***الملحق* العاشر**

للمعيار 27 في المعايير الدولية لتدابير الصحة النباتية

المعايير الدولية لتدابير الصحة النباتية

بروتوكولات تشخيص المعيار 27 في المعايير الدولية لتدابير الصحة النباتية

مسودة بروتوكول تشخيص فيروس جدري الخوخ (Plum pox virus)

(201–)

مسودة وثيقة

المحتويات

1– معلومات حول الآفة 5
2– معلومات تصنيفية 6
3– الكشف وتحديد الهوية 6
3–1 الكشف بالطرق البيولوجية 8
3–2 الكشف وتحديد الهوية بالطرق المصلية 9
3–2–1 اختبار المتصات المناعية المرتبطة بالإنزيمات غير المباشرة لشطيرة ثنائي الأجسام المضادة 9
3–2–2 اختبار ممتصات المناعة المرتبطة بإنزيمات شطيرة ثنائي الأجسام المضادة 10
3–3 الكشف وتحديد والهوية بالطرق الجزيئية 11
3–3–1 النسخ العكسي تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل 11
3–3–2 النسخ العكسي للأسر المناعي – تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل 12
3–3–3 النسخ العكس التعاوني – تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل 13
3–3–4 تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل للنسخ العكسي في الوقت الحقيقي 14
4- تحديد هوية السلالات 17
4–1 التحديد المصلي لهوية السلالات 19
4–2 التحديد الجزيئي لهوية السلالات 19
4–2–1–تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل للنسخ العكسي 19
4–2–2 النسخ العكسي للأسر المناعي – تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل 20
4–2–3 النسخ العكسي التعاوني – تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل 20
4–2–4 تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل للنسخ العكسي في الوقت الحقيقي 21
5- السجلات 23
6– نقاط الاتصال للحصول على معلومات إضافية 24
7– الاعتراف والشكر 24
8– المراجع 25

[1] 1- معلومات حول الآفة

[2] الشاركا (جدري الخوخ) هو أحد أخطر أمراض فاكهة النواة. وهذا المرض الذي يسببه فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) يؤثر على النباتات المنتجة لجنس برونوس (*Prunus*). وهو يتسبب في إحداث أضرار كبيرة لفاكهة المشمش (*P. armeniaca*)، والبرقوق الأوروبي (*P. domestica*)، والبرقوق الياباني، والخوخ (*P. persica* و*P. salicina*) لأنه يقلل من الجودة ويتسبب في سقوط الثمرة قبل نضجها. وتشير التقديرات إلى أن تكاليف مكافحة الشاركا في جميع أنحاء العالم منذ سبعينات القرن الماضي تزيد على 10 000 مليون يورو.

[3] وتم الإبلاغ لأول مرة عن الإصابة بالشاركا في بلغاريا في الفترة 1917 –1918 وتم وصفه بأنه مرض فيروسي في عام 1932. وانتشر الفيروس منذ ذلك الحين بشكل مطَرد في أنحاء كبيرة من أوروبا وحول حوض البحر المتوسط والشرق الأدنى والأوسط. وظهر الفيروس بتوزيع محدود في أمريكا الجنوبية وأمريكا الشمالية وآسيا (منظمة وقاية النباتات في أوروبا والبحر المتوسط، 2006؛ والمركز الدولي للزراعة والعلوم البيولوجية، 2011).

[4] وفيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) هو أحد أفراد جنس *Potyvirus* في عائلة فيروسات *Potyviridae*. وجسيمات الفيروس عبارة عن عصيات مرنة تبلغ نحو 700 نانو متر x 11 نانو متر وهي مكونة من جزيء من الرنا الوحيدة الجديلة وتضم نحو 10 000 نيوكليوتيد يغطيها نحو 2000 وحدة فرعية من غطاء بروتيني وحيد (García and Cambra, 2007). وينتقل فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) في الحقول لفترة وجيزة عن طريق حشرة المنّ، ولكن حركة المواد النباتية المصابة المنتشرة تمثل الطريقة الرئيسية التي ينتشر بها الفيروس على مسافات بعيدة.

[5] ويمكن، حاليا، تصنيف عزلات فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) إلى سبعة أنواع أو سبع سلالات: D (Dideron)، M (Marcus)، C (Cherry)، EA (El Amar)، W (Winona) ومتحدة Rec (Recombinant)) وT (Turkish) (Candresse and Cambra, 2006; James and Glasa, 2006; Ulubaş Serçe *et al.*, 2009). وتنتمي معظم عزلات فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) للنوعين D وM. والسلالتين D وM لفيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) يمكن أن تصيبا بسهولة المشمش والبرقوق، ولكنهما تتباينان في قدرتهما على إصابة أنواع الخوخ. وتتباين السلالات من حيث القدرة الإمراضية؛ وعلى سبيل المثال فإن عزلات M تسبب عموما أوبئة أسرع وأعراضاً أشد مما تسببه عزلات D في *P. armeniaca* و*P. domestica* و*P. Persica* و*P. salicina*. أما عزلات EA فهي تقتصر جغرافياً على مصر ولا يتاح سوى القليل من المعلومات عن تأثيراتها الوبائية وخصائصها البيولوجية. وقد تم تحديد عدد من عزلات الفيروس التي تصيب نوعي الكرز الحمضي (*P. cerasus*) والكرز الحلو (*P. avium*) في العديد

من البلدان الأوروبية مؤخرا. وتشكِّل هذه العزلات نوعاً مميَّزاً وتم تعريفه بأنه PPV-C. وتم عزل نوع غير عادي من فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) من البرقوق الأوروبي (*P. domestica*) في كندا (PPV-W) وهو يمثِّل نوعاً مختلفاً من فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*). وإضافة إلى ذلك فإن الأنواع الناجمة عن الاتحاد الطبيعي بين النوعين D وM لفيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) تسمى PPV-Rec وتتسم بسلوك وبائي مماثل للنوع D. وأفادت التقارير بوجود نوع جديد من عزلات recombinant في تركيا (النوع T).

[6] ويمكن الحصول على معلومات إضافية عن فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*)، بما في ذلك الرسوم التوضيحية لأعراض المرض، من Barba *et al.* (2011) والمركز الدولي للزراعة والعلوم البيولوجية (2011)، ومنظمة وقاية النباتات في أوروبا والبحر المتوسط (2006) وGarcía and Cambra (2007) وPaDIL (2011).

[7] 2 – معلومات تصنيفية

الاسم: *فيروس جدري الخوخ (Plum pox virus)* (اختصاراً PPV)

المرادف: فيروس الشاركا

الوضع التصنيفي: Potyviridae، Potyvirus

الأسماء الشائعة: الشاركا، جدري الخوخ (البرقوق).

[8] 3 – الكشف وتحديد الهوية

[9] في الظروف الطبيعية، يصيب فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) بسهولة أشجار الفاكهة من جنس شجرة *Prunus* المستخدمة كأنواع تجارية أو فسائل جذرية: فأنواع المشمش، والبرقوق الأوروبي والياباني، والخوخ، والخوخ البري الصيني (*P. davidiana*)، وكريز المحلب (*P. mahaleb*)، وبرقوق ماريانا (*P. marianna*)، وبرقوق الميروبلان (*P. cerasifera*). وقد يصاب في بعض الأحيان الكرز الحامض والحلو، واللوز (*P. dulcis*). كما يصيب الفيروس الكثير من أنواع فاكهة *Prunus* البرية أو المستخدمة في الزينة من قبيل الكريز الكندي (*P. besseyi*)، وكرز الرمال الأرجواني الأوراق (*P. cistena*)، واللوز القزمي (*P. glandulosa*)، والإجاص (*P. insititia*)، وكرز الغار (*P. laurocerasus*)، والبرقوق البري الشائك (*P. spinosa*)، وكريز نانكينغ (*P. tomentosa*)، واللوز الزهري (*P. triloba*). وفي ظروف التجارب، يمكن نقل فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) ميكانيكياً إلى عدة أنوع من *Prunus spp* والعديد من النباتات العشبية (*Arabidopsis thaliana, Chenopodium foetidum, Nicotiana benthamiana, N. glutinosa, N. clevelandii* and *Pisum sativum*).

[10] وقد تظهر أعراض فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) على الأوراق، والخلفات، واللحاء، والتويجات، والثمار، والنواة. والمعتاد أن تظهر الأعراض بوضوح على الأوراق في بداية موسم النمو، وتشمل الأعراض ظهور لون أخضر فاتح خفيف؛ وظهور بقع أو خطوط أو حلقات مصفرة؛ وزوال لون العروق أو اصفرارها؛ أو حتى تشوه الأوراق. وبعض هذه الأعراض التي تظهر على الأوراق تشبه الأعراض التي تسببها فيروسات أخرى مثل فيروس التبرقش النطاقي على البرقوق الأمريكي (*American plum line pattern virus*). ومن أعراض النوع *Prunus cerasifera* cv. GF 31 ظهور تفلن بني بلون الصدأ وتشقق اللحاء. ويمكن أن تظهر أعراض الأزهار في التويجات (زوال اللون) في بعض أنواع الخوخ عندما تصاب بفيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) من سلالة PPV-M أو في بروزوبيس جلاندولوسا (*P. glandulosa*) المصابة بفيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) من سلالة PPV-D. وتظهر على الثمار المصابة بقع صفراء أو حلقات أو أشكال طولية ذات لون أصفر فاتح. وقد تتشوه الثمار أو تصبح غير منتظمة في شكلها وتتكون عليها مناطق بنية أو نخرية تحت الحلقات الباهتة. وبعض التشوهات التي تصيب الفاكهة وخاصة *P. armeniaca* و*P. domestica*، تشبه التشوهات الناجمة عن الإصابة بفيروس بقع الشحوب اليخضوري في أوراق التفاح. وقد يظهر على الثمار المصابة اسمرار داخلي وتصمُّغ لُب الثمرة وانخفاض جودتها. وفي الحالات الشديدة، تسقط الثمار المصابة قبل الأوان من الأشجار. ويظهر عموماً على ثمار الأنواع المبكرة النضج أعراض أوضح من الأعراض التي تظهر على الأنواع المتأخرة النضج. وتظهر على نواة ثمار *P. armeniaca* المريضة حلقات أو بقع باهتة نمطية. ولا يمكن تسويق الكحول أو المواد الروحية المنتجة من الثمار المصابة بسبب نكهتها غير المستساغة. وتطور المرض وكثافته يتوقفان بقوة على النبات المضيف والأحوال المتاخمة؛ ومثال ذلك أن الفيروس قد يبقى كامنا لعدة سنوات في المناخ البارد.

[11] يعرض المعيار 31: 2008 من المعايير الدولية لتدابير الصحة النباتية إرشادات عامة بشأن أخذ العينات (منهجيات أخذ العينات من الشحنات). ومن الأساس اختيار العينات الملائمة لاكتشاف جدري الخوخ. وينبغي، في أخذ العينات، مراعاة بيولوجية الفيروس والأحوال المناخية المحلية، وخاصة أحوال الطقس خلال موسم النمو. وإذا ظهرت الأعراض المعتادة، تُجمع الزهور أو الأوراق أو الثمار التي تظهر عليها الأعراض. وأما في النباتات التي بدون أعراض فينبغي أخذ العينات من الأغصان التي لا يقل عمرها عن سنة واحدة وبها أوراق ناضجة أو أوراق متسعة تماماً من وسط كل غصن من الأغصان الرئيسية (لا يمكن التعويل على الكشف في الخلفات التي يقل عمرها عن سنة). وينبغي جمع العينات من أربعة مواقع مختلفة على الأقل (أربعة فروع أو أربع أوراق على سبيل المثال) في كل نبات؛ وهذا حرج في أهميته نظرا للتوزيع غير المتساوي للفيروس. وينبغي تلافي جميع العينات في الأشهر التي تبلغ فيها درجات الحرارة أعلى معدلاتها. ومستوى التعويل على الاختبارات المجراة على عينات تم جمعها في الخريف يقل عن مستواه بالنسبة للعينات التي تم أخذها في باكورة الربيع. ويفضل جمع المادة النباتية من الأجزاء الداخلية لظلة الشجرة. وفي وقت الربيع، يمكن أخذ العينات من الأزهار أو الأغصان الصغيرة التي تنتشر فيها الأوراق تماماً أو التي تحمل الثمار. وفي وقت الصيف والخريف، يمكن استخدام الأوراق الناضجة وقشور الثمار الناضجة التي يتم

جمعها من الحقول أو أماكن التغليف لتحليلها. ويمكن تخزين الأزهار والأوراق والأغصان وقشور الفاكهة عند درجة حرارة 4 مئوية لمدة لا تزيد على 10 أيام قبل معالجتها. ويمكن تخزين الفاكهة لمدة شهر واحد عند درجة 4 مئوية قبل معالجتها. وفي الشتاء، يمكن اختيار البراعم المسبوتة أو أنسجة اللحاء من الجزء القاعدي للأغصان أو الخلفات أو الفروع أو المهاميز الكاملة.

[12] ويمكن كشف فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) باستخدام الاختبارات البيولوجية أو المصلية أو الجزيئية؛ ويقتضي تحديد هوية الفيروس اختبارا مصليا أو جزيئيا. والاختبار المصلي أو الجزيئي هو المقتضى الأدنى لكشف وتحديد هوية الفيروس (وذلك مثلاً أثناء التشخيص الروتيني لآفة منتشرة على نطاق واسع في بلد ما). وفي الحالات التي تشترط فيها المنظمة القطرية لوقاية النباتات الاطمئنان إلى مدى أبعد بالنسبة لتحديد هوية الفيروس (مثل كشف الفيروس في منطقة غير معروف أنه يتواجد فيها أو كشفه في شحنة صادرة عن بلد من المعلن أنها خالية من الفيروس) فإنه يجوز إجراء اختبارات إضافية. وينبغي، حيثما تم تحديد هوية الفيروس في المرة الأولى باستخدام طريقة جزيئية، أن تستخدم الاختبارات التالية — تقنيات مصلية والعكس بالعكس. كما يجوز إجراء اختبارات إضافية لتحديد سلالة الفيروس الموجود. وفي جميع الحالات، يجب أن تشمل الاختبارات ضوابط إيجابية وسلبية. وتبين الأقسام التالية التقنيات الموصى بها.

[13] يجوز في بعض الظروف (مثلا أثناء التشخيص الروتيني لآفة منتشرة على نطاق واسع في بلد ما) اختبار نباتات متعددة في الوقت نفسه باستخدام عينة مجمعة من عدد من النباتات. ويتوقف القرار الخاص باختبار نباتات فردية أو متعددة على مدى تركز الفيروس في النباتات ودرجة الاطمئنان التي تطلبها المنظمة القطرية لوقاية النباتات.

[14] وفي هذا البروتوكول التشخيصي، توصف الطرق (بما في ذلك الإشارة إلى الأسماء التجارية) عند نشرها حيث إنها تحدد المستوى الأصلي للحساسية أو التخصص و/أو التكرار المتحقق. واستخدام أسماء المواد الكيميائية في بروتوكولات التشخيص هذه لا يعني المصادقة عليها واستبعاد بعضها الآخر التي قد تكون مناسبة. ويمكن مواءمة الطرائق المخبرية المعروضة في البروتوكولات للمعايير الخاصة بمختبرات فردية، شريطة أن تكون مجازة تماماً.

[15] 1–3 الكشف بالطرق البيولوجية

[16] والنباتات الدالة الرئيسية المستخدمة لفهرسة الفيروس هي فسائل الصنف *P. cerasifera* cv. GF31 و*P. persica* cv. GF305، *P. persica* × *P. davidiana* cv. Nemaguard، أو *P. tomentosa*. ويتم الحصول على النباتات الدالة من البذور، حيث تزرع في خليط من التربة الجيدة الصرف ويتم الاحتفاظ بها في صوبة مقاومة للحشرات في درجة حرارة تتراوح بين 18 و25 درجة مئوية حتى تكبر بدرجة تكفي لطعمها (يصل ارتفاعها في العادة إلى 25 –30 سنتيمتراً ويتراوح قطرها بين 3 و4 مليمترات). ويمكن، كبديل،

تطعيم فسائل أخرى من فاكهة *Prunus* بطعم من النباتات الدالة. ويجب طعم النباتات الدالة باستخدام الطرق التقليدية مثل طعم البراعم (Desvignes, 1999)، باستخدام ما لا يقل عن أربع نسخ متكررة لكل نبات دال. ويتم الاحتفاظ بالنباتات الدالة المطعمة في نفس الظروف، ويتم تقليمها بعد ثلاثة أسابيع بحيث لا يزيد ارتفاعها عن بضعة سنتيمترات فوق الطعمة العلوية (Gentit, 2006). وينبغي معاينة النباتات المطعمة لمراقبة الأعراض لمدة 6 أسابيع على الأقل. ويلاحظ ظهور الأعراض، وبخاصة خطوط وأشكال صفراء، على النمو الجديد بعد 3–4 أسابيع، ويجب مقارنتها بالضوابط الإيجابية والصحية. ويمكن الاطلاع على صور للأعراض الناجمة عن الفيروس التي تظهر على النباتات الدالة Damsteegt *et al.* (1997; 2007) وGentit (2006).

[17] ولا توجد أي بيانات كمية منشورة عن تخصص التطعيم أو حساسيته أو موثوقيته. وتستخدم الطريقة على نطاق واسع في نُظم إصدار الشهادات وتعتبر طريقة حساسة للكشف. على أن هذه الطريقة ليست اختباراً سريعاً (يتطلب ظهور الأعراض عدة أسابيع بعد التطعيم)، ولا يمكن استخدامها إلا في اختبار أشجار التطعيم حيث تتطلب مرافق متخصصة من قبيل الصوب التي يتم فيها التحكم بدرجات الحرارة، وقد تختلط الأعراض المشاهدة مع أعراض العوامل القابلة للانتقال بواسطة التطعيم. فضلا عن ذلك، هناك سلالات لا تظهر عليها الأعراض ومن ثم لا يمكن كشفها على النباتات الدالة.

[18] 2–3 الكشف وتحديد الهوية بالطرق المصلية

[19] اختبارات المتصات المناعية المرتبطة بالإنزيمات مستصوبة بدرجة كبيرة في فحص عدد كبير من العينات.

[20] ولتجهيز العينة على سبيل المثال، يوزن 0.2 إلى 0.5 غرام تقريباً من المادة النباتية الطازجة وتقطع إلى أجزاء صغيرة وتوضع في أنبوب ملائم أو كيس بلاستيكي. وتتم مجانسة العينة بمعدل لدرء الاستخلاص يبلغ 4–10 ملليلترات (v/w 2:1) باستخدام جهاز كهربائي لمجانسة الأنسجة بوليترون (Kinematica) أو أي جهاز مشابه. ويمكن بدلاً من ذلك مجانسة العينة أو مدحاة يدوية، أو مطرقة، أو أداة أخرى مماثلة. ويتألف عامل درء الاستخلاص من محلول ملحي مدروء بالفوسفات pH 7.2–7.4 (PBS) يحتوي على 2 في المائة من بولي فينيل بيروليدون و0.2 في المائة من ديثيو كاربامات ثنائي إثيل الصوديوم (Cambra *et al.*, 1994)، أو عامل درء بديل يكون قد تم التحقق منه بالصورة الملائمة. وينبغي مجانسة المادة النباتية تماماً واستخدامها طازجة.

[21] 3–2–1 اختبار المتصات المناعية المرتبطة بالإنزيمات غير المباشرة لشطيرة ثنائي الأجسام المضادة

[22] *اختبار المتصات المناعية المرتبطة بالإنزيمات* غير المباشرة لشطيرة ثنائي الأجسام المضادة ELISA–(DASI)، الذي يسمى أيضاً شطيرة ثلاثي الأجسام المضادة ELISA–(TAS)، ينبغي إجراؤه وفقاً

لما جاء في Cambra *et al.* (1994) باستخدام جسم مضاد محدد أحادي الكلون مثل 5B-IVIA وفقاً للتعليمات المحدَّدة من الجهة الصانعة.

[23] ويعتبر 5B-IVIA في الوقت الراهن الجسم المضاد الأحادي الكلون الوحيد الذي أثبت أنه يكتشف جميع سلالات فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*)، ويحقق ذلك بدرجة كبيرة من الموثوقية والتخصص والحساسية (Cambra *et al.*, 2006a). وفي اختبار حلقي (DIAGPRO) أجراه 17 مختبراً باستخدام مجموعة من 10 عينات مصابة بفيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) (من سلالة PPV-D، PPV-M وPPV-D+M) وعينات سليمة) من فرنسا وأسبانيا، كانت طريقة DASI-ELISA باستخدام الجسم المضاد الأحادي الكلون 5B-IVIA دقيقة بنسبة 95 في المائة (عدد النتائج السلبية الصحيحة والنتائج الإيجابية الصحيحة المشخصة بالتقنية/عدد العينات المختبرة). وكانت هذه الدقة أكبر من الدقة التي تحققت سواء باستخدام تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل للنسخ العكسي لأسر المناعة (IC-RT-PCR) التي بلغت 82 في المائة، أو طريقة تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل للنسخ العكسي التعاوني (Co-RT-PCR) التي بلغت 94 في المائة (Cambra *et al.*, 2006b; Olmos *et al.*, 2007). وبلغت النتائج السلبية الصحيحة (عدد النتائج السلبية الصحيحة المشخَّصة بالتقنية/عدد النباتات السليمة) المحدَّدة من خلال DASI-ELISA باستخدام الجسم المضاد الأحادي الكلون 5B-IVIA ما نسبته 99 في المائة مقارنة بتفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل للنسخ العكسي في الوقت الحقيقي باستخدام الحمض النووي المنقي (89.2 في المائة) أو العينات المبقعة (98 في المائة) أو IC-RT-PCR للأسر المناعي (96.1 في المائة). كما أشار Capote *et al.* (2009) إلى وجود احتمال بنسبة 98.8 في المائة في أن تكون النتيجة الإيجابية المتحققة في الشتاء من خلال DASI-ELISA باستخدام الجسم المضاد الأحادي الكلون 5B-IVIA نتيجة صحيحة.

[24] 3-2-2 اختبار ممتصات المناعة المرتبطة بإنزيمات شطيرة ثنائي الأجسام المضادة

[25] ينفذ النظام التقليدي أو نظام بيوتين/ستريبتافيدين لشطيرة ثنائي الأجسام المضادة DAS-ELISA باستخدام الأطقم القائمة على الجسم المضاد المحدَّد الأحادي الكلون 5B-IVIA أو الأجسام المضادة المتعددة الكلون التي ثبت أنها تكتشف جميع سلالات فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) بدون تفاعلات تبادلية مع الفيروسات أو المواد النباتية الأخرى (Cambra et al., 2006a; Capote et al., 2009). وينبغي إجراء الاختبار وفقاً لتعليمات الجهة الصانعة.

[26] وفي حين أن الجسم المضاد الأحادي الكلون 5B-IVIA يكتشف بطريقة محدَّدة وحساسة وموثوقة جميع سلاسلات فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) فإن بعض الأجسام المضادة الأحادية الكلون ليست محددة وتتسم بحساسية محدودة (Cambra *et al.*, 1994; Cambra *et al.*, 2006a). ولذلك من المستصوب استخدام طرق إضافية في الحالات التي تكون الأجسام المضادة المتعددة الكلون قد استخدمت فيها للاختبار

وعندما تشترط المنظمة القطرية لوقاية النباتات ثقة إضافية في تحديد هوية فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*).

[27] 3–3 الكشف وتحديد الهوية بالطرق الجزيئية

[28] الطرق الجزيئية التي تستخدم تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل للنسخ العكسي قد تكون أكثر تكلفة و/أو تستغرق وقتاً أطول من التقنيات المصلية، وبخاصة في الاختبارات الواسعة النطاق. على أن الطرق الجزيئية، وبخاصة طريقة RT-PCR في الوقت الحقيقي، تُعد عموماً أكثر حساسية من التقنيات المصلية. كما أن استخدام RT-PCR في الوقت الحقيقي يساعد أيضاً على تلافي الحاجة إلى أي معالجة في مرحلة ما بعد التضخيم (مثل الارتحال الكهربائي للهلام) ولذلك فإنها أسرع واحتمالات الإصابة فيها بالتلوث أقل من طريقة PCR التقليدية.

[29] وباستثناء طريقة IC-RT-PCR (التي لا يلزم فيها عزل الرنا RNA)، فإن استخلاص الرنا ينبغي إجراؤه باستخدام البروتوكولات التي تم التحقق منها بشكل ملائم. وينبغي وضع العينات في أكياس بلاستيكية لتجنب التلوث المتبادل بينها خلال عملية الاستخلاص. وبدلاً عن ذلك، يمكن في طريقة RT-PCR في الوقت الحقيقي وضع المستخلصات النباتية المبقَّعة أو أجزاء النسيج المطبوع على ورق متشرب أو أغشية من النيلون وتحليلها باستخدام RT-PCR في الوقت الحقيقي (Olmos *et al.*, 2005; Osman and Rowhani, 2006; Capote *et al.*, 2009). ولا يوصى باستخدام العينات المبقعة أو الأنسجة المطبوعة في PCR التقليدية بسبب قلة حساسيتها مقارنة بطريقة RT-PCR في الوقت الحقيقي.

[30] وتحدد كل طريقة حجم العينة المستخلصة التي ينبغي استخدامها كوحدة معيارية. والحد الأدنى للتركز اللازم لكشف فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) يتباين، تبعا لحساسية الطريقة المستخدمة، على النحو التالي: طريقة RT-PCR يبلغ التركيز في وحدة الرنا المعيارية 100 fg في ملليلتر؛ طريقة Co-RT-PCR. يبلغ التركيز في الرنا المعيارية 1 fg في 1 ميلليلتر؛ وطريقة RT-PCR في الوقت الحقيقي، يبلغ التركيز في وحدة الرنا المعيارية 2 fg ميلليلتر.

[31] 3–3–1 النسخ العكسي– تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل (RT-PCR)

[32] بادئات RT-PCR المستخدمة في هذا الاختبار هي بادئات Wetzel *et al.* (1991)

P1 (5′-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3′)
P2 (5′-CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA-3′)

أو بادئات Levy، وHadidi (1994):

3′NCR sense (5′-GTA GTG GTC TCG GTA TCT ATC ATA-3′)
3′NCR antisense (5′-GTC TCT TGC ACA AGA ACT ATA ACC-3′)

[33] ويتكون خليط التفاعل البالغ 25 ميكرو لتر من: 1 ميكرو مولار من كل بادئة (P1/P2 أو الزوج البادئ 3′NCR)، و250 ميكرو مولار من dNTPs، ووحدة واحدة من إنزيم النسخ العكسي AMV، و0.5 من وحدات إنزيم بلمرة الدنا Taq، و2.5 ميكرو لتر 10× عامل درء إنزيم البلمرة Taq، و1.5 مللي مولار من كلوريد الماغنيزيوم $MgCl_2$، و0.3 في المائة من Triton X-100 ووحدة رنا معيارية من مستوى 5 ميكرو لتر. وأُجري التفاعل في جهاز تدوير حراري في الظروف التالية: 45 دقيقة عند درجة حرارة 42 درجة مئوية، ودقيقتان عند درجة حرارة 94 درجة مئوية، و40 دورة في 30 ثانية عند درجة حرارة 94 درجة مئوية، وفي 30 ثانية سواء عند درجة حرارة 60 درجة مئوية (البادئتان P1/P2) أو عند درجة حرارة 62 مئوية (البادئات 3′NCR)، ودقيقة واحدة عند درجة حرارة 72 درجة مئوية، ويعقب ذلك تمديد نهائي لمدة 10 دقائق عند درجة حرارة 72 درجة مئوية. وتُحلل نواتج PCR بواسطة الارتحال الكهربائي للهلام. وتولد البادئات P1/P2 و3′NCR 243 زوجا قاعدياً و220 أمبليكون على التوالي.

[34] وتم تقييم طريقة Wetzel *et al.* (1991) عن طريق اختبار عزلات فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) من مناطق البحر المتوسط (قبرص، ومصر، وفرنسا، واليونان، وأسبانيا، وتركيا). وتمكَّن الاختبار من اكتشاف 20 جزءاً من الرنا الفيروسي، أي ما يقابل 2000 جزيئاً فيروسياً (Wetzel *et al.*, 1991)، وتم تقييم طريقة Levy وHadidi (1994) باستخدام عزلات فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) من مصر، وفرنسا، وألمانيا، واليونان، والمجر، وإيطاليا، وأسبانيا، ورومانيا.

[35] **3–3–2 النسخ العكسي للأسر المناعي – تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل**

[36] ينبغي إجراء مرحلة الأسر المناعي وفقاً لما حدده Wetzel *et al.* (1992)، باستخدام نسخ النبات المستخلص مثلما في القسم 3–2 مع استعمال أنابيب أو أكياس بلاستيكية إفرادية لتجنب التلوث.

[37] ويتم تحضير محلول (1 ميكرو غرام مللي لتر$^{-1}$) من الأجسام المضادة المتعددة الكلون أو الجسم المضاد المحدد الأُحادي الكلون لفيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) (5B-IVIA) في الدارئ الكربوني 9.6 pH. ويضاف 100 ميكرو لتر من الأجسام المضادة المخفَّفة في أنابيب طرد مركزي دقيقة PCR وتحضن عند درجة 37 مئوية لمدة 3 ساعات. وتغسل الأنابيب مرتين باستخدام الماء الخالي من الريبونيكليس. وينقى 100 ميكرو لتر من المستخلص النباتي (انظر القسم 3–2) عن طريق الطرد المركزي (5 دقائق بمعدل 15 500 x غرام)، ويضاف الناتج إلى أنابيب PCR المغطاة. ويترك لمدة ساعتين على الثلج أو في درجة حرارة 37 مئوية. وتغسل الأنابيب ثلاث مرات باستخدام 150 ميكرو لترا من محلول التعقيم PBS-Tween. ويتم تحضير خليط تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل للنسخ العكسي كما هو مبيَّن في القسم 3–3–1 باستخدام بادئات Wetzel *et al.* (1992)، ويضاف مباشرة إلى أنابيب PCR المغطاة. ويتم إجراء التضخيم حسب ما هو مبيَّن في القسم 3–3–1.

[38] تتطلب طريقة IC-RT-PCR استخدام أجسام مضادة محددة، وإن كانت طرق التقييد المباشر قد تزيل هذا المتطلب. وتم التحقق من طريقة IC-RT-PCR باستخدام الجسم المضاد الأحادي الكلون 5B-IVIA في اختبار حلقي (DIAGPRO) كشف عن دقة بنسبة 82 في المائة في اكتشاف فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) (Cambra *et al.*, 2006c; Olmos *et al.*, 2007). وأشار Capote *et al.* (2009) إلى وجود احتمالات بنسبة 95.8 في المائة بأن تكون النتيجة الإيجابية التي تحققها طريقة IC-RT-PCR في الشتاء باستخدام الجسم المضاد الأحادي الكلون 5B-IVIA نتيجة إيجابية صحيحة.

[39] 3–3–3 النسخ العكسي التعاوني – تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل (Co-RT-PCR)

[40] بادئات RT-PCR المستخدمة في هذا الاختبار (Co-RT-PCR) هي بادئات Olmos *et al.* (2002):

البادئة الداخلية P1 (5′-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3′)
البادئة الداخلية P2 (5′-CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA-3′)
البادئة الخارجية P10 (5′-GAG AAA AGG ATG CTA ACA GGA-3′)
البادئة الخارجية P20 (5′-AAA GCA TAC ATG CCA AGG TA-3′)

[41] ويتكون خليط التفاعل المؤلف من 25 ميكرو لترا من الآتي: 0.1 ميكرو مولار من بادئات P1 وP2، و0.05 ميكرو مولار من بادئات P10 و P20، و400 ميكرو مولار dNTPs، ووحدتان من إنزيم النسخ العكسي AMV، ووحدة واحدة من إنزيم البلمرة Taq DNA، و2 ميكرو لتر 10 دارئ التفاعل، و3 مللي مولار كلوريد الماغنيزيوم $MgCl_2$ ، و5 في المائة من سلفوكسيد ثنائي المتيل (DMSO)، و0.3 في المائة من Triton X-100. و5 ميكرو لترات من وحدة الرنا المعيارية. ويتم إجراء تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل للنسخ العكسي في ظروف التدوير الحراري التالية: 45 دقيقة في درجة حرارة 42 مئوية، ودقيقتان في درجة حرارة 94 مئوية، و60 دورة لمدة 15 ثانية عند درجة حرارة 94 درجة مئوية، و15 ثانية عند درجة حرارة 50 درجة مئوية، و30 ثانية عند درجة حرارة 72 درجة مئوية ويعقبها تمديد نهائي لمدة 10 دقائق عند درجة حرارة 72 درجة مئوية حرارة الغرف.

[42] ويقترن تفاعل RT-PCR بكشف لوني للأمبليكونات باستخدام مسبار عام لفيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) يسمى digoxigenin 3′ ويشار إليه بالرمز (DIG-3) (5′-TCG TTT ATT TGG CTT GGA TGG AA-DIG-3′)، على النحو التالي. يتم تحويل الدنا المكمِّل (cDNA) المضخَّم عند درجة حرارة 95 درجة مئوية لمدة 5 دقائق ويوضع فوراً على الثلج. ويوضع 1 ميكرو لتر من العينة على غشاء من النايلون. ويجفف الغشاء في درجة حرارة الغرفة ويتم الربط التصالبي بالتعريض للأشعة فوق البنفسجية لمدة 4 دقائق بمعدل 254 نانو متر. ولإجراء التهجين الأوّلي، يوضع الغشاء في أنبوب تهجين عند درجة حرارة 60 درجة مئوية لمدة ساعة واحدة باستخدام دارئ تهجين قياسي. ويترك المحلول ويتم التهجين عن

طريق مزج المسبار 3′DIG باستخدام دارئ تهجين قياسي بتركيز نهائي مقداره 10 Pmol مللي لتر $^{-1}$، قبل وضعه في حاضنة لمدة ساعتين عند درجة حرارة 60 درجة مئوية. ويغسل الغشاء مرتين لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة الغرفة باستخدام 2 محلول غسل ومرتين لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة الغرفة باستخدام 0.5 محلول غسل. ويعادل الغشاء لمدة دقيقتين في دارئ الغسل قبل نقعه لمدة 30 دقيقة في محلول معوق معقم بمعدل (1 غرام من كاشف كيميائي معوق مذاب في 55 ملليلتر من دارئ من حمض الماليك) 1 في المائة. ويوضع الغشاء في حاضنة في درجة حرارة الغرفة مع الأجسام المضادة المترافقة لأنزيمات الفوسفاتيز القلوية المضادة للديغوكسيجينين بتركيز مقداره 1 إلى 000 5 (150 وحدة لكل لتر $^{-1}$) في محلول معوق بمعدل 1 في المائة (وزن/حجم) لمدة 30 دقيقة. ويغسل الغشاء مرتين لمدة 15 دقيقة بدارئ الغسيل، وتتم معادلته لمدة دقيقتين بدارئ الكشف (100 مللي مولار من كلوريدرات الميثان الأميني، 100 مللي مولار من كلوريد الصوديوم، وأس هيدروجيني معدله 9.5). ويتم تحضير محلول الطبقة التحتية عن طريق مزج 45 ميكرو لتر من محلول NBT (75 مللي غرام مللي لتر $^{-1}$ من ملح تترازوليوم النيتروجين الأزرق في 70 في المائة (حجم/حجم) من ثنائي متيل أميد النمل) و35 ميكرو لتر من محلول BCIP (50 مللي غرام مللي لتر $^{-1}$ من ملح توليدنيوم فسفات بروم خماسي – كلور رباعي – إندوليل ثلاثي في 100 في المائة من ثنائي متيل أميد النمل) في 10 مللي لتر من دارئ الكشف. وبعد وضعه في حاضنة لمدة ساعة مع الطبقة التحتية، يوقف التفاعل عن طريق الغسل بالماء.

[43] وهذه الطريقة تزيد في حساسيتها 100 مرة عن طريقة RT-PCR باستخدام اختبار Wetzel *et al.* (1991) (Olmos, Bertolini and Cambra, 2002). وتم التحقق من هذه الطريقة من خلال الاختبار الحلقي (DIAGPRO) وحققت دقة بنسبة 94 في المائة (Cambra *et al.*, 2006c; Olmos *et al.*, 2007).

[44] 3–3–4 تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل للنسخ العكسي (RT-PCR) في الوقت الحقيقي

[45] يمكن إجراء RT-PCR في الوقت الحقيقي باستخدام TaqMan، أو SYBR Green I. وتم وصف طريقتي TaqMan للكشف العام عن فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) (Schneider *et al.*, 2004; Olmos *et al.*, 2005). والبادئات ومسبار TaqMan المستخدمة في الاختبار الأول هي التي أشار إليها Schneider *et al.* (2004):

البادئة الأمامية (5′-CCA ATA AAG CCA TTG TTG GAT C-3′)

البادئة العكسية (5′-TGA ATT CCA TAC CTT GGC ATG T-3′)

مسبار TaqMan (5′-FAM-CTT CAG CCA CGT TAC TGA AAT GTG CCA-TAMRA-3′).

[46] ويتكون خليط التفاعل البالغ 25 ميكرو لتر من الآتي: 1 خليط تفاعل (0.2 مللي مولار من كل dNTP، و1.2 مللي مولار من كبريتات ماغنيزيوم ($MgSO_4$)، و200 نانو مولار من البادئات الأمامية والعكسية،

و100 نانو مولار من مسمبار TaqMan، 4.8 مللي مولار من كبريتات الماغنيزيوم $MgSO_4$، و0.5 ميكرو لتر من خليط RT/Platinum® Taq في الوقت الحقيقي (RT-PCR الخطوة الواحدة Superscript™ مع Platinum® Taq (طاقم Invitrogen)[1]). و5 ميكرولترات من قالب الرنا. ويتم إجراء RT-PCR في جهاز تدوير حراري في الظروف التالية: 15 دقيقة عند درجة حرارة 52 مئوية، و5 دقائق عند درجة حرارة 95 درجة مئوية، و60 دورة بمعدل 15 ثانية عند درجة حرارة 95 درجة مئوية، و30 ثانية عند درجة حرارة 60 درجة مئوية. وتحلل نواتج PCR في الوقت الحقيقي وفقاً لتعليمات الجهة الصانعة للمعدات.

[47] وتم تقييم طريقة Schneider *et al.* (2004) عن طريق اختبار عزلات فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) المأخوذة من الولايات المتحدة، وسلالات PPV-C، وPPV-D، وPPV-EA، وPPV-M، وثمانية أنواع فيروسية أخرى. وكانت هذه الطريقة محدَّدة وقادرة على أن تكتشف باستمرار 10–20 جزءاً من الرنا الفيروسي (Schneider *et al.* 2004) كما يمكن لهذه الطريقة أن تكتشف فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) في عدد من العوائل وفي أوراق وسيقان وبراعم وجذور الخوخ (*P. persica*).

[48] واستخدمت في الاختبار الثاني البادئات ومسبار TaqMan التي أشار إليها Olmos *et al.* (2005):

البادئة P241 (5′-CGT TTA TTT GGC TTG GAT GGA A-3′)

البادئة P316D (5′-GAT TAA CAT CAC CAG CGG TGT G-3′)

البادئة 316M (5′-GAT TCA CGT CAC CAG CGG TGT G-3′)

مسبار PPV-DM (5′-FAM-CGT CGG AAC ACA AGA AGA GGA CAC AGA-TAMRA-3′)

[49] ويتألف خليط التفاعل البالغ 25 ميكرولتر من الآتي: 1 ميكرو مولار من البادئة P241، 0.5 ميكرو مولار من كل من البادئتين P316D و P316M، و200 نانو مولار من مسبار TaqMan، و1 خليط TaqMan Universal PCR Master (النُظم Applied Biosystems)[2]، و1 خليط MultiScribe، ومثبط RNase (النُظم Applied Biosystems)[3] و5 ميكرو لتر من قالب الرنا. ويتم إجراء RT-PCR في جهاز تدوير حراري في الظروف التالية: 30 دقيقة عند درجة حرارة 48 درجة مئوية، و10 دقائق عند

[1] إن استخدام المنتجات التي تحمل العلامة التجارية Invitrogen في حالة RT-PCR الخطوة الواحدة وSuperscript™ مع مجموعة Platinum® Taq في بروتوكول التشخيص هذا لا ينطوي على أي إقرار لهذه المنتجات يؤدي إلى استبعاد المنتجات الأخرى التي قد تكون مناسبة أيضا. وهذه المعلومات مقدمة للتيسير على مستخدمي هذا البروتوكول ولا تشكل مصادقة من هيئة تدابير الصحة النباتية على المواد الكيماوية والكاشفات و/أو المعدات المذكورة. ويمكن استخدام المنتجات المعادلة إذا تم بيان أنها تؤدي إلى نفس النتائج.

[2] إن استخدام المنتجات التي تحمل العلامة التجارية Applied Biosystems في حالة الخليط TaqMan Universal PCR Master Mix والخليط MultiScribe وRNase Inhibitor Mix في بروتوكول التشخيص هذا لا ينطوي على أي إقرار لهذه المنتجات يؤدي إلى استبعاد المنتجات الأخرى التي قد تكون مناسبة أيضا. وهذه المعلومات مقدمة للتيسير على مستخدمي هذا البروتوكول ولا تشكل مصادقة من هيئة تدابير الصحة النباتية على المواد الكيماوية والكاشفات و/أو المعدات المذكورة. ويمكن استخدام المنتجات المعادلة إذا تم بيان أنها تؤدي إلى نفس النتائج.

[3] انظر الحاشية 2.

درجة حرارة 95 درجة مئوية، و40 دورة بمعدل 15 ثانية عند درجة حرارة 95 درجة مئوية، 60 ثانية عند 60 درجة مئوية، ويبرّد بسرعة إلى درجة حرارة الغرفة. وتحلل نواتج PCR في الوقت الحقيقي وفقاً لتعليمات الجهة الصانعة للمعدات.

[50] وتم تقييم طريقة Olmos *et al.* (2005) باستخدام ثلاث عزلات لكل من PPV-D، وPPV-M، وكانت أكثر حساسية من طريقة DASI-ELISA بمقدار 000 1 ضعف باستخدام الجسم المضاد الأحادي الكلون 5B-IVIA. وبلغت نسبة النتائج الإيجابية الصحيحة 97.5 في المائة (عدد النتائج الإيجابية الصحيحة المشخَّصة بالتقنية/عدد النباتات المصابة بفيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) المحدَّدة بشكل صحيح من خلال RT-PCR في الوقت الحقيقي باستخدام TaqMan (Olmos *et al.*, 2005) والحمض النووي المنقى مقارنة بطريقة RT-PCR في الوقت الحقيقي باستخدام العينات المبقعة (93.6 في المائة)، وطريقة RT-PCR للأسر المناعي (91.5 في المائة) أو طريقة DASI-ELISA باستخدام الجسم المضاد الأحادي الكلون 5B-IVIA (86.6 في المائة) (Capote *et al.*, 2009).

[51] وقد بين Varga، وJames (2005) طريقة باستخدام SYBR Green I للكشف المتزامن عن فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) وتحديد هوية السلالتين D وM:

P1 (5′-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3′)
PPV-U (5′-TGA AGG CAG CAG CAT TGA GA-3′)
PPV-FD (5′-TCA ACG ACA CCC GTA CGG GC-3′)
PPV-FM (5′-GGT GCA TCG AAA ACG GAA CG-3′)
PPV-RR (5′-CTC TTC TTG TGT TCC GAC GTT TC-3′).

[52] ويجوز إدراج بادئات الضوابط الداخلية التالية لكفالة إجراء الاختبار بشكل صحيح:

Nad5-F (5′-GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT-3′)
Nad5-R (5′-CTC CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA-3′).

[53] ويستخدم بروتوكول من خطوتين لإجراء طريقة RT-PCR. ويتألف تفاعل النسخ العكسي (RT) من الآتي: 2 ميكرو لتر من البادئة P1 10 ميكرو مولار، و2 ميكرو لتر من 10 البادئة Nad5-R 10 ميكرو مولار، و4 ميكرو غرامات من مجموع الرنا، و5 ميكرو لتر ماء. ويوضع في حاضنة عند درجة حرارة 72 درجة مئوية لمدة 5 دقائق، ويوضع على الثلج. ويضاف 4 ميكرو لتر من 5 دارئ السلالة الأولى (Invitrogen)[4]، و2 ميكرو لتر من ثنائي التيوتريتول 0.1 مولار، و1 ميكرو لتر dNTPs 10 مللي مولار،

[4] إن استخدام المنتجات التي تحمل العلامة التجارية Invitrogen لدارئ السلالة الأول وRNaseOUTTM وSuperscript™ II وإنزيم البلمرة العالي الدقة Platinum® Taq DNA في بروتوكول التشخيص هذا لا ينطوي على أي إقرار لهذه المنتجات يؤدي إلى استبعاد المنتجات الأخرى التي قد تكون مناسبة أيضا. وهذه المعلومات مقدمة للتيسير على مستخدمي هذا البروتوكول ولا تشكل مصادقة من هيئة تدابير الصحة النباتية على المواد الكيماوية والكاشفات و/أو المعدات المذكورة. ويمكن استخدام المنتجات المعادلة إذا تم بيان أنها تؤدي إلى نفس النتائج.

و0.5 ميكرو لتر من RNaseOUT™ (40 وحدة ميكرو لتر $^{-1}$) (Invitrogen)[5]، و1 ميكرو لتر Superscript™ II (Invitrogen)[6]، و2.5 ميكرو لتر ماء. ويوضع في حاضنة عند درجة حرارة 42 درجة مئوية لمدة 60 دقيقة ثم عند درجة حرارة 99 درجة مئوية لمدة خمس دقائق. ويتكون خليط تفاعل PCR البالغ 24 ميكرو لترا على النحو التالي: 400 نانو مولار من البادئة PPV-U، و350 نانو مولار من البادئة PPV-FM، و150 نانو مولار من البادئة PPV-FD، و200 نانو مولار من البادئة PPV-RR، و100 نانو مولار من البادئة Nad5-F، و100 نانو مولار من البادئة Nad5-R، و200 ميكرو مولار dNTPs، و2 مللي مولار من كلوريد الماغنيزيوم $MgCl_2$، و1 دارئ كرزاي (Karsai *et al.*, 2002)، و1 إلى 42 000 SYBR Green I (Sigma)[7] و0.1 ميكرو لتر من إنزيم البلمرة العالي الدقة لحمض DNA (Platinum® Taq) (Invitrogen). ويضاف خليط التفاعل و1 ميكرو لتر من cDNA المخفف (1:4) إلى أنبوب الطرد المركزي (PCR) الدقيق المعقَّم أو ما يعادله. ويتم إجراء PCR في جهاز تدوير حراري في الظروف التالية: 2 دقيقة عند درجة حرارة 95 مئوية، و39 دورة بمعدل 15 ثانية عند درجة 95 درجة مئوية، و60 ثانية عند درجة حرارة 60 درجة مئوية، ثم يبرّد سريعاً إلى درجة حرارة الغرفة. ويتم إجراء تحليل منحنى الذوبان من خلال الوضع في حاضنة عند درجة حرارة 60 درجة مئوية إلى 95 درجة مئوية عند 0.1 درجة مئوية ثانية$^{-1}$ على أن يكون متوسط المنحنى المهَّد نقطة واحدة. وفيما يلي درجات حرارة الذوبان لكل ناتج:

الكشف العام عن فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) (جزء من 74 زوجاً قاعديا): 80.08–81.52 درجة مئوية.
سلالات D (جزء من 114 من الأزواج القاعدية): 84.3 درجة مئوية– 84.43 درجة مئوية
سلالات M (جزء من 380 من الأزواج القاعدية): 85.34 درجة مئوية–86.11 درجة مئوية
الضبط الداخلي (جزء من 181 من الأزواج القاعدية): 82.45 درجة مئوية–82.63 درجة مئوية.

[54] وتم تقييم طريقة Varga وJames (2005) باستخدام عزلات سلالة PPV-C، وPPV-D، وPPV-EA، وPPV-M، وسلالة غير معروفة، في النوعين نيكوتيانيا (*Nicotiana*) وبرونوس (*Prunus*).

[55] **4 – تحديد هوية السلالات**

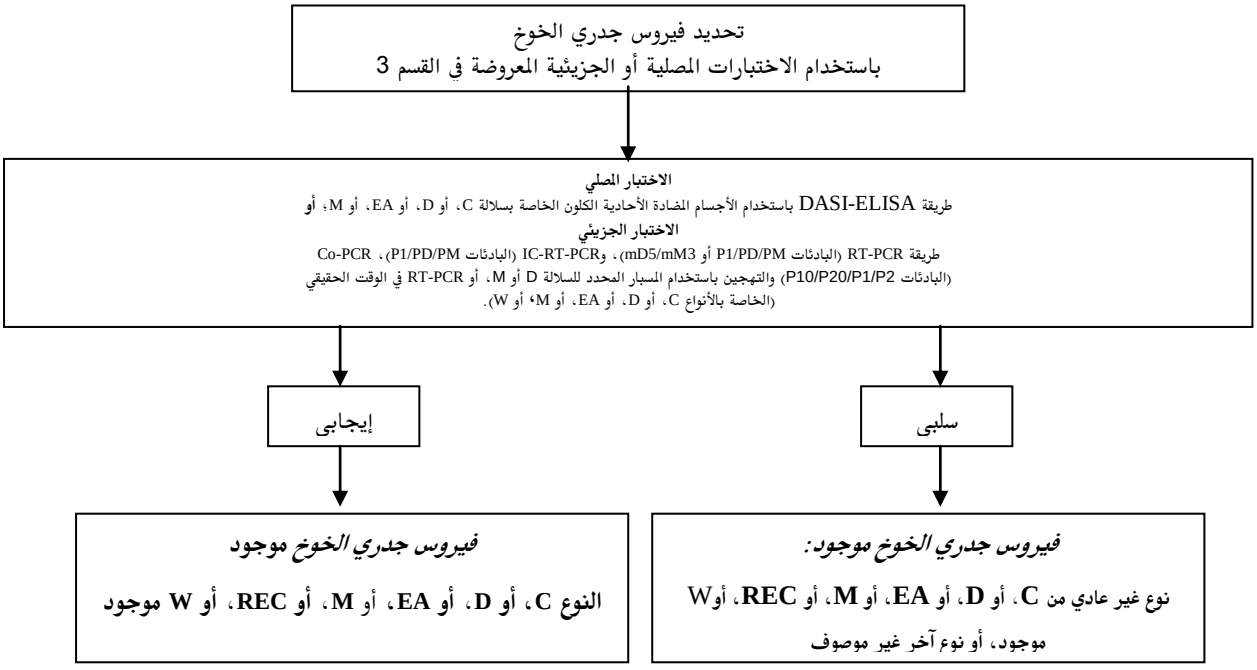
[5] انظر الحاشية 4.

[6] انظر الحاشية 4.

[7] إن استخدام المنتجات التي تحمل العلامة التجارية Sigma في حالة SYBR Green I في بروتوكول التشخيص هذا لا ينطوي على أي إقرار لهذه المنتجات يؤدي إلى استبعاد المنتجات الأخرى التي قد تكون مناسبة أيضا. وهذه المعلومات مقدمة للتيسير على مستخدمي هذا البروتوكول ولا تشكل مصادقة من هيئة تدابير الصحة النباتية على المواد الكيماوية والكاشفات و/أو المعدات المذكورة. ويمكن استخدام المنتجات المعادلة إذا تم بيان أنها تؤدي إلى نفس النتائج.

[56] يبين هذا القسم الطرق الإضافية (التي تستخدم DASI-ELISA، وRT-PCR، وCo-RT-PCR في الوقت الحقيقي) لتحديد هوية سلالات فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) (انظر الشكل 1). ولا يعتبر تحديد نوع السلالة عنصرا أساسيا لتحديد هوية فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*)، ولكن المنظمة القطرية لوقاية النباتات قد ترغب في تحديد هوية السلالة وذلك مثلاً للمساعدة على التنبؤ بسلوكها الوبائي.

[57] وبالنظر إلى تقلُّب فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) فإن الطرق الأخرى بخلاف تحديد التتابع أو بعض الاختبارات القائمة على PCR (انظر أدناه) قد تسفر عن نتائج خاطئة في نسبة ضئيلة من العزلات. على أنه يمكن عموماً التمييز بين النوعين D وM لفيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) باستخدام التقنيات المصلية أو الجزيئية المبيَّنة أدناه (Candresse and Cambra, 2006; Cambra *et al.*, 2006a; Capote *et al.*, 2006).



[58] **الشكل 1: طرق تحديد هوية سلالات *فيروس جدري الخوخ* (*Plum pox virus*)**

[59] ويمكن إجراء اختبارات أخرى في الحالات التي تشترط فيها المنظمة القطرية لوقاية النباتات ثقة إضافية في تحديد هوية نوع فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*). كما ينبغي تتبع السلسلة الجينومية الكاملة لفيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) والسلسلة الكاملة أو الجزيئية للغطاء البروتيني، والمنطقة الجينية P3-6K1، والجينات البروتينية للمشتملات الهيولية عند وجود أنواع غير عادية أو غير موصوفة.

[60] 4–1 التحديد المصلي لهوية السلالات

[61] ينبغي إجراء طريقة DASI-ELISA للتمييز بين النوعين الرئيسيين لفيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) (D، وM) وفقاً لما حدده Cambra *et al*. (1994) باستخدام الأجسام المضادة الأحادية الكلون الخاصة بالسلالتين D، وM (Cambra *et al*., 1994; Boscia *et al*., 1997) وفقاً لتعليمات الجهة الصانعة.

[62] وتم التحقق من هذه الطريقة في الاختبار الحلقي (DIAGPRO) حيث تبين أنها دقيقة بنسبة 84 في المائة في اكتشاف PPV-D، و89 في المائة في اكتشاف PPV-M (Cambra *et al*., 2006b; Olmos *et al*., 2007). وأما الجسم المضاد الأحادي الكلون 4D فهو يخص السلالة PPV-D ولكنه لا يتفاعل مع جميع عزلات PPV-D. وبالإضافة إلى ذلك فإن الجسم المضاد الأحادي الكلون AL المستخدم في كشف السلالة PPV-M يتفاعل مع العزلات التي تنتمي إلى السلالتين M، وRec وT بالنظر إلى أن هذه المجموعات تشترك في نفس تتابع الغطاء البروتيني. ولذلك يلزم إجراء اختبار جزيئي للتمييز بين السلالات M وRec وT المكتشفة باستخدام جسم مضاد أحادي الكلون خاص بالسلالة M.

[63] ويجوز إجراء الكشف المصلي عن هوية عزلات فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) من المجموعتين EA، وC عن طريق DASI-ELISA باستخدام الأجسام المضادة الأحادية الكلون الخاصة بالسلالتين EA و/أو C التي بينها Myrta *et al*. (1998, 2000). غير أنه لم يتم اعتماد تلك الاختبارات.

[64] 4–2 التحديد الجزيئي لهوية السلالات

[65] 4–2–1 تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل للنسخ العكسي (RT-PCR)

[66] تحدَّد السلالتان PPV-D وPPV-M باستخدام البادئات التي بينها Olmos *et al*. (1997):

P1 (5′-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3′)
PD (5′-CTT CAA CGA CAC CCG TAC GG-3′) or PM (5′-CTT CAA CAA CGC CTG TGC GT -3′).

[67] ويتكون خليط التفاعل البالغ 25 ميكرو لتر من الآتي: 1 ميكرو مولار من البادئة P1، و1 ميكرو مولار من البادئة PD أو البادئة PM، و250 ميكرو مولار dNTPs، ووحدة واحدة من إنزيم النسخ العكسي AMV (10 وحدات ميكرو لتر $^{-1}$)، و0.5 وحدة من إنزيم بلمرة الدنا Taq (5 وحدات ميكرو لتر $^{-1}$)، و2.5 ميكرو لتر 10 دارئ إنزيم البلمرة Taq، و1.5 مللي مولار كلوريد الماغنيزيوم $MgCl_2$، و0.3 في المائة Triton X-100 و2 في المائة فورماميد و5 في المائة ميكرو لترات من وحدة الرنا المعيارية. ويتم إجراء طريقة RT-PCR في

جهاز تدوير حراري في الظروف التالية: 45 دقيقة عند درجة حرارة 42 درجة مئوية، ودقيقتان عند درجة حرارة 94 درجة مئوية، و40 دورة بمعدل 30 ثانية عند درجة حرارة 94 درجة مئوية، و30 ثانية عند درجة حرارة 60 درجة مئوية، ودقيقة واحدة عند درجة حرارة 72 درجة مئوية، ويعقب ذلك تمديد نهائي لمدة 10 دقائق عند درجة حرارة 72 درجة مئوية. وتحلل نواتج PCR عن طريق الارتحال الكهربائي للهلام. وتنتج البادئات P1/PD، وP1/PM امبليكون من 198 زوجاً قاعديا. وتم تقييم الطريقة باستخدام 6 عزلات من السلالة PPV-D، و4 عزلات من السلالة PPV-M.

[68] وتحدَّد السلالة PPV-REC باستخدام البادئات mD5/mM3 الخاصة بالسلالة Rec التي بينها Šubr *et al.* (2004):

mD5 (5′-TAT GTC ACA TAA AGG CGT TCT C-3′)
mM3 (5′-CAT TTC CAT AAA CTC CAA AAG AC-3′).

[69] ويتكون خليط التفاعل البالغ 25 ميكرو لتر من الآتي (نقلاً عن Šubr *et al.*, 2004): 1 ميكرو مولار من كل بادئة، و250 ميكرو مولار dNTPs، ووحدة واحدة من إنزيم النسخ العكسي AMV (10 وحدات ميكرو لتر $^{-1}$)، و0.5 وحدة من إنزيم بلمرة الدنا Taq (5 وحدات ميكرو لتر $^{-1}$)، و2.5 ميكرو لتر 10 دارئ إنزيم البلمرة Taq، 2.5 ملليمتر من كلوريد الماغنيزيوم $MgCl_2$ و0.3 في المائة Triton X-100، و5 ميكرو لتر من الرنا المستخلص (انظر القسم 3.3). ويحلل ناتج PCR البالغ 605 زوجا قاعديا من خلال الترحال الكهربائي للهلام.

[70] 4–2–2 النسخ العكسي للأسر المناعي – تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل

[71] ينبغي إجراء مرحلة الأسر المناعي كما هو مبيَّن في القسم 3–2. ويضاف خليط تفاعل PCR مباشرة إلى أنابيب PCR المركزي المغطاة. ويتم تحديد هوية سلالة PPV-D والكشف عن PPV-M حسب ما هو مبيَّن في القسم 4–2–1.

[72] 4–2–3 النسخ العكسي التعاوني – تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل

[73] ينبغي إجراء عملية تحديد هوية PPV-D أو PPV-M كما هو مبين في القسم 3–3–3 باستخدام المسبار 3′DIG الخاص بالسلالتين D، وM (Olmos, Bertolini and Cambra, 2002):

المسبار الخاص بالسلالة PPV-D: 5′-CTT CAA CGA CAC CCG TAC GGG CA- DIG -3′
المسبار الخاص بالسلالة PPV-M: 5′-AAC GCC TGT GCG TGC ACG T- DIG -3′

[74] ويتم إجراء خطوات التهجين الأوّلي والتهجين النهائي عند درجة حرارة 50 درجة مئوية باستخدام مواد الدرء القياسية للتهجين الأوَّلي والتهجين النهائي + 30 في المائة من الفورماميد (لتحديد هوية PPV-D) و+ 50 في المائة من الفورماميد (لتحديد هوية PPV-M). ويستخدم المحلول المعوق عند 2 في المائة (وزن/حجم).

[75] **4–2–4 تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل للنسخ العكسي في الوقت الحقيقي**

[76] يتم التعرف تحديداً على السلالة PPV-D وPPV-M باستخدام كيمياء SYBR Green I وفقاً لطريقة Varga، وJames (2005) (انظر القسم 3–3–4) أو طريقة TaqMan التي وصفها Capote *et al*. (2006).

[77] وفيما يلي البادئات ومسابير TaqMan المستخدمة في طريقة Capote *et al*. (2006)

البادئة PPV-MGB-F (5′-CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA-3′)

البادئة PPV-MGB-R (5′-CTC AAT GCT GCT GCC TTC AT-3′)

مسبار MGB-D (5′- FAM-TTC AAC GAC ACC CGT A-MGB-3′)

مسبار MGB-M (5′-FAM-TTC AAC AAC GCC TGT G-MGB-3′)

[78] ويتكون خليط التفاعل البالغ 25 ميكرو لتر من الآتي: 1 ميكرو مولار من كل بادئة، و150 نانو مولار من مسبار MGB-D، أو مسبار MGB-M FAM، و1 خليط TaqMan Universal PCR Master (النُظم Applied Biosystems)[8]، و1 خليط مثبط MultiScribe، وRNase (النُظم Applied Biosystems)[9]. ويضاف خليط التفاعل و5 ميكرو لتر من قالب الرنا المعيارية (القسم 3–3)، ويتم إجراء RT-PCR في جهاز تدوير حراري في الظروف التالية: 30 دقيقة عند درجة حرارة 48 درجة مئوية، و10 دقائق عند درجة حرارة 95 درجة مئوية، و40 دورة بمعدل 15 ثانية عند درجة حرارة 95 درجة مئوية، و60 ثانية عند درجة حرارة 60 درجة مئوية. وتحلل نواتج PCR في الوقت الحقيقي وفقاً لتعليمات الجهة الصانعة. وتم تقييم هذه الطريقة باستخدام 12 عزلة لكل من PPV-D وPPV-M، و14 عيِّنة مصابة بكلا النوعين.

[8] إن استخدام المنتجات التي تحمل العلامة التجارية Applied Biosystems في حالة TaqMan Universal PCR Master Mix وMultiScribe وRNase Inhibitor Mix في بروتوكول التشخيص هذا لا ينطوي على أي إقرار لهذه المنتجات يؤدي إلى استبعاد المنتجات الأخرى التي قد تكون مناسبة أيضا. وهذه المعلومات مقدمة للتيسير على مستخدمي هذا البروتوكول ولا تشكل مصادقة من هيئة تدابير الصحة النباتية على المواد الكيماوية والكاشفات و/أو المعدات المذكورة. ويمكن استخدام المنتجات المعادلة إذا تم بيان أنها تؤدي إلى نفس النتائج.

[9] انظر الحاشية 8.

[79] وتحدَّد هوية PPV-C، وPPV-EA، وPPV-W خصيصاً باستخدام كيمياء SYBR Green I وفقاً لطريقة Varga، وJames (2006). والبادئات المستخدمة في هذه الطريقة هي:

P1 (5′-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3′)
PPV-U (5′-TGA AGG CAG CAG CAT TGA GA-3′)
PPV-RR (5′-CTC TTC TTG TGT TCC GAC GTT TC-3′).

[80] ويجوز إدراج بادئات الضبط الداخلي التالية لكفالة إجراء الاختبار بطريقة صحيحة:

Nad5-F (5′-GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT-3′)
Nad5-R (5′-CTC CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA-3′).

[81] ويتكون تفاعل RT-PCR البالغ 25 ميكرو لتر على النحو التالي: 2.5 ميكرو لتر من محلول مائي مخفف من الرنا المستخلصة بنسبة 1 إلى 10 (انظر القسم 3–3) و22.5 ميكرو لتر من الخليط الرئيسي. ويتكون الخليط الرئيسي من الآتي: 2.5 ميكرو لتر من دارئ كارزاي (Karsai *et al.*, 2002)؛ و0.5 ميكرو لتر لكل من 5 ميكرو مولار من البادئات PPV-U، أو PPV-RR، أو P1، وNad5R وNad5F ؛ و0.5 ميكرو لتر 10 dNTPs مللي مولار، و1 ميكرو لتر من كلوريد الماغنيزيوم $MgCl_2$ 50 مللي مولار؛ و0.2 ميكرو لتر من RNaseOUT™ (40 وحدة ميكرولتر$^{-1}$ (Invitrogen)[10]؛ و0.1 ميكرو لتر من Superscript™ III (200 وحدة ميكرو لتر$^{-1}$، Invitrogen)[11]؛ و0.1 ميكرو لتر من إنزيم بلمرة الدنا Platinum® Taq العالي الدقة (5 وحدات ميكرولتر$^{-1}$، Invitrogen)؛[12] و1 ميكرو لتر من 1 : 5 000 (في TE, pH 7.5) SYBR Green I (Sigma)[13] في 16.1 ميكرو لتر ماء. ويتم إجراء التفاعل في جهاز تدوير حراري في الظروف التالية: 10 دقائق عند درجة حرارة 50 درجة مئوية، ودقيقتان عند درجة حرارة 95 درجة مئوية، 29 دورة بمعدل 15 ثانية عند درجة حرارة 95 درجة مئوية، و60 ثانية عند درجة حرارة 60 درجة مئوية. ويتم إجراء تحليل منحنى الذوبان عن طريق الوضع في حاضنة عند درجة حرارة 60 درجة مئوية حتى 95 درجة مئوية عند 0.1 درجة مئوية في ثانية$^{-1}$ وفقا للأوضاع التي حددها Varga وJames (2006).

[10] إن استخدام المنتجات التي تحمل العلامة التجارية Invitrogen في حالة RNaseOUT™ وSuperscript™ II وإنزيم البلمرة العالي الدقة Platinum® Taq DNA في بروتوكول التشخيص هذا لا ينطوي على أي إقرار لهذه المنتجات يؤدي إلى استبعاد المنتجات الأخرى التي قد تكون مناسبة أيضا. وهذه المعلومات مقدمة للتيسير على مستخدمي هذا البروتوكول ولا تشكل مصادقة من هيئة تدابير الصحة النباتية على المواد الكيماوية والكاشفات و/أو المعدات المذكورة. ويمكن استخدام المنتجات المعادلة إذا تم بيان أنها تؤدي إلى نفس النتائج.

[11] انظر الحاشية 10.

[12] انظر الحاشية 10.

[13] إن استخدام المنتجات التي تحمل العلامة التجارية Sigma في حالة SYBR Green I في بروتوكول التشخيص هذا لا ينطوي على أي إقرار لهذه المنتجات يؤدي إلى استبعاد المنتجات الأخرى التي قد تكون مناسبة أيضا. وهذه المعلومات مقدمة للتيسير على مستخدمي هذا البروتوكول ولا تشكل مصادقة من هيئة تدابير الصحة النباتية على المواد الكيماوية والكاشفات و/أو المعدات المذكورة. ويمكن استخدام المنتجات المعادلة إذا تم بيان أنها تؤدي إلى نفس النتائج.

السلالة C (جزء من 74 زوجاً قاعدياً): 79.84 درجة مئوية
السلالة EA (جزء من 74 زوجاً قاعدياً): 81.27 درجة مئوية
السلالة W (جزء من 74 زوجاً قاعدياً): 80.68 درجة مئوية.

[82] وتم تقييم هذه الطريقة باستخدام عزلة لكل من PPV-C، وPPV-D، وPPV-EA، وPPV-W.

[83] 5 – السجلات

[84] السجلات المطلوب الاحتفاظ بها محدَّدة في القسم 2–5 من المعيار رقم 27: 2006 من المعايير الدولية لتدابير الصحة النباتية (ISPM).

[85] وفي الحالات التي قد تتأثر فيها أطراف متعاقدة أخرى بنتائج التشخيص، وبخاصة في حالة عدم الامتثال وفي حالة ظهور الفيروس في منطقة للمرة الأولى، ينبغي الاحتفاظ بالمواد الإضافية التالية:

- ينبغي الاحتفاظ بالعينة الأصلية (بعد وضع العلامة الملائمة عليها لسهولة تعقبها) مجمَّدة عند درجة حرارة 80 درجة مئوية تحت الصفر أو تبرّد تبريداً جافاً وتحفظ في درجة حرارة الغرفة.
- ينبغي، عند الاقتضاء، الاحتفاظ بمستخلصات الرنا عند درجة حرارة 80 درجة مئوية تحت الصفر، و/أو ينبغي الاحتفاظ بالمستخلصات النباتية المبقعة أو أجزاء الأنسجة المطبوعة على أغشية في درجة حرارة الغرفة.
- ينبغي، عند الاقتضاء، الاحتفاظ بنواتج تضخيم RT-PCR عند درجة حرارة 80 مئوية تحت الصفر.

[86] 6 – نقاط الاتصال للحصول على معلومات إضافية

APHIS PPQ PHP RIPPS, Molecular Diagnostic Laboratory, BARC Building 580, Powder Mill Road, Beltsville, Maryland 20705, United States of America (Dr. Laurene Levy, e-mail: Laurene.Levy@aphis.usda.gov; Tel.: +1 3015045700; Fax: +1 3015046124).

Equipe de Virologie Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Centre de Bordeaux, UMR GD2P, IBVM, BP 81, F-33883 Villenave d'Ornon Cedex, France (Dr. Thierry Candresse, e-mail: tc@bordeaux.inra.fr; Tel.: +33 557122389; Fax: +33 557122384).

Faculty of Horticultural Science, Department of Plant Pathology, Corvinus University, Villányi út 29-43, H-1118 Budapest, Hungary (Dr. Laszlo Palkovics, e-mail: laszlo.palkovics@uni-corvinus.hu; Tel.: +36 14825438; Fax: +36 14825023).

Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská, 84505 Bratislava, Slovakia (Dr. Miroslav Glasa, e-mail: virumig@savba.sk; Tel.: +421 259302447; Fax: +421 254774284).

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Plant Protection and Biotechnology Centre, Carretera Moncada-Náquera km 5, 46113 Moncada (Valencia), Spain (Dr. Mariano Cambra, e-mail: mcambra@ivia.es; Tel.: +34 963424000; Fax: +34 963424001).

Istituto di Virologia Vegetale del CNR, sezione di Bari, via Amendola 165/A, I-70126 Bari, Italy (Dr. Donato Boscia, e-mail: d.boscia@ba.ivv.cnr.it; Tel.: +39 0805443067; Fax: +39 0805442911).

Sidney Laboratory, Canadian Food Inspection Agency (CFIA), British Columbia, V8L 1H3 Sidney, Canada (Dr. Delano James, e-mail: Delano.James@inspection.gc.ca; Tel.: +1 250 3636650; Fax: +1 250 3636661).

Virology Laboratory, Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes (CTIFL), BP 21 Lanxade, F-24130 La Force, France (Dr. Pascal Gentit, e-mail: gentit@ctifl.fr; Tel.: +33 553580005; Fax: +33 553 581742).

[87] 7 – الاعتراف والشكر

[88] كتب المسودة الأولى لهذا البروتوكول التشخيصي Drs. M. Cambra, A. Olmos and N. Capote, IVIA (انظر القسم السابق)، Mr. N.L. Africander, Department of Agriculture, Forestry and Fisheries, Private Bag X 5015, Stellenbosch, 75999, South Africa; Dr. L. Levy (انظر القسم السابق)، Dr. S.L. Lenardon, IFFIVE-INTA, Cno. 60 Cuadras Km 51/2, Córdoba X5020ICA, Argentina; Dr. G. Clover, Plant Health & Environment Laboratory, Ministry of Agriculture and Forestry, PO Box 2095, Auckland 1140, New Zealand; and Ms. D. Wright, Plant Health Group, Central Science Laboratory, Sand Hutton, York YO41 1LZ, United Kingdom.

8 – المراجع [89]

Barba, M., Hadidi. A., Candresse. T. & Cambra, M. 2011. *Plum pox virus*. *In*: A. Hadidi, M. Barba, T. Candresse & W. Jelkmann, eds. *Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits*, Chapter 36. St. Paul, MN, APS Press. 428 pp.

Boscia, D., Zeramdini, H., Cambra, M., Potere, O., Gorris, M.T., Myrta, A., DiTerlizzi, B. & Savino, V. 1997. Production and characterization of a monoclonal antibody specific to the M serotype of plum pox potyvirus. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 477–480.

CABI. 2011. Crop Protection Compendium. http://www.cabi.org/cpc/, accessed 26 October 2011.

Cambra, M., Asensio, M., Gorris, M.T., Pérez, E., Camarasa, E., García, J.A., Moya, J.J., López-Abella, D., Vela, C. & Sanz, A. 1994. Detection of plum pox potyvirus using monoclonal antibodies to structural and non-structural proteins. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 24: 569–577.

Cambra, M., Boscia, D., Myrta, A., Palkovics, L., Navrátil, M., Barba, M., Gorris, M.T. & Capote, N. 2006a. Detection and characterization of *Plum pox virus*: serological methods. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 36: 254–261.

Cambra, M., Capote, N., Myrta, A. & Llácer, G. 2006b. *Plum pox virus* and the estimated costs associated with sharka disease. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 36: 202–204.

Cambra, M., Capote, N., Olmos, A., Bertolini, E., Gorris, M.T., Africander, N.L., Levy, L., Lenardon, S.L., Clover, G. & Wright, D. 2006c. Proposal for a new international protocol for detection and identification of *Plum pox virus*. Validation of the techniques. *Acta Horticulturae*, 781: 181–191.

Candresse, T. & Cambra, M. 2006. Causal agent of sharka disease: historical perspective and current status of *Plum pox virus* strains. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 36: 239–246.

Capote, N., Bertolini, E., Olmos, A., Vidal, E., Martínez, M.C. & Cambra, M. 2009. Direct sample preparation methods for detection of *Plum pox virus* by real-time RT-PCR. *International Microbiology*, 12: 1–6.

Capote, N., Gorris, M.T., Martínez, M.C., Asensio, M., Olmos, A. & Cambra, M. 2006. Interference between D and M types of *Plum pox virus* in Japanese plum assessed by specific monoclonal antibodies and quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 96: 320–325.

Damsteegt, V.D., Scorza, R., Stone, A.L., Schneider, W.L., Webb, K., Demuth, M. & Gildow, F.E. 2007. *Prunus* host range of *Plum pox virus* (PPV) in the United States by aphid and graft inoculation. *Plant Disease*, 91: 18–23.

Damsteegt, V.D., Waterworth, H.E., Mink, G.I., Howell, W.E. & Levy, L. 1997. *Prunus tomentosa* as a diagnostic host for detection of *Plum pox virus* and other *Prunus* viruses. *Plant Disease*, 81: 329–332.

Desvignes, J.C. 1999. *Virus diseases of fruit trees*. Paris, CTIFL, Centr'imprint. 202 pp.

EPPO. 2004. Diagnostic protocol for regulated pests: *Plum pox potyvirus*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 34: 247–256.

EPPO. 2006. Current status of *Plum pox virus* and sharka disease worldwide. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 36: 205–218.

García, J.A. & Cambra, M. 2007. *Plum pox virus* and sharka disease. *Plant Viruses*, 1: 69–79.

Gentit, P. 2006. Detection of *Plum pox virus*: biological methods. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 36: 251–253.

المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية 27. 2006. *بروتوكولات تشخيص الآفات الخاضعة للوائح*، روما، الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات، منظمة الأغذية والزراعة.

المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية 31. 2008. *منهجيات أخذ العينات من الشحنات*، روما، الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات، منظمة الأغذية والزراعة.

James, D. & Glasa, M. 2006. Causal agent of sharka disease: New and emerging events associated with *Plum pox virus* characterization. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 36: 247–250.

Karsai, A., Müller, S., Platz, S. & Hauser, M.T. 2002. Evaluation of a homemade SYBR Green I reaction mixture for real-time PCR quantification of gene expression. *Biotechniques*, 32: 790–796.

Levy, L. & Hadidi, A. 1994. A simple and rapid method for processing tissue infected with plum pox potyvirus for use with specific 3′ non-coding region RT-PCR assays. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 24: 595–604.

Myrta, A., Potere, O., Boscia, D., Candresse, T., Cambra, M. & Savino, V. 1998. Production of a monoclonal antibody specific to the El Amar strain of plum pox virus. *Acta Virologica*, 42: 248–250.

Myrta, A., Potere, O., Crescenzi, A., Nuzzaci, M. & Boscia, D. 2000. Production of two monoclonal antibodies specific to cherry strain of plum pox virus (PPV-C). *Journal of Plant Pathology*, 82 (suppl. 2): 95–103.

Olmos, A., Bertolini, E. & Cambra, M. 2002. Simultaneous and co-operational amplification (Co-PCR): a new concept for detection of plant viruses. *Journal of Virological Methods*, 106: 51–59.

Olmos, A., Bertolini, E., Gil, M. & Cambra, M. 2005. Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted *Plum pox virus* RNA targets in single aphids. *Journal of Virological Methods*, 128: 151–155.

Olmos, A., Cambra, M., Dasi, M.A., Candresse, T., Esteban, O., Gorris, M.T. & Asensio, M. 1997. Simultaneous detection and typing of plum pox potyvirus (PPV) isolates by heminested-PCR and PCR-ELISA. *Journal of Virological Methods*, 68: 127–137.

Olmos, A., Capote, N., Bertolini, E. & Cambra, M. 2007. Molecular diagnostic methods for plant viruses. *In*: Z.K. Punja, S. DeBoer and H. Sanfacon, eds. *Biotechnology and plant disease management*, pp. 227–249. Wallingford, UK and Cambridge, USA, CAB International. 574 pp.

Osman, F. & Rowhani, A. 2006. Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). *Journal of Virological Methods*, 133: 130–136.

PaDIL. 2011. http://old.padil.gov.au/pbt/, accessed 26 October 2011.

Schneider, W.L., Sherman, D.J., Stone, A.L., Damsteegt, V.D. & Frederick, R.D. 2004. Specific detection and quantification of *Plum pox virus* by real-time fluorescent reverse transcription-PCR. *Journal of Virological Methods*, 120: 97–105.

Šubr, Z., Pittnerova, S. & Glasa, M. 2004. A simplified RT-PCR-based detection of recombinant *Plum pox virus* isolates. *Acta Virologica*, 48: 173–176.

Ulubaş Serçe, Ç., Candresse, T., Svanella-Dumas, L., Krizbai, L., Gazel, M. & Çağlayan, K. 2009. Further characterization of a new recombinant group of *Plum pox virus* isolates, PPV-T, found in the Ankara province of Turkey. *Virus Research*, 142: 121–126.

Varga, A. & James, D. 2005. Detection and differentiation of *Plum pox virus* using real-time multiplex PCR with SYBR Green and melting curve analysis: a rapid method for strain typing. *Journal of Virological Methods*, 123: 213–220.

Varga, A. & James, D. 2006. Real-time RT-PCR and SYBR Green I melting curve analysis for the identification of *Plum pox virus* strains C, EA, and W: Effect of amplicon size, melt rate, and dye translocation. *Journal of Virological Methods*, 132: 146–153.

Wetzel, T., Candresse, T., Macquaire, G., Ravelonandro, M. & Dunez, J. 1992. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods*, 39: 27–37.

Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M. & Dunez, J. 1991. A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods*, 33: 355–365.