

اعتمدت لجنة المعايير بالنيابة عن هيئة تدابير الصحة النباتية بروتوكول التشخيص هذا في
يناير/كانون الثاني 2016.
هذا الملحق جزء ملزم من المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية رقم 27.

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

بروتوكول التشخيص 12: الفيتوبلازما

اعتمد في 2016؛ نُشر في 2018

المحتويات

1- معلومات عن الآفة.....	2
2- معلومات تصنيفية.....	3
3- الكشف وتحديد الهوية.....	3
1-3 التفاعل المتسلسل للبوليميراز التقليدي المتداخل.....	5
2-3 التفاعل المتسلسل للبوليميراز الأنّي.....	6
3-3 شواهد الاختبارات الجزيئية.....	7
4-3 تفسير نتائج التفاعل المتسلسل للبوليميراز.....	9
1-4-3 التفاعل المتسلسل للبوليميراز التقليدي المتداخل.....	9
2-4-3 التفاعل المتسلسل للبوليميراز الأنّي.....	9
5-3 تحليل التسلسل.....	9
4- السجلات.....	10
5- جهات الاتصال للحصول على معلومات إضافية.....	10
6- شكر وتقدير.....	10
7- المراجع.....	11

1- معلومات عن الآفة

كان Doi et al. (1967) أول مكتشف الفيتوبلازما خلال بحثهم عن العامل المسبب لاصفرار النجمية. وقد سميت تلك الكائنات وحيدة الخلية، بأشباه المفطورات بسبب تشابهها المورفولوجي بالمفطورات الحيوانية وبسبب شدة تأثيرها بالمضادات الحيوية من نوع تتراسيكلين (Ishii et al., 1967). وتعتبر أنواع الفيتوبلازما من الممرضات النباتية الإجبارية البدائية النوى التي تخلو من الجدران الخلوية، وهي متعددة الأشكال ويتراوح متوسط قطرها بين 200 و800 نانومتر. وهي تعيش في الخلايا الغربالية للحاء عوائلها النباتية. وتمتاز الفيتوبلازما بجينومات يتراوح حجمها من حوالي 550 إلى 1500 كيلو قاعدة -وهي نسبياً جينومات صغيرة مقارنة ببدائيات النوى الأخرى - وهي تفتقر إلى عدة وظائف للتصنيع الحيوي (Marcone et al., 1999؛ Davis et al., 2005؛ Oshima et al., 2013؛ Bai et al., 2006).

ترتبط أنواع الفيتوبلازما بمجموعة مختلفة من الأعراض ضمن طائفة متنوعة من العوائل النباتية (Lee et al., 2000). وترتبط الإصابة بالفيتوبلازما بأعراض نموذجية تشمل المصوح (أي نمو أزهار خضراء اللون وفقدان الأصباغ الطبيعية للزهرة)؛ والتورّد (نمو الأجزاء الزهرية على هيئة أوراق)؛ و"مكنسة الساحرة" (تكوّن براعم فرعية أو إبطية) وأي انتشار آخر غير طبيعي للبراعم والجذور، واصفرار الأوراق أو احمرارها أو أي تغيير آخر في لونها؛ وتقلص حجم الورقة والثمرة؛ ونخر اللحاء؛ والتدهور العام والتقرّم (Davis and Sinclair, 1998)، وتعتبر بعض الأنواع النباتية أنها تتحمل أو تقاوم الإصابة بالفيتوبلازما؛ وعند إصابة تلك النباتات بالآفة قد لا تظهر عليها أي أعراض أو قد تظهر عليها أعراض طفيفة (Lee et al., 2000).

وقدّر Seemüller et al. (2002) أن هناك حوالي 1000 نوع نباتي يصاب بالفيتوبلازما، وتعتبر معظم عوائله النباتية من ثنائيات الفلقة. وقد اكتشف عدد أقل من أنواع الفيتوبلازما لدى وحيدات الفلقة، وغالبية ما تنتمي مثل هذه العوائل إلى فصيلتي النخيليات والنجيليات (Seemüller et al., 2002).

وتوجد أنواع الفيتوبلازما على مستوى العالم ككل. ويعتمد الانتشار الجغرافي لأمراض الفيتوبلازما وتأثيرها على نطاق عوائلها وكذلك على وجود الحشرات الناقلة وسلوكها الغذائي. فإن بعض أنواع الفيتوبلازما يتسم بنطاق واسع للنباتات العائلة وبالنقلات متعددة العوائل، ولهذا تمتاز بوسع انتشارها. وثمة أنواع أخرى من الفيتوبلازما التي لها نطاق محدود من العوائل والحشرات الناقلة ذات عوائل محدودة أو أحادية، الأمر الذي يُحدّ من انتشارها الجغرافي. للاطلاع على الانتشار الجغرافي للمجموعات التصنيفية لأنواع الفيتوبلازما انظر (Foissac and Wilson, 2010).

ويمكن للفيتوبلازما أن تنتقل بواسطة الحشرات الناقلة، ونبات الحامل المتعرّش الطفيلي، والتطعيم، كما يمكن انتشارها عن طريق التكاثر الخضري للأجزاء المصابة من النبتة. وتقتصر الحشرات الناقلة للفيتوبلازما، والمسؤولة عن نسبة كبيرة من انتشارها الطبيعي، على النشاطات الورقية والنشاطات النباتية والبسيلا (نصفيات الأجنحة، عنقيات الخرطوم) التي تتغذى كلها من اللحاء، وتنقل الممرضات بامعان. ووضع Weintraub and Beanland (2006) قائمة بأكثر من 90 نوعاً يعرف عنه أنه ناقل يمكن لبعضه نقل أكثر من بلازما نباتية واحدة. وثمة طرق أخرى لنقل الفيتوبلازما تشمل الانتقال بواسطة نبات الحامل المتعرّش الطفيلي والتطعيم. وتعتبر نباتات الحامل (من نوع *Cuscuta* and *Cassytha* spp.) طفيليات للكروم تمدّ أوعية اتصال بعوائلها من خلال مراعش. وعندما يقام جسر بين نبات سليم وآخر مصاب بالفيتوبلازما، تنتقل الفيتوبلازما

إلى النبات السليم عبر قنوات اللحاء الناقلة. ويمكن نقل الآفة بالتطعيم والإكثار الدقيق للنباتات ضمن زراعة الأنسجة، لحفظ الفيتوبلازما لأغراض مرجعية (IPWG، بدون تاريخ). يمكن الاطلاع على مزيد من المعلومات حول الفيتوبلازما، بما في ذلك صور تظهر الأعراض المرضية وقائمة بالحشرات الناقلة وقاعدة بيانات عن تصنيف الفيتوبلازما، على الموقعين الإلكترونيين التاليين:

COST Action FA0807 Integrated Management of Phytoplasma Epidemics in Different Crop Systems (الإدارة المتكاملة لأوبئة الفيتوبلازما في أنظمة المحاصيل المختلفة) (<http://www.costphytoplasma.ipwgn.net.org/>) ومركز موارد الفيتوبلازما (<http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/phytoplasma.html>)

2- معلومات تصنيفية

الاسم: الفيتوبلازما (البلازما النباتية)

المرادفات: كائنات مشابهة للمفطورات (MLO)، مفطورات

الوضع التصنيفي: Bacteria، Firmicutes، Mollicutes، Acholeplasmataceae، Acholeplasmatales، "Candidatus Phytoplasma"

قام فريق العمل المعني بالفيتوبلازما/الطفيليات الحلزونية ومجموعة تصنيف الفيتوبلازما لدى برنامج البحوث الدولي المعني بالعلوم المقارنة للمفطورات (IRPCM)، بوضع خطوط توجيهية لوصف أنواع "الفيتوبلازما المرشحة" "Candidatus (Ca.) Phytoplasma" ويعتمد تحديد أنواع "الفيتوبلازما المرشحة" "Ca. Phytoplasma" على تسلسلات جينة الحمض النووي الريباسي 16S، فضلاً عن مواصفاته البيولوجية. وتكون الفيتوبلازما عموماً ضمن النوع الواحد متطابقة بنسبة $\leq 97.5\%$ في المائة على ≤ 200 1 نوكلوتيد من جينة الحمض النووي الريباسي 16S. وعندما تتضمن أنواع الفيتوبلازما المرشحة خصائص بيولوجية مختلفة (ناقلات ونباتات عائلة)، يمكن تمييزها تصنيفياً وفقاً لقواعد محددة وردت في (IRPCM 2004). وتم نشر وصف أنواع "الفيتوبلازما المرشحة" في مجلة *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* واعتباراً من مارس/آذار 2015 وصف 37 نوعاً من "الفيتوبلازما المرشحة".

3- الكشف وتحديد الهوية

تعتبر تقنيات التفاعل المتسلسل للبوليميراز، الطريقة المختارة لكشف الفيتوبلازما. ويعتمد نجاح الكشف الجزيئي للبلازما النباتية على أخذ العينات من الأنسجة النباتية بالطريقة المناسبة، وعلى الطرق الموثوقة لاستخراج حمض النواة (Palmano, 2001؛ Firrao et al., 2007). ويمكن لأنواع الفيتوبلازما أن تكون موزعة بشكل غير متجانس وبمستوى متفاوت على امتداد النبتة وبخاصة في العوائل الخشبية، ويُعتبر النسيج الذي تظهر عليه أعراض الإصابة مثاليًا لكشف وجود الفيتوبلازما (Constable et al., 2003؛ Garcia-Chapa et al., 2003؛ Christensen et al., 2004؛ Necas and Krska, 2006). ويمكن أن تصاب بعض النباتات العائلة بعدوى عديمة الأعراض، وإذا ما تم الاشتباه بها فمن المهم أخذ العينات بشكل وافٍ من مختلف أنسجة النبتة.

وتؤثر كمية الفيتوبلازما الموجودة لدى النبات العائل في موثوقية اختبار التفاعل المتسلسل للبوليميراز (Marzachi, 2004). ويمكن لكمية الفيتوبلازما أن تتأثر بسلالتها أو أنواعها وبأنواع النباتات العائلة وبتوقيت الإصابة والظروف المناخية. ويعتبر توقيت أخذ عينات من أنسجة النباتات هاماً على اعتبار أن تموضع الفيتوبلازما وكميتها في النبات قابلان للتأثر بالتغيرات

الموسمية (Seemüller et al., 1984؛ Jarausch et al., 1999؛ Berges et al., 2000؛ Constable et al., 2003؛ Garcia-Chapa et al., 2003؛ Prezelj et al., 2012).

وتعتبر الأوراق النباتية التي تظهر عليها أعراض الإصابة، أفضل مصادر للعينات بهدف تشخيص غالبية أمراض الفيتوبلازما. تتموضع الفيتوبلازما في الخلايا الغربالية للحاء النباتات المصابة، ولذا كثيراً ما تتم الاستعانة بمعاليق الأوراق أو العروق الوسطى أو السوق أو القشرة الداخلية من أجل استخراج الحمض النووي، وفي بعض الحالات (مثل المرض x الناجم عن الفيتوبلازما)، فإن سويقات الثمار تحتوي على أعلى كمية من الفيتوبلازما (Kirkpatrick, 1991). ورغم أنه يجوز أيضاً كشف الفيتوبلازما في جذور الأشجار الساكنة وأجزاء من لحائها، يفضل عموماً كشف الفيتوبلازما في نهاية فصل الصيف. ويمكن حفظ العينات النباتية التي يتم جمعها عند درجة حرارة 20 درجة مئوية تحت الصفر لأكثر من ستة أشهر قبل إجراء الاختبار. ويمكن تخزينها لفترة أطول عند درجة حرارة 80 درجة مئوية تحت الصفر أو يمكن تجفيفها بواسطة التجميد أو تجفيفها بكلوريد الكليسيوم وتخزينها عند درجة حرارة 4 درجات مئوية.

وأفيد عن طرق متنوعة لاستخراج الأحماض من النوى بهدف كشف الفيتوبلازما بواسطة التفاعل المتسلسل للبوليميراز. وهناك عدد من الطرق التي تستعين بمرحلة للتخصيب من أجل تركيز الفيتوبلازما قبل استخراج حمض النوى (Kirkpatrick et al., 1987؛ Ahrens and Seemüller, 1992؛ Prince et al., 1993). ويمكن لهذه التقنيات أن تكون مفيدة في حال العوائل التي توجد فيها الفيتوبلازما بكميات متدنية، مثل النباتات الخشبية المعمرة، أو في حال العوائل "الصعبة" التي قد تستخرج، بالاقتران مع استخراج حمض النوى، مستويات مرتفعة من المركبات مثل السكريات المتعددة والبولي فينول القادرة على كبح التفاعل المتسلسل للبوليميراز. ويتم في بعض الطرق المبسطة، طحن الأنسجة النباتية مباشرة في داري متحلل متوفر تجارياً، أو في محلول داري قائم على بروميد تريميثيلامونيوم سيتيل. ويتم استخدام 2 في المائة من بروميد تريميثيلامونيوم سيتيل (ثبت أن المحلول بنسبة 3 في المائة أكثر موثوقية في حال كرمة العنب) (Daire et al., 1997؛ Angelini et al., 2001). ويتم بعد ذلك استخراج الحمض النووي مباشرة من الخلالة باستعمال أعمدة دوران السيليكا المتوفرة تجارياً (Green et al., 1999؛ Palmano, 2001) أو الخزرات المغناطيسية (Mehle et al., 2013) أو باستعمال مذبيبات عضوية (Daire et al., 1997؛ Zhang et al., 1998). تنفذ الطريقة التي تستعين بالخزرات المغناطيسية بواسطة جهاز آلي لاستخراج حمض النوى (مثل KingFisher من Thermo Scientific¹). وإن غالبية طرق الاستخراج مثبتة الصلاحية بالكامل لمجموعة متنوعة من العوائل النباتية. ويتم اختيار الطريقة تبعاً للعائل قيد الاختبار ومدى توفر المرافق والتجهيزات. وقد يكون من العملي تطبيق طريقة تتضمن مرحلة لتخصيب الفيتوبلازما للعوائل الخشبية المعمرة، فيما تطبق طريقة مبسطة للعوائل العشبية. ومن المهم، لإجراء التشخيصات الروتينية، إثبات صلاحية طريقة استخراج العائل المحدد لضمان الموثوقية.

