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

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

بروتوكول التشخيص 14: مستصفرة الفراولة (كزانتوموناس فراغاريي)

Xanthomonas fragariae

اعتُمد في 2016؛ نُشر عام 2018

بيان المحتويات

1- معلومات حول الآفة 3
2- المعلومات التصنيفية 3
3- الكشف 4
3–1 الأعراض 4
3-2 أخذ العينات 5
3-3 إعداد العينات 6
3-4 اختبارات المسح السريع 6
3-5 العزل 7
3-5-1 طريقة العزل 1 7
3-5-2 طريقة العزل 2 8
3-5-3 تفسير نتائج العزل 8
3-6 اختبار الأوراق المفصولة والتخصيب البيولوجي 9
3-6-1 فحص الأوراق المفصولة 9
3-6-2 تفسير نتائج اختبار الأوراق المفصولة 9
3-6-3 التخصيب - العزل في النبات 10
3-6-4 التخصيب في المختبر - التفاعل المتسلسل للبوليميراز من اختبار الأوراق المفصولة 10
3-7 اختبار إليزا 10
3-7-1 اختبار إليزا غير المباشر 10
3-7-2 الفحص المناعي المرتبط بالأنزيم المقترن باستخدام الأجسام المضادة DAS-ELISA 11
3-7-3 تفسير نتائج اختبار إليزا 11
3-8 التألق المناعي 12
3-8-1 تفسير نتائج التألق المناعي 13
3-9 التفاعل المتسلسل للبوليميراز 13
3-9-1 استخلاص الحمض النووي 14
3-9-2 التفاعل المتسلسل للبوليميراز المزدوج 15
3-9-2-1 بروتوكول Hartung وPooler (1997) 15
3-9-3 التفاعل المتسلسل للبوليميراز المتداخل 16
3-9-3-1 بروتوكول Moltmann وZimmerman (2005) 16
3-9-3-2 بروتوكول Roberts وآخرون (1996) 17
3-9-4 التفاعل المتسلسل للبوليميراز الآني 18
3-9-4-1 بروتوكول Weller وآخرون (2007) 18
3-9-5 تفسير نتائج التفاعل المتسلسل للبوليميراز 18
3-9-5-1 التفاعل المتسلسل للبوليميراز التقليدي 18
3-9-5-2 التفاعل المتسلسل للبوليميراز الآني 19
3-9-6 الشواهد للاختبارات الجزيئية 19
4- تحديد الهوية 20
4-1 الاختبارات الفيزيولوجية والبيوكيميائية 20

4-1-1 تحديد الخصائص عن طريق استرات ميثيل الأحماض الدهنيةFAME.....25
4-1-1-1 تفسير نتائج عملية تحديد الخصائص عن طريق استرات ميثيل الأحماض الدهنية.....26
4-2 الاختبارات المصلية.....26
4-2-1 التألق المناعي.....26
4-2-2 اختبار إليزا.....26
4-3 الاختبارات الجزيئية.....26
4-3-1 التفاعل المتسلسل للبوليميراز.....26
4-3-2 التفاعل المتسلسل للبوليميراز- المتناوب اللاجيني المتكرر REP-PCR.....26
4-3-2-1 تفسير نتائج التفاعل المتسلسل للبوليميراز- المتناوب اللاجيني المتكرر REP-PCR.....27
4-3-3 تحليل السلاسل المتعددة المواقع.....27
4-4 اختبارات القدرة الإمراضية.....28
4-4-1 إجراء التلقيح العام.....28
4-4-1-1 تفسير نتائج اختبار القدرة الإمراضية.....28
4-4-2 ردّ الفعل الشديد الحساسية.....29
4-4-2-1 تفسير نتائج رد الفعل الشديد الحساسية.....29
5- السجلات.....29
6- جهات الاتصال للحصول على معلومات إضافية.....29
7- شكر وتقدير.....30
8- المراجع.....30
9- الأشكال.....34

1- معلومات حول الآفة

تعتبر بكتيريا مستصفرة الفراولة **(كزانتوموناس فراغاريي)** ***Xanthomonas fragariae*** بحسب (Kennedy وKing ، 1962) العامل المسبب لمرض التبقع البكتيري الخشن الذي يصيب أوراق الفراولة. وينتشر هذا المرض بصورة رئيسية في أمريكا الشمالية، وقد أبلغ عن ظهوره للمرة الأولى في الولايات المتحدة عام 1962 (Kennedy وKing، 1962؛ Hildebrand وآخرون، 1967؛ Maas وآخرون، 1995)، وأبلغ عنه لاحقاً في العديد من مناطق العالم التي تزرع فيها الفراولة، بما في ذلك أمريكا الجنوبية وأوروبا (المركز الدولي للزراعة والعلوم البيولوجية). أما العائل الأولي لهذه البكتيريا فهو الفراولة الأناناسية *Fragaria × ananassa* أي صنف الفراولة المزروع الأكثر انتشاراً. وتختلف الأصناف التجارية من حيث درجة قابليتها للإصابة بهذا المرض، كما أن أنواعاً أخرى من الفراولة، بما في ذلك الفراولة الشيلية *F. chiloensis* والفراولة الفرجينية *F. virginiana* والفراولة المزروعة *F. vesca*، وكذلك عشبة القوى *Potentilla fruticosa* ونبتة المسكيت *P. glandulosa*، معرضة للإصابة هي أيضاً. ومن بين أنواع الفراولة، وحدها الفراولة المسكية *F. moschata* تتمتع بالمناعة ضد هذه البكتيريا (Kennedy وKing، 1962؛ Kennedy، 1965؛ Maas، 1998).

تنتقل بكتيريا *X. fragariae* بسهولة عن طريق الغراس المصاب إصابة كامنة ولا يحمل أي أعراض. أما مصادر لقاح الإصابة الأولية فهي النباتات البنوية غير الحاملة للأعراض ظاهرة للعيان التي تنمو على سيقان نباتات المشاتل المصابة، والمستخدمة للغرس في حقول إنتاج الفاكهة. وعلى الرغم من أن هذه البكتيريا لا تعيش حرة في التربة، إلا أنها تبيت فيها خلال الشتاء عبر ارتباطها بمواد نباتية مصابة سابقاً وتبقى هناك لفترات طويلة (Maas، 1998). كما أن مخلفات الأوراق المصابة والإصابات التاجية على السيقان المستخدمة للغرس، تشكل هي أيضاً مصادر لقاح للإصابة الأولية.

تشير سلالات بكتيريا *X. fragariae* المعزولة في أوقات مختلفة وفي مواقع مختلفة في جميع أنحاء العالم إلى بعض التنوع الجيني وفي الأنماط الظاهرية فيما بين هذه السلالات (Opgenorth وآخرون، 1996؛ Pooler وآخرون، 1996؛ Roberts وآخرون، 1996). وبالإضافة إلى ذلك، لوحظت بينها بعض الاختلافات في القدرة الإمراضية (Maas وآخرون، 2000). ومع ذلك، هناك درجة عالية من التشابه بين سلالات هذا الممرض النباتي، ولم يتبيّن أي ارتباط بين الأنماط الجينية أو الأنماط الظاهرية وبين المنشأ الجغرافي للسلالات. ولذا، يحتمل أن تمثّل السلالات المعروفة حالياً في العالم جمهرة نسيلية. أما الكشف المبكر لبكتيريا *X. fragariae* في غراس الفراولة المصابة غير الحاملة للأعراض، فعامل حاسم لاجتناب انتشار المَمرِض وتطور المرض.

2- المعلومات التصنيفية

الاسم: **Xanthomonas** *fragariae* (Kennedy وKing، 1962)

المرادفات: لا مرادفات

الوضع التصنيفي: Bacteria، Proteobacteria، Gammaproteobacteria، Xanthomonadales، Xanthomonadaceae

الاسم الشائع: مرض التبقع البكتيري الخشن للأوراق

ملاحظة: إن بكتيريا مستصفرة الفراولة *Xanthomonas fragariae* (Kennedy وKing، 1962) هي عضو من القسم الفرعي غاما من Proteobacteria (Stackebrandt وآخرون، 1988)، وفينون 3 في Van den

Mooter وSwings (1990) والمجموعة 1 من تماثل الحمض النووي– الحمض النووي في Rademaker وآخرون (2000)، ومجموعة الحمض النووي 1 في Rademaker وآخرون (2005).

3- الكشف

يستند تشخيص مرض التبقع البكتيري الخشن للأوراق في الفراولة الناجم عن بكتيريا *X. fragariae* إلى التفتيش عن أعراض تشخيصية، وعلى العزل المباشر أو غير المباشر للممرض، وعلى اختبارات مصلية (مثل التألق المناعي غير المباشر والفحص المناعي المرتبط بالأنزيم (إليزا)) والطرق الجزيئية. ولقد وضعت عدة اختبارات للكشف بواسطة التفاعل التسلسلي للبوليميراز، يستهدف كل منها مواضع مختلفة في جينوم هذه البكتيريا، (Roberts وآخرون، 1996؛ Zimmerman وآخرون، 2004؛ Weller وآخرون، 2007؛ Vandroemme وآخرون، 2008؛ Turechek وآخرون 2008؛ Vermunt وBeuningen van، 2008). ويمكن استخدام هذه الاختبارات لتأكيد وجود هذه البكتيريا في مواد نباتية حاملة لأعراض، كما استخدم عدد منها كذلك للكشف عن الإصابات الكامنة بها (Mahuku وGoodwin، 1997؛ Zimmerman وآخرون، 2004؛ Moltman وZimmerman، 2005). كذلك فإن اختبار الأوراق المفصولة (Civerolo وآخرون، 1997أ) مفيد للتشخيص الافتراضي للبكتيريا في الحالات التي يكون فيها العزل المباشر بطيئاً للغاية أو مكبوحاً. وقد تم التحقق من صحة الطرق الواردة في هذا البروتوكول التشخيصي، باستثناء التفاعل التسلسلي للبوليميراز المتداخل، في دراسة لأداء الاختبارات الممولة من الاتحاد الأوروبي (SMT-4-CT98-2252) (López وآخرون، 2005).

إنّ العزل المباشر لبكتيريا *X. fragariae* صعب حتى في وجود أعراض نموذجية وإفرازات بكتيرية، وذلك لأنها تنمو ببطء شديد في الأوساط المغذية ويطغى عليها بسهولة نمو البكتيريا الرمّامة (Hazel وCiverolo، 1980؛ López وآخرون، 1985; Schaad وآخرون، 2001؛ Saddler وBradbury، 2005). وترد إجراءات محددة للعزل المباشر في López وآخرون (2005). ويمكن تيسير العزل في المختبر بالتخصيب الانتقائي للمُمرض في النبات نفسه عن طريق تلقيح أوراق الفراولة المفصولة بمستخلصات مائية من الأنسجة المصابة بالمرض أو المشتبه بإصابتها به (Civerolo وآخرون، 1997أ).

ترد أدناه إجراءات كشف *X. fragariae* في النباتات الحاملة للأعراض والنباتات غير الحاملة للأعراض.

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

3–1 الأعراض

تظهر في البداية على الجزء السفلي لسطح الورقة بقع صغيرة (تمزقات) (قطرها 1-4 ملم) خشنة مشبعة بالماء محدودة بأصغر عروق الورقة. وفي المراحل الأولى من الإصابة، بالكاد تظهر هذه البقع للعيان في الحقل وتبدو صفراء شفافة عندما تشاهد تحت ضوء نافذ. ويكبر حجم التمزقات وتلتحم بعضها ببعض، لتظهر في نهاية المطاف على الجزء العلوي لسطح الورقة كبقع

خشنة مشبعة بالمياه لونها بني مائل إلى الاحمرار (الشكل 1). وتنشأ من هذه التمزقات في الظروف الرطبة أو عندما تكون الرطوبة النسبية عالية، إفرازات بكتيرية لزجة لونها أبيض أو حليبي قشدي أو أصفر (الشكل 2). وتصبح الإفرازات كتلاً جافة أشبه بالقشور تتسم بلونها الداكن والمائل إلى الأبيض أو الفضي في البداية ثم تتحول إلى اللون البني (Janse، 2005). ومع تقدم المرض، تصبح التمزقات المتلاحمة ذات اللون البني المائل إلى الاحمرار، نخرية. وبوسع أنسجة التمزقات النخرية أن تمزق الورقة أو تفصلها كما قد تبدو الأوراق المصابة ملفوحة أو مهترئة. وكثيراً ما تتطور إصابات الأوراق فتشكل تمزقات طويلة على امتداد عروقها الرئيسية. وفي المراحل المتقدمة من تطور المرض، تكون الأنسجة الورقية المحيطة بالتمزقات البنية المائلة إلى الاحمرار المتلاحمة القديمة، شاحبة عموماً (Kennedy وKing، 1962؛ EPPO، 1997؛ Rat، 1993؛ Maas، 1998).

وعلى النقيض من مرض التبقع البكتيري الخشن لأوراق الفراولة، يتميز مرض اللفحة البكتيرية لأوراق الفراولة الذي تسببه بكتيريا *X. arboricola pv. fragariae* بتمزقات صغيرة على الجزء السفلي لسطح الورقة لونها بني مائل إلى الاحمرار، غير مشبّعة بالماء وغير شفافة، وببقع مائلة إلى الاحمرار على الجزء العلوي لسطح الورقة، وتمزقات متلاحمة بطريقة تشكل بقعاً بنية كبيرة وجافة محاطة بهالة شاحبة؛ وبتمزقات كبيرة على شكل V بنية اللون على طول حافة الورقة والضلع الأوسط والعروق الرئيسية (Janse وآخرون، 2001). وبالإضافة إلى ذلك، لا ترتبط الإفرازات البكتيرية بتمزقات اللفحة البكتيرية للأوراق (Janse وآخرون، 2001). وفي المراحل المتقدمة، يصعب تمييز التبقع البكتيري الخشن للأوراق عن أمراض التبقع الفطري للأوراق، مثل تبقّع الأوراق الشائع (*Mycosphaerella fragariae*) وحرّاق الأوراق (*Diplocarpon earliana*) (Janse وآخرون، 2001).

قد تنتشر الإصابات الحادة ببكتيريا *X. fragariae* من الأوراق إلى التاج، حيث تنمو مناطق غير مترابطة مشبعة بالماء (Hildebrand وآخرون، 1967). وقد تفضي إصابات التاج الحادة إلى نباتات منخفضة الحيوية يمكن أن تنهار وتموت في نهاية المطاف. أما الأوراق التي تنمو من التيجان المصابة فعادة ما تصاب بوتيرة منتظمة فتظهر تمزقات على طول عروق قاعدتها. وقد تنز إفرازات بكتيرية من الحزم الوعائية عندما يُقطع التاج بالعرض.

وفي حالات المرض الحادّة، قد تهاجم بكتيريا *X. fragariae* الأزهار وتسبب لفحة الزهر، ولكنها لا تصيب الثمر مباشرة (Gubler وآخرون، 1999). وتكون التمزقات المشبعة بالماء على أنسجة كأس الزهرة مشابهة في مظهرها للتمزقات في الأوراق (الشكل 3). وقد تصبح أنسجة الثمرة قرب كأس الزهرة المصاب إصابة حادة، مشبعة بالماء أيضاً.

