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

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

بروتوكول التشخيص 12: الفيتوبلازما

اعتُمد في 2016؛ نُشر في 2018

المحتويات

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

1- معلومات عن الآفة

كان .Doi et *al* (1967) أول مكتشفي الفيتوبلازما خلال بحثهم عن العامل المسبب لاصفرار النجمية. وقد سمّيت تلك الكائنات وحيدة الخليّة، بأشباه المفطورات بسبب تشابهها المورفولوجي بالمفطورات الحيوانية وبسبب شدة تأثّرها بالمضادّات الحيوية من نوع تتراسيكلين (Ishiie *et al*., 1967). وتعتبر أنواع الفيتوبلازما من الممرضات النباتية الإجبارية البدائية النوى التي تخلو من الجدران الخلوية، وهي متعددة الأشكال ويتراوح متوسط قطرها بين 200 و800 نانومتر. وهي تعيش في الخلايا الغربالية للحاء عوائلها النباتية. وتمتاز الفيتوبلازما بجينومات يتراوح حجمها من حوالي 550 إلى 1 500 كيلو قاعدة -وهي نسبيّاً جينومات صغيرة مقارنة ببدائيات النوى الأخرى - وهي تفتقر إلى عدة وظائف للتصنيع الحيوي (Marcone *et* al., 1999؛ Davis *et* al., 2005؛ Bai *et* al., 2006؛ Oshima *et* al., 2013).

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

وقدّر .Seemüller *et al* (2002) أن هناك حوالي 1 000 نوع نباتي يصاب بالفيتوبلازما، وتعتبر معظم عوائله النباتية من ثنائيات الفلقة. وقد اكتشف عدد أقل من أنواع الفيتوبلازما لدى وحيدات الفلقة، وغالبية ما تنتمي مثل هذه العوائل إلى فصيلتي النخيليات والنجيليات .Seemüller *et al* (2002).

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

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

إلى النبات السليم عبر قنوات اللحاء الناقلة. ويمكن نقل الآفة بالتطعيم والإكثار الدقيق للنباتات ضمن زراعة الأنسجة، لحفظ الفيتوبلازما لأغراض مرجعية (IPWG، بدون تاريخ).
يمكن الاطلاع على مزيد من المعلومات حول الفيتوبلازما، بما في ذلك صور تظهر الأعراض المرضيّة وقائمة بالحشرات الناقلة وقاعدة بيانات عن تصنيف الفيتوبلازما، على الموقعين الإلكترونيين التاليين:
COST Action FA0807 Integrated Management of Phytoplasma Epidemics in Different Crop Systems (الإدارة المتكاملة لأوبئة الفيتوبلازما في أنظمة المحاصيل المختلفة) (http://www.costphytoplasma.ipwgnet.org/) ومركز موارد الفيتوبلازما (http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/phytoplasma.html)

2- معلومات تصنيفية

الاسم: الفيتوبلازما (البلازما النباتية)

المرادفات: كائنات مشابهة للمفطورات (MLO)، مفطورات

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

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

3- الكشف وتحديد الهوية

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

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

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

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

وأُفيد عن طرق متنوعة لاستخراج الأحماض من النوى بهدف كشف الفيتوبلازما بواسطة التفاعل المتسلسل للبوليميراز. وهناك عدد من الطرق التي تستعين بمرحلة للتّخصيب من أجل تركيز الفيتوبلازما قبل استخراج حمض النوى (Kirkpatrick *et al*., 1987؛ Ahrens and Seemüller, 1992؛ Prince *et al*., 1993). ويمكن لهذه التّقنيات أن تكون مفيدة في حال العوائل التي توجد فيها الفيتوبلازما بكميات متدنية، مثل النباتات الخشبية المعمرة، أو في حال العوائل "الصعبة" التي قد تستخرج، بالاقتران مع استخراج حمض النوى، مستويات مرتفعة من المركبات مثل السكريات المتعددة والبولي فينول القادرة على كبح التفاعل المتسلسل للبوليميراز. ويتم في بعض الطرق المبسطة، طحن الأنسجة النباتية مباشرة في دارئ متحلل متوفر تجارياً، أو في محلول دارئ قائم على بروميد تريميثيلامونيوم سيتيل. ويتم استخدام 2 في المائة من بروميد تريميثيلامونيوم سيتيل (ثبت أنّ المحلول بنسبة 3 في المائة أكثر موثوقية في حال كرمة العنب) (Daire *et al*., 1997؛ Angelini *et al*., 2001). ويتم بعد ذلك استخراج الحمض النووي مباشرة من الخُلالة باستعمال أعمدة دوران السيليكا المتوفرة تجارياً (Green *et al*., 1999؛ Palmano, 2001) أو الخرزات المغناطيسية (Mehle *et al*., 2013) أو باستعمال مذيبات عضوية (Daire *et al*., 1997؛ Zhang *et al*., 1998). تنفّذ الطريقة التي تستعين بالخرزات المغناطيسية بواسطة جهاز آلي لاستخراج حمض النوى (مثال KingFisher من Thermo Scientific[1]). وإن غالبيّة طرق الاستخراج مثبتة الصلاحية بالكامل لمجموعة منوّعة من العوائل النباتية. ويتم اختيار الطريقة تبعاً للعائل قيد الاختبار ومدى توفر المرافق والتجهيزات. وقد يكون من العملي تطبيق طريقة تتضمّن مرحلة لتخصيب الفيتوبلازما للعوائل الخشبية المعمّرة، فيما تطبق طريقة مبسّطة للعوائل العشبيّة. ومن المهم، لإجراء التشخيصات الروتينية، إثبات صلاحية طريقة استخراج العائل المحدد لضمان الموثوقية.

