gatunków

1.1.1. *Frankliniella occidentalis* (Pergande) – wciornastek zachodni

Fot. 1. Postać dorosła wciornastka zachodniego (fot. Ż. Fiedler)

Jest to przylżeniec z rodziny wciornastkowatych (Thripidae). Pochodzi z zachodniego brzegu Ameryki Północnej – występuje od Alaski aż po Kostarykę. Po raz pierwszy został zebrany z liści moreli i kwiatów pomarańczy w okolicach Los Angeles przez Theodore Pergande w 1895 roku. Począwszy od 1980 roku jest odnotowywany w krajach wszystkich kontynentów. W Europie występuje w uprawach szklarniowych roślin ozdobnych i warzyw. Po raz pierwszy zaobserwowano go w 1983 roku na chryzantemie w Holandii. W 1987 roku stwierdzono obecność wciornastka zachodniego w Polsce, w Warszawie i okolicy, na złocieniach, popielniku i warzywach. Prawdopodobnie został zawleczony z Holandii i Belgii wraz z sadzonkami złocieni przeznaczonymi na mateczniki (Baranowski i Dankowska 1992). Żeruje na dolnej stronie liści i w kwiatach. Zarówno osobniki dorosłe, jak i larwy wysysają zawartość komórek miękiszowych, które wypełniają się powietrzem. W miejscach żerowania pojawiają się srebrzyste plamy, które z czasem ciemnieją. W obrębie srebrzystych plam widoczne są charakterystyczne odchody wciornastków w postaci ciemnych grudek (Fot. 2). Górna strona liści, na których żerują wciornastki marszczy się, przy czym zmarszczenia są chlorotyczne. Na płatkach kwiatów tworzą się białe, nieregularne plamy, które z czasem brązowieją,

Fot. 2. Charakterystyczne uszkodzenia powodowane przez wciornastka zachodniego. Na zdjęciu widoczne srebrzyste plamy na powierzchni liścia oraz ciemne, grudkowate odchody (fot. Ż. Fiedler)

a kwiatostany ulegają zniekształceniu. Jaja składane są do tkanki płatków, wywołując często efekt tzw. pryszczy.

Etapy rozwoju i długość życia oraz płodność wciornastka zachodniego zależą przede wszystkim od temperatury powietrza. Owad rozmnaża się partenogenetycznie, samce pojawiają się rzadko. W warunkach szklarniowych wciornastek rozmnaża się przez cały rok, wydając od 12 do 15 pokoleń (Bryan i Smith 1956; Lublinkhof i Foster 1977; Łabanowski 1988). Pełny cykl życiowy – od jaja do postaci dorosłej – przebiegający w temperaturze 15°C, trwa ok. 44 dni, a w temperaturze 30°C – ok. 15 dni. Każda samica składa od 20 do 40 jaj. Jaja składane są do komórek parenchymy liścia, części kwiatów i owoców. Larwy lęgną się po ok. 4 dniach w temperaturze 27°C. Pierwsze linienie następuje po ok. 3 dniach. Drugie stadium larwalne stopniowo staje się powolniejsze, linieje i przeobraża we wczesną pseudopoczwarkę. Miejsce przepoczwarczenia jest różne, zazwyczaj następuje ono w glebie, ale może odbywać się także w kwiecie. Późna poczwarka jest mało ruchliwa i może przebywać w glebie ok. 10 dni. Osobniki dorosłe pojawiają się zwykle po 2–9 dniach, w zależności od temperatury.

Frankliniella occidentalis jest wektorem wirusa brązowej plamistości pomidora (*Tomato spotted wilt virus* – TSWV) i *Tobacco streak ilavirus* (TSV). Wirusy mogą być przenoszone tylko przez larwy, a nie przez osobniki dorosłe. Czas pobierania wirusa wynosi co najmniej 30 minut. Owad zachowuje infekcyjność przez 3–10 dni. Do przeniesienia wirusa potrzebuje co najmniej 15 minut. Wciornastek zachodni do roku 2006 był szkodnikiem kwarantannowym na liście A2 (OEPP/EPPO 1989).

1.1.2. *Thrips palmi* (Karny) – wciornastek orientalny (palmowy)

Fot. 3. Postać dorosła wciornastka orientalnego (fot. T. Murai)

Jest to przylżeniec z rodziny wciornastkowatych (Thripidae). Po raz pierwszy został opisany w Indonezji (na Sumatrze i Jawie) w 1925 roku (Karny 1925). Od 1978 roku jest odnotowywany corocznie na południu Japonii, a od 1985 roku zaczął rozprzestrzeniać się w rejonie Karaibów. Obecnie występuje w wielu krajach różnych kontynentów: Azji, Ameryki Środkowej, Oceanii i na Karaibach. W Ameryce Północnej notowany był tylko na Hawajach i na Florydzie. *Thrips palmi* jest organizmem kwarantannowym na liście A1 EPPO (OEPP/EPPO 1989) oraz na liście A2 CPPC w krajach Unii Europejskiej, w tym w Polsce. Owada można znaleźć na wszystkich częściach wielu gatunków roślin. Wciornastek orientalny jest gatunkiem polifagicznym, notowanym jako szkodnik tytoniu, sezamu, grochu, papryki, ogórka, bawełny i dyniowatych. Do innych ekonomicznie ważnych roślin żywicielskich *T. palmi* należą: złocień, ziemniak, soja, cyklamen i storczyki. Objawy żerowania tego gatunku są podobne do uszkodzeń powodowanych przez wciornastka zachodniego. Silne porażenie roślin objawia się srebrzeniem liści, brązowieniem, zahamowaniem wzrostu liści i pędów wierzchołkowych, skorkowaceniem i zniekształceniem owoców.

Wciornastek orientalny nie zimuje na roślinach uprawianych w gruncie. Na zewnątrz szklarni może przezimować tylko w małej strefie południowej części Japonii (Yoshihara 1982). Wyniki badań prowadzonych przez Nagai i Tsumuki (1990)

wykazały jednak, że populacja osobników dorosłych może przetrwać w nieogrzewanej szklarni nawet w temperaturze –7°C. W temperaturze 25°C pełny cykl rozwojowy trwa tylko ok. 17 dni. Rozwój wciornastka zachodniego różni się nieco od rozwoju większości polifagicznych wciornastków, ponieważ osobniki dorosłe opuszczają osłonki poczwarkowe w glebie i wędrują na liście lub kwiaty, gdzie samice składają jaja. Drugie stadium larwalne schodzi do gleby, gdzie się rozwija i przepoczwarcza (Murai 2001; Mound 2005).

W uprawie, w której nie ma kwitnących okazów, do wyłapywania postaci dorosłych obu gatunków wciornastków (*F. occidentalis* i *T. palmi*) można wykorzystywać niebieskie tablice chwytne umieszczane tuż nad roślinami. W celu bardzo wczesnego wykrycia wciornastków na plantacjach roślin ustawia się tzw. rośliny pułapkowe, na przykład kwitnącą na niebiesko sępolię. Na płatkach jej kwiatów bardzo łatwo można zauważyć pyłek, który rozsypał się wskutek rozerwania pylników przez wciornastki.

1.2. Przygotowanie preparatów mikroskopowych

Aby zebrać wciornastki, najlepiej wytrząsnąć je z roślin na kartkę papieru. Jest to prostszy sposób niż zbieranie osobników z rośliny. Następnie należy pędzelkiem przełożyć owady do probówek z płynem konserwującym, stanowiącym mieszaninę o następującym składzie: 9 części 60% alkoholu etylowego, 1 część kwasu octowego i 3–5 kropel gliceryny. W płynie tym wciornastki powinny przebywać co najmniej 24 godziny. Aby wykonać preparat półtrwały, okaz wciornastka należy umieścić na bibule filtracyjnej i ułożyć go na stronie brzusznej na środku szkiełka podstawowego, rozkładając na boki odnóża, czułki i skrzydła. Przed przykryciem szkiełkiem nakrywkowym okaz należy pokryć kroplą płynu Hoyera (w ok. 50 ml wody destylowanej rozpuścić ok. 30 g gumy arabskiej, ok. 200 g wodzianu chloralu i ok. 20 ml gliceryny – wszystko dobrze wymieszać). Oznaczanie prowadzi się pod mikroskopem stereoskopowym. Preparat trzeba zabezpieczyć przed wysychaniem przez nasmarowanie obrzeży szkiełka nakrywkowego balsamem kanadyjskim (Baranowski i Dankowska 1992, protokoły diagnostyczne EPPO i IPPC).

Do obserwacji w mikroskopie skaningowym (SEM) wciornastki należy utrwalać dobę w mieszaninie 2,5% aldehydu glutarowego i 2,5% paraformaldehydu (w stosunku objętościowym 1 : 1) w 0,1 M buforze kakodylowym o pH 7,2. Utrwalanie następcze w 1% czterotlenku osmu (również w buforze kakodylowym) wykonuje się przez następne 2 godziny. Utrwalone owady odwadniania się stopniowo w szeregu alkoholowym (10%, 30%, 50%, 70%) – w każdym roztworze po 10 minut, a potem w acetonie (70%, 80%, 90%, 96%) – również po 10 minut. Następnie płucze się materiał trzykrotnie w 100% acetonie, za każdym razem przynajmniej 20 minut. Tak przygotowane owady suszy się w punkcie krytycznym (CPD), nakleja na specjalne stoliki i napyla złotem z palladem. Prezentowane zdjęcia SEM wykonano, używając mikroskopu skaningowego S-3000N firmy Hitachi.