يمكن أن تنتقل بكتيريا *X. fragariae* بوتيرة منتظمة إلى الجذور والتيجان والسيقان بدون أن تظهر عليها أعراض واضحة (Stefani وآخرون، 1989؛ Milholland، وآخرون 1996؛ Mahuku وGoodwin، 1997). وقد تؤدي هذه الإصابة إلى ظهور مناطق مشبعة بالماء عند قاعدة أوراق ناشئة حديثاً يتبعها بعد فترة وجيزة انهيار مفاجئ للنبات وموته. لكن هذا النوع من الإصابة لا يشاهد في العادة.

2-3 أخذ العينات

بالنسبة إلى النباتات الحاملة للأعراض، يفضّل أخذ الأوراق التي عليها بقع أولية مشبعة بالماء كعينات لتشخيص التبقع البكتيري الخشن للأوراق، إذ أن ذلك يسهّل العزل الناجح لبكتيريا

X. fragariae. وبدلاً من ذلك، يمكن استخدام أوراق عليها بقع جافة مع إفرازات أو بدونها. وينبغي أيضاً فحص الأنسجة التاجية.

تنمو بكتيريا *X. fragariae* ببطء شديد ولذا ليس من المناسب بسط العينات والقيام باختبارات مصلية للكشف عن أعداد صغيرة من البكتيريا في نباتات غير حاملة للأعراض. ويوصى في حالة هذه النباتات باختيار عدة نبتات كاملة واجتثاث كميات صغيرة من الأنسجة من أوراقها وسويقاتها وتيجانها (EPPO، 2006). ويمكن استخدام هذه الأنسجة مباشرة للتحليلات المستندة إلى التفاعل المتسلسل للبوليميراز، كما هو موضح في القسم 3-9.

لا ينبغي أن تترك العينات في حالة رطبة بعد جمعها. ويفضل أن تجفف العينات جزئياً وتلفّ بورق وتوضع في أكياس من البوليثين مع إبقائها باردة. وينبغي أن تُنقل العينات في حاوية معزولة جيدا، وأن تُخزن على حرارة 4 درجات مئوية عند وصولها إلى وجهتها وأن تخضع للتجهيز في أسرع وقت ممكن.

3-3 إعداد العينات

بالنسبة إلى النباتات الحاملة للأعراض، يمكن تطهير أسطح أوراقها ونسيج ساقها عبر مسحها بالإيثانول بنسبة تركيز 70 في المائة. وإذا كانت تظهر على النباتات أعراض وعائية، يوصى بإزالة الجذور والأوراق والحفاظ على التاج والسويقات. وتُشطف العينة بالماء الجاري لإزالة التربة ثم تُطهّر بغمسها لمدة دقيقة واحدة في الإيثانول بنسبة تركيز 70 في المائة ثم تشطف ثلاث مرات بماء مقطر معقّم. ويضاف حوالي 0.1 غرام من أنسجة الورقة أو التاج أو السويقة لكل عينة إلى 9 مليلترات من محلول ملحي منظّم بالفوسفات (8 غرامات كلوريد الصوديوم؛ 0.2 غرام كلوريد البوتاسيوم؛ 2.9 غرام $Na_2HPO_4 \cdot 12H2O$؛ 0.2 غرام فوسفات هيدروجين البوتاسيوم؛ ماء مقطر حتى لتر واحد؛ بدرجة حموضة 7.2). وتُجانس الأنسجة النباتية ويجري حضنها على حرارة البيئة المحيطة لمدة 15 دقيقة.

أما بالنسبة إلى النباتات غير الحاملة للأعراض، فتُجمع عشوائياً عينة وزنها 30 غراماً، وتوضع في 150 مليلتراً من محلول ملحي منظم بالفوسفات وترجّ لمدة 30 دقيقة. ويُستخدم سائل الغسيل إما مباشرة للكشف وإما يخضع للطرد المركزي بسرعة 000 10 دورة لمدة 10 دقائق ثم يعاد تعليق الحبيبة في ماء مُقطّر معقم للحصول على مقدار نهائي يبلغ 5 مليلترات. ثم يترك ليستقرّ لمدة 15 دقيقة فيجمع الجزء العلوي المُصفّى وتعدّ محلولات مخففة (10:1 و100:1) في ماء مُقطّر معقّم (EPPO، 2006). وبعد ذلك تستخدم أنسجة العينات المنقوعة هذه في فحص إليزا واختبار التألق المناعي والتفاعل المتسلسل للبوليميراز.

4-3 اختبارات المسح السريع

تيسّر اختبارات المسح السريع الكشف عن بكتيريا *X. fragariae*. وبما أن من الصعب جداً عزل هذه البكتريا، ينبغي لثلاثة اختبارات (إليزا والتألق المناعي والتفاعل المتسلسل للبوليميراز) أن تكون إيجابية لتأكيد الكشف عنها. ويشكل فحص الأوراق المفصولة اختباراً إضافياً لتأكيد وجود بكتيريا قابلة للنمو. وفي العادة، يكون الترابط قوياً بين اختبار إليزا واختبار التفاعل المتسلسل للبوليميراز وفحص الأوراق المفصولة (Civerolo وآخرون، 1997ب).

5-3 العزل

إنّ العزل المباشر لبكتيريا *X. fragariae* صعب، حتى في حالة وجود الأعراض والإفرازات، لأنها تنمو ببطء شديد في الأوساط المغذية الاصطناعية وسرعان ما يطغى عليها نمو البكتيريا الرمّامة. ويوصي بوسَطين اثنين للعزل. يكون العزل أكثر نجاحاً في وسط ويلبرينك Wilbrink مع النترات (Wilbrink-N) (10 غرامات سكروز، 5 غرامات برتيوز ببتون (هضمون)، (L85؛ Oxoid[1])، 0.5 غرام فوسفات ثنائية البوتاسيوم K_2HPO_4، 0.25 غرام كبريتات المغنيزيوم $MgSO_4.7H_2O$، 0.25 غرام $NaNO_3$، 15 غراماً أجار مُنقى، ماء مقطر حتى لتر واحد؛ بدرجة حموضة 7.0–7.2) (Koike، 1965). أما العزل في وسط مزيج الخميرة والببتون والغلوكوز والأجار YPGA (5 غرامات من مستخلص الخميرة؛ 5 غرامات هضمون باكتوبيبتون Bact opeptone[1]؛ 10 غرامات غلوكوز؛ 15 غراماً أجار منقّى؛ ماء مقطّر حتى لتر واحد؛ تعدل درجة الحموضة إلى 7.0–7.2؛ مع إضافة 5 ملليلترات من مادة السيكلوهيكسيميد المعقمة بواسطة الترشيح (المحلول الأم: 5 غرامات سيكلوهيكسيميد لكل 100 ملليلتر من الإيثانول المطلق) بعد التعقيم بالتسخين بالبخار وتحت الضغط (autoclaving) فأقل نجاحا، ولكنه يبقى محبذاً. وهناك وسط ثالث هو وسط SPA (20 غراماً من السكروز، 5 غرامات هضمون باكتوبيبتون bactopeptone، 0.5 غرام فوسفات ثنائية البوتاسيوم K_2HPO_4، 0.25 غرام كبريتات المغنيزيوم $MgSO_4.7H_2O$، 15 غرام أجار مُنقى، ماء مقطر حتى لتر واحد؛ درجة الحموضة 7.2–7.4) فقد يكون مفيداً للبكتيريا النَيّقة (Hayward، 1960). ويوصي باستخدام الأجار المنقى (Oxoid[1] أو Difco[1]) لجميع الأوساط، إذ أن وجود شوائب في أنواع أجار أخرى تجارية يمكن أن يكبح نمو بكتيريا *X. fragariae*.

1-5-3 طريقة العزل 1

بالنسبة إلى النباتات الحاملة للأعراض، يمكن انتقاء أوراق تحمل تمزقات أولية وتطهير أسطحها بمسحها بالإيثانول بدرجة تركيز 70 في المائة وينبغي أن يجري العزل انطلاقاً من تمزقات أولية مشبعة بالماء أو من حواف تمزقات قديمة، باجتثاث قطعة صغيرة من الأنسجة (0.5–1.0 سم^2) بمشرط معقم حاد.

تُجانس الأنسجة في بضعة ملليلترات من الماء المُقطّر المُعقّم أو في محلول ملحي منظم بالفوسفات ويجري حضنها على حرارة البيئة المحيطة (20–25 درجة مئوية) لمدة 10–15 دقيقة. وتُبسط قُسامات من منقوعات أنسجة التمزقات على صفائح (50 – 100 ميكرولتر) وكذلك محلولات مخففة منها (100:1، 10:1، 1000:1، 10:1 000)، على سطح وسط Wilbrink-N، و/أو وسط YPGA و/أو وسط SPA. كما ينبغي أيضاً بسط أقسام مشابهة من مستعلقات خلايا بكتيريا *X. fragariae* (بحجم 10^4 و10^5 و10^6 وحدة مكوّنة لمستعمرات/ملليلتر بغية التحقق من نوعية الأوساط ولمقارنة خصائص الاستزراع لأية مستعمرات بكتيرية تنمو. ويتم تحضين الشرائح على حرارة 25–27 درجة مئوية لمدة سبعة أيام، ولكن ينبغي وضع علامات على المستعمرات التي تظهر بعد يومين إلى ثلاثة أيام، ذلك أن تلك لن تكون بكتيريا *X. fragariae*. وتجري القراءات النهائية بعد سبعة إلى عشرة أيام من الحضن على حرارة 25–27 درجة مئوية.

يكون لون مستعمرات بكتيريا *X. fragariae* على الوسط Wilbrink-N في البداية أبيض ضارباً إلى الصفرة ثم يصبح بعد أربعة إلى ستة أيام أصفر شاحباً دائرياً ومحدباً قليلاً وأملس ومخاطيا.

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

وعلى الوسطين YPGA وSPA، تكون المستعمرات متشابهة في التشكل المورفولوجي لتلك التي تنمو في وسط Wilbrink-N، غير أنّ لونها يكون أشدّ اصفرارا.

2-5-3 طريقة العزل 2

تُجتث قطع من أنسجة الأوراق التي تحمل تمزقات متميزة خشنة مشبعة بالمياه وتُغسل في 50 ملليلتراً من الماء الجاري وبضع قطرات من Tween 20. ويجري حضن قطع الأوراق على درجة حرارة البيئة المحيطة لمدة 10 دقائق، ثم تشطف بالماء المُقطر وتجفف بورق تجفيف. ويمكن تطهير أسطح قطع أنسجة الأوراق بالإيثانول بنسبة تركيز 70 في المائة لمدة 5 ثوان ثم تجفف بورق تجفيف. تقسّم قطع الأوراق إلى أجزاء أصغر (1– 4 ملم^2) وتوضع في 5 ملليترات من 0.1 مولار من محلول ملحي منظم بالفوسفات، ثم تُخلط ويجري حضنها على درجة حرارة البيئة المحيطة لمدة 30 دقيقة لإطلاق أي بكتيريا *X. fragariae* إلى المادة الطافية. يُجهّز محلول مخفف بنسبة 1: 100 من المادة الطافية في 0.1 مولار من محلول ملحي منظم بالفوسفات وتضاف قسامتان من العينة غير المخففة ومن المحلول المخفف بنسبة 1: 100، مقدار كل منهما 20 ميكرولتراً، إلى كبيبات منفصلة على شريحة مجهر متعددة الكبيبات. وتثبت الخلايا البكتيرية على الشريحة بالتسخين اللاهب لتحليلها في وقت لاحق بالتألق المناعي (القسم 3-8). توضع 200 ميكرولتر من المادة الطافية غير المخففة في أنبوب دقيق لتحليلها في وقت لاحق بالتفاعل المتسلسل للبوليميراز (القسم 3-9) ومليلتر واحد آخر من المادة الطافية غير المخففة في أنبوب دقيق ثان، مع إضافة الغليسرين إليها للحصول على نسبة تركيز نهائية تبلغ 20 في المائة على الأقل، وتُحفظ على حرارة 20 درجة مئوية تحت الصفر أو 80 درجة مئوية تحت الصفر لأغراض الرجوع إليها للمقارنة. يمكن
أن تستخدم المادة الطافية المتبقية للعزل عن طريق بسط المحلول المخفف على صفائح كما هو موضح أعلاه وتلقيح أوراق الفراولة المفصولة (القسم 3-6).

بالإضافة إلى طريقتي العزل 1 و2 المذكورتين أعلاه، يمكن عزل *X. fragariae* من الأنسجة انطلاقاً من أقسام إفرازات طازجة من التمزقات، مباشرة على أوساط Wilbrink-N أو YPGA أو SPA أو غيرها من الأوساط المستخدمة عادة.

3-5-3 تفسير نتائج العزل

تكون نتيجة العزل سلبية عندما لا تلاحظ مستعمرات بكتيرية ذات خصائص مورفولوجية نموذجية لبكتيريا *X fragariae* بعد مضي سبعة أيام على أي من الأوساط الثلاثة (شرط عدم حدوث كبح للنمو بسبب المنافسة أو المُناهضة) وعندما يلاحظ وجود مستعمرات من هذه البكتيريا في الشواهد الإيجابية.

تكون نتيجة العزل إيجابية إذا عزلت مستعمرات بكتيريا *X. fragariae* افتراضية في وسط واحد على الأقل من الأوساط المستخدمة.

نظراً إلى أن عزل هذه البكتيريا يفشل في أحيان كثيرة، فإذا كانت اختبارات إليزا والتألق المناعي والتفاعل المتسلسل للبوليميراز إيجابية، ينبغي الاعتبار ظنياً أن العينة إيجابية، ريثما تحدد هوية البكتيريا نهائيا (القسم 4). ويتوقع التوصل إلى أفضل نتائج العزل عند استخدام عينة طازجة مستخلصة من تمزقات فتية. ويمكن أيضاً أن يتحقق العزل على الأوساط عبر التخصيب في النبات نفسه، كما هو موضح في القسم 3-6.

6-3 اختبار الأوراق المفصولة والتخصيب البيولوجي

1-6-3 فحص الأوراق المفصولة

يمكن استخدام إعدادات عينات الأنسجة (القسم 3-3) لتلقيح أوراق الفراولة المفصولة حالما يجري إعدادها في دارئ استخلاص أو ماء مُقطّر (Civerolo وآخرون، 1997a). وتستخدم أوراق فتية (عمرها 7-14 يوماً) من أصناف الفراولة المستنبتة المعرضة للإصابة ببكتيريا *X. fragariae* (مثلاً، كاماروسا Camarosa، باجارو Pajaro، سيسكاب Seascape، سلفا Selva، كورونا Korona) من نباتات خالية من بكتيريا *X. fragariae* جرت تربيتها في الدفيئة، ومن الضروري الالتفات إلى نوعية الأوراق وعمرها، فهما من الاعتبارات الأساسية لنجاح التجربة.

تزال بطريقة مطهّرة ثلاث أوراق (لدى كل منها ثلاث وريقات) من النباتات التي جرت تربيتها في الدفيئة. ويُقطع الجزء القاعدي من السويقات وتوضع فوراً في أنابيب زجاجية تحتوي ماءاً معقماً.

