



联合国
粮食及
农业组织

Food and Agriculture
Organization of the
United Nations

Organisation des Nations
Unies pour l'alimentation
et l'agriculture

Продовольственная и
сельскохозяйственная организация
Объединенных Наций

Organización de las
Naciones Unidas para la
Alimentación y la Agricultura

منظمة
الأغذية والزراعة
للأمم المتحدة



هيئة تدابير الصحة النباتية

الدورة الثانية عشرة
إنتشون، جمهورية كوريا، 5-11 أبريل/نيسان 2017
الإطلاع على التعديلات في ترجمة المعايير الدولية لتدابير الصحة النباتية التي اعتمدها هيئة تدابير الصحة النباتية في دورتها الحادية عشرة (2016)
البند 9-4 من جدول الأعمال
من إعداد أمانة الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات

أولاً - مقدمة

- 1- اعتمدت هيئة تدابير الصحة النباتية (الهيئة) في دورتها الخامسة (2010) إجراءً خاصاً بمجموعات مراجعة اللغات بهدف تصحيح الأخطاء التحريرية في النسخ المعتمدة للمعايير الدولية لتدابير الصحة النباتية (المعايير الدولية) بمختلف اللغات.
- 2- وتقدم أمانة الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات (الاتفاقية) معلومات بشأن إنشاء مجموعة مراجعة اللغة والعملية الخاصة بذلك على الموقع الإلكتروني للبوابة الدولية للصحة النباتية¹.

ثانياً - إنشاء مجموعات مراجعة اللغات

- 3- هناك حاجة إلى تعيين منسق لمجموعة مراجعة اللغة الروسية.

¹ <https://www.ippc.int/core-activities/governance/standards-setting/ispms/language-review-groups>

طُبع عدد محدود من هذه الوثيقة من أجل الحدّ من تأثيرات عمليات المنظمة على البيئة والمساهمة في عدم التأثير على المناخ. ويرجى من السادة المندوبين والمراقبين التكرم بإحضار نسخهم معهم إلى الاجتماعات وعدم طلب نسخ إضافية منها. ومعظم وثائق اجتماعات المنظمة متاحة على الإنترنت على العنوان التالي: www.fao.org

ثالثاً- استعراض المعايير التي اعتمدها الهيئة في دورتها الحادية عشرة (2016)

4- تلقت الأمانة المعايير الدولية التي اعتمدها الهيئة في دورتها الحادية عشرة (2016) مشفوعةً بالتعديلات المقترحة من مجموعات مراجعة اللغات العربية والصينية والإسبانية. وقد أحالتها الأمانة إلى أقسام الترجمة في المنظمة التي استعرضت التغييرات المقترحة. وأدرجت التغييرات المقترحة بعد ذلك في المعايير الدولية المنقحة وهي معروضة على الهيئة في دورتها الثانية عشرة (2017) مع تبيان التغييرات التي طرأت عليها.

5- وبالنسبة إلى كل لغة، تم التوصل إلى توافق في الآراء بين أقسام الترجمة في المنظمة ومجموعات مراجعة اللغات بشأن جميع التغييرات المقترحة.

6- ولم تتلق الأمانة أي اقتراحات في ما يتعلق بالتعديلات على نسخ المعايير الدولية باللغة الفرنسية.

7- والجدير بالذكر أنه نظراً إلى أن بروتوكولات التشخيص تُعتمد من قِبل لجنة المعايير بالنيابة عن الهيئة، فإنها تُعتمد في أوقات مختلفة على مدى السنة، وقد لا تكون جاهزة بمختلف اللغات لكي تعرض على العملية العادية لمجموعات مراجعة اللغات بعد انعقاد دورة الهيئة. وسترسل الأمانة بروتوكولات التشخيص إلى مجموعات مراجعة اللغات عندما تصبح جاهزة بمختلف اللغات.

8- وإن المعايير الدولية، بما في ذلك معالجات الصحة النباتية وبروتوكولات التشخيص التي اعتمدها الهيئة في دورتها الحادية عشرة (2016)، ترفق بنسخ اللغات المحددة لهذه الوثيقة فقط:

- التعديلات على المعيار الدولي رقم 5 (مسرد مصطلحات الصحة النباتية) (انظر المرفق 1)
- المعيار الدولي رقم 37 (تحديد حالة الفاكهة العائلة لذبابة الفاكهة (*Tephritidae*)) (انظر المرفق 2)
- معالجة الصحة النباتية رقم 20 (معالجة حفار الذرة الأوروبي (*Ostrinia nubilalis*) بتعريض الأغذية للإشعاع) كملحق بالمعيار الدولي رقم 28 (معالجات الصحة النباتية للآفات الخاضعة للوائح) (انظر المرفق 3)
- معالجة الصحة النباتية رقم 21 (معالجة ذباب *Bactrocera xanthodes* و *Bactrocera melanotus* في الببايا (*Carica papaya*) بحرارة البخار) كملحق بالمعيار الدولي رقم 28 (انظر المرفق 4).
- بروتوكول التشخيص رقم 7 (فيروم درنة البطاطا المغزلية) كملحق بالمعيار الدولي رقم 27 (بروتوكولات تشخيص الآفات الخاضعة للوائح) (انظر المرفق 5)
- بروتوكول التشخيص رقم 8 (آفة *Ditylenchus dipsaci* وآفة *Ditylenchus destructor*) (انظر المرفق 6)
- بروتوكول التشخيص رقم 9 (*Genus Anastrepha Schiner*) (انظر المرفق 7)

رابعاً- القرارات

9- إن هيئة تدابير الصحة النباتية مدعوة إلى القيام بما يلي:

(1) الأخذ علماً بأنّ الوثائق التالية قد استعرضت من قبل مجموعات مراجعة اللغات العربية والصينية والإسبانية وأقسام الترجمة في المنظمة:

- التعديلات على المعيار الدولي رقم 5 (مسرد مصطلحات الصحة النباتية)
- المعيار الدولي رقم 37 (تحديد حالة الفاكهة العائلة لذبابة الفاكهة (*Tephritidae*))
- معالجة الصحة النباتية رقم 20 (معالجة حفار الذرة الأوروبي (*Ostrinia nubilalis*) بتعرض الأغذية للإشعاع) كملحق بالمعيار الدولي رقم 28 (معالجات الصحة النباتية للآفات الخاضعة للوائح)
- معالجة الصحة النباتية رقم 21 (معالجة ذباب *Bactrocera* و *Bactroceramelanotus xanthodes* في البيايا (*Carica papaya*) بجرارة البخار) كملحق بالمعيار الدولي رقم 28
- بروتوكول التشخيص رقم 7 (فيروود درنة البطاطا المغزلية) كملحق بالمعيار الدولي رقم 27 (بروتوكولات تشخيص الآفات الخاضعة للوائح)
- بروتوكول التشخيص رقم 8 (آفة *Ditylenchus dipsaci* وآفة *Ditylenchus destructor*) كملحق بالمعيار الدولي رقم 27
- بروتوكول التشخيص رقم 9 (*Genus Anastrepha Schiner*) كملحق بالمعيار الدولي رقم 27

(2) والاتفاق على إلغاء النسخ السابقة للمعايير الدولية والاستعاضة عنها بالنسخ الجديدة المحاط علماً بما فور انتهاء الأمانة من إدخال التغييرات كما هي مبيّنة في المرفقات من 1 إلى 7 (بهذه الوثيقة في النسخ باللغات المعنية).

(3) والأخذ علماً بأن مجموعة مراجعة اللغة الروسية لا تعمل في الوقت الحالي نظراً إلى عدم تعيين منسق حتى الآن.

(4) وتشجيع الأطراف المتعاقدة على تعيين منسق لمجموعة مراجعة اللغة الروسية.

(5) والتوجه بالشكر إلى الأطراف المتعاقدة والمنظمات الإقليمية لوقاية النباتات المشاركة في مجموعات مراجعة اللغات، إضافةً إلى أقسام الترجمة في المنظمة، على جهودها وعملها الدؤوب لتحسين نسخ المعايير الدولية بمختلف اللغات.



مشروع تعديلات المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية رقم 5 (2014):

[1]

مسرد مصطلحات الصحة النباتية (001-1994)

25-11-2015	تاريخ الوثيقة
تعديلات على المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية رقم 5 (مسرد مصطلحات الصحة النباتية) 2014: (001-1994)	فئة الوثيقة
إحالة لجنة المعايير لنص الوثيقة في نوفمبر/تشرين الثاني 2015 إلى هيئة تدابير الصحة النباتية	المرحلة الحالية للوثيقة
قيام لجنة الخبراء المعنية بتدابير الصحة النباتية (لجنة الخبراء) (1994) بإضافة الموضوع: 001-1994، تعديلات على المعيار الدولي رقم 5: مسرد مصطلحات الصحة النباتية 05-2006 موافقة لجنة المعايير على مواصفة فريق الخبراء الفني بالمعيار رقم 5 10-2012 تنقيح فريق الخبراء الفني المعني بمسرد مصطلحات الصحة النباتية (فريق الخبراء الفني) للمواصفة 11-2012 قيام لجنة المعايير بتنقيح المواصفة وموافقتها على المواصفة المنقحة، وإلغاء المواصفة 1 02-2014 قيام فريق الخبراء الفني باستعراض مشروع التعديلات على المعيار رقم 5 (2014) 05-2014 قيام لجنة المعايير باستعراض النص والموافقة عليه لغرض مشاوره الأعضاء 11/7-2014 مشاوره الأعضاء 12-2014 قيام فريق الخبراء الفني بتنقيح التعديلات والرد على تعليقات الأعضاء 5-2015 موافقة جماعة العمل المؤلفة من سبعة أعضاء التابعة للجنة المعايير على النص لغرض إخضاعه لفترة إبداء التعليقات بشأن الشواغل الجوهرية	المراحل الرئيسية

[2]

<p>2015-09/06 فترة إبداء التعليقات بشأن الشواغل الجوهرية</p> <p>2015-10 قيام فريق الخبراء الفني باستعراض التعليقات المنبثقة عن فترة إبداء التعليقات بشأن الشواغل الجوهرية؛ ولم تدخل أي تغييرات على مشروع التعديلات التي تم إدراجها</p> <p>2015-11 قيام لجنة المعايير بسحب "علامة" (2013-007) والموافقة على مشروع تعديلات 2014 على المعيار الدولي رقم 5 على أن يقدم لاعتماده</p>	
<p>2014-05 قيام لجنة المعايير بسحب: هوية (شحنة ما) (2011-001)، وأمن الصحة النباتية (لشحنة ما) (2013-008)، وتمامية (شحنة ما)، التجفيف في القمائن (2013-006)،</p> <p>2014-05-19 قيام الأمانة بعملية التحرير</p> <p>2015-05 قيام جماعة العمل المؤلفة من سبعة أعضاء بسحب: القشرة (2013-005) والمعينة البصرية (2013-010)</p> <p>2015-05-25 قيام الجهة المشرفة بعملية الاستعراض</p> <p>2015-11-16 قيام الأمانة بتحديث مشروع التعديلات لإبراز أن الهيئة أخذت علماً في دورتها العاشرة (2015) بالتعديلات الحبرية فيما يتعلق بعبارة "فئة سلعية"</p> <p>ملاحظة: إن التفسيرات الخاصة بكل اقتراح تعرض فقط في نسخة مشروع التعديلات المقدمة إلى مشاوراة الأعضاء وإلى لجنة المعايير. وفيما يخص الهيئة، سيتم عرض الاقتراحات فحسب.</p>	<p>ملاحظات</p>

[4] 1- التنقيحات

[5] 1-1 إقرار إضافي (2010-006)

[10] التعريف الأصلي

<p>بيان يطلب بلد مستورد إدراجه في شهادة الصحة النباتية ويوفر معلومات إضافية محددة تتصل بحالة الشحنة من زاوية الآفات الخاضعة للوائح [المنظمة، 1990؛ تعديل الهيئة المؤقتة لتدابير الصحة النباتية، 2005]</p>	<p>إقرار إضافي</p>	<p>[11]</p>
---	--------------------	-------------

[12] التنقيح المقترح

<p>بيان يطلب البلد المستورد إدراجه في شهادة الصحة النباتية ويوفر معلومات إضافية محددة تتعلق بحالة الشحنة من حيث الآفات الخاضعة للوائح أو المواد الخاضعة للوائح [المنظمة، 1990؛ تعديل الهيئة المؤقتة لتدابير الصحة النباتية، 2005]</p>	<p>إقرار إضافي</p>	<p>[13]</p>
---	--------------------	-------------

[14] 1-2 الحبوب (2013-018)، البذور

[24] التعريف الأصلي

<p>البذور المستخدمة لأغراض التصنيع أو الاستهلاك وليس للزراعة (انظر البذور) [المنظمة، 1990؛ تعديل الهيئة المؤقتة، 2001؛ تعديل الهيئة، 2015]</p>	<p>حبوب (بوصفها فئة من السلع)</p>	<p>[25]</p>
<p>البذور المخصصة للزراعة أو المستخدمة لأغراض الزراعة وليس للاستهلاك أو التصنيع (انظر الحبوب) [المنظمة، 1990؛ تعديل الهيئة المؤقتة، 2001؛ تعديل الهيئة، 2015]</p>	<p>حبوب (بوصفها فئة من السلع)</p>	

[26] التنقيح المقترح

<p>البذور (بالمعنى النباتي) المستخدمة لأغراض التصنيع أو الاستهلاك و لكن ليس للزراعة (انظر البذور) [المنظمة، 1990؛ تعديل الهيئة المؤقتة، 2001؛ تعديل الهيئة، 2015]</p>	<p>حبوب (بوصفها فئة من السلع)</p>
<p>البذور (بالمعنى النباتي) المخصصة لغرض الزراعة وليس للاستهلاك أو التصنيع (انظر الحبوب) [المنظمة، 1990؛ تعديل الهيئة المؤقتة، 2001؛ تعديل الهيئة، 2015]</p>	<p>بذور (بوصفها فئة من السلع)</p>

[38] 1-3 الخشب (2013-011)

[46] التعريف الأصلي

<p>الخشب المستدير، والخشب المنشور، والشظايا أو الحشوات الخشبية، مع وجود أو بدون وجود لحاء القشرة [المنظمة، 1990؛ تعديل الهيئة المؤقتة، 2001؛ تعديل الهيئة، 2015]</p>	<p>أخشاب (بوصفها فئة من السلع)</p>
---	--

[48] التنقيح المقترح

<p>السلع مثل الخشب المستدير، والخشب المنشور، والشظايا أو الحشوات الخشبية، ومخلفات الخشب، مع وجود أو بدون وجود لحاء القشرة، باستثناء مواد التعبئة الخشبية ومنتجات البامبو [المنظمة، 1990؛ تعديل الهيئة المؤقتة، 2001؛ تعديل الهيئة، 2015]</p>	<p>أخشاب (بوصفها فئة من السلع)</p>
---	--

المعايير الدولية لتدابير الصحة النباتية

المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية رقم 37

تحديد حالة الفاكهة العائلة لذبابة الفاكهة (Tephritidae)

من إنتاج أمانة الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات
اعتمد في 2016 ونشر في 2016

تشجع منظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة استخدام هذه المواد الإعلامية واستنساخها ونشرها. وما لم يذكر خلاف ذلك، يمكن نسخ هذه المواد وطبعها وتحميلها بغرض الدراسات الخاصة والبحث والأهداف التعليمية، أو الاستخدام في منتجات أو خدمات غير تجارية، على أن يشار إلى أن المنظمة هي المصدر، واحترام حقوق النشر، وعدم افتراض موافقة المنظمة على آراء المستخدمين وعلى المنتجات أو الخدمات بأي شكل من الأشكال.

عند نسخ المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية ينبغي الذكر بأن الصيغ الحالية المعتمدة للمعايير الدولية لتدابير الصحة النباتية متاحة لتنزيلها على الموقع www.ippc.int.

ينبغي توجيه جميع طلبات الحصول على حقوق الترجمة والتصريف وإعادة البيع بالإضافة إلى حقوق الاستخدامات التجارية الأخرى إلى العنوان التالي: www.fao.org/contact-us/licence-request أو إلى copyright@fao.org.

تتاح المنتجات الإعلامية للمنظمة على موقعها التالي: www.fao.org/publications، ويمكن شراؤها بإرسال الطلبات إلى: publications-sales@fao.org.

الأوصاف المستخدمة في هذه المواد الإعلامية وطريقة عرضها لا تعبر عن أي رأي خاص لمنظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة (الفاو) في ما يتعلق بالوضع القانوني أو التنموي لأي بلد أو إقليم أو مدينة أو منطقة، أو في ما يتعلق بسلطاتها أو بتعيين حدودها وتخومها. ولا تعبر الإشارة إلى شركات محددة أو منتجات بعض المصنعين، سواء كانت مرخصة أم لا، عن دعم أو توصية من جانب منظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة أو تفضيلها على مثيلاتها مما لم يرد ذكره. تمثل وجهات النظر الواردة في هذه المواد الإعلامية الرؤية الشخصية للمؤلف (المؤلفين)، ولا تعكس بأي حال وجهات نظر منظمة الأغذية والزراعة أو سياساتها.

التسلسل التاريخي للمطبوع

لا يشكل هذا جزءاً رسمياً من المعيار

- 2006-11 أضافت لجنة المعايير موضوع تحديد قابلية العائل لاحتواء ذبابة الفاكهة (*Tephritidae*) (2006-031)
- 2009-05 أيدت لجنة المعايير مشروع مواصفة لعرضه على مشاورة الأعضاء
- 2010-02 مشاورة الأعضاء
- 2010-04 وافقت لجنة المعايير على المواصفة 50
- 2010-10 قام الفريق الفني المعني بالمناطق الخالية من الآفات وبإنهاء النظم المتعلقة بذباب ثمار الفاكهة (الفريق الفني)، بصياغة المعيار الدولي
- 2011-05 راجعت لجنة المعايير مشروع المعيار الدولي وأعادته إلى الفريق الفني
- 2011-08 نصح الفريق الفني مشروع المعيار الدولي
- 2012-04 أيدت لجنة المعايير مشروع المعيار لعرضه على مشاورة الأعضاء
- 2012-07 مشاورة الأعضاء
- 2013-05 وافقت لجنة المعايير في دورتها السابعة عليها لإخضاعها لفترة إبداء التعليقات بشأن الشواغل الجوهرية
- 2013-11 وافقت لجنة المعايير على إرسال مشروع المعيار الدولي إلى الدورة التاسعة للهيئة من أجل اعتماده
- 2014-04 وردت اعتراضات رسمية قبل 14 يوماً من انعقاد الدورة التاسعة للهيئة
- 2014-04 نصح المشرف مشروع المعيار الدولي استجابة للاعتراضات الرسمية
- 2014-05 استعرضت لجنة المعايير المشروع وطلبت إلى الفريق الفني استعراضه بدوره
- 2014-05 استعرض الفريق الفني المشروع
- 2014-11 وافقت لجنة المعايير على مشروع المعيار الدولي لعرضه على الهيئة في دورتها العاشرة لاعتماده
- 2015-03 أثيرت شواغل في الدورة العاشرة للهيئة (2015) وأعيد المشروع إلى لجنة المعايير
- 2015-04 قام المشرف بتنقيح مشروع المعيار الدولي (بعد مناقشة الشواغل فيما بين الأطراف المعنية)
- 2015-05 وافقت لجنة المعايير على المشروع لغرض فترة إبداء التعليقات بشأن الشواغل الجوهرية
- 2015-10 قام الفريق الفني المعني بالمناطق الخالية من الآفات وبإنهاء النظم المتعلقة بذباب ثمار الفاكهة بتنقيح مشروع المعيار الدولي
- 2015-11 استعرضت لجنة المعايير المشروع ووافقت على إحالته إلى الهيئة لغرض اعتماده في دورتها الحادية عشرة.
- 2016-04 اعتمدت الدورة الحادية عشرة للهيئة المعيار.
- المعيار الدولي لتدابير الصحة الذاتية رقم 37، 2016. تحديد حالة الفاكهة العائلة لذبابة الفاكهة (*Tephritidae*). روما، الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات، منظمة الأغذية والزراعة.
- جرى آخر تحديث للتسلسل التاريخي للمطبوع في 2016-04

بيان المحتويات

4	الاعتماد
4	مقدمة
4	النطاق
4	المراجع
4	التعريفات
5	الإطار العام للمتطلبات
6	معلومات أساسية
7	المتطلبات العامة
10	المتطلبات المحددة
11	1- تحديد حالة العائل الطبيعي بواسطة المراقبة عبر جمع عينات الفاكهة
11	2- تحديد حالة العائل باستخدام التجارب الحقلية ضمن الظروف شبه الطبيعية
11	1-2 جمع عينات الفاكهة
12	2-2 ذبابات الفاكهة
13	3-2 الفاكهة
13	4-2 الثمار المستخدمة للمراقبة
13	5-2 تصميم التجارب الحقلية
15	3- مناولة الفاكهة من أجل نمو ذبابات الفاكهة وظهورها
16	4- تحليل البيانات
16	5- مسك السجلات والنشر
17	المرفق 1: قائمة المراجع

الاعتماد

تم اعتماد هذا المعيار من قبل هيئة تدابير الصحة النباتية في دورتها الحادية عشرة في أبريل/نيسان 2016.

مقدمة

النطاق

يقدم هذا المعيار خطوطا توجيهية لتحديد حالة الفاكهة العائل لذبابة الفاكهة (Tephritidae) ويصف ثلاث فئات لحالة العائل.

تشمل الفاكهة، بحسب ما هو مشار إليها في هذا المعيار، الفاكهة بالمعنى النباتي بما يشمل الفاكهة التي تدعى أحيانا خضروات (مثل الطماطم والبطيخ الأصفر).

ينطوي هذا المعيار على منهجيات لمراقبة الفاكهة ضمن الظروف الطبيعية والتجارب الحقلية ضمن الظروف شبيهة الطبيعية التي يفترض أن تستعمل لتحديد حالة العائل للفاكهة غير المتضررة لذبابات الفاكهة، في الحالات التي يكون فيها التعرض غير أكيد. ولا يتناول وهذا المعيار لا يتناول متطلبات حماية النباتات من دخول ذبابة الفاكهة وانتشارها.

المراجع

يشير هذا المعيار إلى معايير دولية لتدابير الصحة النباتية. والمعايير الدولية لتدابير الصحة النباتية متاحة على البوابة الدولية للصحة النباتية على العنوان التالي <https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/ispm5>.

ينطبق أيضا المرفق 1 والمرفق 2 من المعيار الدولي رقم 26 (إنشاء مناطق خالية من آفات ذباب ثمار الفاكهة (Tephritidae)) على هذا المعيار.

التعريفات

يمكن الاطلاع على تعريفات المصطلحات المتعلقة بالصحة النباتية المستخدمة في هذا المعيار ضمن المعيار الدولي 5 (مسرد مصطلحات الصحة النباتية). بالإضافة إلى التعريفات الواردة في المعيار الدولي 5 في هذا المعيار، تنطبق التعريفات التالية:

حالة العائل (لنوع من الفاكهة بالنسبة إلى ذبابة فاكهة) تصنيف أحد أنواع النباتات أو الأصناف كعائل طبيعي أو عائل مشروط أو غير عائل لأحد أنواع ذباب الفاكهة

العائل الطبيعي (لنوع من الفاكهة بالنسبة إلى ذبابة فاكهة) نوع أو صنف نباتي تبين علميا أنه مصاب بأنواع ذبابة الفاكهة المستهدفة في ظل ظروف طبيعية أو أنه قادر على دعم نموها لتصبح بالغة قادرة على العيش

عائل مشروط (لنوع من الفاكهة بالنسبة إلى ذبابة الفاكهة) نوع أو صنف نباتي ليس عائلا طبيعيا ولكن تبين علميا أنه مصاب بأنواع ذبابة الفاكهة المستهدفة وقادر على دعم نموها لتصبح بالغة وقابلة للعيش على نحو ما خلص إليه من ظروف الحقل شبه الطبيعية المحددة في هذا المعيار

غير عائل (لنوع من الفاكهة بالنسبة إلى ذبابة فاكهة) نوع أو صنف نباتي تبين أنه غير مصاب بأنواع ذبابة الفاكهة المستهدفة وغير قادر على دعم نموها لتصبح بالغة وقابلة للعيش في ظل ظروف طبيعية أو ظروف الحقل شبه الطبيعية المحددة في هذا المعيار

الإطار العام للمتطلبات

يصف هذا المعيار متطلبات تحديد حالة العائل لفاكهة معينة بالنسبة إلى ذباب الفاكهة، ويحدد 3 فئات لحالة العائل: العائل الطبيعي والعائل المشروط وغير العائل.

تشمل متطلبات تحديد حالة العائل ما يلي:

- التحديد الدقيق لنوع ذبابة الفاكهة والفاكهة المختبرة، وبالنسبة إلى التجارب الحقلية، فاكهة المراقبة التي تعتبر عائلا طبيعيا معروفا
- تحديد بارامترات عوامل معايير مراقبة ذبابة الفاكهة البالغة واليرقة، والتصميم الاختباري ضمن الظروف شبه الطبيعية (مثل الأقفاص الحقلية أو الدفيئات أو الأغصان المثمرة والمغلقة بأكياس) من أجل تحديد حالة العائل ووصف حالة الثمرة التي ينبغي تقييمها (بما في ذلك الحالة الفيزيولوجية)
- مراقبة صمود بقاء ذبابة الفاكهة في كل مرحلة من مراحل نموها
- تحديد الإجراءات الخاصة باحتجاز الفاكهة ومناولتها لغايات تحديد حالة العائل
- تقييم البيانات الاختبارية وتفسير نتائجها

معلومات أساسية

تعد ذبابات الفاكهة من الآفات الهامة اقتصادياً، وكثيراً ما يكون تطبيق تدابير الصحة النباتية ضرورياً للسماح بتنقل الثمار العائلة لها في المجال التجاري (المعيار الدولي رقم 26)؛ المعيار الدولي رقم 30 (إنشاء مناطق ينخفض فيها انتشار آفات ذباب الفاكهة (Triphritidae))؛ المعيار الدولي رقم 35 (نهج النظم لإدارة مخاطر آفات ذباب الفاكهة (Triphritidae)). وحالة العائل للفاكهة عنصر مهم من عناصر تحليل مخاطر الآفات (المعيار الدولي رقم 2 (إطار لتحليل مخاطر الآفات))؛ المعيار الدولي رقم 11 (تحليل مخاطر الآفات الحجرية)). ولذا تتوجب مواءمة فئات وإجراءات تحديد حالة العائل.

تجدر الإشارة إلى أن حالة العائل قد تتغير على مر الوقت بسبب التغيرات في الظروف البيولوجية.

حين لا تكون حالة العائل أكيدة، ينبغي توفير الإرشاد المتناسق إلى المنظمات الوطنية لوقاية النباتات من أجل تحديد حالة الفاكهة كعائل لذباب الفاكهة. ويمكن للأدلة التاريخية وسجلات رصد الآفات والمؤلفات العلمية عموماً أن تقدم معلومات كافية عن حالة العائل بدون الحاجة إلى المراقبة الحقلية لليرقات أو ممارسة التجارب الحقلية. غير أن السجلات التاريخية والتقارير المنشورة قد تكون غير قابلة للوثوق بها، مثلاً:

- لعل نوع ذبابة الفاكهة ونوع النبات أو صنفه قد حدد بطريقة غير صائبة وقد لا تكون العينات المرجعية متاحة للتدقيق فيها.
- قد تكون سجلات الجمع غير صحيحة أو مشكوك فيها (مثل حالة العائل القائمة على (1) التقاط الذباب من فخ موضوع على نبتة الثمرة؛ (2) الفاكهة التالفة؛ (3) مجرد إيجاد يرقات داخل الفاكهة أو (4) انتقال التلوث بين العينات).
- ربما تم إغفال تفاصيل مهمة (مثل الصنف ومرحلة النضج والحالة المادية للفاكهة لحظة جمعها والحالة الصحية للبيستان).
- عدم التحقق من نمو اليرقات إلى مرحلة البلوغ وقابلية العيش.

لقد تم توثيق البروتوكولات والتجارب الوافية لتحديد حالة العائل لذبابة الفاكهة في المؤلفات العلمية. غير أن عدم الاتساق التضارب في المصطلحات والمنهجيات المستخدمة يعزز الفوارق في تحديد حالة عائل ذبابة الفاكهة. ولهذا فمن شأن مواءمة المصطلحات والبروتوكولات ومعايير تقييم تحديد حالة العائل لذبابة الفاكهة أن تدعم الاتساق بين البلدان والمجتمعات العلمية.

إن المراقبة عبر جمع عينات الفاكهة هي الطريقة الأكثر وثوقاً لتحديد حالة العائل الطبيعي. فإن مراقبة الإصابة الطبيعية عبر أخذ عينات من الفاكهة لا يؤثر في السلوك الطبيعي لذباب الفاكهة ويراعي المستويات العالية للتنوع الجيني. المعلومات يشمل جمع عينات الفاكهة جمع الفاكهة وتربية ذباب الفاكهة

عليها معرفة ما إذا كانت الفاكهة تعيل ذبابة الفاكهة (أي إذا كانت الفاكهة تستطيع إعالة نمو ذبابة الفاكهة إلى أن تصبح بالغة وقابلة للعيش).

تتيح التجارب الحقلية تحت الظروف شبه الطبيعية، لذباب **إب** الفاكهة أن تبين سلوكها الطبيعي من حيث الإباضة. ولأن الثمرة تبقى متصلة بالنبتة فلا تتدهور حالها بسرعة خلال التجارب. غير أن الاختبارات الحقلية ضمن الظروف شبه الطبيعية قد تستوجب الكثير من الموارد كما قد تتأثر بالمتغيرات البيئية.

يمكن الاستعانة بنتائج التجارب الحقلية المطبقة في منطقة معينة على مناطق مقارنة بها، بحال التشابه بين **أنواع إي** ذبابة الفاكهة المستهدفة **بي** والظروف **الثمار** الفيزيولوجية **للثمرة**، وهكذا لا تعود هناك حاجة إلى تحديد حالة العائل مجدداً في منطقة منفصلة ولكن مشابهة.

المتطلبات العامة

يمكن تحديد الفئة المحددة من الفئات الثلاث لحالة العائل (العائل الطبيعي والعائل المشروط وغير العائل) التي تنتمي إليها فاكهة ما من خلال الخطوات التالية، كما هي مبينة في المخطط البياني (الشكل 1):

ألف- حين توفر المعلومات البيولوجية الحالية أو الماضية أدلة كافية إلى أن الفاكهة لا تدعم **تفشي الإصابة¹** الذبابة ونموها لتصبح بالغة قادرة على العيش، فإنه لا حاجة عندئذ إلى إجراء المزيد من المسوح أو الاختبارات الحقلية ويجب تصنيف النبتة كغير عائل.

باء- حين توفر المعلومات البيولوجية الحالية أو الماضية إثباتات كافية على أن الفاكهة تدعم **إصابة تفشي** الذبابة ونموها لتصبح بالغة قابلة للعيش، فإنه لا حاجة عندئذ إلى إجراء المزيد من المسوح أو الاختبارات الحقلية ويجب تصنيف النبتة كعائل طبيعي.

جيم- حين تكون المعلومات البيولوجية الحالية أو الماضية غير قاطعة، فإنه يجب استخدام المراقبة الحقلية المناسبة من خلال جمع عينات الفاكهة أو التجارب الحقلية من أجل تحديد حالة العائل. وقد تؤدي المراقبة والتجارب إلى إحدى النتائج التالية:

جيم 1- إذا تبين وجود إصابة بذبابة الفاكهة مع القدرة على النمو لتصبح بالغة قابلة للعيش بعد المراقبة الحقلية بواسطة جمع عينات الفاكهة، فإنه ينبغي تصنيف النبتة على أنها عائل طبيعي.

جيم 2- إذا لم يتبين وجود أي إصابة بعد المراقبة الحقلية بواسطة جمع عينات الفاكهة، ولم تشر أية معلومات أخرى إلى أن الفاكهة قابلة للإصابة بذبابة الفاكهة، ومع الأخذ بعين الاعتبار الظروف التي يعرف تداول السلعة فيها، مثل الظروف الفسيولوجية، والصف، ومرحلة النضج، فإنه يجوز تصنيف النبتة كغير عائل.

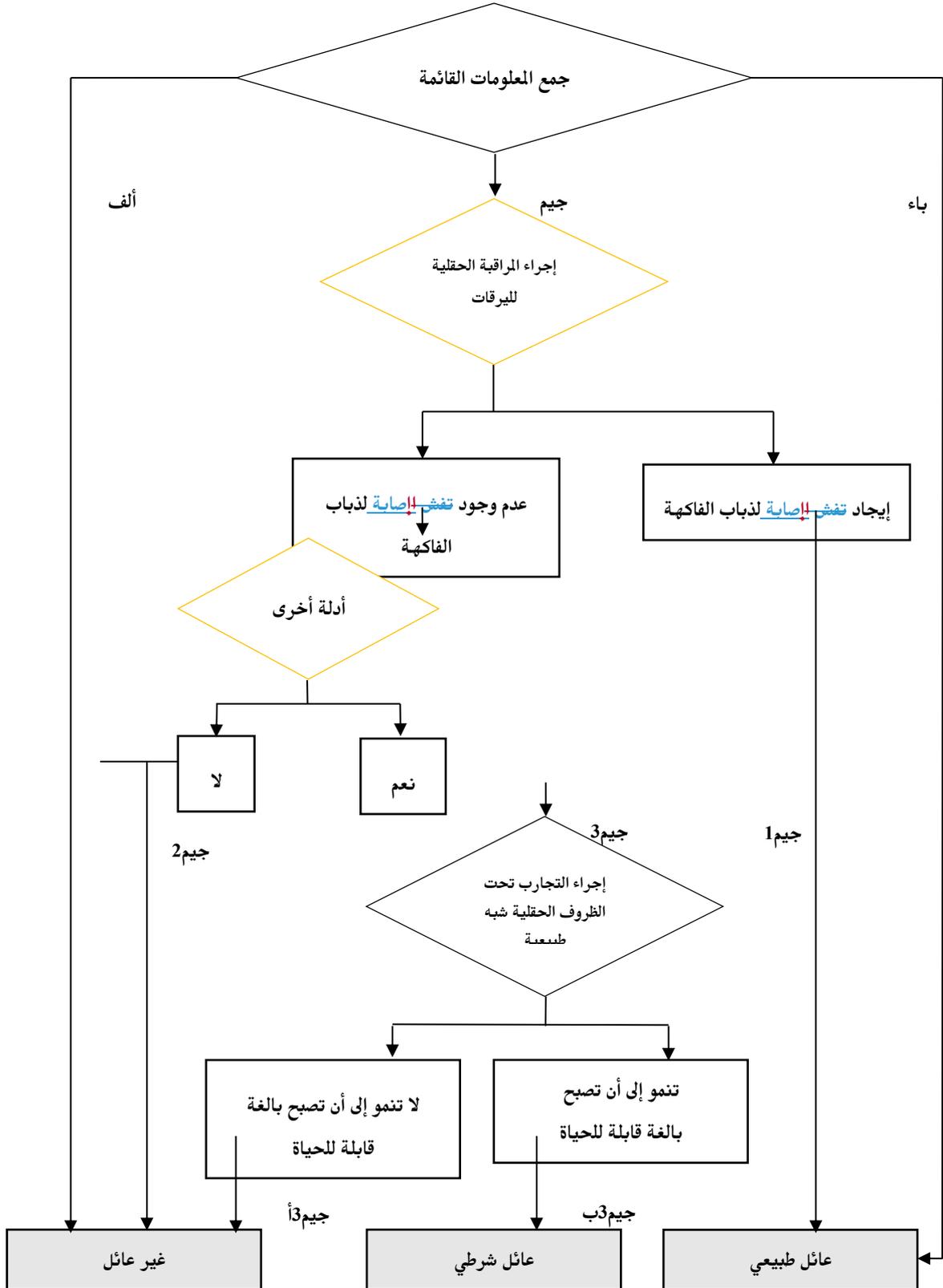
¹ تشير عبارة "تفشي الإصابة" في ما يلي إلى تفشي نوع مستهدف من ذبابة الفاكهة في الثمرة.

جيم 3- في حال اتضح عدم وجود أية إصابة عقب المراقبة الحقلية بواسطة جمع عينات الفاكهة، ولكن المعلومات البيولوجية المتاحة أو الماضية تشير إلى أن الفاكهة المعنية قابلة للإصابة بذبابة الفاكهة، قد تدعو الحاجة إلى المزيد من التجارب الحقلية ضمن ظروف شبه طبيعية لتقييم ما إذا كانت ذباب الفاكهة المستهدفة تستطيع أن تتطور لتصبح بالغة وقابلة للعيش على نوع أو صنف الفاكهة المعينة.

جيم 3أ- إذا لم تنمُ أنواع ذبابة الفاكهة لتصبح بالغة قابلة للعيش، فإنه ينبغي تصنيف النبتة على أنها غير عائل.

جيم 3ب- إذا كانت أنواع ذبابة الفاكهة المستهدفة لا تنمو لتصبح بالغة قابلة للعيش، فإنه ينبغي تصنيف النبتة على أنها عائل مشروط.

الشكل 1- الخطوات لتحديد حالة العائل بالنسبة إلى ذبابة الفاكهة



المتطلبات المحددة

يمكن تحديد حالة العائل بناءً على سجلات الإنتاج الماضي أو بناءً على بيانات التجارة أو **اكتشاف-اعتراض الآفات** التي تشير إلى الإصابة الطبيعية بالآفات. وحيثما لا تقدم البيانات الماضية تحديداً واضحاً لحالة العائل، يفترض إجراء المراقبة المستمرة. عبر جمع عينات الفاكهة من أجل تجميع الأدلة على الإصابة الطبيعية للآفات وتطورها إلى مرحلة البلوغ القابل للحياة أو إجراء تجارب حقلية تحت الظروف شبه الطبيعية. وفي الحالات التي لم تحدد فيها حالة العائل بالشكل العلمي من خلال المراقبة، أو حيث هناك حاجة معينة إلى تحديد ما إذا كانت فاكهة ما عائلاً مشروطاً أو غير عائلاً، قد تدعو الحاجة إلى تجارب ضمن الظروف الحقلية شبه الطبيعية.

إن الظروف الاصطناعية تشكل جزءاً أساسياً من التجارب المخبرية حيث يتم الجمع بين **ذبابات** الفاكهة وبين فواكه **مقطوفة حصودة** تشهد تغييرات فيزيولوجية سريعة وقد تصبح بالتالي أكثر عرضة **لتفشي الإصابة الآفة فيها**. وقد يكون رصد الإصابة في التجارب المخبرية بهدف تحديد حالة العائل مضملاً بالتالي. بالإضافة إلى ذلك فقد تم التوثيق بشكل واسع أن إناث الأنواع القارئة ضمن الظروف الاصطناعية ستبيض في أية فاكهة متاحة لها وفي معظم الحالات ستتمو اليرقات لتصبح بالغة قابلة للعيش. وبالتالي فإن التجارب المخبرية قد تكون كافية لإثبات حالة غير العائل ولكنها غير مناسبة لإثبات حالة العائل الطبيعي أو المشروط.

تعتبر العناصر التالية من الاعتبارات المهمة للتخطيط للتجارب الحقلية:

- هوية نوع النبات (بما في ذلك صنفه حيث ينطبق ذلك) ونوع ذبابة الفاكهة المستهدفة
- التنوع المادي والفيزيولوجي للفاكهة في منطقة إنتاجها
- الاستخدام السابق للمواد الكيميائية في منطقة إنتاج الفاكهة
- مدى انتشار ذبابة الفاكهة المستهدفة على امتداد منطقة إنتاج الفاكهة وفترات الحصاد والتصدير ذات الصلة
- المعلومات ذات الصلة، بما فيها المؤلفات والسجلات، المتعلقة بحالة العائل للفاكهة ونوع ذبابة الفاكهة والاستعراض النقدي لذلك النوع من المعلومات
- أصل وحالة تربية مستعمرة ذبابات الفاكهة التي سوف تستخدم
- الأنواع والأصناف العائلة الطبيعية المعروفة التي سوف تستخدم في المراقبة
- تجارب حقلية منفصلة حيثما ينطبق ذلك، تناسب كل نوع من **ذبابات** الفاكهة يتطلب تحديد حالة العائل
- تجارب حقلية منفصلة لكل صنف من الفاكهة بحال كانت الفوارق بين الأصناف هي المصدر المزعوم لتفاوت درجة التعرض للإصابة.
- مواقع التجارب الحقلية في مناطق إنتاج الفاكهة

- الامتثال للممارسة الإحصائية السليمة

1- تحديد حالة العائل الطبيعي بواسطة المراقبة عبر جمع عينات الفاكهة

يعتبر جمع عينات الفاكهة أكثر طريقة موثوقة لتحديد حالة العائل الطبيعي. ويمكن تحديد حالة العائل الطبيعي بالارتكاز على أساس على تأكيد الإصابة الطبيعية بذبابة الفاكهة ونموها إلى ذبابات بالغة قابلة للحياة، عبر جمع عينات الفاكهة خلال فترة الحصاد.

على عينات الفاكهة أن تمثل المجموعة الكاملة لمناطق الإنتاج والظروف البيئية فضلا عن المراحل الفيزيولوجية والمادية.

2- تحديد حالة العائل باستخدام التجارب الحقلية ضمن الظروف شبه الطبيعية

تتمثل الغاية من التجارب الحقلية في تحديد حالة العائل ضمن ظروف معينة لفاكهة تم تحديدها على أنها ليست عائلا طبيعيا. وقد تتضمن التجارب استخدام الأقفاص الحقلية والدفينات (بما فيها البيوت الزجاجية والبلاستيكية والشبكية) والأغصان المثمرة المغلفة بأكياس.

ويشير ظهور ذبابة الفاكهة بالغة وقابلة للعيش في أية من التجارب الحقلية المكررة ضمن الظروف شبه الطبيعية إلى أن تلك الفاكهة هي عائل مشروط.

تبيّن الأقسام الفرعية التالية العناصر التي يجب وضعها في الحسبان لدى تصميم التجارب الحقلية.

1-2 جمع عينات الفاكهة

تنطبق المتطلبات التالية على جمع عينات الفاكهة في التجارب الحقلية:

- حيثما أمكن، على عملية جمع العينات أن تستهدف الفاكهة التي يشتهبها بإصابتها بالآفة. وإلا فإن بروتوكولات جمع العينات يجب أن تقوم على مبادئ العشوائية والتكرار وأن تكون مناسبة لأي تحليل إحصائي.

- على الفترة الزمنية وعدد المرات في كل موسم للنمو وعدد التجارب المكررة أن تراعي تنوع ذبابت الفاكهة المستهدفة والفاكهة نفسها على مر الزمن وعلى امتداد منطقة الإنتاج. وعليها أيضا أن تراعي ظروف الحصاد (أو القطف) المبكر والمتأخر وأن تمثل المنطقة المقترحة التي ستنقل فيها الفاكهة. ويجب تحديد عدد ووزن الفاكهة المطلوبة والتكرارات ومكررات تكرار كل تجربة من أجل التثبيت من الفاعلية ومستوى الوثوق المناسب.

2-2 ذبابت الفاكهة

تنطبق المتطلبات التالية على الإجراءات التشغيلية المتعلقة بذبابت الفاكهة المستخدمة في التجارب الحقلية:

- تحديد صنف ذبابت الفاكهة المستخدمة في التجارب الحقلية والاحتفاظ بالعينات.
- يجب تجميع معلومات أساسية عن أنواع ذبابت الفاكهة المستهدفة بما فيها الفترة الطبيعية لنموها والفاكهة العائلة المعروفة في منطقة الإنتاج المحددة.
- ينصح باستخدام الأنواع البرية في التجارب الحقلية. وإذا تعذر الحصول على ذبابت برية بأعداد كافية فإن عمر المستوطنة المستخدمة يجب ألا يتعدى الخمسة أجيال لدى انطلاق التجارب، حيثما أمكن ذلك. ويمكن المحافظة على أعداد ذبابة الفاكهة **كركيزة-على مادة** ولكن الجيل الذي يجب استخدامه في التجارب يجب أن يربى على العائل الطبيعي لضمان السلوك الطبيعي للإباضة. وعلى الذبابت المستخدمة في الاختبارات المزاوجة ^ك للفاكهة خلال ذروة قدراتها التناسلية.
- أن تأتي كلها من المجموعة نفسها ومن الجيل نفسه (أي الجماعة).
- يجب أن يكون مصدر مستوطنة ذبابت الفاكهة هو نفسه منطقة الفاكهة المستهدفة حيثما أمكن ذلك.
- يجب تحديد فترات ما قبل الإباضة والإباضة والتزاوج ما قبل التجارب الحقلية بحيث تتعرض إناث الذبابت المزاوجة للفاكهة خلال ذروة قدراتها التناسلية
- يجب تسجيل عمر الذبابت الإناث والذكور البالغة عند تاريخ التزاوج ولدى بداية التجارب الحقلية
- يجب تحديد عدد الذبابت الإناث المزاوجة المطلوب لكل ثمرة وفقا لحجم الثمرة وخصوبة الأنثى وظروف التجربة الحقلية. ويجب تحديد عدد ذبابت الفاكهة عن كل تجربة مكررة، بناء على الخصائص البيولوجية لذبابة الفاكهة وعدد الثمار التي يجب التعرض لها وغيرها من ظروف التجارب الحقلية
- على فترة تعرض الفاكهة لنوع ذبابة الفاكهة المستهدفة أن تقوم على السلوك الإباضي لذبابة الفاكهة.
- على كل ذبابة أنثى أن تستخدم مرة واحدة فقط
- يجب تسجيل عدد الذبابت البالغة التي تموت خلال التجارب الحقلية كما يجب استبدال ذبابت الفاكهة الميتة بذبابت بالغة حية من المجموعة نفسها ومن الجيل نفسه (أي الجماعة). وقد يشير ارتفاع معدل الوفيات للذبابت البالغة إلى وجود ظروف غير مؤاتية (مثل الحرارة المفرطة) أو تلوث الفاكهة في التجربة الحقلية (مثل ترسبات المبيدات). في تلك الحالات، يجب تكرار التجارب ضمن ظروف أكثر ملاءمة.
- لدى التجارب الحقلية المتكررة، على ذبابت الفاكهة أن تكون كلها من **نفس** السن الفيزيولوجية **نفسها** وأن تكون قد ربيت ضمن الظروف نفسها.

3-2 الفاكهة

تنطبق المتطلبات التالية على الفاكهة المستخدمة في التجارب الحقلية. على الفاكهة أن تكون:

- من **نفس** النوع والصف **نفسه** اللذين تنتمي إليهما الفاكهة الواجب نقلها.
- من **نفس** منطقة الإنتاج **نفسها** أو من منطقة تمثلها، للفاكهة الواجب نقلها.
- أن تكون خاليةً عملياً من المبيدات المضرّة بذبابت الفاكهة ومن الطعوم والأوساخ ومن ذبابت الفاكهة والآفات الأخرى
- خالية من أي أضرار ميكانيكية أو طبيعية
- أن تكون من درجة تجارية محددة فيما يتعلق باللون والحجم والحالة الفيزيولوجية
- خلال مرحلة مناسبة ومحددة من النضج (مثل الوزن الجاف أو المحتوى من السكر).

4-2 الثمار المستخدمة للمراقبة

من المطلوب استعمال ثمار عائل طبيعي معلوم على مستوى معروف من النضج لمراقبة جميع التجارب الحقلية. وقد تكون تلك الثمار من أصناف أو أنواع مختلفة من الفاكهة المستهدفة. ويجب أن تكون الثمار خالية من أية إصابة سابقة (مثلاً بوسطة التغليف بكيس أو من منطقة خالية من الآفات). وعلى ذبابت الفاكهة المستخدمة في الضوابط والتجارب المكررة (بما في ذلك المراقبة) أن تأتي كلها من **نفس** المجموعة والجيل **نفسهما** (أي الجماعة).

تستخدم ثمار المراقبة من أجل:

- التأكد من أن إناث الذباب ناضجة جنسياً وقد تزاوجت فعلاً وتتسم بسلوك طبيعي للإباضة.
- تحديد مستوى الإصابة الذي قد يطرأ في العائل الطبيعي
- تحديد الإطار الزمني للنمو وصولاً إلى مرحلة البلوغ ضمن ظروف التجربة الحقلية لدى العائل الطبيعي
- التأكيد أن الظروف البيئية للإصابة بالآفة مؤاتية.

5-2 تصميم التجارب الحقلية

لهذا المعيار تستخدم التجارب الحقلية أقفاصاً أو دفيئات أو أغصانا مثمرة مغلقة بأكياس. ويجب أن تكون التجارب ملائمة لتقييم كيفية تأثير الحالة المادية والفيزيولوجية للثمرة في حالتها كعائل.

يتم إطلاق ذبابت الفاكهة إلى داخل أقفاص **شبكة** حقلية كبيرة **من الشبك** تحتوي داخلها على **كامل كل** النباتات المراد مراقبتها أو إلى أكياس شبكية تتضمن أجزاء من النبتة مع الثمرة. أو يمكن وضع النباتات المثمرة داخل دفيئات تطلق فيها الذبابت. ويمكن زرع النباتات المثمرة في حظائر أو يمكن إدخالها كنباتات مزروعة في أصيص من أجل التجارب. ومن المهم الإشارة إلى أن إناث ذبابت الفاكهة، بما أنها محجوزة اصطناعيا داخل الحظيرة المحددة الخاضعة للمراقبة قد تجبر على الإباضة على ثمرة عائل مشروط.

ينبغي إجراء التجارب الحقلية ضمن الظروف المناسبة لنشاط ذبابة الفاكهة ولا سيما الإباضة، كما يلي:

- على الأقفاص الحقلية والدفيئات أن تكون بالحجم والتصميم المناسبين لضمان احتجاز الذبابت البالغة والنباتات الخاضعة للتجربة وإتاحة **دفع** تيار الهواء هوائي المناسب والسماح بالظروف التي تيسر السلوك الطبيعي للإباضة.
- يجب تزويد الذبابت البالغة بكميات مرضية وكافية من الغذاء والماء.
- على الظروف البيئية أن تكون في أفضل مستوياتها وأن تسجل خلال الفترة الزمنية للتجارب الحقلية.
- يمكن الاحتفاظ بذكور الذباب في أقفاص أو دفيئات مع الإناث بحال كان ذلك مفيدا لجهة تشجيع الإباضة.
- يجب التخلص من الأعداء الطبيعية **لنوع** لأنواع ذبابة الفاكهة المستهدف من الأقفاص قبل البدء بالتجارب ويجب الحؤول دون دخولها من جديد إليها.
- يجب حماية الأقفاص من دخول المستهلكات الأخرى للفاكهة (مثل الطيور والقرود).
- فيما يخص الثمار المستخدمة للمراقبة، يمكن لثمار عائل طبيعي معروف أن تعلق على أغصان النباتات (وليس على الأغصان التي تحمل الثمار الخاضعة للتجربة). ويجب فصلها عن الثمار الخاضعة للاختبار (في أقفاص حقلية أو دفيئات منفصلة أو أغصان مثمرة مغلقة بأكياس) للتأكد من أن التجربة ليست اختبارا اختياريا.
- على الثمرة الخاضعة للاختبار أن تبقى متصلة بشكل طبيعي بالنبتة ويمكن أن تتعرض إلى ذبابت الفاكهة في الأقفاص الحقلية أو الأكياس أو الدفيئات.
- يجب نمو النباتات ضمن ظروف تستبعد قدر الإمكان أي تدخل مواد كيميائية مضرّة بذبابت الفاكهة.
- على التجربة المكررة أن تتم بواسطة كيس أو قفص ويفضل أن تتناول نبتة واحدة في الوحدة الاختبارية.
- على معدل وفيات ذبابت الفاكهة أن يرصد ويسجل وأن يتم استبدال الذبابت الميتة فورا بذبابت حية من المجموعة والجيل نفسيهما (أي الجماعة) من أجل الحفاظ على مستوى الانتشار نفسه لذبابت الفاكهة.
- يجب أن تنمو الثمرة ضمن ظروف تجارية أو في مستوعبات بحجم يتيح النمو الطبيعي للنبتة والثمرة.

- بعد فترة التعرض الموصى بها للإباضة على الثمار أن تنزع عن الغصن وأن توزن وأن يسجل عدد الثمار ووزنها.

على حجم العينة الواجب استخدامها من أجل تحقيق مستوى الثقة المطلوب أن يحدد مسبقاً عبر الاستعانة بالمراجع العلمية.

3- مناولة الفاكهة من أجل نمو ذبابت الفاكهة **وظهورها** **ووزنها**

على الفاكهة التي يتم جمعها ضمن الظروف الطبيعية (المراقبة عبر جمع عينات الفاكهة) والظروف شبه الطبيعية (التجارب الحقلية) فضلاً عن الثمار المستخدمة للمراقبة أن تحفظ حتى اكتمال نمو اليرقة. وقد تتفاوت هذه الفترة بحسب درجة الحرارة وحالة العائل. وعلى ظروف مناولة الفاكهة وحجزها أن تزيد إلى أقصى حد **صمود** **بقاء** ذبابة الفاكهة وأن تحدد في بروتوكول أخذ العينات أو التصميم الاختباري للتجربة الحقلية.

يجب الاحتفاظ بالثمرة في منشأة **أومستوعب** **واقية** من الحشرات **أومستوعب** ضمن الظروف التي تضمن **صمود** **بقاء** الخادرات بما في ذلك:

- درجة حرارة ورطوبة مناسبة
- وسيط مناسب لنمو الخادرات

فضلاً عن ذلك، على الظروف أن تيسر الجمع الدقيق لليرقات والخادرات والذبابت البالغة الحية التي تخرج من الثمرة.

تتضمن البيانات الواجب تسجيلها:

- الظروف المادية اليومية (مثل درجة الحرارة والرطوبة النسبية) في المنشأة التي تحتوي الفاكهة
- تواريخ وأعداد اليرقات والخادرات المجموعة من الثمرة الخاضعة للاختبار والثمرة المستخدمة للمراقبة مع الإشارة إلى أنه:
 - يمكن للوسيط أن يغربل في نهاية فترة الاحتجاز
 - في نهاية فترة الاحتجاز يتوجب تشريح الثمرة قبل التخلص منها لتحديد وجود يرقات أو خادرات حية أو ميتة فيها؛ وبناء على مرحلة فساد الثمرة، قد يكون من الضروري نقل اليرقة إلى وسيط مناسب لنمو الخادرات.
 - يجب تحديد وزن **كل** الخادرات **كلها** أو عينة فرعية منها مع تسجيل أية سمات شاذة فيها
- تواريخ **البيزوغ** وأعداد **ظهور** كافة الذبابت البالغة بحسب النوع، بما في ذلك أية ذبابت بالغة شاذة.

4- تحليل البيانات

يمكن لبيانات مراقبة اليرقات والتجارب الحقلية أن تحلل كميا من أجل تحديد الأمور التالية على سبيل المثال:

- مستويات الإصابة (مثلا عدد اليرقات لكل ثمرة وعدد اليرقات لكل كيلوغرام من الفاكهة، والنسبة المئوية من الفاكهة المصابة) على مستوى معين من الثقة.
- مدة نمو اليرقة والخادرة وعدد الذباب **البالغة الحية**
- النسبة المئوية لظهور الذباب **البالغة**

5- مسك السجلات والنشر

على المنظمة الوطنية لوقاية النباتات أن تمسك السجلات المناسبة للمراقبة الحقلية لليرقات والتجارب الحقلية كي تحدد حالة العائل، بما في ذلك:

- الاسم العلمي لذبابة الفاكهة المستهدفة
- الاسم العلمي لنوع النبتة أو اسم الصنف
- موقع منطقة إنتاج الفاكهة (بما في ذلك الإحداثيات الجغرافية)
- موقع العينات الموثقة لذبابة الفاكهة المستهدفة (التي ينبغي الاحتفاظ بها في موقع رسمي)
- أصل ونمو مستوطنة ذباب الفاكهة المستخدمة للتجارب الحقلية
- الظروف المادية والفيزيولوجية للفاكهة المختبرة لمعرفة إصابتها بذباب الفاكهة
- تصميم الاختبار والتجارب المنفذة والتواريخ والمواقع
- البيانات الخام والحسابات الإحصائية وتفسير النتائج
- المراجع العلمية الأساسية المستخدمة
- المعلومات الإضافية بما فيها الصور التي قد تكون متعلقة بذبابة الفاكهة أو الثمرة أو حالتها كعائل.

يجب أن تتاح السجلات إلى المنظمات الوطنية لوقاية النباتات في البلد المستورد عند الطلب.

على الأبحاث أن تخضع قدر الإمكان لاستعراض الأقران وللنشر في مجلة علمية وإلا فيجب إتاحتها للعموم.

نورد هذا المرفق على سبيل المرجع فقط وهو ليس جزءاً إلزامياً من المعيار.