1.3. Identyfikacja na podstawie charakterystycznych cech morfologicznych stadiów dorosłych z wykorzystaniem zdjęć z mikroskopu skaningowego

1.3.1. Klucz do oznaczania gatunku *Frankliniella occidentalis*

Cechy charakterystyczne rodzaju *Frankliniella*

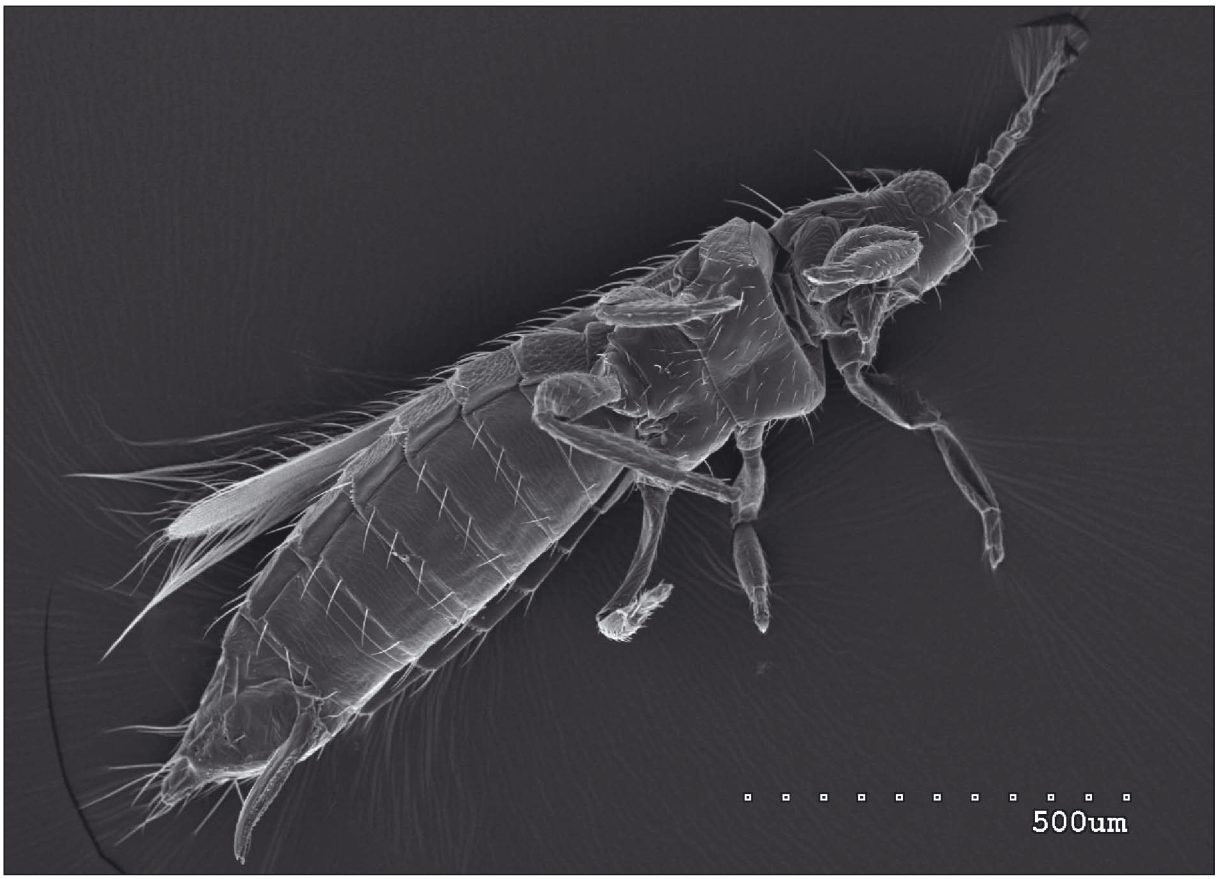
Gatunki z rodzaju *Frankliniella* mają 8-członowe czułki (z wyjątkiem trzech gatunków), człony III i IV ze stożkami czuciowymi w kształcie wystających widełek i 3-członowe głaszczki szczękowe. Na głowie występują trzy pary szczecinek przyoczkowych, spośród których szczecinki międzyprzyoczkowe, umieszczone nieco przed tylnymi przyoczkami, są znacznie silniejsze, dłuższe i ciemniejsze niż pozostałe pary. Boki głowy nie są wypukłe. Przedplecze zazwyczaj z dwiema parami długich szczecin na przedniej krawędzi i dwiema parami długich szczecin położonych w kącie tylnym przedplecza oraz dodatkową parą małych szczecin pomiędzy środkowymi szczecinami na tylnym brzegu.

Cechą charakterystyczną gatunków z rodzaju *Frankliniella* są przezroczyste lub prawie przezroczyste skrzydła, których obie żyłki na całej długości obsadzone są ciemnymi, dobrze rozwiniętymi szczecinkami; rząd szczecin na pierwszej żyłce skrzydła przedniego zazwyczaj kompletny. Charakterystycznymi cechami dla rodzaju *Frankliniella* są: tylny brzeg VIII tergitu odwłoka, który ma pełny grzebień, ktenidia na tergicie VIII umiejscowione na przednim brzegu w stosunku do przetchlinki oraz sternity bez szczecin dodatkowych. U samców na sternitach III–VI lub VII występują małe, poprzeczne, owalne pola gruczołowe (Mound i Kibby 1998; EPPO 2002).

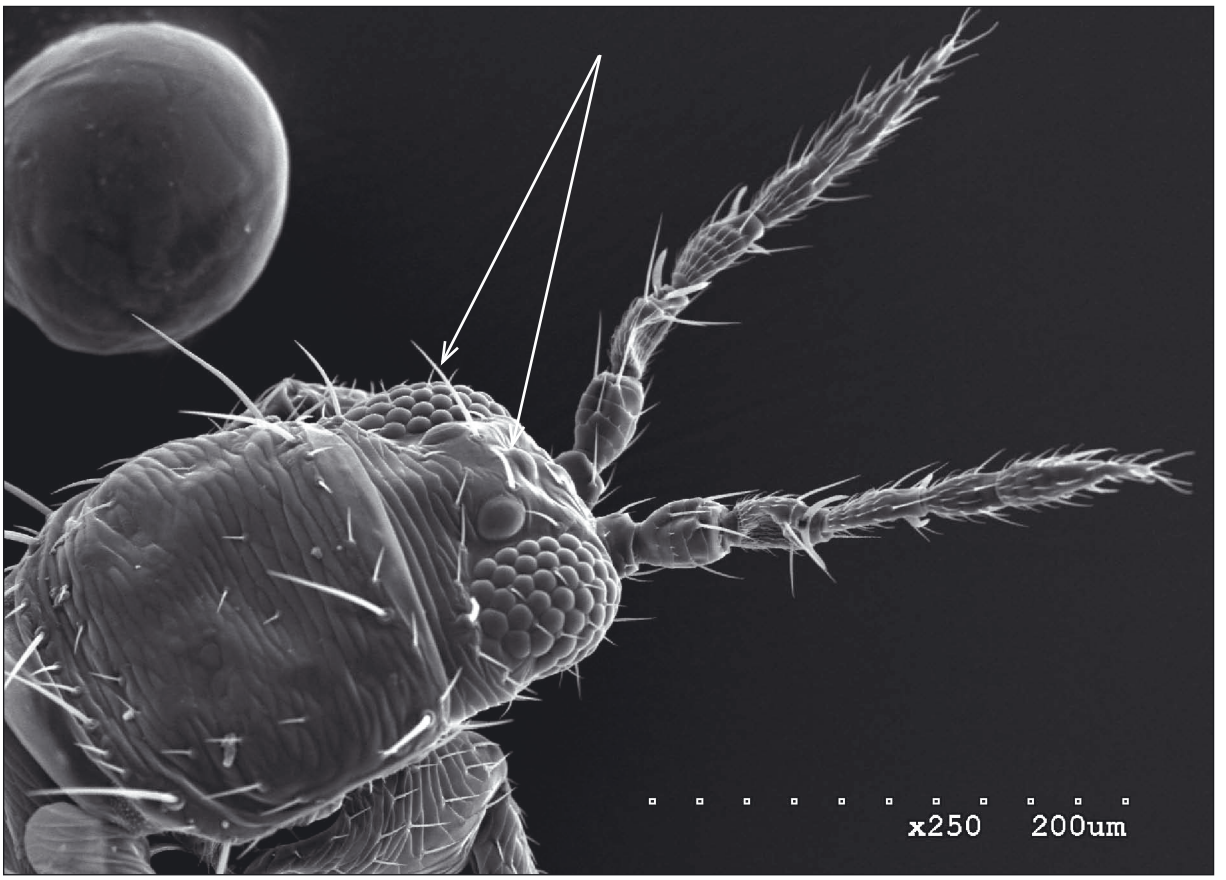
Gatunek *Frankliniella occidentalis* – wciornastek zachodni

Długość ciała osobników dorosłych od 1,3 do 1,6 mm, przy czym samice większe od samców. Ubarwienie ciała samic od żółtego do ciemnobrązowego, samce zawsze jasno ubarwione. Z literatury oraz z własnych obserwacji wiadomo, że barwa ciała jest zmienna – brązowa w zimie, szarożółta wiosną i jasnożółta latem. Tłumaczy się to tym, że forma ciemna jest lepiej przystosowana do przeżycia podczas zimnego, wilgotnego okresu i jest bardziej aktywna niż forma jasna. Fenotypowe zabarwienie wykazują tylko samice.

