

المعيار الدولي رقم 27

الملحق 7



المعايير الدولية لتدابير الصحة النباتية

المعيار الدولي 27: بروتوكولات تشخيص

بروتوكول التشخيص: 7

فيروود درنة البطاطا المغزلية

Potato spindle tuber viroid

(2015)

المحتويات

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

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

1- معلومات عن الآفة

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

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

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

وفي *Solanum tuberosum*، الوسيلة الرئيسية لانتشار فيروس دنة البطاطا المغزلية هو التكاثر النباتي. كما أنه ينتشر أيضاً عن طريق الاتصال وأساساً عن طريق الآلات في الحقول وقطع بذور درنات البطاطا (Hammond & Owens, 2006). وهو ينتقل في بذور البطاطا الحقيقية - قد يكون ما يصل إلى 100 في المائة من البذور مصاباً (Fernow وآخرون، 1970؛ Singh، 1970)، وأمريكا الوسطى (Badilla وآخرون 1999)، وأمريكا الجنوبية ومنطقة الشرق الأوسط (Singh، 1992). وقد أفاد Bokx و De Pirone (1981) أن هناك معدل انتقال منخفض عن طريق *Macrosiphum euphorbiae* ولكن ليس عن طريق الفصيلة *Myzus persicae* أو *Aulacorthum solani* - ومع ذلك تفيد تقارير عن استحواذ تجربي للفيروس وانتقاله عن طريق *M. persicae* من نباتات مصابة بكل من الفيروس وفيروس التفاف أوراق البطاطا (PLRV) (Salazar وآخرون، 1995؛ Singh & Kurz، 1997). وتبين لاحقاً أن

الفيروود مغلف بتنافر ضمن جزيئات فيروس التفاف أوراق البطاطا (PLRV Querci وآخرون، 1997)، وتلك ظاهرة قد تكون لها آثار هامة على انتشار الفيروود في الظروف الحقلية.

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

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

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

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

2- المعلومات التصنيفية

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

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

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

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

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

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

ويرد في هذا البروتوكول التشخيصي وصف للطرق (بما في ذلك الإشارة إلى الأسماء التجارية) كما هي منشورة، إذ أن هذه حددت المستوى الأصلي للحساسية والخصوصية و/أو قابلية التكرار. ولا يعني استخدام أسماء الكواشف الكيميائية أو الأجهزة في بروتوكولات التشخيص المصادقة عليها ضمناً ولا استبعاد البعض الآخر الذي قد يكون مناسباً أيضاً. ويمكن تعديل الإجراءات المخبرية الواردة في البروتوكولات لتتوافق مع معايير المختبرات المفردة، شريطة أن يتم التحقق من صحتها بشكل كاف. وتوفر منظمة حماية النباتات في أوروبا ومنطقة البحر الأبيض المتوسط (EPPO 2014) توصيات بشأن التحقق من الطرق في التقنيات التشخيصية للنبات phytodiagnosics.

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

1-3 أخذ العينات

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

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

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

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

أوراق المحاصيل الأخرى وأنواع نباتات الزينة - تستخدم أوراق صغيرة العمر ممتدة تماماً. ويمكن استكثارها معاً للاختبار؛ ويعتمد معدل الاستكثار على طريقة الاختبار المستخدم وينبغي التحقق من صحته. وتجدر ملاحظة أن تركيز الفيروم يتأثر بعمر/نضج النباتات، وهناك في كثير من الأحيان تقلبات موسمية. وبالإضافة إلى ذلك، يحتوي بعض الأنواع على كيماويات حيوية قد تحول دون انتقال الفيروم إلى نباتات الاختبار (مثل صنف *Brugmansia spp*) أو دون تفاعل البلمرة التسلسلي باستخدام إنزيم النسخ العكسي (RT-PCR) (مثل صنف *Calibrachoa spp*) وصنف *Solanum jasminoides* وصنف *S. jamesonii*.

البذور- قد يختلف تركيز الفيروود اختلافاً كبيراً بين البذور وقد يختلف مستوى الإصابة من أقل من 1 في المائة إلى 100 في المائة. وهذا يجعل من الصعب جداً التوصية بحجم عينة ومعدل استكثار معينين (EUPHRESKO, 2010). وبالنسبة لسنف *S. lycopersicum*، استخدمت معدلات استكثار من 100 – 1000 لاختبار منفرد. ويعتمد معدل الاستكثار على طريقة الاختبار المستخدم وينبغي التحقق من صحته. ويمكن أن تزرع بذور البطاطا في وسط إنماء (كالسماذ العضوي) في صوان وتختبر الشتلات/النباتات بطريقة غير مدمرة باستخدام الإجراء ذاته الموصوف للنباتات التي تنمو في دفيئات زجاجية (EPPO, 2006).

2-3 الكشف البيولوجي

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

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

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

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

3-3 الكشف الجزيئي

1-3-3 إعداد العينات

ميكروبلانتس ومواد أوراق وجذور- استخدمت بنجاح أجران ومدقات أو خلطات (مثل Homex 6 (Bioreba)) بأكياس استخراج (Bioreba) لطحن المواد. وقد تُيسر التجانس إضافة كمية صغيرة من المياه أو من محلول دارئ (تعتمد تركيبته على الطريقة المستخدمة في استخراج الحمض النووي) أو تجميد العينة (مثلاً، في نيتروجين سائل).