تم تصميم عدد من بادئات التفاعل المتسلسل للبوليميراز الشاملة التي تسمح بتضخيم جينة الحمض النووي الريباسي 16S لأية فيتوبلازما معروفة. البادئتان الأكثر شيوعاً هما P1/P7 (Deng and Hiruki, 1991؛ Schneider et al., 1995) وزوج البوادي R16F2n/R16R2 (Lee et al., 1993؛ Gundersen and Lee, 1996) اللتان يمكن استخدامهما في بروتوكول التفاعل المتسلسل للبوليميراز المتداخل. ويقوم زوج البوادي P1/P7 بتضخيم أحد منتجات التفاعل المتسلسل للبوليميراز الذي

¹ في هذا بروتوكول التشخيص 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. إن استخدام أسماء الكواشف أو المواد الكيميائية أو التجهيزات في بروتوكولات التشخيص 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.

يحتوي على جينة الحمض النووي الريباصي 16S كاملةً، فضلاً عن المنطقة المبادعة 16S/23S للحمض النووي الريباصي. أفيد أن حساسية التفاعل المتسلسل للبوليميراز الآني تفوق أو تضاهي حساسية التفاعل المتداخل وذلك بحسب الفيتوبلازما -العائل (Christensen *et al.*, 2004) كما أن هذا التفاعل أكثر قابلية للتحليل ذي الإنتاجية العالية إذ لا داعي للمعالجة بعد المضاعفة. ويعتبر التفاعل المتسلسل للبوليميراز الآني باستخدام مسابر TaqMan أكثر تخصصاً كذلك وينطوي على احتمال أقل لانتقال التلوث بين الأدوات والعينات لدى التفاعل المتسلسل للبوليميراز التقليدي ولا سيما التفاعل المتداخل. يمكن ورود نتائج إيجابية كاذبة مع أنواع البكتيريا القريبة جداً من الفيتوبلازما، في مقاييسات التفاعل المتسلسل للبوليميراز التي يوصي بها هذا البروتوكول – وهذه مساومة لا غنى عنها من أجل تنفيذ مقاييسات شاملة (Fránová, 2011؛ Pilotti *et al.*, 2014). ومن الممكن تنفيذ مقاييسات أكثر تخصصاً للتفاعل المتسلسل للبوليميراز، أو في حال كانت النتيجة حرجة (مثل عينات الحجر الصحي ما بعد الدخول، والسجل الجديد للعوائل، والتوزيعات الجديدة)، تنبغي سلسلة منتج التفاعل التقليدي.

وفضلاً عن تضخيم جينة الحمض النووي الريباصي 16S، استُخدمت طرق التفاعل المتسلسل للبوليميراز أيضاً لتضخيم مناطق الجينوم الأخرى بقصد كشف الفيتوبلازما وتصنيفها، بما في ذلك جينات البروتين الريباصي (Lim and Sears, 1992؛ Jomantiene *et al.*, 1998؛ Lee *et al.*, 1998؛ Martini *et al.*, 2007). ويمكن لهذه البوادي أن تكون مفيدة عندما تدعو الحاجة إلى منطقة مستقلة ثانية لجينوم الفيتوبلازما.

وقد تحتوي العينات على مركبات كفيلة بكبح التفاعل المتسلسل للبوليميراز وذلك تبعاً لأنواع العوائل ونوع الأنسجة وسنّها. وعلى ذلك، فمن المهم التحقق من كفاءة التفاعل المتسلسل للبوليميراز لمستخرجات الحمض النووي باستعمال بوادي الشاهد الداخلي التي تضخم جينة من النبتة العائلة. ويمكن تجاوز التأثيرات الكابحة للعائل عبر زيادة تنقية الحمض النووي باستخدام عمود دوران السيفاكريل أو عبر إضافة ألبومين المصل البقري (Kreader, 1996).

1-3 التفاعل المتسلسل للبوليميراز التقليدي المتداخل

إن بادئتي التفاعل المتسلسل للبوليميراز المستخدمتين في هذا الاختبار هما P1 (Deng and Hiruki, 1991) و P7 (Schneider *et al.*, 1995) لتفاعل المرحلة الأولى:

P1 (أمامية): 5'-AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T-3'

P7 (عكسية): 5'-CGT CCT TCA TCG GCT CTT-3'

أما بادئتا تفاعل المرحلة الثانية فهما R16F2n (Gundersen and Lee, 1996) و R16R2 (Lee *et al.*, 1993):

R16F2n (أمامية): 5'-GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG-3'

R16R2 (عكسية): 5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G-3'

ويتكوّن خليط التفاعل البالغة كميته 20 ميكرو لتر من دارئ بوليميراز الحمض النووي للمستحرة المائية $\times 1$ الذي يحتوي كلوريد المغنيزيوم 1.5 ميليمولار بمقدار 0.5 ميكرومولار لكل بادئة، ونكليوتيدات ثلاثية الفوسفات 200 ميكرومولار، ووحدة من بوليميراز الحمض النووي للمستحرة المائية ونموذج حمض نووي 2 ميكرو لتر. تتألف أطوار التضخيم من مرحلة تمسيخ أولية عند درجة حرارة 94 درجة مئوية لمدة دقيقتين، تعقبها 40 دورة عند درجة حرارة 94 درجة

مئوية لمدة ثلاثين ثانية و 53 درجة مئوية (البادنتان P1/P7) أو 50 درجة مئوية للبادنتين (R16F2n/R16R2) لمدة ثلاثين ثانية و 72 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة، ومرحلة تمديد أخيرة عند درجة حرارة 72 درجة مئوية لمدة عشر دقائق. أما بالنسبة إلى التفاعل المتداخل، فيستخدم 1 ميكرو لتر من منتجات تفاعل المرحلة الأولى إما بشكل غير مذوب وإما مذوب بنسبة تصل إلى 1:30، كنموذج لتفاعل المرحلة الثانية. ومن ثم تحلل منتجات التفاعل بواسطة الرحلان الكهربائي الهلامي. وتنتج البادنتان R16F2n/R16R2 تباهاً أمبليكوناً من 1 800 زوج قاعدة، وأمبليكوناً من 1250 زوج قاعدة.