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

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

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

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

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

3-1 التفاعل المتسلسل للبوليميراز التقليدي المتداخل

إن بادئتي التفاعل المتسلسل للبوليميراز المستخدمتين في هذا الاختبار هما P1 (Deng and Hiruki, 1991) وP7 (Schneider *et al.*, 1995) لتفاعل المرحلة الأولى:

P1 (أمامية): 5′-AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T-3′

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

أما بادئتا تفاعل المرحلة الثانية فهما R16F2n (Gundersen and Lee, 1996) وR16R2 (Lee *et al.*, 1993):

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

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

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

مئوية لمدة ثلاثين ثانية و53 درجة مئوية (البادئتان P1/P7) أو 50 درجة مئوية للبادئتين (R16F2n/R16R2) لمدة ثلاثين ثانية و72 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة، ومرحلة تمديد أخيرة عند درجة حرارة 72 درجة مئوية لمدة عشر دقائق. أما بالنسبة إلى التفاعل المتداخل، فيستخدم 1 ميكرولتر من منتجات تفاعل المرحلة الأولى إما بشكل غير مذوب وإما مذوب بنسبة تصل إلى 1:30، كنموذج لتفاعل المرحلة الثانية. ومن ثم تحلل منتجات التفاعل بواسطة الرحلان الكهربائي الهلامي. وتنتج البادئتان R16F2n/R16R2 تباعاً أمبليكوناً من 800 1 زوج قاعدة، وأمبليكوناً من 1250 زوج قاعدة.

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

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

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

وينطوي الخليط المستخدم لمقايسة جينة الحمض النووي الريباسي 28S على المكونات نفسها ويتم تدويره ضمن نفس أطوار مقايسة الفيتوبلازما، بحيث يمكن تنفيذ المقايستين بالتزامن في أنبوبين منفصلين. تنتج البادئتان 28Sf/28Sr أمبليكوناً يتراوح حجمه بين 500 و600 زوج قاعدة.

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

2-3 التفاعل المتسلسل للبوليميراز الآني

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3 دقائق تعقبها 40 دورة عند درجة حرارة 95 درجة مئوية لمدة 15 ثانية و60 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة. قد تتفاوت أطوار التدوير بتفاوت نوع الخليط الرئيسي المستخدم (فعلى سبيل المثال تتطلب بعض الخلائط مرحلةً لتفعيل البوليميراز عند درجة حرارة 95 درجة مئوية لمدة 10 دقائق فيما تستوجب الخلائط التي تحتوي على جينة UDG فترة تعليق في البداية عند درجة حرارة 50 درجة مئوية لمدة دقيقتين). تحلل نتائج التفاعل المتسلسل للبوليميراز الآني بواسطة البرمجيات المرفقة بالأداة التي تتيحها الشركة المصنّعة.