وقد تم التحقق من صحة الإجراء التالي (أنظر الجدول 1) بالتضافر مع استخراج الحمض النووي باستخدام الطريقة 2 للاستخراج الخريزي المغناطيسي وفحص GenPospi ب RT-PCR في الوقت الحقيقي الموصوف في هذا الملحق. وتجري مجانسة حوالي 1 غرام من الأنسجة في كيس استخراج باستخدام خلط Homex 6 (Bioreba) مع 3.5 ملليغرام (بتراوح 1:2-1:5 (وزن/حجم)) GH زائد محلول دارئ (6 ميليمولار غوانيديين هيدروكلوريد؛ و0.2 ميليمولار أسيتات الصوديوم؛ على درجة حموضة 5.2؛ و25 ميليمولار إيثيل ثنائي أمين حمض الخليك الرباعي (EDTA)؛ و2.5 في المائة (بولي فينيل البيروليدون-10)، وبعد ذلك تحضن العينات لمدة 10 دقائق على 65 درجة مئوية ب 850 دورة في الدقيقة في تيرموميكس (خلط حراري) (أو بالهز (ويقلب الأنبوب ثلاث مرات) وبترد مركزي إضافي لمدة دقيقتين بقوة 16 000 غرام قبل استخراج الحمض النووي.

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

البذور- للأعداد الصغيرة من البذور (أقل من 100)، يمكن استخدام آلة Lyser Tissue (مثلاً، Retsch (Qiagen) (TissueLyser)). وللأعداد الأكبر من البذور، يمكن استخدام خلط مجداف (مثل MiniMix (Interscience)) أو خلط (مثل Homex 6) بكمية دنيا من محلول دارئ (تعتمد تركيبته على الطريقة المستخدمة لاستخراج الحمض النووي). ويمكن أيضاً سحق البذور بمطرقة (Bertolini وآخرون، (2014b)) أو باستخدام جرن ومدقة. وقد لا تكون الطريقة الأخيرة عملية للاستخدام الروتيني، إذ أن من الصعب ضبط التلوث. بدلاً من ذلك، يمكن استخدام النيتروجين السائل لتجميد العينة، لتطحن بعد ذلك في مطحنة خليوية (يمكن استخدام هذه الطريقة لأنواع الأنسجة الأخرى).

لقد تم التحقق من صحة الإجراء التالي (أنظر الجدول 1) بالتضافر مع استخراج الحمض النووي باستخدام الطريقة 2 للاستخراج الخريزي المغناطيسي وفحص RT-PCR في الوقت الحقيقي لـ Boonham وآخرون (2014) الوارد في هذا الملحق. وتنقع كل عينة من العينات الفرعية الثلاث المكونة من 1 000 بذرة في 20 ملليغرام من GH زائد محلول دارئ في 100 ملليغرام (Interscience) BagPage لمدة 30-60 دقيقة على درجة حرارة الغرفة، وتجانس لمدة 90

ثانية باستخدام BagMixer (Interscience) وتحضن (أو تهز أو تُفصل بالطرد المركزي كما للميكروبلانتس و مواد الورق والجذور) قبل استخراج الحمض النووي.

دمغ الأنسجة و/أو هرسها- تضغط عنيقات الورق أو البراعم المنفصلة على أغشية نايلون. ويمكن عمل عدة دمغات أو مسحوقات متداخلة جزئياً من أوراق و/أو براعم منفصلة مختلفة على حوالي 0.5 سم² من غشاء نايلون وفقاً لـ (Bertolini وآخريين (2008، 2014a)، ويُقَصَّ الغشاء المحتوي على العينة المثبتة ويدخل في أنبوب صغير. وتنبغي مناولة العينة المثبتة بملاقط نظيفة. ويمكن خزن عينات الأنسجة المدموغة على درجة حرارة الغرفة في بيئة جافة ومعتمة لمدة ثلاثة أشهر على الأقل. ولاستخراج الحمض النووي الريبسي من الغشاء، يضاف 100 ميكرو لتر من دارئ الجليكاين لكل أنبوب صغير يحتوي على عينة ثابتة تدور بعد ذلك وتوضع على جليد حتى تضخيم تفاعل البلمرة التسلسلي (PCR).

3-3-2 استخراج الحمض النووي

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

وقد استخدمت هذه الطريقة لمجموعة واسعة من أنواع النباتات وكذلك لدرنات البطاطا وبذور البندورة. واستخدمت مع فحصين من فحوصات RT-PCR في الوقت الحقيقي موصوفين في هذا الملحق (أنظر القسمين 3-3-3-4 و3-3-4-2). ويمكن في طريقة الاستخراج الخرزى المغناطيسي 1 توقع عتبات أعلى بعدة دورات مما في طرق الاستخراج الأخرى الموصوفة في هذا الملحق، لكن زيادة الإنتاجية من العينات التي يمكن تحقيقها بهذه الطريقة يجعلها طريقة استخراج قيمة (Roehorst وآخرون 2005).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

EU273604² وبادئات Pospi1 أكثر حساسية من بادئات Vid في الكشف عن فيروس درنة البطاطا المغزلية.

البادئات

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

ظروف التفاعل

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

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

الارتحال الكهربائي الهلامي

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

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

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

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

البيانات

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

المسبارات

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

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

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

يتألف مزيج التفاعل من 12.5 ميكرو لتر من 2 × مزيج TaqMan RT-PCR، و 0.6 ميكرو لتر من 1 × مزيج أنزيم TaqMan RT، و 0.75 ميكرو لتر (10 ميكرو مولار) من البادئات الأمامية (TCR-F 1-1, TCR-F 1-3, TCR-F 1-4, TCR-F IrVd, TCR-F PCFVd and nad5-F) والبادئات العكسية (TR-R1, TR-R CEVd, TR-R6 and nad5-R) (تركيز نهائي 0.3 ميكرو مولار لكل منها)، و 0.25 ميكرو لتر من 10 ميكرو مولار من مسبار TaqMan nad5-R (تركيز نهائي 0.1 ميكرو مولار) و 0.5 ميكرو لتر من 10 ميكرو مولار من مسبار TaqMan nad5-P (تركيز نهائي 0.2 ميكرو مولار). يضاف ماء صالح للفحص الجزيئي و 2 ميكرو لتر من مزيج معايرة الحمض النووي الريبسي RNA للتوصل إلى حجم نهائي يبلغ 25 ميكرو لتر.