ويتأكد وجود الحمض النووي المؤهل للتفاعل المتسلسل للبوليميراز في المستخرجات باستخدام جينة الحمض النووي الريباسي 28S الشاملة حقيقية النواة لـ (Werren et al. (1995).

28Sf (أمامي): 5'-CCC TGT TGA GCT TGA CTC TAG TCT GGC-3'

28Sr (عكسي): 5'-AAG AGC CGA CAT CGA AGG ATC-3'

وينطوي الخليط المستخدم لمقايضة جينة الحمض النووي الريباسي 28S على المكونات نفسها ويتم تدويره ضمن نفس أطوار مقايضة الفيتوبلازما، بحيث يمكن تنفيذ المقايستين بالتزامن في أنبوبين منفصلين. تنتج البادنتان 28Sf/28Sr أمبليكوناً يتراوح حجمه بين 500 و 600 زوج قاعدة.

ويمكن استخدام أزواج بادئات أخرى أيضاً من أجل التثبيت من أهلية الحمض النووي المعين للتفاعل المتسلسل للبوليميراز.

2-3 التفاعل المتسلسل للبوليميراز الآني

وينفذ التفاعل المتسلسل للبوليميراز الآني باستخدام مقايضة TaqMan المصممة لجينة الحمض النووي الريباسي 28S التي استخدمها (Christensen et al. (2004):

بادئة أمامية: 5'-CGT ACG CAA GTA TGA AAC TTA AAG GA-3'

بادئة عكسية: 5'-TCT TCG AAT TAA ACA ACA TGA TCC A-3'

مسبار TaqMan: 5'-FAM-TGA CGG GAC TCC GCA CAA GCG-BHQ-3'

ويجوز بدلاً من ذلك الاستعانة بالتفاعل المتسلسل للبوليميراز الآني المذكور لدى (Hodgetts et al. (2009) والمصمم لجينة الحمض النووي الريباسي 23S.

JH-F 1 (بادئة أمامية): 5'-GGT CTC CGA ATG GGA AAA CC-3'

JH-F كلية (بادئة أمامي): 5'-ATT TCC GAA TGG GGC AAC C-3'

JH-R (بادئة عكسية): 5'-CTC GTC ACT ACT ACC RGA ATC GTT ATT AC-3'

JH-P شاملة (مسبار TaqMan): 5'-FAM-MGB-AAC TGA AAT ATC TAA GTA AC-BHQ-3'

ويتكون خليط التفاعل البالغة كميته 25 ميكرو لتر من خليط المستحرة المائية الرئيسي $1 \times$ للتفاعل المتسلسل للبوليميراز الآني، وبادئة أمامية 300 نانومتر، وبادئة عكسية 300 نانومتر، ومسبار FAM 100 نانومتر، ونموذج حمض نووي 2 ميكرو لتر. يتم اختبار العينات بنسختين لكل منها. تتألف أطوار عملية التضخيم من مرحلة تمسيخ أولية عند درجة حرارة 95 درجة مئوية لمدة

3 دقائق تعقبها 40 دورة عند درجة حرارة 95 درجة مئوية لمدة 15 ثانية و 60 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة. قد تتفاوت أطوار التدوير بتفاوت نوع الخليط الرئيسي المستخدم (فعلى سبيل المثال تتطلب بعض الخلائط مرحلة لتفعيل البوليميراز عند درجة حرارة 95 درجة مئوية لمدة 10 دقائق فيما تستوجب الخلائط التي تحتوي على جينة UDG فترة تعليق في البداية عند درجة حرارة 50 درجة مئوية لمدة دقيقتين). تحلل نتائج التفاعل المتسلسل للبوليميراز الآني بواسطة البرمجيات المرفقة بالأداة التي تتيحها الشركة المصنعة. وتستعين بمقايضة التفاعل المتسلسل للبوليميراز الآني لـ (Christensen et al., 2004) بـ 900 نانومتر من البادئة العكسية وقد جرى تحديث الكمية إلى 300 نانومتر في تقرير لاحق (Christensen et al., 2013). يمكن تنفيذ هذه المقايضة مع أية من كميتي البادئة العكسية المذكورتين.

تم تقييم طريقة التفاعل المتسلسل للبوليميراز الآني لجينة الحمض النووي الريباسي 16S عبر اختبار أنواع الفيتوبلازما من 18 مجموعة فرعية، فتبين أنها بنفس حساسية التفاعل التقليدي المتداخل أو تفوقه حساسية عشر مرات، وذلك تبعاً للبلازما النباتية-العائل (Christensen et al., 2004). وتبين من اختبار حلقة لكشف الفيتوبلازما في الأشجار المثمرة شارك فيه 22 مختبراً أن مقايستتي (Christensen et al., 2004) و (Hodgetts et al., 2009) متشابهتين من حيث الحساسية والخصوصية. (EUPHRESO FruitPhytoInterlab Group, 2011).

ويتمّ التثبيت من وجود حمض نووي مؤهل للتفاعل المتسلسل للبوليميراز في المستخرجات، باستخدام مقايضة COX الواردة في (Weller et al., 2000) التي تضخم جينة أكسيداز السيتوكروم:

COX-F (بادئة أمامية): 5'-CGT CGC ATT CCA GAT TAT CCA-3'

COX-R (بادئة عكسية): 5'-CAA CTA CGG ATA TAT AAG AGC CAA AAC TG-3'

COX-P (مسبار TaqMan): 5'-FAM-TGC TTA CGC TGG ATG GAA TGC CCT-BHQ-3'

وبدلاً من ذلك، يمكن استخدام مقايضة جينة الحمض النووي الريباسي 18S لـ (Christensen et al., 2004)

بادئة أمامية: 5'-GAC TAC GTC CCT GCC CTT TG-3'

بادئة عكسية: 5'-AAC ACT TCA CCG GAC CAT TCA-3'

مسبار TaqMan: 5'-FAM-ACA CAC CGC CCG TCG CTC C-BHQ-3'

وتتكون خلائط التفاعل الخاصة بطريقة COX وتلك التي تخص مقايسات جينة الحمض النووي الريباسي 18S، من المكونات نفسها، كما يجري تدويرها ضمن الأطوار نفسها المعتمدة لمقايضة الفيتوبلازما الآني بحيث يمكن تنفيذ المقايستين بالتزامن في أنبوبين منفصلين. وكبدل عن ذلك، يجوز تنفيذ مقايضة الرقابة الداخلية على مستويات متعددة في الأنبوب نفسه لمقايضة الفيتوبلازما، في حال كان المسبار موسوماً بصبغة مخبرة مختلفة، وشريطة أن تكون كميات البادئات والمسابر في أفضل مستوياتها، للحؤول دون أن تصبح كميات الفيتوبلازما أقل بكثير من المستويات المرتفعة للحمض النووي النباتي المستخدم كشاهد داخلي.