يعدّ مستعلق من الخلايا من سلالة بكتيريا *X. fragariae* مرجعية (الجدول 3) تحتوي 10^5–10^6 وحدات مكوّنة لمستعمرات/مليلتر في محلول ملحي منظم بالفوسفات أو ماء مقطر كشاهد إيجابي. ويستخدم محلول ملحي منظم بالفوسفات أو ماء مقطر كشاهد سلبي. ثم تخترق أربعة مواقع على سطح بعيد عن العرق الرئيسي على كل وريقة (موقعان على كل جانب منه) باستخدام حقنة بدون إبرة (حقنة سعة 3 سنتيلترات مكعب بلاستيكية تطرح بعد الاستعمال BD[1] بفوّهة 2 ملم).

يُشطف اللقاح الزائد بماء معقم جار بعد ساعة واحدة بعد التلقيح. وتوضع الأوراق مع سويقاتها في الأنابيب داخل غرفة رطبة (رطوبة نسبية 95–100 في المائة)، فتُحضن على حرارة 18– 20 درجة مئوية مع فترة تعرض للضوء تتراوح مدتها بين 12 ساعة و21 يوما. وتعتبر الدرجة المحددة للحرارة والإضاءة أثناء فترة الحضن ضرورية لاجتناب التوصل إلى نتائج سلبية كاذبة. ولا ينبغي أن تكون في الأوراق الملقحة إصابات ظاهرة للعيان، ويفترض أن يختفي التشبع بالماء الناجم عن تخلّل اللقاح في غضون 24 ساعة.

تبدأ أعراض محددة (أي تمزقات مشبعة بالماء داكنة خشنة) مشابهة لتلك التي لوحظت في أوراق مصابة طبيعياً بالظهور بعد بضعة أيام من التلقيح. وتسجّل الأعراض كل يومين لمدة 14–21 يوما.

2-6-3 تفسير نتائج اختبار الأوراق المفصولة

تكون نتيجة اختبار الأوراق المفصولة سلبيةً عندما لا تظهر عليها بقع خشنة نموذجية كتلك التي تظهر في حالة الإصابة ببكتيريا *X. fragariae* (أي تكون داكنة ومشبعة بالماء عندما ينظر إليها في ضوء منعكس؛ وصفراء شفافة عندما ينظر إليها في ضوء نافذ) و/أو تظهر هالات شاحبة في أي من المواقع الملقحة بعد 21 يوما. ولا ينبغي أن تظهر بقع مشبعة بالماء تبدو صفراء شفافة عندما ينظر إليها في ضوء نافذ في مواقع تلقيح حُقنت بشواهد سلبية (Civerolo وآخرون، 1997a).

يكون اختبار الأوراق المفصولة إيجابياً إذا نمت بقع أوراق خشنة نموذجية كتلك التي تظهر في حالة الإصابة ببكتيريا *X. fragariae* (أي تكون داكنة ومشبعة بالماء عندما ينظر إليها في ضوء منعكس؛ وصفراء شفافة عندما ينظر إليها في ضوء نافذ) في مواقع اخترقها اللقاح في غضون 10 إلى 21 يوما. وينبغي أن تكون هذه مشابهة في مظهرها لتلك التي نمت في مواقع تلقيح حُقنت

بمستعلقات شواهد إيجابية. ولا ينبغي أن تظهر بقع مشبعة بالماء تبدو صفراء شفافة عندما ينظر إليها من خلال ضوء نافذ في مواقع تلقيح حُقنت بشواهد سلبية (Civerolo وآخرون، 1997أ).

3-6-3 التخصيب - العزل في النبات

تُنتقى ورقة واحدة لكل عينة من الأوراق التي لُقحت في اختبار الأوراق المفصولة بعد التلقيح لمدة 48 ساعة لعزلها على وسط مغذٍ. وتُجتث 10 أقراص صغيرة إلى 12 قرصاً صغيرا، قطر كل منها 0.5 سنتمتر، من كل موقع مُلقح لكل ورقة مفصولة مُلقحة وتُسحق في 4.5 مليلتر من محلول ملحي منظم بالفوسفات. وتُجهّز محلولات مخففة كما للعزل المباشر (القسم 3-5) في محلول ملحي منظم بالفوسفات ويُطلى 50 ميكرولتراً من كل محلول مخفف على سطح الوسط Wilbrink-N في ثلاث نسخ. ثم يجري حضن الصفائح على حرارة 25–27 درجة مئوية، ويجري التحقق من وجود مستعمرات شبيهة بمستعمرات بكتيريا *X. fragariae* بعد خمسة إلى سبعة أيام.

3-6-4 التخصيب في المختبر - التفاعل المتسلسل للبوليميراز من اختبار الأوراق المفصولة

تستخدم صفائح وسط Wilbrink-N المطلية بمستخلصات معدّة للعزل بعد التخصيب في النبات كما هو موضح في القسم 3-6-3 بعد حضنها على حرارة 25 – 27 درجة مئوية لمدة أربعة أيام. تُزال المستعمرات البكتيرية عن سطح الوسط بالغسل بمقدار 3–5 مليلترات من محلول ملحي منظم بالفوسفات وتستخدم لتحليل التفاعل المتسلسل للبوليميراز (القسم 3-9). وهذا تعديل للتفاعل المتسلسل للبوليميراز مع التخصيب البيولوجي الذي وصفه Schaad وآخرون (1995).

3-7 اختبار إليزا

لقد تم التحقق من تخصص اختبار إليزا بمصلين مضادين لبكتيريا *X. fragariae* متوفرين تجارياً (López وآخرون، 2005). وبيّن Rowhani وآخرون (1994) أن اختبار إليزا باستخدام أجسام مضادة متعددة الكلون يمكن أن يكشف على وجه التحديد 34 سلالة من سلالات بكتيريا *X. fragariae* وأن الأجسام المضادة لم تتفاعل مع أصناف البكتيريا ذات الصلة الوثيقة ببكتيريا *X. fragariae* أو غيرها من البكتيريا المعزولة من نباتات الفراولة. وقد أفيد أن حساسية اختبار إليزا لبكتيريا *X. fragariae* تبلغ 10^5 وحدة مشكلة لمستعمرات/مليلتر (Rowhani وآخرون، 1994؛ Civerolo وآخرون، 1997ب).

وتستخدم مستعلقات أعدّت من مستزرعات بكتيريا *X. fragariae* نقية وسلالة من غير بكتيريا *X. fragariae* كشواهد إيجابية وسلبية في كل طبق عيار مجهري. ويوصى بتعيين محلول مخفف مناسب لكل مضاد مصلي متعدد الكلون.

3-7-1 اختبار إليزا غير المباشر

يخلط 210 ميكرولترات من كل عينة، ومستعلق إيجابي من خلايا بكتيريا *X. fragariae* (10^9 وحدة مكوّنة لمستعمرات/مليلتر)، ومستعلق خلايا سلبي من غير بكتيريا *X. fragariae* (10^9 وحدة مشكلة لمستعمرات/مليلتر) والشاهد السلبي (مستعلق من مواد فراولة سليمة، أنظر أدناه) مع 210 ميكرولترات من دارئ طلائي (1.59 غرام Na_2CO_3، 2.93 غرام $NaHCO_3$، لتر واحد من الماء المقطّر) ويضاف 200 ميكرولتر من العينة وخليط دارئ إلى كل كبيبة من كبيبات طبق عيار مجهري ((PolySorp ([1]Nunc) أو ما يعادله). ولشاهد المواد النباتية السلبي، يُسحق حوالي 0.1 غرام من نسيج سليم من ورقة أو سويق أو تاج من الفراولة في 0.9 مليلتر من محلول ملحي منظم بالفوسفات ويضاف 0.9 مليلتر من دارئ طلائي.

يحضن الطبق على حرارة 4 درجات مئوية طوال الليل. ويُغسل الطبق ثلاث مرات بمحلول ملحي منظم بالفوسفات يحتوي على Tween 20 بنسبة تركيز 0.05 في المائة (محلول ملحي منظم بالفوسفات-PBS-T Tween 20)، (8 غرامات كلوريد الصوديوم، 0.2 غرام كلوريد البوتاسيوم، 0.2 غرام فوسفات هيدروجين الصوديوم $12H_2O$، Na_2HPO_4، 2.9 فوسفات هيدروجين البوتاسيوم، 500 ميكرولتر، Tween 20، لتر واحد من الماء المُقطّر). وبعد الغسيل، يضاف 200 ميكرولتر من دارئ مانع (محلول ملحي منظم بالفوسفات يحتوي 1 في المائة من ألبومين المصل البقري أو مسحوق الحليب الخالي من الدسم) لكلٍّ من كبيبات الاختبار ويجري الحضن على حرارة 37 درجة مئوية لمدة ساعة واحدة. ويغسل الطبق ثلاث مرات بمحلول PBS-T.

يجري وفقاً لإرشادات الشركة المُصنّعة تحضير محلول مخفف يتكون من مصل مضاد لبكتيريا *X. fragariae* في محلول ملحي منظم بالفوسفات ويضاف 200 ميكرولتر لكل كبيبة اختبار. ويجري الحضن على حرارة 37 درجة مئوية لمدة ساعتين، ويُغسل الطبق ثلاث مرات من ثم بمحلول PBS-T. ويضاف 200 ميكرولتر من المحلول المخفف المناسب من المضاد المقترن للأنزيم إلى محلول ملحي منظم بالفوسفات يحتوي على ألبومين المصل البقري بنسبة تركيز 0.2 في المائة في كل كبيبة. ويجري الحضن على حرارة 37 درجة مئوية لمدة ساعة واحدة، ويُغسل الطبق أربع مرات بمحلول PBS-T. ويضاف 200 ميكرولتر من ركيزة معدّة حديثاً (1 ملغ/مليلتر من ركيزة الفوسفاتاز القلوي (p-nitrophenylphosphate) الدارئة، 9.8 من حمض الهيدروكلوريك) إلى كل كبيبة اختبار. ويجري حضن الطبق في الظلام على درجة حرارة البيئة المحيطة لمدة 15 و30 و60 دقيقة، ويقرأ الامتصاص على 405 نانومترات.

2-7-3 الفحص المناعي المرتبط بالأنزيم المقترن باستخدام الأجسام المضادة DAS-ELISA

لإجراء فحص DAS-(ELISA)، يضاف 200 ميكرولتر من محلول مخفف مناسب من مصل مضاد لبكتيريا *X fragariae* في دارئ طلائي لكل كبيبة في طبقين للعيار المجهري (Nunc[1] PolySorp أو ما يعادله). ويجري الحضن على حرارة 37 درجة مئوية لمدة 4 ساعات وتغسل الكبيبتان ثلاث مرات بمحلول PBS-T. ويضاف 200 ميكرولتر من عينة منقوع الأنسجة، وشاهد إيجابي وسلبي، كما وصف لاختبار إليزا غير المباشر (القسم 3-7-1) إلى كل كبيبتين من كل طبق ويحضن على حرارة 4 درجات مئوية طوال الليل. وبعد غسل الطبقين ثلاث مرات بمحلول PBS-T، يضاف 200 ميكرولتر من محلول مخفف مناسب من المضاد المترافق للأنزيم في محلول ملحي منظم بالفوسفات يحتوي على 0.2 في المائة من ألبومين المصل البقري لكل كبيبة. ويجري الحضن على حرارة 37 درجة مئوية لمدة 3 ساعات. وبعد غسل الطبقين أربع مرات بالمحلول الملحي المنظم بالفوسفات-توين، يضاف 200 ميكرولتر من ركيزة معدّة حديثاً (1 ملغ/مليلتر من ركيزة الفوسفاتاز القلوي (p-nitrophenylphosphate) الدارئة، 9.8 من حمض الهيدروكلوريك) إلى كل كبيبة اختبار. ويجري الحضن في الظلام على درجة حرارة البيئة المحيطة لمدة 15 و30 و60 دقيقة، ويُقرأ الامتصاص على 405 نانومتر.

3-7-3 تفسير نتائج اختبار إليزا

يكون اختبار إليزا سلبياً إذا كان متوسط قراءة الامتصاص للكبيبتين اللتين تحتويان منقوع الأنسجة أقل 2 × متوسط قراءة الامتصاص لكبيبتي الشاهد السلبي اللتين تحتويان منقوع أنسجة فراولة سليمة.

ويكون اختبار إليزا إيجابياً إذا (1) كان متوسط قراءة الامتصاص للكبيبتين اللتين تحتويان منقوع الأنسجة أكثر 2 × متوسط قراءة الامتصاص لكبيبتي الشاهد السلبي اللتين تحتويان منقوع

أنسجة فراولة سليمة، (2) كان متوسط قراءة الامتصاص لكبيبتي الشاهد الإيجابي أكثر من 2 × متوسط قراءة الامتصاص لكبيبتي الشاهد السلبي.

تشير نتائج اختبار إليزا السلبية لكبيبتي الشاهد الإيجابي إلى أن الاختبار لم يجرِ بشكل صحيح و/أو أن الكواشف قد فسدت أو انتهت مدة صلاحيتها.

أما نتائج اختبار إليزا الإيجابية لكبيبتي الشاهد السلبي فتشير إلى حدوث تلوث أو ارتباط لجسم مضاد غير محدد. وينبغي تكرار الاختبار بأنسجة طازجة أو إجراء اختبار آخر يستند إلى مبدأ مختلف.

8-3 التألق المناعي

ترد إجراءات التألق المناعي لتحديد البكتيريا الممرضة للنبات في De Boer (1990) وفي نشرة منظمة وقاية النباتات في أوروبا والبحر المتوسط (EPPO، 2009). وهناك ثلاثة أمصال متعددة الكلون مضادة لبكتيريا *X. fragariae* متوفرة تجارياً (الجدول 1) تم التحقق منها باستخدام إيزوتيوسيانات الفُلورِسيّن مقترنة بغلوبينات المناعة المضادة للأرانب anti-rabbit (López وآخرون 2005). ويتيح التألق المناعي باستخدام هذه الأجسام المضادة اكتشاف 10^{3}– 10^{4} وحدة مكوّنة لمستعمرات/مليلتر لبكتيريا *X. fragariae* في أنسجة الفراولة (Calzolari وMazzucchi، 1989).

تتألف عينات الاختبار من محلولات منقوعات الأنسجة بنسب 10:1 و100:1 و1: 000 1 ومستعلقات خلايا (10^{6} وحدة مكوّنة لمستعمرات/مليلتر) لسلالة بكتيريا *X. fragariae* إيجابية وسلالة من غير بكتيريا *X. fragariae* سلبية في محلول ملحي منظم بالفوسفات أو ماء مُقطّر. وينبغي أن تتألف الشواهد السلبية من مستخلصات أنسجة نبات سليم.