مزيج التفاعل 2 (nad5 + CLVd)

يتألف مزيج التفاعل من 12.5 ميكرو لتر من 2 × مزيج TaqMan RT-PCR و 0.6 ميكرو لتر من 1 × مزيج أنزيم TaqMan RT، و 0.75 ميكرو لتر (10 ميكرو مولار) من البادئة الأمامية (CLVd-F و nad5-F) و بادئات عكسية (CLVd-R و nad5-R) (تركيز نهائي 0.3 ميكرو مولار لكل منها)، و 0.25 ميكرو لتر من 10 ميكرو مولار من مسبار CLVd-P TaqMan (تركيز نهائي 0.1 ميكرو مولار) و 0.5 ميكرو لتر من 10 ميكرو مولار من مسبار nad5-P TaqMan (تركيز نهائي 0.2 ميكرو مولار). يضاف ماء صالح للفحص الجزيئي و 2 ميكرو لتر من مزيج معايرة الحمض النووي الريبسي RNA للتوصل إلى حجم نهائي يبلغ 25 ميكرو لتر.

برنامج التدوير الحراري لكل من مزيجي التفاعل هو: 48 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة، و 95 درجة مئوية لمدة 10 دقائق، تليها 40 دورة من (95 درجة مئوية لمدة 15 ثانية و 60 درجة مئوية لمدة 1 دقيقة).

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

3-3-4 طرق جزيئية ذات خصوصية عالية للكشف عن فيروس درنه البطاطا المغزلية**3-3-4-1 تقنية RT-PCR التقليدية باستخدام بادئات Shamloul وآخرين، (1997)**

بادئات RT-PCR المستخدمة في هذا الفحص هي بادئات Shamloul وآخرين، (1997)، التي يصفها أيضاً Buchta و Weidemann (1998). وستكتشف البادئات MPVd و PSTVd و CDVd و TPMVd. وقد أظهرت دراسات بالمحاكاة أن خلاصات فيروس درنه البطاطا المغزلية التالية قد لا تكتشف بسبب عدم تطابق البادئة - التسلسل في نقاط حرجة: AY372394 و DQ308555 و EF459698 للبادئة العكسية. وإذا لم يضحض الحمض النووي الريبسي باستخدام هذه البادئات، يمكن استخدام بادئات Vid.

البادئات

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

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

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

لكل تفاعل، يضاف 1 ميكرو لتر من مزيج معايرة الحمض النووي الريبسي إلى 24 ميكرو لتر من المزيج الرئيسي المكون من 1.0 ميكرو لتر من كل من البادئات الأمامية والعكسية (15 ميكرو متر)، و 12.5 ميكرو لتر من 2 X رادئ تفاعل، و 0.5 ميكرو لتر من RT/Platinum Taq و 7.6 ميكرو لتر ماء. ويكون برنامج التدوير الحراري على النحو التالي: 43 درجة مئوية لمدة 30 دقيقة؛ 95 درجة مئوية لمدة 2 دقيقة؛ وبعد ذلك 10 دورات من 94 درجة مئوية لمدة 30 ثانية، 64 درجة مئوية لمدة 90 ثانية و 72 درجة مئوية لمدة 45 ثانية؛ وخطوة تمديد نهائية من 72 درجة مئوية لمدة 10 دقائق و 20 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة.

الطريقة 2 (RT-PCR من خطوتين)

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

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

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

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

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

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

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

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

البادئات

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ترد بيانات التحقق في الجدول 1.

البادئات

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

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

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

يحتوي كوكتيل تفاعل البلمرة التسلسلي بادئات مجففة بالتبريد ومسباراً (مزودة في طقم الأدوات) يمكن أن يضاف إليها أي مزيج RT-PCR رئيسي تجاري. ولكل تفاعل، يضاف مزيج معايرة حمض نووي ريبسي من 3 ميكرو لتر إلى 9 ميكرو لتر من كوكتيل تفاعل البلمرة التسلسلي المكون من 6 ميكرو لتر تجاري 2 × دارئ، و 0.6 من كل من بادئة

أمامية وعكسية (10 ميكرومولار) و0.36 ميكرو لتر مسبار TaqMan (5 ميكرومولار) و0.5 ميكرو لتر من $25 \times$ مزيج إنزيم RT-PCR و0.94 ميكرو لتر ماء لعمل حجم تفاعل نهائي من 12 ميكرو لتر.

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

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

3-4 ضوابط للاختبارات الجزيئية

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

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

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

لقد ثبت أن شظية خماسي نازع الهيدروجين NADH لميتوكوندرية nad5 مؤشر موثوق لأداء إجراء الاستخراج لخطوة النسخ العكسي لتفاعل البلمرة التسلسلي التقليدي (Menzel وآخرون، 2002). وقد اختبر مقابل العديد من الأنواع النباتية، بما في ذلك *S. tuberosum* وأنواع *Solanum* الأخرى (*S. dulcamara*، *S. bonariensis*، *S. jasminoides*، *S. nigrum*، *S. pseudocapsicum*، *S. rantonnetii*، *S. silybifolium*) و *Acnistus* *arborescens* *S. belladonna* و *Brugmansia spp.* و *Capsicum spp.* و *Cestrum spp.* و *Lochroma* و *Nicotiana spp.* و *Nicotiana spp.* و *Physalis spp.* (Seigner وآخرون، 2008). وتشمل بادئات *nad5* إنترنول ولذا فإنها لن تضخم من الحمض النووي. ويضخم الحمض النووي الريبي بعد إزالة الإنترنول.

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

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

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

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

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

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

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

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

3-5-1 تفاعل البلمرة التسلسلي التقليدي

لا يعتبر تفاعل البلمرة التسلسلي الخاص بالفيروود صالحاً إلا:

- عندما ينتج ضابط الحمض النووي الإيجابي الحجم الصحيح للفيروود.
- عندما لا ينتج أي أمبليكون من الحجم الصحيح في ضبط الاستخراج السلبي وضبط التضخيم السلبي.