المرفق 1: قائمة المراجع

- Aluja, M., Diaz-Fleisher, F. & Arredondo, J.** 2004. Nonhost status of commercial *Persea americana* "Hass" to *Anastrepha ludens*, *Anastrepha obliqua*, *Anastrepha serpentina*, and *Anastrepha striata* (Diptera: Tephritidae) in Mexico. *Journal of Economic Entomology*, 97: 293–309.
- Aluja, M. & Mangan, R.L.** 2008. Fruit fly (Diptera: Tephritidae) host status determination: Critical conceptual and methodological considerations. *Annual Review of Entomology*, 53: 473–502.
- Aluja, M., Pérez-Staples, D., Macías-Ordóñez, R., Piñero, J., McPheron, B. & Hernández-Ortiz, V.** 2003. Nonhost status of *Citrus sinensis* cultivar Valencia and *C. paradisi* cultivar Ruby Red to Mexican *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, 96: 1693–1703.
- APPPC RSPM 4.** 2005. *Guidelines for the confirmation of non-host status of fruit and vegetables to Tephritid fruit flies.* RAP Publication 2005/27. Bangkok, Asia and Pacific Plant Protection Commission.
- Baker, R.T., Cowley, J.M., Harte, D.S. & Frampton, E.R.** 1990. Development of a maximum pest limit for fruit flies (Diptera: Tephritidae) in produce imported into New Zealand. *Journal of Economic Entomology*, 83: 13–17.
- Cowley, J.M., Baker, R.T. & Harte, D.S.** 1992. Definition and determination of host status for multivoltine fruit fly (Diptera: Tephritidae) species. *Journal of Economic Entomology*, 85: 312–317.
- FAO/IAEA.** 2013. *Trapping manual for area-wide fruit fly programmes.* Vienna, Joint FAO/IAEA Division. 46 pp.
- FAO/IAEA/USDA.** 2014. *Product quality control for sterile mass-reared and released tephritid fruit flies.* Version 6.0. Vienna, IAEA. 164 pp.
- Fitt, G.P.** 1986. The influence of a shortage of hosts on the specificity of oviposition behaviour in species of *Dacus* (Diptera: Tephritidae). *Physiological Entomology*, 11: 133–143.
- Follett, P.A.** 2009. Puncture resistance in "Sharwil" avocado to Oriental fruit fly and Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) oviposition. *Journal of Economic Entomology*, 102: 921–926.
- Follett, P.A. & Hennessey, M.K.** 2007. Confidence limits and sample size for determining nonhost status of fruits and vegetables to tephritid fruit flies as a quarantine measure. *Journal of Economic Entomology*, 100: 251–257.
- Grové T., de Beer, M.S. & Joubert, P.H.** 2010. Developing a systems approach for *Thaumotobia leucotreta* (Lepidoptera: Tortricidae) on "Hass" avocado in South Africa. *Journal of Economic Entomology*, 103: 1112–1128.
- Hennessey, M.K.** 2007. *Guidelines for the determination and designation of host status of a commodity for fruit flies (Tephritidae).* Orlando, FL, USDA-CPHST.
- NAPPO RSPM No. 30.** 2008. *Guidelines for the determination and designation of host status of a fruit or vegetable for fruit flies (Diptera: Tephritidae).* Ottawa, North American Plant Protection Organization.
- NASS (National Agriculture Security Service).** 1991. *Specification for determination of fruit fly host status as a treatment.* Standard 155.02.01.08. Wellington, New Zealand Ministry of Agriculture and Fisheries.
- Rattanapun, W., Amornsak, W. & Clarke, A.R.** 2009. *Bactrocera dorsalis* preference for and performance on two mango varieties at three stages of ripeness. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 131: 243–253.
- Santiago, G., Enkerlin, W. Reyes, J. & Ortiz, V.** 1993. Ausencia de infestación natural de moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae) en aguacate "Hass" en Michoacán, México. *Agrociencia serie Protección Vegetal*, 4(3): 349–357.
- Singer, M.C.** 2004. Oviposition preference: Its definition, measurement and correlates, and its use in assessing risk of host shifts. In J.M. Cullen, D.T. Briese, W.M. Kriticos, L. Morin & J.K. Scott, eds. *Proceedings of the XI International Symposium on Biological Control of Weeds*, pp. 235–244. Canberra, CSIRO.

- Thomas, D.B.** 2004. Hot peppers as a host for the Mexican fruit fly *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*, 87: 603–608.
- van Klinken, R.D.** 2000. Host specificity testing: Why do we do it and how can we do it better. In R. Van Driesche, T. Heard, A. McClay & R. Reardon, eds. *Host-specificity testing of exotic arthropod biological control agents: The biological basis for improvement in safety*, pp. 54–68. Morgantown, WV, Forest Health Technology Enterprise Team, USDA Forest Service.
- Willard, H.F., Mason, A.C. & Fullaway, D.T.** 1929. Susceptibility of avocados of the Guatemala race to attack by the Mediterranean fruit fly in Hawaii. *Hawaiian Forester and Agriculturist*, 26: 171–176.

اعتمدت هيئة تدابير الصحة النباتية في دورتها الحادية عشرة لعام 2016 هذه المعالجة للصحة النباتية. ويشكل الملحق جزءاً ملزماً من المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية رقم 28.

المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية رقم 28:

معالجات الصحة النباتية للآفات الخاضعة للوائح للقواعد الحجر الزراعي

معالجة الصحة النباتية رقم 20: معالجة حفار الذرة الأوروبي

(Ostrinia nubilalis) بالتشعيع تعريض الأغذية للإشعاع

نطاق المعالجة

تشمل هذه المعالجة تعريض الفاكهة والخضروات للإشعاع بحد أدنى من الجرعة الممتصة قدره 289 غراي لمنع تطوّر الجيل الأول من حفار الذرة الأوروبي (*Ostrinia nubilalis*) إلى ما بعد الطور اليرقي الخامس، أو بحد أدنى من الجرعة الممتصة قدره 343 غراي لمنع البيض من الجيل الأول من أن يفقس من خادرات أساسية قد تعرّضت للإشعاع (الخادرات تشكل أكثر مراحل الحياة صموداً).¹

وصف المعالجة

اسم المعالجة	المعالجة بتعريض حفار الذرة الأوروبي (<i>Ostrinia nubilalis</i>) للإشعاع بالتشعيع
المكون الفعّال	غير محدد
نمط المعالجة	تعريض للإشعاع
الآفة المستهدفة	حفار الذرة الأوروبي (<i>Ostrinia nubilalis</i>) (Hübner) (قشريّة الجناح: كرامبيدا)
المواد الخاضعة للوائح المستهدفة	كافة الفواكه والخضروات التي تحمل حفار الذرة الأوروبي (<i>Ostrinia nubilalis</i>)

الجدول الزمني للمعالجة

الحد الأدنى من الجرعة الممتصة وقدره 289 غراي لمنع تطوّر الجيل الأول إلى ما بعد الطور اليرقي الخامس من خلال الخادرات المتأخرة من حفار الذرة الأوروبي (*Ostrinia nubilalis*).

¹ لا يتضمن نطاق معالجات الصحة النباتية مسائل متعلّقة بتسجيل مبيدات الآفات أو غيرها من المتطلبات المحلية الخاضعة لموافقة الأطراف المتعاقدة على المعالجات. وقد لا توفرّ المعالجات المعتمدة من جانب هيئة تدابير الصحة النباتية معلومات عن الآثار المحددة على صحة الإنسان أو سلامة الأغذية وهو ما ينبغي معالجته عن طريق استخدام إجراءات محلية قبل موافقة الأطراف المتعاقدة على معالجة ما. وعلاوة على ذلك، يتم النظر في آثار المعالجات المحتملة على جودة المنتج بالنسبة إلى بعض السلع التي قد تشكل عائلاً للآفة قبل اعتمادها على المستوى الدولي. غير أن تقييم أي آثار ناجمة عن معالجة ما على جودة السلع قد يتطلب بحثاً إضافياً. وليس للطرف المتعاقد واجب الموافقة على المعالجات أو تسجيلها أو اعتمادها لاستخدامها على أراضيها.

هناك نسبة 95 في المائة من الثقة بأن المعالجة وفقاً لهذا الجدول الزمني يبلغ معدل الثقة بأن المعالجة وفقاً للجدول الزمني هذا تمنع تطوّر الجيل الأول إلى ما بعد الطور اليرقي الخامس لما لا يقل عن 99.987 في المائة من الخادرات المتأخرة من حفار الذرة الأوروبي (*Ostrinia nubilalis*)، نسبة 95 في المائة.

الحد الأدنى من الجرعة المتصلة وقدره 343 غراي لمنع البيض من الجيل الأول من أن يفقس في بيض الخادرات المتأخرة من حفار الذرة الأوروبي (*Ostrinia nubilalis*).

هناك نسبة 95 في المائة من يبلغ معدل الثقة بأن المعالجة وفقاً لهذا الجدول الزمني هذا تمنع بيض الجيل الأول من أن يفقس بالنسبة إلى بيض ما لا يقل عن 99.9914 في المائة من الخادرات المتأخرة من حفار الذرة الأوروبي (*Ostrinia nubilalis*)، نسبة 95 في المائة.

يجب تنفيذ هذه المعالجة تماشياً مع متطلبات المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية رقم 18 (خطوط توجيهية لاستخدام الإشعاع في الصحة النباتية).

يجب ألا تطبق هذه الجداول الزمنية **للتشبيح لإشعاع** على الفواكهة والخضروات التي يتم تخزينها في بيئات مدمجة لأن الأخيرة قد تؤثر على كفاءة المعالجة.

معلومات أخرى ذات صلة

نظراً إلى أن التعريض للإشعاع قد لا يؤدي إلى موت حتمي، قد يجد المفتشون خلال عملية التفطيش، أطواراً حية ولكن غير قابلة للاستمرار من حفار الذرة الأوروبي (*Ostrinia nubilalis*) (يرقات أو خادرات أو بالغات). ولا يعني ذلك فشل المعالجة.

وعند قيامه بتقييم هذه المعالجة ونظر فريق الخبراء المعني بمعالجات الصحة النباتية عند قيامه بتقييم هذا المعالجة، في المسائل المرتبطة بإمكانية نجاة الأطوار البالغة العقيمة من المعالجة. وإذا فرّت أعداد كافية منها الأطوار من الفاكهة والخضروات المصابة التي تم تعريضها للإشعاع وطارت لتدخل في مصائد رامية إلى رصد الآفات، قد يتم تفعيل استجابة الحرجر الصحي، مما قد يؤدي إلى خسائر اقتصادية وقيود على التجارة. واعتبر فريق الخبراء أنه بناءً على العمل المفصل في المؤلفين Hallman and Hellmich (2009) وHallman وآخرون (2010)، فإن أعداد الكائنات الناجية السليمة سيكون منخفضاً بما فيه الكفاية لدرجة جعل استجابة مماثلة أمر مستبعد.

المراجع

يشير الملحق الحالي إلى المعايير الدولية لتدابير الصحة النباتية. وهذه المعايير متاحة على البوابة الدولية للصحة النباتية على العنوان التالي : <https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/ispms>.

Hallman, G.J. & Hellmich, R.L. 2009. Ionizing radiation as a phytosanitary treatment against European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) in ambient, low oxygen, and cold conditions *Journal of Economic Entomology*, 102(1): 64–68.

Hallman, G.J., Levang-Brilz, N.M., Zettler, L. & Winborne, I.C. 2010. Factors affecting ionizing radiation phytosanitary treatments, and implications for research and generic treatments. *Journal of Economic Entomology* 103(6): 1950–1963.

التسلسل التاريخي للمطبوع

- لا يشكل هذا جزءاً رسمياً من المعيار.
2012 تم تقديم طلب المعالجة (2012-009)
2012-12 استعرض الفريق الفني المعني بمعالجات الصحة النباتية (الفريق) المعالجة وطلب توفير المزيد من المعلومات
2013-02 بعث الفريق برسالة إلى مقدّم الطلبات عن طريق الأمانة
2013-05 ردّ مقدّم الطلبات على الرسالة
2013-07 رفع الفريق توصية بالمعالجة إلى لجنة المعايير لمشاورة الأعضاء
2013-09 وافق الفريق على جدول المعالجة (اجتماع افتراضي)
2013-09 بدأ الفريق بإعداد وثيقة عن ظهور الأطوار البالغة بعد تعريض الأغذية للإشعاع
2014-02 وافق الفريق على الوثيقة بشأن ظهور الأطوار البالغة بعد تعريض الأغذية للإشعاع ورفعها إلى الأمانة
2014-02 صدر قرار إلكتروني عن لجنة المعايير للموافقة عليه في مشاورة الأعضاء
2014-03 أدخلت الأمانة التغييرات المقترحة من جانب المنتدى وفتحت باب التصويت
2014-03 وافقت لجنة المعايير على مشروع المعالجة للتصويت عليه في مشاورة الأعضاء (2014_eSC_May_06)
2015-02 استعرض الفريق التعليقات الواردة من مشاورة الأعضاء
2015-05 استعراض الاجتماع الافتراضي للفريق الذي عُقد في مايو/أيار
2015-09 استعراض الاجتماع الافتراضي للفريق الذي عُقد في سبتمبر/أيلول
2015-10 وافقت لجنة المعايير على معالجة الصحة النباتية التي ستُرفع إلى هيئة تدابير الصحة النباتية لاعتمادها (2015_eSC_Nov_06)
2016-04 اعتمدت هيئة تدابير الصحة النباتية في دورتها الحادية عشرة معالجة الصحة النباتية
الملحق 20 من المعيار الدولي للصحة النباتية رقم 28. معالجة حفار الذرة الأوروبي (*Ostrinia nubilalis*) بتعريض الأغذية للإشعاع، روما، الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات. منظمة الأغذية والزراعة.
آخر تحديث للتسلسل التاريخي للمطبوع: 2016 - 04

اعتمدت هيئة تدابير الصحة النباتية في دورتها الحادية عشرة لعام 2016 هذه المعالجة للصحة النباتية. ويشكل الملحق جزءاً ملزماً من المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية رقم 28.

المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية رقم 28:

معالجات الصحة النباتية لآفات الخاضعة للوائح لتواعد الحجر الزراعي

معالجة الصحة النباتية رقم 21: معالجة ذباب *Bactrocera melanotus* و *Bactrocera xanthodes* في البيايا (*Carica papaya*) بحرارة البخار

نطاق المعالجة

تتألف هذه المعالجة من معالجة فاكهة البيايا (*Carica papaya*) في غرفة للهواء المدفوع المرتفع الحرارة لكي تسفر عن نفوق بيض ويرقات ذباب *Bactrocera melanotus* و *Bactrocera xanthodes* (ذبابة فاكهة المحيط الهادئ) بالفعالية المحددة¹.

وصف المعالجة

اسم المعالجة	معالجة ذباب <i>Bactrocera melanotus</i> و <i>Bactrocera xanthodes</i> على فاكهة البيايا بحرارة البخار
المكون الفعال	غير متاح
نمط المعالجة	فيزيائي (حرارة البخار)
الآفة المستهدفة	ذبابة <i>Bactrocera melanotus</i> (Coquillett) (Diptera: Tephritidae) و <i>Bactrocera xanthodes</i> (Broun) (Diptera: Tephritidae)
المواد المستهدفة الخاضعة للوائح	فاكهة البيايا (<i>Carica papaya</i> L.)

جدول المعالجة

التعريض في غرفة للهواء المدفوع:

— لرطوبة نسبية لا تقل عن 60 في المائة

¹ لا يتضمن نطاق معالجات الصحة النباتية القضايا ذات الصلة بتسجيل المبيدات أو المتطلبات المحلية الأخرى الخاصة بموافقة الأطراف المتعاقدة على المعالجات. وقد لا تقدم المعالجات المعتمدة من قبل هيئة تدابير الصحة النباتية معلومات بشأن الآثار المحددة المترتبة على الصحة البشرية أو سلامة الأغذية، وهو ما ينبغي معالجته باستخدام الإجراءات المحلية قبل موافقة الأطراف المتعاقدة على معالجة ما. وبالإضافة إلى ذلك، يُنظر في الآثار المحتملة للمعالجات على نوعية المنتجات بالنسبة لبعض السلع قبل اعتمادها دولياً. إلا أن تقييم آثار معالجة ما على نوعية السلع قد يقتضي دراسة إضافية. ولا يُلزم أي طرف متعاقد بالموافقة على المعالجات، أو تسجيلها أو اعتمادها للاستخدام في أراضيه.

- درجة حرارة هواء تزيد عن درجة حرارة الغرفة لتصل إلى أكثر من 48.5 درجة مئوية أو أكثر لمدة 3.5 ساعات على الأقل.
- درجة حرارة هواء تبلغ 48 درجة مئوية أو أكثر لمدة 3.5 ساعات على الأقل.
- الحفاظ على كل الفاكهة داخل الغرفة عند درجة حرارة أساسية تبلغ 47.5 درجة مئوية أو أعلى، لمدة 20 دقيقة على الأقل.

و حالما تكتمل المعالجة، يجوز تبريد الفاكهة (عن طريق التبريد بالماء مثلاً) في درجة حرارة أساسية تبلغ 30 درجة مئوية لمدة لا تقل عن 70 دقيقة.

وهناك نسبة 95 في المائة من الثقة بأن المعالجة وفقاً لهذا الجدول الزمني تؤدي إلى قتل ما لا يقل عن 99.9914 في المائة من بيض ويرقات ذباب *B. melanotus* و *B. xanthodes*.

معلومات أخرى ذات صلة

نظر الفريق الفني المعني بمعالجات الصحة النباتية، في تقييمه لهذه المعالجة، في التبرير الفني لإدراج أنواع أخرى من ذباب الفاكهة (*Anastrepha ludens* (Loew) و *Anastrepha suspensa* (Loew) و *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) و *Bactrocera dorsalis* (Hendel) و *Bactrocera facialis* (Coquillett) و *Bactrocera kirki* (Froggatt) و *Bactrocera passiflorae* (Froggatt) و *Bactrocera psidii* (Froggatt) و *Bactrocera tryoni* (Froggatt) و *Ceratitis capitata* (Wiedemann))، ومحاصيل فاكهة أخرى (جميع الفواكه التي تعيل ذباب الفاكهة) في وصف المعالجة كما قدم في الأصل. إلا أن الفريق الفني أوصى بإدراج آفتين اثنتين فقط من ذباب الفاكهة، وهما: *B. xanthodes* و *B. melanotus*، لمحصول فاكهة واحد فحسب، البيايا، استناداً إلى Waddell وآخرين (1993).

وقد / استخدم وتمثل محصول الفاكهة البيايا (*C. papaya* . Waimanalo Solo). **المستخدم** لوضع **هذا** الجدول

الزمني **في** البيايا (~~*C. papaya* . Waimanalo Solo~~)

المراجع

يشير الملحق الحالي إلى المعايير الدولية لتدابير الصحة النباتية. وهذه المعايير متاحة على البوابة الدولية للصحة النباتية على العنوان التالي: <https://www.ippc.int/ar/core-activities/standards-setting/ispms/>.

Waddell, B.C., Clare, G.K., Maindonald, J.H. & Petry, R.J. 1993. Postharvest disinfestations of *Bactrocera melanotus* and *B. xanthodes* in the Cook Islands. Report 3. Wellington, New Zealand, Ministry of Agriculture and Fisheries – Regulatory Authoritypp.1-44.

التسلسل التاريخي للمطبوع

لا يشكل هذا جزءاً رسمياً من المعيار.

2009 تم تقديم المعالجة بالهواء المدفوع المرتفع الحرارة لأنواع مختارة من ذباب الفاكهة (Diptera: Tephritidae) على الفاكهة (2009-105).

2010-07 استعرض الفريق الفني المعني بمعالجات الصحة النباتية المعالجة وطلب الحصول على معلومات إضافية.

2012-12 طلب الفريق الفني المعني بمعالجات الصحة النباتية المزيد من الوقت لإجراء التقييم.

2013-07 قام الفريق الفني المعني بمعالجات الصحة النباتية بتغيير العنوان إلى المعالجة بالهواء المدفوع المرتفع الحرارة بالنسبة إلى *Bactrocera melanotus* و *Bactrocera xanthodes* في الببايا (*Carica papaya*) (2009-105) وبتزكيته لدى لجنة المعايير لغرض مشاوره الأعضاء.

2013-09 وافق الفريق الفني المعني بمعالجات الصحة النباتية على جدول زمني للمعالجة (اجتماع افتراضي).

2014-02 اتخذت لجنة المعايير قراراً إلكترونياً للموافقة على مشاوره الأعضاء.

2014-03 أدخلت الأمانة التغييرات التي اقترحت من خلال المذتدى وفتح باب التصويت.

2014-03 وافقت لجنة المعايير على مسودة المعالجة لغرض مشاوره الأعضاء عن طريق التصويت (2014_eSC_May_02).

2015-02 مشاوره الأعضاء قيد الاستعراض من جانب الفريق الفني المعني بمعالجات الصحة النباتية.

2015-05 إجراء الاجتماع الافتراضي للفريق الفني المعني بمعالجات الصحة النباتية في مايو/أيار.

2015-09 إجراء اجتماع الفريق الفني المعني بمعالجات الصحة النباتية في سبتمبر/أيلول

2015-10 وافقت لجنة المعايير على مسودة المعالجة لاعتمادها من قبل الهيئة (2015_eSC_Nov_07).

2016-04 اعتمدت الهيئة في دورتها الحادية عشرة معالجة الصحة النباتية.

الملحق 21 من المعيار الدولي للصحة النباتية رقم 28. معالجة ذباب *Bactrocera melanotus* و *Bactrocera xanthodes* في الببايا (*Carica papaya*) بحرارة

البخار. روما، الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات. منظمة الأغذية والزراعة.

آخر تحديث للتسلسل التاريخي للمطبوع: 2016 - 04

المعيار الدولي رقم 27

الملحق 7



المعايير الدولية لتدابير الصحة النباتية

المعيار الدولي 27: بروتوكولات تشخيص

بروتوكول التشخيص: 7

فيروود درنة البطاطا المغزلية

Potato spindle tuber viroid

(اعتمد في 2016 ونشر في 2016)

المحتويات

- 1- معلومات عن الآفة..... 3
- 2- المعلومات التصنيفية 4
- 3- الكشف..... 5
- 1-3 أخذ العينات 7
- 2-3 الكشف البيولوجي..... 8
- 3-3 الكشف الجزيئي 9
- 1-3-3 إعداد العينات 9
- 2-3-3 استخراج الحمض النووي 10
- 3-3-3 طرق جزيئية عامة للكشف عن فيروسات الـ pospiviroid 12
- 1-3-3-3 ارتحال كهربائي هلامي بولي أكريلاميدي عكسي R-PAGE 12
- 2-3-3-3 التهجين بفحص DIG-labelled cRNA 13
- 3-3-3-3 تفاعل البلمرة التسلسلي باستخدام إنزيم النسخ العكسي RT-PCR التقليدية باستخدام بادئات Verhoeven وآخرين (2004) 13
- 4-3-3-3 تقنية RT-PCR في الوقت الحقيقي باستخدام فحص Botermans GenPospi وآخرين، (2013) . 14

- 4-3-3 طرق جزيئية ذات خصوصية عالية للكشف عن فيروس درنة البطاطا المغزلية 16
- 1-4-3-3 تقنية RT-PCR التقليدية باستخدام بادئات Shamloul وآخرين، (1997) 16
- 2-4-3-3 RT-PCR في الوقت الحقيقي باستخدام بادئات Boonham وآخرين (2004) 17
- 3-3-4-3 RT-PCR في الوقت الحقيقي (Plant Print Diagnostics kit) 18
- 4-3 ضوابط للاختبارات الجزيئية 19
- 5-3 تفسير نتائج من تفاعل البلمرة التسلسلي التقليدي وفي الوقت الحقيقي 21
- 1-5-3 تفاعل البلمرة التسلسلي التقليدي 21
- 2-5-3 تفاعل البلمرة التسلسلي في الوقت الحقيقي 21
- 4- تحديد الهوية 21
- 1-4 التسلسل وتحليل التسلسل 22
- 5- السجلات 23
- 6- جهات الاتصال للحصول على معلومات إضافية 24
- 7- شكر وتقدير 24
- 8- المراجع 25

1- معلومات عن الآفة

الفيروسات (أشباه الفيروسات) هي جزيئات من الحمض النووي الريبي RNA تتألف من جديلة وحيدة غير مغلقة مغلقة الدائرة بشكل ترايطي يبلغ طولها 293-401 نيوكليوتايد تُنسخ نسخاً متماثلاً بأنزيمات مضيفة (Hammond & Owens, 2006). وفي العادة، يبلغ طول فيروس درنة البطاطا المغزلية (من نوع *Pospiviroid*) 359 نيوكليوتايد، ولكن تفيد تقارير أن هناك مستخلصات منها يبلغ طولها 341-364 نيوكليوتايد (Wassenegger وآخرون، 1994؛ Shamloul وآخرون، 1997؛ Jeffries، 1998). وقد وصفت سلالات خفيفة وشديدة الأعراض على أساس أعراض في أصناف *البندورة-البندورة (الطماطم)* الحساسة؛ على سبيل المثال، *Solanum lycopersicum L.* (بندورة) *cv. Rutgers* (Fernow, 1967).

المجموعة الطبيعية المضيفة لفيروس درنة البطاطا المغزلية ضيقة نسبياً. فالمضيفات الطبيعية الرئيسية هي من نوع *Solanum spp.* المدادة-المشكلة-للدرنات، مثلاً *Solanum tuberosum L.* (بطاطا) و *S. lycopersicum* (بندورة). كما وجد فيروس درنة البطاطا المغزلية أيضاً في *Capsicum annuum* و *Persea americana* و *S. muricatum*. واكتشف أساساً في عائلة أنواع نباتات الزينة المتكاثرة نباتياً من العائلة الباذنجانية Solanaceae - وهي *Brugmansia spp.* و *Cestrum spp.* و *Datura sp.* و *Lycianthes rantonetti* و *Petunia spp.* و *Physalis peruviana* و *Solanum spp.* و *Streptosolen jamesonii* - ولكن أيضاً في *Chrysanthemum sp* و *Dahlia × hybrida* وفي عائلة النجميات Asteraceae (للاطلاع على مزيد من تفاصيل المضيفات الطبيعية، أنظر المركز الدولي للزراعة والعلوم البيولوجية (CABI)، (بدون تاريخ)). أما المجموعة المضيفة التجريبية لهذا الفيروس فواسعة تشمل أنواع في العائلة الباذنجانية Solanaceae، ولكن أيضاً بعض الأنواع في تسع عائلات أخرى على الأقل. ويظهر معظم المضيفين أعراضاً مرضية قليلة أو لا يظهرها أية أعراض (Singh، 1973؛ Singh وآخرون 2003).

وفي بعض بلدان أو دول في أفريقيا وآسيا وأوروبا الشرقية وأمريكا الشمالية، وجد أن فيروس درنة البطاطا المغزلية يصيب *S. tuberosum* (منظمة حماية النباتات في أوروبا ومنطقة البحر الأبيض المتوسط (EPPO)/المركز الدولي للزراعة والعلوم البيولوجية (CABI) 1997)، وأمريكا الوسطى (Badilla وآخرون 1999)، وأمريكا الجنوبية ومنطقة الشرق الأوسط (Hadidi وآخرون، 2003). غير أن توزيعه الجغرافي أوسع نطاقاً في أنواع نباتات الزينة وغيرها من المضيفات (للتوزيع الجغرافي، أنظر (CABI) (بدون تاريخ)).

وفي *Solanum tuberosum*، يعد التكاثر النباتي الوسيلة الرئيسية لانتشار فيروس درنة البطاطا المغزلية هو التكاثر النباتي. كما أنه ينتشر أيضاً عن طريق الاتصال وأساساً عن طريق الآلات في الحقول وقطع بذور درنات البطاطا (Hammond & Owens, 2006). وهو ينتقل في بذور البطاطا الحقيقية - قد يكون ما يصل إلى 100 في المائة من البذور مصاباً (Fernow وآخرون، 1970؛ Singh، 1970) - وأيضاً في حبوب اللقاح (Singh، Grasmick & Slack, 1985)؛ Singh وآخرون، 1992). وقد أفاد De Bokx و Pirone (1981) أن هناك معدل انتقال منخفض عن طريق *Macrosiphum euphorbiae* ولكن ليس عن طريق الفصيلة *Myzus persicae* أو *Aulacorthum solani* - ومع ذلك تفيد تقارير عن استحواذ تجريبي للفيروس وانتقاله عن طريق *M. persicae* من نباتات مصابة بكل من الفيروس

وفيروس التفاف أوراق البطاطا (PLRV) (Salazar وآخرون، 1995؛ Singh & Kurz، 1997). وتبين لاحقاً أن الفيروس مغلف بتنافر ضمن جزيئات فيروس التفاف أوراق البطاطا (PLRV) (Querci وآخرون، 1997)، وتلك ظاهرة قد تكون لها آثار هامة على انتشار الفيروس في الظروف الحقلية.

وينتشر الفيروس في *Solanum lycopersicum* بسهولة عن طريق الاتصال وتبين أيضاً أنه ينتقل عن طريق حبوب اللقاح والبذور (Kryczynski وآخرون، 1988؛ Singh، 1970). كما تبين أن الانتقال عن طريق بذور [البنديورة](#) [البنديورة \(الطماطم\)](#) يساهم في انتشار الفيروس على المستوى الدولي (van Brunschot وآخرون، 2014). ومن الممكن أن ينتشر الفيروس أيضاً في بذور الفلفل (Lebas وآخرون، 2005).

وقد تقوم أنواع نباتات الزينة المصابة بدور مصدر للعدوى إذا ما تنوالت قبل لمس نباتات أخرى معرضة، وتبين أنها مسار لانتشار الفيروس على الصعيد الدولي (Navarro وآخرون، 2009؛ Verhoeven وآخرون، 2010). ولم يتبين أي انتقال للفيروس مع *Apis mellifera* أو *Bombus terrestris* أو *Frankliniella occidentalis* أو *Thrips tabaci* (Nielsen وآخرون، 2012).

إن فيروس درنة البطاطا المغزلية هو الفيروس الوحيد الذي من المعروف أنه يصيب طبيعياً أنواع *Solanum* المزروعة. غير أن فيروس *Mexican papita* يصيب الأنواع البرية *S. cardiophyllum* (Martinez-Soriano وآخرون، 1996). أما تجريبياً، فإن أنواعاً أخرى من الفيروس من جنس *Pospiviroid* تصيب *S. tuberosum* (Verhoeven وآخرون، 2004).

وبالإضافة إلى فيروس درنة البطاطا المغزلية، وجد أن فيروسات *pospiviroids* أخرى تصيب طبيعياً *S. lycopersicum*، بما في ذلك *Citrus exocortis viroid* (CEVd؛ Mishra وآخرون، 1991)، و *Columnnea latent viroid* (CLVd)؛ Verhoeven وآخرون، 2010)، و *Mexican papita viroid* (MPVd؛ Ling & Bledsoe، 2009)، و *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd؛ Reanwarakorn وآخرون، 2011) و *Tomato apical stunt viroid* (TASVd؛ Walter، 1987) و *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd؛ Singh وآخرون، 1999) و *Tomato planta macho viroid* (TPMVd؛ Galindo وآخرون، 1982).

2- المعلومات التصنيفية

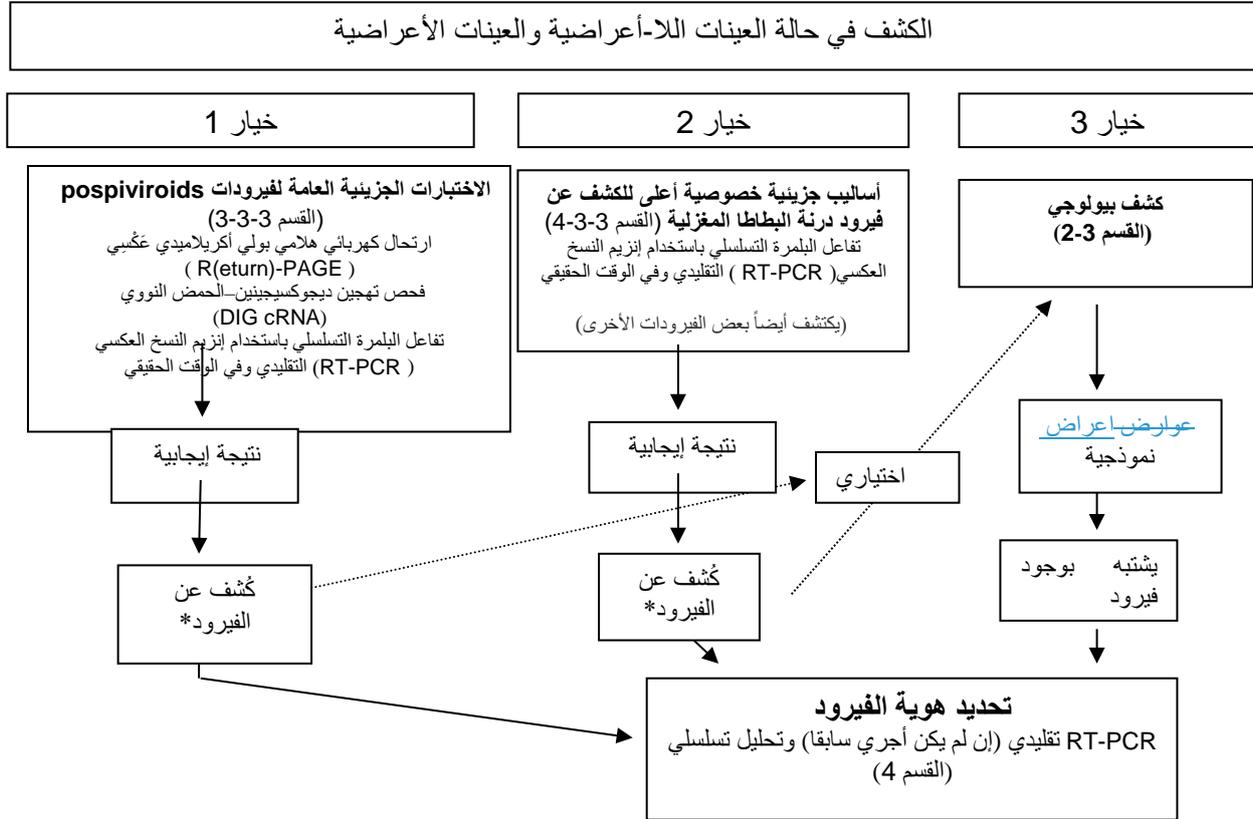
الاسم:	فيروس درنة البطاطا المغزلية (PSTVd)
المرادفات:	فيروس درنة البطاطا المغزلية، فيروس البطاطا القوطي، فيروس تورّد القمة في البنديورة
الوضع التصنيفي:	<i>Pospiviroid</i> ، <i>Pospiviroidae</i>
الأسماء الشائعة:	درنة البطاطا المغزلية

3- الكشف

يعتمد ظهور الأعراض وشدها على سلالة فيروس درنه البطاطا المغزلية وعلى الصنف المستنبت وبيئته. ففي صنف *S. tuberosum*، قد لا تظهر أعراض الإصابة أو تنتج أعراض تتراوح من المعتدل إلى الشديد (تخفيض في حجم النبات واستقامته وترتيب أوراق الشجر مع اتجاه عقارب الساعة عندما يُنظر إلى النباتات من أعلى؛ وأوراق خضراء غامقة ومغضنة). وقد ينخفض حجم الدرنات أو تكون متشوهة الشكل أو مغزلية أو تأخذ شكل الدمبل مع عيون ناتئة بارزة موزعة توزيعاً منتظماً (EPPO، 2004). وفي صنف *S. lycopersicum*، تشمل الأعراض التقزم والالتواء إلى أسفل والتغصن والالتواء الجانبي للوريقات الجديدة وإخضرار وإحمرار وهشاشة ونخر الأوراق وإنخفاض حجم الفاكهة وعدم نضوج الفاكهة (Mackie وآخرون، 2002؛ Hailstones وآخرون، 2003؛ Lebas وآخرون، 2005). وفي صنف *C. annuum*، تكون الأعراض دقيقة، إذ تظهر أوراق الشجر بالقرب من أعلى النبات هامشاً ذا حدّ متموج (Lebas وآخرون، 2005). ولا تظهر كافة أنواع نباتات الزينة التي دُرست حتى الآن أعراضاً (Verhoeven, 2010).

ولأن الإصابات بفيروس درنه البطاطا المغزلية قد تكون بلا أعراض، يتطلب الكشف عنه وتحديد هويته إجراء اختبارات. ويمكن الكشف بالاختبارات البيولوجية والجزيئية التي يبينها الشكل 1 كخيارات، ولكن لتحديد هوية فيروس درنه البطاطا المغزلية، ينبغي إجراء تسلسل sequencing على الناتج من تفاعل البلمرة التسلسلي PCR، إذ أن الاختبارات ليست محددة به وستكتشف فيروسات أخرى. وسيساهم التسلسل أيضاً في الحيلولة دون الإبلاغ عن نتائج إيجابية كاذبة. وإذا اعتبرت القدرة الإراضية هامة، يمكن القيام بفهرسة بيولوجية. وإذا ما جرى تحديد هوية الفيروس لأول مرة في البلد المعني، يمكن أن يؤكد التشخيص مختبر آخر.

وينبغي إدراج ضوابط ملائمة في جميع الاختبارات للتقليل إلى الحد الأدنى من مخاطر النتائج الإيجابية المنزفة أو السلبية الكاذبة.



الشكل 1- متطلبات الحد الأدنى للكشف عن فيروسات درنة البطاطا المغزلية وتحديد هويته

في حالات معينة، قد لا يلزم تحديد الهوية لكل عينة فيروس-إيجابية؛ مثلاً، عند التعامل مع تفشي الفيروس.

ملاحظة: في حالة الاشتباه بوجود فيروس في عينة معينة (أي أن الأعراض النموذجية موجودة)، عندما يعطي الاختبار نتيجة سلبية، ينبغي إجراء اختبارات أخرى للتأكد من النتيجة.

إن هذا الملحق معني بالكشف عن فيروسات درنة البطاطا المغزلية؛ ولم يوضع للكشف عن أنواع أخرى من *pospiviroid* وتحديد هويتها. غير أنه ينبغي الأخذ بالاعتبار احتمال وجود فيروسات أخرى عند اختيار طريقة الكشف وتحديد الهوية. ولذا، يصف هذا الملحق طرق كشف غير محددة تكشف عن جميع الفيروسات المعروفة؛ بما في ذلك فيروسات *pospiviroids* مثل فيروسات درنة البطاطا المغزلية. ويلزم لتحديد الهوية إجراء تسلسل *sequencing* على الناتج من تفاعل البلمرة التسلسلي PCR.

ويرد وصف لبروتوكولات الكشف عن فيروسات درنة البطاطا المغزلية في الأنسجة من الأوراق والدرنات ومن البذور النباتية (الحقيقية البحتة). غير أن الكشف الموثوق في أنسجة البذور يشكّل تحدياً بشكل خاص.

ويرد في هذا البروتوكول التشخيصي وصف للطرق (بما في ذلك الإشارة إلى الأسماء التجارية) كما هي منشورة، إذ أن هذه حددت المستوى الأصلي للحساسية والخصوصية و/أو قابلية التكرار. ولا يعني استخدام أسماء الكواشف الكيميائية أو الأجهزة في بروتوكولات التشخيص المصادقة عليها ضمناً ولا استبعاد البعض الآخر الذي قد يكون مناسباً أيضاً. ويمكن تعديل الإجراءات المخبرية الواردة في البروتوكولات لتتوافق مع معايير المختبرات المفردة، شريطة أن يتم

التحقق من صحتها بشكل كاف. وتوفر منظمة حماية النباتات في أوروبا ومنطقة البحر الأبيض المتوسط (EPPO 2014) توصيات بشأن التحقق من الطرق في التقنيات التشخيصية للنبات phytodiagnosics.

ويحدد أداء أي اختبار جزيئي بكل من المصفوفة التي سيجري اختبارها والخيار المتبنى لإعداد العينة اللاحقة واستخراج الحمض النووي وطرق الكشف وتحديد الهوية. ويقدم الجدول 1 [لمحة نظرة](#) عامة على بيانات التحقق المتوفرة لمصفوفات مختلفة ومجموعات من الطرق. ويرد وصف لتفاصيل هذه الطرق في الفقرة المقابلة لكل طريقة أو في المراجع المشار إليها.

3-1 أخذ العينات

يعرض المعيار 31 من المعايير الدولية لتدابير الصحة النباتية ISPM 31 (منهجيات أخذ العينات من الشحنات) إرشادات عامة لأخذ العينات.

النباتات الدقيقة الصغر (ميكروبلانتس) لصنف *S. tuberosum* و صنف *S. tuberosum* المرابي في دفيئات زجاجية. بالنسبة للميكروبلانتس، ينبغي استخدام النبتة بكاملها كعينة أو اتخاذ أعلى ثلثين من النبتة كعينة في ظروف معقمة، لتمكين بقية النبات من مواصلة النمو. وينبغي أن يكون عمر الميكروبلانتس أربعة إلى ستة أسابيع بحيث يبلغ طول ساقه حوالي 5 سم وتكون أوراقه جيدة التكوين. وبالنسبة للنباتات التي تنمو في دفيئات زجاجية، ينبغي استخدام ورقة ممتدة تماماً من كل نبتة. ويكون تركيز الفيروم [منخفضاً أخفض](#) في درجات الحرارة ومستويات الضوء المنخفضة، ولذا ينبغي أن تنمى النباتات عند درجة حرارة تبلغ 18 درجة مئوية على الأقل ولفترة ضوئية تبلغ 14 ساعة على الأقل. ويمكن استكثار الميكروبلانتس أو الأوراق؛ ويعتمد معدل الاستكثار على طريقة الاختبار المستخدم وينبغي التحقق من صحته.

النباتات من صنف *S. tuberosum* المزروعة في الحقل - ينبغي استخدام ورقة طرفية غير متدهورة بسبب العمر وممتدة تماماً من أعلى كل نبتة. ويمكن استكثار الأوراق معاً للاختبار؛ ويعتمد معدل الاستكثار على طريقة الاختبار المستخدم وينبغي التحقق من صحته.

درنات *S. tuberosum* - يكون الفيروم موزعاً بانتظام في درنات *S. tuberosum* المصابة (Shamloul وآخرون، 1997). ويحدث بكميات متساوية تقريباً في الأجزاء المختلفة من الدرنات المصابة الأساسية والثانوية (Roehorst وآخرون، 2006). ويكون التركيز على أعلى مستوى له بعد الحصاد مباشرة. ولا ينخفض التركيز في الدرنات المخزنة على 4 درجات مئوية انخفاضاً كبيراً لمدة تصل إلى ثلاثة أشهر، لكنه يمكن أن ينخفض بعد ستة أشهر من التخزين بأكثر من 10⁴ مرات. ويمكن أن تستخدم كعينة نواة منفردة من أي جزء من الدرنات ويمكن استكثارها؛ ويعتمد معدل الاستكثار على طريقة الاختبار المستخدم وينبغي التحقق من صحته.

أوراق المحاصيل الأخرى وأنواع نباتات الزينة - تستخدم أوراق صغيرة العمر ممتدة تماماً. ويمكن استكثارها معاً للاختبار؛ ويعتمد معدل الاستكثار على طريقة الاختبار المستخدم وينبغي التحقق من صحته. وتجدر ملاحظة أن تركيز الفيروم يتأثر بعمر/نضج النباتات، وهناك [تقلبات موسمية](#) في كثير من الأحيان [تقلبات موسمية](#). وبالإضافة إلى ذلك، يحتوي بعض الأنواع على كيماويات حيوية قد تحول دون انتقال الفيروم إلى نباتات الاختبار (مثل صنف

Brugmansia spp) أو دون تفاعل البلمرة التسلسلي باستخدام إنزيم النسخ العكسي (RT-PCR) (مثل صنف *Calibrachoa spp.* وصنف *Solanum jasminoides* وصنف *S. jamesonii*).

البذور- قد يختلف تركيز الفيروود اختلافاً كبيراً بين البذور وقد يختلف مستوى الإصابة من أقل من 1 في المائة إلى 100 في المائة. وهذا يجعل من الصعب جداً التوصية بحجم عينة ومعدل استكثار معينين (EUPHRESKO, 2010). وبالنسبة لصنف *S. lycopersicum*، استخدمت معدلات استكثار من 100 – 1000 لاختبار منفرد. ويعتمد معدل الاستكثار على طريقة الاختبار المستخدم وينبغي التحقق من صحته.

ويمكن أن تزرع بذور البطاطا في وسط إنماء (كالمسامد العضوي) في صوانٍ وتختبر الشتلات/النباتات بطريقة غير مدمرة باستخدام الإجراء ذاته الموصوف للنباتات التي تنمو في دفيئات زجاجية (EPPO, 2006).

2-3 الكشف البيولوجي

سيتيح إلقاء نباتات *S. lycopersicum* (أصناف Rutgers أو MoneyMaker أو Sheyenne) الكشف عن كثير من الفيروودات ولكن ليس كلها (مثلاً، ليست البندورة البندورة (الطماطم) (الطماطم) مضيفاً لـ *Iresine viroid 1* من مجموعة pospiviroid (IrVd-1؛ Spieler, 1996؛ Verhoeven وآخرون، 2010)) ويوفر أدلة بصرية على الأمراض. غير أنه قد لا تكتشف بعض المستخلصات بسبب انعدام الأعراض. وعلاوة على ذلك، قد لا تكون الأعراض تشخيصية لفيروود درنة البطاطا المغزلية. وقد تتطلب الفهرسة البيولوجية قدراً كبيراً من مساحة الدفيئة الزجاجية، وقد يتطلب لاستكمال الاختبار عدة أسابيع أو أكثر. ولم ينجز أي عمل لمقارنة حساسية هذه الطريقة بحساسية طرق أخرى موصوفة في هذا البروتوكول، فإذا كانت أقل حساسية من الطرق الجزيئية، فإنها قد تكون أقل ملاءمة لاختبار البذور. غير أن من الممكن أن يضخم الفيروود في الفهرسة البيولوجية إلى مستوى يتيح الكشف عنه بطرق أخرى.

يطحن 200–500 ملليغرام تقريباً من أنسجة الورق أو الجذر أو الدرنة في كمية صغيرة تبلغ 0.1 ميليمولار من دارئ تلقح الفوسفات (تكفي نسبة تمييع 1:1) الذي يحتوي على كاربورندم (400 مش). ويتكون دارئ الفوسفات (بدرجة حموضة 7.4) بجمع 80.2 ملليغرام من 1 ميليمولار $M K_2HPO_4$ مع 19.8 ملليغرام من 1 ميليمولار $M KH_2PO_4$ وتعديل الحجم بماء مقطر ليبلغ 1 لتر.

تُلغح نباتات البندورة البندورة (الطماطم) (الطماطم) غير الناضجة التي تنتشر فيها ورقة أو ورقتان مكتملتان. ويُغمس باللقاح إصبع في قفاز أو برعم قطن أو مسحة قطن ويحكّ سطح الورقة برفق باللقاح ثم تشطف الأوراق فوراً بالماء حتى يزال الكربورندم. وتنمى النباتات بحيث تكون درجات الحرارة اليومية بين 24 و39 درجة مئوية في فترة ضوئية تبلغ 14 ساعة تستكمل بإضاءة بخار الصوديوم بحوالي $650 \mu E/m^2/s$ (Grassmick & Slack, 1985). وقد تؤدي درجات الحرارة الأقل والإضاءة الأقل إلى تقليل حساسية الفحص. وتفحص النباتات أسبوعياً للتحقق من وجود أعراض لمدة تصل إلى ستة أسابيع بعد التلقيح. وتشمل أعراض فيروود درنة البطاطا المغزلية التقرم والالتواء إلى أسفل والتغصن والالتواء الجانبي للوريقات الجديدة وإخضرار وإحمرار وهشاشة ونخر الأوراق.

سيتم اختبار أحيائي على البندورة-البندورة (الطماطم) للكشف عن العديد من فيروسات pospiviroid (باستثناء IrVd-1، انظر أعلاه)؛ ولذا ينبغي إجراء تفاعل البلمرة التسلسلي باستخدام إنزيم النسخ العكسي (RT-PCR) على الحمض النووي المستخرج من نباتات مؤشرة للأعراض وينبغي تسلسل منتج تفاعل البلمرة التسلسلي لتحديد الهوية.

3-3 الكشف الجزيئي

1-3-3 إعداد العينات

ميكروبلانتس ومواد أوراق وجذور - استخدمت بذجاج أجران ومدقات أو خلاطات (مثل Homex 6 (Bioreba)) بأكياس استخراج (Bioreba) لطحن المواد. وقد تُيسر التجانس إضافة كمية صغيرة من المياه أو من محلول دارئ (تعتمد تركيبته على الطريقة المستخدمة في استخراج الحمض النووي) أو تجميد العينة (مثلاً، في نيتروجين سائل). وقد تم التحقق من صحة الإجراء التالي (أنظر الجدول 1) بالتضافر مع استخراج الحمض النووي باستخدام الطريقة 2 للاستخراج الخريزي المغناطيسي وفحص GenPospi بـ RT-PCR في الوقت الحقيقي الموصوف في هذا الملحق. وتجري مجانسة حوالي 1 غرام من الأنسجة في كيس استخراج باستخدام خلاط Homex 6 (Bioreba) مع 3.5 ملليغرام (بتراوح 1:2-1:5 (وزن/حجم)) GH زائد محلول دارئ (6 ميليمولار غوانيدين هيدروكلوريد؛ و0.2 ميليمولار أسيتات الصوديوم؛ على درجة حموضة 5.2؛ و25 ميليمولار إيثيل ثنائي أمين حمض الخليك الرباعي (EDTA)؛ و2.5 في المائة (بولي فينيل البيروليدون-10)، وبعد ذلك تحضن العينات لمدة 10 دقائق على 65 درجة مئوية بـ 850 دورة في الدقيقة في ثيرموميكس (خلط حراري) (أو بالهز (ويقلب الأنبوب ثلاث مرات) وبتردد مركزي إضافي لمدة دقيقتين بقوة 16 000 غرامجي قبل استخراج الحمض النووي.

درنات *S. tuberosum* - تتجانس نوى الدرنة تماماً بالماء أو بمحلول دارئ (يعتمد تكوينه على الطريقة التي استخدمت لاستخراج الحمض النووي؛ 1 ملليغرام لكل غرام نواة الدرنة). وقد استخدمت بذجاج طاحونة مثل Homex 6 مع أكياس استخراج. وييسر التجانس تجميد النوى (مثلاً على -20 درجة مئوية) قبل إضافة المياه أو المحلول الدارئ.

البذور - للأعداد الصغيرة من البذور (أقل من 100)، يمكن استخدام آلة Lyser Tissue (مثلاً، Retsch (TissueLyser (Qiagen)). وللأعداد الأكبر من البذور، يمكن استخدام خلاط مجداف (مثل MiniMix (Interscience)) أو خلاط (مثل Homex 6) بكمية دنيا من محلول دارئ (تعتمد تركيبته على الطريقة المستخدمة لاستخراج الحمض النووي). ويمكن أيضاً سحق البذور بمطرقة Bertolini وآخرون، (b2014) أو باستخدام جرن ومدقة. وقد لا تكون الطريقة الأخيرة عملية للاستخدام الروتيني، إذ أن من الصعب ضبط التلوث. بدلاً من ذلك، يمكن استخدام النيتروجين السائل لتجميد العينة، لتطحن بعد ذلك في مطحنة خليوية (يمكن استخدام هذه الطريقة لأنواع الأنسجة الأخرى).

لقد تم التحقق من صحة الإجراء التالي (أنظر الجدول 1) بالتضافر في تركيبة مع استخراج الحمض النووي باستخدام الطريقة 2 للاستخراج الخريزي المغناطيسي وفحص RT-PCR في الوقت الحقيقي لـ Boonham وآخرون (2014) الوارد في هذا الملحق. وتنقع كل عينة من العينات الفرعية الثلاث المكونة من 1 000 بذرة في 20 ملليغرام من GH زائد محلول دارئ في 100 ملليغرام BagPage (Interscience) لمدة 30-60 دقيقة على درجة حرارة الغرفة،

وتجانس لمدة 90 ثانية باستخدام BagMixer (Interscience) وتحضن (أو تهز أو تُفصل بالتردد المركزي كما للميكروبلانتس ومواد الورق والجذور) قبل استخراج الحمض النووي.

دمغ الأذسجة و/أو هر سها- تضغط عنيقات الورق أو البراعم المنفصلة على أغشية نايلون. ويمكن عمل عدة دمغات أو مسحقات متداخلة جزئياً من أوراق و/أو براعم منفصلة مختلفة على حوالي 0.5 سم² من غشاء نايلون وفقاً لـ (Bertolini وآخريـن (2014، 2008)، ويُقص الغشاء المحتوي على العينة المثبتة ويدخل في أنبوب صغير. وتنبغي مناولة العينة المثبتة بملاقظ نظيفة. ويمكن خزن عينات الأذسجة الدموغة على درجة حرارة الغرفة في بيئة جافة ومعتمة لمدة ثلاثة أشهر على الأقل. ولا استخراج الحمض النووي الربيبي من الغشاء، يضاف 100 ميكرولتـر من دارئ الجليكاين لكل أنبوب صغير يحتوي على عينة ثابتة تدور بعد ذلك وتوضع على جليد حتى تضخيم تفاعل البلمرة التسلسلي (PCR).

3-3-2 استخراج الحمض النووي

يمكن استخدام مجموعة واسعة من طرق استخراج الحمض النووي تتراوح من أطقم الأدوات التجارية إلى طرق منشورة في مجلات علمية. وقد استخدمت أطقم أدوات ودوائى وإجراءات استخراج الحمض النووي التالية بنجاح للكشف عن فيروس دنة البطاطا المغزلية.

أدوات تجارية- يمكن استخدام أطقم أدوات تجارية من مثل RNeasy (Qiagen) و MasterPure (Epicentre) و Sbeadex (LGC Genomics) وفقاً لإرشادات الشركة المصنعة. وقد قيّمت أطقم أدوات RNeasy لاستخراج الحمض النووي لفيروس دنة البطاطا المغزلية من مصفوفات مختلفة كجزء من مشروع EUPHRESKO للكشف عن فيروسات Pospiviroids ووبائياتها (EUPHRESKO, 2010).

الطريقة الواردة في Mackenzie وآخريـن (1997)- تجانس الأنسجة النباتية (1:10 (وزن/حجم)) في محلول دارئ بسيط (4 ميليمولار غوانيديـن إيزوثيو سيانات، و 0.2 ميليمولار أسيتات الصوديوم، و 25 ميليمولار إيثيل ثنائي أمين حمض الخليك الرباعي (EDTA)، و 2.5 في المائة بولي فينيل البيروليدون-40 (وزن/حجم)، و 1 في المائة 2-مركابتوإيثانول (حجم/حجم) يضاف قبل الاستخدام مباشرة). ثم يخلط مليلتر واحد من المزيج المتجانس مع 100 ميكرولتـر من 20 في المائة من ساركوسيل (وزن/حجم) ويُحضن على 70 درجة مئوية لمدة 10 دقائق في خلاط حراري (ثيرموميكسيـن)، مع ارتجاج بقوة 1 200 دورة في الدقيقة، ويمكن استخدام هذه الطريقة لاستخراج حمض نووي ذي جودة من مجموعة واسعة من الأنواع النباتية.

طريقة باستخدام دارئ إيثيل ثنائي أمين حمض الخليك الرباعي (EDTA)- تمكن مجانسة الأنسجة النباتية (1:4 (وزن/حجم)) في محلول دارئ بسيط (50 ميليمولار هيدروكسيد الصوديوم، و 2.5 ميليمولار إيثيل ثنائي أمين حمض الخليك الرباعي (EDTA)) ثم تُحضن (على حوالي 25 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة أو تفصل بالتردد المركزي بقوة 12 000 **غرام جي** على 4 درجات مئوية لمدة 15 دقيقة). ويمكن أن تستخدم المواد الطافية بعد ذلك تبعاً لمستوى الحساسية المطلوب، إما مباشرة لـ RT-PCR (أقل حساسية) أو تُلطح على غشاء النيترو-سليولوز وتزال باستخدام الماء المقطر المعقم (أكثر حساسية) (Singh وآخرون، 2006). وعلى الرغم من أن تركيز الفيروس أقل لطريقة EDTA مما لطرق الاستخراج الأخرى المذكورة، لا ينبغي أن يكون ذلك عاملاً محددًا عندما تستخدم الطريقة

مع RT-PCR أو فحص ديجوكسيجينين. وقد استخدمت هذه الطريقة مع صنفَي *S. tuberosum* و *S. lycopersicum* ومع مجموعة من أنواع نباتات الزينة.

الفينول-كلوروفورم واستخراج بولي إيثيلين غليكول ذي الخطوتين-تجانس الأنسجة النباتية ويُستخرج الحمض النووي كما وصفت منظمة حماية النباتات في أوروبا ومنطقة البحر الأبيض المتوسط EPPO (2004). وقد استخدمت لمجموعة واسعة من أنواع النباتات وأنواع الأنسجة (مثل أوراق ودرنات البطاطا) هذه الطريقة إلى جانب ارتحال كهربائي هلامي بولي أكريلاميدي عكسي (PAGE) أو فحص ديجوكسيجينين-الحمض النووي والطريقتين التقليديتين RT-PCR الموصوفتين في هذا البروتوكول التشخيصي.

استخراج بروميد تريميثيلامونيوم سيتيل-تجانس الأنسجة النباتية ويُستخرج الحمض النووي كما وصفت منظمة حماية النباتات في أوروبا ومنطقة البحر الأبيض المتوسط EPPO (2004). وقد استخدمت هذه الطريقة مع RT-PCR في الوقت الحقيقي لمجموعة واسعة من الأنواع والأنسجة النباتية (مثل أوراق وبذور البندورة؛ EUPHRESKO، 2010).