تضاف قسامات (20 ميكرولتراً) من عينات الاختبار ومستعلقات شواهد إيجابية وسلبية لكبيبات منفصلة من شريحة مجهر متعددة الكبيبات. وتجفف المستحضرات بالهواء وتثبت بالتسخين اللاهب أو بنقع الشرائح في الأسيتون لمدة عشر دقائق يتبعها التجفيف بالهواء. ويمكن تخزين الشرائح على حرارة 20 درجة مئوية تحت الصفر إلى أن تدعو الحاجة إلى استعمالها. ويُخفف الجسم المضاد الأولي لبكتيريا *X. fragariae* في محلول ملحي منظم بالفوسفات يحتوي 10 في المائة من مسحوق الحليب الخالي من الدسم. ويتم اختيار أدنى تركيز للجسم المضاد كفيل بأن ينتج تلطيخاً كافياً عندما تكون هناك خلايا إيجابية يصل عددها إلى 100 لكل حقل مجهري. ويوصى باستخدام محلولين مخففين اثنين للجسم المضاد من أجل الكشف عن التفاعلات مع بكتيريا أخرى. ويوضع 20 ميكرولتراً من الجسم المضاد الأولي لكل كبيبة و تحضن الشرائح في غرفة رطبة على درجة حرارة البيئة المحيطة أو على حرارة 37 درجة مئوية لمدة 30–60 دقيقة. وتُشطف الشرائح في محلول ملحي منظم بالفوسفات وتُغسل بغمرها في الدارئ نفسه لمدة عشر دقائق. ويخفف الجسم المضاد الثانوي المكون من إيزوتيوسيانات الفُلورِسيّن المقترنة في محلول ملحي منظم بالفوسفات (تتفاوت نسبة المحلولات المخففة المثلى عادة بين 20:1 و1: 200). تُغطى كبيبات الشرائح بالجسم المضاد الثانوي ويجري حضنها في غرفة رطبة على درجة حرارة البيئة المحيطة أو على حرارة 37 درجة مئوية لمدة 30–60 دقيقة. وتُكرر مرحلة الغسيل ثم تُجفف الشرائح بالهواء. تُثبّت سواتر على الشريحة نفسها بسائل للتركيب (90 مليلتراً من الغليسرين، 10 مليلترات من محلول ملحي منظم بالفوسفات) يحتوي على 1 ملغ/مليلتر ρ-phenylenediamine وتشاهد الشرائح مغمورة بالزيت بقوة تضخيم 500–000 1. ويجري عدّ الخلايا التي تتألق ويكون حجمها مشابهاً لخلايا سلالة بكتيريا *X. fragariae* المرجعية (López وآخرون 2005).

3-8-1 تفسير نتائج التألق المناعي

تكون نتيجة الاختبار على عينة ما سلبيةً إذا لوحظت خلايا متألقة خضراء بخصائص مورفولوجية نموذجية لبكتيريا *X. fragariae* في كبيبات الشواهد الإيجابية، وليس في كبيبات عينة الاختبار أو في كبيبات الشواهد السلبية.

وتكون نتيجة الاختبار على عينة ما إيجابية إذا لوحظت خلايا متألقة خضراء بخصائص مورفولوجية نموذجية لبكتيريا *X. fragariae* في الشواهد الإيجابية وفي كبيبات العينة، وليس في الشواهد السلبية.

وبما أن مجموعة من خلايا 10^3/مليلتر تعتبر الحدّ الفاصل للكشف الذي يمكن الركون إليه في اختبار التألق المناعي، يعتبر اختبار التألق المناعي لعينات بخلايا أكثر من 10^3/مليلتر إيجابياً (De Boer، 1999). ويمكن اعتبار نتيجة اختبار التألق المناعي غير مؤكدة للعينات بخلايا أقل من 10^3/مليلتر. وفي هذه الحالة، ينبغي إجراء مزيد من الاختبارات أو إعادة أخذ العينات. أما العينات التي لديها أعداد كبيرة من الخلايا غير الكاملة أو ضعيفة التألق مقارنة بالشاهد الإيجابي فتحتاج إلى مزيد من التجارب بمحلولات مخففة مختلفة للأجسام المضادة أو مصدر آخر من مصادر الأجسام المضادة.

الجدول 1- الأجسام المضادة متعددة الكلون لبكتيريا *Xanthomonas fragariae* الموصى حالياً باستخدامها في اختبارات مصلية

المصدر	الاستخدامات الموصى بها†
Neogen Europe[1]	الكشف باستخدام التألق المناعي أو اختبار ساندويتش ثنائي الأجسام المضادة للامتصاص المناعي المرتبط بالأنزيم
Plant Research International, Wageningen UR	الكشف باستخدام التألق المناعي
Bioreba AG[1]	الكشف باستخدام التألق المناعي أو اختبار ساندويتش ثنائي الأجسام المضادة للامتصاص المناعي المرتبط بالأنزيم

† تم التحقق من صلاحيتها في دراسة لأداء الاختبارات في مشروع موّله الاتحاد الأوروبي (SMT-4-CT98-2252) (López وآخرون، 2005).

3-9 التفاعل المتسلسل للبوليميراز

تم التحقق من صحة طرق التفاعل المتسلسل للبوليميراز التي ترد في هذا البروتوكول التشخيصي، باستثناء اختبار التفاعل المتسلسل للبوليميراز المتداخل الذي وضعه Zimmerman وآخرون (2004)، في دراسة لأداء الاختبارات مولها الاتحاد الأوروبي (SMT-4-CT98-2252) (López وآخرون، 2005). وقد أفيد أن بروتوكولات اختبار التفاعل المتسلسل للبوليميراز المتداخل تزيد درجة الحساسية حتى 100 مرة، بالمقارنة مع بروتوكولات التفاعل المتسلسل للبوليميراز التقليدية (Roberts وآخرون، Zimmerman وآخرون 2004).

وقد تم التحقق (López وآخرون، 2005) من صلاحية بروتوكولات استخلاص الحمض النووي من عينات نباتات التفاعل المتسلسل للبوليميراز الواردة في (Pooler وآخرون (1996) وHartung وPooler (1997) كما أفيد أيضاً أن بروتوكولاً معدلاً يستخدم عدة (Sigma[1]) للتفاعل المتسلسل للبوليميراز من شركة REDExtract-N-Amp Plant مناسب لاستخلاص الحمض النووي قبل تضخيمه لغرض اختبار عدد كبير من عينات الأوراق غير الحاملة للأعراض (Stöger

وRuppitsch، 2004). وتتوفر مجموعات تجارية أخرى لاستخراج الحمض النووي واختبار التفاعل المتسلسل للبوليميراز المتداخل واختبار التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام بادئات أخرى (Roberts وآخرون 1996)؛ ولكن لم يتم التحقق من صحتها بعد (López وآخرون، 2005).

وقد وصف اختبارا تفاعل متسلسل للبوليميراز حسّاسان الآني للكشف عن بكتيريا *X. fragariae* في أنسجة الفراولة (Weller وآخرون 2007؛ Vandroemme وآخرون، 2008). ويميّز التفاعل المتسلسل للبوليميراز الآني الذي وضعه Weller وآخرون (2007) أيضاً بين بكتيريا *X. fragariae* وبكتيريا*X. arboricola* pv. *Fragariae*. ويستند التفاعل المتسلسل للبوليميراز الآني الذي وصفه Weller وآخرون (2007) إلى بادئات مصممة ضمن مناطق الجينة *gyrB* التي تنفرد بها بكتيريا *X. fragariae* وجينة *pep* التي تنفرد بها بكتيريا *X. arboricola* pv. *fragariae*. أما التفاعل المتسلسل للبوليميراز الآني الذي طوره Vandroemme وآخرون (2008)، والذي ينتج 41 زوج قواعد (bp) من الأمبليكونات، فيستند إلى بادئات مصممة من الـ 550 زوج قواعد من الأمبليكونات التي وصفها Pooler وآخرون (1996). ويحتمل أن تكون هذه الطرق مفيدة للكشف عن مستويات منخفضة من بكتيريا *X. fragariae* في الإصابات الكامنة أو غير الحاملة للأعراض.

3-9-1 استخلاص الحمض النووي

وفّرت عدّة (Qiagen[1]) من شركة DNeasy Plant، المعدّلة لغاية استخلاص الحمض النووي للكائنات الحية الشبيهة بالمفطورات (مايكوبلازما) (Lopez وآخرون 2005)، أفضل نتائج خلال اختبار حلقي ممول من الاتحاد الأوروبي (SMT-4-CT98-2252).

من أجل استخلاص الحمض النووي، تستخدم عينة مقدارها 250 ميكرولتراً من منقوع/منقوعات الأنسجة؛ ومادة نبات فراولة سليمة أعدّت بشكل مشابه، ومحلول ملحي منظم بالفوسفات معقم أو ماء فائق النقاوة كشاهد سلبي؛ ومستعلق خلايا من مستزرع بكتيريا *X. fragariae* نقي كشاهد إيجابي. ويضاف 250 ميكرولتر من دارئ استخلاص مكون من بروميد تريميثيلامونيوم سيتيل CTAB (50 ملليتراً من 1 مولار تريس-هيدْرُوكْلُوريد Tris-HCI M، 50 ملليتراً من ثُنَائي أمين حِمض الخليك الرباعي EDTA، 40.9 غرام من كلوريد الصوديوم، 5 غرامات من بولي فينيل البيروليدون PVP -40، 12.5 غرام من بروميد تريميثيلامونيوم سيتيل CTAB، ماء مقطر حتى 500 ملليتر) و4 ميكرولترات من ريبونوكلياز- A (100 ملغ/ملليتر)، ويخلط المزيج عبر قلبه برفق خمس مرات، ويجري حضنه على حرارة 65 درجة مئوية لمدة 10 دقائق مع خلطه أحياناً عن طريق القلب. ثم تتبع إرشادات الشركة المّصنّعة حتى مرحلة استخراج الحمض النووي بالشطف.

لشطف الحمض النووي، يضاف 100 ميكرولتر من 10 مليمولارات تريس-هيدْرُوكْلُوريد Tris-HCI على درجة حموضة 9 (مّسخّنة مسبقاً حتى حرارة 65 درجة مئوية) إلى العمود ويخضع للطرد المركزي بسرعة 6 000 دورة كحد أدنى لمدة دقيقة واحدة. وتضاف 100 ميكرولتر أخرى من تريس-هيدْرُوكْلُوريد وتُكرر مرحلة الطرد المركزي. يعدّل محلول الحمض النووي ليبلغ مقداراً إجمالياً من 300 ميكرولتر بدارئ EDTA ويضاف 200 ميكرولتر من 5 مولارات خلات الأمونيوم و1 مليلتر إيثانول مطلق. يخلط المزيج جيداً ويجري حضنه على حرارة 20 درجة مئوية تحت الصفر لمدة تتراوح بين ساعة واحدة وطوال الليل. وبعد الحضن، يخضع للطرد المركزي بسرعة 17 000 دورة لمدة 10 دقائق. ثم يتم التخلّص من المادة الطافية وتغسل حبيبة الحمض النووي في 1 مليلتر إيثانول مطلق وتخضع للطرد المركزي بسرعة 16 000 دورة لمدة 5 دقائق. ويتم التخلص من المادة الطافية وتغسل حبيبة الحمض النووي في 500 ميكرولتر من الإيثانول بنسبة تركيز 80 في المائة وتخضع للطرد المركزي بسرعة 16 000 دورة لمدة 5 دقائق. ويتم

التخلص من المادة الطافية بعد أن تكون الحبيبة قد جفّت، فتعلّق من جديد في 50 ميكرولتراً من الماء المقطّر والمعقّم.

2-9-3 التفاعل المتسلسل للبوليميراز المزدوج

1-2-9-3 بروتوكول Hartung وPooler (1997)

جرى تأكيد تخصص هذا البروتوكول في دراسة تضمنت 30 عزلة من بكتيريا *X. fragariae* و36 عزلة من بكتيريا *X. campestris* (تمثّل 19 صنفاً من البكتيريا ذات الصلة الوثيقة ببكتيريا *X. fragariae*) و62 عزلة من البكتيريا الملازمة التي تعزل عموماً من الفراولة. ولم يكشّف إلاّ عن بكتيريا *X. fragariae* (في العزلات جميعها). وقد مكّن التفاعل المتسلسل للبوليميراز متعدد الطبقات هذا الكشف إلى حدّ 10^3 وحدة مكوّنة لمستعمرات/مليلتر في الأنسجة النباتية (Pooler وآخرون، 1996؛ Hartung وPooler 1997).

مجموعات البادئات الثلاث التي وردت في Pooler وآخرين (1996) هي:

241A: 5′-GCCCGACGCGAGTTGAATC-3′

241B: 5′-GCCCGACGCGCTACAGAC TC-3′

245A: 5′-CGCGTGCCAGTGGAGATCC-3′

245B: 5′-CGCGTGCCAGAACTAGCAG-3′

295A: 5′-CGT TCC TGGCCGATT AATAG-3′

295B: 5′-CGCGTTCCT GCG TTTTTT CG-3

ينفّذ التفاعل المتسلسل للبوليميراز في 25 ميكرولتراً من خلائط تفاعل تحتوي على 2.5 ميكرولتر من محلول دارئ (PerkinElmer[1]) (يحتوي 15 مليمولاراً من كلوريد المغنيزيوم)، 5 ميكرولترات ثلاثي فوسفات النيوكليتيد منقوص الأكسجين (dNTP) (1 مليمولار) 2 ميكرولتر (0.4 ميكرومتر) من كل من البادئات الستة، 5 ميكرولترات من بوليميراز الحمض النووي للمستحرة المائية Taq و5 ميكرولتر من عينة الحمض النووي. أما بارامترات التدوير فهي مرحلة تفعيل أولية على حرارة 95 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة؛ تليها 35 دورة على حرارة 95 درجة مئوية لمدة دقيقة وحدة، و57 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة و72 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة، ومرحلة استطالة نهائية على حرارة 72 درجة مئوية لمدة 7 دقائق. وتحلل منتجات التفاعل المتسلسل للبوليميراز برحلان كهربائي هلامي من 1.5 في المائة من هلام الأجاروز في 0.5 × دارئ ثلاثي أسيتات حمض الإيثيليندياميـن رباعي الخليك TAE (EPPO، 2006).

أما أحجام أمبليكونات التفاعل المتسلسل للبوليميراز المحددة لبكتيريا *X fragariae* فهي 300 و550 و615 زوج قواعد كما وصفت سابقاً (Pooler وآخرون، 1996؛ Hartung وPooler 1997). ويكون هناك شريط بحجم 300 زوج قواعد عادة عندما تكون المستخلصات من نباتات مصابة ببكتيريا *X fragariae*، لكن الشريطين الآخرين (بحجم 550 و615 زوج قواعد) قد يظهران أحياناً.

ويمكن استخدام البادئتين 245A و245B في التفاعل المتسلسل للبوليميراز التقليدي، باستخدام الإجراء الموضح أعلاه، فينتج أمبليكون حجمه 300 زوج قواعد.

3-9-3 التفاعل المتسلسل للبوليميراز المتداخل

يوصى بالتفاعل المتسلسل للبوليميراز المتداخل الذي وصفه Moltmann وZimmerman (2005) باستخدام بادئات وضعها Pooler وآخرون (1996) وZimmerman وآخرون (2004) لتشخيص بكتيريا *X. fragariae* في نباتات فراولة حاملة للأعراض وكذلك لاختبار نباتات فراولة غير حاملة للأعراض (نباتات فريجو frigo ونباتات خضراء). ويوفّر التفاعل المتسلسل للبوليميراز المتداخل الذي وصفه Roberts وآخرون (1996) طريقة بديلة للتأكد.