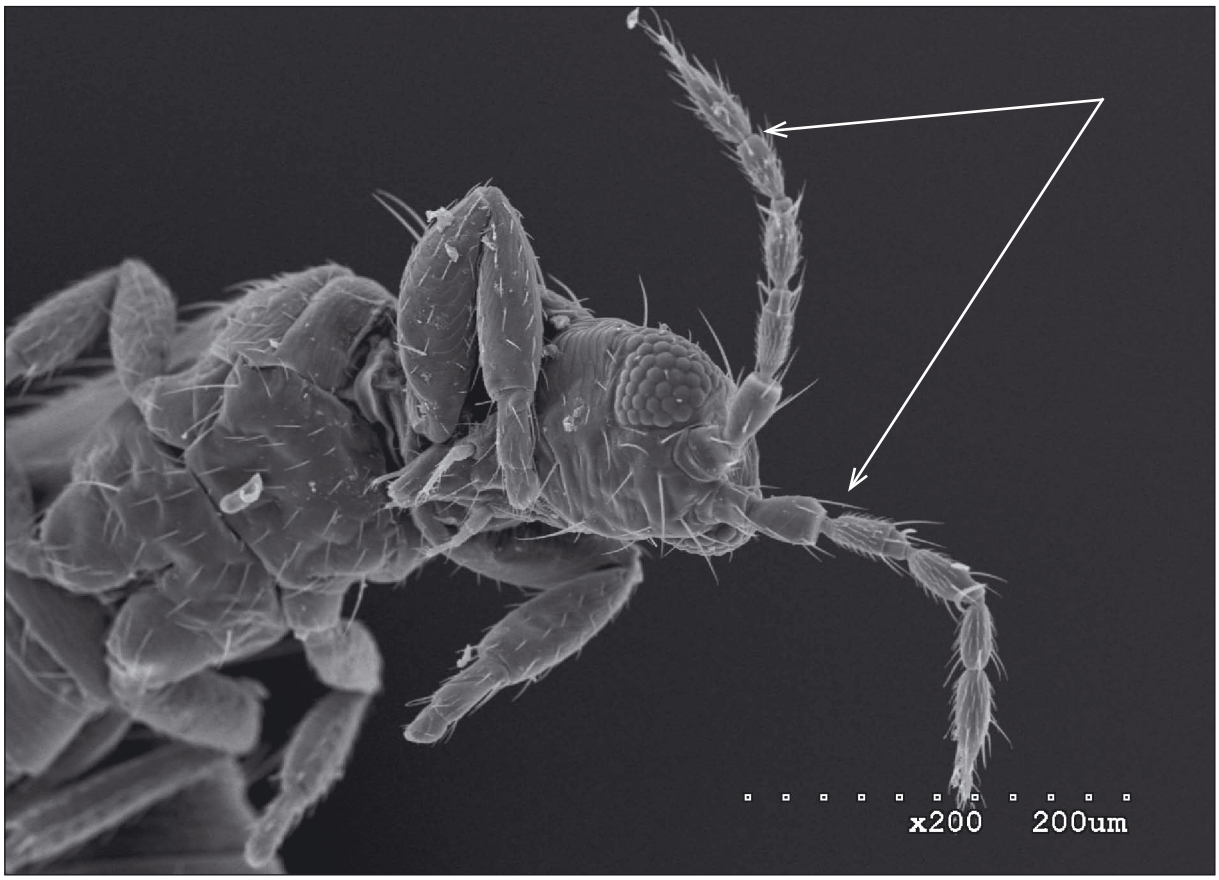
U postaci dorosłych dwie pary wąskich skrzydeł otoczonych frędzlą. U obu płci człon II i trzy ostatnie człony (VI, VII, VIII) czułków ciemno zabarwione, natomiast człony IV i V ciemne z jasną częścią bazalną. Znajdujące się na przedniej krawędzi przedplecza szczecinki w kącie przednim takiej samej długości lub tylko nieco dłuższe od leżących bardziej dośrodkowo szczecinek na przednim brzegu. Między szczecinkami na przednim brzegu, na przedniej krawędzi przedplecza, dwie pary krótkich szczecinek, których nie mają inne gatunki z rodzaju Frankliniella występujące w Polsce. Przednie skrzydła 6,0–6,9 raza dłuższe od przedplecza. Na ich żyłce bocznej 15–18 (najczęściej 16–17) szczecinek. Dorosłe wciornastki występują w kwiatach, pąkach i na liściach roślin. Jaja nerkowate, mętne, o długości ok. 200 μm. Larwy stadium I – przezroczyste, larwy stadium II – złotożółte, dwa stadia poczwarek (pseudopoczwarki) – białe. Charakterystycznymi cechami wczesnej pseudopoczwarki jest obecność zaczątków skrzydeł i skróconych, uniesionych czułków. Obydwa stadia poczwarkowe są białe. Późna poczwarka jest mało ruchliwa, zaczątki skrzydeł ma dłuższe, a czułki skierowane do tyłu (Karnkowski 1990; EPPO 2008).



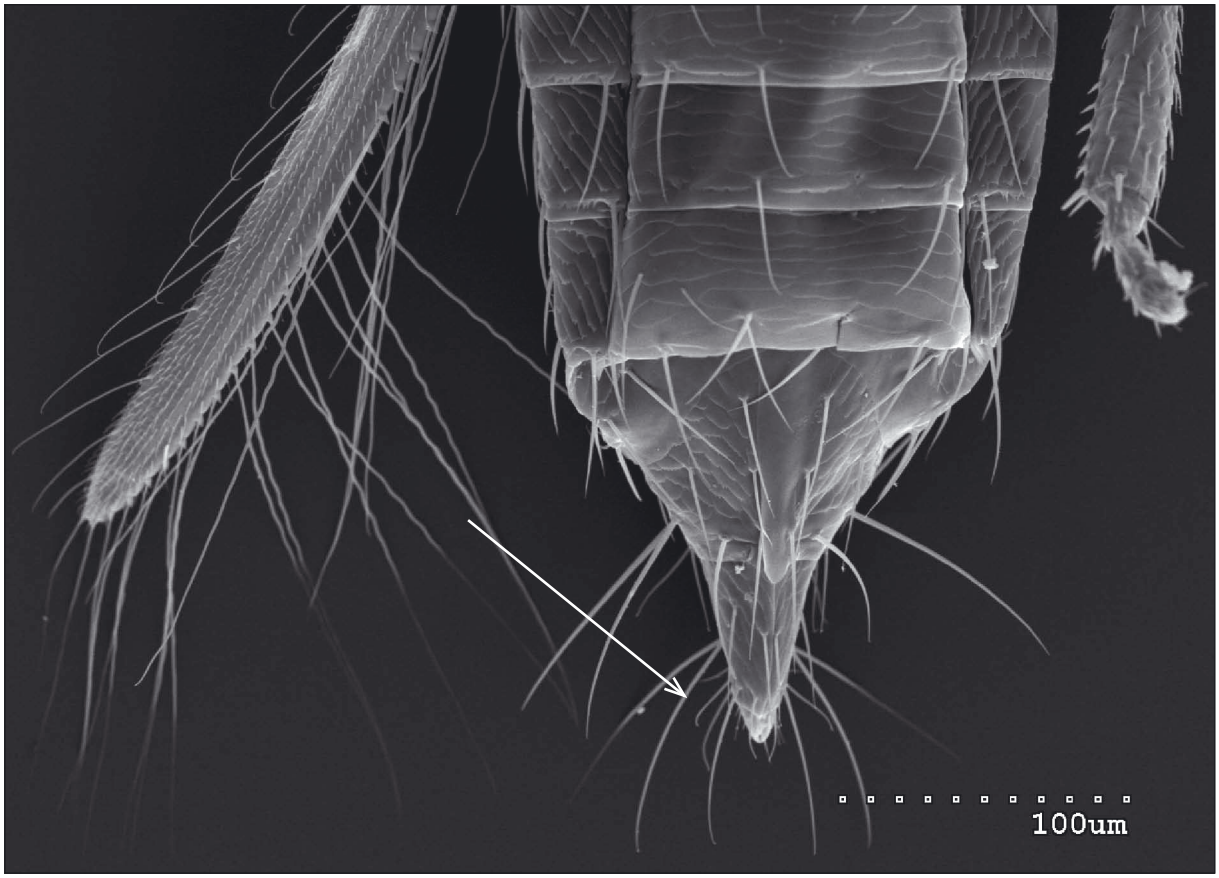
Fot. 4. Postać dorosła wciornastka zachodniego (fot. M. Gawlak)



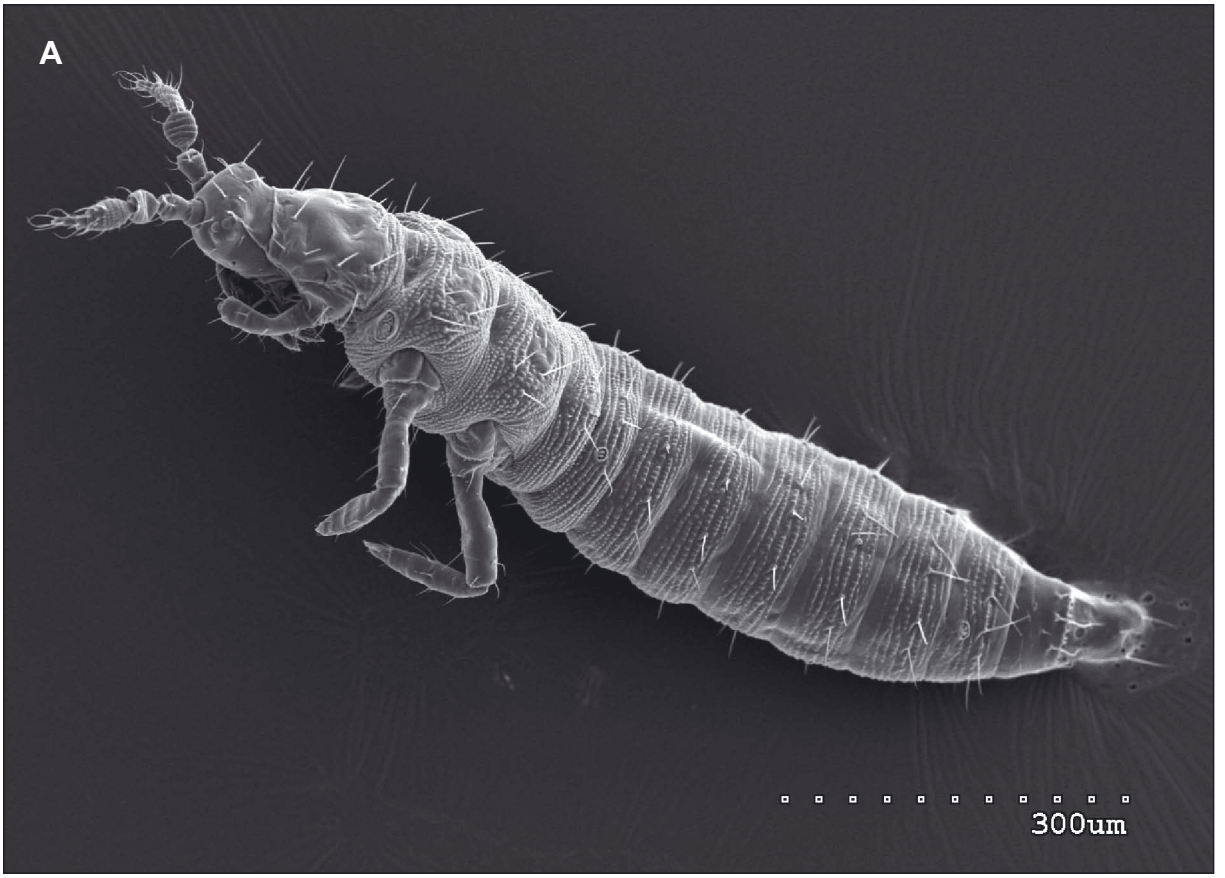
Fot. 5. Głowa wciornastka zachodniego ze szczecinkami międzyprzyoczkowymi ciemniejszymi, silniejszymi i dłuższymi niż pozostałe szczecinki przyoczkowe (fot. M. Gawlak)