طريقة الاستخراج الخريزي المغناطيسي 1- يستند الإجراء الآلي التالي إلى استخدام معالج الجسيمات المغناطيسي KingFisher mL Magnetic Particle Processor (Thermo Scientific). ومع التعديل المناسب للأحجام، يمكن استخدام نماذج KingFisher أخرى.

لكل عينة، يُنقع على الأقل 200 ملغم نسيج ورقي أو درني أو ما يصل إلى 100 بذرة، وبعد ذلك مباشرة يضاف دارئ استخراج بنسبة 1 غرام من نسيج ورقي أو درني إلى 10 ملغم دارئ و1 غرام بذور إلى 20 ميليلتر دارئ. ويستمر النقع حتى يتم الحصول على محلول خليوي صافي بحد أدنى من حطام الأنسجة السليمة. ويتكون دارئ الاستخراج من 200 ميكروتر من 8.39 في المائة (وزن/حجم) من محلول تيتراصوديوم بيروفسفات (درجة حموضة 10-10.9) و100 ميكروتر من مستحلب B مضاد الرغوة (Sigma) مضاف إلى 9.8 ميليلتر من دارئ محلول غوانيديين. ويتكون هذا المحلول من 764.2 غرام هيدروكلوريد و7.4 غرام مجفف ثنائي إيثيل ثنائي أمين حمض الخليك الرباعي و30 غرام بولي فينيل البيروليدون-10 و5.25 غرام مونوهيدرات حامض الستريك و0.3 غرام سترات الصوديوم الثلاثية و5 ملليغرام تريتون X-100 و50 ملليغرام إيثانول مطلق و750 ملليغرام ماء.

يصبّ حوالي 2 ملليغرام من المحلول في أنبوب طرد مركزي جديد ويفصل بالطرد المركزي بقوة 5 000 **غرام جي** لمدة دقيقة واحدة. ويُزال ميليلتر واحد من المادة الطافية ويوضع في الأنبوب الأول (أ) من رف KingFisher mL، ويضاف له 50 ميكروتر من حبات الخرز المغناطيسية الدوارة لمحلول MAP (أ) (Invitek). ويضاف لأنبوب (ب) 1 ملليغرام من المحلول الدارئ غوانيديين ولأنابيب (ج) و(د) 70 في المائة من الإيثانول ولأنبوب هـ 200 ميكروتر ماء أو 1 × المحلول الدارئ Tris-EDTA.

ويوضع شريط الأنبوب في KingFisher mL ويدار البرنامج (أنظر الشكل 2). وبعد 20 دقيقة، يوقف الجهاز لإتاحة خطوة تسخين. يوضع شريط الأنبوب في فرن على 65-70 درجة مئوية لمدة 5 دقائق ثم يعاد إلى KingFisher mL، ويستأنف البرنامج. وفي نماذج KingFisher أخرى، قد تكون خطوة تدفئة أو خطوة حجز للتبخر جزءاً من النموذج. وعند الانتهاء، تنقل الأحماض النووية المزالة إلى أنبوب طرد مركزي صغير.

وقد استخدمت هذه الطريقة لمجموعة واسعة من أنواع النباتات وكذلك لدورات البطاطا وبذور البندورة. واستخدمت مع فحصين من فحوصات RT-PCR في الوقت الحقيقي موصوفين في هذا الملحق (أنظر القسمين 3-3-3-4 و 3-3-4-2). ويمكن في طريقة الاستخراج الخرزى المغناطيسي 1 توقع عتبات أعلى بعدة دورات مما في طرق الاستخراج الأخرى الموصوفة في هذا الملحق، لكن زيادة الإنتاجية من العينات التي يمكن تحقيقها بهذه الطريقة يجعلها طريقة استخراج قيمة (Roehorst وآخرون 2005).

Plate layout Default: Plate type = KingFisher tubestrip 1000 µl; Plate change message = Change Default
A: volume = 1000, name = Cell lysate or tissue homogenate; volume = 50, name = Magnetic particles;
B: volume = 1000, name = Washing buffer 1 (Various); **C:** volume = 1000, name = Washing buffer 2 (Various); **D:** volume = 1000, name = Washing buffer 3 (Various); **E:** volume = 200, name = Elution buffer (Various)
STEPS COLLECT BEADS Step parameters: Name = Collect Beads; Well = A, Default; Beginning of step: Premix = No; Collect parameters: Collect count = 1. **BIND** Step parameters: Name = Lysing, Well = A, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 1min 0s, speed = Fast dual mix; Bind parameters: Bind time = 4min 0s, speed = Slow; End of step: Collect beads = No. **BIND** Step parameters: Name = Lysing, Well = A, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 1min 0s, speed = Fast dual mix Bind; Bind parameters: Bind time = 4min 0s, speed = Slow; End of step: Collect beads = No. **BIND** Step parameters: Name = Lysing, Well = A, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 1min 0s, speed = Fast dual mix; Bind parameters: Bind time = 4min 0s, speed = Slow; End of step: Collect beads = Yes, count = 4. **WASH** Step parameters: Name = Washing, Well = B, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 0s, speed = Fast; Wash parameters: Wash time = 3min 0s, speed = Fast dual mix; End of step: Collect beads = Yes, count = 3. **WASH** Step parameters: Name = Washing, Well = C, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 0s, speed = Fast; Wash parameters: Wash time = 3min 0s, speed = Fast dual mix; End of step: Collect beads = Yes, count = 3. **WASH** Step parameters; Name = Washing, Well = D, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 0s, speed = Fast; Wash parameters: Wash time = 3min 0s, speed = Fast dual mix; End of step: Collect beads = Yes, count = 3. **ELUTION** Step parameters; Name = Elution, Well = E, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 10s, speed = Fast; Elution parameters: Elution time = 20s, speed = Bottom very fast; Pause parameters: Pause for manual handling = Yes, message = Heating, Post mix time = 30s, speed = Bottom very fast; Remove beads: Remove beads = Yes, collect count = 4, disposal well = Dear

الشكل 2- (Thermo Scientific) KingFisher mL Magnetic Particle Processor

طريقة الاستخراج الخرزى المغناطيسي 2. يستخدم هذا الإجراء الآلي أطقم أدوات Sbeadex maxi plant kit (LGC Genomics) مع KingFisher 96 system (Thermo Scientific). وينبغي اتباع تعليمات الشركة الصانعة باستثناء استخدام GH زائد محلول دارى بدلاً من المحلول الدارى PN المتضمن في أطقم الأدوات هذه.

3-3-3 طرق جزيئية عامة للكشف عن فيروسات الـ **pospiviroid**

1-3-3-3 ارتحال كهربائي هلامي بولي أكريلاميدي عكسي **R-PAGE**

أوصى بـ R-PAGE كطريقة للكشف عن فيروسات درنة البطاطا المغزلية الذي يصيب أوراق صنف *S. tuberosum* (EPPO, 2004)، لكنه كان أقل حساسية (كان حد الكشف 87 893 بيكوغرام من فيروسات درنة البطاطا المغزلية) من طرق جزيئية أخرى قيّمت (حد الكشف 17 بيكوغرام) في اختبار حلقة مع فحص DIG-labelled cRNA، وخطوتان

من طريقة RT-PCR التقليدية باستخدام بادئات Shamloul وآخرين (1997) وطريقة Boonham وآخرين (2004) في الوقت الحقيقي (Jeffries & James, 2005)، أنظر أيضا الجدول 1).

كما تم استخدام هذه الطريقة بنجاح مع نباتات مضيئة أخرى؛ مثلاً، صنف *C. annuum* و صنف *S. tuberosum* (درنات) و صنف *S. lycopersicum* وبسبب انخفاض حساسيتها، ينبغي التحقق من استكثار العينات.

وتكشف طريقة R-PAGE جميع فيروسات pospiviroids المعروفة؛ لذا، لتحديد هوية فيروس درنة البطاطا المغزلية ينبغي استخدام طريقة RT-PCR على الحمض النووي متبوعة بتسلسل منتج تفاعل البلمرة التسلسلي PCR.

2-3-3-3 التهجين بفحص DIG-labelled cRNA

أوصي بهذه الطريقة للكشف عن فيروس درنة البطاطا المغزلية الذي يصيب أوراق صنف *S. tuberosum* (EPPO, 2004)، وكانت حساسية الكشف عن هذا الفيروس في أوراق صنف *S. tuberosum* 17 بيكوغرام على الأقل (Jeffries & James, 2005). وقد اختبر مضيئات أخريات بنجاح، بما في ذلك *Petunia spp.*، *S. jasminoides*، و *S. lycopersicum*، و *S. tuberosum* (درنات).

يستند الفحص المستخدم على مونومر كامل الطول لفيروس درنة البطاطا المغزلية تنتجه Agdia, Inc.⁹ (فئة رقم DLP 08000/0001). وينبغي أن يستخدم هذا الفحص وفقاً لإرشادات الشركة المصنعة، أو الرجوع إلى EPPO (2004) للاطلاع على تفاصيل الطريقة. وبالإضافة إلى داري Ames (EPPO, 2004)، يمكن استخدام البولي إيثيلين غليكول وروادئ استخراج أخرى لاستخراج الحمض النووي.

وتكشف هذه الطريقة جميع فيروسات pospiviroids المعروفة؛ لذا، لتحديد هوية فيروس درنة البطاطا المغزلية ينبغي استخدام طريقة RT-PCR على الحمض النووي، متبوعة بتسلسل منتج تفاعل البلمرة التسلسلي PCR.

3-3-3-3 تفاعل البلمرة التسلسلي باستخدام إنزيم الذسخ العكسي RT-PCR التقليدية باستخدام بادئات Verhoeven وآخرين (2004)

البادئات المستخدمة في هذا الفحص هي بادئات Vid و Posp1 — Verhoeven وآخرين (2004). وتكشف بادئات Posp1 ما يلي: CEVd و *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) و IrVd-1 و MPVd و PCFVd و فيروس درنة البطاطا المغزلية PSTVd و TASVd و TCDVd و TPMVd، بينما تكشف بادئة Vid: TCDVd PSTVd، إضافة إلى CLVd. ويتيح استخدام بادئي Vid و Posp1 في تفاعلين منفصلين الكشف عن جميع فيروسات pospiviroids. غير أن عدم تطابق التسلسل في نقاط حرجة في موقع هدف البادئة قد يحول دون الكشف عن بعض خلاصات الفيروسات من نوع pospiviroid (مثلاً، لم تكشف باستخدام هذه البادئات خلاصة من CLVd؛ Steyer وآخرون، 2010) ويتطلب الكشف عن هذه الخلاصات بادئات إضافية. بينت دراسات بالمحاكاة (*In silico*) أن خلاصات فيروس درنة البطاطا المغزلية التالية قد لا يمكن الكشف عنها بسبب عدم تطابق البادئة — التسلسل في مواقع حرجة: بادئات Posp1: EU879925، EU273604، EF459697، AJ007489، AY372398، AY372394،

EU273604² وبادئات Pospi1 أكثر حساسية من بادئات Vid؛ E00278، DQ308555، FM998551؛ وبادئات Vid في الكشف عن فيروس درنة البطاطا المغزلية.

البادئات

Pospi1-FW: 5'-GGG ATC CCC GGG GAA AC-3' (nucleotide (nt) 86-102)
Pospi1-RE: 5'-AGC TTC AGT TGT (T/A)TC CAC CGG GT-3' (nt 283-261)
Vid-FW: 5'-TTC CTC GGA ACT AAA CTC GTG-3' (nt 355-16)
Vid-RE: 5'-CCA ACT GCG GTT CCA AGG G-3' (nt 354-336)

ظروف التفاعل

ثبت أن أطقم أدوات RT-PCR ذات الخطوة الواحدة (Qiagen) يمكن الركون إليها للكشف عن PSTVd وCEVd وCLVd و(CSVd) وTASVd وTCDVd في عينات مفردة (EUPHRESKO, 2010) ولمجموعة فيروسات pospiviroids الأخرى المدرجة في بداية هذا القسم. وليس من الضروري استخدام محلول-Q الذي يرد وصفه في EUPHRESKO (2010). وعلى الرغم من أنه يمكن استخدام أطقم أدوات RT-PCR مختلفة وظروف تفاعل مختلفة، ينبغي أن-التحقق منها للتأكد من أنها صالحة للغرض المقصود وهو الكشف عن جميع فيروسات pospiviroids ذات الصلة.

يضاف ميكرو لتران اثنان من مزيج المعايرة إلى 23 ميكرو لتر من المزيج الرئيسي الذي يتألف من 1.0 ميكرو لتر من كل من البادئات الأمامية والعكسية (10 ميكرو متر)، 5 ميكرو لتر من 5 X رادى RT-PCR ذي الخطوة الواحدة، 10 ميكرو لتر من مزيج أنزيم RT-PCR ذي الخطوة الواحدة و1.0 ميكرو لتر dNTPs (10 ميليمولار لكل dNTPs) و14 ميكرو لتر ماء. ويكون برنامج التدوير الحراري على النحو التالي: 50 درجة مئوية لمدة 30 دقيقة؛ 95 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة؛ 35 دورة من 94 درجة مئوية لمدة 30 ثانية، 62 درجة مئوية لمدة 60 ثانية و72 درجة مئوية لمدة 60 ثانية؛ وخطوة تمديد نهائية من 72 درجة مئوية لمدة 7 دقائق.

الارتحال الكهربائي الهلامي

بعد RT-PCR، ينبغي تحليل منتجات تفاعل البلمرة التسلسلي PCR (حوالي 197 زوج قاعدي (bp) و 359 زوج قاعدي لبادئي Pospi1 و Vid على التوالي) بواسطة الارتحال الكهربائي الهلامي (2) في المائة من هلام الأجاروز) وتسلسل تفاعل البلمرة المتسلسل من الحجم الصحيح لتحديد أنواع الفيروس. في الممارسة، أدى تسلسل منتج 197 زوج قاعدي دائماً إلى تحديد مماثل لتسلسل الجينوم الكامل للفيروس.

3-3-3-4 تقنية RT-PCR في الوقت الحقيقي باستخدام فحص (Botermans وآخرون، 2013)

يستخدم فحص GenPospi تقنية TaqMan RT-PCR في الوقت الحقيقي للكشف عن جميع الأنواع المعروفة من جنس *Pospiviroid*. وهو يتألف من تفاعلين إثنين يعملان بالتوازي: يستهدف الأول (مزيج التفاعل 1) جميع الـ *Pospiviroid* ما عدا CLVd (Botermans وآخرون، 2013)؛ أما الثاني (مزيج التفاعل 2) فيستهدف على وجه التحديد CLVd (Monger وآخرون، 2010). ولرصد استخراج الحمض النووي، يستخدم ضبط داخلي *nad5* يستند إلى البادئات التي وضعها Menzel وآخرون (2002) لتضخيم الحمض النووي من ميتوكوندريا الذببات (جينة نازع الهيدروجين

NADH dehydrogenase). وقد بين التحقق من الطريقة (انظر الجدول 1) على أوراق البندورة-البندورة (الطماطم) أن فحص GenPospi كشف عن خلاصات من جميع أنواع فيروسات Pospiviroid بمعدل إصابة نسبي يصل إلى 0.13 في المائة (أي ما يعادل التخفيف بنسبة 1:770). وكان الفحص محدداً إذ لم تلاحظ أية تفاعلات تتقاطع مع فيروسات أو فيروسات أخرى أو مع حمض نووي آخر من النباتات المضيفة. وقد كانت نسبة قابلية التكرار وقابلية الإعادة 100 في المائة وبدا الفحص متيناً في مقارنات بين المختبرات. وثبت أن فحص GenPospi مناسب لفرز أنواع فيروسات pospiviroid على نطاق واسع. وينبغي التحقق من هذا الفحص لمصفوفات غير أوراق البندورة-البندورة (الطماطم).

البادئات

TCR-F 1-1: 5'-TTC CTG TGG TTC ACA CCT GAC C-3' (Botermans *et al.*, 2013)
TCR-F 1-3: 5'-CCT GTG GTG CTC ACC TGA CC-3' (Botermans *et al.*, 2013)
TCR-F 1-4: 5'-CCT GTG GTG CAC TCC TGA CC-3' (Botermans *et al.*, 2013)
TCR-F PCFVd: 5'-TGG TGC CTC CCC CGA A-3' (Botermans *et al.*, 2013)
TCR-F IrVd: 5'-AAT GGT TGC ACC CCT GAC C-3' (Botermans *et al.*, 2013)
TR-R1: 5'-GGA AGG GTG AAA ACC CTG TTT-3' (Botermans *et al.*, 2013)
TR-R CEVd: 5'-AGG AAG GAG ACG AGC TCC TGT T-3' (Botermans *et al.*, 2013)
TR-R6: 5'-GAA AGG AAG GAT GAA AAT CCT GTT TC-3' (Botermans *et al.*, 2013)
CLVd-F: 5'-GGT TCA CAC CTG ACC CTG CAG-3' (Monger *et al.*, 2010)
CLVd-F2: 5'-AAA CTC GTG GTT CCT GTG GTT-3' (Monger *et al.*, 2010)
CLVd-R: 5'-CGC TCG GTC TGA GTT GCC-3' (Monger *et al.*, 2010)
nad5-F: 5'-GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT-3' (Menzel *et al.*, 2002)
nad5-R: 5'-CTC CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA-3' (Menzel *et al.*, 2002)

المسبارات

pUCCR: 6FAM-5'-CCG GGG AAA CCT GGA-3'-MGB (Botermans *et al.*, 2013)
CLVd-P: 6FAM-5'-AGC GGT CTC AGG AGC CCC GG-3'-BHQ1 (Monger *et al.*, 2010)
nad5-P: VICr-5'-AGG ATC CGC ATA GCC CTC GAT TTA TGT G-3'-BHQ1 (Botermans *et al.*, 2013)

يستند مزيج التفاعلين الاثنان إلى أطقم أدوات 1 TaqMan RNA-to-Ct™ (Applied Biosystems)

مزيج التفاعل 1 (جميع فيروسات ال-*pospiviroids* باستثناء *CLVd* + *nad5*)

يتألف مزيج التفاعل من 12.5 ميكرو لتر من 2 × مزيج TaqMan RT-PCR، و 0.6 ميكرو لتر من 1 × مزيج أنزيم TaqMan RT، و 0.75 ميكرو لتر (10 ميكرو مولار) من البادئات الأمامية (-TCR-F 1-1, TCR-F 1-3, TCR-F 1-4) و 4، TCR-F IrVd, TCR-F PCFVd and *nad5*-F) والبادئات العكسية (-TR-R1, TR-R CEVd, TR-R6 and *nad5*-R) (تركيز نهائي 0.3 ميكرو مولار لكل منها)، و 0.25 ميكرو لتر من 10 ميكرو مولار من مسبار TaqMan pUCCR (تركيز نهائي 0.1 ميكرو مولار) و 0.5 ميكرو لتر من 10 ميكرو مولار من مسبار TaqMan *nad5*-P (تركيز نهائي 0.2

ميكرومولار). يضاف ماء صالح للفحص الجزيئي و2 ميكرو لتر من مزيج معايرة الحمض النووي الريبسي RNA للتوصل إلى حجم نهائي يبلغ 25 ميكرو لتر.

مزيج التفاعل 2 (nad5 + CLVd)

يتألف مزيج التفاعل من 12.5 ميكرو لتر من 2 × مزيج TaqMan RT-PCR و0.6 ميكرو لتر من 1 × مزيج أنزيم TaqMan RT، و0.75 ميكرو لتر (10 ميكرومولار) من البادئة الأمامية (CLVd-F وCLVd-F2 وnad5-F) وبادئات عكسية (CLVd-R وnad5-R) (تركيز نهائي 0.3 ميكرومولار لكل منها)، و0.25 ميكرو لتر من 10 ميكرومولار من مسبار TaqMan CLVd-P (تركيز نهائي 0.1 ميكرومولار) و0.5 ميكرو لتر من 10 ميكرومولار من مسبار TaqMan nad5-P (تركيز نهائي 0.2 ميكرومولار). يضاف ماء صالح للفحص الجزيئي و2 ميكرو لتر من مزيج معايرة الحمض النووي الريبسي RNA للتوصل إلى حجم نهائي يبلغ 25 ميكرو لتر.

برنامج التدوير الحراري لكل من مزيجي التفاعل هو: 48 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة، و95 درجة مئوية لمدة 10 دقائق، تليها 40 دورة من (95 درجة مئوية لمدة 15 ثانية و60 درجة مئوية لمدة 1 دقيقة).

لهذه الطريقة، فسّر Botermans وآخرون. (2013) قيم Ct الناتجة التي تقل عن 32 على أنها إيجابية؛ وتلك التي بين 32 و37 على أنها غير حاسمة وتتطلب تأكيداً، وتلك التي لا تقل عن أو تساوي 37 على أنها سلبية. غير أن هذه القيم قد تستبعد مستويات الإصابة المنخفضة في بعض الأنسجة، وينبغي أن تحدد في كل مختبر.

3-3-4 طرق جزيئية ذات خصوصية عالية للكشف عن فيروس درنه البطاطا المغزلية

3-3-4-1 تقنية RT-PCR التقليدية باستخدام بادئات Shamloul وآخرين، (1997)

بادئات RT-PCR المستخدمة في هذا الفحص هي بادئات Shamloul وآخرين، (1997)، التي يصفها أيضاً Buchta وWeidemann (1998). وستكتشف البادئات MPVd وPSTVd وCDVd وTPMVd. وقد أظهرت دراسات بالمحاكاة أن خلاصات فيروس درنه البطاطا المغزلية التالية قد لا تكتشف بسبب عدم تطابق البادئة – التسلسل في نقاط حرجة: AY372394 وDQ308555 وEF459698 للبادئة العكسية. وإذا لم يضحخ الحمض النووي الريبسي باستخدام هذه البادئات، يمكن استخدام بادئات Vid.

البادئات

3H1-F: 5'-ATC CCC GGG GAA ACC TGG AGC GAA C-3' (nt 89-113)

2H1-R: 5'-CCC TGA AGC GCT CCT CCG AG-3' (nt 88-69)

الطريقة 1 (RT-PCR الخطوة الواحدة Superscript مع Taq Platinum® (Invitrogen))

لكل تفاعل، يضاف 1 ميكرو لتر من مزيج معايرة الحمض النووي الريبسي إلى 24 ميكرو لتر من المزيج الرئيسي المكون من 1.0 ميكرو لتر من كل من البادئات الأمامية والعكسية (15 ميكرومتر)، 12.5 ميكرو لتر من 2 X رادئ تفاعل، و0.5 ميكرو لتر من RT/Platinum Taq و7.6 ميكرو لتر ماء. ويكون برنامج التدوير الحراري على النحو التالي: 43 درجة مئوية لمدة 30 دقيقة؛ 95 درجة مئوية لمدة 2-دقيقتين (2) دقيقة؛ وبعد ذلك 10 دورات من 94 درجة مئوية

لمدة 30 ثانية، 64 درجة مئوية لمدة 90 ثانية و72 درجة مئوية لمدة 45 ثانية؛ وخطوة تمديد نهائية من 72 درجة مئوية لمدة 10 دقائق و20 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة.

الطريقة 2 (RT-PCR من خطوتين)

باستخدام RT-PCR من خطوتين، تكون حساسية الكشف عن فيروس درنة البطاطا المغزلية في صنف S. tuberosum 17 بيكوغرام – وهذا هو أقل تركيز اختبر، لكن الحساسية التي تحققت تفاوتت بين المختبرات، ويكتشف معظم المختبرات 89 بيكوغرام على الأقل (Jeffries & James, 2005). أنظر EPPO (2004) لوصف الطريقة 2.

بعد RT-PCR، تحلل منتجات تفاعل البلمرة التسلسلي PCR (حوالي 360 زوج قاعدي) بواسطة الارتحال الكهربائي الهلامي كما وصف وتسلسل أمبليكونات amplicons تفاعل البلمرة المتسلسل من الحجم الصحيح لتحديد أنواع الفيروس.

وقد استخدم فحص ضبط داخلي ببادئات nad 5 (Menzel وآخرون، 2002) مع هذه الطريقة في تفاعل بسيط (منفصل) (Seigner وآخرون، 2008). وتستخدم البادئات عند تركيز نهائي يبلغ 0.2 ميكرومتر. ويتشكل الأمبليكون من 181 زوجاً قاعدياً.

nad5 sense: 5'-GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGTT-3' (nt 968-987 and 1836-1838)

nad5 antisense: 5'-CTCCAGTCACCAACATTGGCATAA-3' (nt 1973-1995)

2-4-3-3 RT-PCR في الوقت الحقيقي باستخدام بادئات Boonham وآخرين (2004)

البادئات المستخدمة والمسبار المستخدم لهذا الفحص يصفهما Boonham وآخرون (2004). غير أن هذا الفحص كفحوص الوقت الحقيقي المنشورة كلها لا يحدد فيروس درنة البطاطا المغزلية على وجه التحديد. فإذا تم الحصول على نتيجة إيجابية عن طريق RT-PCR في الوقت الحقيقي، ينبغي تحديد هوية الفيروس باستخدام RT-PCR وتسلسل تقليديين.

ويكتشف هذا الفحص PSTVd وMPVd وTCDVd وPMVd. وكانت الحساسية للكشف عن فيروس درنة البطاطا المغزلية في صنف S. tuberosum باستخدام طريقة CTAB للاستخراج 17 بيكوغرام، وكان ذلك أدنى تركيز اختبر (Jeffries & James, 2005). وعن طريق اختبار منوعات فيروس درنة البطاطا المغزلية والأوليغونوكليوتايدات الاصطناعية، ثبت أن هذا الفحص يكتشف جميع منوعات التسلسل المعروفة. وحددت هذه من دراسات بالمحاكاة على أنها حالات عدم تطابق البادئة-التسلسل مع إمكانية الفشل في الكشف (Boonham وآخرون 2005). غير أن الخلاصتين المتشعبتين VIR-06/7L و VIR-06/10L اللتين وصفهما مؤخرًا Owens وآخرون (2009) قد لا يكتشفا بسبب إدخال قاعدة (قواعد) إضافية في موقع رابط المسبار (W. Monger، اتصال شخصي، 2011).¹

¹ اعتباراً من 1 مارس/آذار 2010 (W. Monger, personal communication, 2011)

البادئات

PSTV-231-F: 5'-GCC CCC TTT GCGCTG T-3' (nt 232–247)

PSTV-296-R: 5'-AAG CGG TTC TCG GGA GCT T-3' (nt 297–279)

PSTV-251T: FAM-5'-CAG TTG TTT CCA CCG GGT AGTAGC CGA-3' TAMRA (nt 278–252)

تضخم بادئات الضبط الداخلي COX جينة السيتوكروم أوكسيداز 1 الموجودة في ميتوكوندريا النبات (Weller وآخرون، 2000).

COX-F: 5'-CGT GCG ATT CCA GAT TAT CCA-3'

COX-R: 5'-CAA CTA CGG ATA TAT AAG RRC CRR ACC TG-3'

COXsol-1511T: VIC-5'-AGG GCA TTC CAT CCA GCG TAA GCA-3' TAMRA

مزيج التفاعل هو لصفحة من 96 بئرا (96 well-) وتعديل لطريقة EPPO (EPPO, 2004) إذ أنه يتضمن تفاعلاً مزدوجاً للكشف عن PSTVd و COX وتفاعلاً بسيطاً للكشف عن PSTVd (Roehorst وآخرون، 2005).

يتألف مزيج التفاعل من 13.75 ميكرو لتر ماء من 2 × مزيج (Applied Biosystems) Master Mix، و 1.25 ميكرو لتر من 40 × MultiScribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems) و 1.5 ميكرو لتر من كل من بادئتي PSTV-231-F و PSTV-296-R (10 ميكرومولار) ومسبار 1.0 ميكرو لتر PSTV-251T (5 ميكرومولار). ويقسم مزيج التفاعل هذا بالتساوي إلى حجمين من 22 ميكرو لتر، أ و ب. ويضاف ميكرو لتران اثنان من الماء إلى كل من أ و ب ويضاف 0.75 ميكرو لتر من كل من بادئة COX (10 ميكرومولار) و 0.5 ميكرو لتر من مسبار COXsol-1511T (5 ميكرومولار). ويضاف ميكرو لتر واحد من الحمض النووي الريبي المستهدف إلى كل من أ و ب لعمل مزيج تفاعل نهائي من 25 ميكرو لتر لكل بئر من صفحة التفاعل. ويكشف بمزيج تفاعل أ عن PSTV، ويكشف بمزيج تفاعل ب عن PSTV و COX.

برنامج التدوير الحراري هو: 48 درجة مئوية لمدة 30 دقيقة و 95 درجة مئوية لمدة 2 دقيقتين و 40 دورة من 95 درجة مئوية لمدة 15 ثانية و 60 درجة مئوية لمدة 1 دقيقة.

3-3-4-3 RT-PCR في الوقت الحقيقي (Plant Print Diagnostics kit)

البادئات المستخدمة والمسبار المستخدم لهذا الفحص يصفهما Boonham وآخرون (2004) وهي متوفرة كقطع أدوات من Plant Print Diagnostics (Ref. PSTVd/100) ويكشف الفحص CLVd و PSTVd و TCDVd، ويفترض الكشف عن جميع خلاصات PSTVd الـ 327 الموجودة في بنك الجينات GenBank لأن دراسات المحاكاة أظهرت أن جميع حالات عدم التطابق بين البادئة والتسلسل كانت في نقاط غير حرجة (N. Duran-Vila، اتصال شخصي، 2014).

ترد بيانات التحقق في الجدول 1.

البادئات

PSTVd-F: 5'-CCT TGG AAC CGC AGT TGG T-3' (nt 339–357)

PSTVd-R: 5'-TTT CCC CGG GGA TCC C-3' (nt 87–102)

PSTVdP: FAM-5'-TCCTGTGGTTCACACCTGACCTCCTGA-3' TAMRA (nt 19–45)

يحتوي كوكتيل تفاعل البلمرة التسلسلي بادئات مجففة بالتبريد ومسباراً (مزودة في طقم الأدوات) يمكن أن يضاف إليها أي مزيج RT-PCR رئيسي تجاري. ولكل تفاعل، يضاف مزيج معايرة حمض نووي ريبوي من 3 ميكرو لتر إلى 9 ميكرو لتر من كوكتيل تفاعل البلمرة التسلسلي المكون من 6 ميكرو لتر تجاري $2 \times$ دارئ، و0.6 من كل من بادئة أمامية وعكسية (10 ميكرومولار) و0.36 ميكرو لتر مسبار TaqMan (5 ميكرومولار) و0.5 ميكرو لتر من $25 \times$ مزيج إنزيم RT-PCR و0.94 ميكرو لتر ماء لعمل حجم تفاعل نهائي من 12 ميكرو لتر.

برنامج التدوير الحراري هو: 45 درجة مئوية لمدة 10 دقائق، و95 درجة مئوية لمدة 10 دقائق و40 دورة من (95 درجة مئوية لمدة 15 ثانية و60 درجة مئوية لمدة 1 دقيقة).

لهذه الطريقة، تعتبر العينة إيجابية إذ-عندما تأنتجت قيمة Ct أقل من 40 وكانت الضوابط السلبية كلها سلبية (لا تضخيم). وتعتبر العينة سلبية عندما تنتج إذ-أنتجت قيمة Ct لا تقل عن 40 وتظهر الضوابط الإيجابية تضخيماً.

3-4 ضوابط للاختبارات الجزيئية

كي تعتبر نتيجة الاختبار موثوقة، من الضروري وجود ضوابط مناسبة تعتمد على نوع الاختبار المستخدم ومستوى الجزم المطلوب لكل من سلسلة استخلاص وتضخيم للحمض النووي للآفة المستهدفة أو الحمض النووي المستهدف. وبالنسبة لتفاعل البلمرة التسلسلي في الوقت الحقيقي، فإن الضابط الإيجابي للحمض النووي والضابط الداخلي والضابط السلبي للتضخيم (دون مزيج معايرة) هي ضوابط الحد الأدنى التي ينبغي أن تستخدم.

الضبط الإيجابي للحمض النووي. يستخدم هذا الضبط لرصد كفاءة الفحص (باستثناء الاستخراج). ويمكن استخدام حمض نووي معد مسبقاً (مخزن) أو حمض نووي كامل الجينوم مضخم أو ضابط مصطنع (منتج مستندسخ من تفاعل بلمرة تسلسلي) ولّد باستخدام نفس زوج البادئة نفس المستخدم للكشف. ويمكن أيضاً استخدام ضابط لحدّ الكشف (غير إلزامي).

الضبط الداخلي لتفاعل البلمرة التسلسلي التقليدي وفي الوقت الحقيقي، ينبغي إدراج جينة تدبير شؤون التركيب الوراثي للنبات (HKG) مثل COX أو NAD في بروتوكول التفاعل لاستبعاد احتمال ظهور حالات سلبية زائفة بسبب فشل استخراج الحمض النووي أو تدهوره أو وجود مثبطات لتفاعل البلمرة التسلسلي. ويفضل استخدام بادئات الضبط الداخلي في تفاعل مزدوج مع بادئات pospiviroid/PST. ولكن بما أنه قد يكون من الصعب تحقيق ذلك دون التقليل من حساسية الاختبار للفيروس، يوصى، حيثما كان ذلك عملياً، بعمل تفاعل ثنائي لبادئات pospiviroid/PST مع بادئات HKG وكذلك تفاعل بسيط مع بادئات pospiviroid/PST فقط.

لقد ثبت أن شظية خماسي نازع الهيدروجين NADH لميتوكوندريا nad5 مؤشر موثوق لأداء إجراء الاستخراج لخطوة النسخ العكسي لتفاعل البلمرة التسلسلي التقليدي (Menzel وآخرون، 2002). وقد اختبر مقابل العديد من الأنواع النباتية، بما في ذلك *S. tuberosum* وأنواع *Solanum* الأخرى (*S. dulcamara*، *S. bonariensis*، *S. jasminoides*، *S. nigrum*، *S. pseudocapsicum*، *S. rantonnetii*، *S. sisymbriifolium*) و *Acnistus* و *Brugmansia spp* و *Atropa belladonna* و *arborescens S* و *Capsicum spp* و *Cestrum spp* و *Lochroma*

وتشمل بادهات *nad5* إنترنول ولذا فإنها لن تضخم من الحمض النووي. ويضخم الحمض النووي الريبسي بعد إزالة الإنترنول.

على الرغم من استخدام أن-COX كضابط داخلي في هذا البروتوكول، فإن بادئات COX ستضخم الحمض النووي الريبسي والحمض النووي. ولذا فإنه يوفر مؤشراً على نوعية الحمض النووي المضخم بدلاً من الحمض النووي الريبسي وحده ولا يضبط خطوة النسخ العكسي.

وعندما لا يذكر الضابط الداخلي COX أو *nad5* في وصف طريقة لتفاعل البلمرة التسلسلي، ينبغي على المختبر اختيار ضابط داخلي والتحقق من صحته.

ضابط التضخيم السلبي (دون ضابط مزيج معايرة). هذا الضابط ضروري لتفاعل البلمرة التسلسلي التقليدي وفي الوقت الحقيقي لاستبعاد الإيجابيات الزائفة الناجمة عن التلوث أثناء إعداد مزيج التفاعل. وفي مرحلة التضخيم، يضاف ماء تفاعل البلمرة التسلسلي الذي كان قد استعمل لإعداد مزيج التفاعل.

ضابط الاستخراج الإيجابي يستخدم هذا الضابط لضمان أن يكون الحمض النووي المستخرج من الفيروود المستهدف متوفراً بكمية ونوعية كافية لتفاعل البلمرة التسلسلي وأن يكون الهدف قابلاً للاكتشاف. ويستخرج الحمض النووي من الأنسجة المصابة للمضيف أو من الأنسجة النباتية السليمة الممزوجة بالفيروود.

وينبغي أن يبلغ الضابط الإيجابي تقريباً نسبة واحد إلى عشرة من كمية نسيج الأوراق المستخدمة لكل نبتة لاستخراج الحمض النووي الريبسي. وإذا جرى استكثار العينات، ينبغي عندئذ تعديل كمية الضابط الإيجابي تبعاً لذلك (مثلاً 10 حصص من عينة من 20 ملغ استكثرت لاستخراج الحمض النووي الريبسي، 2 ملغ ورقة مصابة + 198 ملغ نسيج بطاطا سليمة). وإذا لم يكشف عن ذلك، ينبغي تكرار الاختبار أو خفض معدل الاستكثار حتى يتحقق كشف يمكن الركون إليه.

وبالنسبة للنسخ العكسي لتفاعل البلمرة التسلسلي، يجب إيلاء عناية لتجنب التلوث بالرداذ من الضابط الإيجابي أو من العينات الإيجابية. وينبغي أن يسلسل الضابط الإيجابي المستخدم في المختبر كي تمكن مقارنة السلسلة بسهولة مع السلاسل التي يتم الحصول عليها من أمبليكونات تفاعل البلمرة التسلسلي ذات الحجم الصحيح. وبدلاً من ذلك، يمكن تشكيل ضوابط إيجابية مصطنعة بواسطة سلسلة معروفة يمكن بدورها أن تقارن بأمبليكونات تفاعل البلمرة التسلسلي ذات الحجم الصحيح.

ضابط الاستخراج السلبي يستخدم هذا الضابط لرصد التلوث خلال استخراج الحمض النووي و/أو التفاعل المتبادل مع النسيج المضيف. ويتكون الضابط من حمض نووي يستخرج من نسيج مضيف غير مصاب ضخم لاحقاً. ويستحسن إدراج ضوابط متعددة حين يتوقع أن تكون هناك أعداد كبيرة من العينات الإيجابية.

3-5 تفسير نتائج من تفاعل البلمرة التسلسلي التقليدي وفي الوقت الحقيقي

3-5-1 تفاعل البلمرة التسلسلي التقليدي

لا يعتبر تفاعل البلمرة التسلسلي الخاص بالفيروس صالحاً إلا:

- عندما ينتج ضابط الحمض النووي الإيجابي الحجم الصحيح للفيروس.
 - عندما لا ينتج أي أمبليكون من الحجم الصحيح في ضبط الاستخراج السلبي وضبط التضخيم السلبي.
- وفي حال استخدمت بادئات الضوابط الداخلية COX و/أو *nad5* أيضاً، فإنه ينبغي عندئذ أن ينتج الضابط السلبي (أي النسيج النباتي السليم) (في حال استخدامه) وضابط الحمض النووي الإيجابي، وكل عينة من عينات الاختبار شريطاً يبلغ 181 زوجاً قاعدياً. ويشير عجز العينات عن تحقيق تضخيم مع بادئات الضوابط الداخلية، مثلاً، إلى أن استخراج الحمض النووي قد فشل أو أن الحمض النووي لم يدرج في مزيج التفاعل، أو أن خطوة النسخ العكسي قد فشلت، أو أن هناك مركبات مثبّطة لتفاعل البلمرة التسلسلي في خلاصة الحمض النووي أو أن الحمض النووي قد فسد.

وتعتبر العينة إيجابية إذا أنتجت أمبليكون من الحجم الصحيح. ولتحديد نوع الفيروس يجب أن يسلسل منتج تفاعل البلمرة التسلسلي.

3-5-2 تفاعل البلمرة التسلسلي في الوقت الحقيقي

لا يعتبر تفاعل البلمرة التسلسلي صالحاً إلا:

- عندما ينتج ضابط الحمض النووي الإيجابي منحنى تضخيم مع البادئات الخاصة بالفيروس.
 - عندما لا يشاهد أي منحنى تضخيم (أي عندما تكون قيمة Ct 40 أو أي قيمة أخرى يحددها المختبر بعد التحقق منها) مع ضابط الاستخراج السلبي وضابط التضخيم السلبي.
- وفي حال استخدمت بادئات الضوابط الداخلية COX و *nad5* أيضاً، فإنه ينبغي عندئذ أن ينتج الضابط السلبي (في حال استخدامه) وضابط الحمض النووي الإيجابي وكل عينة من عينات الاختبار منحنى تضخيم. ويشير عجز العينات عن إنتاج منحنى تضخيم مع بادئات الضوابط الداخلية، مثلاً، أن استخراج الحمض النووي قد فشل أو أن الحمض النووي لم يدرج في مزيج التفاعل أو أن هناك مركبات مثبّطة لتفاعل البلمرة التسلسلي في الحمض النووي المستخرج أو أن الحمض النووي قد فسد.
- وتعتبر العينة إيجابية إذا أنتجت منحنى تضخيم نموذجياً. وترد معلومات محددة عن قيمة Ct الفاصلة لطريقتين في القسمين 3-3-3 و 3-3-4.

4- تحديد الهوية

ينبغي تحديد فيروس درنة البطاطا المغزلية عن طريق سلسلة المنتج الذي يحصل عليه من تفاعل البلمرة التسلسلي بالنسخ العكسي التقليدي باستخدام بادئات Shamloul أو Vid الموصفة في القسمين 3-3-3 و 3-3-3-1 على التوالي، وعن طريق البحث عن تطابق التسلسل في قواعد بيانات التسلسل الجيني العامة. وقد تتعين الاستعانة

بمختصين للمساعدة على تحديد الهوية. إذا ضحّم منتج تفاعل البلمرة التسلسلي تضخيماً ضعيفاً أو كانت العينة مصابة بأكثر فيروس واحد من نوع pospiviroid، فإن استنساخ منتج تفاعل البلمرة التسلسلي قد يكون فعالاً في تمكين الحصول على تسلسل معين.

وينبغي أن يعاد اختبار عينة إيجابية كشف عنها بواسطة تفاعل البلمرة التسلسلي بالنسخ العكسي في الوقت الحقيقي، إذا لزم الأمر للتأكيد، باستخدام تفاعل البلمرة التسلسلي بالنسخ العكسي التقليدي لتمكين تسلسل المنتج وتحديد هويته. وسيعطي تسلسل منتج تفاعل البلمرة التسلسلي في الوقت الحقيقي مباشرة معلومات عن التسلسل لا تتيح تحديداً يمكن الركون إليه. فهو سيُتيح تحديد المنتج كفيروس، ولكنه لن يَسمح بتحديد الأنواع أو التمييز عن الضابطين الإيجابي المستخدم. ومع ذلك، وبسبب تزايد حساسية تفاعل البلمرة التسلسلي بالنسخ العكسي في الوقت الحقيقي، قد لا يمكن الحصول على منتج بتفاعل البلمرة التسلسلي بالنسخ العكسي التقليدي. وفي حالة استكثار العينات، فإن إعادة اختبار عينات فرعية أصغر قد يزيد من موثوقية التضخيم بواسطة تفاعل البلمرة التسلسلي بالنسخ العكسي التقليدي. وبدلاً من ذلك، يمكن تلقيح العينات في نباتات بندورة لزيادة تركيز الفيروس إلى مستويات يمكن الكشف عنها بتفاعل البلمرة التسلسلي بالنسخ العكسي التقليدي. لكن هذا النهج لم يقيم، وإذا كانت النتائج غير حاسمة قد يتطلب ذلك إعادة أخذ العينات وتكرار الاختبار.

1-4 التسلسل وتحليل التسلسل

ينبغي ألا يقوم بتحليل التسلسل إلا شخص **فائز خبيرة**. وإذا لم تتوفر في المؤسسة نفسها مرافق للتسلسل، ينبغي استخدام شركة تجارية. وستحدد الشركة احتياجاتها لتسلسل منتجات تفاعل البلمرة التسلسلي. وسيُرسَل المنتج المنقى (والبادئات الأمامية والعكسية إذا طلبت) إلى الشركة لإجراء التسلسل. وقد يُقوم بعض الشركات أيضاً بتنقية المنتج إذا لزم الأمر.

إذا جرت عملية التسلسل في المؤسسة نفسها، ينبغي ترسيخ الطرق واتباعها. وتنبغي سلسلة كل خيط من منتج تفاعل البلمرة التسلسلي باستخدام بادئات تفاعل البلمرة التسلسلي كبادئات للتسلسل. وينبغي تجميع خيطي الحمض النووي التسلسلين بشكل مستقل (من استخدام البادئات الأمامية والعكسية) في خيط واحد، وتأكيد قاعدة (هوية) كل موقع نكليوتيد. ومن المفضل أن تستخدم للتحليل مجمعات (مثل برمجيات Geneious أو CLC Genomics Workbench أو Lasergene) تستخدم ملفات تتبع electropherograms. وينبغي ترميز الاختلاف بين الخيطين على أنه قاعدة غامضة في التسلسل الذي جرى تعديله. ويمكن بعد ذلك مقارنة التسلسل التوافقي المعدل (الذي يحدد عن طريق مقارنة الخيطين) مع تسلسلات pospiviroid الموجودة في قاعدة بيانات مناسبة. وفي حالة وجود عدوى مختلطة، قد لا يكون المخطط الكروماتي chromatogram مقروءاً وعندئذ ينبغي استنساخ منتج تفاعل البلمرة التسلسلي وسلسلته.

ويقتضي الأمر مواءمة متأنية للـ pospiviroids عندما يمكن أن تكون اختلافات قليلة في بضعة نيوكليوتيدات حاسمة في تحديد الفيروس كافة مسيطر عليها أو غير مسيطر عليها. وإجراء تحديد أولي لفيروس درنة البطاطا المغزلية، يمكن الإبقاء على تسلسلات البادئات (Shamloul أو Vid) في تسلسل توافقي لأن هذه البادئات تقع في أكثر المناطق المصانة في جينوم الفيروس ومن غير المحتمل أن تؤثر في تحديد الهوية. وإذا ما شوهدت متدليات—أبناها البوليميريز أثناء التمدد تنبغي إزالتها. ولتحديد الهوية، من المستحسن استخدام تسلسل توافقي معدّل يبدأ من موقع 1 من جينوم الفيروس

لمقارنته مع إحدى قواعد بيانات النيوكليوتايد الشاملة. وينبغي أن يتم البحث في قاعدة بيانات بنك الجينات [GenBank](#) للنيوكليوتايد غير الزائد على الموقع الإلكتروني للمركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا البيولوجية أو الأرشيف الأوروبي للنيوكليوتايد على الموقع الإلكتروني لمختبر البيولوجيا الجزئية الأوروبي باستخدام أداة البحث Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). وبالإضافة إلى ذلك، ينبغي أن يركز تحديد الهوية على تجميع عنقودي محدد لنتائج (BLAST) في العرض الذي يتخذ شكل شجرة (تصل النقاط المتجاورة).

ووفقاً للجنة الدولية لتصنيف الفيروسات، المعيار الرئيسي لتحديد هوية الأنواع هو أكثر من 90 في المائة من هوية التسلسل (Owens وآخرون، 2011). ومع ذلك، إذا أظهر التسلسل الذي جرى الحصول عليه هوية تقرب من 90 في المائة، ينبغي إدراج معلومات إضافية، مثل الخصائص البيولوجية. ويبحث فريق الدراسة المعني بالفيروس في اللجنة الدولية لتصنيف الفيروسات حالياً تصنيف الفيروسات ومعايير تحديد الفواصل بين الأنواع.

وعندما تكون دقة التسلسل المطلوبة 100 في المائة، مثلاً، عندما سيقدم تسلسل معين إلى قاعدة بيانات أو عند الاشتباه بأنواع فيروس جديدة، من الضروري إجراء تفاعل البلمرة التسلسلي ثانية ليغطي منطقة تسلسلات البادئات المستخدمة لتفاعل البلمرة التسلسلي الأول وكذلك أية قواعد غامضة من تفاعل البلمرة التسلسلي الأول. وقد يكون مطلوباً لهذا الغرض تصميم مجموعة جديدة من البادئات من التسلسل الأولي، ولكن قد يكون كافياً استخدام زوجي بادئات شمول و Vid.

5- السجلات

ينبغي الاحتفاظ بالسجلات والبراهين حسبما هو مبين في المعيار الدولي رقم 27 (بروتوكولات تشخيص الآفات الخاضعة للوائح)

وفي الحالات التي قد تتأثر فيها أطراف متعاقدة أخرى بنتائج التشخيص، وبخاصة ولا سيما في حالة عدم الامتثال وفي حالة ظهور فيروس درنة البطاطا المغزلية في منطقة معينة للمرة الأولى، ينبغي الاحتفاظ بالمواد الإضافية التالية ب تضمن تتبعاً كاملاً:

- ينبغي الاحتفاظ بالعينة الأصلية (إذا ما زالت متوفرة) مجمدة عند درجة حرارة 80 درجة مئوية تحت الصفر أو مجمدة جافاً وتحفظ في درجة حرارة الغرفة.
- ينبغي، عند الاقتضاء، الاحتفاظ باستخراجات الحمض النووي الريبي عند درجة حرارة 80 درجة مئوية تحت الصفر
- ينبغي، عند الاقتضاء، الاحتفاظ بنتائج واتج تضخيم تفاعل البلمرة التسلسلي بالنسخ العكسي عند درجة حرارة 20 مئوية تحت الصفر إلى 80 مئوية تحت الصفر.
- ملفات تتبع تسلسل الحمض النووي المستخدمة لتوليد تسلسل توافقي لتحديد هوية العينات. وإذا تبين أن الخلاصة خصائص جزيئية أو بيولوجية مختلفة عن الخلاصات المسجلة سابقاً، ينبغي أن يقدم إلى منشأة أرشيف لآفات النباتات معترف بها (مثل، Q-bank) قاعدة البيانات الشاملة عن الحجر الصحي لآفات وأمراض النباتات) و DSMZ (معهد لايبنيغ الألماني لجمع الكائنات المجهرية ومنابت الخلايا).

وإذا كان هناك دليل على أن أي من الاختبارات المذكورة أخفق في الكشف عن خلاصة معينة لفيروس درنة الطاطا المغزلية، ينبغي إرسال تفاصيل الخلاصة (يفضل رقم دخول بنك الجينات) إلى أمانة الاتفاقية الدولية لحماية النباتات.

6- جهات الاتصال للحصول على معلومات إضافية

يمكن الحصول على مزيد من المعلومات عن هذا البروتوكول من:

Science and Advice for Scottish Agriculture (SASA), Roddinglaw Road, Edinburgh EH12 9FJ, Scotland, UK (Dr C.J. Jeffries, e-mail: colin.jeffries@sasa.gsi.gov.uk).

National Plant Protection Organization, PO Box 9102, 6700 HC Wageningen, The Netherlands (Dr J.W. Roenhorst, e-mail: j.w.roenhorst@nvwa.nl; Dr J.Th.J. Verhoeven, e-mail: j.th.j.verhoeven@nvwa.nl).

Department of Environment and Primary Industries, Biosciences Research Division, AgriBio, 5 Ring Road, La Trobe University, Bundoora, Victoria 3083, Australia (Dr B. Rodoni, e-mail: brendan.rodoni@depi.vic.gov.au).

Canadian Food Inspection Agency (CFIA), Charlottetown Laboratory, 93 Mt Edward Road, Charlottetown, PE, C1A 5T1, Canada (Dr H. Xu, e-mail: huimin.xu@inspection.gc.ca).

Conselleria de Agricultura de la Generalitat Valenciana, Centro de Proteccion Vegetal y Biotecnologia (IVIA), 46113 Moncada (Valencia), Spain (Dr N. Duran-Vila, e-mail: duran_nur@gva.es).

USDA-APHIS, Plant Germplasm Quarantine Program BARC-E, BLD 580, Powder Mill Road, Beltsville, MD 20705, USA (Dr J.A. Abad, e-mail: jorge.a.abad@aphis.usda.gov).

Laboratorios Biológicos, Dirección General de Servicios Agrícolas, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Millán 4703, Montevideo, Uruguay (Dr A. Etchevers, e-mail: anitaetchevers@hotmail.com).

ويمكن أن تقدم المنظمات القطرية الخاصة بوقاية النباتات أو المنظمات الإقليمية لوقاية النباتات أو الأجهزة التابعة لهيئة تدابير الصحة النباتية طلباً لإعادة النظر في بروتوكول التشخيص من خلال أمانة الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات (ippc@fao.org) التي ستقوم بدورها بإحالتها إلى الفريق الفني المعني بوضع بروتوكولات التشخيص.

7- شكر وتقدير

حرر المسودة الأولى لهذا البروتوكول J. Jeffries (العلوم والمشورة للزراعة الاسكتلندية SASA، المملكة المتحدة) و J.W. Roenhorst (المنظمة الوطنية لحماية النبات، هولندا) و B. Rodoni (وزارة البيئة والصناعات الأولية، أستراليا)، و H. Xu (الوكالة الكندية للتفتيش على الأغذية (CFIA)، كندا) و N. Duran-Vila (معهد بلنسية للبحوث الزراعية (IVIA)، إسبانيا) و J.A. Abad (دائرة التفتيش المعنية بشؤون الصحة الحيوانية والنباتية التابعة لوزارة الزراعة في الولايات المتحدة USDA-APHIS) (أنظر القسم 6 لتفاصيل الاتصال). وبالإضافة إلى ذلك، شارك J.Th.J. Verhoeven (المنظمة الوطنية لحماية النبات، هولندا) مشاركة كبيرة في صياغة هذا البروتوكول.

ويتوجب توجيه الشكر إلى S.L. Nielsen (الدانمرك) و L. Seigner و S. Winter و M. Wassenegger (ألمانيا)؛ و H. Koenraadt (هولندا)؛ و A. Fox و T. James و W. Monger و V. Mulholland (المملكة المتحدة) لتعليقاتهم المفيدة أثناء وضع هذا البروتوكول.

8- المراجع

- يشير المعيار الحالي أيضا إلى معايير دولية أخرى لتدابير الصحة النباتية ، وهي متاحة على البوابة الدولية للصحة النباتية <https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/ispm>
- Badilla, R., Hammond, R. & Rivera, C.** 1999. First report of Potato spindle tuber viroid in Costa Rica. *Plant Disease*, 83: 1072.
- Bertolini, E., Cambra, M., Serra, P., López, M.M., Lopes, S., Durán-Vila, N., Ayres, J., Bové, J.** 2010. Procedimiento directo de detección específica de los viroides *Potato spindle tuber viroid* y *Citrus exocortis viroid* mediante dianas inmovilizadas y RT-PCR a tiempo real y kit para su detección. Spanish Patent N° 2.387.172.
- Bertolini, E., Felipe, R.T.A., Sauer, A.V., Lopes, S., Arilla, A., Vidal, E., Mourão-Filho, F.A.A., Nunes, W.M.C., Bové, J.M., López, M.M. & Cambra, M.** 2014a. Tissue-print and squash real-time polymerase chain reaction for direct detection of 'Candidatus Liberibacter' species in citrus plants and psyllid vectors. *Plant Pathology*, doi:10.1111/ppa.12197.
- Bertolini, E., Moreno, A., Capote, N., Olmos, A., De Luis, A., Vidal, E., Pérez-Panadés, J. & Cambra, M.** 2008. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant tissues and single aphids by real-time PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 120: 177–188.
- Bertolini, E., Teresani, G.R., Loiseau, M., Tanaka, F.A.O., Barbé, S., Martínez, C., Gentit, P., López, M.M. & Cambra, M.** 2014b. Transmission of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' in carrot seeds. *Plant Pathology*, doi:10.1111/ppa.12245.
- Boonham, N., Fisher, T. & Mumford R.A.** 2005. Investigating the specificity of real-time PCR assays using synthetic oligonucleotides. *Journal of Virological Methods*, 130: 30–35.
- Boonham, N., González, L., Lilia Peralta, E., Blockley, A., Walsh, K., Barker, I. & Mumford, R.A.** 2004. Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd). *Journal of Virological Methods*, 116: 139–146.
- Botermans, M., van de Vossen, B.T.L.H., Verhoeven, J.Th.J., Roenhorst, J.W., Hooftman, M., Dekter, R. & Meekes, E.T.M.** 2013. Development and validation of a real-time RT-PCR assay for generic detection of pospiviroids. *Journal of Virological Methods*, 187: 43–50.
- CABI.** n.d. Invasive species compendium. Datasheet for Potato spindle tuber viroid. Walingford, UK, CABI. Available at <http://www.cabi.org/isc/datasheet/43659> (last accessed 18 August 2014).
- De Bokx, J.A. & Pirone, P.G.** 1981. Transmission of Potato spindle tuber viroid by aphids. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 87: 31–34.
- EPPO** (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2004. Diagnostic protocols for regulated pests. PM 7/33. Potato spindle tuber viroid. *EPPO Bulletin*.
- EPPO** (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2006. Phytosanitary procedures. PM 3/21 (2). Post-entry quarantine for potato. *EPPO Bulletin*, 34: 443–454.
- EPPO.** (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2014. PM 7/98 (2) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. *EPPO Bulletin*, 44: 117–147.
- EPPO/CABI** (I.M. Smith, D.G. McNamara, P.R. Scott & M. Holderness, eds). 1997. *Quarantine pests for Europe*, 2nd edn. Wallingford, UK, CABI. 1425 pp.
- EUPHRESO.** 2010. *Detection and epidemiology of pospiviroids (DEP)*. EUPHRESO Final Report. York, UK, EUPHRESO. Available at <http://www.euphresco.org/downloadFile.cfm?id=536> (last accessed 15 May 2013).
- Fernow, K.H.** 1967. Tomato as a test plant for detecting mild strains of potato spindle tuber virus. *Phytopathology*, 57: 1347–1352.
- Fernow, K.H., Peterson, L.C. & Plaisted, R.L.** 1970. Spindle tuber virus in seeds and pollen of infected plants. *American Potato Journal*, 47: 75–80.