3-3 شواهد الاختبارات الجزيئية

لكي تعتبر نتيجة الاختبار موثوقة، ينبغي تناول شواهد مناسبة – تبعاً لنوع الاختبار المستخدم ومستوى التأكد المطلوب – لكل سلسلة عزل وتضخيم لحمض نواة الآفة المستهدفة.

وبالنسبة إلى التفاعل المتسلسل للبوليميراز، فإن الشاهد الإيجابي للحمض النووي والشاهد الداخلي والشاهد السلبي للتضخيم (بدون شاهد نموذج) هي شواهد الحد الأدنى الواجب استخدامها.

الشاهد الإيجابي لحمض النووية. يتم استخدام هذا الشاهد لرصد كفاءة طريقة الاختبار (ما عدا الاستخراج)، وبخاصة التضخيم. يمكن استخدام الحمض النووي للفيوتوبلازما المستخرج من نبتة مصابة، أو الحمض النووي المضخم للجينوم الكامل أو شاهد مصنع (مثل المنتج المستنسخ للتفاعل المتسلسل للبوليميراز).

الشاهد الداخلي. فيما يخص التفاعل التقليدي والتفاعل الآني، ينبغي إدماج جينة لتدبير شؤون التركيب الوراثي، مثل جينة الحمض النووي الريباسي الشاملة حقيقية النواة 28S (انظر القسم 3-1 للاطلاع على استخدامها في التفاعل التقليدي المتداخل) أو جينة COX (انظر القسم 302 للاطلاع على استخدامها في التفاعل الآني) ضمن البروتوكول، من أجل القضاء على احتمال ورود نتائج سلبية كاذبة للتفاعل الناجمة عن فشل استخراج الحمض من النواة أو فساد هذا الأخير أو وجود كوابح للتفاعل.

شاهد التضخيم السلبي (لا شاهد نموذج). يعتبر هذا الشاهد ضرورياً للتفاعل التقليدي والتفاعل الآني، من أجل استبعاد أية نتائج إيجابية كاذبة ناجمة عن التلوث خلال إعداد خليط التفاعل. أما الماء الملائم للتفاعل المتسلسل للبوليميراز الذي استخدم لإعداد خليط التفاعل، فيضاف في مرحلة التضخيم.

شاهد الاستخراج الإيجابي-يستخدم هذا الشاهد للتأكد من أن حمض نووية الفيتوبلازما متاح بكمية وبجودة كافيتين للتفاعل المتسلسل للبوليميراز ولضمان كشف الممرضات. يتم استخراج الحمض النووي للفيوتوبلازما من أنسجة العوائل المصابة أو من النسيج النباتي السليم الذي قد لدغته الفيتوبلازما.

وينبغي لكمية الشاهد الإيجابي أن تضاهي حوالي عُشر كمية أنسجة الأوراق النباتية المستخدمة لكل نبتة، من أجل استخراج الحمض النووي. وإذا ما تم استكثار العينات، فيجب تعديل كمية الشواهد الإيجابية بموجب ذلك (مثلاً عُشر كتل من عينات يبلغ وزن الواحدة منها 20 ملغ لاستخراج الحمض النووي، و2 ملغ من الأوراق النباتية المصابة + 198 ملغ من الأنسجة النباتية السليمة). وإذا لم يتم كشف الشاهد الإيجابي، فيجب تكرار الاختبار أو تخفيض معدل الاستكثار إلى أن يتحقق كشفٌ يمكن التعويل عليه.

ومن أجل التفاعل المتسلسل للبوليميراز، يجب اتخاذ الحيطة من أجل تجنب انتقال التلوث جراء الرذاذ الناجم عن الشاهد الإيجابي أو عن العينات الإيجابية. وينبغي للشاهد الإيجابي المستخدم في المختبر أن يُسلسل بحيث يصبح ذلك التسلسل جاهزاً للمقارنته بسهولة مع التسلسلات التي تم الحصول عليها من أمبليكونات التفاعل ذات الحجم الصحيح. وكبدل عن ذلك، يمكن تكوين شواهد إيجابية مصنعة ذات تسلسل معروف يمكن أن تقارن بدورها بأمبليكونات التفاعل ذات الحجم المناسب.

الشاهد السلبي للاستخراج-يستعمل هذا الشاهد لرصد التلوث خلال استخراج حمض النوى و/أو التفاعل المتبادل مع نسيج العائل. ويجوز للشاهد أن يكون دارئ الاستخراج أو يمكن أن يحتوي على حمض نوى قد تم استخراجه من نسيج عائل غير مصاب قد خضع بالتالي إلى التضخيم. وفي حال توقع أعداد كبيرة من العينات الإيجابية، يوصى بإدراج شواهد سلبية للاستخراج بين العينات ليتم اختبارها.

4-3 تفسير نتائج التفاعل المتسلسل للبوليميراز

1-4-3 التفاعل المتسلسل للبوليميراز التقليدي المتداخل

يعتبر التفاعل المتصل بالمرضات موثقاً به فقط في حال:

- أنتج الشاهد الإيجابي أمبليكوناً للمرض المستهدف، بالحجم الصحيح
- لم ينتج شاهد الاستخراج السلبي وشاهد التضخيم السلبي أي أمبليكونات للمرض المستهدف، بالحجم الصحيح

أما بالنسبة إلى الشواهد الداخلية التي تستهدف الحمض النووي للنبته، فعلى كل من الشاهد السليم (في حال استخدامه) والشاهد الإيجابي وكل من عينات الاختبار أن ينتج أمبليكوناً بالحجم المتوقع. وفي حال عجزت العينات عن التضخم بواسطة بادئات الشاهد الداخلي فهذا قد يعني مثلاً أن استخراج الحمض النووي قد فشل، أو أن حمض النواة لم يدرج في خليط التفاعل أو أن ثمة مركبات في الحمض النووي المستخرج تكبح التفاعل أو أن الحمض النووي قد فسد.