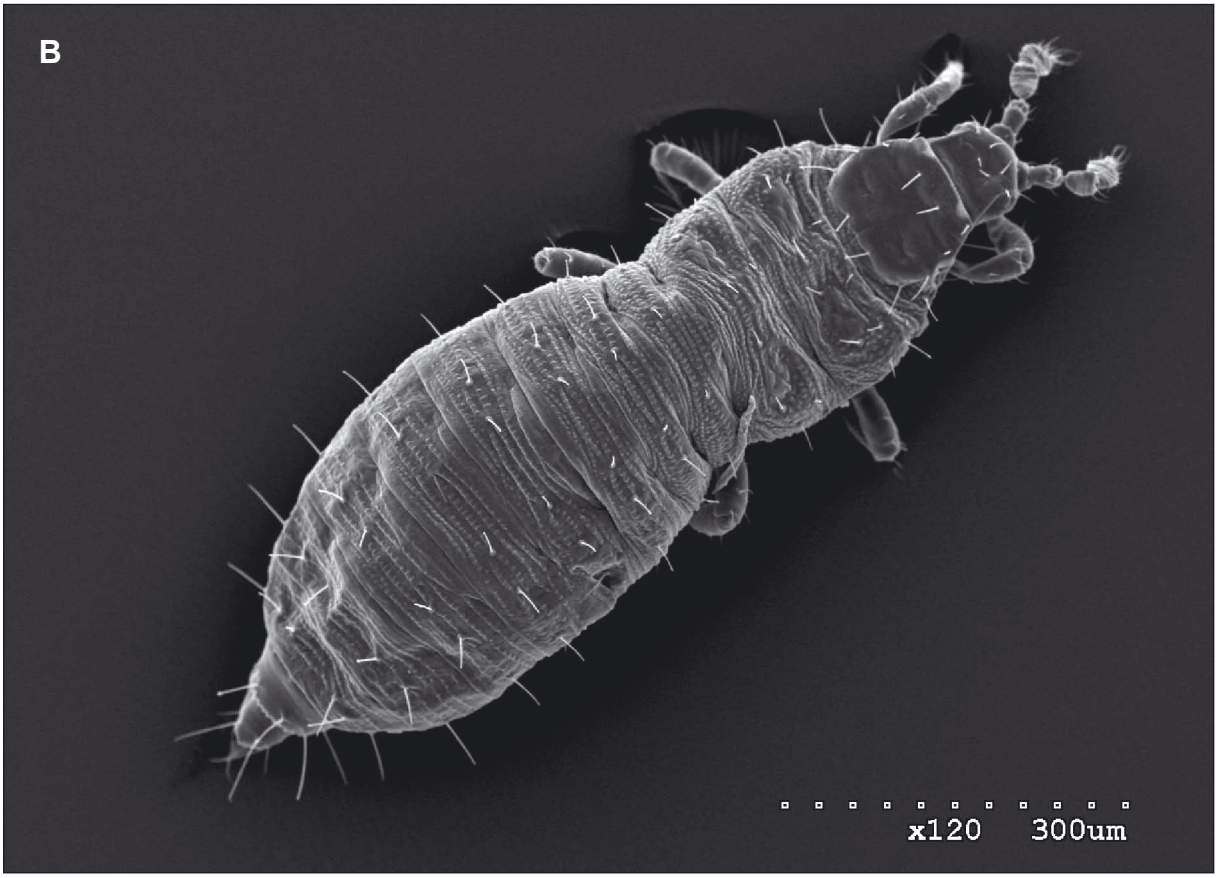


Fot. 6. Czułki wciornastka zachodniego są zawsze 8-członowe (fot. M. Gawlak)



Fot. 7. Wiele par szczecin na zakończeniu odwłoka wciornastka zachodniego (fot. M. Gawlak)





Fot. 8. Larwa wciornastka zachodniego: A – widok z boku; B – widok z góry (fot. M. Gawlak)

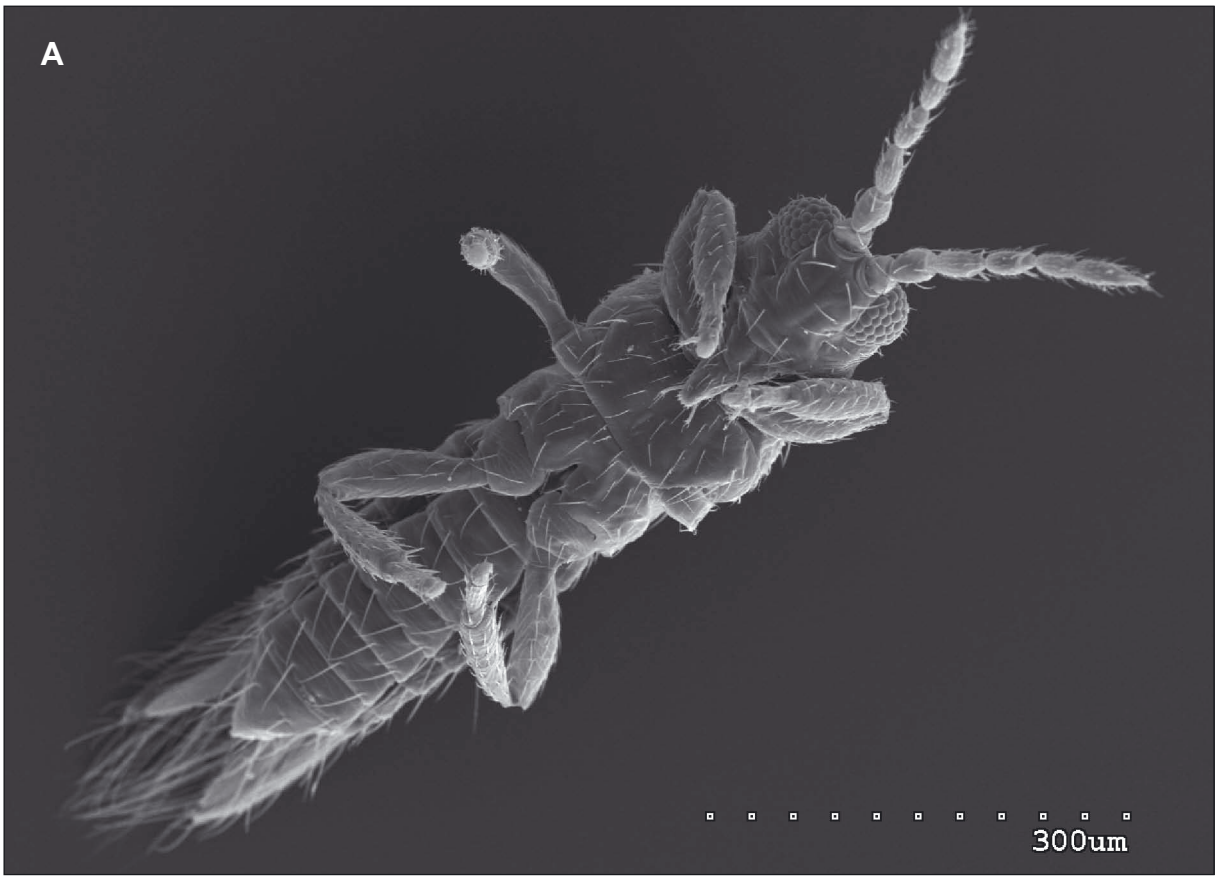
1.3.2. Klucz do oznaczania gatunku *Thrips palmi*

Cechy charakterystyczne rodzaju *Thrips*

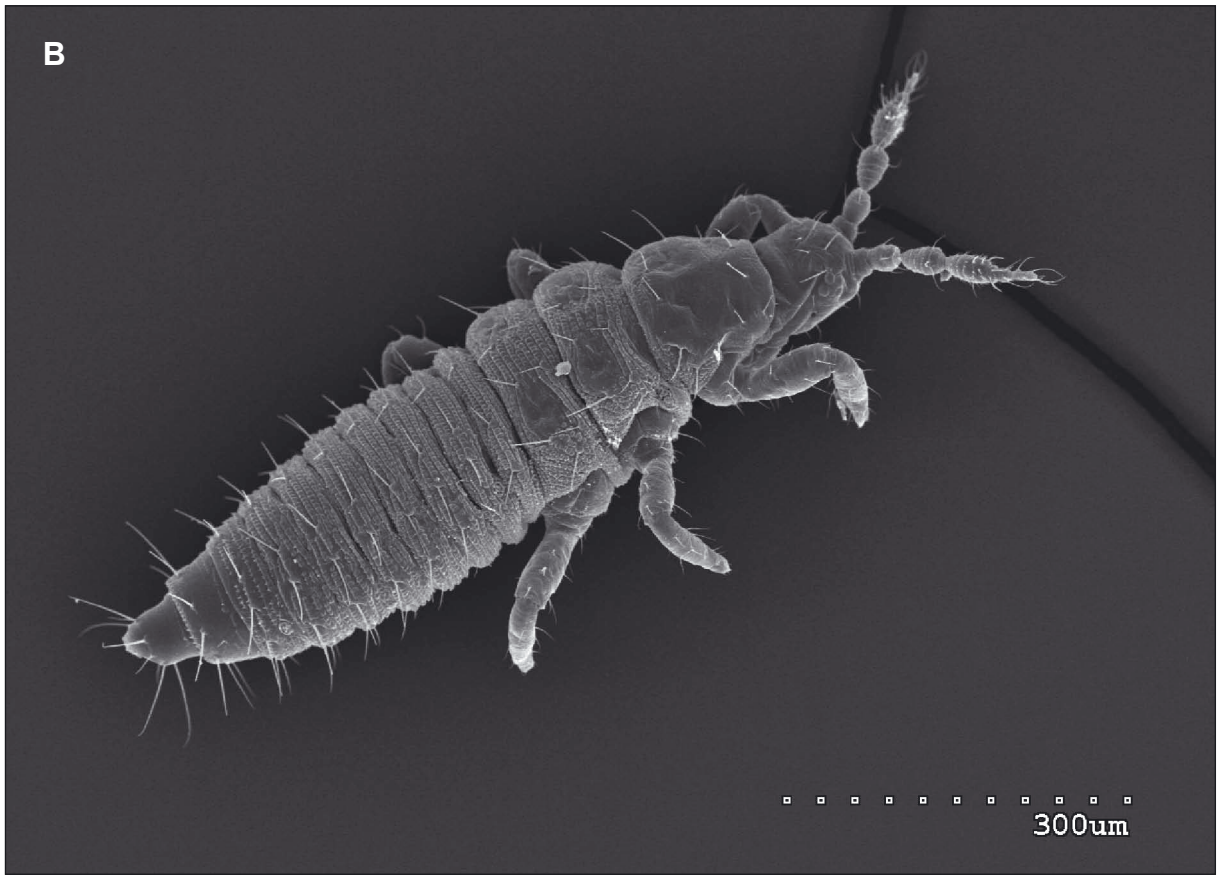
Gatunki z rodzaju *Thrips* mają 7- lub 8-członowe czułki. Człony III i IV ze stożkami czuciowymi w kształcie wystających widełek. Na głowie są widoczne dwie pary szczecinek przyoczkowych (brak szczecinek przyoczkowych I, szczecinki przyoczkowe III umieszczone na zewnątrz trójkąta przyoczkowego). Na przedpleczu, w kącie tylnym, występują dwie pary (rzadko jedna lub żadna) dużych szczecinek, na tylnym brzegu zazwyczaj trzy, czasami cztery pary. Wzdłuż skrzydeł biegną dwie żyłki opatrzone w szczeciny. W części dystalnej pierwszej żyłki znajdują się trzy oddzielone od siebie szczecinki. Rząd szczecinek na przedniej żyłce jest poprzerywany w różny sposób, szczecinki na drugiej żyłce tworzą nieprzerwany rząd. Na tergicie i sternicie odwłoka nie występuje na tylnym brzegu kołnierz. Tergity V–VIII mają po dwa ktenidia umieszczone z każdego boku (rzadko ktenidia występują również na tergicie IV). Ktenidia na tergicie VIII odwłoka umieszczone są przyśrodkowo w stosunku do przetchlinek (Mound i Kibby 1998; Mound i Masumoto 2005; EPPO 2008; ISPM 2010).