- Galindo, J., Smith, D.R. & Diener, T.O.** 1982. Etiology of planta macho, a viroid disease of tomato. *Phytopathology*, 72: 49–54.
- Grasmick, M.E. & Slack, S.A.** 1985. Symptom expression enhanced and low concentrations of potato spindle tuber viroid amplified in tomato with high light intensity and temperature. *Plant Disease*, 69: 49–51.
- Hadidi, A., Mazyad, H.M., Madkour, M.A. & Bar-Joseph, M.** 2003. Viroids in the Middle East. In A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles & J. Semancik, eds. *Viroids*, pp. 275–278. Melbourne, Australia, CSIRO Publishing. 392 pp.
- Hailstones, D.L., Tesoriero, L.A., Terras, M.A. & Dephoff, C.** 2003. Detection and eradication of *Potato spindle tuber viroid* in tomatoes in commercial production in New South Wales, Australia. *Australasian Plant Pathology*, 32: 317–318.
- Hammond, R.W. & Owens, R.A.** 2006. Viroids: New and continuing risks for horticultural and agricultural crops. APSnet. St Paul, MN, American Phytopathological Society (APS). Available at <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/Viroids.aspx> (last accessed 20 December 2012).
- Jeffries, C.** 1998. *Technical guidelines for the safe movement of germplasm*. No.19. Potato. Rome, FAO/IPGRI. 177 pp.
- Jeffries, C. & James, C.** 2005. Development of an EU protocol for the detection and diagnosis of *Potato spindle tuber pospiviroid*. *EPPO Bulletin*, 35:125–132.
- Kryczynski, S., Paduch-cichal, E. & Skrzeczkowski, L.J.** 1988. Transmission of three viroids by seed and pollen of tomato plants. *Journal of Phytopathology*, 121: 51–57.
- Lebas, B.S.M., Clover, G.R.G., Ochoa-Corona, F.M., Elliott, D.R., Tang, Z. & Alexander, B.J.R.** 2005. Distribution of *Potato spindle tuber viroid* in New Zealand glasshouse crops of capsicum and tomato. *Australian Plant Pathology*, 34: 129–133.
- Ling, K.S. & Bledsoe, M.E.** 2009. First report of Mexican papita viroid infecting greenhouse tomato in Canada. *Plant Disease*, 93: 839.
- Mackenzie, D.J., McLean, M.A., Mukerji, S. & Green, M.** 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 81: 222–226.
- Mackie, A.E., McKirdy, S.J., Rodoni, B. & Kumar, S.** 2002. Potato spindle tuber viroid eradicated in Western Australia. *Australasian Plant Pathology*, 31: 311–312.
- Martinez-Soriano, J.P., Galindo-Alonso, J., Maroon, C.J.M., Yucel, I., Smith, D.R. & Diener, T.O.** 1996. Mexican papita viroid: Putative ancestor of crop viroids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 9397–9401.
- Menzel, W., Jelkmann, W. & Maiss, E.** 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with co-amplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods*, 99: 81–92.
- Mishra, M.D., Hammond, R.W., Owens, R.A., Smith, D.R. & Diener, T.O.** 1991. Indian bunchy top disease of tomato plants is caused by a distinct strain of citrus exocortis viroid. *Journal of General Virology*, 72: 1781–1785.
- Monger, W., Tomlinson, J., Boonham, N., Virscek Marn, M., Mavric Plesko, I., Molinero-Demilly, V., Tassus, X., Meekes, E., Toonen, M. & Papayiannis, L.** 2010. Development and inter-laboratory evaluation of real-time PCR assays for the detection of pospiviroids. *Journal of Virological Methods*, 169: 207–210.
- Murcia, N., Serra, P., Olmos, A. & Duran-Vila, N.** 2009. A novel hybridization approach for detection of citrus viroids. *Molecular and Cellular Probes*, 23: 95–102.
- NAK** (Dutch General Inspection Service). 2011. *Pospiviroid: Detection of pospiviroid in potato leaves by real-time RT-PCR*. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (last accessed 18 August 2014).

- Naktuinbouw.** 2012a. *Pospiviroid: Real-time RT-PCR (TaqMan RT-PCR) for pospiviroids in leaves of horticultural crops.* European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (last accessed 18 August 2014).
- Naktuinbouw.** 2012b. *Potato spindle tuber viroid: Real-time RT-PCR (TaqMan RT-PCR) for Potato spindle tuber viroid (PSTVd) and/or Tomato chlorotic dwarf viroid (TCDVd) in leaf material of horticultural crops.* European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (last accessed 18 August 2014).
- Naktuinbouw.** 2012c. *Potato spindle tuber viroid: Detection of Potato spindle tuber viroid (PSTVd) and/or Tomato chlorotic dwarf viroid (TCDVd) in tomato seed with real-time RT-PCR (TaqMan RT-PCR).* European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (last accessed 18 August 2014).
- Navarro B, Silletti M.R, Trisciuzzi, V.N. & Di Serio, F.** 2009. Characterization of Potato spindle tuber viroid infecting tomato in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 91: 723–726.
- Nielsen, S.L., Enkegaard, A., Nicolaisen, M., Kryger, P., Marn, M.V., Pleško, I.M., Kahrer, A. & Gottsberger, R.A.** 2012. No transmission of Potato spindle tuber viroid shown in experiments with thrips (*Frankliniella occidentalis*, *Thrips tabaci*), honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus terrestris*). *European Journal of Plant Pathology*, 133: 505–509.
- NPPO-NL** (National Reference Centre, National Plant Protection Organization). 2013a. *Pospiviroid: Validation of a conventional RT-PCR assay for detection and preliminary identification of pospiviroids (expect [sic] CLVd) by Pospil-FW/Pospil-RE.* European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (last accessed 18 August 2014).
- NPPO-NL** (National Reference Centre, National Plant Protection Organization). 2013b. *Potato spindle tuber viroid: Validation of a conventional RT-PCR assay for detection and identification of CLVd, PSTVd and TCDVd using primers Vid-FW/RE (Verhoeven et al. 2004).* European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (last accessed 18 August 2014).
- NPPO-NL** (National Reference Centre, National Plant Protection Organization). 2013c. *Potato spindle tuber viroid: Validation of a conventional RT-PCR test for detection and identification of PSTVd, TCDVd, MPVd and TPMVd using primers 2H1/3H1 described by Shamoul et al. (1997).* European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (last accessed 18 August 2014).
- NPPO-NL** (National Reference Centre, National Plant Protection Organization). 2013d. *Pospiviroid: Development and validation of a real-time RT-PCR assay for generic detection of Pospiviroids.* European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (last accessed 18 August 2014).
- Owens, R. A., Flores, R., Di Serio, F., Li, S.-F., Pallas, V., Randles, J. W., Sano, T. & Vidalakis, G.** 2011. Viroids. In A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens & E. J. Lefkowitz, eds. *Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 1221–1234. London, Elsevier Academic Press. 1259 pp.

- Owens, R.A., Girsova, N.V., Kromina, K.A., Lee, I.M., Mozhaeva, K.A. & Kastalyeva, T.B. 2009. Russian isolates of *Potato spindle tuber viroid* exhibit low sequence diversity. *Plant Disease*, 93: 752–759.
- Querci, M., Owens, R.A., Bartolini, I., Lazarte, V. & Salazar, L.F. 1997. Evidence for heterologous encapsidation of potato spindle tuber viroid in particles of potato leafroll virus. *Journal of General Virology*, 78: 1207–1211.
- Reanwarakorn, K., Klinkong, S. & Porsoongnurn, J. 2011. First report of natural infection of *Pepper chat fruit viroid* in tomato plants in Thailand. *New Disease Reports*, 24: 6.
- Roenhorst, J.W., Jansen, C.C.C., Kox, L.F.F., De Haan, E.G. & Van den Bovenkamp, G.W. 2006. Real-time RT-PCR voor grootschalige toetsing van aardappel op het aardappelspindelknolviroïde. *Gewasbescherming*, 37: 198–203 (in Dutch).
- Roenhorst, J.W., Jansen, C.C.C., Kox, L.F.F., de Haan, E.G., van den Bovenkamp, G.W., Boonham, N., Fisher, T. & Mumford, R.A. 2005. Application of real-time RT-PCR for large-scale testing of potato for Potato spindle tuber pospiviroid. *EPPO Bulletin*, 35: 133–140.
- Salazar, L.F., Querci, M., Bartolini, I. & Lazarte, V. 1995. Aphid transmission of potato spindle tuber viroid assisted by potato leafroll virus. *Fitopatologia*, 30: 56–58.
- Seigner, L., Kappen, M., Huber, C., Kistler, M. & Köhler, D. 2008. First trials for transmission of Potato spindle tuber viroid from ornamental Solanaceae to tomato using RT-PCR and an mRNA based internal positive control for detection. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 115: 97–101.
- Shamloul, A.M., Hadidi, A., Zhu, S.F., Singh, R.P. & Sagredo, B. 1997. Sensitive detection of potato spindle tuber viroid using RT-PCR and identification of a viroid variant naturally infecting pepino plants. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19: 89–96.
- Singh, R.P. 1970. Seed transmission of potato spindle tuber virus in tomato and potato. *American Potato Journal*, 47: 225–227.
- Singh, R.P. 1973. Experimental host range of the potato spindle tuber virus. *American Potato Journal*, 50: 111–123.
- Singh, R.P., Boucher, A. & Somerville, T.H. 1992. Detection of potato spindle tuber viroid in the pollen and various parts of potato plant pollinated with viroid-infected pollen. *Plant Disease*, 76: 951–953.
- Singh, R.P., Dilworth, A.D., Singh, M. & Babcock, K.M. 2006. An alkaline solution simplifies nucleic acid preparation for RT-PCR and infectivity assays of viroids from crude sap and spotted membrane. *Journal of Virological Methods*, 132: 204–211.
- Singh, R.P. & Kurz, J. 1997. RT-PCR analysis of PSTVd aphid transmission in association with PLRV. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19: 418–424.
- Singh, R.P., Nie, X. & Singh, M. 1999. Tomato chlorotic dwarf viroid: An evolutionary link in the origin of pospiviroids. *Journal of General Virology*, 80: 2823–2828.
- Singh, R.P., Ready, K.F.M. & Nie, X. 2003. Viroids on solanaceous species. In A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles & J. Semancik, eds. *Viroids*, pp. 125–133. Melbourne, Australia, CSIRO Publishing. 392 pp.
- Spieker, R. L. 1996. A viroid from *Brunfelsia undulata* closely related to the *Columnnea* latent viroid. *Archives of Virology*, 141: 1823–1832.
- Steyer, S., Olivier, T., Skelton, A., Nixon, T. & Hobden, E. 2010. *Columnnea latent viroid* (CLVd): First report in tomato in France. *Plant Pathology*, 59: 794.
- van Brunshot, S.L., Verhoeven, J.Th.J., Persley, D.M., Geering, A.D.W., Drenth, A. & Thomas, J.E. 2014. An outbreak of Potato spindle tuber viroid in tomato is linked to imported seed. *European Journal of Plant Pathology*, doi:10.1007/s10658-014-0379-8.
- Verhoeven, J.Th.J. 2010. *Identification and epidemiology of pospiviroids*. Wageningen University, Wageningen, Netherlands. (Thesis) Available at <http://edepot.wur.nl/137571> (last accessed 20 December 2012).

- Verhoeven, J.Th.J., Hüner, L., Virscek Marn, M., Mavric Plesko, I. & Roenhorst, J.W.** 2010. Mechanical transmission of Potato spindle tuber viroid between plants of *Brugmansia suaveolens*, *Solanum jasminoides*, potatoes and tomatoes. *European Journal of Plant Pathology*, 128: 417–421.
- Verhoeven, J.Th.J., Jansen, C.C.C., Willemen, T.M., Kox, L.F.F., Owens, R.A. & Roenhorst, J.W.** 2004. Natural infections of tomato by *Citrus exocortis viroid*, *Columnnea latent viroid*, *Potato spindle tuber viroid* and *Tomato chlorotic dwarf viroid*. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 823–831.
- Walter, B.** 1987. Tomato apical stunt. In T.O. Diener, ed. *The viroids*, pp. 321–328. New York, Plenum Press. 365 pp.
- Wassenegger, M., Heimes, S. & Sängler, H.L.** 1994. An infectious viroid RNA replicon evolved from an *in vitro*-generated non-infectious viroid deletion mutant via a complementary deletion *in vivo*. *EMBO Journal*, 13: 6172–6177.
- Weidemann, H.L. & Buchta, U.** 1998. A simple and rapid method for the detection of potato spindle tuber viroid (PSTVd) by RT-PCR. *Potato Research*, 41: 1–8.
- 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.

الجدول 1: نظرة عامة على البيانات للبروتوكولات المستخدمة لاكتشاف فيروس درنه البطاطا المغزلية في أنواع مختلفة من المواد المضيفة وعلى التحقق منها

المصفوفة	حجم العينة	إعداد العينة	استخراج الحمض النووي	طريقة الكشف	ملاحظات بشأن التحقق من الصحة
أوراق بندورة (الطماطم)	1 غرام	3.5 ملليغرام (بتراوح 1:2-5:1 (وزن/حجم)) من GH زائد محلول داريء مع Homex 6 (Bioreba)	تقم أدوات RNeasy Plant Mini (Qiagen) Kit أو طقم أدوات LGC)Sbeadex maxi plant kit (Genomics) على نظام KingFisher 96 (Thermo Scientific)	تفاعل البلمرة التسلسلي باستخدام إنزيم النسخ العكسي (RT-PCR): فحص GenPospi، Botermans وآخرون، 2013	حد الكشف: كشف جميع أنواع فيروسات Pospiviroid حتى معدل إصابة نسبي يصل إلى 0.13 في المائة (أي ما يعادل تخفيفاً قدره 770 مرة). مع يقين بنسبة 99.7 في المائة لتخفيف أوراق البندورة (الطماطم) المصابة في بندورة (طماطم) سليمة الخصوصية التحليلية: متخصصة إلى درجة عالية بأنواع فيروسات pospiviroid الانتقائية: لا تأثير على أوراق البندورة (الطماطم) التكرار وقابلية الإعادة: 100 في المائة (Naktuinbouw, 2012a)؛ Botermans وآخرون، 2013؛ NPPO-NL، (2013d)
أوراق بندورة (الطماطم)	1 غرام	3.5 ملليغرام (بتراوح 1:2-5:1 (وزن/حجم)) من GH زائد محلول داريء مع Homex 6	تقم أدوات RNeasy Plant Mini Kit الحقيقي	RT-PCR في الوقت الحقيقي Boonham وآخرون، (2004)	حد الكشف: الكشف عن ما يصل إلى 10 000 مرة تخفيف أوراق البندورة (الطماطم) المصابة في بندورة سليمة الخصوصية التحليلية: كشف <i>Mexican papita viroid</i> (MPVd)، فيروس درنه البطاطا المغزلية (PSTVd)، <i>Tomato chlorotic dwarf viroid</i> (TCDVd)، <i>Tomato planta macho viroid</i> (TPMVd) (بعض الخصال) الانتقائية: لا تأثير على أوراق البندورة (الطماطم) التكرار وقابلية الإعادة: 100 في المائة (Naktuinbouw, 2012b)

المصفوفة	حجم العينة	إعداد العينة	استخراج الحمض النووي	طريقة الكشف	ملاحظات بشأن التحقق من الصحة
أوراق بندقية (الطماطم)	1 غرام	3.5 ملليغرام (بتراوح 1:2-5:1 (وزن/حجم)) من GH زائد محلول داريء مع Homex 6	طقم أدوات RNeasy Plant Mini Kit	RT-PCR: بادئات Posp1 - أمامي و Posp1- عكسي، Verhoeven وآخرون، (2004)	حد الكشف: الكشف عن جميع أنواع فيروسات Pospiviroid (باستثناء) الأقل 2.5 في المائة تخفيف أوراق البندقية (الطماطم) المصابة في بندقية سليمة الخصوصية التحليلية: الكشف عن Hop latent viroid (HpLVd)، جنس Cocadviroid) وفيروس درنة البطاطا المغزلية الانتقائية: لا تأثير على أوراق البندقية (الطماطم) التكرار وقابلية الإعادة: 100 في المائة (NPPO-NL, 2013a)
أوراق بندقية (الطماطم)	1 غرام	3.5 ملليغرام (بتراوح 1:2-5:1 (وزن/حجم)) من GH زائد محلول داريء مع Homex 6	طقم أدوات RNeasy Plant Mini Kit	RT-PCR: بادئات Vid - أمامي / Vid- عكسي، Verhoeven وآخرون، (2004)	حد الكشف: الكشف عن CLVd وفيروس درنة البطاطا المغزلية (PSTVd) و TCDVd بمعدل إصابة نسبي يصل إلى على الأقل 100 في المائة (10 في المائة لـ CLVd) تخفيف أوراق البندقية (الطماطم) المصابة في بندقية سليمة الخصوصية التحليلية: كشف CLVd، فيروس درنة البطاطا المغزلية * صممت البادئات في الأصل للكشف عن CLVd مكمل لبادئات Posp1 - أمامي / Posp1- عكسي RT-PCR، Verhoeven وآخرون، (2004) الخصوصية التحليلية: كشف CLVd، فيروس درنة البطاطا المغزلية TCDVd، PSTVd الانتقائية: لا تأثير على أوراق البندقية (الطماطم) التكرار وقابلية الإعادة: 100 في المائة (NPPO-NL, 2013b)

المصفوفة	حجم العينة	إعداد العينة	استخراج الحمض النووي	طريقة الكشف	ملاحظات بشأن التحقق من الصحة
أوراق بندقية (الطماطم)	1 غرام	3.5 ملليغرام (بتراوح 5:1-2:1 (وزن/حجم)) من GH زائد محلول داريء مع Homex 6	طقم أدوات RNeasy Plant Mini Kit	Shamloul : RT-PCR وآخرون، (1997)	حد الكشف: الكشف عن معدل الإصابة نسبي يصل إلى على الأقل 10 في المائة تخفيف أوراق البندقية (الطماطم) المصابة في بندقية سليمة الخصوصية التحليلية: الكشف عن MPVd، فيرود درنة البطاطا المغزلية PSTVd، TCDVd، TPMVd (بعض الخلاصات) الانتقائية: لا تأثير على أوراق البندقية (الطماطم) التكرار وقابلية الإعادة: 100 في المائة (NPPO-NL, 2013c)
بذور بندقية (الطماطم)	3000 بذرة (اختبرت 1000 بذرة ثلاث مرات)	20 ملليغرام (بتراوح 5:1-2:1 (وزن/حجم)) من GH زائد محلول داريء مع BagMixer (Interscience)	طقم أدوات Sbeadex maxi plant kit على نظام KingFisher 96	RT-PCR في السوقت الحقيقي Boonham وآخرون، (2004)	خصائص أداء الفحص كما لأوراق البندقية (الطماطم) احتمال الكشف عن بذرة واحدة مصابة في عينة من 1000 بذرة أقل من 95 في المائة عند اختبار ثلاث عينات فرعية كل منها من 1000 بذرة بسبب التلوث السريع لفيرود درنة البطاطا المغزلية من الثمار المصابة إلى البذور السليمة أثناء معالجة (باستخدام المعالجة بالتخمير والبكتيانات البذور، هناك احتمال كبير لأن تكون هناك بذور ملوثة أكثر في عينة معينة (Naktuinbouw, 2012c).

المصفوفة	حجم العينة	إعداد العينة	استخراج الحمض النووي	طريقة الكشف	ملاحظات بشأن التحقق من الصحة
أوراق بطاطا (مستنبتة في غرف استنبات) ونباتات بطاطا مستنبتة في أنابيب مختبرية.	200 ملليغرام	20 ميكرو لتر من 10 في المائة كبريتات الصوديوم (SDS) ، و180 ميكرو لتر داري استخراج LiCl ، و400 ميكرو لتر فينول-كلوروفورم مع أجران ومدقات	الفينول-كلوروفورم واستخراج بولي إيثيلين غليكول ذو الخطوتين	ارتحال كهربائي هلامي بولي أكريلاميدي عكسي (PAGE) ²	حد الكشف: 2465 بيكوغرام من فيروس درنة البطاطا المغزلية؛ كان ذلك هو الأقل حساسية من الطرق الجزيئية التي استخدمت في اختبار حلقة دولي Pospiviroid التحليلية: الكشف عن جميع أنواع فيروسات Pospiviroid المعروفة الانتقائية. لا تأثير على صنف البطاطا أو أوراق البطاطا أو النباتات المستنبتة في أنابيب مختبرية قابلية التكرار وقابلية الإعادة: قابلية الإعادة 51 في المائة في 87,893 بيكوغرام من فيروس درنة البطاطا المغزلية (أعلى تركيز لفيروس درنة البطاطا المغزلية اختبر) و42 في المائة على حد الكشف
أوراق بطاطا (مستنبتة في غرف استنبات) ونباتات بطاطا مستنبتة في أنابيب مختبرية.	200 ملليغرام	بتراوح 1-5 (وزن/حجم) مع داري Ames (EPPO 2004) مع أجران ومدقات	التثبيت على غشاء (Agdia, Inc.) الفينول-كلوروفورم واستخراج بولي إيثيلين غليكول ذو الخطوتين	فحص ديجوكسيجينين ²	حد الكشف: على الأقل 17 بيكوغرام من فيروس درنة البطاطا المغزلية (أدنى تركيز اختبر) التحليلية: الكشف عن جميع أنواع فيروسات Pospiviroid المعروفة الانتقائية: لا تأثير على صنف البطاطا أو أوراق البطاطا أو النباتات المستنبتة في أنابيب مختبرية قابلية التكرار وقابلية الإعادة: قابلية الإعادة 100 في المائة في 87,893 بيكوغرام من فيروس درنة البطاطا المغزلية و23 في المائة على 17 بيكوغرام من فيروس درنة البطاطا المغزلية

المصفوفة	حجم العينة	إعداد العينة	استخراج الحمض النووي	طريقة الكشف	ملاحظات بشأن التحقق من الصحة
أوراق بطاطا (مستنبطة في غرف استنبات) ونباتات بطاطا مستنبطة في أنابيب مختبرية.	500-50 ملليغرام	بتراوح 1-9 (وزن/حجم) مع دارىء RH (Qiagen) مع أنبوب طرد مركزي و Homex 6 أو micropestle	طقم أدوات RNeasy Plant Mini Kit	وخطوتان ² من طريقة RT-PCR التقليدية باستخدام بادئات Shamloul وآخرين (1997)	حد الكشف: على الأقل 17 بيكوغرام من فيروس درنة البطاطا المغزلية الخصوصية التحليلية: الكشف عن PVd، فيروس درنة البطاطا المغزلية، TPMVd، TCDVd الانتقائية: لا تأثير على صنف البطاطا أو أوراق البطاطا أو النباتات المستنبطة في أنابيب مختبرية قابلية التكرار وقابلية الإعادة: قابلية الإعادة 78 في المائة في 87,893 بيكوغرام من فيروس درنة البطاطا المغزلية (أعلى تركيز لفيروس درنة البطاطا المغزلية اختبر) و44 في المائة على 17 بيكوغرام من فيروس درنة البطاطا المغزلية
أوراق بطاطا (مستنبطة في غرف استنبات) ونباتات بطاطا مستنبطة في أنابيب مختبرية.	1 غرام	3.5 ملليغرام (بتراوح 1:2:1) مع Homex 6 GH plus من المحلول الدارئ	3.5 ملليغرام (بتراوح 1:2:1) مع Homex 6 GH plus من المحلول الدارئ	طقم أدوات RNeasy Plant Mini Kit أو طقم أدوات Sbeadex maxi أدوات plant kit على نظام KingFisher 96	تحليل خصائص الأداء كما لأوراق البندورة (الطماطم) الحساسية التحليلية: تلوث مع الفيروسات التي تحدث عادة في البطاطا الانتقائية: لا تأثير على أوراق البطاطا أو النباتات المستنبطة في أنابيب مختبرية جرى التحقق من معدلات استكثار تصل إلى 100 (كشف 100 في المائة في عينة تتألف من ورقة واحدة مصابة و99 ورقة سليمة؛ NAK, 2011

المصفوفة	حجم العينة	إعداد العينة	استخراج الحمض النووي	طريقة الكشف	ملاحظات بشأن التحقق من الصحة
أوراق بطاطا (مستنبتة في غرف استنبات) ونباتات ودرنات بطاطا مستنبتة في أنابيب مختبرية	1.5 غرام أوراق أو 5 جرام درنات	حوالي 600 ميكرو لتر داريء للأوراق أو حوالي 3 ملليغرام داريء للدرنات (اختيار الداريء تبعاً لطريقة الاستخراج المستخدمة)	طقم أدوات RNeasy Plant Mini Kit، أو استخراجه بروميد تريميثيلامونيوم سيديل، أو طقم أدوات عزل الحمض النووي الريبي (Gentra Systems)، تجدر ملاحظة أن طقم الأدوات لم يعد متوفراً	RT-PCR في الوقت الحقيقي: Boonham وآخرون، (2004)	<p>حد الكشف: الكشف عن ما يصل إلى 10,000 مرة تخفيف لانسجة مصابة في أنسجة سليمة</p> <p>الحساسية التحليلية: الكشف عن MPVd، فيروس درنة البطاطا المغزلية TCDVd، PSTVd، TPMVd (بعض الخلاصات)؛ لا تلوث مع الفيروسات التي تحدث عادة في البطاطا</p> <p>الانتقائية: لا تأثير على أوراق البطاطا أو النباتات المستنبتة في أنابيب مختبرية أو الدرنات</p> <p>قابلية التكرار وقابلية الإعادة: 100 في المائة (اختبار حلقة شاركت فيه أربعة مختبرات)</p> <p>جرى التحقق من معدلات استكثار تصل إلى 100 (كشف 100 في المائة في عينة تتألف من ورقة واحدة مصابة و 99 ورقة سليمة؛ Roenhorst وآخرون، 2005، 2006</p>

المصفوفة	حجم العينة	إعداد العينة	استخراج الحمض النووي	طريقة الكشف	ملاحظات بشأن التحقق من الصحة
أنواع نباتات الزينة (أوراق)	1 غرام	3.5 ملليغرام (بتراوح 1:2-5:1 (وزن/حجم)) من المحلول الدائري Homex 6 مع GH plus	طقم أدوات RNeasy Plant Mini Kit أو طقم أدوات Sbeadex maxi plant kit على نظام KingFisher 96	RT-PCR في الوقت الحقيقي: فحص GenPospi، Botermans وآخرون، (2013)	تحليل خصائص الأداء كما لأوراق البندورة (الطماطم). الحساسية التحليلية: تركيز فيروسات Pospiviroid وانتقائية (مركبات مثبطة) في عصارة الورقة تبعاً لأنواع النبات جرى التحقق من معدلات استكثار تصل إلى 25 لـ <i>Brugmansia</i> ، <i>Calibrachoa</i> ، <i>Petunia</i> ، <i>Nematanthus</i> ، <i>Dahlia</i> ، <i>Cestrum</i> ، <i>Streptosolen jamesonii</i> ، <i>Solanum jasminoides</i> تجدر ملاحظة أن بالنسبة لمصفوفة <i>Calibrachoa</i> ، <i>S. jasminoides</i> ، <i>S. jamesonii</i> شوهدت تأثيرات على تخفيف يزيد على 100. يبدو أن بالنسبة لبعض المحاصيل، مثل <i>Dahlia</i> ، فترة الصيف هي الفترة المناسبة فقط لإجراء اختبار (يمكن الركون إليه) (Naktuinbouw, 2012a)
أنواع نباتات الزينة (أوراق)	1 غرام			RT-PCR في الوقت الحقيقي: Boonham وآخرون، (2004)	تحليل خصائص الأداء كما لأوراق البندورة الحساسية التحليلية: تركيز فيروسات Pospiviroid وانتقائية (مركبات مثبطة) في عصارة الورقة تبعاً لأنواع النبات جرى التحقق من معدلات استكثار تصل إلى 25 لـ <i>Brugmansia</i> ، <i>Calibrachoa</i> ، <i>Dahlia</i> ، <i>Petunia</i> ، <i>S. jasminoides</i> ، <i>S. jasminoides</i> ، <i>Calibrachoa</i> ، لاحظ أن بالنسبة لمصفوفة <i>Calibrachoa</i> ، <i>S. jasminoides</i> ، <i>S. jamesonii</i> شوهدت تأثيرات على تخفيف يزيد على 100 يبدو أن بالنسبة لبعض المحاصيل، مثل <i>Dahlia</i> ، فترة الصيف هي فقط الفترة المناسبة لإجراء اختبار (يمكن الركون إليه) (Naktuinbouw, 2012b)

المصفوفة	حجم العينة	إعداد العينة	استخراج الحمض النووي	طريقة الكشف	ملاحظات بشأن التحقق من الصحة
أوراق بندوقية (طماطم) وأوراق ودرنات وبذور بطاطا، وأنواع نباتات الزينة (أوراق)	1 غرام أوراق أو درنات بطاطا أو دمغات أوراق على أغشية نايلون	10 ملليغرام (بتراوح 1-10:1 وزن/حجم)) مع دارئ الفوسفات (PBS) مع 6 Homex	طرق مباشرة (دمغ الأنسجة)، أو طقم أدوات RNeasy Plant Mini Kit أو طقم أدوات عزل الحمض النووي الريبي كيت (Mo Bio)	RT-PCR في الوقت الحقيقي: Bertolini وآخرون، (2010)	حد الكشف عن: الكشف عما يصل 10,000 مرة تخفيف لأوراق S. jasminoides مصابة في أوراق سليمة لـ jasminoides وللبندورة الخصوصية التحليلية: الكشف عن TCDVd و PSTVd و CLVd الانتقائية: لا تأثير على أوراق البطاطا أو درناتها أو بذور البندوقية (الطماطم) قابلية التكرار وقابلية الإعادة: 100 في المائة (اختبار حلقة شاركت فيه ثلاثة مختبرات) كانت الحساسية التشخيصية 100 في المائة، وكانت خصوصية التشخيص 100 في المائة والدقة النسبية مقارنة بطريقة التهجين الجزيئي (Murcia وآخرون 2009) 100 في المائة. وأجري التحقق من صحة الاختبار على 208 عينات حقلية لأصناف S. jasminoides و Brugmansia spp. و Datura spp و Petunia spp و Dendrathera spp و بطاطا وبندوقية (طماطم). من بين العينات الـ 208، كانت 43 إيجابية صحيحة و150 سلبية صحيحة بكل من الطريقتين. كانت 15 عينة إيجابية زائفة بالتهجين الذي كشف فيه عن فيروس Tomato apical stunt viroid (TASVd) وفيروس Citrus exocortis viroid (CEVd). لم تكن هناك عينات سلبية زائفة

¹ لأن تركيز الفيروس في مادة الاختبار الأصلية غير معروف، لبعض الفحوص يعبر عن حد الكشف (الحساسية) كقيمة نسبية. تعتبر عصاره ورقة غير مخففة مصابة 100 في المائة (بنسبة 1 غرام مادة أوراق: 3 ملليغرام داري). جرى تحديد الحد النسبي للكشف عن طريق اختبار ثمانية مخففات تسلسلية لعصاره ورقة مصابة في عصاره ورقة سليمة. يعرف الحد النسبي للكشف كمتوسط أدنى معدل إصابة نسبي لكل خلاصة لايزال من الممكن الكشف عنها (دورة حد (Ct) تقل عن 32)، وأضيفت ثلاثة انحرافات معيارية لإعطاء قياس محافظ مع يقين 99.7 في المائة (Botermans *et al* وآخرون 2013).

² الطرق الثلاث، الارتحال الكهربائي الهلامي البولي الأكريلاميدي العكسي R-PAGE و تفاعل البلمرة التسلسلي باستخدام إنزيم النسخ العكسي RT-PCR من خطوتين، باستخدام بادئات Shamloul وآخرون، (1997) قورنتا في اختبار حلقة دولي. (Jeffries and James, 2005).

تاريخ المطبوع

هذا ليس جزءاً رئيسياً من المعيار

- 2007-03- أضافت الدورة الثانية لهيئة تدابير الصحة النباتية موضوع لبرنامج العمل (06-002)
- 2012-11- راجع فريق الخبراء المعني ببروتوكولات التشخيص مسودة البروتوكول
- 2013-03- وافقت لجنة المعايير بقرار إلكتروني إلى مشاوراة الأعضاء
(2013_eSC_May_10)
- 2013-07- انعقاد مشاوراة الأعضاء
- 2014-07- استعرض فريق الخبراء المعني ببروتوكولات التشخيص مسودة البروتوكول
- 2014-09- وافق فريق الخبراء المعني ببروتوكولات التشخيص بقرار إلكتروني إلى لجنة المعايير للموافقة عليها لاعتمادها
(2014_eTPDP_September_01)
- 2014-11- وافقت لجنة المعايير عليها بقرار إلكتروني إلى فترة الإخطار لبروتوكول التشخيص
(2014_eSC_Nov_13)
- 2014-12- فترة الإخطار
- 2015-01- اعتمدت لجنة المعايير بروتوكول التشخيص نيابة عن هيئة تدابير الصحة النباتية (لم تتلق أي اعتراضات رسمية)
المعيار الدولي رقم 27 الملحق 7 فيرود درنة البطاطا المغزلية (2016). روما، الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات، الفاو
- 2015-07- أدرجت أمانة الاتفاقية التعديلات التحريرية وغيرت شكل المعايير بعد إلغاء الإجراء المعياري من الدورة العاشرة للهيئة (2015)
- 2016-05- اعتمدت لجنة المعايير التنقيح التقني لبروتوكول التشخيص هذا فيما يخص تسلسل بادئة الضبط الداخلي COX-F تماشياً مع المرجع الوارد في المؤلفات العلمية المقدم (Weller وآخرون، 2000) (القسم "3-3-4-2 RT-PCR في الوقت الحقيقي باستخدام بادئات Boonham وآخرين (2004) ") (2016_eSC_May_15). وأخذ فريق الخبراء المعني ببروتوكولات التشخيص علماً بالتسلسلين في النسخة السابقة لبروتوكول التشخيص وبالتسلسل الحالي بحسب عمل Weller وآخرين.
- كان آخر تعديل لتاريخ المطبوع في 2005-2016.

المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية 27

الملحق 8



المعايير الدولية لتدابير الصحة النباتية

المعيار الدولي 27: بروتوكولات تشخيص

بروتوكول التشخيص: 8

آفة *Ditylenchus dipsaci* وآفة *Ditylenchus destructor*

تم اعتماده عام 2015 ونُشر عام 2015

المحتويات

4	1-1	معلومات عن الآفة
4	1-1-1	آفة <i>Ditylenchus dipsaci</i>
5	2-1	آفة <i>Ditylenchus destructor</i>
6	2-2	المعلومات التصنيفية
7	3-1	كيفية الكشف عن الآفة
7	1-3	العوائل والأعراض
7	1-1-3	آفة <i>Ditylenchus dipsaci</i>
11	2-1-3	<i>Ditylenchus destructor</i>
12	2-3	استخراج النيماتود
12	1-2-3	استخراج النيماتود من البصيلات والثوم

- 13 استخراج النيماتود من التربة والمواد النباتية 2-2-3
- 14 **التحديد** 4-2-2
- 15 التحديد المورفولوجي 1-4
- 15 إعداد العينات 1-1-4
- 15 خصائص التشخيص المورفولوجي 2-1-4
- 21 التحديد الجزيئي 2-4
- 21 آفة *Ditylenchus dipsaci* 1-2-4
- 21 آفة *Ditylenchus destructor* 2-2-4
- 22 استخراج الحمض النووي 3-2-4
- اختبار تتابع مبادئ النسخ الداخلي- الحمض النووي الريبي- تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل - تعدد الأشكال لطول جزء القطع لآفتي *D. dipsaci* و *D. destructor* ... 22 4-2-4
- اختبار تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل القائم على منطقة التضخيم المتتالي لآفة 5-2-4
- 23 *D. dipsaci* 2-4
- اختبار 18S واختبار تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل الخاص بمبادئ النسخ الداخلي 1 لآفة 6-2-4
- 24 *D. dipsaci* 2-4
- اختبار تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل الخاص بالحمض النووي الريبي 5.8S لآفة 7-2-4
- 25 *D. dipsaci* 2-4
- اختبار تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل الخاص بالحمض النووي الريبي 5.8S ومبادئ 8-2-4
- 26 *D. dipsaci* لآفة النسخ الداخلي 2-4
- اختبار تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل القائم على منطقة التضخيم المتتالي لآفة 9-2-4
- 27 *D. dipsaci* 2-4
- 27 الشواهد الخاصة بالاختبار الجزيئي 10-2-4
- 28 تفسير نتائج تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل التقليدي 11-2-4

28	السجلات	-5
28	جهات الاتصال للحصول على معلومات إضافية	-6
29	شكر وتقدير	-7
30	المراجع	-8
38	الأشكال	-9

1- معلومات عن الآفة

تتوزع الأنواع ضمن جنس *Ditylenchus* الواسع (Filipjev، 1936) في كافة أنحاء العالم، ومعظم الأنواع فطرية التغذية. غير أن هذا الجنس يتضمن بعض الأنواع التي تتسم بأهمية كبيرة بوصفها آفات تطال نباتات أعلى (Sturhan و Brzeski، 1991). وتجدر الإشارة إلى أنه رغم تأثر بعض النباتات (مثل الشمندر، والبرسيم، والنفل) بالآفتين *Ditylenchus dipsaci* و *Ditylenchus destructor*، نادراً ما يتواجد هذان النوعان في الوقت ذاته في النبات ذاته (Andrássy و Farkas، 1988).

1-1 آفة *Ditylenchus dipsaci*

تهاجم آفة *D. dipsaci sensu lato (s.l.)*، أو نيماتود الساق، أكثر من 200 نوع من النباتات البرية والمستزرعة. كما أن العديد من الأعشاب والحشائش هي عوائل للنيماتود وقد تؤدي دوراً هاماً في بقائه في غياب نباتات مستزرعة. وقد أشارت تحليلات مورفولوجية وبيوكيميائية وجزيئية ونواتية لأعداد وأنواع مختلفة من آفة *D. dipsaci s.l.* إلى أنه مركب يضم 30 جنساً من العوائل على الأقل، ذات نطاق محدود من عوائل الآفة. وقد قسّم Jeszke وآخرون (2013) هذا المركب إلى مجموعتين، تضم الأولى أعداد الصيغة الصبغية الثنائية التي تتميز بحجمها "العادي" والمسماة *D. dipsaci sensu stricto (s.s.)*، وتشمل هذه المجموعة معظم الأعداد المسجلة حتى الآن. وأمّا المجموعة الثانية فهي تتألف من الأصناف المتضاعفة الصبغيات وتضم حالياً *Ditylenchus gigas*، Vovlas وآخرون 2011 ("المنصف العملاق" من *D. dipsaci* الذي يتطفل على *Vicia faba* (الفاصولياء العريضة))؛ *D. weischeri* Chizhov وآخرون، 2010 (المتطفل على *Cirsium arvense* (النباتات الشوكية الزاحفة))؛ وثلاث آفات غير موصوفة من نوع *Ditylenchus* spp تُسمى دال، وهاء وواو وترتبط بأنواع النباتات Fabaceae، Asteraceae و Plantaginaceae على التوالي (Jeszke وآخرون، 2013). ومن بين كل هذه الأنواع، وحدها آفة *D. dipsaci s.s.* وأحد متغيراتها المورفولوجية الكبيرة *D. gigas* هما من الآفات النباتية التي تتسم بأهمية اقتصادية. ويتضمن هذا البروتوكول معلومات تسمح التمييز بين *D. gigas* و *D. dipsaci s.s.*

وتعيش آفة *D. dipsaci* في معظم الأوقات كطفيليات خارجية في الأجزاء الهوائية من النباتات (السيقان، والأوراق والأزهار)، إنما أيضاً البصلات، والدرنات والريزومات). وهذا النيماتود منقول بواسطة البذور في *V. Faba*، و *Medicago sativa* (البرسيم/ألفافا)، و *Allium cepa* (البصل)، و *Trifolium spp.* (النفل)، و *Dipsacus spp.* (المشط) و *Cucumis melo* (الشمام) (Sousa وآخرون، 2005). ومن الأهمية بمكان الإشارة إلى أنه بإمكان صغار المرحلة الرابعة تحمّل الجفاف لمدة طويلة من 20 سنة أو أكثر (Lucas و Barker، 1984). وتتجمّع هذه النيماتودات في حالة خفية وتشكّل "صوف النيماتود" حين تبدأ أنسجة النباتات بالجفاف (الشكل 1). وغالباً ما يظهر الصوف على البذور في القرون المصابة جداً بالآفات وفي بقايا النباتات الجافة (أي ما يبقى في الحقل بعد الحصاد). كما أن وجود صغار الآفات المعدية من المرحلة الرابعة في البذور ومواد النباتات الجافة هام في الانتشار السالب لهذه الديدان على مسافات طويلة. ويمكن أن تبقى النيماتود حية بحالتها الجافة بعد انتقالها من خلال الخنازير والقطعان إلى بذور مصابة أو داخل هذه البذور (Palmisano وآخرون، 1971).

ورغم أن *D. dipsaci* تُعتبر آفة في نباتات أعلى، أشار Viglierchio (1971) إلى أنه بإمكان مجتمع كاليفورني من *D. dipsaci* في *Allium sativum* (الثوم) أن يتكاثر على فطر التربة (*Cladosporium* و *Verticilium*) في ظروف مخبرية. ومن المعروف أن آفة *D. dipsaci* تنقل ممرضات نباتية بكتيرية من الجهة الخارجية (مثل *Clavibacter* *Corynebacterium insidiosum*)، ما يسبب ذبول الألفالفا.

ووفقاً لمنظمة وقاية النباتات في أوروبا (2013 ألف)، تتواجد آفة *D. dipsaci* في الأقاليم التالية (باستثناء الاعتراضات): أوروبا، وآسيا، وأفريقيا، وأمريكا الشمالية، وأميركا الوسطى والبحر الكاريبي، وأمريكا الجنوبية، أوسيانيا.

2-1 آفة *Ditylenchus destructor*

تهاجم آفة *D. destructor*، أو دودة تعفن البطاطا، بصورة حصرية تقريباً الأجزاء تحت الأرضية من النباتات (مثل الدرنا، والريزومات والأجزاء تحت الأرض المشابهة للسيقان). وهي أنواع شبيهة عالمية شائعة في الأقاليم المعتدلة، ومسؤولة عن خسائر حادة في إنتاج البطاطا وحشيشة الدينار (منظمة وقاية النباتات في أوروبا، 2013 ألف). كما أن نطاق الكائنات المعيلة للنيماتود واسع جداً، إذ يضم أكثر من 90 نوعاً نباتياً يشمل نباتات الزينة، والنباتات المحصولية والأعشاب الضارة. ويشكل *Solanum tuberosum* (البطاطا) المعيل الأساسي، حيث يظهر في الدرنا تعفن رطب أو جاف ينتقل إلى درنا أخرى في التخزين. وفي بعض الظروف، قد تتسبب كائنات التعفن الرطب بتعفن الدرنا إلى حد بعيد، ولكن سوف إنمّا قد تقتل أيضاً النيماتودات. وقد وجد Ciurea و Rojankovski (1986) 55 نوعاً من البكتيريا والفطريات المرتبطة بآفة *D. destructor* في درنا *S. tuberosum*، حيث أن الفطريات المغزلية *Fusarium* spp. هي الأكثر شيوعاً.

والعوائل الشائعة الأخرى هي *Ipomoea batatas* (البطاطا الحلوة)، والزنبق البصلي (أصناف مهجنة ومختارة مشتقة من *Iris xiphoides* و *Iris xiphium*)، و *Taraxacum officinale* (الهندباء)، و *Humulus lupulus* (حشيشة الدينار)، و *Tulipa* spp. (التوليب)، و *Leopoldia comosa* (لبلاب عنبي)، و *Hyacinthus orientalis* (البلاب)، و *Gladiolus* spp. (الزنبق)، و *Dahlia* spp. (الداليا)، و *Coronilla varia* و *Anthyllis vulneraria* (البيقية)، و *Beta vulgaris* (الشمندر السكري، وشمندر العلف، والشمندر)، و *Calendula officinalis* (الزهرة المخملية)، و *Daucus carota* (الجزر)، و *Petroselinum crispum* (البقدونس) و *Trifolium* spp. (البرسيم الأحمر والأبيض والبرسيم السويدي) (Brzeski و Sturhan، 1991). وفي غياب نباتات أعلى، تتكاثر آفة *D. destructor* بسرعة على أفطوريات-مشيجات فطرية لحوالي 70 نوعاً من الفطريات، ومن المعروف أنها تدمر الخيط الفطري في الفطر المستزرع (Brzeski و Sturhan، 1991). وبإمكان هذا النوع أن يقاوم الجفاف ودرجات الحرارة المتدنية، إنما لا يشكل صوف النيماتود كما تفعل آفة *D. dipsaci* (Kühn، 1857، Filipjev، 1936). غير أن هذا النوع يزدهر في الشتاء كبيض، ما يجعل البيض في *D. destructor* أكثر حيوية مما هو عليه في *D. dipsaci*. كذلك، إن آفة *D. destructor* في بذور البطاطا وبصلات الزهور هي آفة خاضعة للوائح في بلدان عديدة (Brzeski و Sturhan، 1991). كذلك، أشارت التقارير إلى وجود آفة *D. destructor* على *Arachis hypogaea* (الفول السوداني/الفسق) في جنوب أفريقيا، إنما باتت هذه

السجلات تُعتبر أنواعاً منفصلة، *Ditylenchus africanus* (Webster وWendt, Swart, Vrain، 1995)، قريبة من الناحية المورفولوجية ومن ناحية القياس المورفولوجي لآفة *D. destructor*. ووفقاً لمنظمة وقاية النباتات في أوروبا (2013 ألف)، تتواجد آفة *D. destructor* في الأقاليم التالية (باستثناء الاعتراضات): أوروبا، وآسيا، وأفريقيا الجنوبية، وأمريكا الشمالية، وأمريكا الجنوبية، أوسيانيا.

2- المعلومات التصنيفية

الإسم: *Ditylenchus dipsaci* (Kühn، 1857) Filipjev، 1936

المرادفات: ترد مرادفات أنواع آفة *Ditylenchus dipsaci* (Kühn، 1857) Filipjev، 1936 في وثيقة Siddiqi (2000)

الوضع التصنيفي: النيماتودا، Secernentea، وDiplogasteria، وTylenchida، وTylenchina، وTylenchoidea، وAnguinidae.

الأسماء الشائعة: نيماتودا الساق، والديدان المستطيلة في السيقان والبصلات (بالإنكليزية) (Brzeski وSturhan، 1991).

ملاحظة: تُعتبر الآن آفة *D. dipsaci* مركّب من الأنواع يتألف من عدد كبير من الأصناف والمجموعات البيولوجية التي تختلف بصورة خاصة في أفضليات العائل. بالتالي، وردت مرادفات لما مجموعه 13 نوعاً إسمياً من *D. dipsaci* كما تمّ التعرّف إلى 30 صنفاً بيولوجياً، يجري التمييز بينها بصورة رئيسية حسب نطاق العوائل وتُسمّى عامةً باسم النباتات الرئيسية المعيلة لها.

الإسم: *Ditylenchus destructor*، Thorne، 1945

المرادفات: غير متوفرة

الوضع التصنيفي: النيماتودا، Secernentea، وDiplogasteria، وTylenchida، وTylenchina، وTylenchoidea، وAnguinidae.

الأسماء الشائعة: الدودة المستطيلة في عفن الدرنات، الدودة الأسطوانية لتعفن البطاطا (بالإنكليزية) (Sturhan وBrzeski، 1991)

وضع Blaxter وDe Ley (2003) نظام التصنيف الأحدث، الذي يجمع بين الملاحظات المورفولوجية، والاستنتاجات الجزيئية وتحليلات التصنيف التفرعي الحيوي.

3- كيفية الكشف عن الآفة

تحمل كل من *D. destructor* و *D. dipsaci* الجراثيم المشتركة التالية التي تسمح بالكشف عنهما: التورم، والتشوه وزوال اللون والتقرم في الأجزاء الموجودة تحت الأرض من النباتات، والنخر أو التعفن في البصيلات والدرنات (Thorne، 1945).

آفة *Ditylenchus dipsaci*

تُظهر آفة *D. dipsaci* تأقلاً مع الطفيلي *ات من حيثني* قدرتها على غزو النسيج الكبدي الصلب عقب التحلل الأنزيمي للطبقة الرقيقة البكتينية أو الوسطى الموجودة بين الجدران المتاخمة في الخلية، ما يؤدي إلى فصل الخلايا وتقريبها. وهذا يؤدي إلى المظهر اللامع النموذجي أو إلى الملمس المنقَط في الأنسجة المصابة بما يذكر بلبّ تفاحة ناضجة أكثر من اللازم (Southey، 1993).

وبحسب Vovlas وآخرين (2011)، تسبب إصابة *V. faba* بآفة *D. gigas* (دودة اسطوانية عملاقة في الساق والبصيلة) التورم وتشوه أنسجة السيقان أو تقرحات تتحول إلى لون بني أحمر ثم اسود. وفي الإصابات الحادة، تبدو البذور سوداء، ومشوهة وأصغر حجماً من البذور غير المصابة بالآفة، كما تظهر بقع أشبه باللطخات على سطحها. وأمّا العوائل غير *V. faba* فهي *Lamium purpureum*، *Lamium album*، و *Lamium amplexicaule*، و *Ranunculus arvensis*، و *Avena sterilis* و *Convolvulus arvensis*.

آفة *Ditylenchus destructor*

تصيب آفة *D. destructor* عادةً الأجزاء تحت الأرض من النباتات (الدرنات وسيقان البطاطا، وريوزمات النعناع، وجذور حشيشة الدينار والليلك)، ما يسبب زوال اللون وتعفن أنسجة النباتات. وتكون أحياناً الأجزاء فوق الأرض من النباتات مصابة أيضاً بالآفة، ما يسبب تقرم الساق وتتحننها وتفرعها إضافةً إلى تقرم الأوراق، وتغضنها وزوال لونها (كما في البطاطا) (Sturhan و Brzeski، 1991). إنما في أغلب الأحيان، لا تظهر أي توجده أعراض الإصابة بالآفة في الأجزاء فوق الأرض من النباتات.

3-1 العوائل والأعراض

3-1-1 آفة *Ditylenchus dipsaci*

يشير Sturhan و Brzeski (1991) إلى أن العوائل الرئيسية لآفة *D. dipsaci* هي النجيليات: *Avena sativa* (الشوفان)، و *Secale cereale* (الجاودان)، و *Zea mays* (الذرة)، و *Triticum aestivum* (القمح)؛ والزنبقيات: *A. cepa*، و *A. sativum*، و *Tulipa spp.*؛ والقرنبيات: *M. sativa*، و *Vicia spp.*، و *Pisum sativum*، و *Trifolium spp.*؛ والباذنجانيات: *S. tuberosum*، و *Nicotiana spp.*؛ والصليبيات: *Brassica campestris*؛ والزرجسيات: *Narcissus spp.* كذلك، تضمّ عوائل أخرى *D. carota*، و *Fragaria spp.* (الفاولة)، و *B. vulgaris*، و *H. orientalis*، و *Allium ampeloprasum* (الكرات)، و *Phlox drummondii*، و *Phlox paniculata*، و *Dianthus spp.* (القرنفل)، و *Apium graveolens* (الكرفس)،

و. *Hydrangea spp.*، و *Lens culinaris* (العدس)، و *Brassica napus* (اللفت)، و *Petroselinum crispum* و *Helianthus annuus* (دوار الشمس).

قد تتواجد أجيال مختلفة من آفة *D. dipsaci* في نباتات عائلة خلال موسم معين، تتبع بعضها البعض. وفي حال ماتت الأجزاء المصابة من النباتات بسبب الآفة، تترك النيماتودات العائل قبل أن تموت بالكامل. وفي غياب نباتات عائلة، بإمكان هذه الديدان أن تدخل إلى نباتات غير عائلة وتتغذى منها لبعض الوقت، رغم أنها غير قادرة على التكاثر في هذه النباتات غير العائلة (Farkas و Andrassy، 1988). وتتمثل الأعراض الأكثر شيوعاً للإصابة بآفة *D. dipsaci* في تقزم النباتات واصفرارها؛ وتتخذ السيقان والسويقات والأزهار، وتقزمها، واحتوائها على العفصة وتشوهها؛ وتقرحات نخرية في البصيلات والريزومات وتعفننها، غالباً ما تظهر بشكل حلقات بنية اللون حين تكون البصيلات مقطعة. وقد تصيب آفة *D. dipsaci* البذور أيضاً من *Phaseolus vulgaris* (الفاصوليا القزمية، أو اللوبياء، أو الفاصوليا الخضراء) مثلاً، و *Allium spp.* و *M. sativa*. وعادةً لا تبدي البذور الصغيرة أعراضاً ظاهرة للإصابة بالآفة في حين تنكمش قشرة البذور الكبيرة وتظهر بقعاً ملونة عليها.

3-1-1-1 الأعراس الخاصة بالنجيليات

Avena sativa و **Secale cereale** (Nicol و McDonald، 2005). تصبح الأوراق مشوهة، وتتخذ السيقان، ويظهر عدد غير اعتيادي من العصيانات، وتكون الذبذبات قصيرة وكثيفة ومتقزمة. وفي زراعة *S. cereale*، تظهر آفة *D. dipsaci* بصورة خاصة في التربة الخفيفة التي تحتوي على كميات قليلة من الدبال، وبصورة طبيعية في المناطق حيث يُزرع الشليم. ويمكن ملاحظة العلامات الأولى للإصابة بالآفة في أواخر فصل الخريف، إنما تصبح أكثر وضوحاً في الربيع. كذلك، تشير بقع عديدة على النباتات ذات النمو المتأخر في حقل الشليم إلى تلف بفعل الآفة. وفيما تنمو نباتات *A. sativa* المصابة بالآفة بوتيرة أبطأ، تظهر بوضوح في المحصول المائل إلى الاصفرار من خلال لونها الأخضر. وتحمل نباتات *T. aestivum* المصابة الأعراض ذاتها التي تظهر في حبوب أخرى، وتتعرض إلى هجوم آفة *D. dipsaci* في أوروبا الوسطى والشرقية فقط (Cook و Rivoal، 1993).

وأما نباتات *Zea mays* فهي لا تشكل عوائل جيداً لآفة *D. dipsaci*، إنما قد يؤدي غزو أذسجة السيقان في النباتات الفتية إلى نخر في هذه الأنسجة، ويتسبب بموت نباتات الذرة أو سقوطها قبل الحصاد (Cook و Rivoal، 1993). كما أن أوراق النباتات المصابة متغضنة وملتوية كفتحة سدادات. كذلك، تكون الفواصل العقدية أقصر فيما يصبح الجزء الأسفل من الساق فارغاً في حين تنكسر النباتات الأكبر حجماً وتسقط.

3-1-1-2 الأعراس الخاصة بالزنبقيات

Allium cepa، و **Allium sativum**، و **Allium cepa var. aggregatum** (الكراث). تتمثل إحدى خصائص معظم نباتات *Allium spp.* بأن الأوراق والبصيلات فيها تشوه بفعل الإصابة بآفة *D. dipsaci* (الشكال 2، و 3 و 4). كذلك، تصبح قاعدة النباتات الفتية منتفخة والأوراق مشوهة. وأما البصيلات المصابة الأخرى فيظهر عليها تورم (انتفاخ) للقشرة وتشققات مفتوحة غالباً ما تحصل عند الجذر الأسطواني للبصيلات (Olthof و Potter، 1993). ويبدو مظهر نباتات *A. cepa* التي تتعرض إلى هجوم آفة *D. dipsaci* جامداً بفعل ذوبان الخلايا الناجم عن تغذية الديدان الأسطوانية (Ferris و Ferris، 1998). وتميل البصيلات المصابة إلى التعفن بسرعة في التخزين (Hunt و Bridge، 1986)، كما أن

القشور الداخلية في البصيلة تتعرض عادة إلى هجوم أكثر حدة من القشور الخارجية. ومع تقدّم الموسم، تصبح البصيلات ليّنة ويظهر لدى قطعها قشر بني اللون بشكل دوائر متحدة المركز. وعلى العكس، لا تؤدي آفة *D. dipsaci* إلى تشوّه الأوراق أو تورم في نباتات *A. sativum*، إنما تسبّب اصفرار الأوراق وموتها (Sikora و Netscher، 1990). كذلك، أفاد Mollov وآخرون (2012) عن ظهور آفة *D. dipsaci* للمرة الأولى في نباتات *A. sativum* في منيسوتا، الولايات المتحدة الأمريكية. وتمثلت الأعراض التي ظهرت في النباتات تحت الأرض في التقزّم والبرقان، في حين كانت الأعراض في البصيلات هي النخر، والنمو بمستوى غير كافٍ والتشوه. وقد تبدو نقاط على أوراق نباتات *Allium spp.* (تورّمات شبيهة بالبثور على الأوراق). ولا تُلاحَظ أي أعراض للإصابة في بذور النباتات المصابة.