وفي حال استخدمت بادئات الضوابط الداخلية COX و/أو *nad5* أيضا، فإنه ينبغي عندئذ أن ينتج الضابط السلبي (أي النسيج النباتي السليم) (في حال استخدامه) وضابط الحمض النووي الإيجابي، وكل عينة من عينات الاختبار شريطةً يبلغ 181 زوجاً قاعدياً. ويشير عجز العينات عن تحقيق تضخيم مع بادئات الضوابط الداخلية، مثلاً، إلى أن استخراج الحمض النووي قد فشل أو أن الحمض النووي لم يدرج في مزيج التفاعل، أو أن خطوة النسخ العكسي قد فشلت، أو أن هناك مركبات مثبطة لتفاعل البلمرة التسلسلي في خلاصة الحمض النووي أو أن الحمض النووي قد فسد.

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

3-5-2 تفاعل البلمرة التسلسلي في الوقت الحقيقي

لا يعتبر تفاعل البلمرة التسلسلي صالحاً إلا:

- عندما ينتج ضابط الحمض النووي الإيجابي منحنى تضخيم مع البادئات الخاصة بالفيروود.
- عندما لا يشاهد أي منحنى تضخيم (أي عندما تكون قيمة Ct 40 أو أي قيمة أخرى يحددها المختبر بعد التحقق منها) مع ضابط الاستخراج السلبي وضابط التضخيم السلبي.

وفي حال استخدمت بادئات الضوابط الداخلية COX و *nad5* أيضا، فإنه ينبغي عندئذ أن ينتج الضابط السلبي (في حال استخدامه) وضابط الحمض النووي الإيجابي وكل عينة من عينات الاختبار منحنى تضخيم. ويشير عجز العينات عن إنتاج منحنى تضخيم مع بادئات الضوابط الداخلية، مثلاً، أن استخراج الحمض النووي قد فشل أو أن الحمض النووي لم يدرج في مزيج التفاعل أو أن هناك مركبات مثبطة لتفاعل البلمرة التسلسلي في الحمض النووي المستخرج أو أن الحمض النووي قد فسد.

وتعتبر العينة إيجابية إذا أنتجت منحنى تضخيم نموذجياً. وترد معلومات محددة عن قيمة Ct الفاصلة لطريقتين في القسمين 3-3-3 و 4-3-3-3.

4- تحديد الهوية

ينبغي تحديد فيروود درنة البطاطا المغزلية عن طريق سلسلة المنتج الذي يحصل عليه من تفاعل البلمرة التسلسلي بالنسخ العكسي التقليدي باستخدام بادئات Shamloul أو Vid الموصفة في القسمين 3-3-3-1 و 3-3-3-3 على التوالي، وعن طريق البحث عن تطابق التسلسل في قواعد بيانات التسلسل الجيني العامة. وقد تتعين الاستعانة بمتخصصين للمساعدة على تحديد الهوية. إذا ضخم منتج تفاعل البلمرة التسلسلي تضخيماً ضعيفاً أو كانت العينة مصابة بأكثر فيروود واحد من نوع *pospiviroid*، فإن استنساخ منتج تفاعل البلمرة التسلسلي قد يكون فعالاً في تمكين الحصول على تسلسل معين.

وينبغي أن يعاد اختبار عينة إيجابية كشف عنها بواسطة تفاعل البلمرة التسلسلي بالنسخ العكسي في الوقت الحقيقي، إذا لزم الأمر للتأكيد، باستخدام تفاعل البلمرة التسلسلي بالنسخ العكسي التقليدي لتمكين تسلسل المنتج وتحديد هويته. وسيعطي تسلسل منتج تفاعل البلمرة التسلسلي في الوقت الحقيقي مباشرة معلومات عن التسلسل لا تتيح

تحديداً يمكن الركون إليه. فهو سيُتيح تحديد المنتج كفيروود، ولكنه لن يتيح تحديد الأنواع أو التمييز عن الضابط الإيجابي المستخدم. ومع ذلك، وبسبب تزايد حساسية تفاعل البلمرة التسلسلي بالنسخ العكسي في الوقت الحقيقي، قد لا يمكن الحصول على منتج بتفاعل البلمرة التسلسلي بالنسخ العكسي التقليدي. وفي حالة استكثار العينات، فإن إعادة اختبار عينات فرعية أصغر قد يزيد من موثوقية التضخيم بواسطة تفاعل البلمرة التسلسلي بالنسخ العكسي التقليدي. وبدلاً من ذلك، يمكن تلقيح العينات في نباتات بندورة لزيادة تركيز الفيروود إلى مستويات يمكن الكشف عنها بتفاعل البلمرة التسلسلي بالنسخ العكسي التقليدي. لكن هذا النهج لم يقيّم، وإذا كانت النتائج غير حاسمة قد يتطلب ذلك إعادة أخذ العينات وتكرار الاختبار.

1-4 التسلسل وتحليل التسلسل

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

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

ويقتضي الأمر مواءمة متأنية للـ pospiviroids عندما يمكن أن تكون اختلافات قليلة في بضعة نيوكليوتايدات حاسمة في تحديد الفيروود كافة مسيطر عليها أو غير مسيطر عليها. ولإجراء تحديد أولي لفيروود درنة البطاطا المغزلية، يمكن الإبقاء على تسلسلات البادئات (Shamloul أو Vid) في تسلسل توافقي لأن هذه البادئات تقع في أكثر المناطق المصانة في جينوم الفيروود ومن غير المحتمل أن تؤثر في تحديد الهوية. وإذا ما شوهدت متديلات-أ بناها البوليميريز أثناء التمدد تنبغي إزالتها. ولتحديد الهوية، من المستحسن استخدام تسلسل توافقي معدّل يبدأ من موقع 1 من جينوم الفيروود لمقارنته مع إحدى قواعد بيانات النيوكليوتايد الشاملة. وينبغي أن يتم البحث في قاعدة بيانات بنك الجينات [GenBank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank) للنيوكليوتايد غير الزائد على الموقع الإلكتروني للمركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا البيولوجية أو الأرشيف الأوروبي للنيوكليوتايد على الموقع الإلكتروني لمختبر البيولوجيا الجزئية الأوروبي باستخدام أداة البحث Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). وبالإضافة إلى ذلك، ينبغي أن يركز تحديد الهوية على تجميع عنقودي محدد لنتائج (BLAST) في العرض الذي يتخذ شكل شجرة (تصل النقاط المتجاورة).