Gatunek *Thrips palmi* – wciornastek orientalny

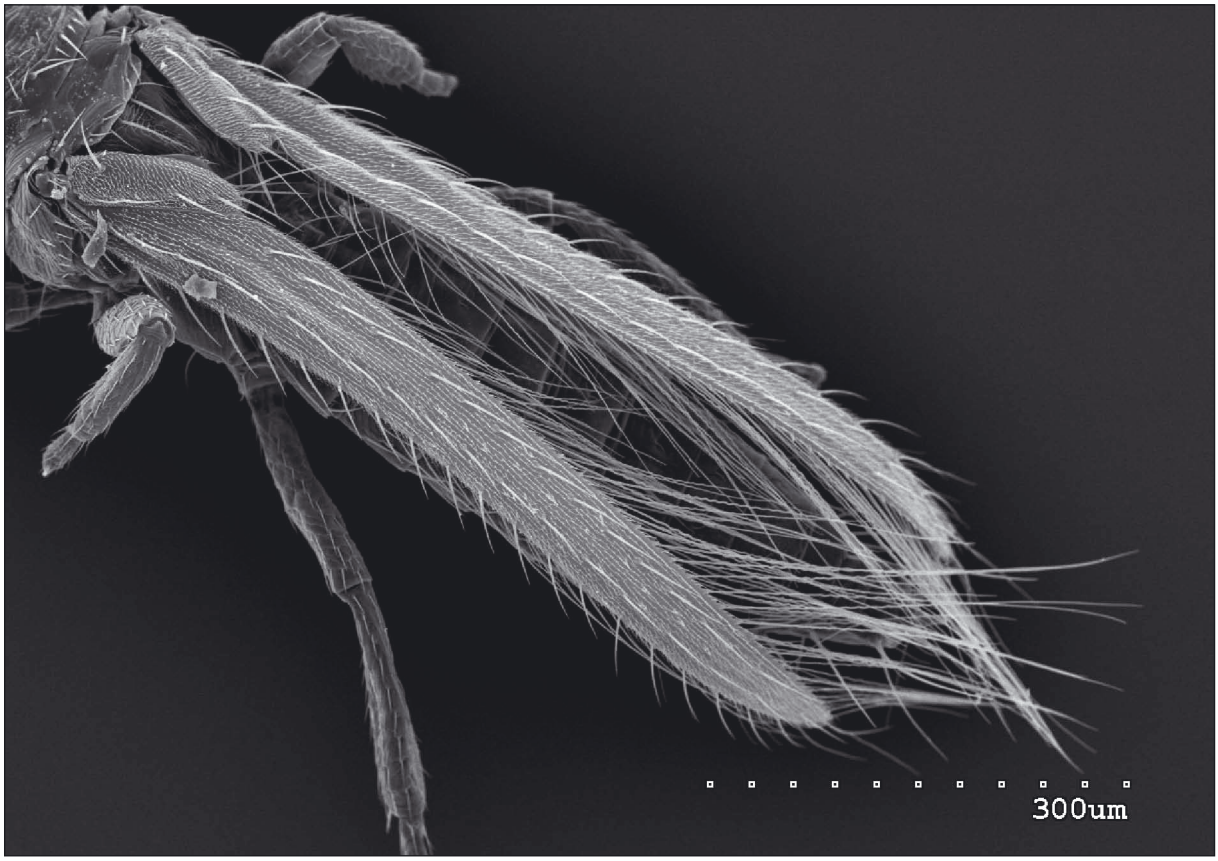
Długość ciała osobników dorosłych od 0,9 do 1,3 mm. Ciało jasnożółte bez ciemnych obszarów na głowie, tułowiu i odwłoku, z lekko pogrubionymi czarniawymi szczecinkami. Czułki zawsze 7-członowe. Człony I i II jasnożółte, człon III – żółty z przyciemnionym wierzchołkiem, człony IV do VII – brązowe, ale zazwyczaj nasada członu IV i V żółta, człon V zazwyczaj żółtawy w nasadowej części (1/3 do 1/2 długości). Przednie skrzydła jednolicie lekko przyciemnione, szczecinki ciemne. Szczecinki zaoczne II i IV dużo mniejsze od pozostałych. Szczecinki przyoczkowe III umiejscowione tuż za trójkątem przyoczkowym lub stycznie do linii łączących przyoczko przednie z każdym z przyoczek tylnych. Przedplecze z dwiema parami dużych szczecinek w kącie tylnym. Tarcza zaplecza z rzeźbą w postaci linii zbieżnych w jej tylnej części. Środkowa para szczecinek umieszczona za przednią krawędzią. Obecna para porów czuciowych (sensilli dzwonowatych). Przednie skrzydło z trzema (rzadko dwiema) szczecinkami dystalnymi. Tergit II odwłoka z czterema szczecinkami brzeżnymi. Szczecinki S2 na tergitach III i IV odwłoka prawie tej samej wielkości co szczecinki S3. Grzebień na tylnej krawędzi tergitu VIII odwłoka samicy kompletny, u samców silnie rozwinięty w części środkowej. Tergit IX odwłoka zazwyczaj z dwiema parami porów czuciowych (przednią i tylną). Sternity odwłoka bez szczecinek dodatkowych lub mikrotrychiów. Pleurotergity odwłoka bez szczecinek dodatkowych, linie rzeźby bez mikrotrychiów. Sternity III–VII samców z wąskimi poprzecznymi polami gruczołowymi. Larwy stadium I – przezroczyste, larwy stadium II – złotożółte, dwa stadia poczwarek (pseudopoczwarki) – białawe (Mound i Kibby 1998; EPPO 2008; ISPM 2010).



Fot. 9. Postać dorosła wciornastka orientalnego: A – widok od strony brzusznej; B – widok z boku (fot. M. Gawlak)