وتستعين مقايسة التفاعل المتسلسل للبوليميراز الآني لـ Christensen *et al.* (2004) بـ 900 نانومتر من البادئة العكسية وقد جرى تحديث الكمية إلى 300 نانومتر في تقرير لاحق (Christensen *et al.*, 2013). يمكن تنفيذ هذه المقايسة مع أية من كميتي البادئة العكسية المذكورتين.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3-3 شواهد الاختبارات الجزيئية

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4-3 تفسير نتائج التفاعل المتسلسل للبوليميراز

1-4-3 التفاعل المتسلسل للبوليميراز التقليدي المتداخل

يعتبر التفاعل المتصل بالممرضات موثوقاً به فقط في حال:

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

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

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

2-4-3 التفاعل المتسلسل للبوليميراز الآني

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

5-3 تحليل التسلسل

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

4- السجلات

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

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

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

5- جهات الاتصال للحصول على معلومات إضافية

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

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

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

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

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

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

6- شكر وتقدير

أعدّ المسودة الأولى لبروتوكول التشخيص هذا L.W. Liefting (مختبر الصحة النباتية والبيئة، وزارة الصناعات الأولية، نيوزيلندا) (انظر القسم السابق)، وP. Jones (قسم تفاعلات ممرضات النبات، معهد البحوث Rothamsted Research، المملكة المتحدة)، وF. Constable (قسم التنمية

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

7- المراجع

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

Ahrens, U. & Seemüller, E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology*, 82: 828–832.

Angelini, E., Clair, D., Borgo, M., Bertaccini, A. & Boudon-Padieu, E. 2001. Flavescence dorée in France and Italy: Occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma. *Vitis*, 40: 79–86.

Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S.A., Jancso Radek, A., Shevchenko, D.V., Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J.W. & Hogenhout, S.A. 2006. Living with genome instability: The adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology*, 188: 3682–3696.

Berges, R., Rott, M. & Seemüller, E. 2000. Range of phytoplasma concentration in various hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 90: 1145–1152.

Christensen, N.M., Nicolaisen, M., Hansen, M. & Schulz, A. 2004. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 17: 1175–1184.

Christensen, N.M., Nyskjold, H. & Nicolaisen, M. 2013. Real-time PCR for universal phytoplasma detection and quantification. *In*: M. Dickinson & J. Hodgetts, eds. *Phytoplasma: Methods and protocols.* Methods in molecular biology series, Vol. 938, pp. 245–252. New York, NY, Humana Press. 421 pp.

Constable, F.E., Gibb, K.S. & Symons, R.H. 2003. Seasonal distribution of phytoplasmas in Australian grapevines. *Plant Pathology*, 52: 267–276.

Daire, X.D., Clair, D., Reinert, W. & Boudon-Padieu, E. 1997. Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to the elm yellows group and to the stolbur subgroup by PCR amplification of nonribosomal DNA. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 507–514.

Davis, R.E., Jomantiene, R. & Zhao, Y. 2005. Lineage-specific decay of folate biosynthesis genes suggests ongoing host adaptation in phytoplasmas. *DNA Cell Biology*, 24: 832–840.

Davis, R.E. & Sinclair, W.A. 1998. Phytoplasma identity and disease etiology. *Phytopathology*, 88: 1372–1376.

Davis, R.E., Zhao, Y., Dally, E.L., Lee, I.M., Jomantiene, R. & Douglas S.M. 2013. ‘*Candidatus* Phytoplasma pruni’, a novel taxon associated with X-disease of stone fruits, *Prunus* spp.: multilocus characterization based on 16S rRNA, *secY*, and ribosomal protein genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 766–776.

Deng, S. & Hiruki, C. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable Mollicutes. *Journal of Microbiological Methods*, 14: 53–61.

Doi, Y.M., Teranaka, M., Yora, K. & Asuyama, H. 1967. Mycoplasma or PLT-group like micro-organisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato

witches' broom, aster yellows and paulownia witches' broom. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 33: 259–266.

EUPHRESCO FruitPhytoInterlab Group. 2011. European interlaboratory comparison and validation of detection methods for '*Candidatus* Phytoplasma mali', '*Candidatus* Phytoplasma prunorum' and '*Candidatus* Phytoplasma pyri': Preliminary results. *Bulletin of Insectology*, 64 (Supplement): S281–S284.

Firrao, G., Garcia-Chapa, M. & Marzachì, C. 2007. Phytoplasmas: Genetics, diagnosis and relationships with the plant and insect host. *Frontiers in Bioscience*, 12: 1353–1375.

Foissac, X. & Wilson, M.R. 2010. Current and possible future distributions of phytoplasma diseases and their vectors. *In* P.G. Weintraub & P. Jones, eds. *Phytoplasmas: Genomes, plant hosts, and vectors*, pp. 309–324. Wallingford, UK, CABI. 331 pp.