وتعتبر نتيجة اختبار العينة المحددة إيجابية إذا ما أنتج أمبليكوناً بالحجم الصحيح. ومن أجل تحديد هوية الفيتوبلازما الموجودة في عينات إيجابية، فلا بد من سلسلة الأمبليكون (انظر القسم 3-5). وفي بعض الحالات ثمة مقاييس متاحة للتفاعل أكثر تحديداً.

2-4-3 التفاعل المتسلسل للبوليميراز الآني

يحدد التفاعل المتسلسل للبوليميراز الآني ما إذا كانت العينة إيجابية أو سلبية فيما خص إصابتها بالفيتوبلازما. من أجل تحديد هوية الفيتوبلازما الموجودة في العينات الإيجابية، ينبغي تنفيذ تفاعل تقليدي من أجل الحصول على طول لا يقل عن 1250 زوج قاعدة من جينة الحمض النووي الريباسي 16S الناتجة عن زوج البادئات R16F2n/R16R2 من أجل تحليل السلسلة (انظر القسم 3-5). وبدلاً من ذلك، ولبعض أنواع الفيتوبلازما، قد يجوز استخدام مقاييس محددة للتفاعل الآني مثلاً، مجموعة (انتشار التفاح) SrX16 (Torres et al., 2005) والاصفرار الذهبي (Pelletier et al., 2009).

5-3 تحليل التسلسل

تنبغي سلسلة منتجات التفاعل إما مباشرة وإما بنقلها أولاً إلى عامل استنساخ للتفاعل التسلسلي للبوليميراز. ويمكن تحليل بيانات التسلسل باستعمال "أداة البحث عن الاصطفاف المحلي الأساسي" BLASTN المتوفرة في المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). وإذا كانت هوية تسلسل الفيتوبلازما تتشابه بنسبة 97.5 في المائة مع أقرب قريباتها، فتعتبر من أنواع "الفيتوبلازما المرشحة" الجديدة. وفي هذه الحالة، يجب سلسلة كامل جينة الحمض النووي الريباسي 16S وأداء تحليل تطور السلالة. ومن المحبذ أن تسلسل منطقة منفصلة من الجينوم مثل منطقة secY المباشرة للحمض الريباسي النووي 16S/23S أو جينات البروتين الريباسي أو جينة tuf.

4- السجلات

يجب الاحتفاظ بالسجلات والأدلة بالطريقة الموصوفة في المعيار الدولي رقم 27 (بروتوكولات تشخيص الآفات الخاضعة للوائح).

وفي الحالات التي قد تتأثر فيها أطراف متعاقدة أخرى بنتائج التشخيص، لا سيما حالات عدم الامتثال، وحيث يسجل وجود الفيتوبلازما في منطقة ما للمرة الأولى، ينبغي الاحتفاظ بالسجلات والأدلة والمواد الإضافية التالية لسنة واحدة على الأقل على نحو يضمن الاقتفاء:

- تحفظ العينة الأصلية مجمدة عند درجة حرارة 80 درجة مئوية تحت الصفر، أو تجفف بواسطة التجميد أو تجفف على كلوريد الكالسيوم وتحفظ عند درجة حرارة أربع درجات مئوية.
- وإذا كان الأمر مناسباً، تبقى مستخرجات الحمض النووي عند درجة حرارة 20 درجة مئوية تحت الصفر أو 80 درجة مئوية تحت الصفر. أما المستخرجات النباتية التي جرى تبقيعها على أغشية، فتحفظ عند درجة حرارة البيئة المحيطة.
- لدى الاقتضاء، يجب حفظ منتجات تضخيم التفاعل عند درجة حرارة 20 درجة تحت الصفر أو 80 درجة تحت الصفر.

5- جهات الاتصال للحصول على معلومات إضافية

يمكن الحصول على معلومات إضافية بشأن هذا البروتوكول على العناوين التالية:

Plant Health and Environment Laboratory, Ministry for Primary Industries, PO Box 2095, Auckland 1140, New Zealand (Lia W. Liefing; e-mail: lia.liefing@mpi.govt.nz; tel.: +64 9 9095726; fax: +64 9 9095739).

Department of Economic Development, Jobs, Transport and Resources, Victoria, AgriBio, 5 Ring Road, Bundoora, VIC 3083, Australia (Fiona Constable; e-mail: fiona.constable@ecodev.vic.gov.au; tel.: +61 3 9032 7326; fax: + 61 3 9032 7604).

Department of Territory and Sustainability, Av. Diagonal 525, 08029 Barcelona, Spain (Ester Torres; e-mail: ester.torres@gencat.net).

Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Institute for Plant Protection and Fruit Crops, Schwabenheimer Str. 101, D-69221 Dossenheim, Germany (Wilhelm Jelkmann; e-mail: wilhelm.jelkmann@jki.bund.de).

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

6- شكر وتقدير

أعّد المسودة الأولى لبروتوكول التشخيص هذا L.W. Liefing (مختبر الصحة النباتية والبيئة، وزارة الصناعات الأولية، نيوزيلندا) (انظر القسم السابق)، و P. Jones (قسم تفاعلات ممرضات النبات، معهد البحوث Rothamsted Research، المملكة المتحدة)، و F. Constable (قسم التنمية

الاقتصادية والعمل والنقل والموارد، فيكتوريا، أستراليا (انظر القسم السابق))، و E. Torres (قسم الأراضي والاستدامة، برشلونة، إسبانيا (انظر القسم السابق))، و W. Jelkmann (المركز الاتحادي للبحوث البيولوجية للزراعة والحراجة، معهد وقاية النباتات ومحاصيل الفاكهة، ألمانيا) (انظر القسم السابق)) و J. Verhoeven (شعبة وقاية النباتات، قسم التشخيصات، Wageningen، هولندا).