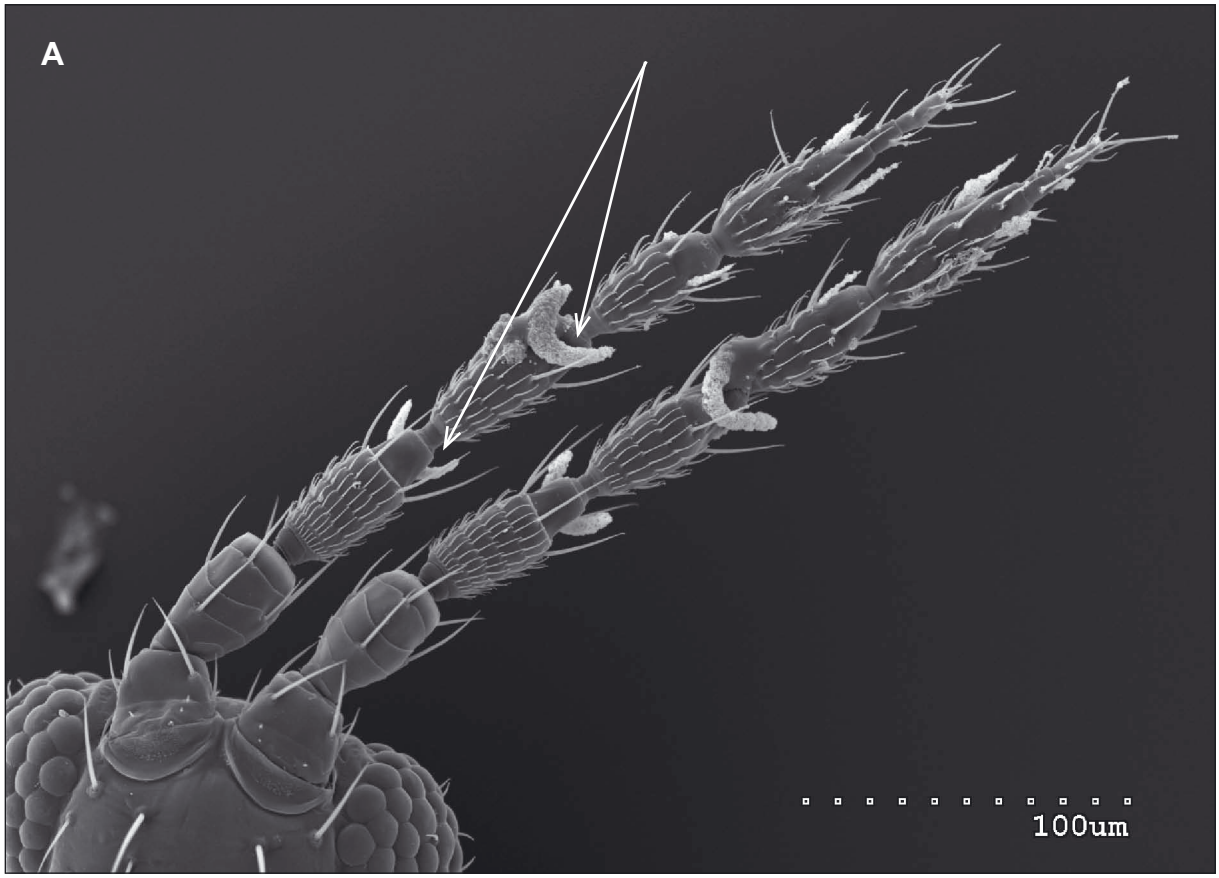


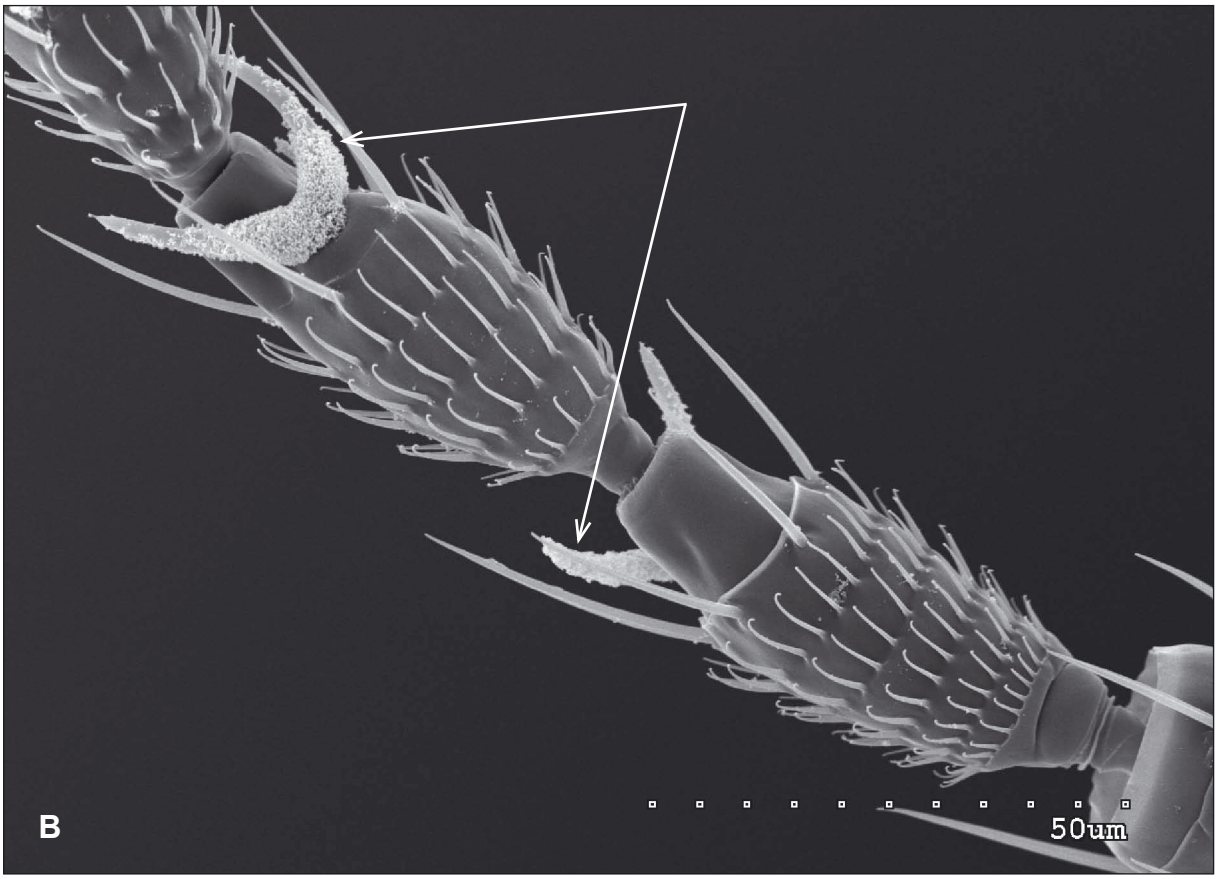
Fot. 10. Larwa wciornastka orientalnego: A – widok od strony brzusznej; B – widok z góry (fot. M. Gawlak)



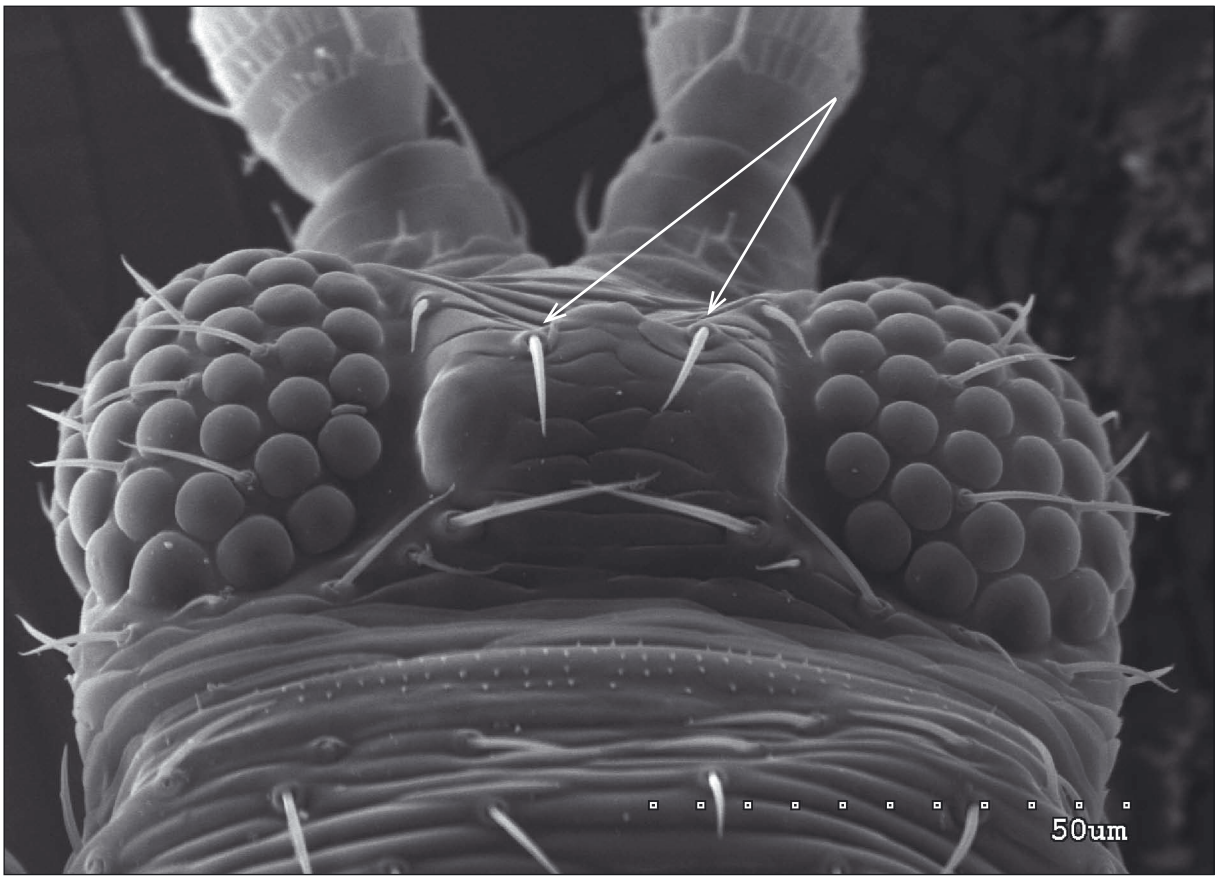
Fot. 11. Skrzydła wciornastka orientalnego z dwiema żyłkami opatrzonymi w szczeciny (fot. M. Gawlak)

Fot. 12. Czułki wciornastka orientalnego są zawsze 7-członowe (fot. M. Gawlak)

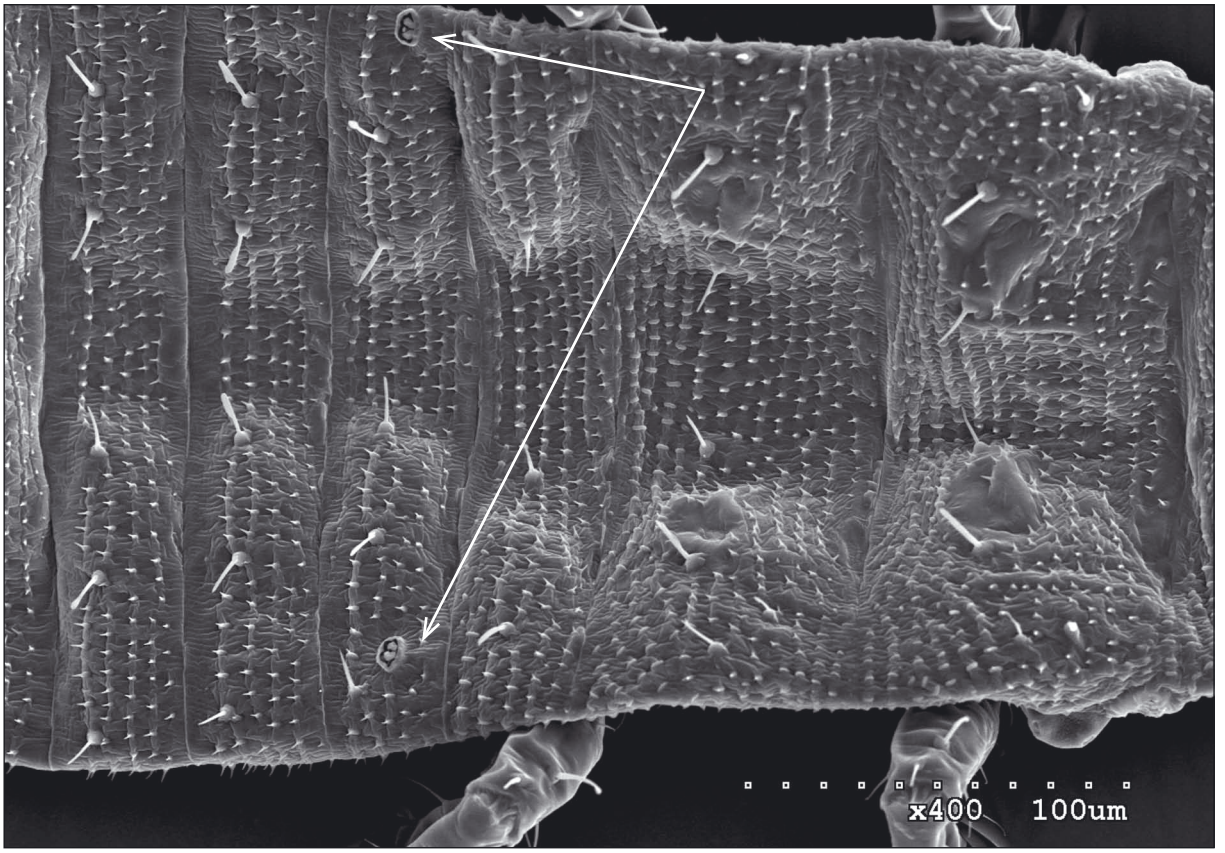




Fot. 13. Stożki czuciowe w kształcie wystających widełek na III i IV członie czułków wciornastka orientalnego widoczne w różnych powiększeniach (A i B) (fot. M. Gawlak)