Tulipa spp. (Southey، 1993). تختلف الأعراض الناجمة عن مهاجمة آفة *D. dipsaci* لأزهار اللعلع، في النباتات النامية والبصيلات على السواء، عن تلك التي تظهر على نباتات *Narcissus spp.* ففي الحقل، يشكّل الإزهار الفترة الأفضل للكشف عن الإصابة بالآفة. والإشارة الأولى هي إصابة شاحبة أو أرجوانية اللون تظهر على جانب واحد من الساق مباشرة تحت الزهرة التي تنحني باتجاه الإصابة. وتزداد هذه الإصابة حجماً، وتنقسم القشرة— بما يكشف عن النسيج الرخو النموذجي تحتها— وينتشر التلف باتجاه الأسفل والأعلى في أغلب الأحيان وصولاً إلى البتلات. وفي الهجومات الأكثر حدة، تمتد إصابات مماثلة إلى الجزء الأسفل من الساق بدءاً من الأوراق ويحدث خلل في النمو. تبدأ الإصابات عند قاعدة البصيلات الجديدة حيث تظهر بشكل براعم مقابلة جانبية عند قاعدة السيقان السابقة. يمكن رؤية الإصابة والشعور بها لدى إزالة القشور الخارجية البنية اللون، بشكل لطخات ليّنة رمادية أو بنية اللون على القشور اللحمية الخارجية. ولا تظهر على البصيلات المصابة حلقات بنية اللون كالتالي نراها في نباتات النرجس والياقوتية.

3-1-1-3 الأعراض الخاصة بالنجليات

Medicago sativa. تشكل *D. dipsaci* آفة الديدان الأسطوانية الأكبر التي تصيب نباتات *M. sativa*. وتحصل الإصابة بسرعة في التربة الثقيلة وخلال أوقات هطول الأمطار الكثيفة أو في المناطق المروية بالرش. وغالباً ما يكون "الذبول الأبيض" المرتبط بخسارة الكلوروفيل في الورق إحدى خصائص المحاصيل المصابة في حالة من الإجهاد الرطوبي (Griffin، 1985). وأحياناً تظهر في الحقول المصابة مساحات غير منتظمة من النباتات المزروعة المبعثرة. وتشمل أعراض هجوم الديدان الأسطوانية التورّم، والتقزّم والالتواء في السيقان والأوراق، وقصر الفواصل العقدية، وتشكّل العديد من البراعم الإبطية، وإنتاج عدد غير اعتيادي من الغصينات التي تعطي النباتات مظهراً كثيفاً (Nicol و McDonald، 2005). ولا تنمو النباتات المصابة بما فيه الكفاية لتشكّل هشيماً (Ferris و Ferris، 1998)، وغالباً ما لا تتمكن من إنتاج أشواك الأزهار (Nicol و McDonald، 2005). كذلك، تعرّض آفة *D. dipsaci* نبات البرسيم إلى *Phytophthora megasperma*. ويتفاقم التلف الذي تسبّبه آفة *D. dipsaci* بفعل كائنات سبروفاج أخرى (أنواع *Rhizoctonia*، و *Cephalobus*، و *Panagrolaimus*) في نباتات مريضة ومكسورة، وهو أمر يسرّع أيضاً موت النباتات (Andrássy و Farkas، 1988). ولا تُلاحَظ أعراض في بذور نباتات *Medicago* المصابة.

Trifolium spp. (Cook و Yeates، 1993). الأعراض مشابهة جداً للأعراض التي سبق وصفها في نباتات *M. sativa*، باستثناء النفل الأحمر والأبيض اللون. تغزو الآفة النفل الأحمر وبخاصة في الطقس البارد والمطر. وتظهر مساحات كبيرة ومستديرة من النباتات المريضة في الحقل، حيث تتواجد النباتات الأكثر إصابةً بالمرض باتجاه المنطقة الداخلية وتبدو ذابلةً في

وسطحها. كما أن قواعد النباتات تبدو متورمةً مثل البصيلات، والأوراق متجعدة ومتغضنة تظهر عليها بوضوح عروق سميكة. وأما براعم الأزهار فهي متورمة كالعفص، وقد يحتوي عفس زهرة واحدة على 5 آلاف دودة أسطوانية (Courtney، 1962). كذلك، تكون سيقان النفل الأبيض المصابة بآفة *D. dipsaci* قصيرة ومتورمة، وتبدو براعمها متخضلة، وتصبح الأجزاء المصابة بنية اللون في الصيف أو الخريف. وأما الأوراق فهي أضيق مما في الحالات العادية، غير أن سويقاتها أكثر سماكة وقصرًا. وبراعم الأزهار متورمة عند قواعدها (Farkas و Andrassy، 1988).

3-1-1-4 الأعراض الخاصة بالباذنجانيات

Solanum tuberosum. تنتج آفة *D. dipsaci* عفنًا بشكل قمع يمتد باتجاه الدرنة أكثر من العفن السطحي الذي تسببه آفة *D. destructor*. وتغزو النيما تود السيقان والأوراق، مما يؤدي إلى تقزم نموذجي للنباتات يرافقه تشوه حاد في السيقان والسويقات (Evans و Trudgill، 1992).

Nicotiana spp. (Johnson، 1998). تدخل صغار الآفات (المرحلة الرابعة) إلى أوراق وسيقان شتلات التبغ في الطقس الرطب، وتؤدي إلى تورمات صغيرة وصفراء اللون (العفص) قد تمتد على ارتفاع 40 سم أو أكثر فوق التربة. وفيما يزداد عدد العفصات، تبدأ أنسجة النباتات بالموت قبل أوانها. وقد تسقط الأوراق السفلى فيما تميل الأوراق العليا إلى الإصفرار بعدها، تتعفن العفصات وتوقف نمو النباتات المصابة وفي النهاية، لا سيما في الطقس الدافئ والرطب وفي التربة الثقيلة، تنكسر السيقان المصابة وتسقط النباتات أرضاً.

3-1-1-5 الأعراض الخاصة بالصليبيات

قد يظهر عفن تاجي حاد في نبات *B. campestris* الناخج المصاب بآفة *D. dipsaci*.

3-1-1-6 الأعراض الخاصة بالنرجسيات

Narcissus spp. (Southey، 1993). تتمثل الأعراض النمطية في وجود تورمات من اللون الأصفر الفاتح أشبه بالبثور على الأوراق (نقاط) وحلقات بنية اللون ومتحدة المركز يمكن رؤيتها حين تُقطع البصيلات بالعرض (الشكلان 5 و6). إنما حين تُقطع البصيلات بالطول، يُلاحظ أن النخر يبدأ عند العنق ويمتد باتجاه الأسفل. كما أن التورمات تظهر بوضوح في فترة الإزهار حين تنمو الأوراق بشكل ناشط. وفي الهجومات المعتدلة، يمكن الشعور بالتورمات على النحو الأفضل أكثر من رؤيتها، بين السبابة والإبهام. ويمكن الكشف عن وجود آفة *D. dipsaci* في البصيلات الجافة التي تعاني من تلف ضئيل، من خلال قطعها مباشرة تحت العنق. ويبين الفحص المتأني في المراحل الأولى من الإصابة بقاء برقة وإسفنجية حيث تكون الخلايا قد انفصلت عن بعضها. ويستتبع ذلك ظهور سريع لنخر بني اللون.

3-1-1-7 الأعراض الخاصة بعوائل أخرى

Fragaria spp. تشكل آفة *D. dipsaci* النوع الوحيد من *Ditylenchus* الذي يُعتبر مسبباً مرضياً في الفراولة (Brown وآخرون، 1993). ويُلاحظ التلف في الأوراق الصغيرة والمشوّهة وفي السويقات القصيرة والسميكة والملتوية. عائلة الهليونيات، والعائلة الفرعية لذباتات **Sciloideae** (الياقوتيات) وبصيلات أخرى (Southey، 1993). أعراض البصيلات هي ذاتها التي تظهر في نباتات *Narcissus spp*، إنما لا تُلاحظ عادة تورمات محددة على أوراق النباتات. إنما قد تبدو على الأوراق أثلام وتشوهات وأحياناً، تورمات طفيفة. كذلك، تظهر عادة على بصيلات زنبقيات

أخرى الأعراض ذاتها التي تظهر على الياقوتيات. كما أن أعراض الإصابة في النرجسيات مشابهة لتلك التي تظهر في نباتات *Narcissus spp*؛ إذ تبدو مثلاً على أوراق نباتات *Galanthus spp* و *Nerine spp* تورمات، إضافةً إلى حلقاتٍ بنية اللون ومنتحة المركز في البصيلات.

Beta vulgaris and Daucus carota (Cookey، 1993). تؤدي تغذية *D. dipsaci* إلى موت نقطة النمو في الشتلات (بما يفضي إلى تشكّل تيجان عديدة)؛ وقد تصبح الفلقات والأوراق ملتويةً، ومتورمة ومشوهة؛ كما قد تظهر نقاط على الأوراق أو السويقات في النباتات الأقدم الأكبر سناً. وفي وقت لاحق من الموسم، قد تسبّب الآفة في التاج عفنًا يُعرف باسم تفرّج التاج، أو عفن التاج أو عفن العنق. وتظهر هذه الإشارة أولاً بشكل بثرات بارزة ورمادية اللون بين نذب الأوراق عادةً. ثم، ينمو العفن باتجاه الجانب الخارجي والسفلي، ويمتد إلى ما بعد كتف النباتات، ما يسمح للتاج بالانفصال حين يتمّ سحبه. وفي نباتات *D. carota*، قد تشمل أعراض أخرى تفرّج الأوراق وزوال لون رأس الجذر الرئيسي. وتظهر الأعراض بصورة رئيسية على جذر وساق النباتات عند 2 إلى 4 سنتيمتر تحت مستوى الأرض وفوقه. وتُسبّب الإصابة الحادة موت الأوراق وتعفن التاج، وبخاصة في فصل الخريف (الشكل 7).

Phlox paniculata وغيرها من نباتات الزينة (Southey، 1993). تبيّن نباتات الفلوكس المصابة تثخناً وهشاشة في السيقان إضافةً إلى قصر الفواصل العقدية التي تميل إلى الانفصال. وتتمثل الميزة الفريدة لهذه العوائل في تجعد وتقلص صفائح الأوراق العليا، والتي قد ينكمش الجزء الأعلى منها ليتحول إلى خيوط ضئيلة. ومن بين النباتات التي تُعتبر عوائل وتعاني تشوهاً في النمو وتورماً وما إليه من الأعراض، هناك أنواع وأصناف من *Anemone*، *Calceolaria*، *Cheiranthus*، *Gypsophila*، و *Helenium*، و *Heuchera*، و *Lychnis*، و *Lysimachia*، و *Penstemon* (Roberts، 1981). وأفاد Edwards (1937) عن تفرّج، وتشوه للأوراق، وعفن وعجز عن الإزهار في نباتات *Primula spp*. وأمّا النباتات الخشبية فهي غالباً ما لا تتعرض للهجوم، إنما قد تُصاب نباتات *Hydrangea* بآفة *D. dipsaci*، ما يسبّب خللاً في الأضلاع غير الخشبية، وتورماً في السويقات والعروق الرئيسية، وزيادة في تجعد صفائح الأوراق. وتشكّل عادةً الأوراق المتجعدة العلامة الأولى عن الإصابة. ويظهر على نباتات خشبية أخرى، *Yucca smaliana*، خللٌ في الأوراق وتورمات شبيهة بالبتور.

2-1-3 *Ditylenchus destructor*

بحسب Brzeski و Sturhan (1991)، تتطفل آفة *D. destructor* بصورة خاصة على الدرنات (مثل البطاطا والداليا)، والبصيلات (مثل السوسن البصلي، والتوليب والدلبوث) والمحا صيل الجذرية (مثل الشمندر السكري والجزر). وهي قادرة على تدمير الخيط الفطري في *Agaricus hortensis* (الفطر المستزرع). وتشمل عوائل أخرى *I. batatas*، و *A. sativum*، و *P. vulgaris*، و *Angelica sinensis* ("dong quai" أو الجينسنغ)، و *Panax ginseng* (الجينسنغ)، و *Taraxacum officinale*، و *Begonia spp*، وبصيلات *Erytronium denscanis* (dog's tooth violet).

Dahlia spp و *Solanum tuberosum* لا تظهر أي أعراض خلال فترة النمو. فالنيماتود تدخل إلى درنات البطاطا عبر السيقان، وتتواجد معظم هذه الديدان عند أطراف الأجزاء البنية اللون وغير التالفة. ولو أُخذت عيّنة صغيرة من هذا الجزء من الدرنه ووضعت تحت الماء، تبدو كتلة الديدان الصغيرة واضحةً حتى تحت زجاج مكبر بسيط. وتتمثل الأعراض الأولى للإصابة بآفة *D. destructor* في بقع صغيرة بيضاء طباشيرية أو طيفية اللون يمكن ملاحظتها تحت قشرة الدرنه (Brodie، 1998). ولاحقاً، تصبح هذه البقع أكبر حجماً وأعمق لوناً تدريجياً (تمر باللون الرمادي، والبني اللون

والأسود)، وتكتسب ملمساً إسفنجياً (الشكل 8). وهذا ينجم بصورة خاصة عن غزو ثانوي للبكتيريا والفطريات والديدان الأسطوانية الرمامة (Brodie، 1998). وأما في الدرنات التي تعاني إصابة حادة، تظهر عادة مواقع مقوّرة ذات قشرة متشققة، ومتعددة وشبيهة بالورق. لا تتعرض القشرة إلى الهجوم بل تصبح رقيقةً وتتشقق سيما أن الأذسجة المصابة السفلية تجفّ وتتكشم (Brodie، 1998). أخيراً، قد تتحطّ الدرنات بكاملها، وهذه الدرنات التالفة بالكامل تعوم على سطح المياه (الشكل 9). وعلى العكس، لا تظهر تشققات على قشرة *S. tuberosum* المصابة بآفة *D. dipsaci*. وتستمر الديدان الأسطوانية بالتكاثر داخل الدرنات بعد الحصاد، ويمكن أن تصل إلى أعداد كبيرة. وقد تكون الأعراض أكثر وضوحاً بعد التخزين، لكن الإصابات الثانوية بالفطريات والبكتيريا والديدان الحرّة تحصل في الدرنات المصابة.

Beta vulgaris. تؤدي الإصابة إلى كلوم نخرية في الجذور والريزومات. وأفاد Thorne و Dallimore (1951) عن أعراض مماثلة للتقرّح التاجي. وفي الشمندر السكري، بالإضافة إلى خسارة المحصول ينخفض أيضاً محتوى السكر إضافة إلى خسارة الغلّة.

Daucus carota. تؤدي الإصابة إلى شقوق عرضية في قشرة الجزر إضافة إلى لطخات بيضاء في النسيج القشري. وأما الإصابات الثانوية في هذه المواقع بفعل الفطريات والبكتيريا فقد تؤدي أيضاً إلى التحلّل. ويمكن ملاحظة هذا التلف بسهولة في تقطيع عرضي للجزر. فالديدان الأسطوانية تواصل نشاطها التدميري خلال التخزين في فصل الشتاء ويصبح الجزر غير ملائم للاستهلاك.

Tulipa spp و *Iris spp* (Southey، 1993). تؤدي الإصابات إلى علامات خطية رمادية اللون تمتد باتجاه الأعلى بدءاً من الطبقة القاعدية على القشور اللحمية الخارجية. وفيما تتقدم الإصابة، ينتشر التلف عبر نسيج البصيلة بكامله ويسبب جفافاً ثانوياً، وعفنًا في الألياف بما يؤدي إلى سقوط البصيلة. وتبدو البقع البنية اللون بشكل دوائر واضحة حين تُقطع بصيلة مصابة بالعرض. كذلك، يشكل اصفرار الأوراق وموتها أعراضاً ثانوية يسببها تلف في البصيلة وتوقف ممكن لعمل الجذور.

وأظهرت إصابة الجذور الدرنية في نباتات الزينة (*Liatrix spicata* "Gayflower"، "Blazing Star" أو "Button Snakeroot") بآفة *D. destructor* في التخزين البارد في جنوب أفريقيا عفنًا مائلًا إلى السواد حيث تعيش ديدان أسطوانية في أنسجة متاخمة للمواقع المتحللة (Daiber و Van der Vegte، 1983).

3-2 استخراج النيماتود

3-2-1 استخراج النيماتود من البصيلات والثوم

بهدف استخراج النيماتود، يتمّ قطع القشور البصيلات المتضررة في البصيلات (وبخاصة القشور الداخلية) أو فصوص الثوم إلى أجزاء صغيرة ووضعها في وعاء (مثل صحيفة بتري) مع مياه الصنبور في درجة حرارة الغرفة. وللحصول على معلق نقي، يمكن أن توضع الأجزاء على منخل بفتحات بين 200 و250 ميكرونًا مغطى بورق ترشيح بوصفه دعامةً (تقنية صحن Oostenbrink). وبعد ساعة أو أكثر، يمكن رؤية النيماتودات بواسطة مجهر مجسّم (تكبير 40 مرة على الأقل).

3-2-2 استخراج النيماتود من التربة والمواد النباتية

تشكل طريقة قمع Baermann تقنية مرجعية لاستخراج النيماتود من التربة والمواد النباتية (البصيلات، والجذور، وقشور وبذور البطاطا). والقمع مزود بأنبوب مطاطي مربوط بساقه ومغلق برفاقص أو بملقط ملولب. يوضع القمع في دعامة ويُمَلَأُ كله تقريباً بماء الصنبور. ثم، توضع أنسجة التربة أو النباتات المقطعة إلى أجزاء صغيرة في شاش أو محرمة يتم ثنيها بحيث تحتجز المواد، وتغطيها بلطف في الماء داخل القمع. عندها، تمر النيماتودات الناشطة عبر القماش وترقد في أسفل ساق القمع. وبعد بضع ساعات، أو بعد مرور ليلة، تنساب كمية صغيرة من المياه التي تتواجد فيها هذه الديدان وتُفحص تحت المجهر (Hooper و Flegg، 1970).

وفي تقنية مختلفة قليلاً، يتم استبدال القمع بصحن وتفتيت كتل التربة وإزالة بقايا الحجارة والنباتات. ثم، يجري بسط التربة (50 ملم) بشكل متساوٍ على دائرة من منشفة ورقية ذات ثنية واحدة توضع على شاشة بلاستيكية واسعة الشبيكات وموجودة في حاوية بلاستيكية. بعدها، يُسكب الماء في الوعاء حتى تصبح التربة رطبة بكاملها إنما من دون أن تغمرها الماء. يُعطى الوعاء بعدها بصحفة بتري كبيرة للتقليل من تبخر الماء. تُترك هذه الوضعية لمدة 24 ساعة على الأقل، وبعدها توضع التربة جانباً ويُسكب المستعلق الذي يحتوي على النيماتود من الوعاء إلى الصحن لفحصها بواسطة مجهر تشريحي. يمكن استبدال التربة بأنسجة نباتية مقطعة إلى أجزاء صغيرة (Kleynhans، 1997).

وأما تقنية Seinhorst للغشاوة التي تُستخدم في البصيلات والجذريات، فتختلف عن طريقة القمع لدى Baermann سيما أن عصارة النباتات ومنتجات الانحلال السام تُغسل بالماء. ومن الأفضل استخدام هذه الطريقة، مقارنة بطريقة القمع لدى Baermann، في نباتات من فصيلة *Narcissus spp* مثلاً. وفي هذه الطريقة، يوضع قمع Baermann أو صحن Oostenbrink في غشاوة أو ضباب من الماء لتلافي استنفاد الأكسجين. وتنجم هذه الغشاوة عن خراطيم ترش المياه على المواد النباتية، أو باتجاه الأعلى بحيث تعود وتسقط قطرات صغيرة بلطف على المواد النباتية. عندها، تترك النيماتود الحية الأنسجة النباتية وتحملها المياه إلى القمع أو الصحن حيث تترسب. ثم يتم جمع هذه الديدان كل 24 إلى 48 ساعة في إناء زجاجي بفتح الملقط الملولب على ساق القمع أو بجمع عينات على منخل قياس 20-25 ميكرونًا. يمكن مواصلة الاستخراج إلى حد أربعة أسابيع، وهي تقنية يصفها Hooper (1986).

وقد تم تكييف طريقة أخرى لاستخراج آفة *Ditylenchus spp* من المواد النباتية تبعاً لوصف Oliveira وآخرين (2013). تُقطع المواد النباتية إلى أجزاء من سنتيمتر واحد وتوضع في أوعية بسعة 500 ملم مملوءة بمياه الصنبور. يُحدث ثقبان في أغطية هذه الأوعية، يسمح الأول بالوصول إلى أنبوب مضخة حوض مائي ويكون الثاني بمثابة منفذ للهواء. يتم الإبقاء على هذه المواد لمدة 72 ساعة في تهوية مستمرة من المضخة. ثم يُسكب المستعلق الذي ينشأ عبر منخل قياس 1000 ميكرون لإزالة بقايا النباتات، ثم عبر منخل قياس 38 ميكرونًا لاستخراج النيماتود من المستعلق. وهذه الطريقة في التهوية تحول دون تعفن المواد النباتية بحيث تحصل زيادة دنيا في العناصر التي تتغذى من البكتيريا والفطريات، ويبقى عدد كبير من النيماتود حياً. وعند خض الوعاء خلال تهوية المستعلق الذي يحتوي على المواد النباتية، يخرج المزيد من هذه الديدان من الأنسجة الجذرية وبالتالي، هذا يسمح بتقدير مدى إصابة المواد النباتية بالآفة على نحو أكثر دقة.

يمكن أيضاً استخراج النيماتود من المواد النباتية باستخدام طريقة D'Herde و Coolen (1972). تُغسل المواد النباتية، وتُقطع إلى أجزاء بحجم 0.5 سم تقريباً، وتُنقع أجزاء من 5 غرامات في 50 مل من مياه الصنبور في خلط منزلي

بالسرعة الأدنى لمدة دقيقة واحدة. من بين مساويء هذه الطريقة أن عينات كبيرة من النيماتود، مثل آفات *D. dipsaci* البالغة، قد تُقطع إلى إرب في الخلاط. ثم يُغسل المستعلق الذي يحتوي على النيماتود وبقايا الأنسجة عبر منخل قياس 750 ميكرونًا يوضع فوق منخل قياس 45 ميكرونًا. ثم، تُجمع المخلفات على المنخل قياس 45 ميكرونًا وتُسكب داخل أنابيب للطرز المركزي بسعة 50 ملم. ويُضاف حوالي ملم واحد من الكاولين إلى كل أنبوب، ثم يُمزج الخليط بشكل جيد ويخضع للطرز المركزي بسرعة تبلغ 3 000 دورة في الدقيقة الواحدة لمدة 5 دقائق. تُصب المادة الطافية ويُضاف محلول السكر (بكتافة 1.13 غ/سم) إلى الأنابيب. ويُمزج الخليط بعدها جيداً ويخضع للطرز المركزي بسرعة 1 750 دورة في الدقيقة لمدة دقيقة واحدة. بعدها، تُغسل المادة الطافية عبر منخل قياس 45 ميكرونًا، ثم يتم جمع المخلفات ودراسة النيماتود.

وأما فحص الخضار المجففة وغيرها من المحاصيل البقولية للكشف عن وجود آفة *D. dipsaci* فيها فهو إجراء من خطوتين تتمثلان في (1) نقع كمية من البذور في مياه مهوأة خلال الليل، و(2) استخراج جزء من البذور المنقوعة في الغشاوة لمدة ثلاثة أيام. ويمكن تحديد وجود النيماتود في مياه النقع ومستخرج الضباب من خلال غربلة الأجزاء المائية الناجمة عن كل من الخطوتين على أن تخضع للفحص المجهرى لغرض التعرف إليها. وتستغرق هذه العملية سبعة أيام تقريباً، إنما يمكن تقليل بـ هذه المدة إلى ثلاثة أيام بإلغاء الإجراء (2) (اي الاستخراج في الضباب). ويقضي الإجراء المعدل بنقع البقوليات خلال الليل في ماء مهوئ، ثم غربلتها وفحصها تحت المجهر للتعرف إليها.

ولاستخراج النيماتود من التربة، يمكن استخدام الطريقة التالية (بعد Kleynhans، 1997). تُغسل التربة (250 مل) عبر منخل واسع الشبيكات (2 مم) في سطل بسعة 5 لترات. وتُضاف ماء الصنبور بحيث تصبح السعة 5 لترات. ثم يُخلط المستعلق ويُترك ليرقد لمدة 30 ثانية قبل أن يُسكب عبر منخل قياس 45 ميكرونًا. ويُكرر هذا الإجراء بوضع تربة في السطل مرتين، إنما تُقصر أوقات الترسيب إلى 20 ثانية ثم إلى 10 ثوان. وتُنقل بعدها المخلفات من منخل قياس 45 ميكرونًا إلى أنابيب للطرز المركزي من 50 مل. وإذا كان المحلول في الأنابيب رملياً جداً، يمكن إضافة 5 مل من الكاولين في الأنابيب (ويُمزج جيداً) للمساعدة في ترسب النيماتود. ثم تخضع الأنابيب للطرز المركزي بسرعة 1 750 دورة في الدقيقة لمدة 7 دقائق. وتُصب المادة الطافية من كل أنبوب ويتم التخلص منها. كما يُضاف محلول من السكر (450 غ/لتر من الماء) إلى الأنابيب، ويُخلط هذا المزيج من السكر والتربة جيداً قبل إخضاعه مرة أخرى للطرز المركزي بسرعة 1 750 دورة في الدقيقة لمدة 3 دقائق. ثم تُسكب المادة الطافية عبر منخل قياس 45 ميكرونًا، وتُجمع المخلفات، التي تحتوي على النيماتود، في إناء لفحصها. هذه تقنية أساسية، وحسب مهارات التقني ونوع التربة؛ يمكن خسارة إلى حد 40 في المائة من النيماتود. وتشمل طرق أخرى يمكن استخدامها لاستخراج هذه الديدان من التربة تقنية Flegg المعدلة بتقنية Cobb، وطريقة Oostenbrink للتصنيف (المنظمة الأوروبية لوقاية النباتات، 2013 ج). ويصف Hooper وآخرون (2005) طرق استخراج مختلفة جرى تكييفها للاستفادة من حجم النيماتود، وكثافتها وحركتها.

4- التحديد

ويقتصر تحديد آفة *Ditylenchus* spp. بوسائل مورفولوجية على العينات البالغة، ومن الأفضل أن يجري فحص النيماتود من الذكور والإناث من نوع محدد تحت مجهر عالي القدرة. ومن شأن إعداد شرائح رقيقة الجودة أن تسمح بالتعرف إلى آفتي *D. destructor* و *D. dipsaci* بكل تأكيد من خلال الفحص المورفولوجي وحده. وينبغي اللجوء إلى

التحديد المورفولوجي لصغار *Ditylenchus* في عينة بهدف التأكيد فقط على وجود النوع المعني في العينة. ونظراً إلى أن آفة *Ditylenchus spp.* الفطرية تلوث في الكثير من الأحيان المواد النباتية البالية، ينبغي التأني في تحديد العينات في النباتات والتربة على السواء.

1-4 التحديد المورفولوجي

من الأفضل أن يستند تحديد آفتي *D. destructor* و *D. dipsaci* إلى طرق مورفولوجية. ويمكن استخدام الطرق الجزيئية لتحديد هذين النوعين في مستويات الإصابة المتدنية أو في وجود صغار العينات فقط. ويمكن تطبيق الطرق الجزيئية على العينات البالغة التالفة وغير العادية، وفي جميع مراحل الحياة، بما في ذلك المراحل الأولى من النمو، حين يتعذر التوصل إلى تحديد مورفولوجي للأنواع.

1-1-4 إعداد العينات

يتم الإعداد للتحضيرات المؤقتة من أجل تحديد سريع أو دراسة الخصائص التي تلاحظ جيداً في العينات غير المثبتة على النحو التالي (Kleynhans، 1997):

- تُنقل العينات الحية إلى قطرة صغيرة من المياه على شريحة زجاجية.
- يتم تسخين الشريحة لفترة وجيزة فوق نار خافتة، والتحقق من حركة النيماتود من حين إلى آخر. يجب التوقف عن التسخين حالما تتوقف عن الانتفاض.
- توضع ساترة وتُغلق بإحكام حول الأطراف بطلاء للأظافر. وحين يجفّ الطلاء، تصبح الشريحة مع العينات جاهزة للدراسة.

وفي الفحص المجهرى الخفيف، يتم استخراج النيماتود الحية من التربة أو من المواد النباتية، وتُقتل على حرارة متدنية (65-70 درجة مئوية)، مثبتة في FAA (35 في المائة مياه مقطرة، و10 في المائة من 40 في المائة فورمالين، 5 في المائة حمض الخلّ الثلجي، 50 في المائة من 95 في المائة كحول) (Andrássy، 1984) وتُنقل إلى الغليسيرول (Hooper وآخرون، 2005) وتوضع في الغليسيرين اللامائي بين شرائح الساترة طبقاً لوصف Seinhorst (1959) وGoodey (1963).

ولعملية التحديد في الفحص المجهرى الخفيف، يوصى التكبير من 500 إلى 1 000 مرة (عدسة الغمر بالزيت) إضافة إلى فحص مجهرى لتباين فروق التداخل.

2-1-4 خصائص التشخيص المورفولوجي

يمكن إيجاد مفاتيح الرموز لأنواع *Ditylenchus* في مؤلف Brzeski وViscardi (1993) وBrzeski (1998). ويرد في الجدول 1 أدناه مفتاح الرموز للتمييز بين آفة *Ditylenchus spp.* وأنواع أخرى من tylenchid وaphelenchid.

الجدول 1- مفتاح الرموز للتمييز بين آفة *Ditylenchus spp.* وأنواع أخرى من tylenchid و aphelenchid .

Tylenchida – 2	مخرج غدة الحلق الظهري قرب قاعدة القلم؛ البصيلة الوسطى مستديرة أو بيضاوية الشكل أو غير موجودة.	1
Aphelenchida	مخرج غدة الحلق الظهري في البصيلة الوسطى؛ تكون البصيلة الوسطى مميزة بارزة، ومستطيلة الشكل عادةً	
3	الجزء الأمامي من المريء والبصيلة الوسطى متحدان ضمن وحدة واحدة؛ القلم ليس طويلاً إلا في حالات استثنائية.	2
أنواع أخرى	الجزء الأمامي من المريء يتسع بصورة تدريجية ويندمج مع البصيلة الوسطى؛ القلم طويل جداً، وغالباً ما تتواجد قاعدته في الجزء الأمامي من البصيلة الوسطى.	
4	أنثى بالغة دودية الشكل	3
أنواع أخرى	أنثى بالغة من الطفيليات اللاعنقية والكيسية أو الكثرية الشكل على الجذور.	
5	بصيلة وسطى صمامية	4
أنواع أخرى	بصيلة وسطى من دون صمام ¹	
6	غدد الحلق الموجودة داخل البصيلة القاعدية، لا تتداخل مع الأمعاء أو تتداخل معها بشكل طفيف؛ نادراً ما يكون الإطار الرأسي ظاهراً؛ القلم ضعيف إلى قوي بصورة معتدلة	5
أنواع أخرى	غدد الحلق بشكل فلقة، تتداخل معها الأمعاء؛ الإطار الرأسي قوي؛ القلم ضخم	
7	مبيض واحد؛ فرج خلفي	6
أنواع أخرى	مبيضان؛ الفرغ خلف المحور الاستوائي	

<i>Ditylenchus</i>	الأنثى غير متورمة؛ الجلبة في الأنثى بشكل عميد رباعي مع أربعة صفوف يتألف كل منها من أربع خلايا؛ الجراب لدى الذكور يغطي ثلث الذنب أو أكثر	7
أنواع أخرى	الأنثى متورمة؛ تتألف الجلبة من أكثر من 20 خلية	

المصدر: مقتبس من Heyns (1971) و Siddiqi (2000)

¹ بعض أنواع الطفيليات غير النباتية من آفة *Ditylenchus* ليس فيها بصيلة وسطى صمامية.

تتشابه *D. africanus*، و *D. destructor*، و *D. dipsaci*، و *D. gigas*، و *D. myceliophagus* من حيث المورفولوجيا والقياس، إنما تتمايز عن بعضها بما يلي (الجدول 2)، شرط إمكانية قياس ودراسة العينات من الذكور والإناث.

1-2-1-4 وصف آفة *Ditylenchus dipsaci*

حسب Sturhan و Brzeski (1991)، و Wendt و آخرين (1995) و Brzeski (1998). ترد في الشكل 10 التفاصيل ووجهات النظر.

القياسات (المعايير موصوفة في المنظمة الأوروبية لوقاية النباتات (2013 باء)). (مثل الشوفان، و *Avena sativa* L، حسب Blake، 1962، في Hooper، 1972):

(n = 48 ♀♀): L = 1.3 mm ± 0.009; a = 62 ± 5.6; b = 15 ± 1.4; c = 14 ± 2.1; V = 80 ± 1.5.

(n = 23 ♂♂): L = 1.3 mm ± 0.017; a = 63 ± 11.3; b = 15 ± 1.7; c = 14 ± 2.1; T = 72.

المورفولوجيا العامة. الجسم مستقيم أو تقريباً مستقيم لدى الاسترخاء. الحقل الجانبي ذو أربعة قواطع. الرأس متواصل مع الجسم المتاخم (الشكل 10 باء). يبلغ طول القلم بين 10 و 13 ميكرونًا لدى الإناث، وبين 10 و 12 ميكرونًا لدى الذكور. يمتد مخروط القلم على نصف طول القلم تقريباً، والعقد مدوّرة ونامية جيداً. البصيلة الوسطى عضلية و يبلغ طول تخينات جدران اللعة بين 4 و 5 ميكرون (الشكل 10 ألف). إنحراف البصيلة القاعدية أو الأمعاء المتداخلة لبعض الميكرومتر. المسمّ الإفراغي مقابل الجزء الخلفي من البرزخ أو البصيلة الغدية. يشغل الجزء الفرجي الخلفي من الكيس الرحمي حوالي نصف المسافة أو أكثر بقليل بين الفرج والشرح (الشكل 10 دال). ويغطي الجراب ثلاثة أرباع الذنب لدى الذكور. يتراوح طول الشويكات بين 23 و 28 ميكرونًا، كما أن الذنب لدى الجنسين مخروطي الشكل ومستدق الرأس.

خصائص التشخيص المورفولوجي. القواطع الجانبية (أربعة) (الشكل 10 واو)، القلم الطويل نسبياً، وطول الكيس الفرجي الخلفي والذنب المروّس (الشكل 10 دال) هي الخصائص المميزة لهذه الأنواع (Andrássy، 2007). يمكن تمييز آفة *D. dipsaci* عن آفة *D. gigas* من حيث الجسم الأقصر لدى الإناث (1.0-1.7 مقابل 1.6-2.2 ملم)، والمسافة الأطول بين الفرج والشرح (202-206 مقابل 132-188 ميكرونًا) (Vovlas و آخرون، 2011). ولدى فحص الشويكات من الجهة الجانبية، تبدو أكثر تقوساً في آفة *D. dipsaci* ممّا هي عليه في *D. destructor* (الشكل 10 جيم). أنظر Willemsen و Karssen (2010) لمزيد من المعلومات عن الشويكات واستخدامها في تحديد آفتي *D. dipsaci* و *D. destructor*. تجدر الإشارة إلى أن بذور *V. faba* تتضمن بصورة خاصة يرقات من المرحلة الرابعة.

2-2-1-4 وصف آفة *Ditylenchus destructor*

حسب Sturhan و Brzeski (1991). ترد التفاصيل والآراء في الشكل 11.

القياسات (حسب Goodey، 1952، من عوائل نباتية عالية متنوعة).

($n = 237 \text{♀}$): $L = 1.07 (0.69-1.89) \text{ mm}$; $a = 32 (18-49)$; $b = 7 (4-12)$; $c = 17 (9-30)$; $V = 80 (73-90)$.
($n = 231 \text{♂}$): $L = 0.96 (0.76-1.35) \text{ mm}$; $a = 35 (24-50)$; $b = 7 (4-11)$; $c = 14 (11-21)$; $T = 65 (40-84)$.

المورفولوجيا العامة. العينات البالغة من آفة *D. destructor* هي حيوانات دقيقة أشبه بالديدان، يتراوح طولها بين 0.8 و 1.4 ملم فيما يبلغ عرضها بين 23 و 47 ميكروناً، كما أنها مقوسّة قليلاً عند البطن. وتُلاحظ اختلافات كبيرة لدى العينات البالغة من حيث قياسها وفقاً لعوائلها وعمرها. كذلك، يتشابه الذكور والإناث من حيث المظهر العام. يضم المجال الجانبي ستة قواطع (الشكل 11 واو)، وينخفض عددها إلى قاطعين في منطقة العنق والذنب. الحلقة الجليدية وحلقة الرأس دقيقة، وغالباً ما يكون الرأس أضيّق من الجسم المتاحم، ويمكن تحديد أربعة حلقات في الرأس من خلال فحص مجهري بالالكترن (Wendt وآخرون، 1995). يتراوح طول القلم بين 10 و 12 ميكروناً، وقد لوحظ من حين إلى آخر وجود عينات يبلغ طول القلم فيها 14 ميكروناً. يشكل مخروط القلم نسبة 45 إلى 50 في المائة من طول القلم، كما أن المقابض واضحة ومدوّرة ومنحدرة إلى الخلف. البصيلة الوسطى عضلية، ويبلغ طول تثخينات جدران اللعة (أو الصّمَام) 3 ميكرونات تقريباً. تتداخل البصيلة الخلفية مع الأمعاء على مسافة قصيرة على الجانب الظهري من الجسم، رغم إمكانية ملاحظة انحراف في البصيلة الغديّة في بعض العينات من حين إلى آخر (الشكل 11 ألف). يتواجد المسم الإفراغي مقابل غدّد المريء، كما يمتد الكيس الفرجي الخلفي على ثلاثة أرباع المسافة بين الفرج والشرح (الشكل 11 هاء). ويكون طول البيض ضعف عرضها (Andrássy، 2007). الشفاه في الفرج سميكة وناثئة (الشكل 11 باء) والمبيض الأمامي ممدّد ويصل أحياناً إلى منطقة المريء. يشغل الجزء الفرجي الخلفي من الكيس الرحمي حوالي 40 إلى 98 في المائة من المسافة بين الفرج والشرح، (الشكل 11 هاء). ويحيط الجراب الذكري ما بين 50 و 90 في المائة من طول الذنب، ويبلغ طول الشويكات بين 24 و 27 ميكروناً. يختلف شكل الشويكات في آفة *D. dipsaci* عن شكلها في آفة *D. destructor* إذ نلاحظ فيها قبةً بطنية (الشكل 12) (Willemsen و Karssen، 2010). تمتد الخصية وصولاً إلى قاعدة المريء، والذنب لدى الجنسين مخروطي الشكل، يبلغ طوله ما بين ثلاثة إلى خمسة أعراض الجسم الشرجي، وهو مقوّس عادة من ناحية البطن ومدور عند طرفه.

خصائص التشخيص المورفولوجي. إن آفة *D. destructor* مشابهة لآفة *D. dipsaci*، إنما تختلف عن هذا النوع من حيث المجال الجانبي الذي تظهر فيه ستة قواطع (الشكل 11 واو)، والكيس الفرجي الخلفي الأطول وطرف الذنب المدور على نحو رقيق (الشكل 11 دال). وتختلف مورفولوجيا *D. destructor* عن *D. africanus* بصورة خاصة من حيث طول القلم الذي قد يتداخل بشكل طفيف، وطول الشويكات، ما يحتم وجود ذكور في أعداد هذه الجراثيم. وتتميز تكنولوجيا تفاعل البلمرة المتسلسل بحساسية كافية لحلّ الفروقات بين الأصناف المتصلة ببعضها بشكل وثيق. لقد استخدم Wendt وآخرون (1995) تعدّد الأشكال لطول جزء القطع لفصل *D. destructor* عن *D. africanus* ولدى فحص الآفة من الناحية الجانبية، تكون الشويكة أقل تقوّساً في *D. dipsaci* ممّا هي عليه في *D. destructor* (الشكل 11 جيم).

ملاحظات: قد تختلف الخصائص المذكورة أعلاه ويكاد يكون من المستحيل تحديد عيّنة واحدة في مستوى النوع. يوصى بفحص عيّنة واحدة على الأقل من الذكور والإناث. ويمكن أن تنخفض القواطع الجانبية لدى الذكر مثلاً إلى أربعة قرب الذنب، ما يشكّل نمطاً مشابهاً للنمط في *D. dipsaci*.

الجدول 2- المقارنة بين خصائص التشخيص في *Ditylenchus africanus*، و *Ditylenchus destructor*، و *Ditylenchus myceliophagus*، و *Ditylenchus gigas*، و *Ditylenchus dipsaci*

<i>D. dipsaci</i> (حسب ،Hooper (1972)	<i>D. gigas</i> (حسب Vovlas وآخرين، (2011)	<i>D. myceliophagus</i> (حسب Hesling)، (1974)	<i>D. africanus</i> (حسب Wendt وآخرين، (1995)	<i>D. destructor</i> (حسب ،Hooper (1973)	الخصائص
1.7 -1.0	2.2-1.6	1.4 -0.6	1.1 -0.7	1.9 -0.8	طول الجسم لدى الإناث (مم)
4	4	6	15-6	6	عدد الخطوط الجانبية
مرؤس	مرؤس إلى مدور بشكل رفيع	مدور	مدور	مدور	شكل طرف الذنب
20-11	27.6 -15.7	17 -8.2	16.9 -8.8	20-14	c (طول الجسم/طول الذنب) لدى الأنثى
غير متداخلة	متداخلة بشكل طفيف	قصيرة، متداخلة من ناحية الظهر	قصيرة، متداخلة من ناحية الظهر	قصيرة، متداخلة من ناحية الظهر	البصيلة الخلفية
12-10	13-10.5	8-7	10-8	14-10	طول القلم (ميكرون) لدى الأنثى
70-40	حوالي 50 ⁽²⁾	69-30	85-37	90-53	الجزء الفرجي الخلفي من الكيس الرحمي (PUS)/ المسافة بين الفرج والشرح (%) ⁽¹⁾
28-23	28-23.5	20-15	21-17	27-24	طول الشويكات (ميكرون)
70-40	76-72	55-20	66-48	70-50	طول الجراب (كنسبة مئوية من طول الذنب)
النباتات الأعلى والفطريات	النباتات الأعلى	غصينات فطرية	القول السوداني والفطر	نباتات أعلى وغصينات فطرية	أفضلية العوائل ⁽³⁾

(1) PUS — الجزء الفرجي الخلفي من الكيس الرحمي

(2) محتسبة من وصف النوع

(3) مفيد في حال وجود معايير مورفولوجية محيرة

2-4 التحديد الجزيئي

عند الضرورة، يمكن إجراء تحديد جزيئي لنوعي *D. dipsaci* أو *D. destructor*، وبخاصة حين تكون الأنواع محيرة (مثل *D. myceliophagus*، أو *D. africanus*، أو *D. gigas*)، ولا يمكن تمييزها بشكل حاسم عن الأنواع المستهدفة مورفولوجياً.

وفي هذه الحالة، من الأفضل تخزين المحلول الذي يتضمن النيماتود في ظروف باردة (أي مثلاًجة) إنما ليس لأكثر من بضعة أيام قبل استخراج الحمض النووي.

وفي هذا البروتوكول التشخيصي، يتم وصف الطرق (بما في ذلك الإشارة إلى الأسماء التجارية) حال نشرها حيث أنها تحدد المستوى الأصلي الذي تحقق بالنسبة للحساسية والخصوصية و/أو إمكانية الاستدساخ. إن استخدام أسماء المواد المطهرة، والمواد الكيميائية أو الأجهزة في بروتوكولات التشخيص لا يعني المصادقة عليها واستبعاد بعضها الآخر التي قد تكون مناسبة. ويمكن مواءمة الإجراءات المخبرية الواردة في البروتوكولات للمعايير الخاصة بمختبرات فردية، شريطة أن تكون مجازة تماماً.

1-2-4 آفة *Ditylenchus dipsaci*

وُضعت نهج جزيئية مختلفة لتحديد آفة *D. dipsaci*.

لقد تمّ استخدام التهجين (Wendt وآخرون، 1993) والارتحال الكهربائي (Evans و Tenente، 1997، Palazova و Baicheva، 2002) للتحقق من مفهوم الأصناف داخل فصيلة *D. dipsaci* والتنوع الوراثي بين أنواع *Ditylenchus*. وتمّ التحقق بشكل تفصيلي من النهج الجزيئية من أجل تحديد محدد، وبخاصة بواسطة تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل أو تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل - تعدد الأشكال لطول جزء القطع (PCR-RFLP)، وللكشف عن التقلب في الأعداد من خلال تحليل التتابع (Leal-Bertioli وآخرون، 2000؛ Zouhar وآخرون، 2002).

وقد نُشرت ستة اختبارات جزيئية (تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل أو تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل - تعدد الأشكال لطول جزء القطع) يمكن استخدامها في تحديد آفة *D. dipsaci*؛ ويرد وصفها في الأجزاء 4-2-4 إلى 9-2-4. كذلك، يشمل الوصف دقائق كل اختبار، إضافةً إلى جنس وأنواع النيماتود التي جرى تقييم كل اختبار بشأنها.

وإن التحليل الجزيئي لتسلسلات الحمض النووي الريبسي، بما في ذلك المناطق المختلفة (منطقة تتابع مبادئ النسخ الداخلي 5.8S-ITS21-، والجزء D2-D3 من جينات *s8S*، ووحدة S18 الفرعية الصغيرة، والجينات الجزيئية المتقدرة من أجل *cytochrome c oxidase I* (الحمض النووي المتقدري) وتسلسلات الجينات *hsp90* (الحمض النووي)، يميّز بشكل واضح بين *D. dipsaci s.s.* و *D. gigas* (Vovlas وآخرون، 2011).

2-2-4 آفة *Ditylenchus destructor*

يستند التشخيص الجزيئي لآفة *D. destructor* على تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل - تعدد الأشكال لطول جزء القطع أو تسلسل منطقة مبادئ النسخ الداخلي لجينات الحمض النووي الريبسي.

بين Wendt وآخرون (1993) أن تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل – تعدد الأشكال لطول جزء القطع في منطقة مبادئ النسخ الداخلي سمح بتمييز آفة *D. destructor* التي تتطفل على البطاطا عن صنفين من *D. dipsaci* وعن *D. myceliophagus*. وقد نشروا تشخيص ملامح تعدد الأشكال لطول جزء القطع لهذه الأنواع الثلاثة. ويمكن تمييز آفة *D. africanus* عن *D. destructor* من خلال المزج بين الخصائص التالية: تعدد الأشكال لطول جزء القطع التي تولدها سبعة أنزيمات تقييد على منطقة مبادئ النسخ الداخلي لجينات الحمض النووي الريبسي.

حصل Ji وآخرون (2006) على ملامح تعدد الأشكال لطول جزء القطع لعدة مجتمعات *D. destructor* من البطاطا الحلوة، وكشفوا عن بعض الاختلافات في ملامحها المتصلة بتعدد الأشكال لطول جزء القطع.

قام Powers وآخرون (2001) أولاً بترتيب تتابع مبادئ النسخ الداخلي لآفة *D. dipsaci*، إنما تتوفر حالياً في قاعدة بيانات بنك الجينات أكثر من 50 تسلسلاً لأجزاء الحمض النووي الريبسي التي تم الحصول عليها من جراثيم ديدان *D. destructor* جرى جمعها من مواقع ونباتات عائلة مختلفة.

3-2-4 استخراج الحمض النووي

يُنقل العديد من العينات الصغيرة أو البالغة إلى أنبوب مجهري، ويُستخرج الحمض النووي منها. يقوم Webster وآخرون (1990) بوصف عملية استخراج الحمض النووي.

4-2-4 اختبار تتابع مبادئ النسخ الداخلي – الحمض النووي الريبسي – تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل – تعدد

الأشكال لطول جزء القطع لآفتي *D. destructor* و *D. dipsaci*

وضع Wendt وآخرون هذا الاختبار (1993).

المنهجية

البادئات العامة للحمض النووي الريبسي في مبادئ النسخ الداخلي (الموصوفة في Vrain وآخرون (1992)) المستخدمة في هذا الاختبار هي:

18S: 5'-TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT-3'

26S: 5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3'

الأمبليكونات هي 900 زوج قاعدي لكل من آفتي *D. dipsaci* و *D. myceliophagus*، و 1200 زوج قاعدي لآفة *D. destructor*.

يتم الحصول على التضخيم عقب توصيات المصنِّع لرزم تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل التي تحتوي على وحدات من بوليميراز الحمض النووي تاك، ونيوكليوتيد وداريء تفاعل.

تتألف بارامترات تدوير تفاعل البلمرة المتسلسل¹ من دورة أولى لمدة 1.5 دقيقة على حرارة 96 درجة مئوية، و 30 ثانية على حرارة 50 درجة مئوية و 4 دقائق على حرارة 72 درجة مئوية؛ و 40 دورة من 45 ثانية على حرارة 96 درجة

¹ بارامترات تدوير تفاعل البلمرة المتسلسل موصوفة في المقالة الأساسية (Wendt وآخرون، 1993). وقد يؤدي تحسين أجهزة التدوير الحرارية والمواد المطهرة لتفاعل البلمرة المتسلسل إلى مراجعة بارامترات التدوير المذكورة.

مئوية، و30 ثانية على حرارة 50 درجة مئوية و4 دقائق على حرارة 72 درجة مئوية؛ ودورة أخيرة لمدة 45 ثانية بدرجة 96 درجة مئوية، و30 ثانية على حرارة 50 درجة مئوية و10 دقائق على حرارة 72 درجة مئوية. وبعد تضخيم الحمض النووي، يوضع 2 إلى 5 ميكرونات من المنتج على هلام الأغاروس بتركيز 1 في المائة ويخزن الباقي على حرارة 20 درجة مئوية تحت الصفر ويستخدم في تعدد الأشكال لطول جزء القطع. وتكون عدة أنزيمات قطع مفيدة لتمييز آفتي *D. destructor* و *D. dipsaci* عن أنواع أخرى من *Ditylenchus* مثل *HaeIII*، و *HpaII*، و *HinfI* و *RsaI* (Wendt وآخرون، 1993). ويرد في الجدول 3 طول أجزاء القطع الناجمة عن أنزيمات التشخيص هذه.

الجدول 3- الطول التقريبي لأجزاء قطع الحصر ذات التكوين والطول المتعددة في الحمض النووي الريبسي في مبادئ النسخ الداخلي لأنواع *Ditylenchus* الناجمة عن 4 أنزيمات حصر

الأنزيم	<i>D. destructor</i>	<i>D. myceliophagus</i>	<i>D. dipsaci</i>	<i>D. gigas</i> ¹	<i>D. africanus</i>
منتج تفاعل البلمرة المتسلسل غير المحصور	1 200	900	900	900	1 000
<i>HaeIII</i>	450, 170	450, 200	900	800, 200	650, 540
<i>HpaII</i>	1 000	900	320, 200, 180	600, 200	950
<i>HinfI</i>	780, 180	630, 310	440, 350, 150	350, 150	450, 340, 150, 130, 100
<i>RsaI</i>	600, 250, 170	900	450, 250, 140	490, 450	690, 450

المصدر: Wendt وآخرون (1993، 1995).

الأزواج القاعدية؛ مبادئ النسخ الداخلي؛ وتفاعل البلمرة المتسلسل؛ وتعدد الأشكال لطول جزء القطع؛ والحمض النووي الريبسي.

¹ مسماة في الورقة الأساسية بوصفها صنف عملاق من آفة *D. dipsaci*

4-2-5 اختبار تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل القائم على منطقة التضخيم المتتالي لآفة *D. dipsaci*

لقد صُمم اختبار تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل القائم على منطقة التضخيم المتتالي، الذي وضعه Esquibet وآخرون (2003)، على أنه اختبار خاص بالأنواع لآفة *D. dipsaci* مع التمييز بين الأصناف العادية والعملاقة منها. ويجري تقييمها مقارنةً بآفة *D. myceliophagus* (مجتمع واحد)، وصنف واحد من آفة *D. dipsaci* (11 مجتمعاً من عوائل ومواقع مختلفة)، وصنف عملاق من آفة *D. dipsaci*، يصفه Vovlas وآخرون (2011) بأنه *D. gigas* (11 مجتمعاً من مواقع مختلفة معزولة *V. faba*).

المنهجية

البادئات المستخدمة والخاصة بآفة *D. dipsaci* هي :

D. dipsaci (الصنف العادي) :

H05: 5'-TCA AGG TAA TCT TTT TCC CCA CT-3'

H06: 5'-CAACTG CTA ATG CGT GCT CT-3'

D. dipsaci صنف عملاق، يصفه Vovlas وآخرون (2011) بأنه (*D. Gigas*)

D09: 5'-CAA AGT GTT TGA TCG ACT GGA-3'

D10: 5'-CAT CCC AAA ACA AAG AAA GG-3'

وأما الأمبليكون فهو تقريباً 242 زوجاً قاعدياً لآفة *D. dipsaci* (الصنف العادي) و198 زوجاً قاعدياً لآفة *D. dipsaci* (الصنف العملاق). ولهاتين المجموعتين من البادئات، لا يُلاحظ أي تضخيم لدى أنواع غير مستهدفة وأصناف غير مستهدفة (Esquibet وآخرون، 2003).

ويتألف خليط تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل البالغ 10 ميكرونات من: 1.5 ميلليمولار من كلوريد المغنيزيوم $MgCl_2$ ، و250 ميكرومولار من ثلاثي فوسفات النيوكلييتيد منقوص الأكسجين (dNTP)، و690 نانومولار من كل بادئة لتفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل المزدوج (H05-H06) أو (D09-D10) أو 500 نانومولار من كل بادئة لتفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل المتعدد (H05-H06-D09-D10) و0.5 وحدة من بوليميراز الحمض النووي تاك. وأما بارامترات التدوير فهي: خطوة مسخ أولية لمدة 3 دقائق على حرارة 94 درجة مئوية؛ وخطوة استطالة نهائية لمدة 10 دقائق على حرارة 72 درجة مئوية. ويتم تحليل نواتج تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل بواسطة الارتحال الكهربائي لهلام الأغاروس.

4-2-6 اختبار 18S واختبار تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل الخاص بمباعد النسخ الداخلي 1 لآفة *D. dipsaci*

صُمم هذا الاختبار الذي وضعه Subbotin وآخرون (2005) على أنه اختبار خاص بالأنواع لآفة *D. dipsaci s.s.* (الصنف العادي فقط). وجرى تقييمه مقارنة بآفة *D. destructor* (مجتمع واحد)، والصنف العادي من آفة *D. dipsaci* (18 مجتمعاً من عوائل ومواقع مختلفة) وآفة *Ditylenchus sp.* (12 مجتمعاً من عوائل ومواقع مختلفة).

المنهجية

البادئات الخاصة بآفة *D. dipsaci* والمستخدمه هي :

rDNA2: 5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3' (Vrain وآخرون، 1992)

DitNF1: 5'-TTA TGA CAA ATT CAT GGC GG-3'

يبلغ هذا التضخيم حوالي 263 زوجاً قاعدياً لآفة *D. dipsaci s.s.* (الصنف العملاق، المسمّى لاحقاً *D. gigas*، غير مشمول). ولا يُلاحظ أي تضخيم لدى الأنواع غير المستهدفة.

يتألف خليط تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل البالغ 25 ميكرونات من: تركيز مرة واحدة من أصل تركيز 10 مرات لداريء تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل بما في ذلك 15 ميلليمولار من كلوريد المغنيزيوم $MgCl_2$ ، و0.2 ميلليمولار من كل ثلاثي

فوسفات النيوكلييتيد منقوص الأكسجين (dNTP)، و60 نانو ميترمولار لكل بادئة ووحدة واحدة من بوليميراز الحمض النووي تاك. ويجري تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل باستخدام جهاز تدوير حراري من نوع بيلتييه (Peltier) مجهز ببئر 96 (MJ Research²، PTC100) مع بارامترات التدوير التالية: خطوة مسخ أولية لمدة 4 دقائق على حرارة 94 درجة مئوية؛ و35 دورة من 15 ثانية على حرارة 94 درجة مئوية، و30 ثانية على حرارة 72 درجة مئوية؛ وخطوة استطالة نهائية لمدة 10 دقائق على حرارة 72 درجة مئوية. ويتم تحليل نواتج تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل بواسطة الارتحال الكهربائي لهلام الأغاروس.

4-2-7 اختبار تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل الخاص بالحمض النووي الريبسي 5.8S لآفة *D. dipsaci*

صُمم هذا الاختبار الذي وضعه Marek وآخرون (2005) على أنه اختبار خاص بأنواع آفة *D. dipsaci*. وجرى تقييمه مقارنةً بآفة *D. dipsaci* (ثلاثة مجتمعات أوروبية من عوائل مختلفة) ومجتمعات من الأصناف غير المستهدفة (*Rhabditis spp.*، *Bursaphelenchus xylophilus*، *Globodera pallida*).

المنهجية

وُضعت مجموعتان من البادئات المحددة لتحديد آفة *D. dipsaci*، إنما البادئات الأكثر حساسية (تم الكشف عن 10 pg من الحمض النووي المستهدف) هي:

PF1: 5'-AAC GGC TCT GTT GGC TTC TAT-3'

PR1: 5'-ATT TAC GAC CCT GAG CCA GAT-3'

يبلغ الأمبليكون في هذه المجموعة من البادئات حوالي 327 زوجاً قاعدياً لآفة *D. dipsaci*.