7- المراجع

يتضمن هذا الملحق إحالات مرجعية إلى المعايير الدولية لتدابير الصحة النباتية. والمعايير الدولية متاحة على البوابة الدولية للصحة النباتية على العنوان: <https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/ispm>

- Ahrens, U. & Seemüller, E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology*, 82: 828–832.
- Angelini, E., Clair, D., Borgo, M., Bertaccini, A. & Boudon-Padieu, E. 2001. Flavescence dorée in France and Italy: Occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma. *Vitis*, 40: 79–86.
- Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S.A., Jancso Radek, A., Shevchenko, D.V., Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J.W. & Hogenhout, S.A. 2006. Living with genome instability: The adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology*, 188: 3682–3696.
- Berges, R., Rott, M. & Seemüller, E. 2000. Range of phytoplasma concentration in various hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 90: 1145–1152.
- Christensen, N.M., Nicolaisen, M., Hansen, M. & Schulz, A. 2004. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 17: 1175–1184.
- Christensen, N.M., Nyskjold, H. & Nicolaisen, M. 2013. Real-time PCR for universal phytoplasma detection and quantification. In: M. Dickinson & J. Hodgetts, eds. *Phytoplasma: Methods and protocols*. Methods in molecular biology series, Vol. 938, pp. 245–252. New York, NY, Humana Press. 421 pp.
- Constable, F.E., Gibb, K.S. & Symons, R.H. 2003. Seasonal distribution of phytoplasmas in Australian grapevines. *Plant Pathology*, 52: 267–276.
- Daire, X.D., Clair, D., Reinert, W. & Boudon-Padieu, E. 1997. Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to the elm yellows group and to the stolbur subgroup by PCR amplification of nonribosomal DNA. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 507–514.
- Davis, R.E., Jomantiene, R. & Zhao, Y. 2005. Lineage-specific decay of folate biosynthesis genes suggests ongoing host adaptation in phytoplasmas. *DNA Cell Biology*, 24: 832–840.
- Davis, R.E. & Sinclair, W.A. 1998. Phytoplasma identity and disease etiology. *Phytopathology*, 88: 1372–1376.
- Davis, R.E., Zhao, Y., Dally, E.L., Lee, I.M., Jomantiene, R. & Douglas S.M. 2013. ‘*Candidatus* Phytoplasma pruni’, a novel taxon associated with X-disease of stone fruits, *Prunus* spp.: multilocus characterization based on 16S rRNA, *secY*, and ribosomal protein genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 766–776.
- Deng, S. & Hiruki, C. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable Mollicutes. *Journal of Microbiological Methods*, 14: 53–61.
- Doi, Y.M., Teranaka, M., Yora, K. & Asuyama, H. 1967. Mycoplasma or PLT-group like micro-organisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato

- witches' broom, aster yellows and paulownia witches' broom. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 33: 259–266.
- EUPHRESKO FruitPhytoInterlab Group.** 2011. European interlaboratory comparison and validation of detection methods for '*Candidatus* Phytoplasma mali', '*Candidatus* Phytoplasma prunorum' and '*Candidatus* Phytoplasma pyri': Preliminary results. *Bulletin of Insectology*, 64 (Supplement): S281–S284.
- Firrao, G., Garcia-Chapa, M. & Marzachi, C.** 2007. Phytoplasmas: Genetics, diagnosis and relationships with the plant and insect host. *Frontiers in Bioscience*, 12: 1353–1375.
- Foissac, X. & Wilson, M.R.** 2010. Current and possible future distributions of phytoplasma diseases and their vectors. In P.G. Weintraub & P. Jones, eds. *Phytoplasmas: Genomes, plant hosts, and vectors*, pp. 309–324. Wallingford, UK, CABI. 331 pp.
- Fránová, J.** 2011. Difficulties with conventional phytoplasma diagnostic using PCR/RFLP analyses. *Bulletin of Insectology*, 64 (Supplement): S287–S288.
- Garcia-Chapa, M., Medina, V., Viruel, M.A., Lavina, A. & Batlle, A.** 2003. Seasonal detection of pear decline phytoplasma by nested-PCR in different pear cultivars. *Plant Pathology*, 52: 513–520.
- Green, M.J., Thompson, D.A. & MacKenzie, D.J.** 1999. Easy and efficient DNA extraction from woody plants for the detection of phytoplasmas by polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 83: 482–485.
- Gundersen, D.E. & Lee, I-M.** 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea*, 35: 144–151.
- Guo, Y.H., Cheng, Z.M. & Walla, J.A.** 2003. Rapid PCR based detection of phytoplasmas from infected plants. *HortScience*, 38: 1134–1136.
- Hodgetts, J., Boonham, N., Mumford, R. & Dickenson, M.** 2009. Panel of 23S rRNA gene-based real-time PCR assays for improved universal and group-specific detection of phytoplasmas. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 2945–2950.
- IPWG (International Phytoplasma Working Group).** n.d. Phytoplasma collection web page. Available at http://www.ipwgnet.org/index.php?option=com_content&view=article&id=29&Itemid=5 (last accessed 17 April 2015).
- IRPCM (International Research Programme on Comparative Mycoplasmaology Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma Taxonomy Group).** 2004. '*Candidatus* Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1243–1255.
- Ishii, T., Doi, Y., Yora, K. & Asuyama, H.** 1967. Suppressive effects of antibiotics of the tetracycline group on symptom development in mulberry dwarf disease. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 33: 267–275.
- Jarausch, W., Lancas, M. & Dosba, F.** 1999. Seasonal colonization pattern of European stone fruit yellows phytoplasmas in different *Prunus* species detected by specific PCR. *Journal of Phytopathology*, 147: 47–54.
- Jomantien, R., Davis, R.E., Maas, J. & Dally, E.** 1998. Classification of new phytoplasmas associated with diseases of strawberry in Florida, based on analysis of 16S ribosomal-RNA and ribosomal-protein gene operon sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 269–277.
- Kirkpatrick, B.C.** 1991. Mycoplasma-like organisms: Plant and invertebrate pathogens. In A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K.-S. Schleifer, eds. *The prokaryotes*, Vol. III, pp. 4050–4067. New York, NY, Springer Verlag.
- Kirkpatrick, B.C., Stenger, D.C., Morris, T.J. & Purcell, A.H.** 1987. Cloning and detection of DNA from a nonculturable plant pathogenic mycoplasma-like organism. *Science*, 238: 197–199.