3-9-3-1بروتوكول Moltmann وZimmerman (2005)

جرى تأكيد تخصص هذا البروتوكول في دراسة تضمنت 14 عزلة من بكتيريا *X. fragariae*، و30 عزلة من بكتيريا *X. campestris* (تمثّل 14 من أصناف البكتيريا ذات الصلة الوثيقة ببكتيريا *X. fragariae*) و17 عزلة من بكتيريا غير محددة الهوية مرتبطة بأوراق الفراولة. وبالإضافة إلى ذلك، قام Hartung وPooler (1997) بالتحقق من تخصص مجموعة البادئات الخارجية (القسم 3-9-2-1). ولم تلاحظ تفاعلات مع العزلات التي اختبرت. وقد طبّق التفاعل المتسلسل للبوليميراز هذا بنجاح في اختبار عينات جمعت خلال مسح لنباتات الفراولة ونباتات الفراولة المستوردة (Moltmann وZimmerman، 2005). وقد مكّن هذا البروتوكول الكشف عن 200 فِيمتوغرام حمض نووي لكل تفاعل وكان حساساً أكثر من التفاعل المتسلسل للبوليميراز التقليدي بمقدار 100 مرة (Zimmerman وآخرون، 2004).

يجري حضن أنسجة لأوراق وسويقات وتيجان (30–70 غراماً) في 10–20 مليلتراً من 0.01 مولار دارئ فوسفات الصوديوم (درجة حموضة 7.2) لكل غرام من الأنسجة على درجة حرارة البيئة المحيطة طوال الليل. ويستخلص الحمض النووي ويحلل عن طريق التفاعل المتسلسل للبوليميراز المفرد والمتداخل كما وصفه Zimmerman وآخرون (2004).

البادئات هي:

245A: 5′-CGCGTGCCAGTGGAGATCC-3′

245B: 5′-CGCGTGCCAGAACTAGCAG-3′

245.5: 5′-GGTCCAGTGGAGATCCTGTG-3′

245.267: 5′-GTTTTCGTTACGCTGAGTACTG-3′

ينفّذ التفاعل المتسلسل للبوليميراز في 25 ميكرولتراً من خلائط تفاعل تحتوي دارئ التفاعل المتسلسل للبوليميراز (10 مليمولار من Tris-HCl، 50 مليمولارا من كلوريد البوتاسيوم، 0.08 في المائة من Nonidet P-40، 2.5 مليمولار من كلوريد المغنيزيوم ($MgCl_2$)، و0.2 مليمولار من كل ثلاثي فوسفات النيوكليتيد منقوص الأكسجين dNTP، و0.2 ميكرومتر من كل بادئة و0.5 ميكرولتر من بوليميراز الحمض النووي للمستحرة المائية Taq. أما بارامترات التدوير فهي مرحلة تَمَسُّخ البروتين denaturation على حرارة 94 درجة مئوية لمدة 4 دقائق؛ تليها 35 دورة على حرارة 94 درجة مئوية لمدة دقيقة وحدة، و68 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة، و72 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة، ومرحلة استطالة نهائية على حرارة 72 درجة مئوية لمدة 7 دقائق. أما بالنسبة إلى التفاعل المتسلسل للبوليميراز المتداخل، فبعد تضخيم الحمض النووي ببادئتي الجولة الأولى (245A وB245)، يستخدم 1 ميكرولتر من أول منتج للتفاعل المتسلسل للبوليميراز كقالب في تفاعل ثان مع البادئتين الداخليتين 245.5 و245.267. وتستخدم بارامترات التدوير ذاتها باستثناء درجة حرارة التلدين فهي 62 درجة مئوية للبادئتين الداخليتين 245.5 و245.267 وتحلل منتجات التفاعل المتسلسل

للبوليميراز برحلان كهربائي هلامي من 1.2 في المائة من هلام الأجاروز في 0.5 × دارئ ثلاثي أسيتات حمض الإيثيليندياميين رباعي الخليك TAE.

تبلغ أحجام أمبليكونات التفاعل المتسلسل للبوليميراز المحددة لبكتيريا *X fragariae* 300 زوج قواعد في الجولة الأولى للتفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام البادئتين 245A و245B، و286 زوج قواعد في التفاعل المتسلسل للبوليميراز المتداخل باستخدام البادئتين 245.5 و245.267. ومع وجود كميات مرتفعة من النموذج، يمكن لجزء ثان يبلغ حجمه 650 زوج قواعد تقريباً أن يتضخم أحيانا.

2-3-9-3 بروتوكول Roberts وآخرون (1996)

جرى تأكيد تخصص هذا البروتوكول في دراسة تضمنت 30 عزلة من بكتيريا *X. fragariae* و17 عزلة من بكتيريا *X. campestris* (تمثّل 16 من أصناف البكتيريا ذات الصلة الوثيقة ببكتيريا *X. fragariae*) و9 عزلات من أصناف بكتيريا مستصفرة xanthomonads غير المُمرّضة المعزولة من الفراولة. ولم تلاحظ تفاعلات مع العزلات التي اختبرت. وقد مكّن التفاعل المتسلسل للبوليميراز المدمج هذا الكشف عن 18 خلية من خلايا بكتيريا *X. fragariae* تقريباً في الأنسجة النباتية (Roberts وآخرون 1996).

البادئات شبه المتداخلة كما وصفها Roberts وآخرون 1996 هي:

XF9: 5′-TGGGCCATGCCGGTGGAACTGTGTGG-3′

XF11: 5′-TACCCAGCCGTCGCAGACGACCGG-3′

XF12: 5′-TCCCAGCAACCCAGATCCG-3′

ينفذ التفاعل المتسلسل للبوليميراز في 25 ميكرولتراً من خلائط تفاعل تحتوي دارئ التفاعل المتسلسل للبوليميراز (10 مليمولارات من Tris-HCl، 50 مليمولاراً من كلوريد البوتاسيوم، 1.5 مليمولار من كلوريد المغنيزيوم $MgCl_2$) و0.2 مليمولار من كل ثلاثي فوسفات النيوكليتيد منقوص الأكسجين dNTP، و0.2 ميكرومتر من كل بادئة، و0.5 ميكرولتر من بوليميراز الحمض النووي للمستحرة المائية Taq. أما بارامترات التدوير فهي مرحلة تَمَسُّخُ البروتين denaturation أولية على حرارة 95 درجة مئوية لمدة دقيقتين؛ تليها 30 دورة على حرارة 95 درجة مئوية لمدة 30 ثانية، و65 درجة مئوية لمدة 30 ثانية، و72 درجة مئوية لمدة دقيقة 45 ثانية؛ ومرحلة استطالة نهائية على حرارة 72 درجة مئوية لمدة 5 دقائق. أما بالنسبة إلى التفاعل المتسلسل للبوليميراز شبه المتداخل، فبعد تضخيم الحمض النووي ببادئتي الجولة الأولى (XF9 وXF1)، تستخدم 3 ميكرولترات من أول منتج للتفاعل المتسلسل للبوليميراز كنموذج في تفاعل ثانٍ مع البادئتين XF9 وXF12. وتستخدم بارامترات التدوير ذاتها باستثناء درجة حرارة التلدين حيث تبلغ 58 درجة مئوية. وتحلل منتجات التفاعل المتسلسل للبوليميراز برحلان كهربائي هلامي من 1.5 في المائة من الأجاروز في 0.5 × دارئ ثلاثي أسيتات حمض الإيثيليندياميين رباعي الخليك TAE.

يبلغ حجم الأمبليكونات المحددة لبكتيريا *X. fragariae* في التفاعل المتسلسل للبوليميراز 537 زوج قواعد لدى الجولة الأولى للتفاعل باستخدام البادئتين XF9 وXF11، و458 زوج قواعد في التفاعل المتسلسل للبوليميراز شبه المتداخل باستخدام البادئتين XF9 وXF12.

4-9-3 التفاعل المتسلسل للبوليميراز الآني

1-4-9-3 بروتوكول Weller وآخرون (2007)

جرى تأكيد تخصص هذا البروتوكول في دراسة تضمنت عشر عزلات من بكتيريا *X. fragariae* و24 عزلة من أصناف بكتيريا مستصفرة *Xanthomonas* (تمثّل 12 نوعاً و17 من أصناف البكتيريا ذات الصلة الوثيقة ببكتيريا *X. fragariae*). ولم يكتشف غير بكتيريا *X. fragariae* (في جميع العزلات). وقد مكّن هذا التفاعل المتسلسل للبوليميراز من الكشف عن 10^3 وحدة مكوّنة لمستعمرات/مليلتر لكل قرص من الأوراق (Weller وآخرون 2007). وقد قام مختبر في هولندا بمزيد من التحقق من صحة هذا البروتوكول؛ وبيانات التحقق متاحة على قاعدة بيانات الخبرة التشخيصية لمنظمة حماية النباتات في أوروبا ومنطقة البحر الأبيض المتوسط (http://dc.eppo.int/validationlist.php).

إن البادئات، المستندة إلى سلاسل جينة *gyrB*، ومسبار TaqMan، موسومة بشكل ترابطي عند الطرف رقم '5 بالصبغ المُخبر JOE وعند الطرف رقم 3' بالصبغ المُخَمّدّ TAMRA، وهي:

Xf gyrB-F: 5'-CCG CAG CGA CGC TGA TC -3'

Xf gyrB-R: 5'-ACG CCC ATT GGC AAC ACT TGA-3'

Xf gyrB-P: 5'-TCC GCA GGC ACA TGG GCG AAG AAT TC-3'

ينفذ التفاعل المتسلسل للبوليميراز بإضافة 4 ميكرولترات من الحمض النووي النموذج إلى خليط تفاعل يحتوي على 1 x دارئ TaqMan A (Applied Biosystems[1])، و5.5 مليمولار من كلوريد المغنيزيوم، و200 ميكرومتر من كل ثلاثي فوسفات النيوكليتيد منقوص الأكسجين dNTP (Promega[1])، و300 نانومتر لكل بادئة، ومسبار 100 نانومتر و0.63 وحدة من إنزيم بوليميراز الحمض النووي AmpliTaq Gold (النظم Applied Biosystems). أما بارامترات التدوير فهي مرحلة تفعيل أولية من دقيقتين على حرارة 50 درجة مئوية وبعد ذلك 15 دقيقة على حرارة 95 درجة مئوية، تليها 40 دورة من 10 ثوان على حرارة 95 درجة مئوية ودقيقة واحدة على حرارة 60 درجة مئوية.

5-9-3 تفسير نتائج التفاعل المتسلسل للبوليميراز

1-5-9-3 التفاعل المتسلسل للبوليميراز التقليدي

تعتبر نتيجة التفاعل المتسلسل للبوليميراز سلبية إذا لم يُكتشف أي من الأمبليكونات الخاصة ببكتيريا *X. fragariae* من الحجم المتوقع للعينات والشواهد السلبية فيما يكشف عن الأمبليكونات في الشواهد الإيجابية جميعها.

تعتبر نتيجة التفاعل المتسلسل للبوليميراز إيجابية إذا كشف عن أمبليكون واحد على الأقل خاص ببكتيريا *X. fragariae* من الحجم المتوقع، شريطة ألا يكون قد ضُخّم انطلاقاً من أي من الشواهد السلبية.

قد يشتبه في تعرض التفاعل المتسلسل للبوليميراز إلى الكبح إذا ما تم الحصول على الأمبليكون المتوقع من الشاهد الإيجابي الذي يحتوي على بكتيريا *X. fragariae* في الماء فيما يتم الحصول على نتائج سلبية من شواهد إيجابية مع بكتيريا *X. fragariae* في مستخلص نباتي. ويوصى بتكرار التفاعل المتسلسل للبوليميراز بمحلولات مخففة بنسب 10:1 و100:1 و1: 000 1 للمستخلص أو تكرار استخلاص الحمض النووي.

3-9-5-2 التفاعل المتسلسل للبوليميراز الآني

لا يعتبر التفاعل المتسلسل للبوليميراز الآني مثبت الصلاحية إلا إذا:

- أنتج الشاهد الإيجابي منحنى تضخيم بواسطة البادئات الخاصة بالمُمرض.
- لم يشاهد أي منحنى تضخيم (أي أن قيمة حد الدورة تبلغ 40) مع شاهد الاستخلاص السلبي وشاهد التضخيم السلبي.

في حال استخدمت بادئات الشاهد الداخلي لـ *COX*، ينبغي أن ينتج الشاهد السلبي (في حال استخدم) والشاهد الإيجابي وكل عينة من العينات منحنى تضخيم. ويشير إخفاق العينات في إنتاج منحنى تضخيم مع بادئات الشاهد الداخلي، مثلاً، أن عملية استخلاص الحمض النووي قد فشلت أو أن الحمض النووي لم يدرج في مزيج التفاعل أو أن مركبات كابحة للتفاعل المتسلسل للبوليميراز موجودة في الحمض النووي المستخلص أو أن حمض النواة قد فسد.

وتعتبر عينة ما إيجابية إذا أنتجت منحنى تضخيم نموذجيا. وينبغي التحقق من قيمة حد الدورة في كل مختبر لدى تنفيذ الاختبار أول مرة.

3-9-6 الشواهد للاختبارات الجزيئية

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

وينبغي أن تجهّز الشواهد الإيجابية في مكان بعيد عن مكان اختبار العينات.

الشاهد الإيجابي لحمض النواة. يُستخدم هذا الشاهد لرصد كفاءة التضخيم بالتفاعل المتسلسل للبوليميراز. يجوز استخدام حمض نواة مُعدّ مسبقاً (مخزّن) أو حمض نووي كامل الجينوم أو شاهد اصطناعي (مثلاً، منتج مستنسخ للتفاعل المتسلسل للبوليميراز). ويوصى لهذا البروتوكول تعليق مستزرع نقي لخلايا بكتيريا *X. fragariae* (10^4–10^6 وحدة مكوّنة لمستعمرات/مليلتر) كشاهد إيجابي لحمض النواة.

الشاهد الداخلي بالنسبة إلى التفاعل المتسلسل للبوليميراز التقليدي والتفاعل الآني، ينبغي أن يتضمن البروتوكول جينة تدبير للشؤون الوراثية كمثل *COX* (Weller وآخرون، 2000) أو جينة الحمض النووي الريبي المرسال S16 (Weisberg وآخرون 1991) أو هيدروجناز غليسرالدهايد الفوسفات *GADPH* (Mafra وآخرون، 2012) لاستبعاد احتمال ظهور نتائج سلبية كاذبة بسبب إخفاق استخلاص الحمض النووي أو تدهوره أو وجود عوامل كابحة للتفاعل المتسلسل للبوليميراز.

شاهد التضخيم السلبي (بدون شاهد نموذج) هذا الشاهد ضروري للتفاعل المتسلسل للبوليميراز التقليدي والتفاعل الآني بغية استبعاد النتائج الإيجابية الكاذبة الناجمة عن التلوث خلال إعداد خليط التفاعل. ويضاف في مرحلة التضخيم الماء الصالح للتفاعل المتسلسل للبوليميراز الذي كان قد استعمل لإعداد خليط التفاعل أو يضاف محلول دارئ للفوسفات معقّم في مرحلة التضخيم.

شاهد الاستخلاص الإيجابي. يستخدم هذا الشاهد لضمان إتاحة حمض النواة المستهدف بالكمية والجودة الكافيتين للتضخيم بالتفاعل المتسلسل للبوليميراز. ويستخلص الحمض النووي من أنسجة العائل المصابة أو من أنسجة نباتية سليمة انغرز فيها الفيروس المستهدف بكميات تناهز المستوى الذي يعتبر حدّ الكشف الذي ينص عليه البروتوكول.

وينبغي أن تبلغ كمية الشاهد الإيجابي تقريباً عُشر كمية أنسجة الأوراق المستخدمة لكل نبتة لاستخلاص الحمض النووي. ويوصى لهذا البروتوكول كشواهد استخلاص إيجابية، بمنقوعات أنسجة غزرت فيها 10^6 وحدة مكوّنة لمستعمرات/مليلتر من سلالة بكتيريا *X. fragariae* مرجعية.

وبالنسبة إلى التفاعل المتسلسل للبوليميراز، ينبغي الحرص على اجتناب التلوث الناجم عن رذاذ من الشاهد الإيجابي أو من عينات إيجابية (خاصة بالنسبة إلى التفاعل المتسلسل للبوليميراز المتداخل). وعندما يقتضي الأمر ذلك، ينبغي أن يُسلسل الشاهد الإيجابي المستخدم في المختبر بحيث تمكن مقارنة السلسلة بسهولة مع السلاسل التي يتم الحصول عليها من أمبليكونات التفاعل المتسلسل للبوليميراز ذات الحجم الصحيح. وبدلاً من ذلك، يمكن تشكيل شواهد إيجابية اصطناعية ذات سلسلة معروفة يمكن أن تقارَن بدورها بأمبليكونات التفاعل المتسلسل للبوليميراز ذات الحجم الصحيح.

شاهد الاستخلاص السلبي يستخدم هذا الشاهد لرصد التلوث خلال استخلاص الحمض النووي و/أو رد الفعل المتبادل مع نسيج العائل. ويضم الشاهد حمضاً نووياً استخلص من أنسجة العائل غير المصابة وتم تضخيمه لاحقاً، أو عينة عن نسيج منقوع مستخلص لبكتيريا *X. fragariae* اختبرت سابقاً على أنها سلبية. وينصح باستخدام شواهد متعددة حين يتوقع أن تكون هناك أعداد كبيرة من العينات الإيجابية.

4- تحديد الهوية

الحد الأدنى لمتطلبات تحديد الهوية هو عزل البكتيريا وتحقيق نتيجة إيجابية من كل من تقنيات الكشف الثلاث: (1) اختبار إليزا غير المباشر وDAS-ELISA (القسم 3-7) أو التألق المناعي (القسم 3-8) باستخدام أجسام مضادة أحادية الكلون؛ (2) التفاعل المتسلسل للبوليميراز (القسم 3-9)؛ (3) اختبار القدرة الإمراضية عن طريق تلقيح عوائل الفراولة لاستيفاء متطلبات فرضيات Koch (القسمان 4-4 و6-3). ويمكن إجراء اختبارات إضافية (القسم 4) لتثبيت خصائص السلالة الموجودة. وينبغي تضمين الشواهد الإيجابية والسلبية في الاختبارات جميعها.

في حالة الإصابات الكامنة أو النباتات غير الحاملة للأعراض، وبعد إجراء اختبار مسح أولي، ينبغي عزل الكائن الممرض وتأكيد هويته، بما في ذلك عن طريق اختبار القدرة الإمراضية على المستزرع النقي واستيفاء فرضيات Koch.

4-1 الاختبارات الفيزيولوجية والبيوكيميائية

تتسم بكتيريا *X. fragariae* بخصائص استزراع تشترك فيها جميع أصناف البكتيريا المستصفرة xanthomonads. فالخلايا سلبية الغرام، وتكون على شكل قضبان هوائية بزائدة قطبية واحدة شبيهة بالسوط. والنترات غير مخفضة واختبار الكاتالاز إيجابي والأسباراجين لا يستخدم كمصدر وحيد للكربون والنيتروجين (Bradbury، 1977؛ Bradbury، 1984؛ Schaad وآخرون 2001). وإنتاج ضعيف للأحماض من الكربوهيدرات. والمستعمرات مخاطية ومحدبة ولامعة على وسطي YPGA وWilbrink-N (Dye، 1962؛ van den Mooter وSwings 1990؛ Swings وآخرون 1993؛ Schaad

وآخرون،2001). ويمكن تمييز أنواع xanthomonads بسهولة عن غيرها من الأجناس الهوائية السلبية الغرام على شكل قضيب وغيرها من البكتيريا المصطبغة باللون الأصفر حسب الخصائص المبينة في الجدول 2، كما وصفها Schaad وآخرون، (2001).

الجدول 2- الخصائص النمطية الظاهرية لتمييز البكتيريا المُسْتَصْفِرَة *Xanthomonas* عن البكتيريا الزَّائِفَة *Pseudomonas* والبكتيريا المصطبغة الصفراء *Flavobacterium* و*بكتيريا Pantoea* (Schaadوآخرون، 2001)

الخصائص	البكتيريا المُسْتَصْفِرَة	البكتيريا الزَّائِفَة	البكتيريا المصطبغة	بكتيريا *Pantoea*
الأسواط Flagellation	1، قطبي	اكثر من 1، قطبية	لا شيء	مُحِيطِيّة الأَهْدَاب
الصباغ الأصفر Xanthomonadin	نعم	لا	لا	لا
التألق Fluorescence	لا	متغير	لا	لا
ليفان من السكروز	نعم	متغير	لا	لا
حمض الكبريتيك H_2S من السيستين	نعم	لا	لا	لا
أوكسيديز Oxidase	سلبي او ضعيف	متغير	إيجابي	سلبي
تخمير	لا	لا	لا	نعم
نمو على 0.1 في المائة كلوريد ثلاثي فينيل تترازوليوم (TTC)	لا	نعم	نعم	نعم

ويوصى باستخدام السلالات المرجعية بكتيريا *X. fragariae* المتاحة من مجموعات مختلفة التي يتم عرضها في الجدول 3 لاستخدامها كشواهد إيجابية في الاختبارات البيوكيميائية والفسيولوجية.

الجدول 3- السلالات المرجعية لبكتيريا *Xanthomonas fragariae*

السلالة	المصدر
ATCC 33239	مجموعة الانواع المستزرعة الامريكية، ماناساس، فيرجينيا، الولايات المتحدة الأمريكية
CFBP 2510	المجموعة الفرنسية للبكتيريا الممرضة للنبات، المعهد الوطني للبحوث الزراعية، أنجيه، فرنسا
ICMP 5715	المجموعة الدولية للكائنات المجهرية من النبات، اوكلاند، نيوزيلندا
BCCM/LMG 708	المجموعة البلجيكية للكائنات المجهرية المنسقة/ مجموعة مختبر علم الاحياء الدقيقة وعلم الوراثة الميكروبية، غينت، بلجيكا
NCPPB 1469	المجموعة الوطنية للبكتيريا المسببة لامراض النبات، مختبر العلوم المركزي، يورك، المملكة المتحدة؛ مجموعة المستزرعات من دائرة حماية النباتات فاغينينغن، هولندا.
NCPPB 1822	المجموعة الوطنية للبكتيريا المسببة لامراض النبات، مختبر العلوم المركزي، يورك، المملكة المتحدة؛ مجموعة المستزرعات من دائرة حماية النباتات فاغينينغن، هولندا.

ترد معظم الخصائص ذات الصلة أو المفيدة لتمييز بكتيريا *X. fragariae* عن أنواع البكتيريا المستصفرة *Xanthomonas* الأخرى (Schaad وآخرون، 2001؛ Janse وآخرون،2001؛ EPPO، 2006 في الجدول 4.

الجدول 4- اختبارات تشخيصية لتمييز بكتيريا *Xanthomonas fragariae* عن مجموعة البكتيريا *Xanthomonas campestris* ومجموعة البكتيريا *Xanthomonas arboricola* pv. *Fragariae*

الاختبار	*X. fragariae*	*X. campestris*	*X. arboricola pv. fragariae.*
النمو على حرارة 35 درجة مئوية	–	+	غير محدد
النمو على 2 في المائة كلوريد الصوديوم	–	+	+
التحلل المائي للإسكولين	–	+	+
تسييل الجيلاتين	+	تفاعل متفاوت	+
هضم البروتين	–	+	غير محدد
التحلل المائي للنشا	+	تفاعل متفاوت	+
إنتاج اليورياز	–	–	–
حمض من:			
الأرابينوز Arabinose	–	+	غير محدد
الغالاكتوز Galactose	–	+	+
التريهالوز Trehalose	–	+	غير محدد
السيلوبيوز Cellobiose	–	+	+

المصدر: Janse وآخرون،2001 ومنظمة وقاية النباتات في أوروبا والبحر المتوسط (2006).

يمكن أن يجري تحديد الخصائص البيوكيميائية للسلالات باستخدام نظم تجارية ويمكن تحديد هوية بكتيريا *X fragariae* بالتنميط على الصفائح الشريطية API 20 NE وAPI 50 CH (bioMérieux[1]) (EPPO، 2006).

للصفائح الشريطية API 20 NE[1]، ينبغي اتباع تعليمات الشركة المصنّعة لإعداد مستعلقات من اختبار عمره 48 ساعة ومستزرعات سلالة مرجعية على وسط Wilbrink-N وتُلقح الشرائح الشريطية. ويجري الحضن على حرارة 25-26 درجة مئوية وتكون القراءة بعد 48 و96 ساعة. وتقارن القراءة بعد 48 ساعة للنشاط الأنزيمي والقراءة بعد 96 ساعة للاستفادة من الركيزة مع الخصائص المميزة لبكتيريا *X. fragariae* (الجدول 5).

الجدول 5- تفاعلات بكتيريا *Xanthomonas fragariae* في شرائط API 20 NE

الاختبار	التفاعل (بعد 48 أو 96 ساعة)†
تخمير الجلوكوز	−
الأرجينين Arginine	−
اليورياز Urease	−
الإسكولين Esculin	+
الجيلاتين	+ (ضعيف)
البارانِتروفِنِيل- β - D ج	+
الاكتوبيرانوسيديز PNPG Para-nitrophenyl-β-D-galactopyranosiDASe (PNPG) تمثل:	
الجلوكوز	+
الأرابينوز Arabinose	−
المانوز Mannose	+
المانيتول Mannitol	−
أسيتيل الجلوكوزامين- N N-acetyl glucosamine	+
المالتوز Maltose	−
الغلوكونات Gluconate	−
الكابرات Caprate	−
الأديبات Adipate	−
المالات Malate	+
السيترات Citrate	−
اسيتات الفينيل Phenyl acetate	−

† تفاعلات مشتركة بين 90 في المائة من سلالات بكتيريا *X. fragariae* تم اختبارها (López وآخرون، 2005).

للصفائح الشريطية API 50 CH، تعدّ مستعلقات خلايا بكتيرية بكثافة ضوئية $_{600}$نانومتر= 1.0 في محلول ملحي منظم بالفوسفات. ويضاف مليلتر واحد من المستعلق إلى 20 مليلتر من وسط C المعدّل (0.5 غرام من NH_4H2PO_4؛ 0.5 غرامات من فوسفات ثنائية البوتاسيوم K_2HPO_4؛ 0.2 غرام من سلفات المغنيزيوم $MgSO_4$؛ 5 غرامات من كلوريد الصوديوم NaCl؛ غرام واحد من مستخلص الخميرة؛ 70 مليلتراً من البروموثيمول الأزرق bromothymol blue (0.2 في المائة)؛ لتر واحد من الماء المقطر؛ درجة حموضة 6.8) (Dye، 1962). وينبغي اتباع إرشادات الشركة المصنعة لتلقيح الشرائح الشريطية. ويجري الحضن على حرارة 25 درجة مئوية في ظروف يتوفر فيها الهواء

وتتم القراءة بعد يومين وثلاثة وستة أيام. وتلاحظ الاستفادة من الكربوهيدرات المختلفة بتكوّن لون أصفر في الكبيبات بعد فترة الحضن (الجدول 6).

الجدول 6 - تفاعلات بكتيريا *Xanthomonas fragariae* في الصفائح الشريطية API 50 CH

الاختبار †	التفاعل (بعد ستة أيام)
د – أرابينوز D-Arabinose	متفاوت
الغالاكتوز Galactose	+
د-الجلوكوز D-Glucose	+
د- الفركتوز D-Fructose	+
د- المانوز D-Mannose	+
أسيتيل الجلوكوزامين- N N-acetyl glucosamine	+
الإسكولين Esculin	+
السكروز Sucrose	+
التريهالوز Trehalose	+
د –ليكسوزا D-Lyxosa	+
لـ –فكوز L-Fucose	+

† لا تستفيد بكتيريا *X. fragariae* من السكريات المتبقية في اختبار الصفائح الشريطية API 50 CH (López وآخرون، 2005)

1-1-4 تحديد الخصائص عن طريق استرات ميثيل الأحماض الدهنية FAME

استرات ميثيل الأحماض الدهنية المرتبطة بالأغشية السيتوبلازمية والخارجية للبكتيريا السلبية الغرام مفيدة لتحديد الهوية البكتيرية (Sasser، 1990). وترد في Dickstein وآخرين (2001) أحماض دهنية محددة يمكن استخدامها للتنبؤ بجنس البكتيريا السلبية الغرام والبكتيريا الإيجابية الغرام. ويستند تحديد الهوية إلى مقارنة أنواع الأحماض الدهنية وكمياتها النسبية في نمط سلالة غير معروفة بأنماط من مجموعة متنوعة واسعة من السلالات في قاعدة بيانات (مثل مكتبة TSBA40). ومن حاسم الأهمية أن تجري تنمية البكتيريا في ظروف موحدة من ناحية الوقت ودرجة الحرارة والوسط المغذي بغية الحصول على نتائج قابلة للتكرار. وتحتوي سلالات بكتيريا *X. fragariae* ثلاثة أحماض دهنية رئيسية: بنسب 16:1 ω7- cis، و15:0 *anteiso*، و15:0 *iso*. وفي حين تتطابق بعض سلالات الاختبار جيداً مع النمط الموجود في قاعدة البيانات، لدى سلالات أخرى أنماط أحماض دهنية مختلفة لا تتوافق جيدا. وقد أظهرت الدراسات أن سلالات *X. fragariae* تظهر تنوعاً كبيراً وتنقسم إلى ما لا يقل عن أربع مجموعات متميزة من الأحماض الدهنية (Roberts وآخرون، 1998). يوصى بالطريقة التي وصفها Roberts وآخرون (1998) للتنميط عن طريق استرات ميثيل الأحماض الدهنية لبكتيريا *X. fragariae*. فتنمّى سلالات الاختبار في أجار الصُّويا بِالتريبتِيكاز على حرارة 24 درجة مئوية لمدة 48 ساعة، ويطبق إجراء استخلاص الأحماض

الدهنية وتحلل العزلة باستخدام نظام شرلوك Sherlock لتحديد الهوية الميكروبية (MIDI) (Newark, DE, United States).

4-1-1-1 تفسير نتائج عملية تحديد الخصائص عن طريق استرات ميثيل الأحماض الدهنية

يكون اختبار تحديد الخصائص عن طريق استرات ميثيل الأحماض الدهنية إيجابياً إذا كانت مجموعة خصائص سلالة الاختبار متطابقة مع نمط الشاهد الإيجابي أو السلالة/السلالات المرجعية لبكتيريا *X. fragariae*. ويتوفر تحليل الأحماض الدهنية من نظام تحديد الهوية الميكروبية ومن المجموعة الوطنية للبكتيريا المسببة لأمراض النبات (NCPPB)، (وكالة البحوث الغذائية والبيئية Fera، يورك، المملكة المتحدة). ويرد تكوين وكميات استرات ميثيل الأحماض الدهنية في بكتيريا *X. fragariae* وبكتيريا *X. arboricola* pv. *fragariae* في Janse وآخرين (2001).

4-2 الاختبارات المصلية

4-2-1 التألق المناعي

يمكن استخدام التألق المناعي لتحديد هوية سلالات بكتيريا *X. fragariae* المشتبه بها. يعدّ مستعلق من حوالي 10^6 خلايا/مليلتر في محلول ملحي منظم بالفوسفات ويطبق إجراء التألق المناعي الموضح في القسم 3-8. وإذا كان سيتم إجراء اختبارين اثنين فقط لتحديد الهوية لغرض التشخيص السريع، ينبغي عدم استخدام اختبار مصلي آخر بالإضافة إلى هذا الاختبار.

4-2-2 اختبار إليزا

يمكن استخدام اختبار إليزا غير المباشر أو اختبار DAS-ELISA (الموضحين في القسمين 3-7-1 و3-7-2 على التوالي) لتحديد هوية سلالات بكتيريا *X. fragariae* المشتبه بها المعزولة من مواد نباتية مصابة ببقع خشنة بكتيرية. وإذا كان سيتم إجراء اختبارين اثنين فقط لتحديد الهوية لغرض التشخيص السريع، ينبغي عدم استخدام اختبار مصلي آخر بالإضافة إلى هذا الاختبار.

4-3 الاختبارات الجزيئية

4-3-1 التفاعل المتسلسل للبوليميراز

يمكن تحديد هوية مستزرعات بكتيريا *X. fragariae* المشتبه بها باستخدام بروتوكولات التفاعل المتسلسل للبوليميراز الموضحة في القسم 3-9.

4-3-2 التفاعل المتسلسل للبوليميراز- المتناوب اللاجيني المتكرر REP-PCR

ترد بروتوكولات (REP)-PCR محددة لتحديد هوية سلالات بكتيريا *X. fragariae* في Opgenorth وآخرين (1996) وPooler وآخرين (1996). ويمكن استخدام أي من هذه البروتوكولات للتحديد الموثوق لهوية سلالات بكتيريا *X. fragariae*.

يستند بروتوكول التفاعل المتسلسل للبوليميراز الذي يرد أدناه إلى خليط التفاعل وظروف التضخيم الموضحة في Opgenorth وآخرين (1996).

تؤخذ السلالات البكتيرية التي سيجري تحليلها من مسحات أو مستعمرات فردية على وسط مرض بيرس Pierce المعدّل (5 غرام من السكروز، 2.5 غرام فيتون (BD BBL[1]، 10 غرامات

فيتاجيل (BD BBL[1])؛ لتر واحد من الماء المقطر؛ تعديل الحموضة إلى 7.5 بمقدار 2 مولار من حمض الهيدروكلوريك قبل التسخين تحت الضغط (Opgenorth وآخرون 1996). يمكن استخدام أوساط مختلفة للنمو؛ ولكن تنبغي معايرتها قبل الاستخدام.

مجموعتا البادئات هما:

REP1R-I: 5′-IIIICGICGICATCIGGC-3′

REP2-I: 5′-ICGICTTATCIGGCCTAC-3′

ERIC1R: 5′-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3′

ERIC2: 5′-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGC G-3′

يحتوي دارئ التفاعل على 16.6 مليمولار من $(NH4)_2SO_4$، 67 مليمولاراً من Tris-HCl (على درجة حموضة 8.8)، 6.7 ميكرومولار من EDTA، 30 مليمولاراً من 2-مركابتوإيثانول 2-mercaptoethanol، 0.17 ملغ من محلول ملحي منظم بالفوسفات/مليلتر، 10 في المائة (حجم/حجم) ثنائي ميثيل سلفوكسيد dimethyl sulfoxide، 1.2 مليمولار لكل ثلاثي فوسفات النيوكليتيد منقوص الأكسجين dNTP، و62 بيكومولاراً من كل بادئة ووحدتين من بوليميراز الحمض النووي للمستحرة المائية Taq. وتنقل البكتيريا من مستعمرة مُمثِّلة لسلالة الاختبار باستخدام طرف ماصة 10 ميكروليترات معقمة (أو أي أداة مناسبة أخرى)، إلى أنبوب التفاعل المتسلسل للبوليميراز المحتوي على 25 ميكرولتر من خليط التفاعل. أما بارامترات التدوير فهي على حرارة 95 درجة مئوية لمدة 6 دقائق؛ تليها 35 دورة على حرارة 94 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة، و44 درجة مئوية (بادئات REP) لمدة دقيقة واحدة، أو 52 درجة مئوية (بادئات ERIC) لمدة دقيقة واحدة، و65 درجة مئوية لمدة 8 دقائق. وتلي دورات التضخيم مرحلة استطالة نهائية على حرارة 68 درجة مئوية لمدة 16 دقيقة. وترحّل كهربائياً منتجات التضخيم (5-10 ميكرولترات) في 1.5 في المائة (وزن/حجم) من هلام الأجاروز. وتشاهد شدف الحمض النووي بعد صبغها ببروميد الإثيديوم بالأشعة فوق البنفسجية النافذة.

4-2-3-1 تفسير نتائج التفاعل المتسلسل للبوليميراز- المتناوب اللاجيني المتكرر REP-PCR

تحدد هوية سلالات الاختبار البكتيرية على أنها بكتيريا *X. fragariae* إذا كانت لديها البصمات الجينومية نفسها التي للأنماط الجينية REP وERIC من السلالات المرجعية (Pooler وآخرون 1996) مضخّمة في التفاعل المتسلسل للبوليميراز نفسه باستخدام الهلام نفسه. ويمكن الحصول على عدد صغير من شرائط متعددة الأشكال من السلالات المختلفة لبكتيريا *X. fragariae* نظراً لوجود مستويات تنوع جينومي منخفضة.

4-3-3 تحليل السلاسل المتعددة المواقع

استخدم نهج تحليل السلاسل المتعددة المواقع على نطاق واسع لتحديد هوية أصناف البكتيريا المستصفرة xanthomonads (Parkinson وآخرون، 2007؛ Almeida وآخرون، 2010؛ Hamza وآخرون 2012) ويمكن أن يستخدم لتحديد هوية بكتيريا *X. fragariae*، خاصة أن هناك مسودة تسلسل جينومي متوفرة (Vandroemme وآخرون، 2013). ومع ذلك، تجدر الإشارة إلى أن هذه المنهجية لم يتحقق منها بعد لغرض تحديد هوية بكتيريا *X. fragariae*. يجري تضخيم جينات تدبير (مثل gyrB، rpoD) باستخدام البادئات والظروف التي وصفها Almeida وآخرون (2010) وHamza وآخرون (2012). ويتكون تحليل السلاسل المتعددة المواقع من سَلسلة مواقع متعددة (عادة أربع إلى ثماني جينات تدبير) ومقارنة هذه السلاسل مع سلاسل مرجعية من أنواع بكتيريا *Xanthomonas* مودعة في قواعد

بيانات النوكليوتيدات؛ مثلاً قاعدة البيانات المشتركة لميكروبات النبات (http://genome.ppws.vt.edu/cgi-bin/MLST/home.pl) (Almeida وآخرون، 2010)، وMLVAbank للتنميط الجيني للميكروبات http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping/، وقاعدة بيانات البكتيريا Q-bank/ (http://www.q-bank.eu/Bacteria).

4-4 اختبارات القدرة الإمراضية

ينبغي، عند الاقتضاء، تأكيد هوية السلالات البكتيرية التي يشتبه بأنها بكتيريا *X. fragariae* باختبار القدرة الإمراضية. فينبغي تلقيح سلالات منتقاة من صفائح جرى عزلها أو تخصيبها في أوراق على نباتات فراولة قابلة للإصابة (أو أوراق مفصولة، كما هو موضح في القسم 3-6). وهناك عدة إجراءات متوفرة: Hazel وCiverolo (1980)، Civerolo وآخرون (1997أ) وHildebrand وآخرون (2005).

1-4-4 إجراء التلقيح العام

من إجراءات التلقيح الموصى بها، استخدام نباتات فراولة خالية من بكتيريا *X. fragariae* من أصناف قابلة للإصابة (مثل كاماروسا، سيسكاب، سلفا، كورونا، باجارو). وإذا كان ذلك ممكناً، ينبغي أن تحفظ النباتات طوال الليل في غرفة بيئية على حرارة 20–25 درجة مئوية وعلى رطوبة نسبية مرتفعة (أكثر من 90 في المائة) مع تعريضها للضوء لمدة 4 ساعات قبل التلقيح لإحداث فتحات ثغيرية في الأوراق.

تجهّز مستعلقات خلايا بكتيرية (10^6 وحدة مكوّنة لمستعمرات/مليلتر) في ماء مقطّر ومعقّم أو في 10 مليمولارات من محلول ملحي منظم بالفوسفات. يطلى اللقاح لكل سلالة على الأسطح البعيدة عن العرق لثلاث ورقات ثلاثية الوريقات على كلّ من نبتتين أو ثلاث نبتات ببندقية رش ذات ضغط منخفض أو بخاخة أو أداة مماثلة (مثلاً من DeVilbiss[1]) لكي لا يحدث إشباع بالماء. وبالإمكان تيسير الإصابة بجرح الأوراق (مثل ثقب السطح البعيد عن العرق بإبرة) قبل طلاء اللقاح، ولو أن ذلك غير ضروري. وبعد التلقيح، يجري حضن النباتات في غرفة يحافظ فيها على حرارة 20–25 درجة مئوية وعلى رطوبة نسبية مرتفعة (أكثر من 90 في المائة)، وتتعرض للضوء لمدة 12–14ساعة. وتقوم مستعلقات من خلايا سلالة مرجعية لبكتيريا *X. fragariae* (أعدت بنفس طريقة إعداد سلالة الاختبار) وماء مقطر ومعقم أو 10 مليمولارات من محلول ملحي منظم بالفوسفات بدور الشاهد الإيجابي والشاهد السلبي، على التوالي، ويجري التلقيح في صوان مختلفة. ثم يقيّم تطور التمزقات أسبوعياً مدة ثلاثة أسابيع (21 يوماً) بعد التلقيح. ويعزل المُمرض من جديد من مثل هذه التمزقات، كما هو موضح في القسم 3-5، وتحدد هويته بطريقة إليزا أو التألق المناعي أو التفاعل المتسلسل للبوليميراز.

1-1-4-4 تفسير نتائج اختبار القدرة الإمراضية

إذا كان مستعلق الخلايا البكتيرية يحتوي بكتيريا *X. fragariae*، تكون الأعراض الأولية تمزقات داكنة مشبعة بالماء (عندما ينظر إليها في ضوء منعكس) على أسطح الأوراق السفلى. وتظهر هذه التمزقات صفراء شفافة عندما تشاهد في ضوء نافذ. وتتطور هذه التمزقات في وقت لاحق إلى بقع بهالة شاحبة أو نخر على الأطراف. وينبغي أن تظهر هذه الأعراض نفسها على أوراق لقّحت بسلالة بكتريا *X. fragariae* مرجعية (شاهد إيجابي).

ولا ينبغي أن تظهر أعراض مشابهة على أوراق لقحّت بماء مقطر ومعقم أو بمقدار 10 مليمولارات من محلول ملحي منظم بالفوسفات (شاهد سلبي).

2-4-4 ردّ الفعل الشديد الحساسية

يمكن أن يكون رد الفعل الشديد الحساسية في أوراق التبغ إشارة إلى وجود جينات *hrp* ويستحث العديد من البكتيريا المُمرضة للنبات ردود فعل إيجابية. ويمكن استخدام شاهد إيجابي، مثل سلالة Pseudomonas syringae pv. syringae. وتستخدم نبتات تبغ من أصناف كزانتي Xanthi أو سامسون Samsun لديها أكثر من خمس إلى ست أوراق. ويعدّ مزيج مستعلق من البكتيريا بتركيز 10^9 وحدة مكوّنة لمستعمرات/ مليلتر (كثافة ضوئية 1.0 على 600 نانومتر) في ماء معقّم أو في 10 مليمولارات من محلول ملحي منظم بالفوسفات ويستخدم محقن مزود بإبرة قياس 25 لحقن المزيج في الفسحات ما بين الخلايا في أسطح بعيدة عن العرق في أوراق ناضجة.

1-2-4-4 تفسير نتائج رد الفعل الشديد الحساسية

يعتبر انهيار الأنسجة التي حقنت انهياراً كاملاً ونخرها في غضون 24–48 ساعة بعد التلقيح على أنه نتيجة اختبار إيجابية. ومعظم سلالات بكتيريا *X. fragariae* إيجابية بالعلاقة مع رد الفعل الشديد الحساسية. ولكن قد يكون بعضها سلبيا، خاصة بعد أن تُخزن بعض الوقت. ولا ينبغي أن تظهر ردود فعل مشابهة على أوراق لقّحت بماء مقطر ومعقم أو بمقدار 10 مليمولارات من محلول ملحي منظم بالفوسفات كشاهد سلبي.

5- السجلات

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

وفي الحالات التي قد تتأثر فيها أطراف متعاقدة أخرى بنتائج التشخيص، لا سيما حالات عدم الامتثال (المعيار رقم 13: (المبادئ التوجيهية بشأن الإخطار عن عدم الامتثال وإجراءات الطوارئ)) وفي حالة ظهور الآفة في منطقة ما للمرة الأولى، ينبغي الاحتفاظ بالسجلات والأدلة والمواد الإضافية التالية مدة سنة واحدة على الأقل بطريقة تضمن التتبع: العينة الأصلية أو مستزرع/مستزرعات الآفة والعينات المحفوظة أو المثبتة على شرائح أو مواد الاختبار (مثلاً، الصور الفوتوغرافية للهلام، والنسخ المطبوعة لنتائج اختبار إليزا وأمبليكونات التفاعل المتسلسل للبوليميراز).

6- جهات الاتصال للحصول على معلومات إضافية

يمكن الحصول على معلومات إضافية بشأن هذا البروتوكول من:

United States Department of Agriculture (USDA) Agricultural Research Service (ARS) (formerly), (Edwin L. Civerolo; e-mail: emciv@comcast.net).

Plant and Environmental Bacteriology, Fera, Sand Hutton, York YO41 1LZ, United Kingdom (John Elphinstone; e-mail: john.elphinstone@fera.gsi.gov.uk).

Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera Moncada-Náquera km 4.5, 46113 Moncada (Valencia), Spain (María M. López; e-mail: mlopez@ivia.es; tel.: +34 963 424000; fax: +34 963 424001

يمكن التقدم بطلب لتنقيح بروتوكول للتشخيص من قبل المنظمات الوطنية لوقاية النباتات، أو المنظمات الإقليمية لوقاية النباتات أو الأجهزة الفرعية لهيئة تدابير الصحة النباتية من خلال أمانة

الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات (ippc@fao.org) وهي بدورها تحيله إلى الفريق التقني المعني ببروتوكولات التشخيص.

7- شكر وتقدير

حرر المسودة الأولى لهذا البروتوكول E.L. Civerolo من إدارة البحوث الزراعية في وزارة الزراعة في الولايات المتحدة، USDA-ARS سابقا (أنظر القسم السابق) ونقحها M.M. López من معهد البحوث الزراعية في فالنسيا (IVIA، إسبانيا (أنظر القسم السابق)).

8- المراجع

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

Almeida, N.F., Yan, S., Cai, R., Clarke, C.R., Morris, C.E., Schaad, N.W., Schuenzel, E.L., Lacy, G.H., Sun, X., Jones, J.B., Castillo, J.A., Bull, C.T., Leman, S., Guttman, D.S., Setubal, J.C. & Vinatzer, B.A. 2010. PAMDB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes. *Phytopathology*, 100(3): 208–215.

Bradbury, J.F. 1977. *Xanthomonas fragariae*. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria No. 558. Wallingford, UK, CABI.

Bradbury, J.F. 1984. *Xanthomonas. In* N.R. Krieg & J.G. Holt, eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 1. Baltimore, MD, Williams & Wilkins.

CABI. n.d. *Crop protection compendium.* Wallingford, UK, CABI. Available at http://www.cabi.org/cpc/ (last accessed 16 April 2016).

Calzolari, A. & Mazzucchi, U. 1989. Attempts to detect *Xanthomonas fragariae* in symptomless strawberry plants. *Acta Horticulturae*, 265: 601–604.

Civerolo, E.L., Feliciano, A.J., Melvin, J.A. & Gubler, W.D. 1997a. A detached leaf bioassay for *Xanthomonas fragariae*. *In* A. Mahadevin, ed. *Proceedings of the 9th International Conference of Plant Pathogenic Bacteria*, pp. 89–94. University of Madras, Madras, India.

Civerolo, E.L., Roberts, P., Feliciano, A.J., Melvin, J.A., Buchner, R.P., Jones, J.B. & Gubler, W.D. 1997b. Comparative detection of *Xanthomonas fragariae* in strawberry plants by detached leaf inoculation, ELISA and PCR. *In* A. Mahadevin, ed. *Proceedings of the 9th International Conference of Plant Pathogenic Bacteria*, pp. 95–99. University of Madras, Madras, India.

De Boer, S.H. 1990. Immunofluorescence for bacteria. *In* R. Hamptom, E. Ball & S. De Boer, eds. *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens: A laboratory manual*, pp. 295–298. St Paul, MN, APS Press.

Dickstein, E.R., Jones, J.B. & Stead, D.E. 2001. Automated techniques. *In* N.W. Schaad, J.B. Jones & W. Chun, eds. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*, pp. 343–358. St Paul, MN, APS Press.

Dye, D.W. 1962. The inadequacy of the usual determinative tests for the identification of X*anthomonas* spp. *New Zealand Journal of Science*, 5(4): 393–416.

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 1997. Data sheet on *Xanthomonas fragariae*. *In* EPPO/CABI (I.M. Smith, D.G. McNamara, P.R. Scott, & M. Holderness, eds), ed. *Quarantine pests for Europe*, 2nd edn, pp. 1124–1128. Wallingford, UK, CABI.

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2006. Diagnostic protocol for *Xanthomonas fragariae*. EPPO Standards PM 7/65. *EPPO Bulletin*, 36: 135–144.

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2009. Indirect immunofluorescence test for plant pathogenic bacteria. EPPO Standards PM 7/97 (1). *EPPO Bulletin*, 39: 413–416.

Gubler, W.D., Feliciano, A.J., Bordas, A., Civerolo, E.L., Melvin, J. & Welch, N. 1999. *X. fragariae* and *C. cladosporioides* cause strawberry blossom blight. *California Agriculture*, 53: 26–28.

Hamza, A.A., Robene-Soustrade, I., Jouen, E., Lefeuvre, P., Chiroleu, F., Fisher-Le Saux, M., Gagnevin, L. & Pruvost, O. 2012. Multilocus sequence analysis- and amplified fragment length polymorphism-based characterization of xanthomonads associated with bacterial spot of tomato and pepper and their relatedness to *Xanthomonas* species. *Systematic and Applied Microbiology*, 35(3): 183–190.

Hartung, J.S. & Pooler, M.R. 1997. Immunocapture and multiplexed-PCR assay for *Xanthomonas fragariae*, causal agent of angular leafspot disease. *Acta Horticulturae*, 439: 821–828.

Hayward, C. 1960. A method for characterizing *Pseudomonas solanacearum*. *Nature*, 186: 405–406.

Hazel, W.J. & Civerolo, E.L. 1980. Procedures for growth and inoculation of *Xanthomonas fragariae*, causal organism of angular leaf spot of strawberry. *Plant Disease*, 64: 178–181.

Hildebrand, P.D., Braun, P.G., Renderos, W.E., Jamieson, A.R., McRae, K.B. & Binns, M.R. 2005. A quantitative method for inoculating strawberry leaves with *Xanthomonas fragariae*, factors affecting infection, and cultivar reactions. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 27: 16–24.

Hildebrand, D.C., Schroth, M.N. & Wilhelm, S. 1967. Systemic invasion of strawberry by *Xanthomonas fragariae* causing vascular collapse. *Phytopathology*, 57: 1260–1261.

Janse, J.D. 2005. Examples of bacterial diseases of cultivated and wild plants – *Xanthomonas fragariae*. In: *Phytobacteriology: principles and practice.* Chapter 7. Wallingford, UK, CABI Publishing. Pp. 224-225.

Janse, J.D., Ross, M.P., Gorkink, R.F.J., Derks, J.H.J., Swings, J. Janssens, D. & Scortichini, M. 2001. Bacterial leaf blight of strawberry (*Fragaria (×) ananassa*) caused by a pathovar of *Xanthomonas arboricola*, not similar to *Xanthomonas fragariae* Kennedy & King. Description of the causal organism as *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae* (pv. nov., comb. nov.). *Plant Pathology*, 50: 653–665.

Kennedy, B.W. 1965. Infection of Potentilla by *Xanthomonas fragariae*. *Plant Disease Reporter*, 49: 491–492.

Kennedy, B.W. & King, T.H. 1962. Angular leaf spot of strawberry caused by *Xanthomonas fragariae* sp. nov. *Phytopathology*, 52: 873–875.

Koike, H. 1965. The aluminum-cap method for testing sugarcane varieties against leaf scald disease. *Phytopathology*, 55: 317–319.

López, M.M., Aramburu, J.M., Cambra, M. & Borrás, V. 1985. [Detection and identification of *Xanthomonas fragariae* in Spain.] *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Serie Agricola*, 28: 245–259 (in Spanish).

López, M.M., Dominguez, F., Morente, C., Salcedo, C.I., Olmos, A. & Civerolo, E. 2005. *Diagnostic protocols for organisms harmful to plants: Diagnosis* Xanthomonas fragariae. SMT-4-CT98-2252.

Maas, J.L., ed. 1998. *Compendium of strawberry diseases*, 2nd edn. St Paul, MN, APS Press.

Maas, J.L., Gouin-Behe, C., Hartung J.S. & Hokanson, S.C. 2000. Sources of resistance for two differentially pathogenic strains of *Xanthomonas fragariae* in *Fragaria* genotypes. *Horticultural Science*, 35: 128–131.

Maas, J.L., Pooler, M. & Galletta, G.J. 1995. Bacterial angular leafspot disease of strawberry: Present status and prospects for control. *Advances in Strawberry Research*, 14: 18–24.

Mafra, V., Kubo, K.S., Alves-Ferreira, M., Ribeiro-Alves, M., Stuart, R.M., Boava, L.P., Rodrigues, C.M. & Machado, M.A. 2012. Reference genes for accurate transcript

normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. *PloS One*, 7(2), e31263.

Mahuku, G.S. & Goodwin, P.H. 1997. Presence of *Xanthomonas fragariae* in symptomless strawberry crowns in Ontario detected using a nested polymerase chain reaction (PCR). *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19: 366–370.

Milholland, R.D., Ritchie, D.F., Dayking, M.E. & Gutierrez, W.A. 1996. Multiplication and translocation of *Xanthomonas fragariae* in strawberry. *Advances in Strawberry Research*, 15: 13–17.

Moltmann, E. & Zimmermann, C. 2005. Detection of *Xanthomonas fragariae* in symptomless strawberry plants by nested PCR. *EPPO Bulletin*, 35: 53–54.

Opgenorth, D.C., Smart, C.D., Louws, F.J., de Bruijn, F.J. & Kirkpatrick, B.C. 1996. Identification of *Xanthomonas fragariae* field isolates by rep-PCR genomic fingerprinting. *Plant Disease*, 80: 868–873.

Parkinson, N., Aritua, V., Heeney, J., Cowie, C., Bew, J. & Stead, D. 2007. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(12): 2881–2887.

Pooler, M.R., Ritchie, D.F. & Hartung, J.S. 1996. Genetic relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR data and generation of multiplexed PCR primers useful for the identification of this phytopathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 3121–3127.

Rademaker, J.L.W., Hoste, B., Louws, F.J., Kersters, K., Swings, J., Vauterin, L., Vauterin, P. & De Bruijn, F.J. 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 665–677.

Rademaker, J.L.W., Louws, F.J., Schultz, M.H., Rossbach, U., Vauterin, L., Swings, J. & de Bruijn, F.J. 2005. A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 95: 1098–1111.

Rat, B. 1993. *Xanthomonas fragariae*: Causal agent of angular leaf spot of strawberry. *In* J.G. Swings & E.L. Civerolo, eds. *Xanthomonas*, pp. 69–70. London, Chapman and Hall.

Roberts, P.D., Hodge, N.C., Bouzar, H., Jones, J.B., Stall, R.E., Berger, R.D. & Chase, A.R. 1998. Relatedness of strains of *Xanthomonas fragariae* by restriction fragment length polymorphism, DNA-DNA reassociation, and fatty acid analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3961–3965.

Roberts, P.D., Jones, J.B., Chandler, C.K., Stall, R.E. & Berger, R.D. 1996. Survival of *Xanthomonas fragariae* on strawberry in summer nurseries in Florida detected by specific primers and nested PCR. *Plant Disease*, 80: 1283–1288.

Rowhani, A., Feliciano, A.J., Lips, T. & Gubler, W.D. 1994. Rapid identification of *Xanthomonas fragariae* in infected strawberry leaves by enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Disease*, 78: 248–250.

Saddler, G.S. & Bradbury, J.F. 2005. *Xanthomonas*. *In* G.M. Garrity, editor-in-chief; D.J. Brenner, N.R. Krieg & J.T. Stanley, eds Vol. 2. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd edn, Vol. 2, Part B, pp. 63–90. New York, Springer.

Sasser, M. 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis. *In* Z. Klement, K. Rudolph & D.C. Sands, eds. *Methods in phytopathology*, pp. 200–204. Budapest, Akademiai Kiado.

Schaad, N.W., Jones, J.B. & Lacy, G.H. 2001. *Xanthomonas*. *In* N.W. Schaad, J.B. Jones & W. Chun, eds. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*, 3rd edn, pp. 175–200. St Paul, MN, APS Press.

Schaad, N.W., Tamaki, S., Hatziloukas, E. & Panapoulos, N.J. 1995. A combined biological enzymatic amplification (Bio-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. *Phytopathology*, 85: 243–248.

Stackebrandt, E., Murray, R.G.E. & Truper, H.G. 1988. *Proteobacteria* classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the "purple bacteria and their relatives". *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38: 321–325.

Stefani, E., Mazzucchi, U. & Calzolari, A. 1989. Evidence of endophytic movement of *Xanthomonas fragariae* Kenn. and King in strawberry. *Phytopathologia Mediterranea*, 28: 147–149.

Stöger, A. & Ruppitsch, W. 2004. A rapid and sensitive method for the detection of *Xanthomonas fragariae*, causal agent of angular leafspot disease in strawberry plants. *Journal of Microbiological Methods*, 58: 281–284.

Swings, J., Vauterin, L. & Kersters, K. 1993. The bacterium *Xanthomonas*. *In* J. Swings & E.L. Civerolo, eds. *Xanthomonas*, pp. 138–144. London, Chapman and Hall.

Turechek, W.W., Hartung, J.S. & McCallister, J. 2008. Development and optimization of a real-time detection assay for *Xanthomonas fragariae* in strawberry crown tissue with receiver operating characteristic curve analysis. *Phytopathology*, *98*(3): 359-368.

Van den Mooter, M. & Swings, J. 1990. Numerical analyses of 295 phenotypic features of 266 *Xanthomonas* strains and related strains and an improved taxonomy of the genus. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40: 348–369.

Vandroemme, J., Baeyen, S., Van Vaerenbergh, J., De Vos, P. & Maes, M. 2008. Sensitive real-time PCR detection of *Xanthomonas fragariae* in strawberry plants. *Plant Pathology*, 57(3): 438–444.

Vandroemme, J., Cottyn, B., Baeyen, S., De Vos, P. & Maes, M. 2013. Draft genome sequence of *Xanthomonas fragariae* reveals reductive evolution and distinct virulence-related gene content. *BMC Genomics*, 14(1), 829.

Weisberg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, B.A. & Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173: 697–703.

Weller, S.A., Beresford-Jones, N.J., Hall, J., Thwaites, R., Parkinson, N. & Elphinstone, J.G. 2007. Detection of *Xanthomonas fragariae* and presumptive detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae*, from strawberry leaves, by real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 70: 379–383.

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(7): 2853–2858.

Zimmermann, C., Hinrichs-Gerger, J., Moltmann, E. & Buchenauer, H. 2004. Nested PCR for detection of *Xanthomonas fragariae* in symptomless strawberry plants. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 111: 39–51.

9- الأشكال

الشكل 1- أعراض بكتيريا Xanthomonas fragariae على (ألف، جهة الشمال) السطح العلوي للورقة و(باء، جهة اليمين) على السطح السفلي للورقة.
الصورة تقدمة من: A.M.C. Schilder, Michigan State University, East Lansing, MI, United States

الشكل 2- نزيز بكتيري ناجم عن آفة *Xanthomonas fragariae* على السطح السفلي للورقة.
الصورة تقدمة من: W.W. Turechek, United States Department of Agriculture Agricultural Research Service, Washington, DC, United States.

الشكل 3- أعراض بكتيريا *Xanthomonas fragariae* على كأس الزهرة.
الصورة تقدمة من: A.M.C. Schilder, Michigan State University, East Lansing, MI, United States

مراحل النشر:

هذه الفقرة لا تشكل جزءاً رسمياً من المعيار.

2004-11 أضافت لجنة المعايير الموضوع إلى برنامج العمل

2006-04 أضافت الدورة الأولى لهيئة تدابير الصحة النباتية بكتيريا *Xanthomonas fragariae* (2004-012) إلى برنامج العمل

2014-01 مشاورة الخبراء

2015-06 صدر قرار إلكتروني عن لجنة المعايير بالموافقة على تقديمه إلى مشاورة الأعضاء (2015_eSC_Nov_03).

2016-03 صدر قرار إلكتروني عن الفريق الفني المعني ببروتوكولات التشخيص بالموافقة على اعتماده (2016_eTPDP_Mar_05).

2016-06 صدر قرار إلكتروني عن لجنة المعايير بالموافقة على تقديمه لفترة الإشعار الخاصة ببروتوكولات التشخيص ومدتها 45 يوماً (2016_eSC_Nov_01).

2016-08 اعتمدت لجنة المعايير بروتوكول التشخيص نيابة عن هيئة تدابير الصحة النباتية (بدون ورود أي اعتراضات رسمية).

المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية رقم 27. الملحق 14. *Xanthomonas fragariae*، (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