يتألف خليط أنزيم تفاعل البلمرة المتسلسل البالغ 25 ميكرونياً من: مادة دائرة تاك مركزة مرة واحدة، و1.5 ميلليمولار من كلوريد الماغنيزيوم MgCl₂، و200 ميكرو مولار لكل من كل ثلاثي فوسفات النيوكلييتيد منقوص الأكسجين (dNTP)، و10 بيكومولار لكل بادئة (مجموعة بادئات PF1-PR1) و1.5 وحدة من بوليميراز الحمض النووي تاك (Fermentas²). وقد وُضع اختبار تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل باستخدام جهاز تدوير حراري من نوع بيلتييه (Peltier) مجهز ببئر 96 (MJ Resarch²، PTC200) ببارامترات التدوير التالية: 3 دقائق على حرارة 94 درجة مئوية؛ و30 دورة من دقيقتين على حرارة 94 درجة مئوية، و30 ثانية على حرارة 62 درجة مئوية ودقيقتين على حرارة 72 درجة مئوية؛ وخطوة استطالة نهائية لمدة 10 دقائق على حرارة 72 درجة مئوية. ويتم تحليل نواتج تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل بواسطة الارتحال الكهربائي لهلام الأغاروس.

² في هذا البروتوكول التشخيصي، يتم وصف الطرق (بما في ذلك الإشارة إلى الأسماء التجارية) حال نشرها حيث إنها تحدد المستوى الأصلي الذي تحقق بالنسبة للحساسية والخصوصية و/أو إمكانية الاستنساخ. وإن استخدام أسماء المواد الكيميائية أو الأجهزة في بروتوكولات التشخيص لا يعني المصادقة عليها واستبعاد بعضها الآخر التي قد تكون مناسبة. ويمكن مواءمة الإجراءات المخبرية الواردة في البروتوكولات للمعايير الخاصة بمختبرات فردية، شريطة أن تكون مجازة تماماً.

4-2-8 اختبار تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل الخاص بالحمض النووي الريبسي 5.8S ومبادئ النسخ الداخلي لآفة *D. dipsaci*

صُمم هذا الاختبار الذي وضعه Kerkoud وآخرون (2007) على أنه اختبار خاص بأنواع آفة *D. dipsaci*. وجرى تقييمه مقارنة بآفة *D. dipsaci* (عشرة مجتمعات من عوائل ومواقع مختلفة)، وآفات *D. africanus*، و *D. destructor*، و *D. myceliophagus*، و *Aphelenchoides ritzemabosii* (مجتمع واحد من كل نوع)، وآفة *Ditylenchus sp.* (وفقاً للورقة والموصوفة الآن بأنها *D. gigas* (10 مجتمعات من عوائل ومواقع مختلفة معزولة عن *V. faba*)).

المنهجية

تُستخدم مجموعتان من البادئات المحددة، الأولى لتحديد آفة *D. dipsaci* وحدها والثانية لتحديد آفة *D. gigas* و *D. dipsaci*. ويسمح استخدام المجموعتين من البادئات الفصل بين آفة *D. gigas* وآفة *D. dipsaci*. والبادئات هي التالية: المجموعة الأولى من البادئات:

DdpS1: 5'-TGG CTG CGT TGA AGA GAA CT-3'

rDNA2: 5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3' (Vrain وآخرون، 1992)

يبلغ الأمبليكون حوالي 517 زوجاً قاعدياً لآفة *D. dipsaci*. ولا يُلاحظ أي أمبليكون لدى أنواع غير مستهدفة، بما في ذلك آفة *D. gigas*.

المجموعة الثانية من البادئات:

DdpS2: 5'-CGA TCA ACC AAA ACA CTA GGA ATT-3'

rDNA2: 5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3' (Vrain وآخرون، 1992)

يبلغ الأمبليكون حوالي 707 زوجاً قاعدياً لآفة *D. dipsaci* و *D. gigas*.

يتألف خليط أنزيم تفاعل البلمرة المتسلسل البالغ 20 ميكروناً من: دارئ تضخيم من 1.5 ميكروميلا مع كلوريد الماغنيزيوم $MgCl_2$ نهائي، وتركيز يبلغ 5 ميكروميلا، و 200 ميكروميلا من كل ثلاثي فوسفات النيوكليوتيد منقوص الأكسجين (dNTP)، و 0.5 ميكروميلا لكل بادئة (في تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل البسيط مع DdpS1-rDNA2 أو DdpS2-rDNA2؛ وفي تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل المزدوج، يبلغ التركيز النهائي لبادئة DdpS1 0.5 ميكروميلا في حين أنها تبلغ ميكروميلا واحد في بادئتي DdpS2 و rDNA2) و وحدة واحدة من بوليميراز الحمض النووي تاك (MP Biomedicals). وقد وُضع اختبار تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل باستخدام جهاز تدوير حراري من نوع بيلتييه (Peltier) مجهز ببئر 96 (نظام GeneAmp 9600 PCR، Perkin Elmer²)، باعتماد بارامترات التدوير التالية: دقيقة واحدة على حرارة 94 درجة مئوية؛ 40 دورة لمدة 30 ثانية على حرارة 94 درجة مئوية، و 30 ثانية على حرارة 60 درجة مئوية و 45 ثانية على حرارة 72 درجة مئوية؛ وخطوة استتالة نهائية لمدة 10 دقائق على حرارة 72 درجة مئوية. ويتم تحليل نواتج تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل بواسطة الارتحال الكهربائي لهلام الأغاروس.

4-2-9 اختبار تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل القائم على منطقة التضخيم المتتالي لآفة *D. dipsaci*

صمّم اختبار تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل القائم على منطقة التضخيم المتتالي الذي وضعه Zouhar وآخرون (2007) بوصفه اختباراً خاصاً بالأنواع لآفة *D. dipsaci*. وقد جرى تقييمه مقارنةً بآفة *D. dipsaci* فقط (عشرة مجتمعات أوروبية من عوائل مختلفة).

المنهجية

جرى تصميم مجموعتين من البادئات المحددة لتحديد آفة *D. dipsaci*:

المجموعة الأولى من البادئات:

DIT_2 forward: 5'-GCA ATG CAC AGG TGG ATA AAG-3'

DIT_2 reverse: 5'-CTG TCT GTG ATT TCA CGG TAG AC-3'

يبلغ الأمبليكون في هذه المجموعة من البادئات حوالي 325 زوجاً قاعدياً لآفة *D. dipsaci*.

المجموعة الثانية من البادئات:

DIT_5 forward: 5'-GAA AAC CAA AGA GGC CGT AAC-3'

DIT_5 reverse: 5'-ACC TGA TTC TGT ACG GTG CAA-3'

يبلغ الأمبليكون في هذه المجموعة من البادئات حوالي 245 زوجاً قاعدياً لآفة *D. dipsaci*.

يتألف خليط أنزيم تفاعل البلمرة المتسلسل البالغ 25 ميكروناً من: مادة دارثة من تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل مركزة مرة واحدة (Fermentas²)، و1.5 مللي مولار من كلوريد الماغنيزيوم MgCl₂، و200 ميكرو مولار بيتتر من كل ثلاثي فوسفات النيوكلييتيد منقوص الأكسجين (dNTP)، و10 بيكومولار لكل بادئة (إما مجموعة البادئة DIT_2 أو DIT_5) و1.5 وحدة من بوليميراز الحمض النووي تاك (Fermentas²)، وحمض نووي بتركيز 50 نانوغرام كنموذج. يجري اختبار تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل باستخدام جهاز تدوير حراري من نوع بيلتينييه مجهز ببئر 96 (PTC200، MJ Resarch²) ببارامترات التدوير التالية: 3 دقائق على حرارة 94 درجة مئوية؛ و30 دورة من دقيقة واحدة على حرارة 94 درجة مئوية، و30 ثانية على حرارة 60 درجة مئوية ودقيقة واحدة على حرارة 72 درجة مئوية؛ وخطوة استطالة نهائية لمدة 10 دقائق على حرارة 72 درجة مئوية. ويتم تحليل نواتج تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل بواسطة الارتحال الكهربائي لهلام الأغاروس.

4-2-10 الشواهد الخاصة بالاختبار الجزيئي

من أجل الركون إلى نتيجة الاختبار، من الضروري وجود الشواهد المناسبة - التي تعتمد على نوع الاختبار المستخدم ومستوى الجزم المطلوب - لكل سلسلة من عمليات عزل الحمض النووي وتضخيم الحمض النووي للآفة المستهدفة أو الحمض النووي المستهدف. كما أن الشاهد الإيجابي للحمض النووي، والشاهد السلبي للتضخيم، وشاهد الاستخراج السلبي هي شواهد الحد الأدنى التي يجب استخدامها.

الشاهد الإيجابي للحمض النووي: يُستخدم هذا الشاهد لرصد كفاءة التضخيم (بعيداً عن الاستخراج). ويمكن استخدام الحمض النووي المعدّ مسبقاً (المخزّن) في النيماتود المستهدفة.

شاهد التضخيم السلبي (بدون شاهد نمونج). هذا الشاهد ضروري في تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل التقليدي من أجل استبعاد النتائج الإيجابية المضللة الناجمة عن التلوث خلال إعداد خليط التفاعل. ويضاف ماء تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل الذي كان قد استعمل من أجل إعداد خليط التفاعل، في مرحلة التضخيم.

شاهد الاستخراج السلبي. يُستخدم هذا الشاهد لرصد التلوث خلال استخراج الحمض النووي. ويضم هذا الشاهد استخراج الحمض النووي والتضخيم اللاحق لدارىء الاستخراج فقط. ويُنصح باستخدام شواهد متعددة حين تكون أعداد كبيرة من العينات الإيجابية متوقّعة.

4-2-11 تفسير نتائج تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل التقليدي

يعتبر تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل الخاص بالمرض المحدد صالحا فقط إذا تم استيفاء المعايير التالية:

- أن ينتج الشاهد الإيجابي أمبليكونا للآفة من الحجم الصحيح لأنواع النيما تود المستهدفة.
- عدم إنتاج أمبليكونات من الحجم الصحيح لأنواع النيما تود المستهدفة في الشاهد السلبي للاستخراج والشاهد السلبي للتضخيم.

5- السجلات

ينبغي الاحتفاظ بالسجلات والبراهين حسب ما هو مبين في المعيار 27 من المعايير الدولية لتدابير الصحة النباتية (بروتوكولات تشخيص الآفات الخاضعة للوائح).

وينبغي الاحتفاظ بالسجلات والبراهين (خاصة العينات المحفوظة أو الموضوعة على شرائح، وصور الهياكل التصنيفية المميزة، ومستخلصات الحمض النووي وصور المواد الهلامية، حسب الاقتضاء) لمدة عام على الأقل في الحالات التي يمكن فيها أن تتأثر أطراف متعاقدة أخرى بنتائج التشخيص.

6- جهات الاتصال للحصول على معلومات إضافية

يمكن الحصول على مزيد من المعلومات عن هذا البروتوكول من:

جمهورية جنوب أفريقيا، Biosystematics Division, ARC-PPRI, Private Bag X134, Queenswood, 0121
(Antoinette Swart; e-mail: SwartA@arc.agric.za)

مركز تشخيص الآفات النباتية، إدارة كاليفورنيا للأغذية والزراعة، Meadowview Road, Sacramento, CA 3294، 95832-1448، الولايات المتحدة (Sergei Subbotin; e-mail: subbotin@ucr.edu)

مختبر Charlottetown - أمراض البطاطا، الوكالة الكندية لفحص الأغذية، 93 Mount Edward Rd, Charlottetown PEI, C1A 5T1 كندا (Harvinder Bennypaul; البريد الإلكتروني: bennypaulhs@inspection.gc.ca)

ويمكن تقديم طلب لإعادة النظر في بروتوكول التشخيص من قبل المنظمات القطرية الخاصة بوقاية النباتات والمنظمات الإقليمية لوقاية النباتات أو الأجهزة التابعة لهيئة تدابير الصحة النباتية من خلال أمانة الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات (ippc@fao.org) التي ستقوم بدورها بإحالتها إلى الفريق الفني المعني بوضع بروتوكولات التشخيص.

7- شكر وتقدير

حرّر هذا البروتوكول كلّ من السيدة Antoinette Swart (Nematology Unit, Biosystematics Division, ARC-) السيد Eliseo Jorge Chaves (PPRI، جمهورية جنوب أفريقيا)، والسيد Renata C.V. Tenente (Laboratorio de Nematología، الأرجنتين) والسيدة (e Biotecnología، البرازيل).

وجرى وصف التقنيات الجزيئية من جانب السيد Sergei Subbotin (مركز تشخيص الآفات النباتية، إدارة كاليفورنيا للأغذية والزراعة، Meadowview Road, Sacramento, CA 95832-14483294، الولايات المتحدة).

قام أخصائيو النيमतودا التالون بتحسين البروتوكول من خلال تعليقاتهم:

- السيد Harvinder Bennypaul (الوكالة الكندية لفحص الأغذية، كندا)
- السيد Johannes Hallmann (معهد Julius Kühn، ألمانيا)
- السيد Mikhail Pridannikov (مركز الطفيليات، معهد A.N. Severtsov للإيكولوجيا والتطور، روسيا)
- السيد P. Castillo (Instituto Agricultura Sostenible, Consejo Superior de Investigaciones Cientificas، إسبانيا)

8- المراجع

- Andrássy, I.** 1984. Klasse Nematoda (Ordnungen Monhysterida, Desmoscolecida, Araeolaimida, Chromadorida, Rhabditida). In *Bestimmungsbücher zur Bodenfauna Europas* ألمانيا، Gustav Fischer Verlag. ص 509
- Andrássy, I.** 2007. النيماتودا الحية الحرة في هنغاريا (Nematoda Errantia) 2. *In Pedazologica Hungarica* No. 4، ص 154-145. بودابست، المتحف الهنغاري للتاريخ الطبيعي ومجموعة البحث في علم الحيوان في أكاديمية العلوم الهنغارية، ص 496.
- Andrássy, I. & Farkas, K.** 1988. *Kertészeti növények fonálféreg kártevői*. بودابست، Mezőgazdasági Kiadó، ص 198-181. ص 418.
- Barker, J.R. & Lucas, G.B.** 1984. طفيليات النيماتودا في التبغ. *In W.R. Nickle, ed. Plant and insect nematodes*، ص 242-213. نيويورك، Marcel Dekker Inc.، ص 925.
- Bridge, J. & Hunt, D.** 1986. النيماتودا. *In Pest control in tropical onions*، ص 77-65. لندن. معهد التنمية والبحوث الإستوائي ومكتب إدارة التنمية الخارجية، المعهد الاستوائي للتنمية والبحوث، ص 109.
- Brodie, B.B.** 1998. البطاطا. *In K.R. Barker, G.A. Pederson & G.L. Windham, eds. Plant and nematode interactions*، ص 594-567. Madison, WI, American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc. and Soil Science Society of America, Inc. ص 772.
- Brown, D.J.F., Dalmasso, A. & Trudgill, D.L.** 1993. آفات النيماتودا في الفاكهة اللينة والكرمة. *In K. Evans, D.L. Trudgill & J.M. Webster, eds. Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*، ص 462-427. Wallingford, UK, CABI. ص 656.
- Brzeski, M.W.** 1998. *Nematodes of Tylenchina in Poland and temperate Europe*. وارسو، متحف ومعهد علم الحيوان، الأكاديمية البولندية للعلوم. ص 397.
- Chizhov, V.N., Borisov, B.A. & Subbotin, S.A.** 2010. A new stem nematode, *Ditylenchus weischeri* sp.n. (Nematoda: Tylenchida), a parasite of *Cirsium arvense* (L) Scop. in the Central Region of the Non-Chernozem Zone of Russia. *المجلة الروسية لعلم النيماتودا*، 102-18:95.
- Cook, R. & Yeates, G.W.** 1993. آفات النيماتودا في المراعي ومحاصيل العلف. *In K. Evans, D.L. Trudgill and J.M. Webster, eds. Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*، ص 350-305. Wallingford, UK, CABI، ص 656.

In K. Evans, D.L. Trudgill and J.M. Webster, eds. 1993 **Cooke, D.** طفيليات النيماتودا في الشمندر السكري. Wallingford, UK, CABI. 169–133 ص. *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture* 656

A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. 1972 **Coolen, W.A. & D'Herde, C.J.** غانت، بلجيكا، وزارة الزراعة. مركز الدولة للبحوث الزراعية. ص 77

Bulletin of the 1962 **Courtney, W.D.** نيماتودا الساق في النفل الأحمر في شمال غرب المحيط الهادىء. *Washington State Agricultural Experiment Station* 17–1 : 640

،Thorne ، *Ditylenchus destructor* بآفة 1951 **Dallimore, C.E. & Thorne, G.** إصابة الشمندر السكري بآفة *Phytopathology* ، 874–41 : 872 نيماتودا عفن البطاطا،

Combining morphological characters with : نظام جديد للنيماتودا: 2003 **De Ley, P. & Blaxter, M.** molecular trees, and translating clades into ranks and taxa. *Nematological Monographs and Perspectives*, 21–2 : 1

On the eelworm disease of primulas caused by *Anguillula dipsaci*, Kühn. *Journal of Helminthology* 1937 **Edwards, E.E.** 232–15 : 221

PQR: EPPO Plant Quarantine Data Retrieval . 2013 أ. (المنظمة الأوروبية والمتوسطية لوقاية النباتات). EPPO System. Available at <http://www.eppo.org/DATABASES/pqr/pqr.htm>

Diagnostic protocols for regulated pests: 2013 ب. (المنظمة الأوروبية والمتوسطية لوقاية النباتات). EPPO *Pictorial glossary of morphological terms in nematology*. EPPO Technical Document No. 1056 (Rev. 4). متاح على الموقع : http://www.eppo.int/QUARANTINE/diag_activities/EPPO_TD_1056_Glossary.pdf.

EPPO Standard PM (المنظمة الأوروبية والمتوسطية لوقاية النباتات). 2013 ج. استخراج النيماتودا. EPPO 7/119(1). نشرة المنظمة الأوروبية لوقاية النباتات، 43 : 485–471

2003 **Esquibet, M., Grenier, E., Plantard, O., Andaloussi, F.A. & Caubel, G.** النوي في ساق النيماتودا *Ditylenchus dipsaci*: وضع واسمات التشخيص للأصناف العادية والعملاقة. *Genome* ، 46 : 1083–1077

In P.M. 1992 **Evans, K. & Trudgill, D.L.** جوانب الآفات في إنتاج البطاطا الجزء 1. آفات النيماتودا في البطاطا. *The potato crop*, 2nd edn Harris, ed. London, Chapman and Hall. 475–438 ص. 909

In K.R. Barker, G.A. Pederson & 1998 **Ferris, J.M. & Ferris, V.R.** بيولوجيا النيماتودا الطفيلية النباتية. *Plant and nematode interactions* ، G.L. Windham, eds. Madison, WI, American 36–21 ص.

- Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc. and Soil Science Society of America, Inc. ص 772
- Proceedings of the Helminthological Society of Tylenchinae*. Filipjev, I.N. 1936. بشأن تصنيف آفة . Washington 80 : 3-82
- In J.F. Southey, ed. *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*. 1970 Flegg, J.J.M. & Hooper, D.J. النشر الفنية 2، ص 5-22. لندن، وزارة الزراعة ومصايد الأسماك والأغذية. ص 148
- Annals of Applied Biology*. 1952 Goodey, J.B. تأثير العائل على الأبعاد في النيماطودا الطفيلية النباتية، *Ditylenchus destructor*. 30 : 474-468
- Harpden, UK, Nematology Department, *المياه العذبة، والنيماطودا في التربة، والمياه العذبة*. 1963 Goodey, J.B. Rothamsted Experimental Station, and London, Methuen & Co. Ltd. ص 544
- In W.R. Nickle, ed. *Plant and insect nematodes*. 1985 Griffin, G.D. طفيليات النيماطودا في الألفالفا، والحبوب والأعشاب. Marcel Dekker Inc. نيويورك. ص 243-322. ص 925
- Ditylenchus myceliophagus*. CIH descriptions of plant-parasitic nematodes, Set 3, 1974 Hesling, J.J. No. 36. St Albans, UK, Commonwealth Institute of Helminthology (CIH). ص 4
- 1971 Heyns, J. دليل عن نيماطودا النباتات والتربة في جنوب أفريقيا، كايب تاون، A.A. Balkema. ص 233
- Ditylenchus dipsaci*. CIH descriptions of plant-parasitic nematodes, Set 1, No. 14. 1972 Hooper, D.J. St Albans, UK, Commonwealth Institute of Helminthology (CIH) ص 4
- Ditylenchus destructor*. CIH descriptions of plant-parasitic nematodes, Set 2, No. 1973 Hooper, D.J. St Albans, UK, Commonwealth Institute of Helminthology (CIH) ص 4
- In J.F. Southey, ed. *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*. 1986 Hooper, D.J. الكتاب المرجعي 402، النسخة السادسة، ص 51-58. لندن، وزارة الزراعة ومصايد الأسماك والأغذية، ص 202
- 2005 Hooper, D.J., Hallmann, J. & Subbotin, S.A. طرق لاستخراج ومعالجة والكشف عن نيماطودا النباتات والتربة. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. In M. Luc, R.A. Sikora & J. Bridge, eds. Wallingford, UK, CABI. ص 53-86. ص 871

- Jeszke, A., Budziszewska, M., Dobosz, R., Stachowiak, A., Protasewicz, D., Wieczorek, P. & Ditylenchus dipsaci**, 2013. *Obrepałska-Stęplowska, A.* دراسة مقارنة وتاريخية عرقية لآفات *Ditylenchus destructor* and *Ditylenchus gigas* في بولندا. (إعلان قصير). *Journal of Phytopathology*. 67-162:61
- Ji, L., Wang, J.C., Yang, X.L., Huang, G.M. & Lin, M.S.** 2006. [تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل- تعدد الأشكال لطول جزء القطع للتمييز بين الأنواع الثلاثة من آفة *Ditylenchus*]. *Journal of Nanjing Agricultural University*. 39: 29-43 (بالصينية)
- Johnson, C.S.** 1998. التنغ. *Plant and nematode interactions*. ص 487-522. Madison, WI, American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc. and Soil Science Society of America, Inc. ص 772
- Karssen, G. & Willemsen, N.M.** 2010. الشويكة: صفة مفيدة أخرى لتحديد آفتي *Ditylenchus dipsaci* و *D. destructor* (النيماتودا: Anguinidae). نشرة المنظمة الأوروبية لوقاية النباتات، 40: 211-212
- Kerkoud, M., Esquibet, M. & Plantard, O.** 2007. تحديد أنواع *Ditylenchus* المرتبطة ببذور القرنيات بالاستناد إلى تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل لمناطق مبادئ النسخ الداخلي في الحمض النووي الريبي. *European Journal of Plant Pathology*. 118: 323-332
- Kleynhans, K.P.N.** 1997. جمع النيماتودا والمحافظة عليها. دليل دورة عملية في علم النيماتودا من تأليف معهد SAFRINET, the southern African (SADC) LOOP of BioNET-INTERNATIONAL, ARC. بحوث الحماية النباتية، ص 52
- Kühn, J.** 1857. Über das Vorkommen von Anguillulen in erkrankten Blütenköpfen von *Dipsacus fullonum* L. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*. 9: 129-137
- Leal-Bertioli, S.C.M., Tenente, R.C.V. & Bertioli, D.J.** 2000. تتابع مبادئ النسخ الداخلي لمجتمعات نيماتودا الطفيليات النباتية *Ditylenchus dipsaci*. *Nematologia Brasileira*. 24: 83-85
- Marek, M., Zouhar, M., Rysanek, P. & Havranek, P.** 2005. تحليل تتابعات مبادئ النسخ الداخلي للحمض النووي الريبي ووضع تحليل قائم على تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل لتحديد سريع لساق النيماتودا *Ditylenchus dipsaci* (النيماتودا: Anguinidae) في أنسجة النباتات. *Helminthologia*. 42: 49-56
- McDonald, A.H. & Nicol, J.M.** 2005. طفيليات النيماتودا في الحبوب. *Plant parasitic nematodes on subtropical and tropical agriculture*. eds. Luc, R.A. Sikora & J. Bridge. ص 131-192. Wallingford, UK, CABI. ص 896

Mollov, D.S., Subbotin, S.A. & Rosen, C. 2012. التقرير الأول عن آفة *Ditylenchus dipsaci* في الثوم في منيسوتا. *الأمراض النباتية*، 96: 1707

.D. Eisenback & U. Zunke, eds. *A journal of nematological images*, Vol. 2. 1999 **Nemapix**. Blacksburg, VA, Mactode Publications.

J.D. Eisenback & U. Zunke, eds. *A journal of nematological images*, Vol. 1, 2nd edn. 2000 **Nemapix**. Blacksburg, VA, Mactode Publications.

J.D. Eisenback & U. Zunke, eds. *A journal of nematological images*, Vol. 3. 2002 **Nemapix**. Blacksburg, VA, Mactode Publications.

In M. Luc, R.A. Sikora & J. Bridge, eds. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. 1990 **Netscher, C. & Sikora, J.W.**، ص 283–237، *parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*، الص 283–237، Wallingford, UK, CABI.

Oliveira, R.D.L., Santin, Â.M., Seni, D.J., Dietrich, A., Salazar, L.A., Subbotin, S.A., Mundo-Ditylenchus gallaeformans sp.n. 2013 **Ocampo, M., Goldenberg, R. & Barreto, R.W.** (Tylenchida: Anguinidae): A neotropical nematode with biocontrol potential against weedy *Melastomataceae*. *Nematology* 15: 179–196

Palazova, G. & Baicheva, O. 2002. دراسات التحليل الكهربائي لآفة *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn, 1857) في *Allium cepa* و *Allium sativum* من عائلين: 1936. Filipjev *Experimental Pathology and Parasitology*، 39: 5–40

Palmisano, A.M., Tacconi, R. & Trotti, G.C. 1971. Sopravvivenza di *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) al processo digestive nei suini, equini e bovini. *Redia*، 737: 725–52

Potter, J.W. & Olthof, T.H.A. 1993. آفات النيماتودا في محاصيل الخضار. In K. Evans, D.L. Trudgill & J.M. Webster, eds. *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*، ص 171–208، Wallingford, UK, CABI.

Powers, T.O., Szalanski, A.L., Mullin, P.G., Harris, T.S., Bertozzi, T. & Griesbach, J.A. 2001. تحديد نيماتودا عفن البذور ذات أهمية زراعية وتنظيمية مع تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل- تعدد الأشكال لطول جزء القطع في مبادئ النسخ الداخلي 1. *Journal of Nematology*، 33: 191–194.

Rivoal, R. & Cook, R. 1993. آفات النيماتودا في الحبوب. In K. Evans, D.L. Trudgill & J.M. Webster, eds. *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*، ص 259–304، Wallingford, UK, CABI. ص 656 .

- Roberts, H. 1981. سجلات جديدة أو غير اعتيادية للعوائل النباتية لنيماتودا الطفيليات النباتية، 1977-1980. *Plant Pathology*, 30: 182.
- Rojankovski, E. & Ciurea, A. 1986. مساهمات في دراسة التفاعلات بين نيماتودا عفن البطاطا، *Ditylenchus destructor* Thorne، والفطر في مرض البطاطا. *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz*, 22: 106-101.
- Seinhorst, J.W. 1959. طريقة سريعة لنقل النيماتودا من غليسيرين مثبت إلى غليسيرين لامائي، *Nematologica*, 4: 69-67.
- Siddiqi, M.R. 2000. طفيليات *Tylenchida* في النباتات والحشرات، النسخة الثانية. 2nd edn. Wallingford, UK, CABI. ص 864.
- Sikora, R.A., Greco, N. & Silva, J.F.V. 2005. طفيليات النيماتودا في الخضار. In M. Luc, R.A. Sikora & J. Bridge, eds. *Plant parasitic nematodes on subtropical and tropical agriculture*، النسخة الثانية، ص 318-259. Wallingford, UK, CABI.
- Sousa, A.I., Gomes, V.F. & Tenente, R.C.V. 2003. Tratamento fisico aplicado as sementes de melao (Cucumis melo L.), importadas da Holanda, na erradicaçao de *Ditylenchus dipsaci* (Khun, 1857) (Filipjev)، 1936. *Nematologia Brasileira*, 27: 223-225.
- Southey, J.F. 1993. النيماتودا في نباتات الزينة والمحاصيل البصلية. In K. Evans, D.L. Trudgill & J.M. Webster, eds. *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*، ص 463-500. Wallingford, UK, CABI.
- Sturhan, D. & Brzeski, M.W. 1991. نيماتودا السيقان والبصيلات، *Ditylenchus* spp. In W.R. Nickle, ed. *Manual of Agricultural Nematology*، ص 423-464، نيويورك، Marcel Decker Inc.، ص 1064.
- Subbotin, S.A., Madani, M., Krall, E., Sturhan, D. & Moens, M. 2005. تشخيص جزيئي، والسمية والتاريخ العرقي لنيماتودا الساق من نوع *Ditylenchus dipsaci* القائم على تتابعات الحمض النووي الريبسي في مبادئ النسخ الداخلي. *Phytopathology*, 95: 1315-1308.
- Tenente, R.C.V. & Evans, A.A.F. 1997. الارتحال الكهربائي للبروتينات من عدة اصناف من *Ditylenchus dipsaci* يتم استرجاعها من أنسجة الكوسا المجففة المصابة. *Nematologia Brasileira*, 21: 84-91.

، *Ditylenchus dipsaci* وآفة *Ditylenchus destructor*, n. sp., آفة .1945 Thorne, G. *Proceedings of the* (Tylenchidae : نيماتودا) (Kuhn, 1857) Filipjev، 1936، النيماتودا في المشط (نيماتودا: Tylenchidae). *Helminthological Society of Washington*، 12 : 27-33.

1983 Van der Vegte, F.A. & Daiber, K.C. تقرير أولي عن حدوث آفة *Ditylenchus destructor* في نباتات الزينة *Liatris spicata* والجهود لاستئصال الأخيرة. *Proceedings of the 6th Symposium and General Meeting of the Nematological Society of Southern Africa*.

1971 Viglierchio, D.R. تكوّن الصنف في آفة *Ditylenchus dipsaci*. *Nematologica*، 17 : 386-392.

1993 Viscardi, T. & Brzeski, M.W. مفتاح ممكن لتحديد أنواع *Ditylenchus* (النيماتودا): *Fundamental and Applied Nematology*، 16 : 389-392.

Vovlas, N., Troccoli, A., Palomares-Rius, J.E., De Luca, F., Liébanas, G., Landa, B.B., Subbotin, S.A. & Castillo, P. 2011 آفة *Ditylenchus gigas* n.sp. المتطفلة على الفاصولياء العريضة: نيماتودا جديدة في الساق والتميز عن أنواع *Ditylenchus dipsaci* باستخدام نهج متعدد الأطوار مع تحديد التاريخ العرقي الجزيئي. *Plant Pathology*، 60 : 762-775.

1992 Vrain, T.C., Wakarchuk, A.C., Levesque, A.C. & Hamilton, R.I. تعدد الأشكال لطول جزء القطع الخاص بالحمض النووي الرببي في مجموعة *Xiphinema americanum*. *Fundamental and Applied Nematology*، 15 : 563-573.

1990 Webster, J.M., Anderson, R.V., Baillie, D.L., Beckenbach, K., Curran, J. & Rutherford, T. اختبارات الحمض النووي للتمييز بين أنواع نيماتودا خشب الصنوبر. *Revue de Nématologie*، 13 : 255-263.

1995 Wendt, K.R., Swart, A., Vrain, T.C. & Webster, J.M. آفة *Ditylenchus africanus* sp.n من جنوب أفريقيا: توصيف مورفولوجي وجزيئي. *Fundamental and Applied Nematology*، 18 : 241-250.

1993 Wendt, K.R., Vrain, T.C. & Webster, J.M. فصل ثلاثة أنواع من آفة *Ditylenchus* وبعض الأصناف العائلة لآفة *D. dipsaci* عبر تعدد الأشكال لطول جزء القطع. *Journal of Nematology*، 25 : 555-563.

2007 Zouhar, M., Marek, M., Douda, O., Mazáková, J. & Ryšánek, P. تحويل نطاقات منطقة التضخم المتتالي إلى واسمات ذات مردود عالٍ بالاستناد إلى تقنية الحمض النووي متعدد الأشكال والمضخم عشوائياً للكشف عن نيماتودا الساق *Ditylenchus dipsaci* في العوائل النباتية الرئيسية. *Plant Soil and Environment*، 53 : 97-104.

2002 Zouhar, M., Marek, M., Licinio, J. & Ryšánek, P. استخدام التحولات في الحمض النووي الريبسي من أجل التمييز بين الأصناف البيولوجية لآفة *Ditylenchus dipsaci* من الجمهورية التشيكية. *Plant Protection Science*، 38 (خاص 2): 360-358.

9- الأشكال



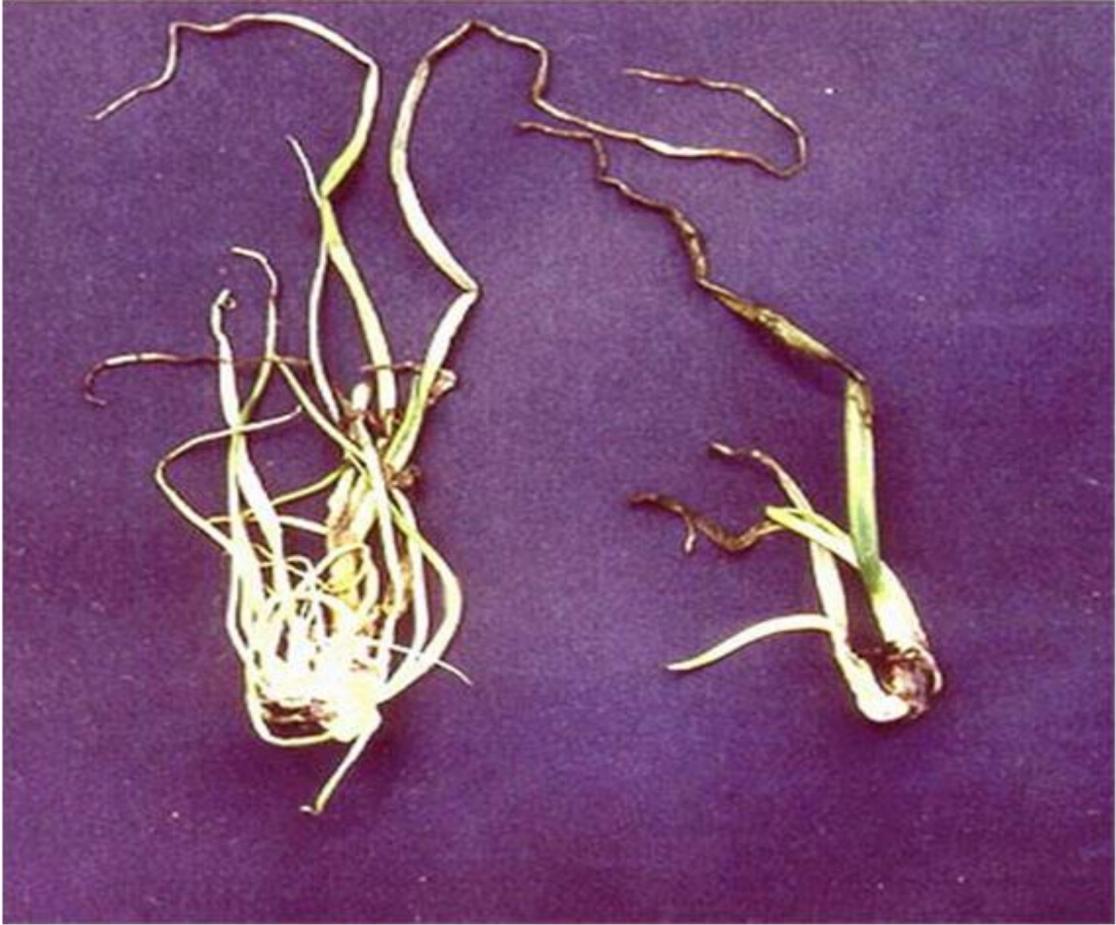
الشكل 1- بذور *Vicia faba* مصابة بآفة *Ditylenchus dipsaci* (ويظهر صوف النيماتودا).

الصورة مقدمة من طرف *Nemapix* G. Caubel, (1999)



الشكل 2- نباتات *Allium sativum* مصابة بآفة *Ditylenchus dipsaci*

الصورة من طرف مقدمة *Nemapix* G. Caubel, (1999)



الشكل 3- نباتات فثية من *Allium cepa* مصابة بأفة *Ditylenchus dipsaci*
الصورة من طرف تقدمة E. Hennig المركز الدولي الوطني للصحة النباتية وفحص البذور، تورون، بولندا



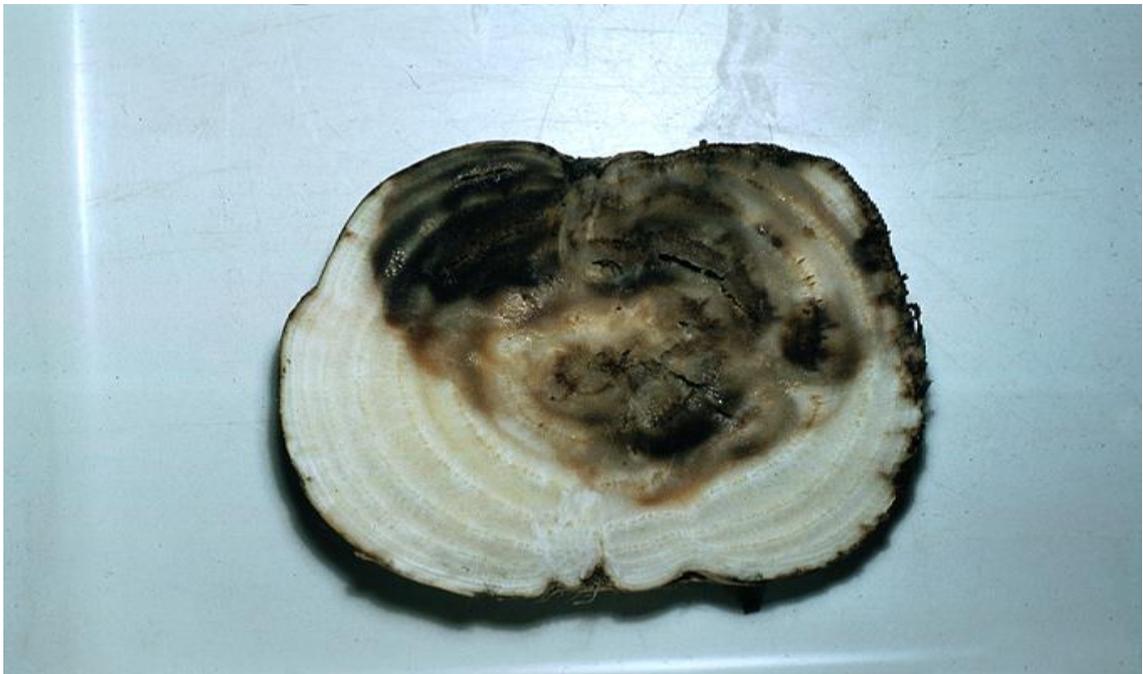
الشكل 4- بصيلة الثوم مصابة بآفة *Ditylenchus dipsaci*
الصورة من طرف تقدمة G. Caubel, *Nemapix* (2002)



الشكل 5- نباتات *Narcissus* spp. مصابة بآفة *Ditylenchus dipsaci*
الصورة من طرف تقدمة G. Caubel, *Nemapix* (1999)



الشكل 6- قطع عرضي لبصيلة *Narcissus* spp. مصابة بآفة *Ditylenchus dipsaci*
الصورة من طرف تقديم *Nemapix* (2002) C.W. Laughlin,

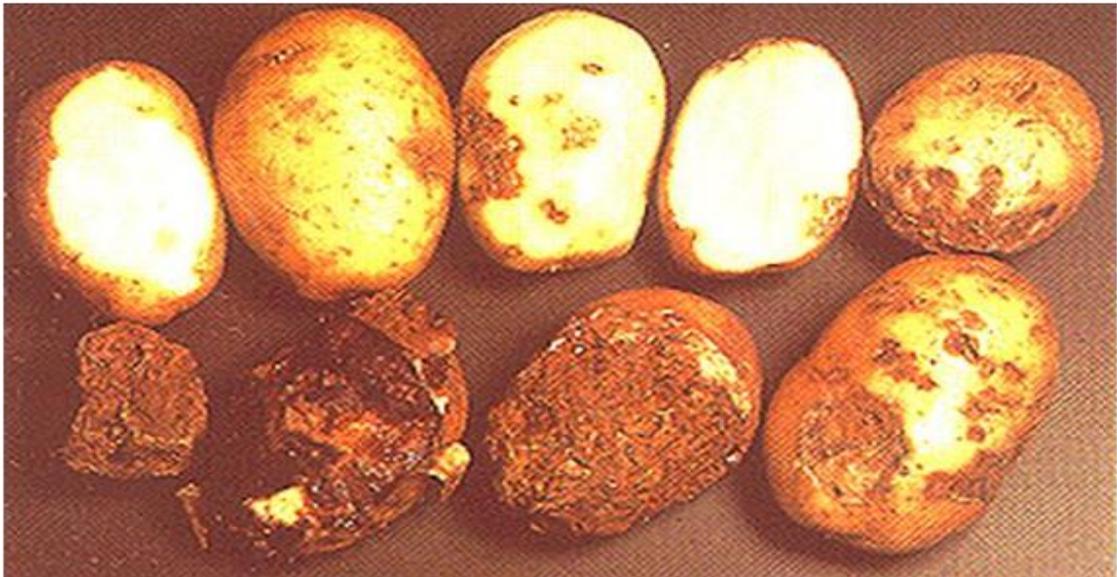


الشكل 7- قطع عرضي لشمندر سكري مصاب بآفة *Ditylenchus dipsaci*
الصورة من طرف تقديم *Nemapix* (1999) C. Hogger,



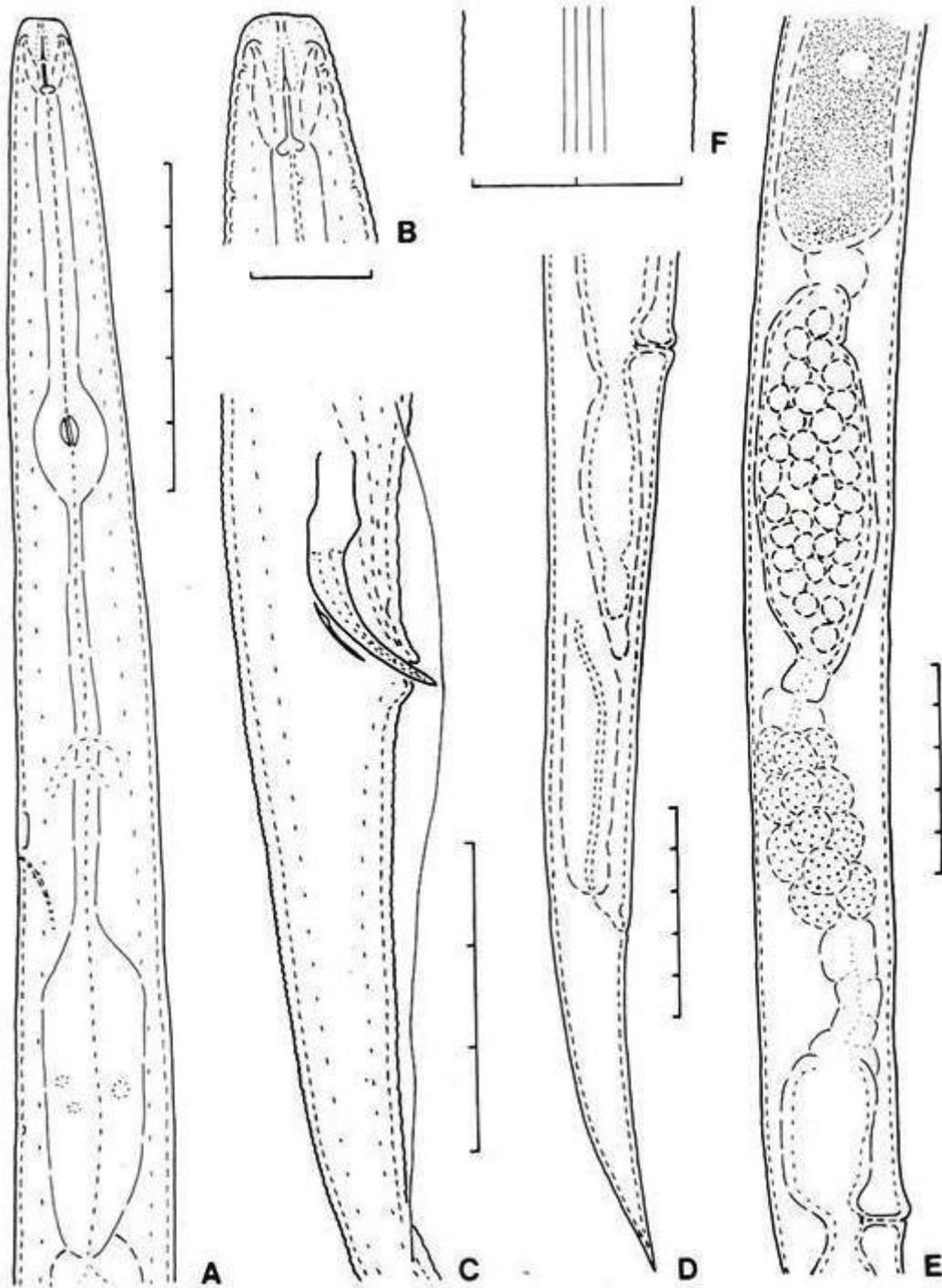
الشكل 8- قطع عرضي لبطاطا مصابة بآفة *Ditylenchus destructor* مقارنة مع بطاطا غير مصابة.

الصورة من طرف تقديمية S. Ayoub, (2000)

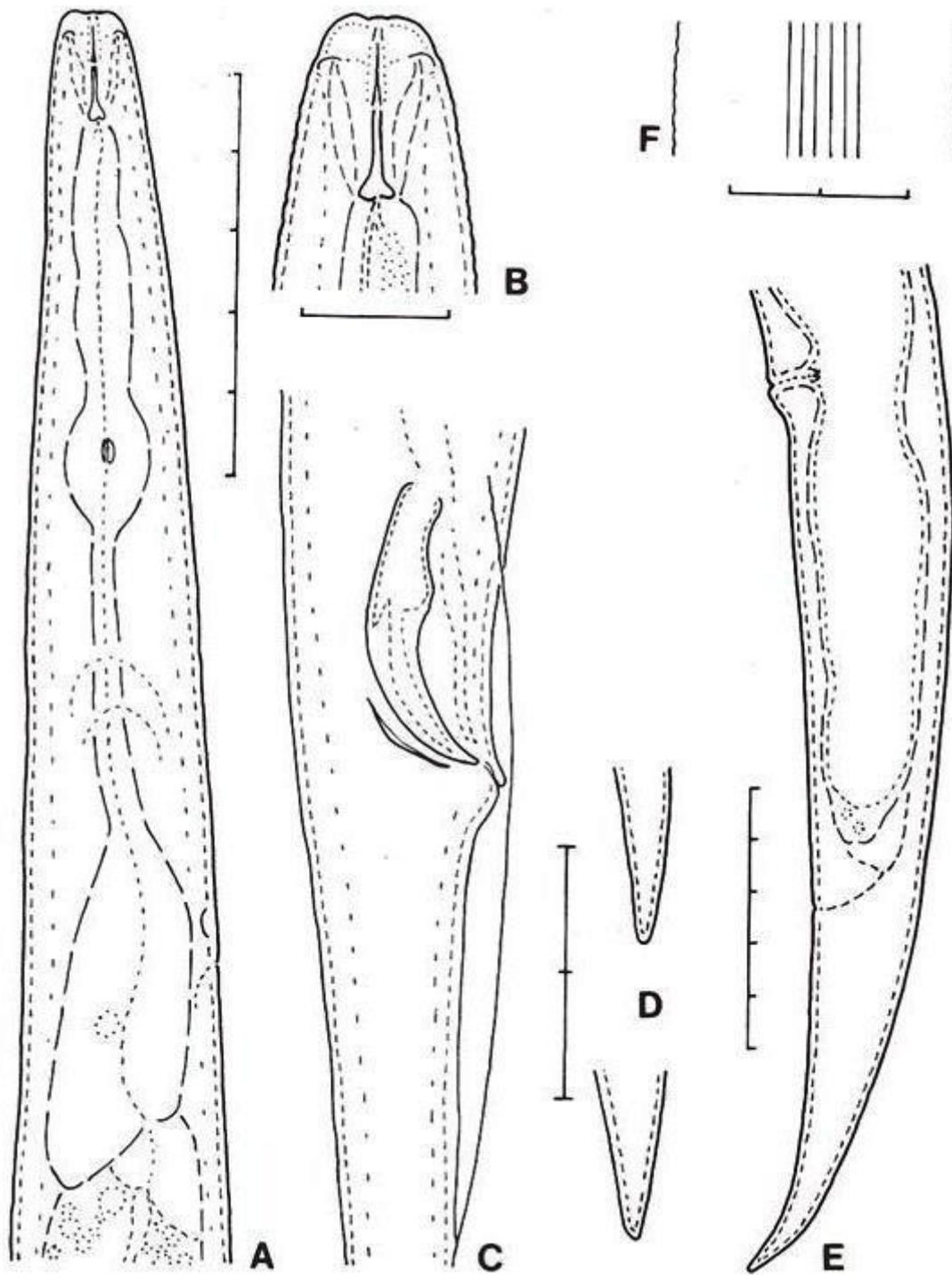


الشكل 9- بطاطا في مستويات مختلفة من الإصابة بآفة *Ditylenchus destructor*

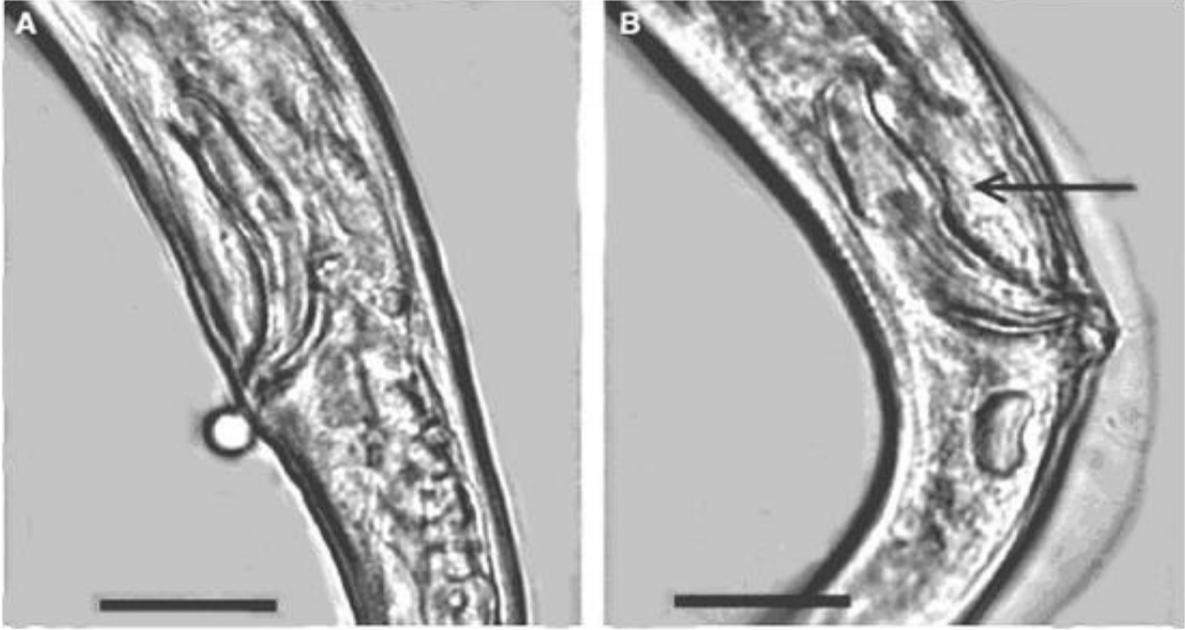
الصورة من طرف تقديمية H. Andersen



الشكل 10- آفة *Ditylenchus dipsaci* (Filipjev (Kühn, 1857)، 1936 بعد Sturhan و Brzeski، 1991). (أ) أنثى، منطقة المريء؛ (ب) رأس الأنثى؛ (جيم) ذكر، منطقة الشويكة؛ (دال) أنثى، المنطقة الخلفية؛ (هـ) جزء من الجهاز التناسلي لدى الأنثى؛ (و) المجال الجانبي عند منتصف الجسم. كل وحدة موسومة على مقياس الرسم = 10 ميكرون.



الشكل 11- آفة *Ditylenchus destructor*. Thorne. 1945 (بعد Brzeski و Sturhan، 1991). (ألف) أنثى، منطقة المريء؛ (باء) أنثى، الرأس؛ (جيم) ذكر، منطقة الشويكة؛ (دال) طرف الذنب لدى أنثيين؛ (هاء) أنثى، المنطقة الخلفية؛ (واو) المجال الجانبي عند منتصف الجسم. كل وحدة موسومة على مقياس الرسم = 10 ميكرون.



الشكل 12- شويكة *Ditylenchus*: (ألف) *D. dipsaci* و(باء) *D. destructor*. السهم= القبة. مقياس الرسم= 12 ميكرون
الصورة تقدمت Willemsen و Karssen (2010)

تاريخ المطبوع

هذا ليس جزءاً رئيسياً من المعيار

04- 2006 أضافت هيئة تدابير الصحة النباتية موضوعاً إلى برنامج العمل (النيماتود، 2006-2008).

11- 2004 أضافت لجنة المعايير موضوع آفة *Ditylenchus destructor* / *D. dipsaci* (2004-017)

07-2010 قُدمت المسودة إلى اجتماع الفريق الفني المعني ببروتوكولات التشخيص. 04- 2013 مشاوره الخبراء.

06-2013 قُدمت المسودة إلى اجتماع الفريق الفني المعني ببروتوكولات التشخيص.

05-2014 صادقت لجنة المعايير على مشاوره الأعضاء (2014_eSC_May_11).

07-2014 مشاوره الأعضاء

04-2015 صادق الفريق الفني المعني ببروتوكولات التشخيص على المسودة لرفعها إلى لجنة المعايير (2015_eTPDP_Apr_03)

06-2015 صادقت لجنة المعايير على فترة الإخطار لبروتوكول التشخيص (2015_eSC_Nov_02)

08-2015 اعتمدت لجنة المعايير بروتوكول تشخيص نيابةً عن هيئة تدابير الصحة النباتية (من دون تلقي اعتراضات رسمية).

المعيار رقم 27 في تدابير الصحة النباتية - الملحق 8. آفة *Ditylenchus dipsaci* و *Ditylenchus destructor* (2015)، روما، الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات، منظمة الأغذية والزراعة.

جرى آخر تعديل على تاريخ المطبوع: 2015-09

المعايير الدولية لتدابير الصحة النباتية

المعيار الدولي 27: بروتوكولات تشخيص

بروتوكول التشخيص 9:

Genus Anastrepha Schiner

اعتمد في 2015: نشر في 2015

المحتويات

1-3	معلومات عن الآفة.....	3
2-2	المعلومات التصنيفية.....	4
3-3	الكشف.....	5
3-1	تفتيش الفاكهة.....	5
3-2	تفتيش المصائد.....	6
4-4	تحديد الهوية.....	6
4-1	إعداد الذباب المكتمل النمو لتحديد الهوية.....	7
4-1-1	تربية يرقات الذباب للحصول على ذباب بالغ مكتمل النمو	7
4-1-2	إعداد الذباب بالغ مكتمل النمو للفحص المجهرى.....	7
4-2	إعداد اليرقات لتحديد الهوية.....	8
4-2-1	مناولة العينة البيولوجية.....	8
4-2-2	إعداد اليرقات للفحص المجهرى.....	8
4-3	التحديد المورفولوجي للحشرات البالغة مكتملة النمو	9
4-3-1	تحديد جنس <i>Anastrepha</i> Loew.....	9
4-3-2	مفتاح للحشرات البالغة المكتملة النمو لأنواع ذات الأهمية الاقتصادية الرئيسية من جنس <i>Anastrepha</i>	10
4-4	التحديد المورفولوجي ليرقات الطور الثالث.....	12
4-4-1	مفتاح يرقات الطور الثالث للأجناس الهامة اقتصاديا الرئيسية من <i>Tephritidae</i> في الأمريكيتين.....	12

2-4-4	مفتاح يرقات الطور الثالث للأجناس الهامة اقتصاديا الرئيسية من جنس <i>Anastrepha</i>	13
-5	السجلات	2019
-6	جهات الاتصال للحصول على معلومات إضافية	20
-7	شكر وتقدير	20
-8	المراجع	21
-9	الأشكال	25

1- معلومات عن الآفة

تتألف فصيلة ذباب الفاكهة المعروفة بـ Tephritidae من حوالي 4 450 نوعاً في قرابة 500 جنس (Norrbon وآخرون، 1999a، 1999b، Norrbom، 2004b) (كان الرقم حوالي 7 400 نوع في عام 2014 (A.L. Norrbom، اتصال شخصي، 2014)). وتتوزع فصيلة Tephritidae في جميع أنحاء العالم في المناطق المعتدلة والمدارية وشبه المدارية. و *Anastrepha* Schiner (Tephritidae: Toxotrypanini) هي أكبر جنس من فصيلة Tephritidae في الأمريكتين، وهي ممثلة بأكثر من 250 نوعاً تمتد من جنوب الولايات المتحدة (تكساس وفلوريدا) إلى شمال الأرجنتين (Hernández-Ortiz، 1992، Foote وآخرون، 1993، Hernández-Ortiz و Aluja، 1993، Norrbom، 2004b، Norrbom وآخرون، 2012). ويعتبر ما لا يقل عن سبعة أنواع من الـ *Anastrepha* اقتصادية رئيسية بسبب الأهمية الكبيرة للفواكه المزروعة التي تهاجمها (مثل المانجا والحمضيات) وبسبب المدى الواسع للنباتات المضيفة لها. وهذه الأنواع السبعة هي *A. fraterculus* (Wiedemann)، *A. grandis* (Macquart)، *A. ludens* (Loew)، *A. obliqua* (Macquart)، *A. serpentina* (Wiedemann)، *A. striata* Schiner، و *A. suspensa* (Loew). وقد تم الاعتراف بأن *A. fraterculus* (Wiedemann) هي نوع مستتر معقد (Hernández-Ortiz وآخرون، 2004، 2012، Selivon وآخرون، 2004، 2005، Vera وآخرون، 2006، Cáceres وآخرون، 2009). ويغطي هذا البروتوكول التشخيصي لـ *Anastrepha* التحديد المورفولوجي للأجناس والأنواع ذات الأهمية الاقتصادية الرئيسية. لمزيد من المعلومات العامة حول أنواع Tephritidae، انظر Norrbom (2010).