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

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

5- السجلات

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

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

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

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

6- جهات الاتصال للحصول على معلومات إضافية

يمكن الحصول على مزيد من المعلومات عن هذا البروتوكول من:

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

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

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

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

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

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

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

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

7- شكر وتقدير

حرر المسودة الأولى لهذا البروتوكول J. Jeffries (العلوم والمشورة للزراعة الاسكتلندية SASA، المملكة المتحدة) و J.W. Roenhorst (المنظمة الوطنية لحماية النبات، هولندا) و B. Rodoni (وزارة البيئة والصناعات الأولية، أستراليا)، و H. Xu (الوكالة الكندية للتفتيش على الأغذية (CFIA)، كندا) و N. Duran-Vila (معهد بلنسية للبحوث الزراعية (IVIA)، إسبانيا) و J.A. Abad (دائرة التفتيش المعنية بشؤون الصحة الحيوانية والنباتية التابعة لوزارة الزراعة في الولايات المتحدة USDA-APHIS) (أنظر القسم 6 لتفاصيل الاتصال). وبالإضافة إلى ذلك، شارك J.Th.J. Verhoeven (المنظمة الوطنية لحماية النبات، هولندا) مشاركة كبيرة في صياغة هذا البروتوكول. ويتوجب توجيه الشكر إلى S.L. Nielsen (الدانمرك) و L. Seigner و S. Winter و M. Wassenegger (ألمانيا)؛ و H. Koenraadts (هولندا)؛ و A. Fox و T. James و W. Monger و V. Mulholland (المملكة المتحدة) لتعليقاتهم المفيدة أثناء وضع هذا البروتوكول.

8- المراجع

يشير المعيار الحالي أيضاً إلى معايير دولية أخرى لتدابير الصحة النباتية، وهي متاحة على البوابة الدولية للصحة النباتية <https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/ispms>

- Badilla, R., Hammond, R. & Rivera, C.** 1999. First report of Potato spindle tuber viroid in Costa Rica. *Plant Disease*, 83: 1072.
- Bertolini, E., Cambra, M., Serra, P., López, M.M., Lopes, S., Durán-Vila, N., Ayres, J., Bové, J.** 2010. Procedimiento directo de detección específica de los viroides *Potato spindle tuber viroid* y *Citrus exocortis viroid* mediante dianas inmovilizadas y RT-PCR a tiempo real y kit para su detección. Spanish Patent N° 2.387.172.
- Bertolini, E., Felipe, R.T.A., Sauer, A.V., Lopes, S., Arilla, A., Vidal, E., Mourão-Filho, F.A.A., Nunes, W.M.C., Bové, J.M., López, M.M. & Cambra, M.** 2014a. Tissue-print and squash real-time polymerase chain reaction for direct detection of ‘*Candidatus Liberibacter*’ species in citrus plants and psyllid vectors. *Plant Pathology*, doi:10.1111/ppa.12197.
- Bertolini, E., Moreno, A., Capote, N., Olmos, A., De Luis, A., Vidal, E., Pérez-Panadés, J. & Cambra, M.** 2008. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant tissues and single aphids by real-time PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 120: 177–188.
- Bertolini, E., Teresani, G.R., Loiseau, M., Tanaka, F.A.O., Barbé, S., Martínez, C., Gentit, P., López, M.M. & Cambra, M.** 2014b. Transmission of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ in carrot seeds. *Plant Pathology*, doi:10.1111/ppa.12245.
- Boonham, N., Fisher, T. & Mumford R.A.** 2005. Investigating the specificity of real-time PCR assays using synthetic oligonucleotides. *Journal of Virological Methods*, 130: 30–35.
- Boonham, N., González, L., Lilia Peralta, E., Blockley, A., Walsh, K., Barker, I. & Mumford, R.A.** 2004. Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd). *Journal of Virological Methods*, 116: 139–146.
- Botermans, M., van de Vossen, B.T.L.H., Verhoeven, J.Th.J., Roenhorst, J.W., Hooftman, M., Dekter, R. & Meekes, E.T.M.** 2013. Development and validation of a real-time RT-PCR assay for generic detection of pospiviroids. *Journal of Virological Methods*, 187: 43–50.
- CABI.** n.d. Invasive species compendium. Datasheet for Potato spindle tuber viroid. Wallingford, UK, CABI. Available at <http://www.cabi.org/isc/datasheet/43659> (last accessed 18 August 2014).
- De Bokx, J.A. & Pirone, P.G.** 1981. Transmission of Potato spindle tuber viroid by aphids. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 87: 31–34.
- EPPO** (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2004. Diagnostic protocols for regulated pests. PM 7/33. Potato spindle tuber viroid. *EPPO Bulletin*.
- EPPO** (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2006. Phytosanitary procedures. PM 3/21 (2). Post-entry quarantine for potato. *EPPO Bulletin*, 34: 443-454.
- EPPO.** (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2014. PM 7/98 (2) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. *EPPO Bulletin*, 44: 117-147.
- EPPO/CABI** (I.M. Smith, D.G. McNamara, P.R. Scott & M. Holderness, eds). 1997. *Quarantine pests for Europe*, 2nd edn. Wallingford, UK, CABI. 1425 pp.
- EUPHRESKO.** 2010. *Detection and epidemiology of pospiviroids (DEP)*. EUPHRESKO Final Report. York, UK, EUPHRESKO. Available at <http://www.euphresco.org/downloadFile.cfm?id=536> (last accessed 15 May 2013).
- Fernow, K.H.** 1967. Tomato as a test plant for detecting mild strains of potato spindle tuber virus. *Phytopathology*, 57: 1347–1352.
- Fernow, K.H., Peterson, L.C. & Plaisted, R.L.** 1970. Spindle tuber virus in seeds and pollen of infected plants. *American Potato Journal*, 47: 75–80.
- Galindo, J., Smith, D.R. & Diener, T.O.** 1982. Etiology of planta macho, a viroid disease of tomato. *Phytopathology*, 72: 49–54.
- Grasmick, M.E. & Slack, S.A.** 1985. Symptom expression enhanced and low concentrations of potato spindle tuber viroid amplified in tomato with high light intensity and temperature. *Plant Disease*, 69: 49–51.