Fot. 14. Głowa wciornastka orientalnego z dobrze widoczną III parą szczecinek przyocznych na zewnątrz trójkąta przyoczkowego (fot. M. Gawlak)



Fot. 15. Na tergicie VIII wciornastka orientalnego widoczne dwie przetchlinki (fot. M. Gawlak)

2. IDENTYFIKACJA Z WYKORZYSTANIEM METOD BIOLOGII MOLEKULARNEJ

Do identyfikacji gatunków *F. occidentalis* i *T. palmi* opracowano dotychczas wiele protokołów diagnostycznych, jednak większość z nich opiera się na amplifikacji sekwencji mitochondrialnego DNA (mtDNA), który w przypadku wciornastków charakteryzuje się zróżnicowaniem występującym nawet pomiędzy różnymi populacjami tego samego gatunku. Dlatego też zaprojektowano metody z wykorzystaniem sekwencji rybosomalnego DNA (rDNA), które jednocześnie wykazują zarówno znaczne zróżnicowane pomiędzy gatunkami wciornastków, jak i konserwatywność wewnątrz danego gatunku. Poniższe metodyki powstały w oparciu o standardową reakcję PCR (Polymerase Chain Reaction) oraz metodę LAMP (Loop-mediated isothermal AMPlification). Metoda LAMP przeznaczona do identyfikacji gatunku *T. palmi* jest prostsza i szybsza niż proponowane do tej pory metody, a ponadto umożliwia bezpośrednie wykrywanie tego gatunku bez wykorzystania zaawansowanej aparatury. Natomiast przedstawiony protokół do identyfikacji *F. occidentalis* metodą PCR pozwala na równoczesną identyfikację innych gatunków z rodzaju *Frankliniella* występujących na terenie Polski. Poniższe metodyki zostały opracowane w Międzyzakładowej Pracowni Biologii Molekularnej Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego (IOR – PIB).

2.1. Izolacja genomowego DNA

Aby możliwe było przeprowadzenie reakcji LAMP i PCR, należy wyizolować z owadów całkowity genomowy DNA. Etap ten można przeprowadzić, wykorzystując m.in. komercyjnie dostępne zestawy (np. NucleoSpin® Tissue, Macherey-Nagel). Osobnika dorosłego lub w stadium larwalnym należy dokładnie rozgnieść w buforze lizującym, dodać proteinazę K i inkubować w temperaturze 56°C przez ok. 16–20 h. Następnie dodaje się kolejne bufory, stwarzając odpowiednie warunki do związania DNA ze złożem znajdującym się na kolumnach załączonych przez producenta zestawu do izolacji. Całość mieszaniny umieszcza się na kolumnie i wiruje. Kolejnym etapem jest przepłukanie oraz dokładne wysuszenie filtra kolumny, a następnie przeprowadzenie elucji genomowego DNA za pomocą wody lub buforu dołączonego do zestawu.

UWAGA!

1) Jakość wyizolowanego DNA należy sprawdzić spektrofotometrycznie (np. spektrofotometrem NanoDrop, Thermo Scientific). Stężenie można ocenić, mierząc absorbancję przy długości fali λ = 260 nm, natomiast czystość preparatu ocenia się na podstawie stosunku współczynników A_{260}/A_{280} (wartość pomiędzy 1,7–1,9 świadczy o czystości preparatu).
2) Wyizolowany DNA należy przechowywać w temperaturze −20°C.

2.2. Identyfikacja gatunku *Frankliniella occidentalis*

W celu identyfikacji gatunku *F. occidentalis* opracowano protokół wykorzystujący reakcję PCR. Reakcja ta pozwala także na odróżnienie innych gatunków z rodzaju *Frankliniella* występujących na terenie Polski, takich jak: *F. intonsa*, *F. pallida* i *F. tenuicornis*, gdyż startery zostały zaprojektowane w regionie rDNA wspólnym dla tych gatunków, jednak o innej długości dla każdego z nich. Spodziewane wielkości produktu dla poszczególnych gatunków zestawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Spodziewana wielkość produktu reakcji PCR dla poszczególnych gatunków z rodzaju *Frankliniella*

Identyfikowany gatunek	Wielkość produktu
F. occidentalis	326 pz
F. intonsa	237 pz
F. pallida	250 pz
F. tenuicornis	280 pz

Reakcję PCR przeprowadza się przy użyciu komercyjnie dostępnej polimerazy Taq, sprzedawanej często w już gotowej mieszaninie zawierającej także odpowiedni bufor i dNTP (np. DreamTaq Master Mix, Thermo Scientific Fermentas) lub w zestawie z samym buforem (np. Allegro, Novazym).

Mieszaninę reakcyjną przygotowuje się w 10 µl końcowej objętości. W skład mieszaniny wchodzą:

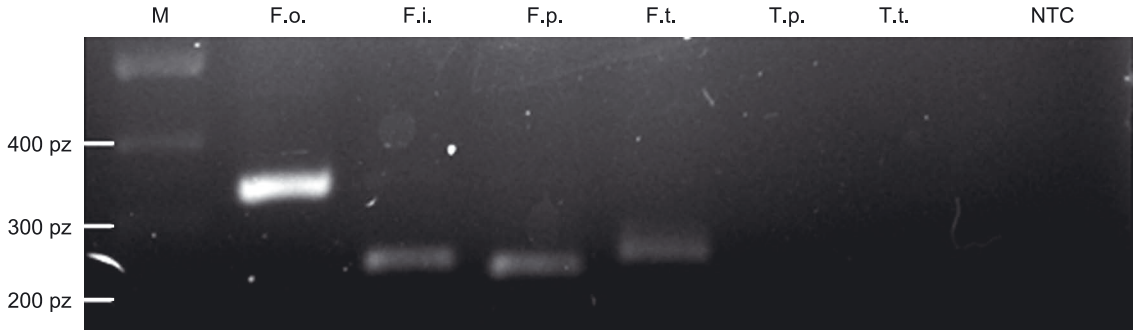
- 0,2 U polimerazy Taq,
- 1X stężony bufor dołączony zwykle do polimerazy o składzie: 10 mM Tris-HCl pH 8,8, 1,5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100,
- 200 µM mieszaniny dNTP,
- 1 µM każdego ze starterów: FrUNIF (5'-GATRCGACTGTCAGAGWAC-3') i FrUNIR (5'-GATACCGACACTTCATCTG-3')
- 5 ng analizowanego genomowego DNA,
- woda.

Reakcję prowadzi się w następujących warunkach termicznych:

- wstępna denaturacja w 95°C przez 5 min,
- 35 cykli amplifikacji składających się z:
  - denaturacji w 95°C przez 30 s,
  - przyłączenia starterów w 57°C przez 30 s,
  - wydłużania produktu w 72°C przez 30 s,
- wydłużanie końcowe w 72°C przez 5 min.

Produkty reakcji należy rozdzielić elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika wiążącego się z DNA (np. Midori Green, Nippon). Następnie żel analizowany jest w świetle UV. Spodziewana wielkość produktu widocznego na żelu w przypadku reakcji pozytywnej dla gatunku *F. occidentalis* wynosi ok. 326 pz. Pojawienie się produktu reakcji innej wielkości (ok. 240–280 pz) może świadczyć o występowaniu

w próbie innego gatunku z rodzaju *Frankliniella* (Tab. 1). Przykładowy wynik reakcji pozytywnej dla wciornastka *F. occidentalis*, a także dla innych wciornastków z rodzaju *Frankliniella*, które mogą zostać wykryte podczas tej reakcji, przestawiono na rycinie 1.



Ryc. 1. Pozytywny wynik reakcji PCR świadczący o obecności gatunku *Frankliniella occidentalis*, a także innych gatunków z rodzaju *Frankliniella*: M – marker, F.o. – *F. occidentalis*, F.i. – *F. intonsa*, F.p. – *F. pallida*, F.t. – *F. tenuicornis*, T.p. – *T. palmi*, T.t. – *T. tabaci*, NTC – kontrola odczynnikowa

UWAGA!

1) Przeprowadzając reakcje PCR i LAMP, należy – oprócz próby badanej − uwzględnić także kontrolę odczynnikową (mieszaninę reakcyjną zawierającą wodę zamiast DNA), kontrolę negatywną (zawierającą DNA gatunku innego niż badany) oraz kontrolę pozytywną (zawierającą DNA gatunku badanego).
2) Rozdzielając produkty reakcji PCR w żelu agarozowym, należy rozdzielić także marker masy cząsteczkowej obejmujący swoim zakresem spodziewaną wielkość produktu.