ويتفاوت طول دورة حياة الـ Tephritidae وفقاً للنوع وكذلك وفقاً للظروف البيئية والمناخية (Basso، 2003). وتودع إناث *Anastrepha* بيضها داخل ثمار الفاكهة. ويتفاوت عدد البيض المودع في كل ثمرة ويعتمد ذلك أساساً على سمات الفاكهة المضيفة مثل حجمها ونضجها (Malvasi وآخرون، 1983)، ولكن يبدو أيضاً أن لكل نوع من الأنواع حدوداً ملازمة له فيما يتعلق بعدد البيض المودع (Aluja وآخرون، 1999). ويفقس البيض المودع في غضون عدة أيام، تظهر بعدها اليرقات. وتتغذى اليرقات عادة على لب الفاكهة، ولكن في بعض الحالات أيضاً أو حصراً على البذور. وتترك اليرقات الناضجة عادة الفاكهة لتتشرنق في الأرض، ولكن في بعض الحالات يمكن أن يحدث التشرنق داخل الفاكهة. وتظهر الحشرات البالغة المكتملة عادة بعد فترة خدر تتراوح من 16 إلى 25 يوماً، وتتطلب فترة النضج الجنسي من 5 إلى 20 يوماً بعد الظهور. وخلال هذه العملية يحصل الذباب على الغذاء من إفرازات من الحشرات من نوع homopteran وبراز الطيور والعصير الذي تنتجه الفاكهة الناضجة (Prokopy and Roitberg، 1984).

وليست العلاقة بين أنواع *Anastrepha* ونباتاتها المضيفة مفهومة تماماً. فهناك أكثر من 330 نوعاً مضيفاً من 48 فصيلة، يذكر العديد منها لعدد من أنواع الـ *Anastrepha* العامة (Norrbon and Kim، 1988، Norrbom، 2004a) في حين لا تزال نباتات الأغذية المضيفة لعدد من أنواع *Anastrepha* الأخرى غير معروفة. وعلاوة على ذلك، تتضمن المعلومات الحالية العديد من السجلات المشكوك فيها، وتقارير عن إصابات لم تحفز إلا في ظروف مختبرية فقط. وإذا ما حصرت قائمة النباتات المضيفة بالإصابات الطبيعية، فلا تعرف هذه النباتات المضيفة إلا بحوالي 39.8 في المائة فقط من أنواع *Anastrepha* (Hernández-Ortiz و Aluja، 1993).

وقد أتاح إدخال أنواع دخيلة مستتنبتة مثل فاكهة المانجو *Mangifera indica* والحمضيات *Citrus spp.* لبعض أنواع آفات *Anastrepha* توسيع مناطق توزيعها الأصلية وتعزيز إمكانات تكاثرها. مع ذلك، لا تزال هذه الآفات تفضل نباتات مضيقة أصلية معينة، ما يدل ربما على علاقات الاستضافة الأصلية الخاصة بها. وفي هذا الصدد، تتكاثر أنواع *A. suspensa* و *A. fraterculus* و *A. striata* أساساً في نباتات مضيقة تنتمي إلى فصيلة *Myrtaceae*، و *A. ludens* في فصيلة السذابيات *Rutaceae*، و *A. obliqua* في فصيلة البطميات *Anacardiaceae*، و *A. serpentina* في فصيلة السبوتيات، و *A. grandis* في فصيلة القرعيات (Norrbon، 2004a).

ويبدو أن هناك بين النباتات المضيقة الأصلية في المناطق المدارية الأمريكية ارتباطاً أسلافياً مع النباتات التي تنتج المطاط وخاصة فصيلة السبوتيات *Sapotaceae*. ففاكهة السبوتيات *Sapotaceae* مضيقة متكرر لمجموعات أنواع *dentata* و *leptozona* و *serpentina* و *daciformis* و *robusta* و *cryptostrepha*. وفصيلة الفاكهة الكافورية *Myrtaceae* هي أيضاً مضيقة مهم جداً. فقد ذكر أن 26 نوعاً من أنواع *Anastrepha*، ومعظمها ينتمي إلى أنواع مركب *A. fraterculus* تتغذى على نباتات هذه الفصيلة (Norrbon and Kim، 1988؛ Norrbon وآخرون 1999c).

2- المعلومات التصنيفية

الاسم: *Anastrepha Schiner*، 1868

المرادفات: *Acrotoxa* Loew، 1873؛ *Pseudodacus* Hendel، 1914؛ *Phobema* Aldrich، 1925؛

Lucumaphila Stone، 1939

الوضع التصنيفي: Insecta : Diptera : Tephritidae، Trypetinae، Toxotrypanini

الأسماء الشائعة: انظر الجدول 1

الجدول 1- الأسماء والمرادفات الشائعة لأنواع ذباب الفاكهة ذات الأهمية الاقتصادية الرئيسية التي تنتمي إلى

جنس *Anastrepha*

المرادفات	أنواع <i>Anastrepha</i>	الاسم الشائع
<i>Tephritis mellea</i> Walker, 1837	<i>Anastrepha fraterculus</i> (Wiedemann, 1830) مجموعة أنواع	ذباب فاكهة أمريكا الجنوبية
<i>Trypeta unicolor</i> Loew, 1862		
<i>Anthomyia frutalis</i> Weyenbergh, 1874		
<i>Anastrepha fraterculus</i> var. <i>soluta</i> Bezzi, 1909		
<i>Anastrepha peruviana</i> Townsend, 1913		
<i>Anastrepha braziliensis</i> Greene, 1934		
<i>Anastrepha costarukmanii</i> Capoor, 1954		
<i>Anastrepha scholae</i> Capoor, 1955		
<i>Anastrepha pseudofraterculus</i> Capoor, 1955		
<i>Anastrepha lambayecae</i> Korytkowski and Ojeda, 1968		

<i>Anastrepha schineri</i> Hendel, 1914	<i>Anastrepha grandis</i> (Macquart, 1846)	ذبابة فاكهة البطيخ
<i>Anastrepha latifasciata</i> Hering, 1935		
<i>Anastrepha lathana</i> Stone, 1942	<i>Anastrepha ludens</i> (Loew, 1873)	ذبابة فاكهة المكسيك
<i>Anastrepha fraterculus</i> var. <i>mombinpraeoptans</i> Sein, 1933	<i>Anastrepha obliqua</i> (Macquart, 1835)	ذبابة فاكهة الهند الغربية
<i>Anastrepha fraterculus</i> var. <i>ligata</i> Lima, 1934		
<i>Anastrepha trinidadensis</i> Greene, 1934		
<i>Urophora vittithorax</i> Macquart, 1851	<i>Anastrepha serpentina</i> (Wiedemann, 1830)	ذبابة فاكهة السبوتة Sapodilla
<i>Dictya cancellaria</i> Fabricius, 1805 (see Norrbom <i>et al.</i> , 1999b)	<i>Anastrepha striata</i> Schiner, 1868	ذبابة فاكهة الجوافة
<i>Anastrepha unipuncta</i> Sein, 1933	<i>Anastrepha suspensa</i> (Loew, 1862)	ذبابة فاكهة البحر الكاريبي
<i>Anastrepha longimacula</i> Greene, 1934		

3- الكشف

يمكن الكشف عن ذبابة الفاكهة بالتفتيش عنها كيرقات داخل الفاكهة وكشرانق في الحاويات التي تنقل فيها الفاكهة أو يمكن التقاطها كحشرات **مكتملة النمو بالغة** في الهواء الطلق بواسطة نظم الاصطياد.

1-3 تفتيش الفاكهة

يمكن العثور على الفاكهة الموبوءة في الشحنات المستوردة أو المصدرة وفي الأمتعة وحتى على الطائرات أو في عربات النقل الأرضي. وثمرات الفاكهة التي يستهدفها التفتيش هي تلك التي **فيها** تكون فيها بقع طرية أو بقع قاتمة أو عفن أو ثقوب أو إصابات قد تكون نشأت عن إباضة الإناث أو أنشطة إطعام اليرقات. ويجري الكشف عن ثقوب تنتجها إناث الذباب أثناء الإباضة بالفحص البصري المجهر الذي يقوم به خبير. وإذا لوحظ وجود ثقوب خروج اليرقات، ينبغي فحص حاويات الفاكهة للتفتيش عن الشرانق. ومن غير المحتمل حدوث يرقات وشرانق الطور الثاني والثالث عندما تجمع وتعبأ الفاكهة غير الناضجة؛ ومع ذلك، يمكن أن تستضيف هذه الفاكهة بيض ويرقات الطور الأول التي يصعب الكشف عنها. أما الثمار التي يحتمل أن تكون مصابة وتظهر فيها الثقوب النموذجية التي تنتجها إناث الذباب أثناء الإباضة فينبغي قطعها وفتحها للبحث عن البيض أو اليرقات داخلها. ويعتمد نجاح الكشف على أخذ العينات والفحص الدقيق للفاكهة.

2-3 تفتيش المصائد

ترد توجيهات بشأن اصطياد ذباب الفاكهة *Anastrepha* في الملحق 1 بالمعيار الدولي رقم 26 (إنشاء مناطق خالية من آفات ذبابة الفاكهة (*Tephritidae*)). وعموماً تتطلب نظم الرصد المنشأة للكشف عن ذباب الفاكهة المكتملة النضج في الأشجار، إما في مناطق زراعة الفاكهة أو في المناطق الحدودية بين البلدان، واستخدام مصائد ماكفيل McPhail المزودة بطعوم من أغذية أو مغريات اصطناعية. وينبغي أن تكون الطعوم، وهي في كثير من الأحيان مصادر غنية بالأمونيوم، معتمدة دولياً (مثلاً، المعيار الدولي رقم 26). وينبغي أن تتوافق الأساليب المحددة لنشر المصائد مع الأنظمة الوطنية للصحة النباتية.

4- تحديد الهوية

يستند تصنيف جنس *Anastrepha* على التشكيل المورفولوجي الخارجي للذباب **المكتمل النمو البالغ** وعلى سمات الإناث (Stone، 1942؛ Hernández-Ortiz، 1992؛ Zucchi، 2000؛ Norrbom وآخرون، 2012). وبما أن الخصائص المورفولوجية للمراحل غير الناضجة غير موثقة جيداً لمعظم أنواع ذبابة الفاكهة *Anastrepha*، فإن هذه الخصائص محدودة الفائدة في تحديد هوية الأنواع (White و Elson-Harris، 1992) مقارنة بتشكيلات الذباب **البالغ** **المكتمل النمو**. ومع ذلك، يتوفر في الأدبيات العلمية بعض المعلومات عن بنى البيض ويرقات الطور الثالث، وتفيد هذه المعلومات في تشخيص بعض الأنواع (Steck و Wharton، 1988؛ Steck وآخرون، 1990؛ Frías وآخرون، 2006، 2008، 2009؛ Dutra وآخرون، 2011a، 2011b، 2012، 2013؛ Figueiredo وآخرون، 2011). وتتوفر مفاتيح تحديد هوية يرقات سبعة أنواع من *Anastrepha* يعرف أن لها أهمية اقتصادية رئيسية (القسم 1؛ ترد في الجدول 1) (Steck وآخرون، 1990؛ Carroll وآخرون، 2004) ولكن ينبغي أن تستخدم هذه المفاتيح مع مراعاة حدودها.

ورغم أنه يمكن على ما يبدو تمييز يرقات الطور الثالث لبعض أنواع *Anastrepha* (Berg، 1979؛ Steck و Wharton، 1988؛ Carroll و Wharton، 1989؛ Steck وآخرون، 1990؛ White و Elson-Harris، 1992؛ Carroll وآخرون، 2004؛ Frías وآخرون، 2006؛ Hernández-Ortiz وآخرون، 2010)، فإن البيانات المتاحة تستند إلى عينة محدودة جداً فيما يتعلق بمعظم الأنواع التي وصفت. وقد تقلل دراسات أجريت على أنواع إضافية ذات صلة وثيقة لم تحدد لها خصائص حتى الآن أيضاً من موثوقية الأسلوب. ولهذا السبب، ينبغي أن يقوم بهذه التشخيصات خبراء وأن يقيموا جميع المعلومات المتاحة. أما الأسلوب الأكثر موثوقية لتحديد الهوية فهو تربية اليرقات لتصل إلى مرحلة البلوغ.

ويعتقد أن العديد من آفات أنواع *Anastrepha* يشمل عدة أنواع ملغزة خفية (لم توصف بعد) لا يمكن تمييزها مورفولوجياً أو يتطلب التعرف عليها تحليلاً للقياسات المورفولوجية (Hernández-Ortiz وآخرون، 2004، 2012).

وللمزيد من دراسة هذه الفكرة، نسقت الوكالة الدولية للطاقة الذرية مشروعاً بحثياً دولياً لوصف الأنواع الملغزة في مجموعة أنواع *A. fraterculus*. وكجزء من هذا المشروع، فحصت الأساليب الجزيئية لتحديد فائدتها التشخيصية ضمن الجنس. واستناداً إلى البيانات المتاحة، فإن أساليب مثل الترميز الشريطي للحمض النووي DNA barcoding باستخدام جينة *cytochrome oxidase I* لا يمكن أن تحدد بعض أنواع الحشرات المزوجة الجناح dipteran تحديداً

موثوقاً، بما في ذلك العديد من أنواع الآفات الهامة (Will وآخرون، 2005؛ Meier وآخرون، 2006؛ Virgilio وآخرون، 2010؛ Lopes وآخرون، 2013). وقد أحرز بعض التقدم في تحليل مبادئ النسخ الداخلي (ITS) (مثلاً، Sonvico وآخرون، 2004، رقم دخول بنك الجينات AY686689). وارتبطت هذه المعلومات بالتوصيف المورفولوجي للعينات وبتحليل النمط النووي karyotypic analysis، جنباً إلى جنب مع دراسات التزاوج التقاطعي (Basso، 2003). ونتيجة لذلك، فإن طرق تحديد الهوية المدرجة في هذا البروتوكول التشخيصي تستند إلى الخصائص المورفولوجية.

1-4 إعداد الذباب **البالغ المكتمل النمو** لتحديد الهوية

1-1-4 تربية يرقات الذباب للحصول على ذباب **بالغ مكتمل النمو**

توضع الفاكهة في أقفاص مغطاة بالقماش أو بشبكة دقيقة وتكون في الجزء السفلي منها بيئة تشرنق معقمة (مثلاً، قشور سيليكيا أو رمال أو نشارة خشب رطبة). وما أن تظهر اليرقات من الفاكهة، فإنها ستنتقل إلى الطبقة التحتية للتشرنق. ومن المستحسن احتضان كل ثمرة على حدة. وتنبغي مراقبة كل عينة وجمع الشرائق يوميا. وتوضع الشرائق في حاويات مع بيئة تشرنق، وتغطي الحاويات بغطاء محكم يمكن تهوية مناسبة. وعندما يذشأ الذباب **البالغ المكتمل النمو**، ينبغي إبقاؤه على قيد الحياة مدة 48-72 ساعة لضمان أن تكتسب الأغشية والأجنحة الصلابة واللون المميزين للنوع. وبعد ذلك يقتل الذباب **البالغ المكتمل النمو** ويحتفظ به في 70 في المائة إيثانول (96 في المائة إيثانول للدراسات الجزيئية (DNA) أو تقتل بأسيئات الإثيل ethyl acetate أو عامل آخر وبعد ذلك تعلق على دبابيس. وبالنسبة لإنات الذباب، من المفيد مباشرة بعد قتلهم (قبل أن يتصلبن) ضغط الجزء القمي من بطن الحشرة برفق بملقط، ثم الضغط برفق على قاعدة وقمة جهاز وضع البيض oviscape لإظهار الشوكة aculeus (لتشريحها لاحقاً).

2-1-4 إعداد الذباب **المكتمل النمو البالغ** للفحص المجهرى

للتعرف على الأنواع في أطوار اكتمال النمو، ينبغي حفظ العينة بأكملها - إما جافة (مثبتة على دبابيس) أو في 70 في المائة إيثانول. وفحص الجناح والشوكة aculeus هام بشكل خاص. وينبغي فحص الشوكة بتكبير يبلغ حوالي 400 مرة. ويمكن وضع جناح ورأس كل عينة تحت ساترتين منفصلتين على الشريحة نفسها. وينبغي أن يقوم بالتشريح والوضع على الشريحة فقط شخص ذو خبرة، فتشريح الأطراف النهائية لإنات فصيلة *Anastrepha* صعب ومن السهل إتلاف أجزاء مفيدة.

1-2-1-4 الرأس

من الأفضل إزالة البطن كله من الأنثى لتشريح جهاز وضع البيض oviscape (7 syntergosternite) والغشاء القابل للقلب ظهراً لبطن eversible membrane والشوكة aculeus. وينصح باستخدام مقص تشريح دقيق لإزالة البطن للعينات المحفوظة حفظاً جافاً (المعلقة على دبابيس). وتنبغي إزالة البطن تماماً. ويمكن أن ينجز ذلك بوضعه في 10 في المائة هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) أو محلول 10 في المائة هيدروكسيد البوتاسيوم (KOH) وتسخينه في حمام مائي يغلي لمدة 10-15 دقيقة، ثم غسل الهيكل بماء مقطر وبعد ذلك إزالة المحتويات الداخلية تحت مجهر مجسم بمساعدة ملقط تشريح. وينبغي إظهار الشوكة aculeus والغشاء. وعند هذه الخطوة، من الممكن فحص الشوكة مباشرة في قطرة

واحدة أو قطرتين من الغليسيرين تحت مجهر. بعد ذلك، يمكن نقل الهيكل إلى قارورة مصغرة فيها غليسيرين وتعليقه تحت العينة الجافة المعلقة. وللشرائح الدائمة، ينبغي اتباع الخطوات الموضحة في القسم 4-1-2. ويحول وضع الشوكة بشكل دائم في وضع بطني دون مشاهدة بعض الخصائص التي تكون رؤيتها من وجهة جانبية أفضل. ولهذا السبب، من الأفضل في كثير من الأحيان حفظه في غليسيرين في قارورة مصغرة.

4-2-1-2 الأجنحة

عادة، يمكن مشاهدة خصائص الأجنحة دون وضعها على شريحة، ولذا لا يذبح بذلك كتمارسة عامة. وقد يكون وضع الأجنحة على شريحة ضرورياً للدراسات المورفولوجية، ولكن ليس لمراقبة الخصائص المستخدمة في المفتاح في القسم 4-3-2. وإذا وضعت الأجنحة على شريحة بشكل دائم، يوصى بقطع أحد الجناحين من قاعدته (يفضل الجناح الأيمن لسهولة مقارنته بصور واردة في الأدبيات وفي البروتوكول التشخيصي هذا).

4-2-4 إعداد اليرقات لتحديد الهوية

4-2-1-2 مناقلة العينة البيولوجية

كما أشير في القسم 4، قد يكون من الضروري مراقبة خصائص الذباب **المكتمل النمو البالغ** للقيام بتحديد الهوية نهائياً. وإذا وجدت أطوار غير ناضجة، من المستحسن الحفاظ على يرقات قليلة لإجراء فحص مورفولوجي بمعاملتها بماء ساخن (القسم 4-2-2) وبعد ذلك تخزينها في 70 في المائة إيثانول. وتربى اليرقات والشرائح المتبقية للحصول على عينات ذباب مكتمل النمو لتحديد الهوية (القسم 4-1-1).

ويمكن إجراء الفحص المورفولوجي (القسم 4-2-2) على يرقات غير مركبة باستخدام مجهر مجسم، واستخدام مجهر مركب لليرقات المركبة على شريحة أو مجهر إلكتروني ماسح للنقطة الحاسمة في يرقة مجففة. ويمكن أن يحول وضع اليرقات المركبة على شرائح دون إجراء تحليل للخصائص المورفولوجية. ومن الممكن دراسة الشكل الخارجي المورفولوجي لليرقات المركبة على شرائح (مثلاً الفتحات التنفسية الأمامية والخلفية وحروف الفم)، وكذلك الهياكل الداخلية مثل الهيكل الرأسي- البلعومي cephalopharyngeal (الأشكال 21-44)، باستخدام مجهر ضوئي ماسح بعدسة 20×، 40× أو أعلى. ولا يمكن إجراء مشاهدة تفصيلية عالية الاستبانة للتشكيل المورفولوجي الخارجي لليرقات إلا باستخدام مجهر إلكتروني ماسح (الأشكال 45-61). ولذا لا ينصح بوضع العينات المتوفرة للتشخيص جميعها على شرائح أو اليرقة الوحيدة المتوفرة؛ بل ينبغي حفظ يرقات غير موضوعة على شرائح ليجري تحليلها في المستقبل.

4-2-2 إعداد اليرقات للفحص المجهر

لإعداد عينات للفحص، ينبغي أن تعامل اليرقات بالماء الساخن، ويمكن إنجاز ذلك بوضع اليرقات الحية في ماء درجة حرارته 65 درجة مئوية لمدة 2-4 دقائق. ثم تبرّد اليرقات إلى درجة حرارة الغرفة و تغمر في كحول 50 في المائة لمدة 15-30 دقيقة. ثم تنقل العينات إلى قارورة محكمة (15-25 ملم) مملوءة بكحول 70 في المائة. ومن المستحسن وضع لاصق على القارورة يتضمن جميع المعلومات عن العينة. وتكون هذه العينات جاهزة للفحص تحت مجهر مجسم أو لإعداد لاحق للشرائح المركبة أو لدراسة تحت مجهر ضوئي ماسح.

إعداد عينات موضوعة على شرائح، من الضروري إزالة كافة المحتويات الداخلية لإتاحة مشاهدة البشرة وفتحة الفم وهيكل الرأس والبلعوم و الفتحات التنفسية الأمامية، فضلاً عن لوحة الفتحات التنفسية الخلفية وفصوص الشرج. ويمكن أن ينجز ذلك بشقين عرضيين في اليرقة، شق واحد خلف منطقة الرأس والفتحة التنفسية الأمامية، والآخر قبل الجزء الذيلي. ثم ينبغي غمر اليرقة المقطعة في أنبوب اختبار يحتوي على محلول هيدروكسيد الصوديوم 10 في المائة (NaOH) أو هيدروكسيد البوتاسيوم 10 في المائة (KOH) وتسخينها في حمام مائي يغلي لمدة 10-15 دقيقة. ثم تزال المحتويات الداخلية بعناية من العينة باستخدام الملقط والماء المقطر تحت مجهر مجسم (تكبير 45 مرة أو أكثر). ويمكن عمل شرائح دائمة باستخدام بلسم كندا أو يوبارال Euparal. وقبل القيام بذلك، ينبغي تجفيف الهياكل المنظفة بوضعها لمدة 25 دقيقة في كل من إيثانول 50 في المائة و75 في المائة و100 في المائة. ولوضع العينات على شرائح ببلسم كندا، ينبغي نقلها إلى زيت الخزامى (اللافندر) لمدة 15 دقيقة لتصفيتها وبعد ذلك توضع مباشرة على شريحة بقطرة واحدة أو قطرتين من بلسم كندا. وعندما يستخدم اليوبارال كوسيط، ينبغي نقل الهياكل الموضوعة في إيثانول 100 في المائة إلى زيت القرنفل لحوالي 30 دقيقة لتصفيتها قبل وضعها على الشرائح. وفي الحالتين كليهما، ينبغي أن تترك الشرائح لتجف لعدة أيام (يمكن تقليل الوقت باستخدام فرن)، ولكن يمكن فحصها تحت المجهر بتكبير منخفض مباشرة. وينبغي توسيم الشرائح.

للمشاهدة باستخدام مجهر ضوئي ماسح، ينبغي أولاً تنظيف العينات (المخزنة في الكحول) وهي في قواريرها في ماء مقطر مع قطرة صابون سائل يضاف لخفض التوتر السطحي. ثم تشطف جيدا بماء مقطر وتجفف بتمريرها بسلسلة من حمامات الإيثانول: 50 في المائة و80 في المائة و95 في المائة وبثلاثة تغييرات من الإيثانول المطلق (15 دقيقة لكل حمام). وينبغي بعد ذلك أن تجفف النقطة الحاسمة في العينات وتطلى بذهب - بلاديوم (Wharton و Carroll، 1989). ويمكن الاطلاع على تقنيات مشابهة في أمكنة أخرى (مثلاً Frías وآخرون، 2006، 2008، 2009).

3-4 التحديد المورفولوجي للحشرات المكتملة النمو البالغة

1-3-4 تحديد جنس *Anastrepha* Loew

الحشرات البالغة المكتملة النمو (الشكل 1). الرأس (الشكل A-2): في العادة لونه أصفر بوجهتين إلى ثماني واجهات وشعيرة مدارية واحدة أو اثنتين، وأحياناً تكون الشعيرة المدارية الخلفية غير موجودة؛ وفي العادة تكون قرون الاستشعار العينية ضعيفة جداً أو غير واضحة؛ وتوجد قرون استشعار عينية خلفية وسطية وجانبية. الصدر (الشكلان B-2، 3): في العادة، تكون شعيرات الصدر الكبرى Macrosetae سوداء أو حمراء-بنية أو برتقالية، ونادراً ما تكون صفراء ذهبية؛ وعادة، يكون الترس الصدري أصفر إلى برتقالي، وأحياناً يكون معظمه بنياً داكناً أو تكون عليه أحياناً خطوط أو بقع بنية داكنة أو سوداء، وهناك دائماً خطان إلى خمسة خطوط صفراء؛ ويكون على السطح الخارجي للجزء الأوسط من الصدر mesonotum الشعيرات التالية: واحدة postpronotal، اثنتان notopleural، واحدة presutural، واحدة supra-alar، واحدة postsutural supra-alar، واحدة postalar، واحدة intra-alar، واحدة dorsocentral، واحدة acrostichal (نادراً ما تكون غير موجودة) اثنتان scutellars.

الأجنحة (الشكل 4): هناك شق تحت ضلعي؛ العرق المتقاطع R-M ممتد من الطرف البعيد إلى منتصف طول الخلية القرصية (dm)؛ خلية قاعدية مرفقية (bcu) مع امتداد خلفي للقمة متطور تماماً؛ العرق M عادة منحني بشكل

واضح إلى الأمام باتجاه القمة (ومنحن بقوة في جميع أنواع الآفات) ولا يلتقي مع الضلع بزواوية 90 درجة مئوية. تشكل أشرطة برتقالية إلى بنية اللون نمطاً نموذجياً على الجناح كما يلي: شريط (C) ضلعي على حافة ضلعية قاعدية تشمل كل العرق R_1 ؛ خلية تحت ضلعية وجزء علوي مجنح؛ يمتد شريط S من قمة الخلية (bcu) عبر الخلية dm والعرق المتقاطع $R-M$ بحيث يصل إلى حافة ضلعية ويستمر إلى قمة الجناح؛ يكون الشريط V شكل V مقلوباً، تمتد ذراعه القريبة (شريط تحت القمة) على طول العرق $DM-Cu$ وذراعه البعيدة (شريط خلفي للقمة) ناشئ من الخلية m ، وهما متقاربان في الخلية r_{4+5} ؛ وفي كثير من الأحيان تكون الذراع البعيدة غير مكتملة أو غير موجودة. ويكون نمط الجناح النموذجي معدلاً في بعض الأنواع الهامة اقتصادياً (انظر المفتاح للأنواع في القسم 4-3-2).

نهائية (تيرميناليا) الذكور (الشكل 5): Epanthium واسعة في المنظر الجانبي مع surstylus جانبي قصير أو ممدود؛ surstylus وسطي أقصر من الـ surstylus الجانبي مع شعيرتين قويتين ضاربتين إلى السواد متجهتين إلى أعلى؛ proctiger غشائي متصلب بشكل ضعيف جانبياً وبطنياً؛ قضيب ممدود، وعادة أطول من جهاز وضع البيض oviscape لدى الأنثى؛ حشفة متصلبة بشكل ضعيف بصلبية علوية على شكل T، الحشفة في بعض الأحيان غير موجودة في الأنواع التي لا تعتبر آفات.

نهائية (تيرميناليا) الإناث (الشكل 6): جهاز وضع البيض oviscape على شكل أنبوب، متفاوت في الطول؛ غشاء قابل للقلب ظهراً لبطن eversible (عادةً، يكون مقلوباً داخل الـ oviscape) متجه إلى أعلى مع مجموعة ظهرية من لوحات متصلبة تشبه الخطاف (تسمى أيضاً raspers)؛ الشوكة (عادةً، تكون مقلوبة داخل الغشاء القابل للقلب ظهراً لبطن eversible والـ oviscape) متصلبة تماماً، وطرفها أحياناً مسنن على الحواف الجانبية.

2-3-4 مفتاح للحشرات البالغة المكتملة النمو للأنواع ذات الأهمية الاقتصادية الرئيسية من جنس *Anastrepha*

هذا المفتاح مقتبس من Hernández-Ortiz وآخرين (2010). للحصول على معلومات إضافية حول الهياكل المورفولوجية وأنواع *Anastrepha* الأخرى، راجع Norrbom وآخرين (2012). **انظر-انظر** الجدولين 2 و 4 للخصائص المورفولوجية التشخيصية لجنس *Anastrepha*.

1- جناح بشريط C مقطوع عند نهاية العرق R_1 بعلامة شفافة محددة جيداً في الخلية r_1 ؛ الشعيرات المدارية الخلفية والأمامية موجودة؛ الذراع البعيدة للشريط V تكون موجودة عادةً، على الأقل جزئياً، ولكن إذا لم تكن موجودة، يكون نمط الجناح بنياً داكناً إلى أسود.....2

- جناح بشريط C غير متقطع من قاعدة الجناح إلى القمة في بعض الأحيان منتشر في الخلية r_1 ؛ الشعيرات المدارية الخلفية غير موجودة في كثير من الأحيان؛ الذراع البعيدة للشريط V غير موجودة. ينبغي أن تكون جميع الخصائص التالية موجودة: يتواصل النصف القاعدي للشريط S من قمة الخلية القاعدية المرفقية مروراً بالعرق المتقاطع R-M ويتصل بالشريط C؛ الخلية r_{2+3} مصطبغة تماماً بطولها الكامل؛ العرق r_{2+3} مستقيم تقريباً بطوله الكامل؛ الخلية br شفافة بشكل عام بين العرقين BM-Cu و R-M (الشكل 7)؛ صفائح البطن صفراء؛ للترس خطوط ظهر مركزية بنياً داكنة؛ رأس الشوكة *aculeus* طويل للغاية (5.3-6.2 ملم)، وعرضه عادة أكبر من 0.1 ملم، طرف الشوكة المدببة بحافتين على شكل V، والحواف الجانبية غير مسننة (الشكل 14)؛ حشفة الذكور موجودة. (البرقات تصيب البطيخ)

Anastrepha grandis (Macquart).....

- 2- ترس في الغالب بني داكن مع خطوط بنية إلى سوداء 3.
- ترس أصفر أو برتقالي دون علامات بنية داكنة إلا أحياناً على طول خيط سكوتو سكوتيلار scuto-scutellar 4.
- 3- نمط الجناح معظمه بني داكن؛ الذراع البعيدة للشريط V غير موجودة بالكامل (الشكل 8)؛ صفائح البطن بنية داكنة بعلامة بيضاء وسطية على شكل T؛ جدار البليورون الصدري بني في معظم الأحيان، متباين بشدة مع العلامات الصفراء؛ طول شوكة الأنثى *aculeus* 2.6-3.8 ملم، طول رأس الشوكة 0.37-0.46 ملم وعرضه 0.14-0.17 ملم، والحواف الجانبية مسننة بدقة على الطرف الأقصى 0.5-0.7 (الشكل 15). (اليرقات تصيب ثمار الفاكهة السبوتية *Anastrepha serpentina* (Wiedemann)..... (sapotaceous)
- نمط الجناح معظمه بني داكن؛ الذراع البعيدة للشريط V عادة موجودة (الشكل 9)؛ صفائح البطن والبليورون صفراء أو برتقالية؛ الترس بخطي ظهر مركزيين عريضين متصلين على حافة خارجية ليشكلا علامة على شكل U، دون شعيرات في منطقة صغيرة على طول خيط مستعرض، ولكن مع دقة شعرية بيضاء كثيفة تتباين مع شعيرات سوداء؛ طول شوكة الأنثى *aculeus* 1.95-2.30 ملم، ورأس الشوكة عريض، طوله 0.24-0.31 ملم وعرضه 0.17-0.20 ملم (الشكل 16). (اليرقات تصيب الجوافة)..... *Anastrepha striata* Schiner.....
- 4- الشريط العلوي الداخلي للجناح (= القسم البعيد من الشريط S) ضيق إلى واسع باعتدال، لا يصل أبداً إلى قمة العرق M؛ الشريط V بذراعيين منفصلين أمامياً، أو إذا كانا منضمين، تكون هناك علامة شفافة بينهما والعرق M؛ خيط سكوتو سكوتيلار scuto-scutellar ببقعة أو بدون بقعة بنية وسطياً؛ الشوكة *aculeus* متفاوتة. 5
- الشريط العلوي الداخلي للجناح (= القسم البعيد من الشريط S) واسع للغاية، يصل إلى قمة العرق M؛ الشريط V مكتمل وواسع بذراعيين متصلين أمامياً وهناك علامة شفافة بينهما والعرق M صغير أو غير موجود (الشكل 10)؛ خيط سكوتو سكوتيلار يكون عادة ببقعة بنية كبيرة مدورة وسطياً؛ طول شوكة الأنثى 1.4-1.6 ملم، وطول رأس الشوكة 0.19-0.23 ملم، وعرضه 0.10-0.13 ملم، والحواف الجانبية مسننة بدقة على الطرف الأقصى 0.50-0.65 (الشكل 17) *Anastrepha suspense* (Loew)
- 5- طول شوكة الأنثى أقل من 2.0 ملم (عادة 1.4-1.9 ملم)، رأسها قصير وواسع مع أسنان كبيرة على الجانبين؛ الخصائص الأخرى متغيرة..... 6.
- طول شوكة الأنثى أكثر من 2.5 ملم (عادة 3.3-5.8 ملم)؛ طول رأسها 0.28-0.42 ملم، مع انقباض معتدل قرب منتصف الطول؛ الحواف الجانبية غير مسننة أو مسننة بأسنان دقيقة على الطرف الأقصى 0.55 أو أقل (الشكل 18)؛ علامات جانبية بنية على السوبسكوتيلوم subscutellum دائماً واضحة وفي بعض الأحيان ممتدة على الصفائح الوسيطة mediotergite (الشكل B3)؛ نمط الجناح كما في الشكل 11. (اليرقات تصيب الحمضيات والمانجو بشكل شائع)..... *Anastrepha ludens* (Loew)
- 6- السوبسكوتيلوم subscutellum أصفر تماماً، هناك فقط علامات بنية على جانبي الصفائح الوسيطة mediotergite (الشكل 3C)؛ البقعة البنية على خيط سكوتو سكوتيلار scuto-scutellar غير موجودة؛ طول رأس الشوكة

0.16-0.20 ملم، مع تسنين جانبي على بعد ثلثين أو أربعة أخماس من الطرف الأقصى (الشكل 19)؛ نمط الجناح كما في الشكل 12. (اليرقات تصيب عادة ثمار المانجو أو الإجاص Spondias *Anastrepha obliqua* (Macquart)

- الصفائح الوسيطة *mediotergite* والسوبسكوتيلوم *subscutellum* كلاهما بعلامات على الجانبين بنية داكنة إلى سوداء (الشكل 3A)؛ البقعة البنية على خيط سكوتو سكوتيلار scuto-scutellar موجودة عادة؛ طول الشوكة 1.4-1.9 ملم، طول رأس الشوكة 0.20-0.28 ملم، تسنين جانبي ب 8 أسنان إلى 14 سنناً على بُعد حُمسين إلى ثلاثة أخماس من الطرف الأقصى (الشكل 20)؛ نمط الجناح متغير (الشكل 13)..... مجموعة أنواع (Wiedemann *Anastrepha fraterculus*)

4-4 التحديد المورفولوجي ليرقات الطور الثالث

1-4-4 مفتاح يرقات الطور الثالث للأجناس الهامة اقتصادياً الرئيسية من Tephritidae في الأمريكيتين

هذا المفتاح مقتبس من Frías وآخرين (2006). للحصول على معلومات إضافية عن مورفولوجيا يرقات هذه الأجناس والأنواع ذات الصلة، راجع White and Elson-Harris (1992)، Carroll وآخرين (2004)، Frías وآخرين (2006)، (2008).

1- طول الفك السفلي أكثر من 0.3 ملم. الـ *apodeme* البطني للفك السفلي واسع ومدور في الطرف العلوي (الشكل 26). شعرات الفتحات التنفسية أقصر من عرض شقوق الفتحات التنفسية الخلفية الوسطية (الشكل 49)..... *Toxotrypana Gerstaecker*

- طول الفك السفلي أقل من 0.3 ملم. الـ *apodeme* البطني للفك السفلي حاد في الطرف العلوي (الأشكال 22-24). شعرات الفتحات التنفسية أطول من عرض شقوق الفتحات التنفسية الخلفية الوسطية (كما في الشكل 50)..... 2

2- جسر البلعوم السفلي ضيق في المنطقة تحت قمة البلعوم السفلي (الشكل 21). الأسنان أمام الفم وفي الفم موجودة (الشكل 47)؛ حروف الفم عادة غير مسننة (الشكلان 45، 47). مجموعة الشعيرات الظهرانية الجانبية على مسافة واحدة من الهوائي ومن الملبس الفكي maxillary palpus..... *Rhagoletis Loew*

- جسر البلعوم السفلي ضيق في منتصف البلعوم السفلي (كما في الأشكال 27-32). الأسنان أمام الفم وفي الفم غير موجودة؛ حروف الفم عادة مسننة (الشكل 48). مجموعة الشعيرات الظهرانية الجانبية أقرب إلى الملبس الفكي maxillary palpus مما إلى الهوائي..... 3

3- المنطقة الخلفية من الفك السفلي دون رقبة متميزة (واضحة) (الشكل 23). ولا توجد حافة ذيلية (الشكل 59)..... *Anastrepha Schiner*

- المنطقة الخلفية للفك السفلي مع رقبة متميزة (واضحة) (الشكلان 22، 24). توجد حافة ذيلية (الشكل 60)..... 4

4- حروف الفم بأسنان مدورة قصيرة (الشكل 48)..... *Ceratitis McLeay*

حروف الفم بأسنان مدببة طويلة حادة (ليس كأعلاه)..... *actrocera Macquart* -

2-4-4 مفتاح يرقات الطور الثالث للأجناس الهامة اقتصاديا الرئيسية من جنس *Anastrepha*

هذا المفتاح مقتبس من Steck وآخرين (1990). انظر الجدول 3 للخصائص المورفولوجية التشخيصية ليرقات الطور الثالث لأنواع *Anastrepha*.

يشار إلى التوزيع الجغرافي والنباتات المضيغة فقط كمعلومات إضافية للمصدر الأصل المشترك للأنواع.

1- ترتفع الفتحات التنفسية الخلفية بشكل بارز من سطح الجسم؛ أو معظم أجزاء الجسم بشعيرات أو نواتئ واضحة؛ أو الفتحات التنفسية الخلفية ملتوية ليس ذباب الثمار *Tephritidae*

- تنبسط الفتحات التنفسية الخلفية تقريباً مع سطح الجسم؛ الدرناات، إن وجدت، فتكون على الجزء الذيلي فقط؛ شقوق الفتحات التنفسية الخلفية مستطيلة أو بيضاوية (الشكلان 49، 50) (ذباب الثمار) *Tephritidae*..... 2

2- أسنان أمام الفم قرنية بارزة (= حراس الفغرة) متاخمة لفتحة الفم أو أسنان صليبية واضحة (الشكلان 47، 45)؛ و/أو درناات ذيلية واضحة جداً؛ أو يرقة مأخوذة من البابايا تفتقر إلى حافات ذيلية وشعيرات ذيلية مخفضة بشدة ذباب الثمار *Tephritidae* الأخرى (ليس *Anastrepha*)

- تفتقر إلى أسنان أمامية (= حراس الفغرة)، وتفتقر إلى أسنان صليبية أو أنها غير واضحة (الشكل 48)؛ الدرناات الذيلية في أقصى الأحوال معتدلة الحجم *Anastrepha* 3

3- أشواك ظهرية *Dorsal spinules* موجودة على قطاعين بطنيين أو أكثر، وتكون منفصلة ومخروطية في أقل من خمس إلى ستة صفوف على القطاعين الصدريين T2 و T3 (الشكل 61)؛ فتحات تنفسية خلفية SP-I و SP-IV (الشكل 46) بمعدل ستة جذوع أو أكثر بشعر خشن بطول يبلغ ثلث طول الفتحات التنفسية أو أكثر (الشكلان 40 و 44)..... 4

- أشواك ظهرية *Dorsal spinules* غير موجودة على جميع القطاعات البطنية، أو إذا كانت موجودة، فقط في القطاع البطني A1 (بعض عينات *A. ludens*) 5

4- فتحات تنفسية أمامية ب 28-37 أنبوباً (الشكل 43)؛ هيكل رأسي- بلعومي cephalopharyngeal كما في الشكل 32. (النباتات المضيغة الرئيسية: تتكاثر اليرقات في ثمار فاكهة القرعيات Cucurbitaceae؛ التوزيع: بنما إلى الأرجنتين) *Anastrepha grandis*

- فتحات تنفسية أمامية ب 12-23 أنبوباً (الشكل 39)؛ هيكل رأسي- بلعومي cephalopharyngeal كما في الشكل 31. (النباتات المضيغة الرئيسية: تتكاثر اليرقات في ثمار فاكهة آسيات Myrtaceae؛ التوزيع: المناطق الاستوائية في الأمريكيتين) *Anastrepha striata*

5- أشواك ظهرية *Dorsal spinules* موجودة على القطاع الصدري T3 (الشكل 61)..... 6

- أشواك ظهرية *Dorsal spinules* غير موجودة على القطاع الصدري T3 (ليس كما أعلاه)..... 7

- 6- حروف الفم في 11 إلى 17 صفا، عادة بهوامش كاملة؛ فتحات تنفسية أمامية ب 12 إلى 20 أنبوبا (الشكلان 33، 51)؛ شقوق فتحات تنفسية خلفية أطول ب 3.1-4.6 مرات من عرضها (الشكل 34). هيكل رأسي- بلعومي كما في الشكل 27. (النباتات المضيفة الرئيسية: تتكاثر اليرقات في ثمار الحمضيات *Citrus spp.* (سذابيات Rutaceae) أو منغيفيرا هندية *Mangifera indica*؛ التوزيع: جنوب تكساس في الولايات المتحدة إلى بنما.) *Anastrepha ludens*
- حروف الفم في 8 إلى 11 صفا، بأسنان قوية ومدورة بوضوح وأسنان متباعدة بشكل واسع؛ فتحات تنفسية أمامية ب 9 إلى 15 أنبوبا (الشكل 41)؛ شقوق فتحات تنفسية خلفية أطول ب 2.5-3.5 مرة من عرضها (الشكل 42). هيكل رأسي- بلعومي كما في الشكل 29. (النباتات المضيفة الرئيسية: تتكاثر اليرقات في ثمار فاكهة آسيات Myrtaceae؛ التوزيع: فلوريدا في الولايات المتحدة وجزر الأنتيل) *Anastrepha serpentina*
- 7- نتوءات فتحات تنفسية خلفية SP-I و SP-IV بجذوع قاعدية قصيرة 5 إلى 11 (متوسط، 8) (الشكل 36)؛ حروف الفم عادة في 12 إلى 14 صفا؛ فتحات تنفسية أمامية ب 13 إلى 19 أنبوبا في صف واحد (الشكل 35)؛ فصوص الشرح عادة مزدوجة (كما في الشكل 57). هيكل رأسي- بلعومي كما في الشكل 30. (النباتات المضيفة الرئيسية: تتكاثر اليرقات في ثمار فاكهة السبوتيات Sapotaceae؛ التوزيع: المناطق الاستوائية في الأمريكيتين) *Anastrepha serpentina*
- نتوءات فتحات تنفسية خلفية SP-I و SP-IV بجذوع قاعدية قصيرة 8 إلى 18 (متوسط، 13)؛ حروف الفم في 7 إلى 10 صفوف؛ فتحات تنفسية أمامية ب 9 إلى 18 أنبوبا في صف واحد (كما في الشكل 34)؛ فصوص الشرح كاملة أو مزدوجة (الشكلان 57، 58)..... 8
- 8- نتوءات فتحات تنفسية خلفية SP-II عادة بثلاثة إلى ستة جذوع قاعدية؛ شقوق فتحات تنفسية خلفية أطول ب 3.0-4.9 مرة من عرضها (الشكل 38). هيكل رأسي- بلعومي كما في الشكل 28. (النباتات المضيفة الرئيسية: تتكاثر اليرقات في ثمار فاكهة البطميات Anacardiaceae؛ التوزيع: المناطق الاستوائية في الأمريكيتين، بما في ذلك جزر الأنتيل.) *Anastrepha obliqua*
- نتوءات فتحات تنفسية خلفية SP-II عادة بأربعة إلى تسعة جذوع قاعدية؛ شقوق فتحات تنفسية خلفية أطول ب 2.5 - 4.0 مرات من عرضها (الشكل 46). (التوزيع: المناطق الاستوائية في الأمريكيتين.) مجموعة أنواع *Anastrepha fraterculus* (Weidemann)

الجدول 2- الخصائص المورفولوجية التشخيصية لجنس *Anastrepha* المستخدمة في مفاتيح هذا البروتوكول

المرحلة البيولوجية	الهيكل	الوصف
اليريقة	الفك السفلي	أقل من 0.3 ملم في الطول؛ المنطقة الخلفية دون رقبة متميزة (واضحة)؛ السن تحت القمة غير موجود
	الفتحات التنفسية الخلفية	شعيرات الفتحات التنفسية الخلفية أطول من عرض شقوق الفتحات التنفسية الخلفية الوسطية
	جسر البلعوم السفلي	ضيق في المنطقة تحت قمة البلعوم
	الأسنان أمام الفم وفي الفم	غير موجودة
	حروف الفم	عادة مسننة
	الجهاز الحسي الفعري	موسع
	البالغة مكتملة النمو	ترتيب الشعيرات على الرأس
ترتيب الشعيرات على منتصف الظهر		واحدة <i>postpronotal</i> ، اثنتان <i>notopleurals</i> ، واحدة <i>presutural supra-alar</i> ، واحدة <i>supra-alar</i> ، واحدة <i>postalar</i> ، واحدة <i>intra-alar</i> ، واحدة <i>dorsocentral</i> ، واحدة <i>acrostichal</i> (نادراً ما تكون غير موجودة)، اثنتان <i>scutellars</i> .
الأجنحة		العروق: العرق M عادة منحني بشكل واضح إلى الأمام باتجاه القمة (ومنحن بقوة في جميع أنواع الآفات) ولا يلتقي مع الضلع بزواوية 90 درجة؛ العرق المتقاطع R-M ممتد من الطرف البعيد إلى منتصف طول الخلية القرصية (dm)؛ خلية قاعدية مرفقية (bcu) مع امتداد خلفي للقمة متطورة تماماً
		نمط الجناح: شريط (C) ضلعي على حافة ضلعية قاعدية؛ شريط S (يمتد من قمة الخلية (bcu) عبر الخلية dm والعرق المتقاطع R-M)؛ يكون الشريط V شكل V مقلوباً، تمتد ذراعه القريبة (شريط تحت القمة) على طول العرق DM-Cu وذراعه البعيدة (شريط خلفي للقمة) ناشئ من الخلية m، وهما متقاربان في الخلية R4+5.
الأعضاء التناسلية الذكورية		<i>surstylus</i> جانبي قصير أو ممدود؛ <i>surstylus</i> وسطي أقصر من الـ <i>surstylus</i> الجانبي مع شعيرتين قويتين متجهتين إلى أعلى؛ <i>proctiger</i> غشائي متصلب بشكل ضعيف جانبياً وبطنياً؛ حشفة متصلبة بشكل ضعيف بصلبية علوية على شكل T، الحشفة في بعض الأحيان غير موجودة في الأنواع التي لا تعتبر آفات
الأعضاء التناسلية الأنثوية	جهاز وضع البيض <i>oviscape</i> على شكل أنبوب، متفاوت في الطول؛ غشاء قابل للقلب ظهراً لبطن <i>eversible</i> متجه إلى أعلى مع مجموعة ظهرية من لوحات متصلبة تشبه الخطاف (تسمى أيضاً <i>raspers</i>)؛ الشوكة متصلبة تماماً، وطرفها أحياناً مسنن على الحواف الجانبية.	

الجدول 3- الخصائص المورفولوجية التشخيصية ليرقات الطور الثالث لأنواع *Anastrepha*

الأنواع	هيكل	الوصف	
مجموعة أنواع <i>Anastrepha fraterculus</i>	حروف الفم	في 7 إلى 10 صفوف	
	الفتحات التنفسية الأمامية	ب 9 إلى 18 أنبوبا في صف واحد	
	أشواك ظهرية spinules	Dorsal	غير موجودة على القطاعات البطنية
			غير موجودة على القطاع الصدري T3
	الفتحات التنفسية الخلفية	SP-I و SP-IV ب 10 إلى 17 جذعا طويلا، و SP-II عادة ب 6 إلى 9 جذوع؛ شقوق أطول ب 2.5 - 3.5 مرات من عرضها	
فصوص الشرح	كاملة في بعض المجموعات، مشقوقة في أخرى		
<i>Anastrepha grandis</i>	حروف الفم	في 8 إلى 13 صفا	
	الفتحات التنفسية الأمامية	ب 28 إلى 37 أنبوبا	
	أشواك ظهرية spinules	Dorsal	موجودة على قطاعين بطنيين أو أكثر
			موجودة على القطاعين الصدريين T2 و T3
	الفتحات التنفسية الخلفية	SP-I و SP-IV بمعدل ستة جذوع أو أكثر بشعر خشن بطول يبلغ ثلث طول الفتحات التنفسية أو أكثر	
فصوص الشرح	مزدوجة		
<i>Anastrepha ludens</i>	حروف الفم	في 11 إلى 17 صفا؛ حواف كاملة	
	الفتحات التنفسية الأمامية	ب 12 إلى 20 أنبوبا	
	أشواك ظهرية spinules	Dorsal	موجودة على القطاعات البطنية A1
			موجودة على القطاع الصدري T3
	الفتحات التنفسية الخلفية	شقوق أطول ب 3.1 - 4.6 مرات من عرضها	
فصوص الشرح	مزدوجة		
<i>Anastrepha obliqua</i>	حروف الفم	في 7 إلى 10 صفا	
	الفتحات التنفسية الأمامية	ب 9 إلى 18 أنبوبا في صف واحد	
	أشواك ظهرية spinules	Dorsal	غير موجودة على القطاعات البطنية
			غير موجودة على القطاع الصدري T3
	الفتحات التنفسية الخلفية	SP-I و SP-IV ب 10 إلى 17 جذوع طويلة، و SP-II عادة ب 3 إلى 6 جذوع؛ شقوق أطول ب 3 - 4.5 مرات من عرضها	
فصوص الشرح	كاملة		
حروف الفم	في 12 إلى 18 صفا		

الأنواع	هيكل	الوصف
Anastrepha serpentina	الفتحات التنفسية الأمامية	ب 13 إلى 19 أنبوبا في صف واحد
	أشواك ظهرية spinules Dorsal	غير موجودة على القطاعات البطنية
		غير موجودة على القطاع الصدري T3
	الفتحات التنفسية الخلفية	SP-I و SP-IV بستة إلى تسعة جذوع قصيرة
	فصوص الشرح	عادة مزدوجة (أحيانا كاملة)
Anastrepha striata	حروف الفم	في 5 إلى 8 صفوف
	الفتحات التنفسية الأمامية	ب 12 إلى 23 أنبوبا
	أشواك ظهرية spinules Dorsal	موجودة على قطاعين بطنيين أو أكثر ؛ موجودة على القطاعين الصدريين T2 و T3
		الفتحات التنفسية الخلفية
	فصوص الشرح	كاملة أو مزدوجة جزئياً
Anastrepha suspensa	حروف الفم	في 8 إلى 11 صفاً، بأسنان قوية ومدورة بوضوح وأسنان متباعدة بشكل واسع
	الفتحات التنفسية الأمامية	ب 9 إلى 15 أنبوبا
	أشواك ظهرية spinules Dorsal	غير موجودة على القطاعات البطنية
		موجودة على القطاع الصدري T3
	الفتحات التنفسية الخلفية	شقوق أطول ب 2.5 - 3.5 مرة من عرضها
فصوص الشرح	—	

الجدول 4- الخصائص المورفولوجية التشخيصية للحشرات البالغة بالمكتلة النمو من أنواع *Anastrepha*

الأنواع	هيكل	الوصف
مجموعة أنواع <i>Anastrepha fraterculus</i>	ترتيب الشعيرات على الرأس	الشعيرات المدارية الخلفية موجودة
	الصدر	السوبسكوتيلوم subscutellum والصفائح الوسيطة mediotergite كلاهما بعلامات عريضة على الجانبين بنية خيط سكوتو سكوتيلار scuto-scutellar يكون عادة ببقعة بنية وسطياً
	الأجنحة	الذراع البعيدة من الشريط S متقدمة النمو عادة، لا تصل ابدأ إلى قمة العرق M ؛ الشريط V متصل بالشريط S أو منفصل عنه أمامياً
	الأعضاء التناسلية الأنثوية	طول الشوكة 4.1-9.1 ملم، طول رأس الشوكة 0.20-0.28 ملم وبتسنين جانبي ب 8 أسنان إلى 14 سناً على بعد خمسين إلى ثلاثة أخماس
<i>Anastrepha grandis</i>	ترتيب الشعيرات على الرأس	الشعيرات المدارية الخلفية غير موجودة
	الصدر	الترس بخطوط ظهر مركزية بنية داكنة
	الأجنحة	الشريط C- غير متقطع على طول العرق الضلعي؛ يتواصل النصف القاعدي للشريط S (الخلية القرصية) من قمة الخلية القاعدية المرفقية bcu مروراً بالعرق المتقاطع R-M ويتصل بالشريط C أعلاه؛ الخلية r_{2+3} مصطبغة تماماً بطولها الكامل؛ العرق r_{2+3} مستقيم تقريباً بطوله الكامل؛ الخلية br شفافة بشكل عام بين العرقين bm-cu و R-M
الأعضاء التناسلية الأنثوية	الشوكة طويلة للغاية (5.3 - 6.2) ملم، يكون عرضها عادة أكثر من 0.10 ملم رأس الشوكة بحافتين على شكل V والحواف الجانبية غير مسننة	
<i>Anastrepha ludens</i>	ترتيب الشعيرات على الرأس	الشعيرات المدارية الخلفية موجودة
	الصدر	السوبسكوتيلوم subscutellum دائماً بعلامات جانبية بنية وفي بعض الأحيان ممتدة على الصفائح الوسيطة mediotergite
	الأجنحة	الشريط V عادة غير متصل بالشريط S والذراعان منفصلتان أمامياً
الأعضاء التناسلية الأنثوية	الشوكة طويلة للغاية (3.3 - 5.8) ملم، طول رأس الشوكة 0.28 - 0.42 ملم وعرضه 0.12-0.14 مع انقباض معتدل قرب منتصف الطول؛ الحواف الجانبية غير مسننة أو مسننة بأسنان دقيقة على الطرف الأقصى 0.55 أو أقل	
<i>Anastrepha obliqua</i>	ترتيب الشعيرات على الرأس	الشعيرات المدارية الخلفية موجودة
	الصدر	السوبسكوتيلوم subscutellum أصفر تماماً، هناك فقط علامات بنية على جانبي الصفائح الوسيطة mediotergite ؛ خيط سكوتو سكوتيلار scuto-scutella بدون بقعة بنية وسطياً

الأنواع	هيكل	الوصف
Anastrepha serpentina	الأجنحة	الذراع البعيدة من الشريط S متقدمة النمو عادة، لا تصل ابدأ إلى قمة العرق M ؛ الشريط V عادة متصل بالشريط S أمامياً
	الأعضاء التناسلية الأنثوية	طول الشوكة أقل من 2.0 ملم، طول رأس الشوكة 0.16 – 0.20 ملم وبتسنيين جانبي على بعد ثلثين إلى أربعة أخماس
	ترتيب الشعيرات على الرأس	الشعيرات المدارية الخلفية موجودة
	الصدر	الصدر في معظم الأحيان بني أو أحمر إلى بني متباين مع العلامات الصفراء؛ الترس في معظم الأحيان بني عليه ثلاثة خطوط صفراء
	الأجنحة	نمط الجناح معظمه بني داكن؛ الذراع البعيدة للشريط V غير موجودة بالكامل
Anastrepha striata	الأعضاء التناسلية الأنثوية	طول الشوكة 2.6 – 3.8 ملم، طول رأس الشوكة 0.37–0.46 ملم وعرضه 0.14 – 0.17 ملم وبتسنيين جانبي دقيق على بعد 0.5 – 0.7
	ترتيب الشعيرات على الرأس	الشعيرات الجانبية المدارية موجودة
	الصدر	الترس بخطي ظهر مركزيين عريضين متصلين على حافة خارجية ليشكل علامة على شكل U، دون شعيرات في منطقة صغيرة على طول خيط مستعرض
	الأجنحة	نمط الجناح معظمه برتقالي وبني؛ الذراع البعيدة للشريط V موجودة أو غير موجودة
	الأعضاء التناسلية الأنثوية	طول الشوكة 1.95 – 2.30 ملم رأس الشوكة عريض، طوله 0.24 – 0.31 وعرضه 0.17–0.20
Anastrepha suspensa	ترتيب الشعيرات على الرأس	الشعيرات الجانبية المدارية موجودة
	الصدر	خيط سكوتو سكوتيلار Scuto-scutellar يكون عادة ببقعة بنية كبيرة مدوّرة وسطياً؛ الصفائح الوسيطة mediotergite صفراء تماماً أو بعلامة بنية على الجانبين.
	الأجنحة	الشريط العلوي الداخلي للجناح (= القسم البعيد من الشريط S) واسع للغاية، يصل إلى قمة العرق M لشريط V مكتمل وواسع بذراعين متصلين أمامياً
	الأعضاء التناسلية الأنثوية	طول الشوكة 1.4–1.6 ملم، وطول رأس الشوكة 0.19–0.23 ملم، وعرضه 0.10–0.13 ملم، الحواف الجانبية مسننة بدقة على الطرف الأقصى 0.50–0.65.