Fránová, J. 2011. Difficulties with conventional phytoplasma diagnostic using PCR/RFLP analyses. *Bulletin of Insectology*, 64 (Supplement): S287–S288.

Garcia-Chapa, M., Medina, V., Viruel, M.A., Lavina, A. & Batlle, A. 2003. Seasonal detection of pear decline phytoplasma by nested-PCR in different pear cultivars. *Plant Pathology*, 52: 513–520.

Green, M.J., Thompson, D.A. & MacKenzie, D.J. 1999. Easy and efficient DNA extraction from woody plants for the detection of phytoplasmas by polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 83: 482–485.

Gundersen, D.E. & Lee, I-M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea*, 35: 144–151.

Guo, Y.H., Cheng, Z.M. & Walla, J.A. 2003. Rapid PCR based detection of phytoplasmas from infected plants. *HortScience*, 38: 1134–1136.

Hodgetts, J., Boonham, N., Mumford, R. & Dickenson, M. 2009. Panel of 23S rRNA gene-based real-time PCR assays for improved universal and group-specific detection of phytoplasmas. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 2945–2950.

IPWG (International Phytoplasmologist Working Group). n.d. Phytoplasma collection web page. Available at http://www.ipwgnet.org/index.php?option=com_content&view=article&id=29&Itemid=5 (last accessed 17 April 2015).

IRPCM (International Research Programme on Comparative Mycoplasmology Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma Taxonomy Group). 2004. '*Candidatus* Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1243–1255.

Ishiie, T., Doi, Y., Yora, K. & Asuyama, H. 1967. Suppressive effects of antibiotics of the tetracycline group on symptom development in mulberry dwarf disease. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 33: 267–275.

Jarausch, W., Lancas, M. & Dosba, F. 1999. Seasonal colonization pattern of European stone fruit yellows phytoplasmas in different *Prunus* species detected by specific PCR. *Journal of Phytopathology*, 147: 47–54.

Jomantiene, R., Davis, R.E., Maas, J. & Dally, E. 1998. Classification of new phytoplasmas associated with diseases of strawberry in Florida, based on analysis of 16S ribosomal-RNA and ribosomal-protein gene operon sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 269–277.

Kirkpatrick, B.C. 1991. Mycoplasma-like organisms: Plant and invertebrate pathogens. *In* A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K.-S. Schleifer, eds. *The prokaryotes*, Vol. III, pp. 4050–4067. New York, NY, Springer Verlag.

Kirkpatrick, B.C., Stenger, D.C., Morris, T.J. & Purcell, A.H. 1987. Cloning and detection of DNA from a nonculturable plant pathogenic mycoplamsa-like organism. *Science*, 238: 197–199.

Kreader, C.A. 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1102–1106.

Lee, I.-M., Bottner-Parker, K.D., Zhao, Y., Davis, R.E. & Harrison, N.A. 2010. Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on *secY* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60: 2887–2897.

Lee, I.-M., Davis, R.E. & Gundersen-Rindal, D.E. 2000. Phytoplasma: Phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology*, 54: 221–255.

Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D.E., Davis, R.E. & Bartoszyk, I.M. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 1153–1169.

Lee, I.-M., Hammond, R.W., Davis, R.E. & Gundersen, D.E. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology*, 83: 834–842.

Lim, P.-O. & Sears, B.B. 1992. Evolutionary relationships of a plant-pathogenic mycoplasmalike organism and *Acholeplasma laidlawii* deduced from two ribosomal protein gene sequences. *Journal of Bacteriology*, 174: 2606–2611.

Makarova, O., Contaldo, N., Paltrinieri, S., Kawube, G., Bertaccini, A. & Nicolaisen, M. 2012. DNA barcoding for identification of '*Candidatus* Phytoplasmas' using a fragment of the elongation factor Tu gene. *PloS ONE*, 7: e52092.

Marcone, C., Neimark, H., Ragozzino, A., Lauer, U. & Seemüller, E. 1999. Chromosome sizes of phytoplasmas comparing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology*, 89: 805–810.

Martini, M., Lee, I.-M., Bottner, K.D., Zhao, Y., Botti, S., Bertaccini, A., Harrison, N.A., Carraro, L., Marcone, C., Khan, A.J. & Osler, R. 2007. Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 2037–2051.

Marzachì, C. 2004. Molecular diagnosis of phytoplasmas. *Phytopathologia Mediterranea*, 43: 228–231.