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

- Naktuinbouw.** 2012b. Potato spindle tuber viroid: *Real-time RT-PCR (TaqMan RT-PCR) for Potato spindle tuber viroid (PSTVd) and/or Tomato chlorotic dwarf viroid (TCDVd) in leaf material of horticultural crops.* European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (last accessed 18 August 2014).
- Naktuinbouw.** 2012c. Potato spindle tuber viroid: *Detection of Potato spindle tuber viroid (PSTVd) and/or Tomato chlorotic dwarf viroid (TCDVd) in tomato seed with real-time RT-PCR (TaqMan RT-PCR).* European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (last accessed 18 August 2014).
- Navarro B, Silletti M.R, Trisciuzzi, V.N. & Di Serio, F.** 2009. Characterization of Potato spindle tuber viroid infecting tomato in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 91: 723–726.
- Nielsen, S.L., Enkegaard, A., Nicolaisen, M., Kryger, P., Marn, M.V., Pleško, I.M., Kahrer, A. & Gottsberger, R.A.** 2012. No transmission of Potato spindle tuber viroid shown in experiments with thrips (*Frankliniella occidentalis*, *Thrips tabaci*), honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus terrestris*). *European Journal of Plant Pathology*, 133: 505–509.
- NPPO-NL** (National Reference Centre, National Plant Protection Organization). 2013a. Pospiviroid: Validation of a conventional RT-PCR assay for detection and preliminary identification of pospiviroids (except [sic] CLVd) by Posp1-FW/Posp1-RE. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (last accessed 18 August 2014).
- NPPO-NL** (National Reference Centre, National Plant Protection Organization). 2013b. Potato spindle tuber viroid: Validation of a conventional RT-PCR assay for detection and identification of CLVd, PSTVd and TCDVd using primers Vid-FW/RE (Verhoeven *et al.* 2004). European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (last accessed 18 August 2014).
- NPPO-NL** (National Reference Centre, National Plant Protection Organization). 2013c. Potato spindle tuber viroid: Validation of a conventional RT-PCR test for detection and identification of PSTVd, TCDVd, MPVd and TPMVd using primers 2H1/3H1 described by Shamoul *et al.* (1997). European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (last accessed 18 August 2014).
- NPPO-NL** (National Reference Centre, National Plant Protection Organization). 2013d. *Pospiviroid: Development and validation of a real-time RT-PCR assay for generic detection of Pospiviroids.* European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (last accessed 18 August 2014).
- Owens, R. A., Flores, R., Di Serio, F., Li, S.-F., Pallas, V., Randles, J. W., Sano, T. & Vidalakis, G.** 2011. Viroids. In A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens & E. J. Lefkowitz, eds. *Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 1221–1234. London, Elsevier Academic Press. 1259 pp.
- Owens, R.A., Girsova, N.V., Kromina, K.A., Lee, I.M., Mozhaeva, K.A. & Kastalyeva, T.B.** 2009. Russian isolates of *Potato spindle tuber viroid* exhibit low sequence diversity. *Plant Disease*, 93: 752–759.
- Querci, M., Owens, R.A., Bartolini, I., Lazarte, V. & Salazar, L.F.** 1997. Evidence for heterologous encapsidation of potato spindle tuber viroid in particles of potato leafroll virus. *Journal of General Virology*, 78: 1207–1211.