- Kreader, C.A.** 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1102–1106.
- Lee, I.-M., Bottner-Parker, K.D., Zhao, Y., Davis, R.E. & Harrison, N.A.** 2010. Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on *secY* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60: 2887–2897.
- Lee, I.-M., Davis, R.E. & Gundersen-Rindal, D.E.** 2000. Phytoplasma: Phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology*, 54: 221–255.
- Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D.E., Davis, R.E. & Bartoszyk, I.M.** 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 1153–1169.
- Lee, I.-M., Hammond, R.W., Davis, R.E. & Gundersen, D.E.** 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology*, 83: 834–842.
- Lim, P.-O. & Sears, B.B.** 1992. Evolutionary relationships of a plant-pathogenic mycoplasma-like organism and *Acholeplasma laidlawii* deduced from two ribosomal protein gene sequences. *Journal of Bacteriology*, 174: 2606–2611.
- Makarova, O., Contaldo, N., Paltrinieri, S., Kawube, G., Bertaccini, A. & Nicolaisen, M.** 2012. DNA barcoding for identification of ‘*Candidatus* Phytoplasmas’ using a fragment of the elongation factor Tu gene. *PLoS ONE*, 7: e2092.
- Marcone, C., Neimark, H., Ragozzino, A., Lauer, U. & Seemüller, E.** 1999. Chromosome sizes of phytoplasmas comparing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology*, 89: 805–810.
- Martini, M., Lee, I.-M., Bottner, K.D., Zhao, Y., Botti, S., Bertaccini, A., Harrison, N.A., Carraro, L., Marcone, C., Khan, A.J. & Osler, R.** 2007. Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 2037–2051.
- Marzachi, C.** 2004. Molecular diagnosis of phytoplasmas. *Phytopathologia Mediterranea*, 43: 228–231.
- Mehle, N., Nikolić, P., Rupar, M., Boben, J., Ravnkar, M. & Dermastia, M.** 2013. Automated DNA extraction for large numbers of plant samples. In: M. Dickinson & J. Hodgetts, eds. *Phytoplasma: Methods and protocols*. Methods in molecular biology series, Vol. 938, pp. 139–145. New York, NY, Humana Press. 421 pp.
- Necas, T. & Krska, B.** 2006. Selection of woody indicators and the optimum plant material and sampling time for phytoplasma ESFY detection. *Acta Horticulturae*, 717: 101–105.
- Oshima, K., Maejima, K. & Namba, S.** 2013. Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas. *Frontiers in Microbiology*, doi: 103389/fmicb.2013.00230.
- Palmano, S.** 2001. A comparison of different phytoplasma DNA extraction methods using competitive PCR. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: 99–107.
- Pelletier, C., Salar, P., Gillet, J., Cloquemin, G., Very, P., Foissac, X. & Malembic-Maher, S.** 2009. Triplex real-time PCR assay for sensitive and simultaneous detection of grapevine phytoplasmas of the 16SrV and 16SrXII-A groups with an endogenous analytical control. *Vitis*, 48: 87–95.
- Pilotti, C.A., Saul, J., Liefting, L.W., Kembu, A. & Kokoa, P.** 2014. Occurrence of a phytoplasma associated with bogia coconut syndrome in Papua New Guinea. *Agricultural Science*, 26: 32–40.
- Prezelj, N., Nikolić, P., Gruden, K., Ravnkar, M. & Dermastia, M.** 2012. Spatiotemporal distribution of flavescence dorée phytoplasma in grapevine. *Plant Pathology*, 62: 760–766.
- Prince, J.P., Davis, R.E., Wolf, T.K., Lee, I.-M., Mogen, B.D., Dally, E.L., Bertaccini, A., Credi, R. & Barba, M.** 1993. Molecular detection of diverse mycoplasma-like organisms (MLOs) associated with grapevine yellows and their classification with aster yellows, X-disease, and elm yellows MLOs. *Phytopathology*, 83: 1130–1137.

- Quaglino, F., Zhao, Y., Casati, P., Bulgari, D., Bianco, P.A., Wei, W. & Davis, R.E. 2013. 'Candidatus Phytoplasma solani', a novel taxon associated with stolbur- and bois noir-related diseases of plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 879–2894.
- Schneider, B., Gibb, K.S. & Seemüller, E. 1997. Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology*, 143: 3381–3389.
- Schneider, B., Seemüller, E., Smart, C.D. & Kirkpatrick, B.C. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma like organisms or phytoplasmas. In S. Razin & J.G. Tully, eds. *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*, Vol. 1, pp. 369–380. San Diego, CA, Academic Press. 483 pp.
- Seemüller, E., Garnier, M. & Schneider, B. 2002. Mycoplasmas of plants and insects. In S. Razin & R. Herrmann, eds. *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas*, pp. 91–115. New York, NY, Kluwer Academic Publishers/Plenum Publishers. 572 pp.
- Seemüller, E., Schaper, U. & Zimbelmann, F. 1984. Seasonal variation in the colonization pattern of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 91: 371–382 (in English with German summary).
- Torres, E., Bertolini, E., Cambra, M., Montón, C. & Martin, M.P. 2005. Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine phytoplasmas from apple proliferation (16 SrX) group. *Molecular and Cellular Probes*, 19: 334–340.
- Weintraub, P. & Beanland, L. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology*, 51: 91–111.
- Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N.C., Boonham, N. & Stead, D.E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative multiplex real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2853–2858.
- Werren, J.H., Windsor, D. & Guo, L. 1995. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 262: 197–204.
- Zhang, Y.P., Uyemoto, J.K. & Kirkpatrick, B.C. 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *Journal of Virological Methods*, 71: 45–50.

مراحل النشر

لا تعتبر هذه الفقرة جزءاً رسمياً من المعيار

2004-11 قامت لجنة المعايير بإضافة الموضوع: الفيروسات والفيتوبلازما (018-2004).

2006-004 أضافت الدورة الأولى لهيئة تدابير الصحة النباتية الموضوع.

2013-04 مشاوره الخبراء.

2013-06 عرضت المسودة على اجتماع الفريق الفني المعني ببروتوكولات التشخيص.

2014-05 وافقت لجنة المعايير على عرض المسودة على مشاوره الأعضاء (2014_eSC_May_07).

2014-07 مشاوره الأعضاء.

2015-03 وافق الفريق الفني المعني ببروتوكولات التشخيص على رفع المسودة إلى لجنة المعايير للموافقة على اعتمادها (2015_eTPDP_May_01).

2015-06 موافقة لجنة المعايير على فترة الإخطار لبروتوكول التشخيص (2015_eSC_Nov_04).

2015-08 فترة الإخطار لبروتوكول التشخيص.

2015-08 تلقى اعتراض رسمي.

2015-09 اجتماع الفريق الفني المعني ببروتوكولات التشخيص عبر الإنترنت

2015-10 قيام الفريق الفني المعني ببروتوكولات التشخيص بتحليل الاعتراض الرسمي وتنقيحه (2015_eTPDP_Oct_03).

2015-11 موافقة لجنة المعايير على فترة الإخطار لبروتوكول التشخيص وتأييد الرد على الاعتراض الرسمي (2015_eSC_Nov_10).

2016-01 اعتمدت لجنة المعايير لبروتوكول التشخيص بالنيابة عن هيئة تدابير الصحة النباتية (مع عدم ورود اعتراضات رسمية)

المعيار الدولي رقم 27 - الملحق 12. الفيتوبلازما (2016). روما، الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات، منظمة الأغذية والزراعة.

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

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

04-2018: الدورة الثالثة عشر لهيئة تدابير الصحة النباتية (CPM-13) في 2018

أحيطت علماً بأن مجموعة مراجعة اللغات راجعت هذا الملحق.

آخر تحديث لتاريخ المطبوع: 12-2018