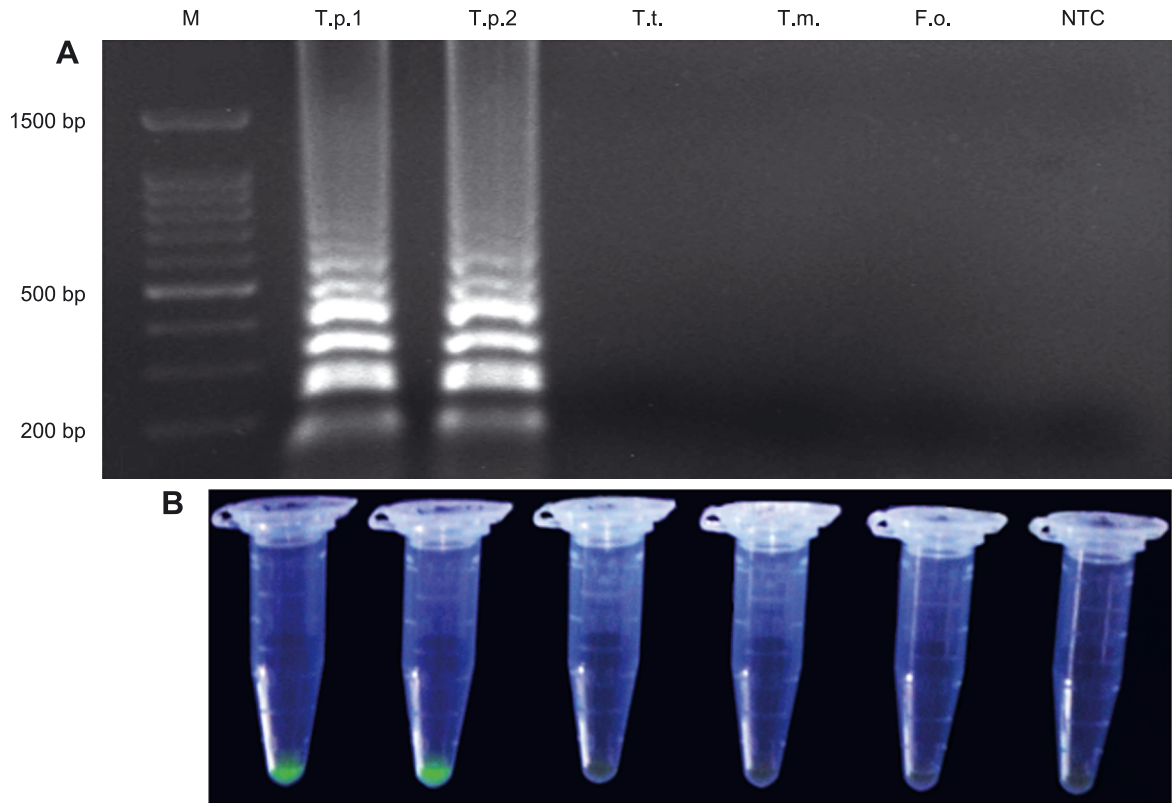
2.3. Identyfikacja gatunku *Thrips palmi*

W celu identyfikacji gatunku *T. palmi* zaprojektowano reakcję LAMP, którą prowadzi się tylko w jednej temperaturze (w związku z tym reakcję można prowadzić w łaźni wodnej lub termobloku, natomiast nie jest konieczne wykorzystanie do tego etapu termocyklera), a wynik można uzyskać już po 30 min. Reakcję LAMP przeprowadza się, wykorzystując gotową mieszaninę reakcyjną (np. Isothermal Master Mix, OptiGene). Metoda została opisana i opublikowana przez pracowników IOR – PIB (Przybylska i wsp. 2015).

Mieszaninę reakcyjną przygotowuje się w 25 µl końcowej objętości. W skład mieszaniny wchodzą:

- 12,5 µl mieszaniny Isothermal Master Mix,
- 0,8 µM każdego ze starterów:
  FIP (TCGATGTTGTATTGGCATCCGTAAGAGATCTGGCTAGGATCTT)
  i BIP (CACTCTGTCCTGCCGCTAAGCGCTTCTGAAGTGGATCTC),
- 0,4 µM każdego ze starterów: LoopF (GTAAATCGGAGCGAGGAGG)
  i LoopR (CGTTCTCTGTAGTCGGAGC),
- 0,2 µM każdego ze starterów:
  F3 (ATTCCATGCCATCCTTCG) i B3 (TAGTCTCACCTGAACAGAGG),
- 1 ng analizowanego DNA,
- woda (uzupełniona do końcowej objętości 25 µl).

Reakcję prowadzi się przez 30 min w temperaturze 63°C. Po zakończeniu reakcji, 0,5 µl produktu dodaje się do 1X stężonego roztworu barwnika fluorescencyjnego (np. Eva Green, Biotium) i analizuje wynik w świetle UV. W próbach zawierających DNA gatunku *T. palmi* jest widoczna fluorescencja. Pozostałą objętość produktu reakcji rozdziela się elektroforetycznie w 1% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika wiążącego się z DNA (np. Midori Green, Nippon). Następnie żel analizowany jest w świetle UV. O wyniku pozytywnym świadczy pojawienie się w ścieżkach zawierających kontrolę pozytywną (DNA z *T. palmi*) obrazu drabinki zawierającej wiele produktów DNA o różnych długościach. Przykładowy wynik pozytywny przestawiono na rycinie 2.



Ryc. 2. Pozytywny wynik reakcji LAMP świadczący o obecności gatunku *Thrips palmi*: A – wizualizacja w 1% żelu agarozowym; B – wizualizacja za pomocą barwnika fluorescencyjnego (Eva Green, Biotium): M – marker, T.p. – *T. palmi*, T.t. – *T. tabaci*, T.m. – *T. major*, F.o. – *F. occidentalis*, NTC – kontrola odczynnikowa

UWAGA!

Reakcja LAMP jest niezwykle czuła, pozwala na wykrycie nawet śladowych ilości DNA pochodzącego z *T. palmi*, dlatego też reakcję należy przeprowadzić w sterylnych warunkach i zachować szczególną ostrożność, aby nie doszło do zanieczyszczenia środowiska pracy i w rezultacie badanych prób.

3. LITERATURA

1. Baranowski T., Dankowska E. 1992. Szkodniki kwarantannowe upraw szklarniowych. Ochrona Roślin 1: 13–14.
2. Bryan D.E., Smith R.F. 1956. The *Frankliniella occidentalis* complex in California. University of California, Publications in Entomology 10: 359–410.
3. EPPO/CABI. 1992. Tomato spotted wilt virus. In: "Quarantine Pests for Europe" (I.M. Smith, D.G. McNamara, P.R. Scott, K.M. Harris, eds.). CAB International, Wallingford, UK, 1032 pp.
4. EPPO. 2008. URL: http://www.eppo.org/ [Accessed: 17 June 2008]
5. ISPM. 2010. ISPM 27 Diagnostic protocols, DP 1: *Thrips palmi* Karny. https://www.ippc.int/sites/default/files/documents//1336039694_DP_01_2010_En_2012-05-02.pdf
6. Karnkowski W. 1990. Jak oznaczyć wciornastka zachodniego? Ochrona Roślin 9: 11–13.
7. Karny H.H. 1925. Thrips found on tobacco in Java and Sumatra. Bulletin Deli Proefstation 23: 3–55.
8. Łabanowski G. 1988. Wciornastek zachodni – *Frankliniella occidentalis* (Pergande). Ochrona Roślin 9: 24.
9. Mound L.A., Kibby G. 1998. Thysanoptera an Identification Guide. CAB International, Wallingford, UK, 70 pp.
10. Mound L.A., Masumoto M. 2005. The genus *Thrips* (Thysanoptera, Thripidae) in Australia, New Caledonia and New Zealand. Zootaxa 1020: 1–64.
11. Murai T. 2001. The pest and vector from the East: *Thrips palmi*. p. 19–32. In: Proceedings of the 7th International Symposium on Thysanoptera, 2–7 July 2001, Calabria, Italy, 390 pp.
12. Nagai H., Tsumuki H. 1990. Search for winter host plants of *T. palmi* in winter. Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology 34: 105–108.
13. OEPP/EPPO. 1989. Data sheets on quarantine organisms No. 177, *Frankliniella occidentalis*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 19: 725–731.
14. Pergande Th. 1895. Observations on certain *Thripidae*. Insect Life 7: 390–395.
15. Przybylska A., Fiedler Ż., Kucharczyk H., Obrępalska-Stęplowska A. 2015. Detection of the quarantine species *Thrips palmi* by loop-mediated isothermal amplification. PLoS ONE 10 (3): e0122033. doi: 10.1371/journal.pone.0122033.
16. Lublinkhof J., Foster D.E. 1977. Development and reproductive capacity of *Frankliniella occidentalis* reared at three temperatures. Journal of the Kansas Entomological Society 50: 313–316.
17. Yoshihara T. 1982. An Overview of Researches on *Thrips palmi* in Japan. Kurume Vegetable Experimental Substation, Kurume, Japan.

4. SPIS FOTOGRAFII

Fot. 1. Postać dorosła wciornastka zachodniego (fot. Ż. Fiedler)
Fot. 2. Charakterystyczne uszkodzenia powodowane przez wciornastka zachodniego. Na zdjęciu widoczne srebrzyste plamy na powierzchni liścia oraz ciemne, grudkowate odchody (fot. Ż. Fiedler)
Fot. 3. Postać dorosła wciornastka orientalnego (fot. T. Murai)
Fot. 4. Postać dorosła wciornastka zachodniego (fot. M. Gawlak)
Fot. 5. Głowa wciornastka zachodniego ze szczecinkami międzyoczkowymi ciemniejszymi, silniejszymi i dłuższymi niż pozostałe szczecinki przyoczkowe (fot. M. Gawlak)
Fot. 6. Czułki wciornastka zachodniego są zawsze 8-członowe (fot. M. Gawlak)
Fot. 7. Wiele par szczecin na zakończeniu odwłoka wciornastka zachodniego (fot. M. Gawlak)
Fot. 8. Larwa wciornastka zachodniego: A – widok z boku; B – widok z góry (fot. M. Gawlak)
Fot. 9. Postać dorosła wciornastka orientalnego: A – widok od strony brzusznej; B – widok z boku (fot. M. Gawlak)
Fot. 10. Larwa wciornastka orientalnego: A – widok od strony brzusznej; B – widok z góry (fot. M. Gawlak)
Fot. 11. Skrzydła wciornastka orientalnego z dwiema żyłkami opatrzonymi w szczeciny (fot. M. Gawlak)
Fot. 12. Czułki wciornastka orientalnego są zawsze 7-członowe (fot. M. Gawlak)
Fot. 13. Stożki czuciowe w kształcie wystających widełek na III i IV członie czułków wciornastka orientalnego widoczne w różnych powiększeniach (A i B) (fot. M. Gawlak)
Fot. 14. Głowa wciornastka orientalnego ze szczecinkami przyocznymi III znajdującymi się na zewnątrz trójkąta przyoczkowego (fot. M. Gawlak)
Fot. 15. Na tergicie VIII wciornastka orientalnego widoczne dwie przetchlinki (fot. M. Gawlak)