- Reanwarakorn, K., Klinkong, S. & Porsoongnurn, J.** 2011. First report of natural infection of *Pepper chat fruit viroid* in tomato plants in Thailand. *New Disease Reports*, 24: 6.
- Roenhorst, J.W., Jansen, C.C.C., Kox, L.F.F., De Haan, E.G. & Van den Bovenkamp, G.W.** 2006. Real-time RT-PCR voor grootschalige toetsing van aardappel op het aardappelspindelknolviroïde. *Gewasbescherming*, 37: 198–203 (in Dutch).
- Roenhorst, J.W., Jansen, C.C.C., Kox, L.F.F., de Haan, E.G., van den Bovenkamp, G.W., Boonham, N., Fisher, T. & Mumford, R.A.** 2005. Application of real-time RT-PCR for large-scale testing of potato for Potato spindle tuber pospiviroid. *EPPO Bulletin*, 35: 133–140.
- Salazar, L.F., Querci, M., Bartolini, I. & Lazarte, V.** 1995. Aphid transmission of potato spindle tuber viroid assisted by potato leafroll virus. *Fitopatologia*, 30: 56–58.
- Seigner, L., Kappen, M., Huber, C., Kistler, M. & Köhler, D.** 2008. First trials for transmission of Potato spindle tuber viroid from ornamental Solanaceae to tomato using RT-PCR and an mRNA based internal positive control for detection. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 115: 97–101.
- Shamloul, A.M., Hadidi, A., Zhu, S.F., Singh, R.P. & Sagredo, B.** 1997. Sensitive detection of potato spindle tuber viroid using RT-PCR and identification of a viroid variant naturally infecting pepino plants. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19: 89–96.
- Singh, R.P.** 1970. Seed transmission of potato spindle tuber virus in tomato and potato. *American Potato Journal*, 47: 225–227.
- Singh, R.P.** 1973. Experimental host range of the potato spindle tuber virus. *American Potato Journal*, 50: 111–123.
- Singh, R.P., Boucher, A. & Somerville, T.H.** 1992. Detection of potato spindle tuber viroid in the pollen and various parts of potato plant pollinated with viroid-infected pollen. *Plant Disease*, 76: 951–953.
- Singh, R.P., Dilworth, A.D., Singh, M. & Babcock, K.M.** 2006. An alkaline solution simplifies nucleic acid preparation for RT-PCR and infectivity assays of viroids from crude sap and spotted membrane. *Journal of Virological Methods*, 132: 204–211.
- Singh, R.P. & Kurz, J.** 1997. RT-PCR analysis of PSTVd aphid transmission in association with PLRV. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19: 418–424.
- Singh, R.P., Nie, X. & Singh, M.** 1999. Tomato chlorotic dwarf viroid: An evolutionary link in the origin of pospiviroids. *Journal of General Virology*, 80: 2823–2828.
- Singh, R.P., Ready, K.F.M. & Nie, X.** 2003. Viroids on solanaceous species. In A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles & J. Semancik, eds. *Viroids*, pp. 125–133. Melbourne, Australia, CSIRO Publishing, 392 pp.
- Spieker, R. L.** 1996. A viroid from *Brunfelsia undulata* closely related to the *Columnnea* latent viroid. *Archives of Virology*, 141: 1823–1832.
- Steyer, S., Olivier, T., Skelton, A., Nixon, T. & Hobden, E.** 2010. *Columnnea latent viroid* (CLVd): First report in tomato in France. *Plant Pathology*, 59: 794.
- van Brunschot, S.L., Verhoeven, J.Th.J., Persley, D.M., Geering, A.D.W., Drenth, A. & Thomas, J.E.** 2014. An outbreak of Potato spindle tuber viroid in tomato is linked to imported seed. *European Journal of Plant Pathology*, doi:10.1007/s10658-014-0379-8.
- Verhoeven, J.Th.J.** 2010. *Identification and epidemiology of pospiviroids*. Wageningen University, Wageningen, Netherlands. (Thesis) Available at <http://edepot.wur.nl/137571> (last accessed 20 December 2012).
- Verhoeven, J.Th.J., Hüner, L., Virscek Marn, M., Mavric Plesko, I. & Roenhorst, J.W.** 2010. Mechanical transmission of Potato spindle tuber viroid between plants of *Brugmansia suaveolens*, *Solanum jasminoides*, potatoes and tomatoes. *European Journal of Plant Pathology*, 128: 417–421.
- Verhoeven, J.Th.J., Jansen, C.C.C., Willemen, T.M., Kox, L.F.F., Owens, R.A. & Roenhorst, J.W.** 2004. Natural infections of tomato by *Citrus exocortis viroid*, *Columnnea latent viroid*,

- Potato spindle tuber viroid* and *Tomato chlorotic dwarf viroid*. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 823–831.
- Walter, B.** 1987. Tomato apical stunt. In T.O. Diener, ed. *The viroids*, pp. 321–328. New York, Plenum Press. 365 pp.
- Wassenegger, M., Heimes, S. & Sanger, H.L.** 1994. An infectious viroid RNA replicon evolved from an *in vitro*-generated non-infectious viroid deletion mutant via a complementary deletion *in vivo*. *EMBO Journal*, 13: 6172–6177.
- Weidemann, H.L. & Buchta, U.** 1998. A simple and rapid method for the detection of potato spindle tuber viroid (PSTVd) by RT-PCR. *Potato Research*, 41: 1–8.
- Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N.C., Boonham, N. & Stead, D.E.** 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2853–2858.

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

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

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

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

المصفوفة	حجم العينة	إعداد العينة	استخراج الحمض النووي	طريقة الكشف	ملاحظات بشأن التحقق من الصحة
أوراق بطاطا (مستنبطة في غرف استنبات) ونباتات بطاطا مستنبطة في أنابيب مختبرية.	200 ملليغرام	20 ميكرو لتر من 10 في المائة كبريتات الصوديوم (SDS) ، و180 ميكرو لتر دارئ استخراج LiCl ، و 400 ميكرو لتر فينول-كلوروفورم مع أجران ومدقات	الفينول-كلوروفورم واستخراج بولي إيتيلين غليكول ذو الخطوتين	ارتحال كهربائي هلامي بولي أكريلاميدي عكسي (PAGE) ²	حد الكشف: 2465 بيكوغرام من فيروس درنة البطاطا المغزلية؛ كان ذلك هو الأقل حساسية من الطرق الجزيئية التي استخدمت في اختبار حلقة دولي Pospiviroid المعروفة الخصوصية التحليلية: الكشف عن جميع أنواع فيروسات Pospiviroid المعروفة الانتقائية: لا تأثير على صف البطاطا أو أوراق البطاطا أو النباتات المستنبطة في أنابيب مختبرية قابلية التكرار وقابلية الإعادة: قابلية الإعادة 51 في المائة في 87,893 بيكوغرام من فيروس درنة البطاطا المغزلية (أعلى تركيز لفيروس درنة البطاطا المغزلية اختبر) و42 في المائة على حد الكشف
أوراق بطاطا (مستنبطة في غرف استنبات) ونباتات بطاطا مستنبطة في أنابيب مختبرية.	200 ملليغرام	بتراوح 1-5 (وزن/حجم) مع دارئ Ames (EPPO 2004) مع أجران ومدقات	التثبيت على غشاء (Agdia, Inc.) الفينول-كلوروفورم واستخراج بولي إيتيلين غليكول ذو الخطوتين	فحص ديوكسيجينين ²	حد الكشف: على الأقل 17 بيكوغرام من فيروس درنة البطاطا المغزلية (أدنى تركيز اختبر) الخصوصية التحليلية: الكشف عن جميع أنواع فيروسات Pospiviroid المعروفة الانتقائية: لا تأثير على صف البطاطا أو أوراق البطاطا أو النباتات المستنبطة في أنابيب مختبرية قابلية التكرار وقابلية الإعادة: قابلية الإعادة 100 في المائة في 87,893 بيكوغرام من فيروس درنة البطاطا المغزلية و23 في المائة على 17 بيكوغرام من فيروس درنة البطاطا المغزلية