5- السجلات

ينبغي الاحتفاظ بالسجلات والبراهين حسبما هو مبين في القسم 2-5 من المعيار الدولي رقم 27 (بروتوكولات تشخيص الآفات الخاضعة للوائح).

وفي الحالات التي قد تتأثر فيها أطراف متعاقدة أخرى (خاصة العينات بنتائج التشخيص المحفوظة أو الموضوعة على شرائح، وصور الهياكل التصنيفية المميزة، حسب الاقتضاء) ينبغي أن تودع في متحف أو مجموعة دائمة أخرى.

6- جهات الاتصال للحصول على معلومات إضافية

يمكن الحصول على مزيد من المعلومات عن هذا البروتوكول من:

Instituto de Ecología A.C., Red de Interacciones Multitróficas, Xalapa, Veracruz, México (Vicente Hernández-Ortiz; e-mail: vicente.hernandez@inecol.mx).

Systematic Entomology Laboratory, United States Department of Agriculture (USDA), Washington, DC, United States (Allen L. Norrbom; e-mail: anorrbom@sel.barc.usda.gov).

Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ)/Universidade de São Paulo (USP) – Departmaneto de Entomologia, Piracicaba, Brazil (Roberto A. Zucchi; e-mail: razucchi@usp.br).

Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación, Instituto de Entomología, Santiago, Chile (Daniel Frías; e-mail: daniel.frias@umce.cl).

Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry, Gainesville, FL, United States (Gary Steck; e-mail: gary.steck@freshfromflorida.com).

Universidad de Buenos Aires, Facultad de Agronomía, Buenos Aires, Argentina (Alicia Basso; e-mail: bassoalicia@yahoo.com).

APHIS, United States Department of Agriculture (USDA), Mission Laboratory, TX, United States (Norman B. Barr; e-mail: Norman.B.Barr@aphis.usda.gov).

Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Dirección General de Servicios Agrícolas, Departamento Laboratorios Biológicos, Montevideo, Uruguay (Andrea Listre; e-mail: allbme@gmail.com).

ويمكن أن تقدم المنظمات القطرية الخاصة بوقاية النباتات أو المنظمات الإقليمية لوقاية النباتات أو الأجهزة التابعة لهيئة تدابير الصحة النباتية طلباً لإعادة النظر في بروتوكول التشخيص من خلال أمانة الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات (ippc@fao.org) التي ستقوم بدورها بإحالتها إلى الفريق الفني المعني بوضع بروتوكولات التشخيص.

7- شكر وتقدير

حرر هذا البروتوكول V. Hernández-Ortiz (Instituto de Ecología A.C., Red de Interacciones Multitróficas, México) بالتعاون مع N. Vaccaro (Instituto Nacional de Tecnología, Argentina) و A. Basso (Agropecuaria, Estación Experimental Concordia, Argentina) (من جامعة بوينس آيرس، الأرجنتين). (Universidad de Buenos Aires, Facultad de Agronomía)، (انظر القسم السابق).

وبالإضافة إلى ذلك، شارك في وضع هذا البروتوكول إلى حد كبير الخبراء التالية أسماؤهم:

- A.L. Norrbom (Systematic Entomology Laboratory, United States Department of Agriculture (USDA), Smithsonian Institution, United States (انظر القسم السابق))
- R.A. Zucchi (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de Sao Paulo, Brazil (انظر القسم السابق))
- D. Frías (Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación, Chile (see preceding section))
- N.B. Barr (APHIS, United States Department of Agriculture (USDA), United States (انظر القسم السابق))
- G. Steck (Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry, United States (انظر القسم السابق))
- A.L. Terra, (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Dirección General de Servicios Agrícolas, Uruguay)
- A. Listre (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Dirección General de Servicios Agrícolas, Uruguay)
- O. Volonterio (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Dirección General de Servicios Agrícolas, Uruguay)
- M. Malipatil (La Trobe University, Bioprotection, Biosciences Research Division, Department of Environment and Primary Industries (Victoria), Australia)
- V. Balmès (Anses, Laboratoire de la santé des végétaux, Unité entomologie et plantes invasives, France).

8- المراجع

يشير المعيار الحالي أيضا إلى معايير دولية أخرى لتدابير الصحة النباتية، وهي متاحة على البوابة الدولية

للصحة النباتية <https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/ispms>

- Aluja, M., Piñero, J., Jácome, I., Díaz-Fleischer, F. & Sivinski, J.** 1999. Behavior of flies in the genus *Anastrepha* (Trypetinae: Toxotrypanini). In M. Aluja & A.L. Norrbom, eds. *Fruit flies (Tephritidae): Phylogeny and evolution of behavior*, pp. 375–406. Boca Raton, FL, CRC Press.
- Basso, A.L.** 2003. Caracterización genética de los componentes del “complejo *Anastrepha fraterculus*” (*Anastrepha* spp. Diptera: Tephritidae, Trypetinae) (Wiedemann) mediante análisis de la variabilidad cromosómica. University of Buenos Aires, Buenos Aires. (PhD Dissertation)
- Berg, G.H.** 1979. *Clave ilustrada de larvas de moscas de la fruta de la familia Tephritidae*. El Salvador, Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria. 36 pp.
- Cáceres, C., Segura, D.F., Vera, M.T., Wornoayporn, V., Cladera, J.L., Teal, P., Sapountzis, P., Bourtzis, P., Zacharopoulou, A. & Robinson, A.S.** 2009. Incipient speciation revealed in *Anastrepha fraterculus* (Diptera; Tephritidae) by studies on mating compatibility, sex pheromones, hybridization, and cytology. *Biological Journal of the Linnean Society*, 97: 152–165.
- Carroll, L.E., Norrbom, A.L., Dallwitz, M.J. & Thompson, F.C.** 2004. *Pest fruit flies of the world: Larvae*. Version: 8 December 2006. Available at <http://delta-intkey.com/ffl/> (last accessed 18 March 2015).
- Carroll, L.E. & Wharton, R.A.** 1989. Morphology of the immature stages of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 82: 201–214.
- Dutra, V.S., Ronchi-Teles, B., Steck, G.J. & Gomes Silva, J.** 2011a. Description of eggs of *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in the *spatulata* group using scanning electron microscopy. *Annals of the Entomological Society of America*, 104(5): 857–862.

- Dutra, V.S., Ronchi-Teles, B., Steck, G.J. & Gomes Silva, J.** 2011b. Egg morphology of *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in the *fraterculus* group using scanning electron microscopy. *Annals of the Entomological Society of America*, 104(1): 16–24.
- Dutra, V.S., Ronchi-Teles, B., Steck, G.J. & Gomes Silva, J.** 2012. Description of larvae of *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in the *fraterculus* group. *Annals of the Entomological Society of America*, 105(4): 529–538.
- Dutra, V.S., Ronchi-Teles, B., Steck, G.J. & Gomes Silva, J.** 2013. Description of eggs of *Anastrepha curitis* and *Anastrepha leptozona* (Diptera: Tephritidae) using SEM. *Annals of the Entomological Society of America*, 106(1): 13–17.
- Figueiredo, J.V.A., Perondini, A.L.P., Ruggiro, E.M., Prezotto, L.F. & Selivon, D.** 2011. External egg-shell morphology of *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Acta Zoologica (Stockholm)*, doi: 10.1111/j.1463-6395.2011.00533.x.
- Foote, R.H., Blanc, F.L. & Norrbom, A.L.** 1993. *Handbook of the fruit flies (Diptera: Tephritidae) of America North of Mexico*. Ithaca, NY, Comstock Publishing Associates, Cornell University Press. 571 pp.
- Frías, D., Hernández-Ortiz, V. & López Muñoz, L.** 2009. Description of the third-instar of *Anastrepha leptozona* Hendel (Diptera: Tephritidae). *Neotropical Entomology*, 38(4): 491–496.
- Frías, D., Hernández-Ortiz, V., Vaccaro, N., Bartolucci, A. & Salles, L.** 2006. Comparative morphology of immature stages in some frugivorous species of fruit flies (Diptera: Tephritidae). In A. Freidberg, ed. *Biotaxonomy of the Tephritoidea*, *Israel Journal of Entomology*, 35–36: 423–457.
- Frias, D., Selivon, D. & Hernández-Ortiz, V.** 2008. Taxonomy of immature stages: New morphological characters for Tephritidae larvae identification. In A. Malavasi, R. Sugayama, R. Zucchi & J. Sivinski, eds. *Fruit flies of economic importance: From basic to applied knowledge*. Proceedings of the International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, Salvador, Brazil, 10–15 September 2006, pp. 29–44.
- Hernández-Ortiz, V.** 1992. *El género Anastrepha Schiner en México*. Taxonomía, distribución y sus plantas huéspedes. Publicación #33. Xalapa, México, Instituto de Ecología. 167 pp.
- Hernández-Ortiz, V. & Aluja, M.** 1993. Listado de especies del género neotropical *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) con notas sobre su distribución y plantas hospederas. *Folia Entomológica Mexicana*, 88: 89–105.
- Hernández-Ortiz, V., Bartolucci A.F., Morales-Valles, P., Frías, D. & Selivon, D.** 2012. Cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex: A multivariate approach for the recognition of South American morphotypes. *Annals of the Entomological Society of America*, 105(2): 305–318.
- Hernández-Ortiz, V., Gómez-Anaya, J.A., Sánchez, A., McPheron, B.A. & Aluja, M.** 2004. Morphometric analysis of Mexican and South American populations of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae) and recognition of a distinct Mexican morphotype. *Bulletin of Entomological Research*, 94: 487–499.
- Hernández-Ortiz, V., Guillén-Aguilar, J. & López, L.** 2010. Taxonomía e identificación de moscas de la fruta de Importancia Económica en América. In P. Montoya, J. Toledo & E. Hernández, eds. *Moscas de la Fruta: Fundamentos y Procedimientos para su Manejo*, pp. 49–80. México, D.F., S y G Editores.
- Lopes, G.N., Arias, O.R., Cônsoli, F.L. & Zucchi, R.A.** 2013. The identity of specimens of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae) with atypical aculeus tip. *Neotropical Entomology*, 42(6): 618–627.
- Malavasi, A., Morgante, J.S. & Prokopy, R.J.** 1983. Distribution and activities of *Anastrepha fraterculus* (Diptera:Tephritidae) flies on host and non-host trees. *Annals of the Entomological Society of America*, 76: 286–292.
- Meier, R., Shiyang, K., Vaidya, G., & Ng, P.K.** 2006. DNA barcoding and taxonomy in Diptera: A tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology*, 55(5): 715–728.

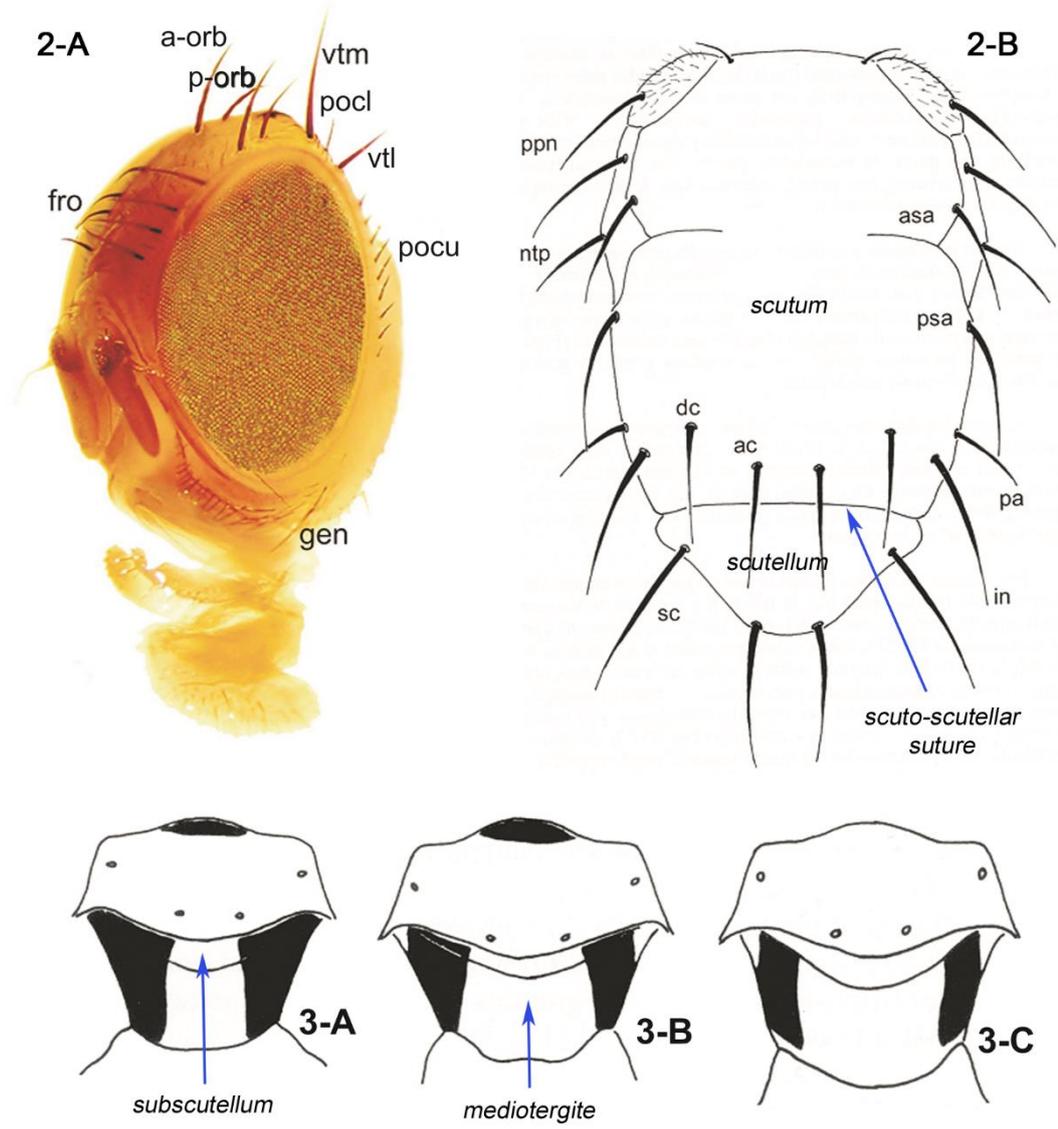
- Norrbom, A.L.** 2004a. Host plant database for *Anastrepha* and *Toxotrypana* (Diptera: Tephritidae: Toxotrypanini). *Diptera Data Dissemination Disk* (CD-ROM) 2.
- Norrbom, A.L.** 2004b. Updates to biosystematic database of world Diptera for Tephritidae through 1999. *Diptera Data Dissemination Disk* (CD-ROM) 2.
- Norrbom, A.L.** 2010. Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) Taxonomy Pages. Beltsville, MD, Systematic Entomology Laboratory, Agricultural Research Service (ARS), United States Department of Agriculture (USDA). Available at <http://www.sel.barc.usda.gov/diptera/tephriti/tephriti.htm> (last accessed 18 October 2010).
- Norrbom, A.L., Carroll, L.E. & Freidberg, A.** 1999a. Status of knowledge. In F.C. Thompson, ed. *Fruit fly expert identification system and systematic information database*, pp. 9–47. *Myia* (1998) 9, vii + 524 pp. and *Diptera Data Dissemination Disk* (CD-ROM) (1998) 1.
- Norrbom, A.L., Carroll, L.E., Thompson, F.C., White, I.M. & Freidberg, A.** 1999b. Systematic database of names. In F.C. Thompson, ed. *Fruit fly expert identification system and systematic information database*, pp. 65–251. *Myia* (1998) 9, vii + 524 pp. and *Diptera Data Dissemination Disk* (CD-ROM) (1998) 1.
- Norrbom, A.L. & Kim, K.C.** 1988. A list of the reported host plants of the species of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). *United States Department of Agriculture, APHIS* 81–52, 114 pp.
- Norrbom, A.L., Korytkowski, C.A., Zucchi, R.A., Uramoto, K., Venable, G.L., McCormick, J. & Dallwitz, M.J.** 2012. *Anastrepha* and *Toxotrypana*: Descriptions, illustrations, and interactive keys. Version: 31 August 2012. Available at <http://delta-intkey.com> (last accessed 18 March 2015).
- Norrbom, A.L., Zucchi, R.A. & Hernández-Ortiz, V.** 1999c. Phylogeny of the genera *Anastrepha* and *Toxotrypana* (Trypetinae: Toxotrypanini) based on morphology. In M. Aluja & A.L. Norrbom, eds. *Fruit flies (Tephritidae): Phylogeny and evolution of behavior*, pp. 299–342. Boca Raton, FL, CRC Press.
- Prokopy, R.J. & Roitberg, B.D.** 1984. Foraging behavior of true fruit flies. *American Scientist*, 72: 41–49.
- Selivon, D., Perondini, A.L.P., Morgante, J.S.** 2005. A genetic-morphological characterization of two cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 98: 367–381.
- Selivon, D., Vretos, C., Fontes, L. & Perondini, A.L.P.** 2004. New variant forms in the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae). In B.N. Barnes, ed. *Proceedings of the 6th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance*, Stellenbosch, South Africa, 2004, pp. 253–258. Stellenbosch, South Africa, Isteg Scientific Publications.
- Sonvico, A., Benseñor, L., Basso, A. & Quesada-Allué, L.A.** 2004. *Anastrepha fraterculus* internal transcribed spacer 1, complete sequence. GenBank accession number AY686689.
- Steck, G.J., Carroll, L.E., Celedonio-Hurtado, H. & Guillén-Aguilar, J.** 1990. Methods for identification of *Anastrepha* larvae (Diptera: Tephritidae), and key to 13 species. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 92: 333–346.
- Steck, G.J. & Wharton, R.A.** 1988. Description of immature stages of *Anastrepha interrupta*, *A. limae*, and *A. grandis* (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 81: 994–1003.
- Stone, A.** 1942. *The fruit flies of the genus Anastrepha*. United States Department of Agriculture (USDA) Miscellaneous Publication 439. Washington DC, USDA. pp. 1–112. 2012. Available at <http://www.sel.barc.usda.gov/diptera/tephriti/tephriti.htm>.
- Vera, M.T., Cáceres, C., Wornoayporn, V., Islam, A., Robinson, A.S., De La Vega, M.H., Hendrichs, J. & Cayol, J.P.** 2006. Mating incompatibility among populations of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 99: 387–397.
- Virgilio, M., Backeljau, T., Nevado, B., & De Meyer, M.** 2010. Comparative performances of DNA barcoding across insect orders. *BMC Bioinformatics*, 11(1): 206.

- White, I.M. & Elson-Harris, M.M.** 1992. *Fruit flies of economic significance: Their identification and bionomics*. Wallingford, UK, CABI. 601 pp.
- Will, K.W., Mishler, B.D. & Wheeler, Q.D.** 2005. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology*, 54: 844–851.
- Zucchi, R.A.** 2000. Taxonomia. In A. Malavasi & R.A. Zucchi, eds. *Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil. Conhecimento básico e aplicado*, pp. 13–24. Riberao Preto, Brasil, Holos Editora.

9- الأشكال

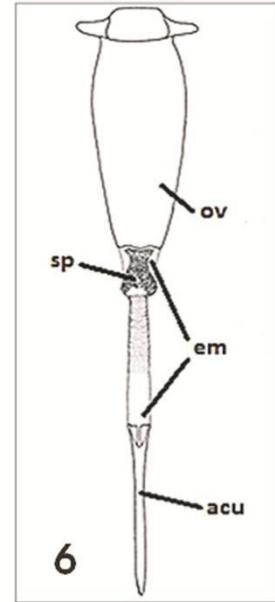
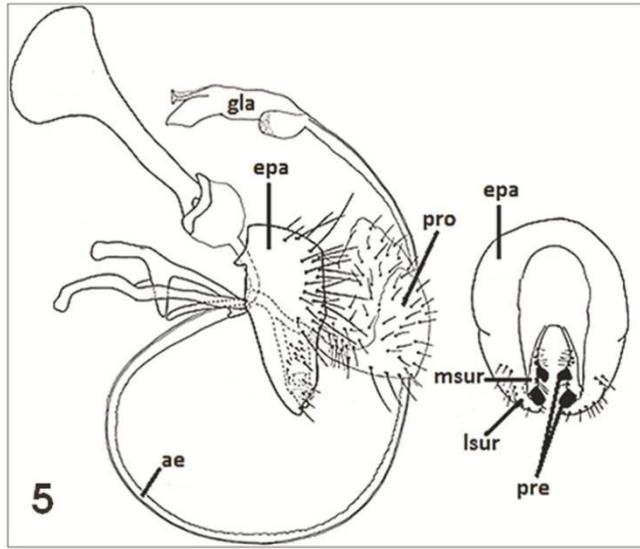
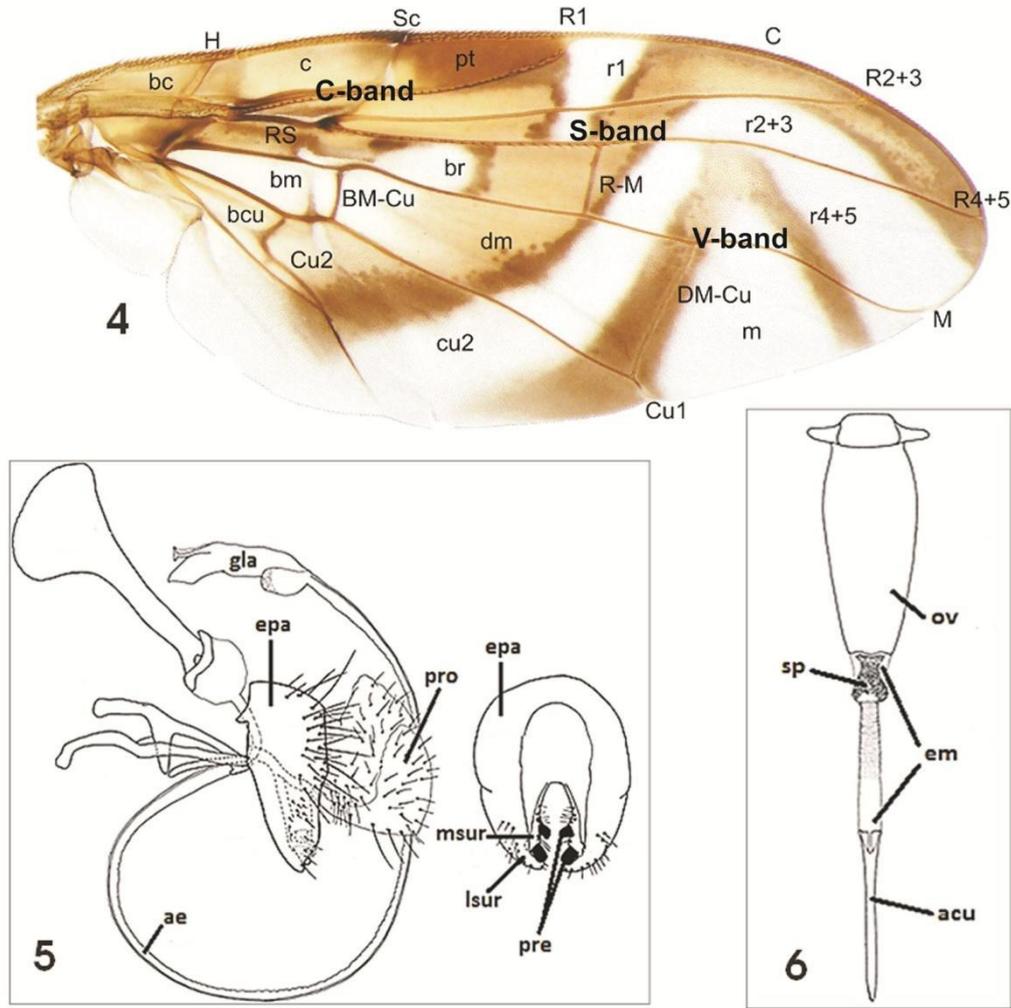


الشكل 1. وضعية الجسم العامة للإناث البالغة مكتسبات النيمو من فصيلة *Anastrepha ludens* (ذبابة فاكهة المكسيك) في عرض ظهري. صورة مجهرية مقدمة من V. Hernández-Ortiz.



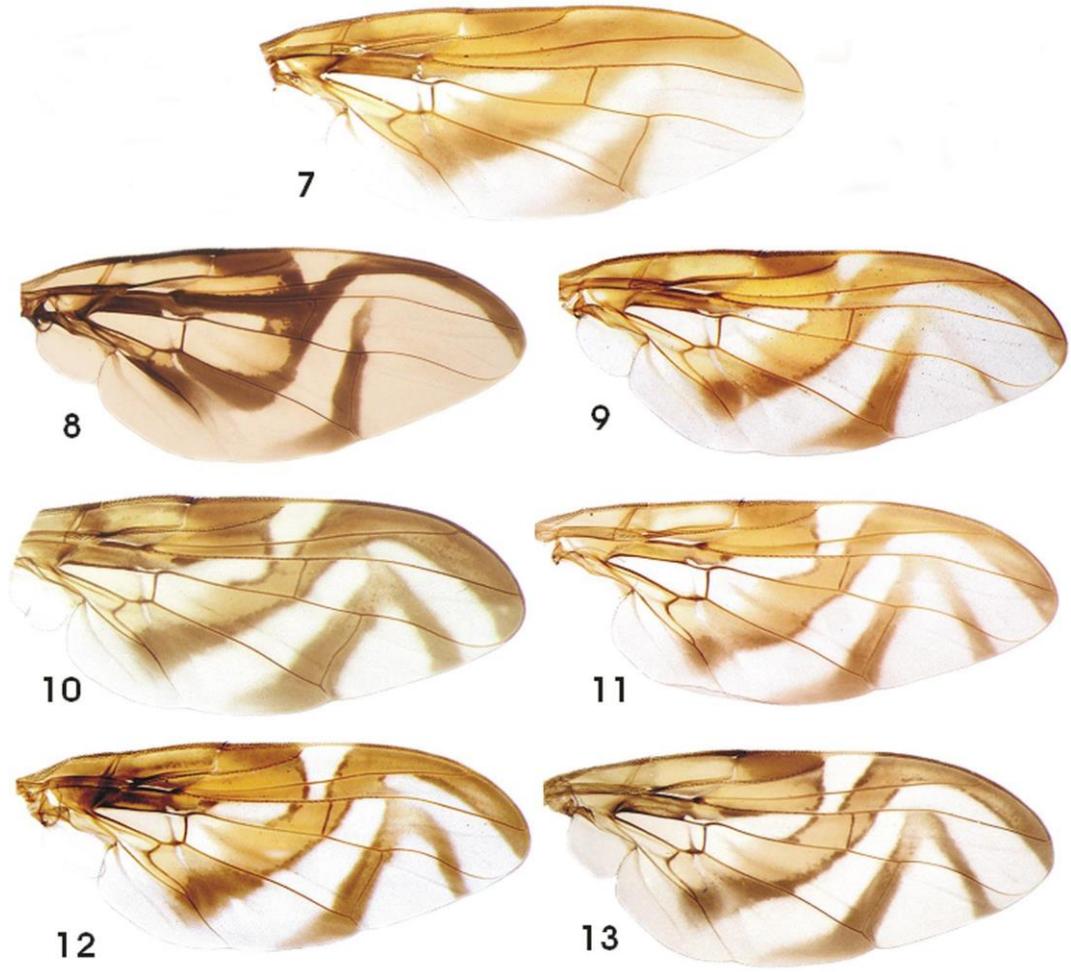
الشكلان 2-3. (A-2) مورفولوجيا رأس أنواع *Anastrepha*، عرض جبهي وجانبي؛ *a-orb*، شعيرة مدارية أمامية؛ *fro*، شعيرة جبهيّة بعيدة؛ *gen*، جينا؛ *pocl*، شعيرة خلف العين؛ *pocu*، شعيرة خلف العين؛ *p-orb*، شعيرة خلف العين؛ *vtl*، شعيرة مدارية خلفية؛ *vtm*، شعيرة جانبية عمودية؛ *vtm*، شعيرة وسطية عمودية (B-2) عرض ظهري للصدر وترتيب الشعيرات، *ac*، acrostichal، *asa*، presutural supra-alar، *dc*، dorsocentral، *in*، intra-alar، *ntp*، notopleurals، *pa*، postalar، *ppn*، postpronotal، *psa*، postsutural supra-alar، *sc*، scutellars، (3) عرض لـ Mediotergite و subscutellum، وعرض ظهري خلفي: *A. obliqua* (C-3)؛ *A. ludens* (B-3)؛ *fraterculus* (A-3).

المصدر: الشكل 1 (A) مقتبس من Hernández-Ortiz وآخرين (2010)؛ الشكلان 2 و 3 مقتبس من Hernández-Ortiz (1992).

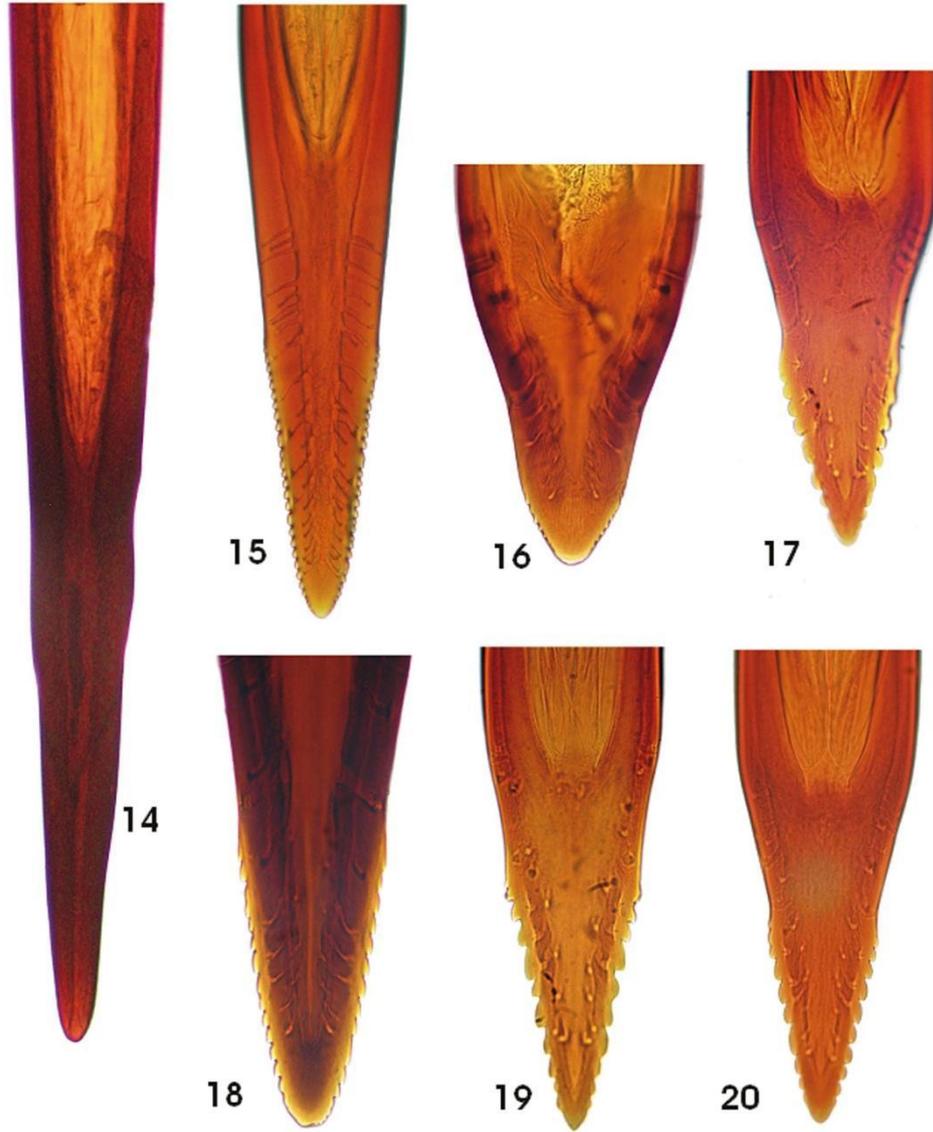


الأشكال 4-6. (4) نمط جناح *Anastrepha* وتسميات العروق والخلايا (عرض ظهري). (5) نهائية ترمينليا الذكور في أنواع *Anastrepha*. ae. نهائية (ترمينليا) الإناث في أنواع *Anastrepha*. acu. غشاء قابل للقلب ظهراً لبطن eversible؛ ov، جهاز وضع البيض oviscape، لوحات متصلبة (rasper)، sp، نهائية (ترمينليا) الإناث في أنواع *Anastrepha*. epandrium، gla، حشفة؛ lsur، surstylus جانبي؛ msur، surstylus وسطي؛ pre، prensisetae؛ pro، proctiger (6)

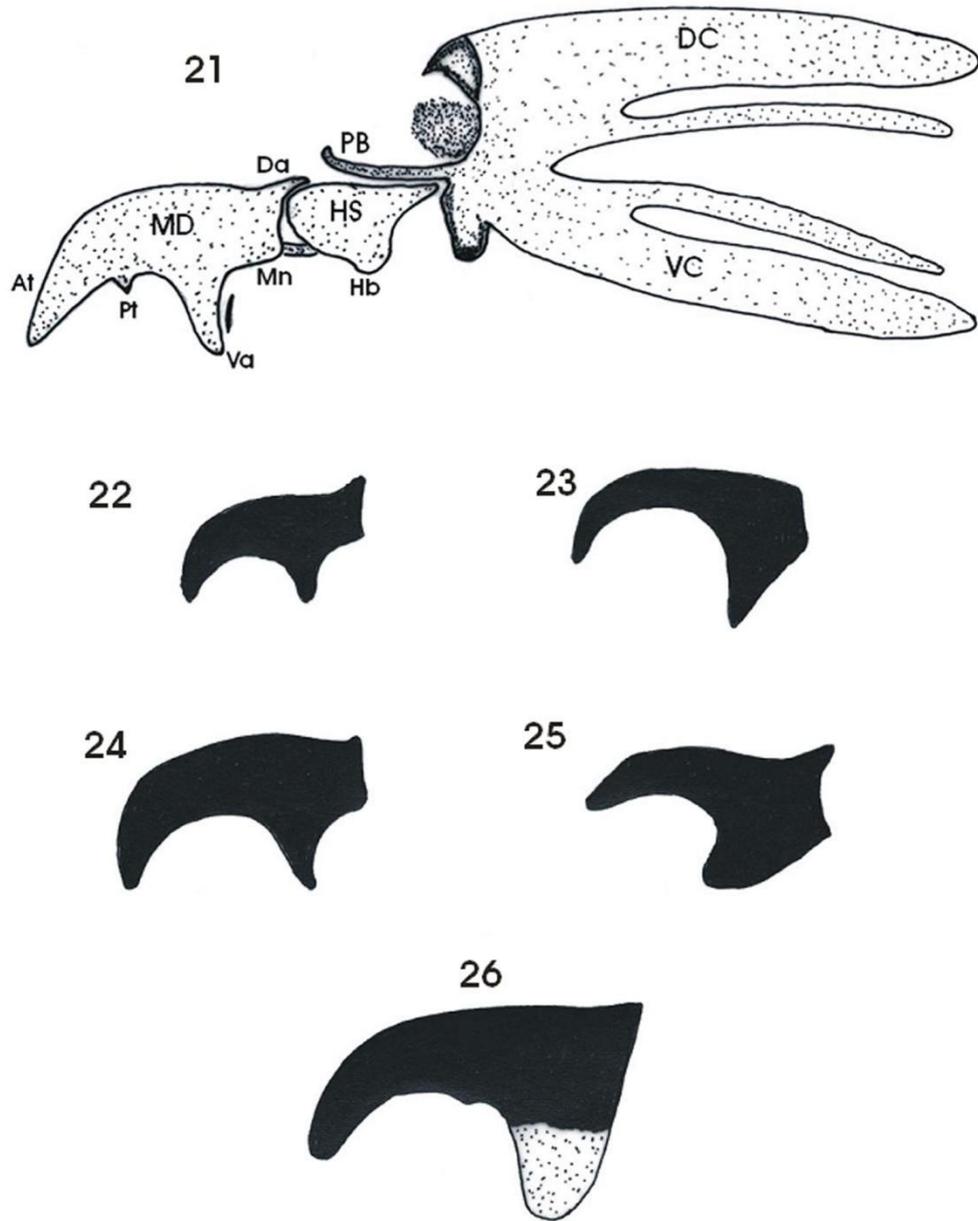
المصدر: الشكل 4 مقتبس من Hernández-Ortiz وآخرين (2010)؛ الشكلان 5 و6 مقتبس من Norrbom وآخرين (2012).



الأشكال 7 - 13. نمط جناح أنواع *Anastrepha*: (7) *A. grandis*، (8) *A. serpentina*، (9) *A. striata*، (10) *A. suspensa*، (11) *A. ludens*، (12) *A. obliqua*، (13) *A. fraterculus* (البرازيل).
المصدر: جميع الأشكال مقتبسة من Hernández-Ortiz وآخرين (2010).

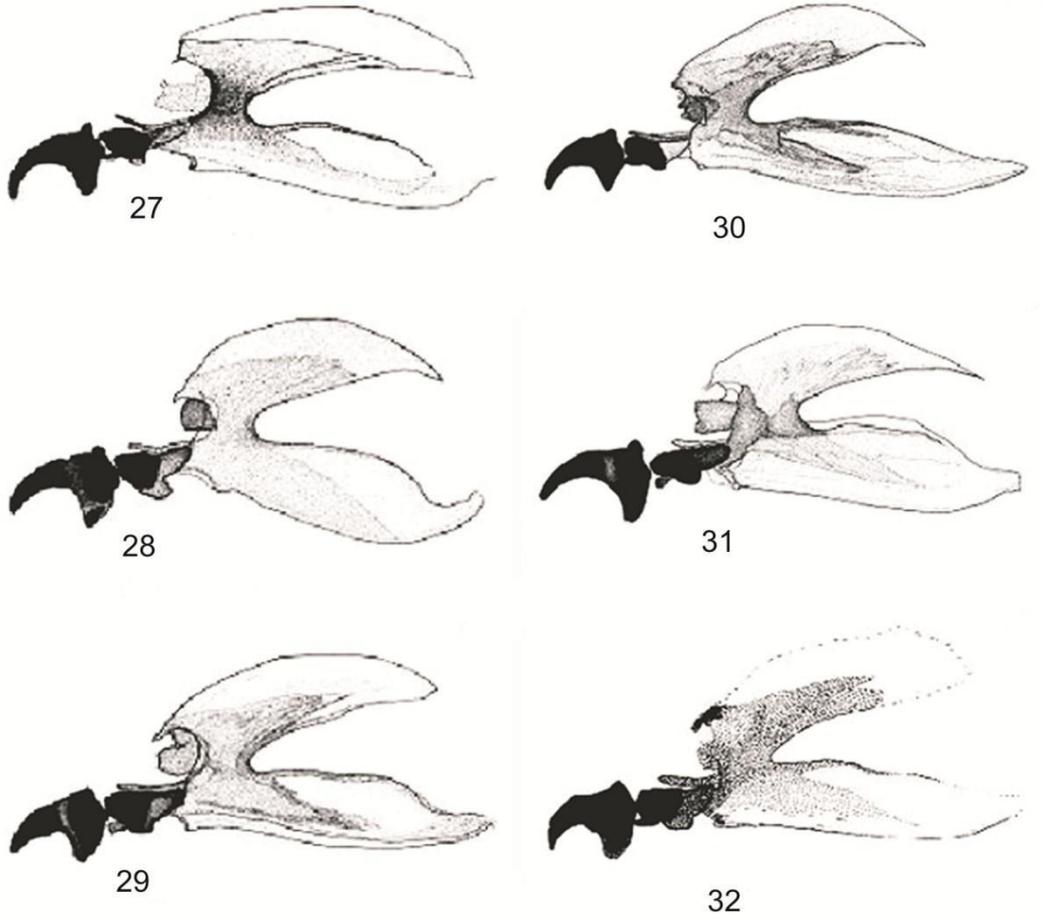


الأشكال 14-20. مورفولوجيا رأس شوكة الأنثى لأنواع *Anastrepha* ذات الأهمية الاقتصادية الرئيسية: (14) *A. grandis*، (15) *A. serpentina*، (16) *A. striata*، (17) *A. suspensa*، (18) *A. ludens*، (19) *A. obliqua*، (20) *A. fraterculus* (البرازيل).
المصدر: جميع الأشكال مقتبسة من Hernández-Ortiz وآخرين. (2010).



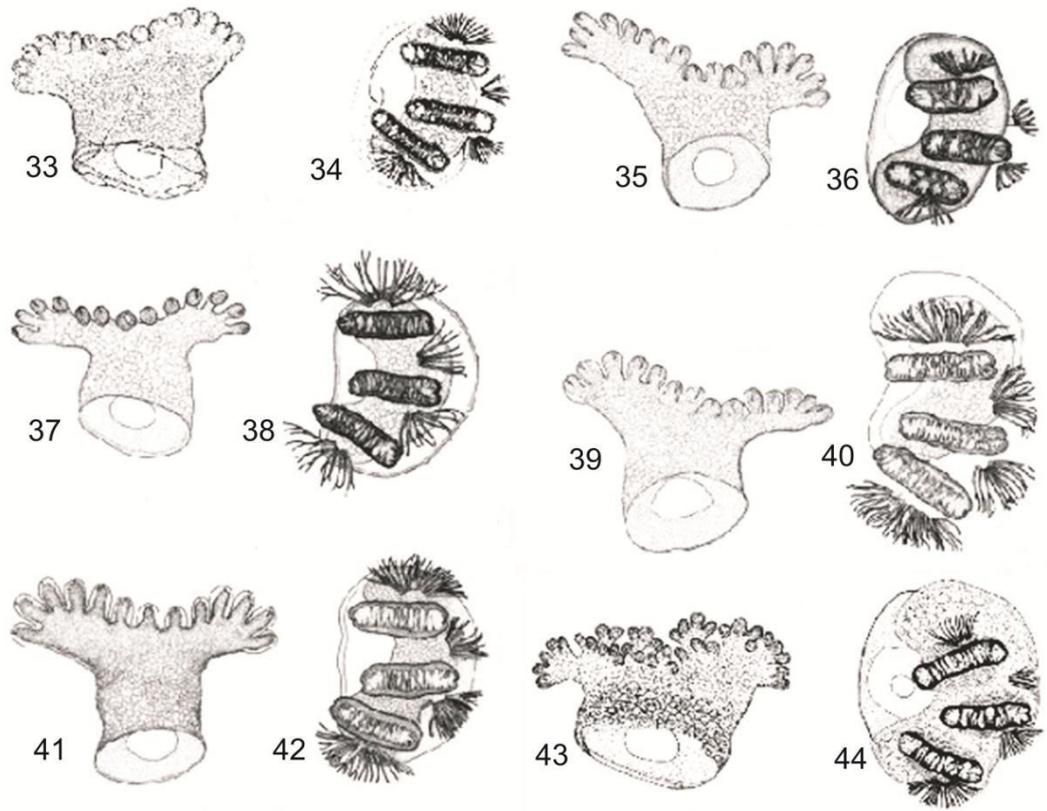
الأشكال 21-26. (21) مورفولوجيا الهيكل الرأسي - البلعومي ليرقات الطور الثالث. خطاف الفك السفلي ليرقات الطور الثالث، عرض جانبي: (22) *Ceratitis capitata*؛ (23) *Anastrepha obliqua*؛ (24) *Bactrocera dorsalis*؛ (25) *Rhagoletis tomatis*؛ (26) *Toxotrypana sp.*؛ *At*، سن قمي؛ *DC*، قرن ظهري؛ *DS*، صليبية سنّية؛ *Hb*، جسر البلعوم السفلي، *HS*، صليبية بلعومية؛ *MD*، الفك السفلي؛ *Mn*، عنق الفك السفلي؛ *PB*، parastomal bar؛ *Pt*، سن تحت القمّة؛ *Va*، apodeme بطني؛ *VC*، قرن بطني.

المصدر: جميع الأشكال مقتبسة من Frías وآخرين (2006).



الأشكال 27-32. الهيكل الرأسي- البلعومي ليرقات الطور الثالث من أنواع *Anastrepha*: (27) *A. ludens*؛ (28) *A. obliqua*؛ (29) *A. suspensa*؛ (30) *A. serpentina*؛ (31) *A. striata*؛ و (32) *A. grandis*.

المصدر: جميع الأشكال مقتبسة من Carroll وآخرين (2004).

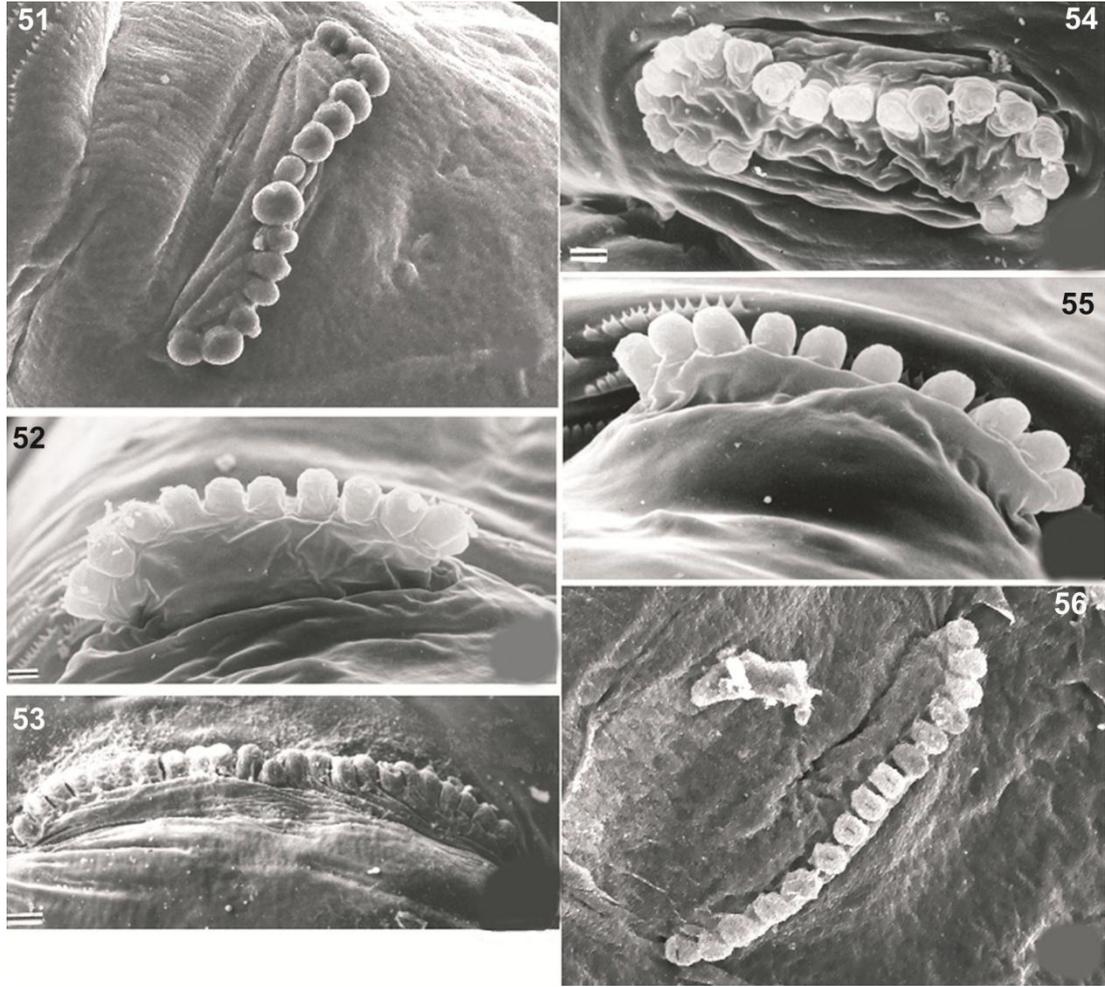


الأشكال 33-44. الفتحات التنفسية الأمامية والخلفية ليرقات الطور الثالث لأنواع *Anastrepha*: *A. ludens* (34، 33)؛ *A. serpentina* (36، 35)؛ *A. obliqua* (38، 37)؛ *A. striata* (40، 39)؛ *A. suspensa* (42، 41)؛ *A. grandis* (44، 43).

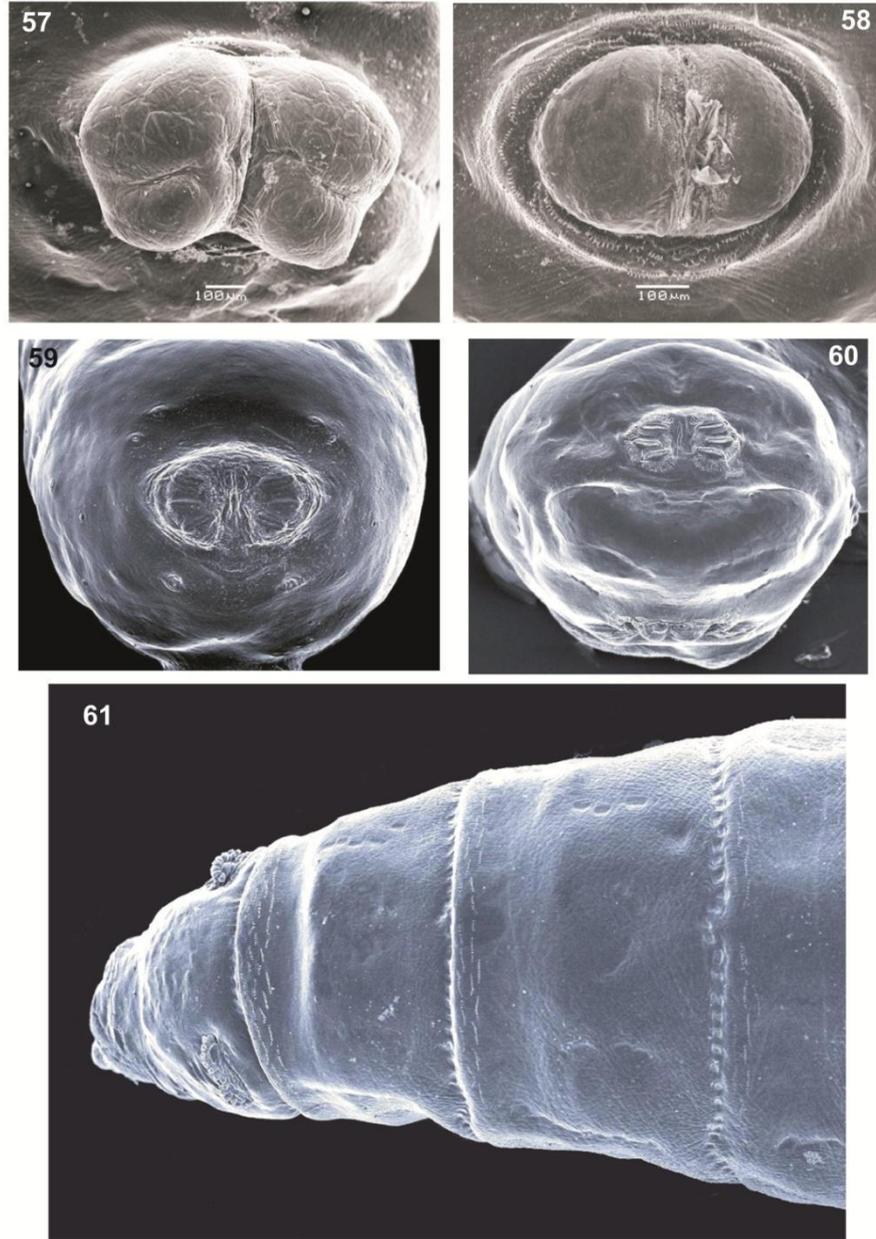
المصدر: جميع الأشكال مقتبسة من Carroll وآخرين (2004).



الأشكال 45-50. (45، 47، 48) الجزء الرأسي ليرقات الطور الثالث. (46، 49، 50) فتحات تنفسية للجزء الذيلي. (45) *Rhagoletis sp.* (46) *Anastrepha fraterculus* (47) *Rhagoletis bmcici* (48) *Ceratitis capitata* (49) *Toxotrypana sp.* (50) *Anastrepha obliqua*؛ *Ac*؛ هوائي الفك العلوي؛ *At*؛ سن قمي؛ *Lb*، *labium*؛ *Or*؛ حروف الفم؛ *Ort*؛ أسنان الفم؛ *Po*؛ جهاز فمي أمامي؛ *Prt*؛ أسنان فم أمامية؛ *sl*؛ شقوق الفتحات التنفسية. نتوءات الفتحات التنفسية (= شعيرات الفتحات التنفسية): *SP-I* ظهرية، *SP-II* و *SP-III* وسطية، *SP-IV* خلفية. المصدر: الأشكال 45 و 47-50 مقتبسة من Frías وآخرين (2006)؛ الشكل 46 مقتبس من Hernández-Ortiz وآخرين (2010).



الأشكال 51-56. الفتحات التنفسية الأمامية للقطاع الصدري الأول، يرقات الطور الثالث: (51) *Anastrepha ludens*؛ (52) *Anastrepha*؛ (53) *Toxotrypana curvicauda*؛ (54) *Rhagoletis conversa*؛ (55) *Ceratitis capitata*؛ (56) *Bactrocera cucurbitae*.
المصدر: الأشكال 52-55 مقتبسة من Frías وآخرين (2006)؛ الأشكال 51 و56 مقتبسة من Hernández-Ortiz وآخرين (2010).



الأشكال 57-61. (57) شقوق فصوص الشرج، *Anastrepha striata*؛ (58) فصوص الشرج كاملة، *Anastrepha obliqua*؛ (59) الحواف الذيلية غير موجودة، *Anastrepha suspensa*؛ (60) الحواف الذيلية موجودة *Bactrocera carambolae*؛ (61) *Anastrepha striata*، يبين عرض ظهري ليرقات الطور الثالث صفوفًا من أشواك ظهرية Dorsal spinules. الصور المجهرية مقدمة من G. Steck.

2014-05 وافقت لجنة المعايير لمشاورة الأعضاء
2014-07 انعقاد مشاورة الأعضاء
2015-03 وافق الفريق الفني على التقدم إلى لجنة المعايير للموافقة
بغرض الاعتماد. (2015_eTPDP_Apr_02)
2015-06 وافقت لجنة المعايير على فترة الإخطار لبروتوكول
التشخيص. (2015_eSC_Nov_05)
2015-08 اعتمدت لجنة المعايير بروتوكول التشخيص نيابة عن هيئة
تدابير الصحة النباتية (لم يُتلقَ أي اعتراض رسمي)

تاريخ المطبوع
هذا ليس جزءاً رسمياً من المعيار
2014-03 أضافت الدورة الأولى لهيئة تدابير الصحة النباتية (2006)
الموضوع لبرنامج العمل (Genus Anastrepha, 2004-015)
2008-06 قدمت المسودة الأولى إلى الفريق الفني (اجتماع)
04-2013 انعقاد مشاورة الخبراء
06-2013 قدمت المسودة إلى الفريق الفني (اجتماع)
المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية 27 الملحق 9
Genus Anastrepha Schiner (2015)، روما، الاتفاقية الدولية
لوقاية النباتات، منظمة الأغذية والزراعة.
آخر تعديل لتاريخ المطبوع في: 2015-09.