Mehle, N., Nikolić, P., Rupar, M., Boben, J., Ravnikar, M. & Dermastia, M. 2013. Automated DNA extraction for large numbers of plant samples. *In*: M. Dickinson & J. Hodgetts, eds. *Phytoplasma: Methods and protocols*. Methods in molecular biology series, Vol. 938, pp. 139–145. New York, NY, Humana Press. 421 pp.

Necas, T. & Krska, B. 2006. Selection of woody indicators and the optimum plant material and sampling time for phytoplasma ESFY detection. *Acta Horticulturae*, 717: 101–105.

Oshima, K., Maejima, K. & Namba, S. 2013. Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas. *Frontiers in Microbiology*, doi: 103389/fmicb.2013.00230.

Palmano, S. 2001. A comparison of different phytoplasma DNA extraction methods using competitive PCR. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: 99–107.

Pelletier, C., Salar, P., Gillet, J., Cloquemin, G., Very, P., Foissac, X. & Malembic-Maher, S. 2009. Triplex real-time PCR assay for sensitive and simultaneous detection of grapevine phytoplasmas of the 16SrV and 16SrXII-A groups with an endongenous analytical control. *Vitis*, 48: 87–95.

Pilotti, C.A., Saul, J., Liefting, L.W., Kembu, A. & Kokoa, P. 2014. Occurrence of a phytoplasma associated with bogia coconut syndrome in Papua New Guinea. *Agricultural Science*, 26: 32–40.

Prezelj, N., Nikolić, P., Gruden, K., Ravnikar, M. & Dermastia, M. 2012. Spatiotemporal distribution of flavescence dorée phytoplasma in grapevine. *Plant Pathology*, 62: 760–766.

Prince, J.P., Davis, R.E., Wolf, T.K., Lee, I.-M., Mogen, B.D., Dally, E.L., Bertaccini, A., Credi, R. & Barba, M. 1993. Molecular detection of diverse mycoplasmalike organisms (MLOs) associated with grapevine yellows and their classification with aster yellows, X-disease, and elm yellows MLOs. *Phytopathology*, 83: 1130–1137.

Quaglino, F., Zhao, Y., Casati, P., Bulgari, D., Bianco, P.A., Wei, W. & Davis, R.E. 2013. '*Candidatus* Phytoplasma solani', a novel taxon associated with stolbur- and bois noir-related diseases of plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 879–2894.

Schneider, B., Gibb, K.S. & Seemüller, E. 1997. Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology*, 143: 3381–3389.

Schneider, B., Seemüller, E., Smart, C.D. & Kirkpatrick, B.C. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma like organisms or phytoplasmas. *In* S. Razin & J.G. Tully, eds. *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmology*, Vol. 1, pp. 369–380. San Diego, CA, Academic Press. 483 pp.

Seemüller, E., Garnier, M. & Schneider, B. 2002. Mycoplasmas of plants and insects. *In* S. Razin & R. Herrmann, eds. *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas*, pp. 91–115. New York, NY, Kluwer Academic Publishers/Plenum Publishers. 572 pp.

Seemüller, E., Schaper, U. & Zimbelmann, F. 1984. Seasonal variation in the colonization pattern of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 91: 371–382 (in English with German summary).

Torres, E., Bertolini, E., Cambra, M., Montón, C. & Martin, M.P. 2005. Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine phytoplasmas from apple prolifetation (16 SrX) group. *Molecular and Cellular Probes*, 19: 334–340.

Weintraub, P. & Beanland, L. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology*, 51: 91–111.

Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N.C., Boonham, N. & Stead, D.E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative multiplex real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2853–2858.

Werren, J.H., Windsor, D. & Guo, L. 1995. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 262: 197–204.

Zhang, Y.P., Uyemoto, J.K. & Kirkpatrick, B.C. 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *Journal of Virological Methods*, 71: 45–50.

مراحل النشر

لا تعتبر هذه الفقرة جزءاً رسمياً من المعيار

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

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

2013-04 مشاورة الخبراء.

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

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

2014-07 مشاورة الأعضاء.

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

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

2015-08 فترة الإخطار لبروتوكول التشخيص.

2015-08 تلقي اعتراض رسمي.

2015-09 اجتماع الفريق الفني المعني ببروتوكولات التشخيص عبر الإنترنت

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

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

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

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

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

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

04-2018: الدورة الثالثة عشر لهيئة تدابير الصحة النباتية (CPM-13) في 2018
أحيطت علماً بأن مجموعة مراجعة اللغات راجعت هذا الملحق.

أخر تحديث لتاريخ المطبوع: 12-2018