المصفوفة	حجم العينة	إعداد العينة	استخراج الحمض النووي	طريقة الكشف	ملاحظات بشأن التحقق من الصحة
أوراق بطاطا (مستنبطة في غرف استنبات) ونباتات بطاطا مستنبطة في أنابيب مختبرية.	500-50 ملليغرام	بتراوح 1-9 (وزن/حجم) مع داريء RH (Qiagen) مع أنبوب طرد مركزي و Homex 6 أو micropestle	طقم أدوات RNeasy Plant Mini Kit	وخطوتان ² من طريقة RT-PCR التقليدية باستخدام بادئات Shamloul وآخرين (1997)	حد الكشف: على الأقل 17 بيكوغرام من فيروس درنة البطاطا المغزلية الخصوصية التحليلية: الكشف عن PVd، فيروس درنة البطاطا المغزلية، TPMVd، TCDVd الانتقائية: لا تأثير على صنف البطاطا أو أوراق البطاطا أو النباتات المستنبطة في أنابيب مختبرية قابلية التكرار وقابلية الإعادة: قابلية الإعادة 78 في المائة في 87,893 بيكوغرام من فيروس درنة البطاطا المغزلية (أعلى تركيز لفيروس درنة البطاطا المغزلية اختبر) و44 في المائة على 17 بيكوغرام من فيروس درنة البطاطا المغزلية
أوراق بطاطا (مستنبطة في غرف استنبات) ونباتات بطاطا مستنبطة في أنابيب مختبرية.	1 غرام	3.5 ملليغرام (بتراوح 1-2: 5 (وزن/حجم)) من المحلول الدارئ GH plus مع Homex 6	3.5 ملليغرام (بتراوح 1-2: 5 (وزن/حجم)) من المحلول الدارئ GH plus مع Homex 6	طقم أدوات RNeasy Plant Mini Kit أو طقم أدوات Sbeadex maxi أو plant kit على نظام KingFisher 96	تحليل خصائص الأداء كما لأوراق البندورة الحساسية التحليلية: تلوث مع الفيروسات التي تحدث عادة في البطاطا الانتقائية: لا تأثير على أوراق البطاطا أو النباتات المستنبطة في أنابيب مختبرية جرى التحقق من معدلات استكثار تصل إلى 100 (كشف 100 في المائة في عينة تتألف من ورقة واحدة مصابة و99 ورقة سليمة؛ NAK, 2011

المصفوفة	حجم العينة	إعداد العينة	استخراج الحمض النووي	طريقة الكشف	ملاحظات بشأن التحقق من الصحة
أوراق بطاطا (مستنبتة في غرف استنبات) ونباتات ودرنات بطاطا مستنبتة في أنابيب مختبرية	1.5 غرام أوراق أو 5 جرام درنات	حوالي 600 ميكروتر داريء للأوراق أو حوالي 3 ملليغرام داريء للدرنات (اختيار الداريء تبعاً لطريقة الاستخراج المستخدمة)	طقم أدوات RNeasy Plant Mini Kit، أو استخراجه بروميد تريميثيلامونيوم سيتيل، أو طقم أدوات عزل الحمض النووي الريبي (Gentra Systems)، تجدر ملاحظة أن طقم الأدوات لم يعد متوفراً	RT-PCR في الوقت الحقيقي: Boonham وآخرون، (2004)	<p>حد الكشف: الكشف عن ما يصل إلى 10.000 مرة تخفيف لانسجة مصابة في أنسجة سليمة</p> <p>الحساسية التحليلية: الكشف عن MPVd، فيروس درنة البطاطا المغزلية TPMVd، TCDVd، PSTVd (بعض الخلاصات)؛ لا تلوث مع الفيروسات التي تحدث عادة في البطاطا</p> <p>الانتقائية: لا تأثير على أوراق البطاطا أو النباتات المستنبتة في أنابيب مختبرية أو الدرنات</p> <p>قابلية التكرار وقابلية الإعادة: 100 في المائة (اختبار حلقة شاركت فيه أربعة مختبرات)</p> <p>جرى التحقق من معدلات استكثار تصل إلى 100 (كشف 100 في المائة في عينة تتألف من ورقة واحدة مصابة و 99 ورقة سليمة؛ Roenhorst وآخرون، 2005، 2006</p>

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

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

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

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

تاريخ المطبوع

هذا ليس جزءاً رئيسياً من المعيار

2007 03- أضافت الدورة الثانية لهيئة تدابير الصحة النباتية موضوع لبرنامج العمل (06-002)

112012- راجع فريق الخبراء المعني ببروتوكولات التشخيص مسودة البروتوكول

2013 03- وافقت لجنة المعايير بقرار إلكتروني إلى مشاوراة الأعضاء

(2013_eSC_May_10)

2013 07- انعقاد مشاوراة الأعضاء

2014 07- استعرض فريق الخبراء المعني ببروتوكولات التشخيص مسودة البروتوكول

2014 09- وافق فريق الخبراء المعني ببروتوكولات التشخيص بقرار إلكتروني إلى لجنة المعايير للموافقة عليها لاعتمادها

(2014_eTPDP_September_01)

2014 11- وافقت لجنة المعايير عليها بقرار إلكتروني إلى فترة الإخطار لبروتوكول التشخيص

(2014_eSC_Nov_13)

2014 12- فترة الإخطار

2015 01- اعتمدت لجنة المعايير بروتوكول التشخيص نيابة عن هيئة تدابير الصحة النباتية (لم تتلق أي اعتراضات رسمية)

المعيار الدولي رقم 27. 2006: الملحق 7 فيرود درنة البطاطا المغزلية (2015). روما، الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات