المعيار الدولي 27
الملحق 4

المعايير الدولية لتدابير الصحة النباتية

بروتوكولات تشخيص المعيار الدولي 27 لتدابير الصحة النباتية

البروتوكول التشخيصي 4:

فطر النخر الهندي *Tilletia indica Mitra*

(2014)

المحتويات

1– معلومات عن الآفة 3
2– المعلومات التصنيفية 4
3– الكشف 4
3–1 فحص البذور/الحبوب 5
3–2 استخراج البوغات النهائية من البذور/الحبوب، اختبار الغسل بالمنخل القائم على الحجم 5
4– تحديد هوية الفطر 7
4–1 مظهر البوغات النهائية 7
4–1–1 التحديد بناء على المظهر 8
4–1–2 المقارنة من حيث المظهر مع الأنواع الأخرى لنخريات القمح 8
4–2 عزل وإنبات البوغات النهائية 9
4–2–1 إنبات البوغات النهائية 9
4–2–2 إنبات الأنواع المشابهة من النخريات 13
4–2–3 استخلاص البوغات النهائية فرادى 13
4–3 التحديد الجزيئي لهوية النخر 13
4–3–1 تحليل أنزيم القطع لمنطقة ITS1 14
4–3–2 تحليل تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدي باستخدام البادئات المرتبطة بالأنواع المحددة 16

4–3–3 فحص تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام بادئات خاصة بأنواع محددة ومسبار فلوري 17
4–3–4 تفاعل البلمرة المتسلسل بالوقت الحقيقي على البوغات النهائية 18
4–3–4–1 تضخيم الحمض النووي للنخريات قبل الانتقال إلى تنفيذ تفاعل البلمرة المتسلسل بالوقت الحقيقي 19
4–3–4–2 اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل الفلوري الخماسي الطبقات بالوقت الحقيقي لغايات تحديد النوع 19
5– السجلات 21
6– جهات الاتصال للمزيد من المعلومات 21
7– شكر وتقدير 22
8– المراجع 22
9– الأشكال 25

1- معلومات عن الآفة

يتسبب فطر النخر الهندي *Tilletia indica Mitra* بمرض "نخر كارنال" الذي يعرف أيضا باسم النخر الجزئي لأنواع القمح. وقد تم وصف نخر كارنال للمرة الأولى في كارنال بالهند عام 1931. وينتشر هذا المرض على نطاق واسع في مناطق من جنوب آسيا وجنوب غرب آسيا (وزارة الزراعة الأمريكية، 2007؛ Wiese، 1987). كما قد تم رصده في بعض مناطق الولايات المتحدة والمكسيك وجنوب أفريقيا (Crous وآخرون، 2001؛ Fuentes-Davila، 1996).

وتشمل عوائله كلا من القمح الشائع والقمح القاسي وهجين القمح الشائع والشيلم. إنّ السجلات المتعلقة بهجين القمح الشائع والشيلم قليلة، غير أن أنواع الشيلم قد أثبتت قابليتها لأن تكون من عوائل تلك الآفة (Sansford وآخرون، 2008). وقد ثبت أن فطر النخر الهندي *T. indica* يصيب أنواعا أخرى من الأعشاب تحت ظروف البيوت الزجاجية، إلا أنه لم يكتشف قط في الظروف الحقلية لدى تلك العوائل البديلة (Inman وآخرون، 2003).

إن فطر النخر الهندي *T. indica* عبارة عن ممرض مفحّم يصيب الزهيرات. وتصاب البذور من خلال الطرف الجنيني للب وينمو الفطر داخل القشرة حيث ينتج كتلة سهلة التفتيت من البوغات النهائية ذات اللون الأسود الضارب إلى البني. وحين تكون كتل البوغات نضرة، تفوح منها رائحة نتنة فاسدة شبيهة برائحة السمك (التريمثيلامين). وعلى عكس المفحمات العامة، فليس من الاعتيادي أن تكون كل البذور الموجودة على إحدى آذان العائل أن تكون مصابة بـ *T. indica*، كما أن الرؤوس ذات البذور المصابة لا تختلف من حيث مظهرها عن الرؤوس السليمة (الشكل 1). وعادة ما يتم استعمار البذور بشكل جزئي فقط فتظهر عليها درجات متفاوتة من الإصابة (الشكل 2). وبالتالي فإنه من الصعب جدا اكتشاف المرض في الحقل. ولا تظهر الأعراض عادة للعين المجردة إلا بعد الحصاد، إلا إذا كانت مستويات الإصابة عالية.

ويؤدي فطر النخر الهندي *T. indica* أيضا إلى تراجع نوعية الحبة من خلال إفساد لونها وإكساب رائحة كريهة للحبة وللمنتجات المصنوعة منها. كما أنه يسبب انخفاضا طفيفا في المحصول. وعموما فإن القمح الشائع الذي يحتوي على ما يزيد عن 3 في المائة من اللب المفحم، يعتبر غير مؤهل للاستهلاك البشري (Fuentes-Davila، 1996).

هناك أنواع أخرى من النخريات التي قد يحصل التباس بينها وبين فطر النخر الهندي *T. indica*، وهي توجد عادة في الحبوب أو البذور المحصودة، وهي تشمل نخر *Walkeri* (وهو ممرض يصيب الزوان المعمّر والزوان الإيطالي) و *T. Horrida* (وهو ممرض يصيب أنواع الأرز) و*T. ehrhartae* (وهو ممرض لعشبة *Ehrharta calycina*). وفي أستراليا وُجد أن كلا من نخريتي *T. walkeri* و*T. ehrhartae* تلوثان البذور المحصودة للقمح الشائع. ويوجد *T. walkeri* و*T. Horrida* في الولايات المتحدة الأمريكية ويتم رصدهما في البذور المحصودة للقمح الشائع لا سيما في المواقع التي تزرع فيها أنواع الأرز وأنواع الزوان مداورة مع القمح الشائع (Castlebury، 1998؛ Castlebury وCarris، 1999؛ Pascoe وآخرون، 2005). وبسبب تشابه هذه المرضات من حيث السمات المظهرية فمن الأهمية بمكان تحديدها بدقة.

2- المعلومات التصنيفية

الاسم: فطر النخر الهندي *Tilletia indica Mitra، 1931*

المرادفات: *Neovossia indica* (Mitra) Mundkur، *1941*

الموقع التصنيفي: Eukaryota، فطريات، Basidiomycota، Ustilaginomycotina، Exobasidiomycetes، Exobasidiomycetidae، Tilletiales Tilletiaceae

الاسم الشائع: نخر كارنال أو النخر الجزئي

المرجعية: بنك الفطريات MycoBank 267835

3- الكشف

يصف المخطط التشخيصي لفطر النخر الهندي *T. indica* كما هو مبين في الشكل 3، إجراءات رصد البوغات النهائية في بذور أو حبوب العوائل. ويتم فحص عينات عن البذور أو الحبوب بصريا لتفقد أيّ نخر قد يكون موجودا في اللب (القسم 3–1). وإذا ما تم الكشف عن لب منخور، يمكن إزالة البوغات النهائية وتحديد وجود فطر النخر الهندي *T. indica* بناء على مظهره (القسم 4–1).

بحال لم يكتشف أي لب منخور في العينة، يمكن البحث عن بوغات نهائية فيها عبر استخدام اختبار الغسل بالمنخل بناء على الحجم على 3 عينات فرعية (القسم 3–2). غير أن مثل هذا الاختبار قد لا يميز بين الحبوب المصابة فعلا وبين الحبوب الملوثة بالبوغات النهائية على سطح البذرة. وفي حال لم تكتشف أي بوغات النهائية بعد اختبار الغسل بالمنخل، فإن نتيجة تشخيص العينة تعتبر سلبية. أما إذا تم الكشف عن البوغات النهائية، فإن عدد البوغات النهائية المكتشف سوف يحدد أية طريقة يمكن أن تستخدم لتحديد ماهيتها:

- ففي حال تم الكشف عن 10 بوغات نهائية أو أكثر، تقضي الخطوة الأولى بتحديد نوع تلك البوغات (القسم 4–1) بناء على مظهرها. وإذا دعت الحاجة إلى مزيد من التأكد، تقضي الخطوة التالية **إما** بعزل البوغات النهائية وإنباتها (القسم 4–2–1) وتلي ذلك البروتوكولات الجزيئية الموصوفة في الأقسام من 4–3–1 إلى 4–3–3، **وإما** نزع البوغات النهائية (القسم 4–2–3) ويلي ذلك تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل المباشر على البوغات النهائية الفردية (القسم 4–3–4). (راجع الأقسام أ و ب و ج في الشكل 3).
- في حال اكتشفت أقل من 10 بوغات نهائية، من أجل التمييز الدقيق بين فطر النخر الهندي *T. indica* والأصناف المشابهة له، يستحسن تكرار اختبار الغسل بالمنخل بناء على الحجم، على عينات فرعية جديدة. ويمكن للحد المعتمد للكشف أن يكون أو أن لا يكون هو نفسه الحد النظامي.

في هذا البروتوكول التشخيصي، تم وصف الطرق (بما في ذلك الأسماء التجارية) بحسب ما نشرت كونها تحدد المستوى الأصلي للحساسية أو الخصوصية أو لقابلية التناسل.

3–1 فحص البذور/الحبوب

لا تعتبر المعاينة البصرية المباشرة للبّ المنخور أو للبوغات النهائية التي تلوث سطح البذور أو الحبوب أسلوبا موثوقا به لغايات الصحة النباتية. إلا أنه قد يتم كشف اللب المنخور بالعين المجردة إلى جانب استعمال المجهر المنخفض الطاقة (تكبير من 10 إلى 40 مرة). ويستند هذا البروتوكول إلى دراسة عينة زنتها كيلوغرام واحد من البذور أو الحبوب؛ حيث يجب التحقق من العينة كلها بحثا عن اللب المنخور (الشكل 2) أو بذور النجيليات (على سبيل المثال أنواع الزوان). ويتم تسجيل الأعراض المكتشفة ووجود بذور النجيليات الأخرى.

بحال وجود لب منخور، يمكن إجراء تشخيص إيجابي على أساس المظهر الخارجي للبوغات النهائية. ويجب وضع شرائح مجهرية للبوغات النهائية ووصف شكل تلك البوغات النهائية. وإذا ما تطابق مظهر البوغات النهائية مع الإصابة بفطر النخر الهندي *T. indica* (راجع القسم 4–1 والأشكال 4–8) يمكن التوصل إلى تشخيص إيجابي.

للمساعدة على رؤية الأعراض بصورة أوضح، يمكن نقع اللب في هيدروكسيد الصوديوم بنسبة 0.2 في المائة لمدة 24 ساعة على حرارة 20 درجة مئوية إذ أن ذلك كفيل بتبييض السويداء بلطف وجعل الإصابة المسودّة تبرز بشكل واضح جدا. وهذه العملية مفيدة بشكل خاص مع البذور المعالجة كيميائيا حيث يمكن للأصباغ الملونة أن تخفي الأعراض (Agarwal وMathur، 1992؛ Mathur وCunfer، 1993). وفي حالة الإصابة الشديدة والتلوث، يمكن رؤية البوغات النهائية على سطح البذور (Mathur وCunfer، 1993).

حين لا يوجد أي لب منخور يمكن الاستعانة باختبار الغسل بالمنخل القائم على الحجم (القسم 3–2) من أجل تحديد ما إذا كان فطر النخر الهندي *T. indica* موجودا أو غير موجود في العينة. في حال عدم وجود لب منخور، يمكن الاعتبار أن فطر النخر الهندي *T. indica* غير موجود. أما إذا تبين أن بذورا من أنواع الزوان تلوث العينة فهناك احتمال كبير باكتشاف *T. walkeri* في هذه العينة.

3–2 استخراج البوغات النهائية من البذور/الحبوب، اختبار الغسل بالمنخل القائم على الحجم

يعتبر اختبار الغسل بالمنخل القائم على الحجم طريقة موثوقة للكشف عن البوغات النهائية لفطر النخر الهندي *T. indica* في عينة غير معالجة من أنواع القمح الشائع أو القمح القاسي أو القمح القاسي المهجّن بالشيلم. ومن المهم اختبار كمية بالحد الأدنى مكونة من 3 عينات فرعية مكررة تزن الواحدة منها 50 غراما لضمان الكشف عن البوغات النهائية، في حال كانت موجودة في العينة (راجع الجدول 1 للاطلاع على عدد العينات المطلوبة لكشف الأعداد المختلفة من البوغات النهائية). يعتبر هذا الأسلوب فعالا بنسبة 82 في المائة بالمتوسط من حيث استخلاص البوغات كما أن الفحص المجهري يتطلب عادة بضع شرائح فقط لكل عينة زنة 50 غراما. ويرد في ما يلي وصف لهذا الأسلوب وهناك المزيد من التفاصيل المتاحة من قبل Inman وآخرين (2003)، وPeterson وآخرين (2000) وWright وآخرين (2003). وقد يكون الحد المعتمد للكشف أو لا يكون هو نفسه الحد النظامي.

من المهم نقع جميع المعدات قبل استخدامها لمدة 15 دقيقة في محلول للتبييض (1.6 في المائة من العنصر النشط لهيبوكلوريت الصوديوم) من أجل القضاء على احتمال الإيجابيات الكاذبة جراء انتقال التلوث من العينات السابقة. يقتل محلول التبييض البوغات النهائية ويجعلها تبدو شفافة مقارنة بمظهرها الاعتيادي الداكن والمصطبغ. ويتم شطف جميع المعدات بماء الصنبور بعد نقعها.

يتم وضع العينة، وهي عبارة عن 50 غراما من البذور غير المعالجة، في حوجلة إيرلنماير (250 مل) مع 100 مل من محلول توين 20 المائي بنسبة 0.01 في المائة. ومن ثم توضع العينة على الآلة الهزازة لمدة 3 دقائق بسرعة 200 دورة في الدقيقة من أجل تحرير البوغات النهائية فتسكب في منخل قياس 53 ميكرونا على منخل قياس 20 ميكرونا داخل قمع

موضوع على حوجلة أخرى (500 مل). ثم يتم شطف الحوجلة التي تحتوي على العينة مرتين بواسطة 50 مل تقريبا من ماء الصنبور المعقم في كل من المرتين مع سكب ماء الشطف على العينة القابعة في المنخل. ويتم غسل العينة بواسطة مياه الصنبور المعقمة (200–300 مل) باستخدام زجاجة شافطة لضمان الإزالة الجيدة للبوغات النهائية عن البذور. وتتم إزالة العينة والمنخل قياس 53 ميكرونا. وتتم إمالة المنخل قياس 20 ميكرونا بزاوية 45 درجة، وذلك باستخدام زجاجة شافطة مملوءة بماء الصنبور المعقم، ويتم غسل الفلذ الموجودة على المنخل من أعلى إلى أسفل بحركة جانبية كاسحة إلى الوراء وإلى الأمام. تؤدي هذه العملية إلى غسل كل البوغات النهائية المستخلصة من العينة في الجزء السفلي من المنخل. ومن ثم يتم غسل البوغات النهائية والفلذ في أنبوب مخروطي للطرد المركزي سعة 15 مل. ومن المهم أن يتم استخدام أنابيب البوليبروبيلين بما أن البوغات النهائية تلتصق بجوانب أنابيب البوليكربونات ما يؤدي إلى نتائج مغلوطة. ويجب تكرار هذه الخطوات إلى أن يبدو منخل الـ20 ميكرونا نظيفا. وستكون الكمية النهائية الموجودة في الأنبوب قريبة من 8 مل. وإذا لزم الأمر، يمكن فحص المنخل قياس 20 ميكرونا تحت مجهر منخفض الطاقة للتحقق من البوغات النهائية المترسبة.

يخضع المزيج المستعلق الناتج عن العملية إلى الطرد المركزي بقوة 1000 *g* لثلاث دقائق من أجل جمع البوغات النهائية، بما أن تلك الأخيرة هي أكثر كثافة من معظم الفلذ المستخلصة من عملية الاختبار بالغسل. أما المعادلة المستخدمة لحساب القوة الطاردة المركزية النسبية (ق.ط.ن.) (g) بناء على عدد الدورات في الدقيقة هي ق.ط.ن.= 1.12 ق.أقصى (ق.ط.ن./100)^2 حيث أن " ق.أقصى" يعني القطر الأقصى (بالمليمترات) من مركز الدوران إلى أسفل أنبوب الطرد المركزي. تتم إزالة المادة الطافية بعناية من دون تعكير المادة المترسبة، وذلك باستخدام ماصة باستير جديدة قابلة للرمي. ويمكن بعد ذلك فحص الترسبات تحت المجهر. وإذا كانت الترسبات سميكة جدا، يمكن إضافة الماء لتخفيف المستعلق، وتحريك المستعلق بواسطة طرف الماصة لضمان الحصول على مستعلق متجانس قبل الفحص تحت المجهر.

يتم وضع كامل ترسبات المستعلق بكميات منفصلة بحجم 20 ميكرولترا للكمية الواحدة، على شريحة مجهر وتغطى بساترة. يتم فحص الشرائح باستخدام مجهر المجال المضيء بقدرة تكبير تتراوح بين 20 و40 مرة. ومن المهم دراسة كل مليمتر مربع من المستعلق على الشريحة بحثا عن وجود بوغات نهائية. وإذا تم العثور على البوغات النهائية، يتم تسجيل سماتها المظهرية (مثل الحجم واللون والزخرفة) وعدد البوغات النهائية الموجودة على كل شريحة.

الجدول 1– عدد العينات الفرعية المكررة زنة 50 غراما المطلوبة لكشف المستويات المختلفة من التلوث مع مستويات محددة من الموثوقية، مع افتراض توزيع متساوٍ للبوغات النهائية (Peterson وآخرون، 2000).

	عدد العينات المكررة المطلوبة لكشف البوغات النهائية بناء على مستوى الثقة (نسبة مئوية)		
مستوى التلوث (عدد البوغات النهائية لكل عينة زنة 50 غراما)	99 في المائة	99.9 في المائة	99.99 في المائة
1	3	5	6

4	3	2	2
1	1	1	5

4– تحديد هوية الفطر

يستند تحديد فطر النخر الهندي *T. indica* إما على (أ) الأعراض الظاهرة على اللب وعلى مظهر البوغات النهائية، وإما على (ب) المظهر الخارجي للبوغات النهائية والكشف عن التسلسل الفريد للحمض النووي بواسطة إحدى تقنيات تفاعل البلمرة المتسلسل (أنظر الشكل 3).

4–1 مظهر البوغات النهائية

عندما يتم العثور على بوغات نهائية مشبوهة في اختبار الغسل بالمنخل، يمكن إعادة فحص اللب في كل من العينة الفرعية (أو العينات الفرعية) المغسولة ومن العينة الأم بحثا عن أعراض. وإذا ما تم العثور على أعراض، ينبغي التثبت منها عن طريق الفحص المجهري للبوغات النهائية. وينبغي أيضا فحص أي بذور عشبية توجد في العينة بحثا عن إشارات إلى الإصابة بالنخر، وإذا ما وجدت فيجب فحص البوغات النهائية المرتبطة بها تحت المجهر. وإذا وجدت البوغات النهائية نفسها في اللب المنخور لدى اختبار الغسل بالمنخل، فيمكن إجراء التشخيص. وإذا لم يتم العثور على أي لب منخور في العينة الأكبر، فيستحسن ممارسة أحد الاختبارات الجزيئية (الأقسام 4–3–1 إلى 4–3–4) من أجل التحديد.

يسرد الجدول 2 الخصائص المظهرية للبوغات النهائية لفطر النخر الهندي *T. indica* وكذلك البوغات النهائية لأنواع النخريات الشائعة التي يمكن العثور عليها في شحنات البذور أو الحبوب والتي قد يظن خطأ أنها فطر النخر الهندي *T. indica*.

4–1–1 التحديد بناء على المظهر

يتراوح شكل البوغات النهائية لفطر النخر الهندي *T. indica* بين المستدير وشبه المستدير وأحيانا يكون له جزء خوطي صغير (يوجد عادة على البوغات النهائية غير الناضجة، ولكنه يوجد في بعض الأحيان على البوغات النهائية الناضجة)؛ يبلغ قطر معظمها بين 22 و47 ميكرونا، ولكنه قد يكون أكبر من ذلك أحيانا إذ يصل إلى 64 ميكرونا (المتوسط هو ما بين 35 و41 ميكرونا)؛ يتراوح لونها بين البرتقالي الضارب إلى البني الشاحب وبين البني المحمر الداكن؛ وتكون البوغات النهائية الناضجة سوداء وكامدة اللون (الشكلان 4 و 5)؛ وهي مزخرفة بكثافة مع أشواك تتفاوت بين المروسة والحادة وبين المبتورة وأحيانا مع أطراف منحنية يبلغ ارتفاعها بين 1.4 و5.0 (–7.0) ميكرونا، وهي تبدو من السطح إما كأشواك فردية (شوكاء بكثافة) وإما كنتوءات ضيقة متقاربة (مخية الشكل) (الشكلان 4 و 5)؛ ويكسو الأشواك غشاء شفاف رقيق (Carris وآخرون، 2006؛ CMI، 1983) .

يتراوح شكل الخلايا العقيمة لفطر النخر الهندي *T. indica* بين المستدير وشبه المستدير والدمعي. لونها بني مصفر ويتفاوت حجمها بين 10 و28 ميكرونا × 48 ميكرونا، وتكون مع أو بدون ساق قصيرة، وجوانبها ملساء تصل سماكتها إلى 7 ميكرونات وهي ذات صفائح. تميل الخلايا العقيمة إلى أن تكون أقل شيوعا في عمليات الغسل بالمنخل (Carris وآخرون، 2006؛ CMI، 1983).

إذا وجدت 10 بوغات نهائية أو أكثر في اختبار الغسل بالمنخل، يمكن حينذاك التثبت من السمات المظهرية التي تم تحديدها. أما إذا اكتشف ما يقل عن 10 بوغات نهائية، فلا يعوّل على السمات المظهرية بالكامل للتحديد الموثوق

(منظمة وقاية النباتات في أوروبا والبحر المتوسط، 2007). في هذه الحالة من المستحسن تقسيم العينة عبر إعداد عينات فرعية جديدة انطلاقا من الكمية الأصلية البالغة زنتها كيلوغراما واحدا واختبارها.

4–1–2 المقارنة من حيث المظهر مع الأنواع الأخرى لنخريات القمح

من أهم السمات المظهرية التي تميز نخريات *T. indica* و*T. walkeri* و*T. horrida* و*T. ehrhartae* هو حجم البوغة النهائية (كمجموعة وكمتوسط) والزخرفة واللون (الجدول 2؛ الأشكال 4 إلى 8). وغالبا ما تختلف التقارير المنشورة بشأن حجم البوغات. ويتأثر حجم البوغة بالوسيط المستخدم وبعلاجات التسخين. فقد أظهر Pascoe وآخرون (2005) أنه في أستراليا تعتبر كل من *T. walkeri* و *T. ehrhartae* من الملوثات الشائعة للقمح الشائع المحصود. وفي الولايات المتحدة، فإن فطري *T. walkeri* و*T. horrida* المتشابهين من حيث المظهر والتركيبة الجينية هما من الملوثات المعروفة للقمح الشائع المحصود (Castlebury وCarris، 1999؛ Cunfer وCastlebury، 1999؛ Smith وآخرون، 1996). وبالإضافة إلى أنواع النخريات المذكورة في الجدول 2، قد يحصل التباس بين النخريات ذات البوغات المزدوجة وبين فطر النخر الهندي *T. indica* (Durán، 1987؛ Durán وFischer، 1961؛ Pimentel وآخرون، 1998). هذه الأنواع أقل عرضة لأن تكون من ملوثات من القمح الشائع وهي تشمل نخر *Barclayana sensu latu* (يسبب تفحم أنواع مختلفة من النجيليات، مثل الدخن والعشب)، ونخر عشبة الحب، *ونخر inolens* (على *Lachnagrostis filiformis*)، ونخر *rugispora* (على *Paspalum*) *ونخر boutelouae* (على *Bouteloua gracilis*). ولم يتبين أن أيا من هذه الأنواع المتشابهة من حيث الشكل، تصيب بشكل طبيعي القمح الشائع.

ويمكن تعزيز السمات الوسطى لـ"سبين" البوغات النهائية عبر تبييض تلك البوغات في هيبوكلوريت الصوديوم بنسبة 10 في المائة لمدة 15–20 دقيقة. وإذا لزم الأمر، يمكن بعد ذلك شطف البوغات النهائية مرتين في الماء وصبغها بواسطة زرقة الرتيبان أو زرقة القطن في اللاكتوغليسرول مثلا (الشكل 8).

4–2 عزل وإنبات البوغات النهائية

توجد حاليا طريقتان متاحتان للتأكد من هوية البوغات النهائية المكتشفة في اختبار الغسل بالمنخل (القسم 3–2). فهناك الإجراء القياسي لاستخلاص البوغات النهائية عن الشريحة وحفز إنباتها (القسم 4–2–1)، والإجراء الجديد الذي وضعه Tan وآخرون (2009) والذي يتيح تنفيذ تفاعل البلمرة المتسلسل مباشرة على بوغ نهائي واحد مرفوع عن الشريحة (القسم 4–2–3).

4–2–1 إنبات البوغات النهائية

إن فطر النخر الهندي *T. indica* طفيلي اختياري. من أجل استنباته يتم نقع البوغات النهائية في الماء وتعقيمها سطحيا بسرعة ومن ثم إنباتها على شرائح من الأجار المائي.

يمكن رفع البوغات النهائية عن الشرائح وعن الساترات عبر غسلها بالماء المقطر على المنخل قياس 20 ميكرونا ومن ثم وضعها في أنبوب مخروطي نظيف ومعقم للطرد المركزي (كما في القسم 3–2). ويجب أن يكون الحجم قريبا من 3–5 مل. يتم تحضين الأنابيب ليلا على حرارة 21 درجة مئوية لترطيب البوغات النهائية وجعل الملوثات الفطرية والبكتيرية أكثر عرضة للتعقيم السطحي اللاحق. وبعد التحضين خلال الليل يتم ترسيب البوغات النهائية بواسطة الطرد المركزي بقوة 1200 *g* لمدة 3 دقائق.

ترفع المواد الطافية على السطح وتعقّم البوغات النهائية من خلال استعلاق الترسب في 5 مل من مادة التبييض (0.3 إلى 0.5 في المائة من العنصر النشط لهيبوكلوريت الصوديوم)، ويقلب الأنبوب بسرعة ثلاث مرات ويخضع للطرد

المركزي بقوة 1200 *g* لمدة دقيقة واحدة. قد تقتل بعض البوغات النهائية إذا ما تعدى الوقت الإجمالي الذي تمضيه في مادة التبييض، الدقيقتين. وكبديل عن المعالجة بمادة التبييض، يمكن تعقيم البوغات النهائية سطحيا لمدة 30 دقيقة في 5–10 من المياه المحمضة والمكهربة. تعتبر المياه المحمضة والمكهربة فعالة في التعقيم السطحي للبوغات، ولكن بالمقارنة مع المعالجة بالمادة المبيضة لمدة تتراوح بين الدقيقة الواحدة والدقيقتين، فهي تحفز إنبات البوغات النهائية بدلا من أن تخففه (Bonde وآخرون، 1999). ثم يتم غسل البوغات النهائية مرتين عن طريق إزالة المواد الطافية وإعادة استعلاق الترسب في 1 مل من الماء المقطر المعقم وإجراء الطرد المركزي بقوة 1200 g لمدة 5 دقائق.

يعاد استعلاق الترسب في 1 مل من الماء المقطر المعقم وتوضع 200 ميكرولتر مطهرة من مستعلق البوغات النهائية على 2 في المائة من أجار الماء مع صفائح من المضادات الحيوية (WA + A) لوحات وتنشر عليها بواسطة أداة معقمة للمد. أما المضادات الحيوية المستخدمة فهي 60 ملغ من البنسلين–G (ملح الطعام) و200 ملغ من سلفات الستربتوميسين لكل لتر من الأجار (منظمة وقاية النباتات في أوروبا والبحر المتوسط، 2007). يتم تحضين صفائح الـ WA + A على حرارة 21 درجة مئوية وتعرض للضوء مدة 12 ساعة. ومن ثم تترك الصفائح لمدة أيام قبل أن تختم أو توضع داخل أكياس شفافة من البولي إثيلين.

بعد انقضاء 7 إلى 14 يوما، تنتج البوغات النهائية غير النائمة أفطورة تحمل 32 إلى 128 أو أكثر من البوغات البدائية على طرفها. وتنتج هذه المستعمرات بوغات ثانوية من نوعين عادة: النوع الخيطي الشكل والنوع السجقية الشكل. ويمكن إنباتها من ثم مباشرة على وسائط صلبة (الشكل 9) أو على وسيط من المغذيات السائلة مثل مرق دكستروز البطاطا. تقتطع كتل صغيرة من الأجار (1 سم × 1 سم) تحمل بوغات نهائية أو مستعمرات منبتة وتعلق عند الجانب السفلي لغطاء طبق بيتري بحيث يواجه البوغ النهائي المنبّت، سطح المرق، إذ يتيح ذلك للبوغات أن تنتشر على سطح المرق. ويتم تحضين الأطباق على حرارة 21 درجة مئوية مع تعريضها للضوء لمدة 12 ساعة. وبعد يومين إلى 3 أيام تنتج البوغات البدائية الراقدة على سطح المرق أفطوريات صغيرة يبلغ قطرها ما بين 0.5 و1.0 سنتمترا. ترفع كل أفطورة بواسطة إبرة تشريح معقمة، وتلامس ورق ترشيح معقم لإزالة فائض المرق. ثم توضع الأفطورات في قوارير مناسبة (أنابيب للطرد المركزي الأصغر سعة 1.5 إلى 2.0 مل) لاستخراج الحمض النووي مباشرة، أو تخزن على حرارة 80 درجة مئوية تحت الصفر لاستخراج الحمض النووي منها في وقت لاحق.

قد لا يكون إنبات البوغات النهائية لغايات الاختبار الجزيئي بالأمر الممكن على الدوام، كما حين تعالج البذور بواسطة هيدروكسيد الصوديوم كما في حالة الحبوب المعالجة بواسطة مبيدات الفطريات. إن زيادة عدد العينات المكررة المنخولة قد تؤدي إلى زيادة عدد البوغات النهائية المستخلصة وبالتالي عدد البوغات النهائية القابلة للإنبات. قد تمر البوغات النهائية في فترة من السكون، ما يمكن أن يؤثر على الإنبات (Carris وآخرون، 2006). ويمكن حل هذه المشكلة من خلال تنفيذ تفاعل البلمرة المتسلسل مباشرة على البوغات النهائية الفردية (أنظر القسم 4–3–4).

الجدول 2– السمات المظهرية للبوغات النهائية لنخريات *Tilletia indica* و*Tilletia walkeri* و*Tilletia horrida* و*Tilletia ehrhartae* وما يرتبط بهذه الأنواع الأربعة من عوائل

النوع	حجم البوغ النهائي (ميكرومتر)	حجم البوغ النهائي (المتوسط) (ميكرومتر)	لون البوغ النهائي	شكل البوغ النهائي	غلاف البوغ النهائي	أشواك البوغ النهائي	العائل
***T. indica*(أ)**	64–22	41–35	برتقالي بني شاحب إلى بني محمر داكن، أما لون البوغات الناضجة فبين الأسود والكامد	من مستدير إلى شبه مستدير	موجود	5–1.4 (–7) ميكرومتر حين ينظر إليها من السطح تظهر نتؤات شائكة كثيفة أو ضيقة متقاربة (ذات أشكال مخية دقيقة) حين ينظر إليها من الوسط، يظهر كفاف أملس وأكثر اكتمالا بما أن الأشواك مرتبة بكثافة مع أطراف منحنية أحيانا.	*أنواع القمح المختلفة*
***T. walker*(ب)**	28–35	31–30	أصفر شاحب إلى بني محمر داكن (ولا يكون أبدا أسود أو كامدا)	مستدير	موجود ويمتد إلى الأطراف، شفاف إلى بني مصفر	6–3 ميكرومترات خشنة ومخية الشكل تقريبا. نتؤات عريضة مخية الشكل ولكن ليس بصورة كاملة حين ينظر إليها من السطح. وحين ينظر إليها من الوسط يظهر جانبها غير سوي مع ثغرات بين الشوكة والأخرى.	*الزوان المعمر والزوان الإيطالي*
***T. horrida*(ج)**	(ناضج أقل من 25)	28–24	بني كستنائي من فاتح إلى داكن وقد يكون شبه كامد	مستدير إلى شبه مستدير	موجود ويمتد إلى أطراف الأشواك، ما بين الشفاف والملوّن	1.5 إلى 3 ميكرومتر يكون عادة منحنيا ويظهر على شكل صفائح متعددة الأضلاع حين ينظر إليها من السطح.	*مختلف أنواع الأرز*
T. ehrhartae(د)	25–17	لا بيانات	بني زيتوني داكن جدا حين يكون ناضجا. قد يكون كامدا بسبب اسوداد الصفائح.	مستدير إلى شبه مستدير	موجود، يمتد إلى قمة الأشواك أو حتى ما بعدها بقليل	1– 2.5 ميكرومتر أشواك أسطوانية الشكل أو مخرزية نوعا ما. حين ينظر إليها من السطح نادرا ما تكون مخية الشكل. ولديها صفائح عريضة وحادة متعددة الأضلاع. حين ينظر إليها من الوسط يتراوح الشكل بين المبتور بشكل عريض أو المدور بشكل طفيف عند القمة.	*Ehrharta calycina*

الحواشـــي: (أ) بناء على Inman وآخرين (2003). (ب) بناء على Castlebury، 1998؛ Milbrath وآخرين، 1998؛ Castlebury وCarris، 1999؛ Cunfer وCastlebury، 1999. (ج) بـالنســـبـة إلى *T. barclayana*: Durán وFischer، 1961؛ CMI، 1965؛ Durán، 1987؛ Castlebury وCarris، 1999. بالنسبة إلى *T. horrida*: Khanna وPayak ، 1968؛ Aggarwal وآخرين، 1998. (د) Pascoe وآخرون، 2005.

4–2–2 إنبات الأنواع المشابهة من النخريات

لدى استنبات، ينتج نخرا *T. walkeri* و*T. indica* مستعمرات متشابهة جدا. على أجار دكستروز البطاطا، وبعد 14 يوما على حرارة 19 درجة مئوية والتعرض للضوء 12 ساعة، ينتج النوعان عادة مستعمرات قشرية غير منتظمة بطيئة النمو يتراوح لونها بين الأبيض والقشدي ويبلغ قطرها تقريبا بين 4 و6 مليمترات (الشكل 9). في مقابل ذلك، تنمو الاستنباتات المشابهة لنخر *T. horrida* بوتيرة أبطأ بكثير (لا يتعدى قطر المستعمرة الـ 2 إلى 3 مليمترات) بسبب الحرارة المثلى الأعلى التي تهصعا. ويمكن لعزلات *T. horrida* أن تنتج أيضا صبغا أرجوانيا ضاربا إلى الحمرة (الشكل 9)، على كل من أجار دكستروز البطاطا ومرقه..

4–2–3 استخلاص البوغات النهائية فرادى

بعد تفحص البوغات النهائية وتسجيل سماتها المظهرية تترك الشريحة لكي تجف جيدا، مع الساترة أو بدونها. وحين تزال الساترة عنها، توضع على الشريحة رأسا على عقب كي يمكن التحقق من وجود البوغات النهائية الملتصقة بها.

على شريحة أخرى، توضع قطعة واحدة من الساترة، تم الحصول عليها عبر تقطيعها إلى أجزاء صغيرة (1× 1 ملم^2) بعد أن يكون قد تم تعقيمها (التعقيم الموصد على حرارة 121 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة أو وضعها في فرن على حرارة 170 درجة مئوية لمدى ساعتين). توضع قطرة من الحمض الدارئ التريس إثيلين دياميين تترا أسيتيك بمقدرا 1 ميكرولتر على تلك القطعة من الساترة. وتحت إما مركب أو مجهر للتشريح، يتم رفع بوغ نهائي فردي واحد بواسطة إبرة رفيعة جدا ووضعه في القطرة الصغيرة للحمض الدارئ. وهكذا يتفشى البوغ النهائي في القطرة. وبواسطة الكلاّب، توضع قطعة صغيرة معقمة أخرى من الساتر فوقها بحيث تكون ما يشبه الشطيرة. يتم سحق البوغ النهائي بواسطة الكلاّب من أجل الضغط على الساتر ومن ثم تنقل الشطيرة الزجاجية إلى أنبوب لتفاعل البلمرة المتسلسل سعة 0.2 مل. ويتم سحق الساتر مرة أخرى بواسطة طرف الماصّة (Tan وآخرون، 2009)...
أما الإجراءات التي تعقب ذلك فموصوفة تحت القسم 4–3–4–1.

4–3 التحديد الجزيئي لهوية النخر

هناك عدد من أساليب الفحص الجزيئي المتاحة لتحديد هوية فطر النخر الهندي *T. indica*. يمكن استخدام أي من الأساليب الموصوفة أدناه، ولكن من الضروري الحصول على مواد مرجعية (ضوابط إيجابية) من خبراء في هذا المجال (راجع القسم 6)..
إن البروتوكولات الثلاثة الأولى الموصوفة فيما يلي ناجعة غير أنها تعتمد على إنبات البوغات النهائية لكي يتم استخراج ما يكفي من الحمض النووي من الأفطورة المنتجة. قد يستغرق إنبات البوغات النهائية حتى 3 أسابيع من الوقت. وقد وجد Peterson وآخرون (2000) أن متوسط معدل إنبات البوغات النهائية يبلغ 55 في المائة ما يخفض بشدة من احتمال تحديد البوغات النهائية بواسطة تلك الأساليب الثلاثة للفحص الجزيئي. وقد تم وصف بروتوكول جزيئي رابع كذلك لا يعتمد على إنبات البوغات النهائية.

توجد فوارق تشخيصية ملحوظة بين كل من *T. indica* و*T. walkeri* و*T. horrida* على مستوى حمضها النووي المتقدري. فقد تم تحديد أشكال متعددة بين الأنواع المختلفة بواسطة أساليب تفاعل البلمرة المتسلسل المختلفة، بما فيها ذلك التضخيم العشوائي للحمض النووي المتعدد الأشكال، وتعدد الأشكال لطول جزء القطع، وتعدد الأشكال لطول الجزء المضخم (Laroche وآخرون، 1998؛ Pimentel وآخرون 1998). في المنطقتين 1 و2 لمباعد النسخ الداخلي في الحمض النووي الريبي يوجد ما يزيد عن 98 في المائة من التشابه بين تسلسلي *T. walkeri* و*T. indica* (Levy وآخرون، 2001). غير أنه ضمن المنطقة لمباعد النسخ الداخلي ITS1، ينطوي *T. walkeri* على موقع مهم تشخيصيا لقطع الأنزيم (Sca1) وهو غير موجود في *T. indica* أو *T. horrida* أو غيرهما من الأنواع المرتبطة بها ارتباطا وثيقا (Levy وآخرون، 2001؛ Pimentel وآخرون، 1998). ولقد أتاحت الفوارق في تسلسل الحمض النووي المتقدري تصميم البادئات المرتبطة بالأنواع المحددة لكل من *T. indica* و *T. walkeri* (Frederick وآخرون، 2000). يمكن استخدام هذه البادئات في التحاليل التقليدية لتفاعل البلمرة المتسلسلة، في نظام ®TaqMan إلى جانب المسبار (Frederick وآخرون، 2000)، أو الاختبار المتعدد المباشر بواسطة 5 مسبارات (Tan وآخرون، 2009).

4–3–1 تحليل أنزيم القطع لمنطقة ITS1

إن منطقة الجينات المستخدمة هي منطقة مباعد النسخ الداخلي لجينة الحمض النووي الريبي (Pimentel وآخرون، 1998). يتضمن أمبليكون تفاعل البلمرة المتسلسل المنتج كلا من منطقتي ITS1 و ITS2 والجزء المحفوظ 5.8S. وهذا الأمبليكون مكون تقريبا من 670 زوجا أساسيا بما في ذلك تسلسلات البادئات. أما الأوليغونكليوتيدات المستخدمة لفطر النخر الهندي *T. indica* فهي:

البادئة الأمامية ITS1 (5′-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3′)

البادئة العسكية ITS4 (5′-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3′) (White وآخرون، 1990).

يتم استخراج الحمض النووي من الأفطورة. وهذا يتم إما عن طريق طحن الأفطورة بواسطة جرن ومدقة أو عبر وضع 0.1 غرام تقريبا من الأفطورة في أنبوب معقم سعة 2 مل للطرد المركزي الأصغر ثلثه ممتلئ بخرزات زجاجية معقمة بحجم 0.5 ملم و1 مل من المياه الصالحة للتحاليل الجزيئية. ويتم ختم هذا الأنبوب بغطاء لولبي يحتوي حلقة مطاطية وهزه في خلاط الخرزات أو آلة Lyser Tissue بربع طاقتها لمدة 5 دقائق. ومن ثم تترك العينة المطحونة لتستريح مدة 30 ثانية وبعد ذلك يستخرج الحمض النووي منها بواسطة عدة خاصة بالمختبر لاستخراج الحمض النووي من الفطريات. لا حاجة إلى تنظيف الحمض النووي. يتم استخدام الحمض النووي المستخرج على الفور ويحفظ خلال الليل على حرارة 4 درجات مئوية أو يخزن على حرارة 20 درجة مئوية تحت الصفر للفترات الأطول.

إن تفاعل البلمرة المتسلسل لإنتاج أمبليكون القطع يستخدم المزيج الرئيسي التالي (التركيز لكل 50 ميكرولترا من التفاعل الوحيد): 1 x دارئ تفاعل البلمرة المتسلسل (يحتوي على 1.5 مللي مولر من كلوريد المغنيسيوم (Applied

Biosystems))[1] ، 0.2 مللي مولر من كل dNTP، 1.25 ميكرولتر AmpliTaq (5 وحدات/ميكرولتر) (Applied Biosystems)[1]، 0.5 ميكرومتر لكل بادئة و1 ميكرولتر من الحمض النووي المستخرج. أما بارامترات تدوير تفاعل البلمرة المتسلسل فهي: 94 درجة مئوية لتغيير الخاصيات الطبيعية لدقيقتين؛ 30 دورة من 94 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة، 54 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة و72 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة وخطوة تمديد على حرارة 72 درجة مئوية لمدة 10 دقائق.

تم قطع أمبليكون تفاعل البلمرة المتسلسل كما يلي: خليط القطع (التركيز لكل 20 ميكرولترا من التفاعل الوحيد): 7.3 ميكرولتر من المياه الصالحة للتحاليل الجزيئية، 2.0 ميكرولتر من دارئ القطع (Promega) [2] 0.2 ميكرولتر من ألبومين المصل البقري (10 ميكروغرام/ميكرولتر)، 0.5 ميكرولتر من أنزيم القطع (إما *Taq*1 وإما *Sca*1 عند 10 وحدات/ميكرولتر) (Promega) [2] و10.0 ميكرولتر من محلول أمبليكون الحمض النووي النظيف بحسب ما أنتج آنفا (حمض نووي أكثر من 50 نانوغراما/ميكرولتر). يتم تحضين هذه المزيج لمدة 3 ساعات على حرارة 37 درجة مئوية ومن ثم يخلط التفاعل برفق بواسطة الانقلاب خلال التحضين. تخزن المنتجات المقطوعة على 4 درجات مئوية قبل تظهيرها على الهلام. وحين تدعو الحاجة، يتم تحميل 10 ميكرولترات من منتج التفاعل ويزود بعلامة مناسبة ويوضع على هلام بنسبة 2 في المائة.

تعتبر نتيجة الاختبار إيجابية لـ*T. indica* بحال تم قطع عينات الفحص المضخمة بواسطة أنزيم القطع *Taq*1 لتعطي 5 منتجات (عند 60 و70 و110 و170 و260 زوجا أساسيا) وحين لا يكون هناك أي قطع بواسطة *Sca*1. يتم الحصول على نتيجة إيجابية لـ*T. walkeri* بحال تم قطع عينات الفحص المضخمة بواسطة *Taq*1 لتعطي الأجزاء الخمسة نفسها كما في حالة *T. indica* ولكن *Sca*1 يقطع المنتجات المضخمة ليعطي جزئين اثنين: أحدهما بـ 140 زوجا أساسيا وثانيهما بـ 520 جزءاً أساسيا. وفي حال انبثقت المنتجات المضخمة عن *T. Horrida* فإن Taq1 سينتج 4 أجزاء من الحمض النووي (60 و110 و150 و235 زوجا أساسيا) فيما لا ينتج Sca1 أي قطع. وتعطي الأنواع الأخرى للنخريات أنماطا مختلفة للقطع بواسطة هذين الأنزيمين أو الأنزيمات الأخرى (Pimentel وآخرون، 1998).

4–3–2 تحليل تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدي باستخدام البادئات المرتبطة بالأنواع المحددة

صمم هذا الاختبار Frederick وآخرون (2000) باستخدام الحمض النووي المتقدري[3] لإنتاج أمبليكون بـ 414 زوجا أساسيا. أما الأليغونكليوتيدات المستخدمة لـ *T. indica* فهي:

---

[1] إن استخدام منتجات العلامة التجارية Biosystems في هذا البروتوكول التشخيصي لا يعني أية موافقة عليها بهدف إقصاء منتجات أخرى قد تكون مناسبة هي أيضا. وقد أوردنا هذه المعلومة لإفادة مستخدمي هذا البروتوكول ولكن ذلك لا يشكل مصادقة من جانب هيئة تدابير الصحة النباتية على المواد الكيميائية و/أو الكاشفة و/أو المعدات الوارد ذكرها. ويمكن استعمال منتجات مكافئة لها في حال أثبت أنها تؤدي إلى النتائج نفسها.

[2] إن استخدام منتجات العلامة التجارية Promega في هذا البروتوكول التشخيصي لا يعني أية موافقة عليها بهدف إقصاء منتجات أخرى قد تكون مناسبة هي أيضا. وقد أوردنا هذه المعلومة لإفادة مستخدمي هذا البروتوكول ولكن ذلك لا يشكل مصادقة من جانب هيئة تدابير الصحة النباتية على المواد الكيميائية و/أو الكاشفة و/أو المعدات الوارد ذكرها. ويمكن استعمال منتجات مكافئة لها في حال أثبت أنها تؤدي إلى النتائج نفسها.

[3] قدم Ferreira وزملاؤه إلى بنك الجينات أرقام الدخول AF218058 وAF218059 وAF218060. لا يتماثل هذا التسلسل المتقدري كثيرا مع تسلسل الحمض النووي المتقدري لـ*T. indica* ذات رقم الدخول DQ993184: إذ تبين نتائج BLAST حوالي 30 في المائة من التماثل فقط. إن التركيبة الأساسية لمحتوى AT في الحمض النووي المتقدري أعلى من محتواه من GC الذي يتراوح عادة بين 30 و40 في المائة (Kurtzman، 1985)، غير أن محتوى الـAT في التسلسلات الثلاثة في بنك الجينات التي قدمها Ferreira وزملاؤه تبلغ 43.5 في المائة وهذا أدنى من محتوى GC (56.55 في المائة). (ج) لا تستطيع البادئتان TIN3/Tin4 تضخيم الحمض النووي المتقدري لينتج

البادئة الأمامية Tin 3 (5′-CAA TGT TGG CGT GGC GC-3′)

البادئة العكسية Tin 4 (5′-CAA CTC CAG TGA TGG CTC CG-3′)

يتم استخراج الحمض النووي من الأفطورة. ويجري ذلك عن طريق طحن أفطورة زنتها 0.5 إلى 1.0 غرام في أنبوب للطرد المركزي الأصغر سعة 1.5 مل مع دارئ للانحلال، ومن ثم طحنها مرة أخرى بواسطة مدقة معقمة متصلة بمثقاب كهربائي. تضاف كمية أخرى قدرها 75 ميكرولترا من دارئ الانحلال قبل استخراج الحمض النووي بواسطة عدّة خاصة بالمختبر لاستخراج الحمض النووي للفطريات. لا حاجة إلى تنظيف الحمض النووي. يستخدم الحمض النووي المستخرج على الفور فيحتفظ به ليلا على حرارة 4 درجات مئوية، أو يخزّن على حرارة 20 درجة مئوية تحت الصفر للفترات الأطول.

يستعين تفاعل البلمرة المتسلسل لهذا الاختبار بالمزيج الرئيسي التالي (التركيز لكل 25 ميكرولترا من التفاعل الوحيد): 1 x دارئ تفاعل البلمرة المتسلسل (يحتوي على 10 مللي مولار من حمض Tris-HCl، و50 مللي مولار من كلوريد البوتاسيوم (رقمه الهيدروجيني 8.3)، و1.5 مللي مولار من كلوريد المغنيسيوم و0.001 في المائة من (كتلة/حجم) الجيلاتين؛ dATP وdGTP وdCTP وdTTP كل منها بتركيز 0.1 ميكرومتر؛ وكل بادئة بتركيز 0.1 ميكرومتر؛ و0.5 وحدة من بوليمراز الحمض النووي *AmpliTaq*؛ و0.1 ميكرولتر من الحمض النووي المستخرج الذي تم الحصول عليه بالطريقة الموصوفة آنفا. أما بارامترات دورات تفاعل البلمرة المتسلسل فهي: تغيير الخاصيات الطبيعية على حرارة 94 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة؛ و25 دورة على حرارة 94 درجة مئوية لـ15 ثانية، و65 درجة مئوية لـ15 ثانية و72 درجة مئوية لـ15 ثانية وخطوة تمديد على حرارة 72 درجة مئوية لـ6 دقائق.

على النحو المطلوب، يتم تحميل 10 ميكرولترات من ناتج التفاعل مع وضع علامة مناسبة عليه واستعماله على 2 في المائة من هلام الأجاروز.

عند إجراء الاختبار *للكشف عن T. walkeri*، يتم استبدال البادئة Tin 3 بـ0.1 ميكرولتر بالبادئة الأمامية Tin11 (5′- TAA TGT TGG CGT GGC AT-3′) (25 ميكرومترا). وهذا ينتج أمبليكونا من 414 زوجا أساسيا.

تنتج التفاعلات الإيجابية أمبليكونا واحدا من 414 زوجا أساسيا لكل من فطر النخر الهندي *T. indica* (البادئتان Tin 4/Tin 3) و*T. walkeri* (البادئتان Tin11/Tin4). إذا كانت البادئتان الخاصتان بـ *T. walkeri* و *T. indica* لا تؤديان إلى نتائج إيجابية لعينات الاختبار (ولكن إذا كانت عينات المراقبة الإيجابية للحمض النووي إيجابية)، فهذا يعني أن مستخرجات العينة تنتمي إلى أنواع أخرى من النخريات مثل *T. horrida*. قد يتيح تحليل أنزيم القطع لتحديد المزيد من الأنواع انطلاقا من تلك العينات إذا لزم الأمر (القسم 4–3–1).

من جهة أخرى لا يمكن التوصل إلى أي تضخيم انطلاقا من الحمض النووي السيئ النوعية. ويمكن التحقق من ذلك خلال اختبار مستخرجات مع البادئتين العامتين (ITS1 وITS4) الموصوفتين في القسم 4–3–1. وإذا كانت العينات

الأمبليكون المرغوب حين تكون البادئات مستخلصة من الحمض النووي المتقدري المستخرج والمنقى لـ*T. indica*. وبالتالي فإن التسلسلات الثلاثة المقدمة تشير إلى الحمض النووي الجينومي.

تحتوي على حمض نووي ذي نوعية جيدة، وبالتالي إذا لم تكن العينات المختبرة تعود لـــــ *T. indica* أو *T. walkeri* بل لأنواع أخرى من النخريات، فيمكن عندئذ إنتاج مجموعة واحدة (مكونة من حوالي 670 زوجا أساسيا) عندما توضع أمبليكونات تفاعل البلمرة المتسلسل على هلام الأجاروز. وإذا استمر التضخيم متعذرا فينبغي استخراج حمض نووي جديد واختباره من جديد.

4–3–3 فحص تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام بادئات خاصة بأنواع محددة ومسبار فلوري

صمم هذا الاختبار Frederick وآخرون (2000) باستخدام الحمض النووي الجينومي لإنتاج أمبليكون من 212 زوجا أساسيا. أما الأليغونوكليوتيدات المستخدمة لـT. indica فهي:

البادئة الأمامية Tin 3 (5′-CAA TGT TGG CGT GGC GC-3′)

البادئة العسكية Tin 10 (5′-AGCTCCGCCTCAAGTTCCTC-3′)

مسبار RT: مسبار TaqMan® (10 ميكرومترات) (Applied Biosystems1): 5′-(FAM label)-ATT CCC GGC TTC GGC GTC ACT-(TAMRA quencher)-3′.

يتم استخراج الحمض النووي من الأنسجة الأفطورية كما هو موضح في القسم 4–3–2.

يستخدم تفاعل البلمرة المتسلسل لهذا الاختبار المزيج التالي (التركيز لكل 25 ميكرولترا من التفاعل الوحيد: 1 × TaqMan®، المزيج الرئيسي العام Universal Master Mix، 0.4 ميكرومتر لأي من البادئات Tin3/Tin10 أو Tin11/Tin10 و4 ميكرومترات من المسبار، 12.5 نانوغراما من الحمض النووي الجينومي لكل من الاختبارين الخاصين بـT. indica وT.walkeri (الذي تم الحصول عليه وفقا للطريقة الموصوفة في القسم 4–3–2). أما بارامترات دورات تفاعل البلمرة المتسلسل فهي: 50 درجة مئوية لمدة دقيقتين، و95 درجة مئوية لمدة 10 دقائق، و34 دورة على حرارة 95 درجة مئوية لمدة 15 ثانية، و60 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة.

يجب استعمال أنابيب التفاعل والأغطية التي تتيح النظر من أجل التمكن من مراقبة حصول التضخيم في الوقت الحقيقي.

عند إجراء الاختبار المتعلق بـــــ T. walkeri، تستبدل Tin 3 بمقدار 1.0 ميكرولتر من البادئة الأمامية Tin11 (5′-TAA TGT TGG CGT GGC AT-3′) (25 ميكرومترا)، ما ينتج أمبليكونا من 212 زوجا أساسيا.

يولد فطر النخر الهندي T. indica تضخيما مع البادئتين Tin 3/Tin 10 وكذلك T. walkeri مع البادئتين Tin 11/Tin 10. أما إذا لم تولّد أية من البادئتين تضخيما على الرغم من أن عينات المراقبة تتفاعل بحسب ما هو متوقع، فيعتبر أن مستخرجات العينة تنتمي إلى نوع آخر من النخريات مثل T. horrida ولدى إجراء الاختبار المتعلق بـT. indica مع حد للدورة بالنسبة إلى العينة يفوق الـ33، تشير النتيجة إلى أنه سلبي لـT. indica من المحتمل جدا أنه يتعلق بنوع آخر من النخريات. وبالمثل، لدى إجراء الاختبار المتعلق بـT. walkeri، إذا كان حد الدورة يفوق الـ33 وكانت النتيجة سلبية بالنسبة إلى T. walkeri فهناك أرجحية عالية بأنه يتعلق بنوع آخر من النخريات. وقد يمكن

تحليل أنزيم القطع من تحديد المزيد من الأنواع انطلاقا من تلك العينات إذا لزم الأمر (القسم 4–3–1).

لا يمكن لأي تضخيم أن ينجم عن الحمض النووي السيئ النوعية. ويمكن التحقق من ذلك عبر اختبار مستخرجات بواسطة البادئتين العامتين (أي ITS1 وITS4) الموصوفتين في القسم 4–3–1. وإذا كانت العينات تحتوي حمضا نوويا جيد النوعية ولم تشر عينات الاختبار إلى وجود T. indica أو T. walkeri بل إلى نوع آخر من النخريات فحينئذ يمكن إنتاج مجموعة واحدة (حوالي 670 زوجا أساسيا) مع استعمال أمبليكونات تفاعل البلمرة المتسلسل على هلام الأجاروز. وفي حال استمر التضخم متعذرا، يتوجب استخراج حمض نووي جديد واختباره من جديد.

تبيّن أن حدود الحساسية لكل من تحليلي T. indica وT. walkeri تضاهي 5 بيكوغرامات من مجمل الحمض النووي. هذا التركيز ينتج مستويات قابلة للرصد من الفلورة (Frederick وآخرون، 2000). وقد اختبرت صلة الاختبارين بهذين النوعين مقارنة بحمض نووي مستخرج من T. barclayana وTilletia tritici وTilletia laevis وTilletia controversa وTilletia fusca . ولم تتضخم أية من تلك العزلات في أي من الاختبارين المحددين لـT. indica أو T. walkeri (Frederick وآخرون، 2000).

4–3–4 تفاعل البلمرة المتسلسل بالوقت الحقيقي على البوغات النهائية

صمّم هذا الاختبار Tan وآخرون (2009) من أجل استخدام منطقة ITS التي تطرأ بين الوحدة النووية الفرعية الكبيرة والصغيرة للحمض النووي الريبي. وقد تبين أن أنواع النخريات تضم منطقتين متفاوتتين (أي ITS1 وITS2) تفصل بينهما جينة 5.8S المحفوظة للحمض النووي الريبي (Levy وآخرون، 2001؛ Tan وMurray، 2006). وقد صمم هذا البروتوكول من أجل تضخيم الحمض النووي الخاص بالنخريات في المقام الأول ومن ثم استخدام تفاعل البلمرة المتسلسل بالوقت الحقيقي والمسبارات الفلورية من أجل تحديد أنواع النخريات. وقد تم استهداف منطقة ITS1 في الحمض النووي الريبي من أجل تصميم الاختبار المتعدد الطبقات؛ تحليل فلوري خماسي الطبقات لتفاعل البلمرة المتسلسل من أجل التحديد الوثيق لأنواع النخريات المرصودة في الحبوب.

يضاف قاسم مستخلص من خليط التفاعل إلى أنبوب تفاعل البلمرة المتسلسل (من القسم 4–2–3) وبالاستعانة بطرف الماصة نفسها يتم سحق الشطيرة الزجاجية إلى أجزاء من أجل تحرير مادة البوغ. ومن المهم الحرص على عدم جرح أنبوب تفاعل البلمرة المتسلسل خلال عملية السحق.

4–3–4–1 تضخيم الحمض النووي للنخريات قبل الانتقال إلى تنفيذ تفاعل البلمرة المتسلسل بالوقت الحقيقي

ينفذ تضخيم الحمض النووي لأنواع النخريات المختلفة بواسطة البادئتين MK56، (5’-gta ggt gaa cct gcg gaa gga 3′-) (Tan وآخرون، 1996) وTilletia-R (5’-caa gag atc cgt tgt caa aag ttg-3′) (Tan وMurray، 2006). تتم كل عملية لتفاعل البلمرة المتسلسل في 20 ميكرولترا (تفاعل وحيد) يحتوي 1.5 مللي مولر من كلوريد المغنيسيوم و200 ميكرومتر من كل من الديوكسينوكليوتيدات الأربعة أي dATP وdTTP وdCTP وdGTP و0.5 ميكرومتر من كل

من زوج البادئتين و0.5 وحدة من بوليمراز الحمض النووي Taq (Invitrogen) [4] و1 x مادة دارئة (50 مللي مولر Tris (الرقم الهيدروجيني 9.0) و20 مللي مولر من كلوريد الصوديوم و1 في المائة من التريتون x-100 و0.1 في المائة من الجيلاتين).

إن بارامترات الدورات الحرارية هي كالتالي: دورة أولية على حرارة 95 درجة مئوية لمدة 3 دقائق؛ و20 دورة على حرارة 94 درجة مئوية لمدة 20 ثانية، و63 درجة مئوية لمدة 30 ثانية و72 درجة مئوية لمدة 30 ثانية مع خفض حرارة التحمية بنسبة درجة مئوية واحدة عن كل دورة لـ5 دورات إلى 59 درجة مئوية وأخيرا فترة تحضين من 10 دقائق ودقيقة واحدة تباعا على حرارة 72 درجة مئوية ومن ثم 4 درجات مئوية.

يمكن تخزين المنتجات المقطوعة على حرارة 4 درجات مئوية. في حال تظهيرها على الهلام، يتم تحميل 10 ميكرولترات من ناتج التفاعل وتزويده بعلامة مناسبة ووضعه على 2 في المائة من هلام الأجاروز. أما حجم الجزء المتوقع فهو 260 زوجا أساسيا. غير أن هذا الجزء لن يكون مرئيا في حال نفذ تفاعل البلمرة المتسلسل على بوغ نهائي واحد إذ لن تكون هناك كمية كافة من الحمض النووي المتاح.

4–3–4–2 اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل الفلوري الخماسي الطبقات بالوقت الحقيقي لغايات تحديد النوع

تنفذ اختبارات تفاعل البلمرة المتسلسل بالوقت الحقيقي بواسطة المسبارات الثنائية الوسم وبادئات الأليغونوكليوتيد (الجدول 3) للتفاعلات من 20 ميكرولترا داخل أنابيب للطرد المركزي سعة 0.1 مل في آلة Rotor-Gene 6000 (Qiagen)[5]. يتكون المزيج الخماسي الطبقات من ImmoBuffer1 × (Bioline6، 5 مللي مولر من كلوريد المغنيسيوم، و200 ميكرومتر من كل من الديوكسينوكليوتيدات الأربعة dATP وdTTP وdCTP وdGTP ووحدة واحدة من بوليمراز الحمض النووي Immolase™ (Bioline)[6] و0.2 ميكرومتر و0.4 ميكرومتر و0.9 ميكرومتر من كل من المسبارات الثنائية الوسم والبادئات الأمامية الأربع والبادئات العكسية الأربع، تباعا (الجدول 3). أما الحمض النووي النموذج فعبارة عن 1 ميكرولتر من ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل من تضخيم تفاعل البلمرة المتسلسل للحمض النووي الخاص بالنخريات (القسم 4–3–4–1).

إن بارامترات الدورات الحرارية عبارة عن دورة أولية على حرارة 95 درجة مئوية لمدة 10 دقائق تليها 40 دورة من 94 درجة مئوية لمدة 15 ثانية و65 درجة مئوية لمدة 60 ثانية، مع خفض حرارة التحمية بنسبة درجة مئوية واحدة لكل دورة، لـ6 دورات إلى 60 درجة مئوية. يتم استعمال خيار تطبيع الأنبوب الديناميكي من أجل تحديد الخلفية المتوسطة

[4] إن استخدام منتجات العلامة التجارية Invitrogen في هذا البروتوكول التشخيصي لا يعني أية موافقة عليها بهدف إقصاء منتجات أخرى قد تكون مناسبة هي أيضا. وقد أوردنا هذه المعلومة لإفادة مستخدمي هذا البروتوكول ولكن ذلك لا يشكل مصادقة من جانب هيئة تدابير الصحة النباتية على المواد الكيميائية و/أو الكاشفة و/أو المعدات الوارد ذكرها. ويمكن استعمال منتجات مكافئة لها في حال أثبت أنها تؤدي إلى النتائج نفسها.

[5] إن استخدام منتجات العلامة التجارية Qiagen في هذا البروتوكول التشخيصي لا يعني أية موافقة عليها بهدف إقصاء منتجات أخرى قد تكون مناسبة هي أيضا. وقد أوردنا هذه المعلومة لإفادة مستخدمي هذا البروتوكول ولكن ذلك لا يشكل مصادقة من جانب هيئة تدابير الصحة النباتية على المواد الكيميائية و/أو الكاشفة و/أو المعدات الوارد ذكرها. ويمكن استعمال منتجات مكافئة لها في حال أثبت أنها تؤدي إلى النتائج نفسها.

[6] إن استخدام منتجات العلامة التجارية Bioline في هذا البروتوكول التشخيصي لا يعني أية موافقة عليها بهدف إقصاء منتجات أخرى قد تكون مناسبة هي أيضا. وقد أوردنا هذه المعلومة لإفادة مستخدمي هذا البروتوكول ولكن ذلك لا يشكل مصادقة من جانب هيئة تدابير الصحة النباتية على المواد الكيميائية و/أو الكاشفة و/أو المعدات الوارد ذكرها. ويمكن استعمال منتجات مكافئة لها في حال أثبت أنها تؤدي إلى النتائج نفسها.

لكل عينة فردية قبل ابتداء عملية التضخيم. تسجل بيانات الفلورة على 5 قنوات: أخضر وأصفر وبرتقالي وأحمر وقرمزي.

تراوحت نسبة الحساسية لاختبار البوغات الفردية بين 10 و40 في المائة (أي من أصل بوغات T. indica فقط 10 إلى 40 في المائة أدت إلى نتائج إيجابية من حيث تفاعل البلمرة المتسلسل) (TanوWright، 2009). وتنشأ هذه الحساسية من عدد من الأسباب بما في ذلك أن كل بوغات T. indica والحبوب المنخورة يجب أن تعقم بشكل موصد مرتين ولذا قد يكون قد طرأ انحلال على المادة الوراثية. وقد تم التحقق من خاصية المسبار الخاص بـ T. indica في خليط من الحمض النووي العائد لـ T. indica أو T. walkeri أو T. ehrhartae أو T. caries بنسب تتراوح بين 0.1 : 1 بيكوغرام و1 : 0.1 بيكوغرام (يشار إلى نطاق التركيز المناسب من تحليل البوغات الفردية). وقد تم اختبار خاصية البادئات فتبين أنها لا تتفاعل مع الأنواع الأخرى من النخريات.

يجب توليد المنحنيات القياسية لكل كشف خاص بكل نوع من الأنواع بحسب ما هو موصوف في دراسة Tan وآخرين (2009) باستخدام التركيزات المعروفة للحمض النووي لأنواع النخريات. أما قيمة حد الدورة (قيمة الدورة حيث منحنى التضخيم يتخطى الحد) التي يتم التوصل إليها فتستخدم لتحديد الحد الخاص بكل أنواع النخريات الخاضعة للفحص. وبشكل عام فإن قيمة حد الدورة التي تفوق تلك المحددة في هذه الخطوة، تعتبر نتيجة سلبية.

الجدول 3. التسلسلات وتعديلات البادئات والمسبارات المستخدمة في اختبار التشخيص الفلوري لتفاعل البلمرة المتسلسل المتعلق بـT. indica وغيرها من أنواع النخريات

الهدف	القناة	(التعديلات 5′، 3′)	أزواج البادئات (التسلسل 5′–3′)
T. indica	أخضر	ACGGAAGGAACGAGGC (nt. 105–120) (6-FAM, BHQ1)	KB-DL-For: CTTCGGAAGAGTCTCCTT (nt. 64–81[أ]) KB-DL- Rev: CCGGACAGGTACTCAG (nt. 127–142)
T. walkeri	أصفر	ACGGAAGGAACAAGGC (nt. 67–82[ب]) (JOE, BHQ1)	
T. horrida (بعض السلالات لم يتم رصدها)	برتقالي	CAACCCAGACTACGGAGGGTGA (nt. 60–81) (CAL Fluor Red 610, BHQ2)	Hor-DL-For: GGCCAATCTTCTCTACTATC (nt. 40–59[ج]) Hor-DL-Rev: CCGGACAGGATCACTA (nt. 87–102)
مجال عريض[1]	أحمر	AGAGGTCGGCTCTAATCCCATCA (nt. 75–97) (Quasar 670, BHQ2)	Tri-DL-For: ATTGCCGTACTTCTCTTC (nt. 56–73[د]) Tri-DL-Rev: GTAGTCTTGTGTTTGGATAATAG (nt. 99–112)
T. ehrhartae	قرمزي	CAGAGTCATTGGTTCTTCGGAGC (nt. 104–126) (Quasar 705, BHQ2)	Ehr-DL-For: CGCATTCTTATGCTTCTTG (nt. 72–90[ه]) Ehr-DL-Rev: GTTAGGAACCAAAGCCATC (nt. 128–146)

ملاحظات: إن أرقام دخول بنك الجينات هي أAF398434 وبAF310180 وجAF310171 ودAF398447 وهـAY770433. ترد قائمة المواد المرجعية المستخدمة ومكان المنشأ في Tan وآخرين (2009) والمواد موجودة في معهد

إليزابيث مكارثر الزراعي، إدارة نيو ساوث ويلز للصناعات الأولية في أستراليا (أنظر القسم 6، جهات الاتصال، nt، نكليوتيد).

يشمل ذلك T. caries 1 وT. laevis وT. controversa وT. fusca وT. bromi وT. goloskokovii .

5– السجلات

راجع القسم 2–5 في المعيار الدولي رقم 27: 2006 من أجل الاطلاع على قائمة المعلومات التي يجب تسجيلها والاحتفاظ بها.

ينبغي أن يشمل تقرير التشخيص عدد العينات الفرعية الإيجابية وعدد البوغات النهائية المقدر التي اكتشفت في كل عينة فرعية إيجابية. وإذا تم الحصول على مستزرعات من التحليل الجزيئي فإنه يجب وصف مظهر المستعمرة ولا سيما أي اصطباغ ومعدل نموها ضمن الظروف المحددة. ويجب الاحتفاظ بالمستزرعات (يمكن للأفطورات من المرقات أو السدادات الأفطورية من أطباق الأجار أن تخزن مجمدةً على حرارة 80 تحت الصفر).

6– جهات الاتصال للمزيد من المعلومات

يمكن الحصول على المزيد من المعلومات من:

وزارة الزراعة والأغذية، حكومة أستراليا الغربية، جنوب بيرث، WA 6151، أستراليا (السيدة Dominie Wright؛ البريد الإلكتروني: dominie.wright@agric.wa.gov.au رقم الهاتف: 3875 9368 8 61+؛ رقم الفاكس: 2658 474 8 61 +).

معهد إليزابث مكارثر الزراعي، إدارة نيو ساوث ويلز للصناعات الأولية، كامدن، NSW 2570، أستراليا (الدكتور Mui-Keng)؛ البريد الإلكتروني: mui-keng.tan@idpi.nsw.gov.au.

مختبر التفتيش والحجر النباتي، مكتب التفتيش والحجر على الوارد والصادر في شنزن، شنزن، 518045 مقاطعة غوانغدونغ، الصين (الدكتور Guiming Zhang؛ البريد الإلكتروني: zgm2001cn@yahoo.com.cn؛ الهاتف: 1148 8211 755 86+؛ الفاكس: 8630 2558 755 86+).

وزارة الزراعة للولايات المتحدة الأمريكية، شعبة البحوث الزراعية، منطقة شمال الأطلسي، فورت دتريك، ماريلاند 21702، الولايات المتحدة الأمريكية (السيد Gary Peterson، البريد الإلكتروني: gary.peterson@ars.usda.gov).
شعبة تفتيش صحة الحيوان والنبات لدى وزارة الزراعة الأمريكية، ريفردايل، ماريلاند، الولايات المتحدة الأمريكية (الدكتور Mary Palm؛ البريد الإلكتروني Mary.E.Palm@aphis.usda.gov)
شعبة تفتيش صحة الحيوان والنبات لدى وزارة الزراعة الأمريكية، بلتسفيل، ماريلاند، الولايات المتحدة الأمريكية (الدكتور John McKemy؛ البريد الإلكتروني John.M.McKemy@aphis.usda.gov)

وكالة البحوث الغذائية والبيئية، يورك YO41 1LZ، المملكة المتحدة (الدكتور Kelvin Hughes)؛ البريد الإلكتروني: (Kelvin.Hughes@fera.gsi.gov.uk)

ويمكن أن تقدِّم المنظمات الوطنية لوقاية النباتات أو المنظمات الإقليمية لوقاية النباتات أو الأجهزة التابعة لتدابير 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 أساس هذا البروتوكول بالأصل A.J. Inman وK.J.D. Hughes وR.J. Bowyer من وكالة البحوث الغذائية والبيئية في يورك، المملكة المتحدة عام 2003. وقد خضع هذا البروتوكول للاختبار الحلقي في مختبرات أوروبية[7] (Riccioni وآخرون، 2002) وقد شكل أساس بروتوكول منظمة وقاية النباتات في أوروبا والبحر المتوسط (2007) PM 7/29(2)

وقد تم تعزيز البروتوكول من قبل D.G. Wright، وزارة الزراعة والأغذية، حكومة أستراليا الغربية، بيرث، أستراليا، وK.J.D Hughes ، وكالة البحوث الغذائية والبيئية، يورك، المملكة المتحدة وG. Zhang ، مختبر التفتيش والحجر النباتي، شنزن، الصين، وقد قام V. Cockerell قسم العلوم والمشورة للزراعة الاسكتلندية، إدنبرة، المملكة المتحدة بمراجعة هذا البروتوكول.

8- المراجع

Agarwal, V.K. & Mathur, S.B. 1992. Detection of karnal bunt in wheat seed samples treated with fungicides. FAO Plant Protection Bulletin, 40: 148–153.

Aggarwal, R., Joshi, L.M. & Singh, D.V. 1990. Morphological differences between teliospores of Neovossia indica and N. horrida. Indian Phytopathology, 43: 439–442.

Bonde, M.R., Nester, S.E., Khayat, A., Smilanick, J.L., Frederick, R.D. & Schaad, N.W. 1999. Comparison of effects of acidic electrolyzed water and NaOCl on Tilletia indica teliospore germination. Plant Disease, 83: 627–632.

Carris, L.M., Castlebury, L.A. & Goates, B.J. 2006. Nonsystemic bunt fungi – Tilletia indica and T. horrida: A review of history, systematics, and biology. Annual Review of Phytopathology, 44: 113–133.

Castlebury, L.A. 1998. Morphological characterisation of Tilletia indica and similar fungi. In V.S. Malik & D.E. Mathre, eds. Bunts and smuts of wheat: An international symposium, pp. 97–105. Ottawa, North American Plant Protection Organization. 445 + xv pp.

Castlebury, L.A. & Carris, L.M. 1999. Tilletia walkeri, a new species on Lolium multiflorum and L. perenne. Mycologia, 91: 121–131.

CMI (Commonwealth Mycological Institute). 1965. Tilletia barclayana. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 75. Wallingford, UK, CAB International.

[7] A. Radova، الإدارة الحكومية للصحة النباتية، أولوموك، الجمهورية التشيكية؛ I. Vloutoglou، معهد بيناكي لأمراض الصحة النباتية، أثينا، اليونان؛ A. Porta-Puglia، المعهد الاختباري للأمراض النباتية، روما، إيطاليا؛ C. Montuschi، إدارة الصحة النباتية الإقليمية، بولونيا، إيطاليا؛ I. van Brouwershaven، المنظمة الوطنية لوقاية النباتات، فاخنينغن، هولندا؛ M. de Jesus Gomes وE. Diogo وM.R. Malheiro، المديرية العامة لحماية المزروعات، لشبونة، البرتغال؛ V. Cockerell، قسم العلوم والمشورة للزراعة الاسكتلندية، إدنبرة، المملكة المتحدة؛ A. Barnes، وكالة البحوث الغذائية والبيئية، يورك، المملكة المتحدة.

CMI (Commonwealth Mycological Institute). 1983. Tilletia indica. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 748. Wallingford, UK, CAB International.

Crous, P.W., Jaarsveld, A.B. van, Castlebury, L.A., Carris, L.M., Frederick, R.D. & Pretorius, Z.A. 2001. Karnal bunt of wheat newly reported from the African continent. Plant Disease, 85: 561.

Cunfer, B.M. & Castlebury, L.A. 1999. Tilletia walkeri on annual ryegrass in wheat fields in the south-eastern United States. Plant Disease, 83: 685–689.

Durán, R. 1987. Ustilaginales of Mexico: Taxonomy, symptomatology, spore germination, and basidial cytology. Seattle, Washington State University. 331 + xvi pp.

Durán, R. & Fischer, G.W. 1961. The genus Tilletia. Seattle, WA, Washington State University. 138 pp.

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2007. Diagnostic protocols for regulated pests. PM 7/29(2). Tilletia indica. OEPP/EPPO Bulletin, 37: 503–520.

Frederick, R.D., Snyder, K.E., Tooley, P.W., Berthier-Schaad, Y., Peterson, G.L., Bonde, M.R., Schaad, N.W. & Knorr, D.A. 2000. Identification and differentiation of Tilletia indica and T. walkeri using the polymerase chain reaction. Phytopathology, 90: 951–960.

Fuentes-Davila, G. 1996. Karnal bunt. In R.D. Wilcoxson & E.E. Saari, eds. Bunt and smut diseases of wheat: Concepts and methods of disease management, pp. 26–32. Mexico, DF, International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT). 74 pp.

Inman, A.J., Hughes, K.J.D. & Bowyer, R. 2003. Protocol for extracting teliospores from untreated seed or grain by size-selective sieving. In: EU recommended protocol for the diagnosis of a quarantine organism: Tilletia indica, pp. 21–26. UK Department for Environment, Food and Rural Affairs, DIAGPRO (EU Project on Diagnostic Protocols). 38 pp. Available at http://www.fera.defra.gov.uk/plants/planthealth/pestsdiseases/documents/protocols/tipro.pdf (accessed on 03 October 2010).

ISPM 27. 2006. Diagnostic protocols for regulated pests. Rome, IPPC, FAO.

Khanna, A. & Payak, M.M. 1968. Teliospore morphology of some smut fungi. II. Light microscopy. Mycologia, 60: 655–662.

Kurtzman, C.P. 1985. Molecular taxonomy of the fungi. pp 35–63. In W. Bennett & L.L. Lasure, eds. Gene manipulations in fungi. Orlando, FL, Academic Press, Inc. 558 pp.

Laroche, A., Gaudet, D.A., Despins, T., Lee, A. & Kristjansson, G. 1998. Distinction between strains of Karnal bunt and grass bunt using amplified fragment length polymorphism (AFLP). In V.S. Malik & D.E. Mathre, eds. Bunts and smuts of wheat: An international symposium, p. 127. Ottawa, North American Plant Protection Organization. 445 + xv pp.

Levy, L., Castlebury, L.A., Carris, L.M., Meyer, R.J., Pimentel, G. 2001. Internal transcribed spacer sequence-based phylogeny and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism differentiation of Tilletia walkeri and T. indica. Phytopathology, 91: 935–940.

Mathur, S.B. & Cunfer, B.M. 1993. Karnal bunt. In S.B. Mathur and B.M. Cunfer, eds. Seed-borne diseases and seed health testing of wheat, pp. 31–43. Frederiksberg, Denmark, Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries. 168 pp.

Milbrath, G.M., Pakdel, R. & Hilburn, D. 1998. Karnal bunt spores in ryegrass (Lolium spp.). In V.S. Malik & D.E. Mathre, eds. Bunts and smuts of wheat: An international symposium, pp. 113–116. Ottawa, North American Plant Protection Organization. 445 + xv pp.

Pascoe, I.G., Priest, M.J., Shivas, R.G., Cunnington, J.H. 2005. Ustilospores of Tilletia ehrhartae, a smut of Ehrharta calycina, are common contaminants of Australian wheat grain, and a potential source of confusion with Tilletia indica, the cause of Karnal bunt of wheat. Plant Pathology, 54: 161–168.

Peterson, G.L., Bonde, M.R. & Phillips, J.G. 2000. Size-selective sieving for detecting teliospores of Tilletia indica in wheat seed samples. Plant Disease, 84: 999–1007.

Pimentel, G., Carris, L.M., Levy, L. & Meyer, R. 1998. Genetic variability among isolates of Tilletia barclayana, T. indica and allied species. Mycologia, 90: 1017–1027.

Riccioni, L., Valvassori, M., Inman, A.J., Hughes, K.J., Bowyer, R.J., Barnes, A.V., Montuschi, C. 2002. International validation of a diagnosis protocol for Tilletia indica [Triticum - Secale - × Triticosecale]. Internal report. Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale, Rome.

Sansford, C.E., Baker, R.H.A., Brennan, J.P., Ewert, F., Gioli, B., Inman, A.J., Kinsella, A., Magnus, H., Miglietta, F., Murray, G.M., Porta-Puglia, A., Porter, J.R., Rafoss, T., Riccioni, L. & Thorne, F. 2008. The new pest risk analysis for Tilletia indica, the cause of Karnal bunt of wheat, continues to support the quarantine status of the pathogen in Europe. Plant Pathology, 57: 603–611.

Smith, O.P., Peterson, G.L., Beck, R.J., Schaad, N.W. & Bonde, M.R. 1996. Development of a PCR-based method for identification of Tilletia indica, causal agent of Karnal bunt of wheat. Phytopathology, 86: 115–122.

Tan, M.-K. & Murray, G.M. 2006. A molecular protocol using quenched FRET probes for the quarantine surveillance of Tilletia indica, the causal agent of Karnal bunt of wheat. Mycological Research, 110: 203–210.

Tan, M.-K., Timmer, L.W., Broadbent, P., Priest, M. & Cain, P. 1996. Differentiation by Molecular Analysis of Elsinoe spp. Causing Scab Diseases of Citrus and Its Epidemiological Implications. Phytopathology 86:1039–1044.

Tan, M.-K. & Wright, D.G. 2009. Enhancing the detection of Tilletia indica, the cause of Karnal bunt. Final report. CRC20004: Karnal bunt detection. Canberra, CRC National Plant Biosecurity. 63 pp.

Tan, M.-K., Ghalayini, A., Sharma, I., Yi J., Shivas, R., Priest, M. & Wright, D. 2009. A one-tube fluorescent assay for the quarantine detection and identification of Tilletia indica and other grass bunts in wheat. Australasian Plant Pathology, 38: 101–109.

USDA (United States Department of Agriculture). 2007. Karnal bunt manual. Frederick, MD, USDA. 160 pp. Available at http://www.aphis.usda.gov/import_export/plants/manuals/online_manuals.shtml (accessed February 2012).

White ,T.J., Bruns, T., Lee S. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White, eds. PCR protocol: A guide to methods and applications, pp. 315–322. London, Academic Press. 482 pp.

Wiese, M.V., ed. 1987. Compendium of wheat diseases, 2nd ed. Saint Paul, MN, APS Press. 112 pp.

Wright, D., Murray, G. & Tan, M.-K. 2003. National diagnostic protocol for the identification of Tilletia indica, the cause of Karnal bunt. Perth, Australia, Department of Agriculture and Food, Government of Western Australia.

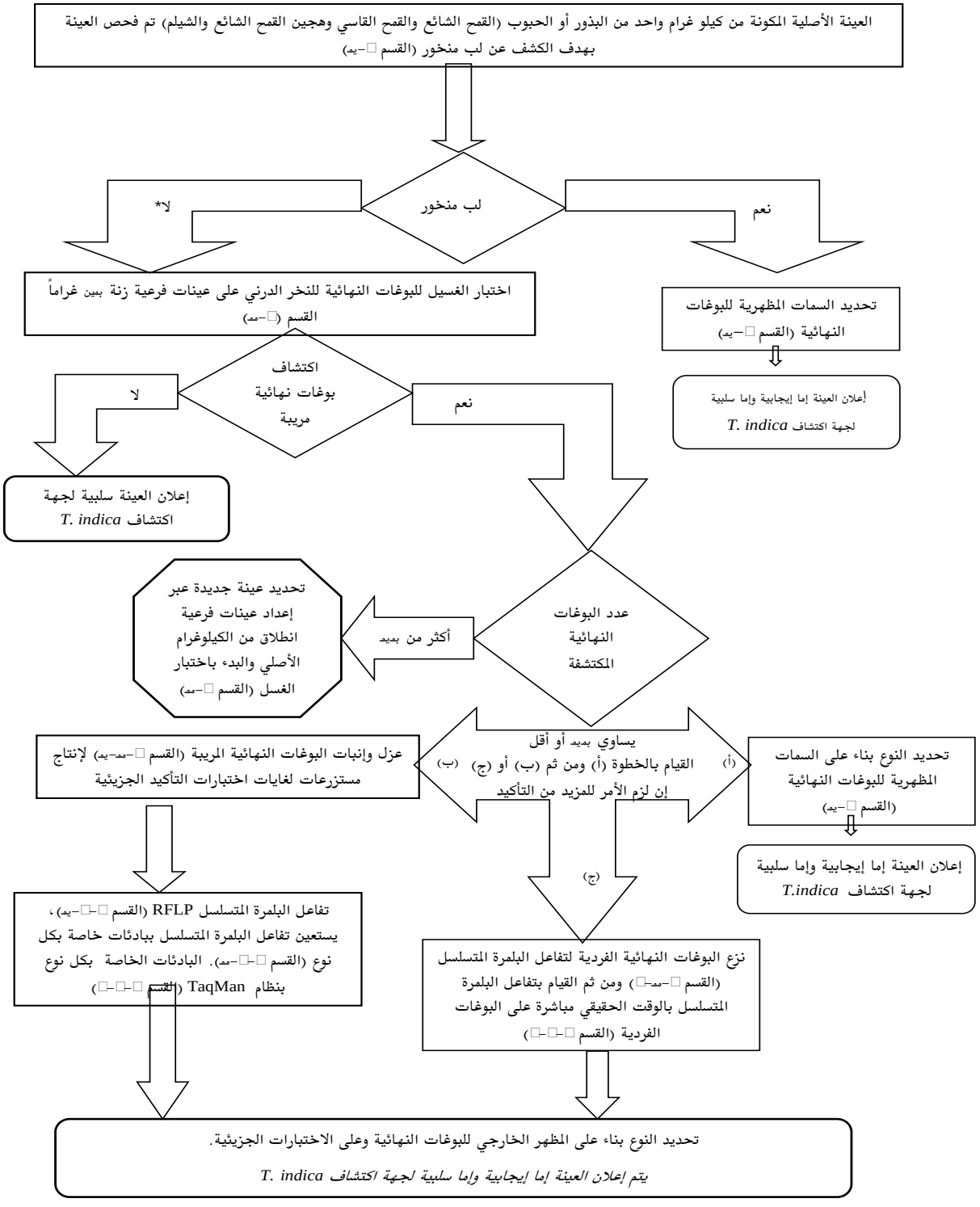
9– الأشكال

الشكل 1– رأس قمح مصاب تظهر عليه أعراض نخر كارنال

الصورة مقدمة من وزارة الزراعة والأغذية، حكومة أستراليا الغربية.

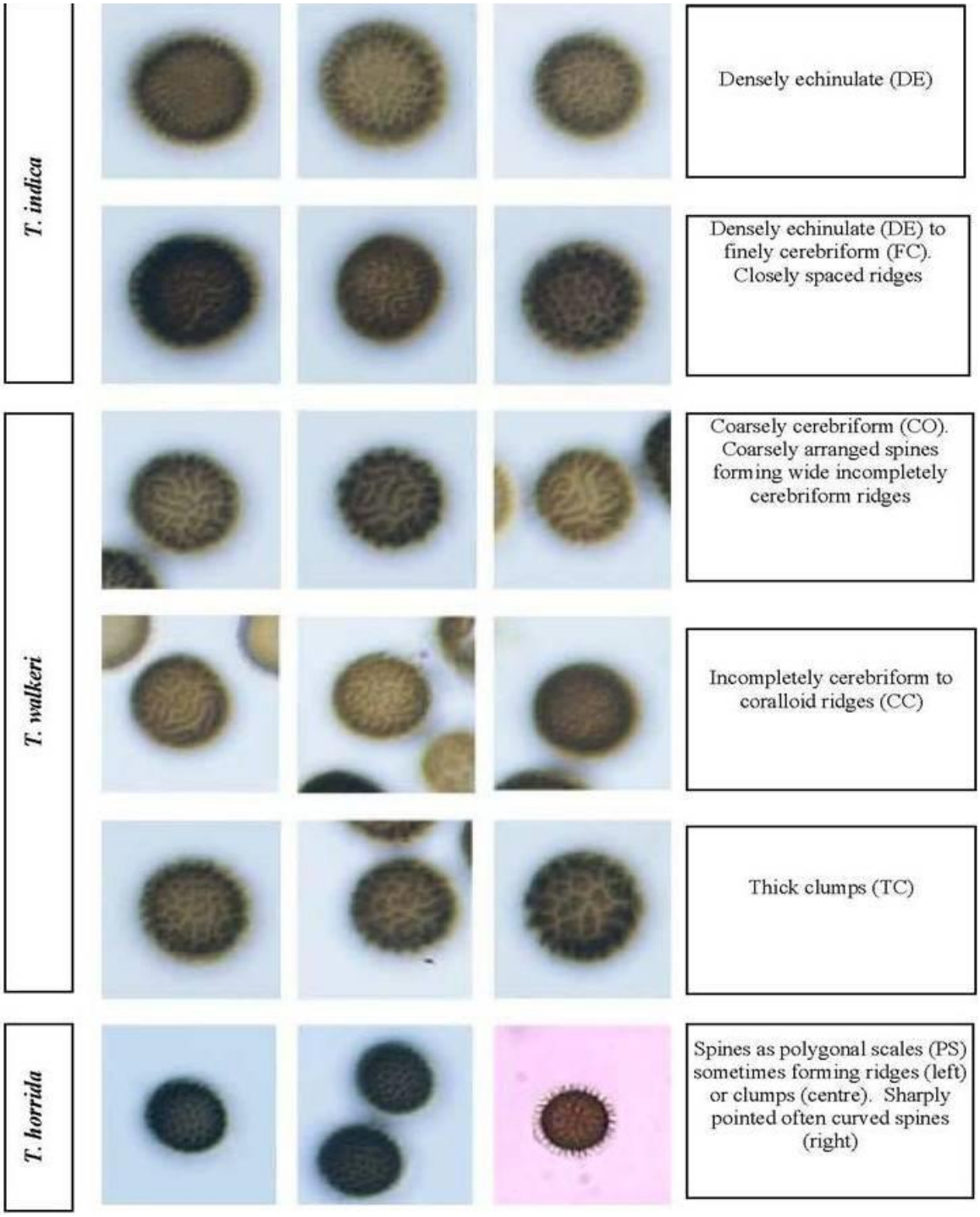
الشكل 2– حبوب قمح مصابة تظهر عليها أعراض نخر كارنال

الصورة مقدمة من وزارة الزراعة والأغذية، حكومة أستراليا الغربية.



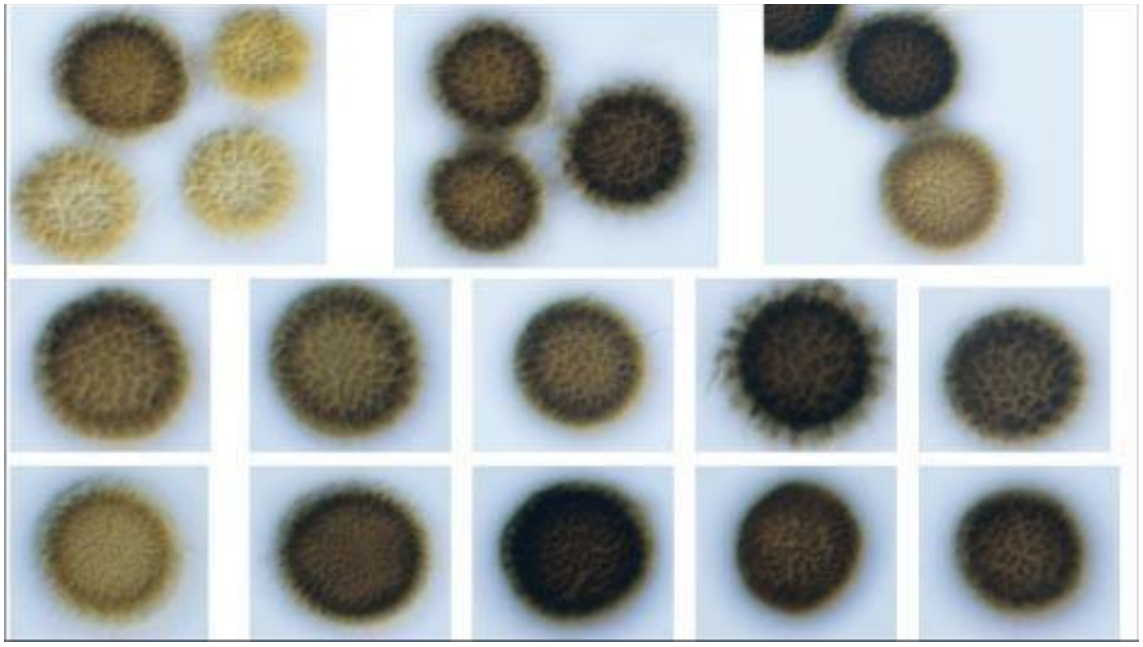
*حين لا يوجد لب منخور يمكن الاعتبار أن *T.indica* غير موجودة

الشكل 3– مخطط بياني يظهر العملية المعتمدة لكشف فطر النخر الهندي Tilletia indica في عينات البذور والحبوب. RFLP، تعدد أشكال طول جزء القطع.



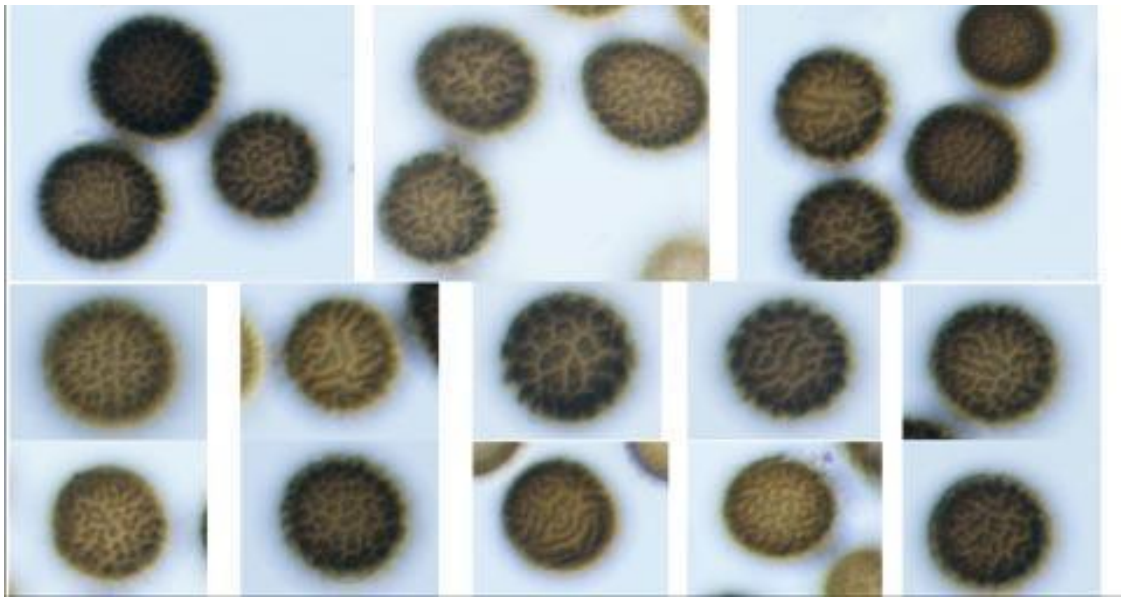
الشكل 4– صور توضيحية لزخرفات البوغات النهائية للنخريات. يجب استعمالها بالاقتران مع الجدول 2 (القسم 4–1)

الصور مقدمة من A. Inman، مختبر العلوم المركزي، يورك، المملكة المتحدة.



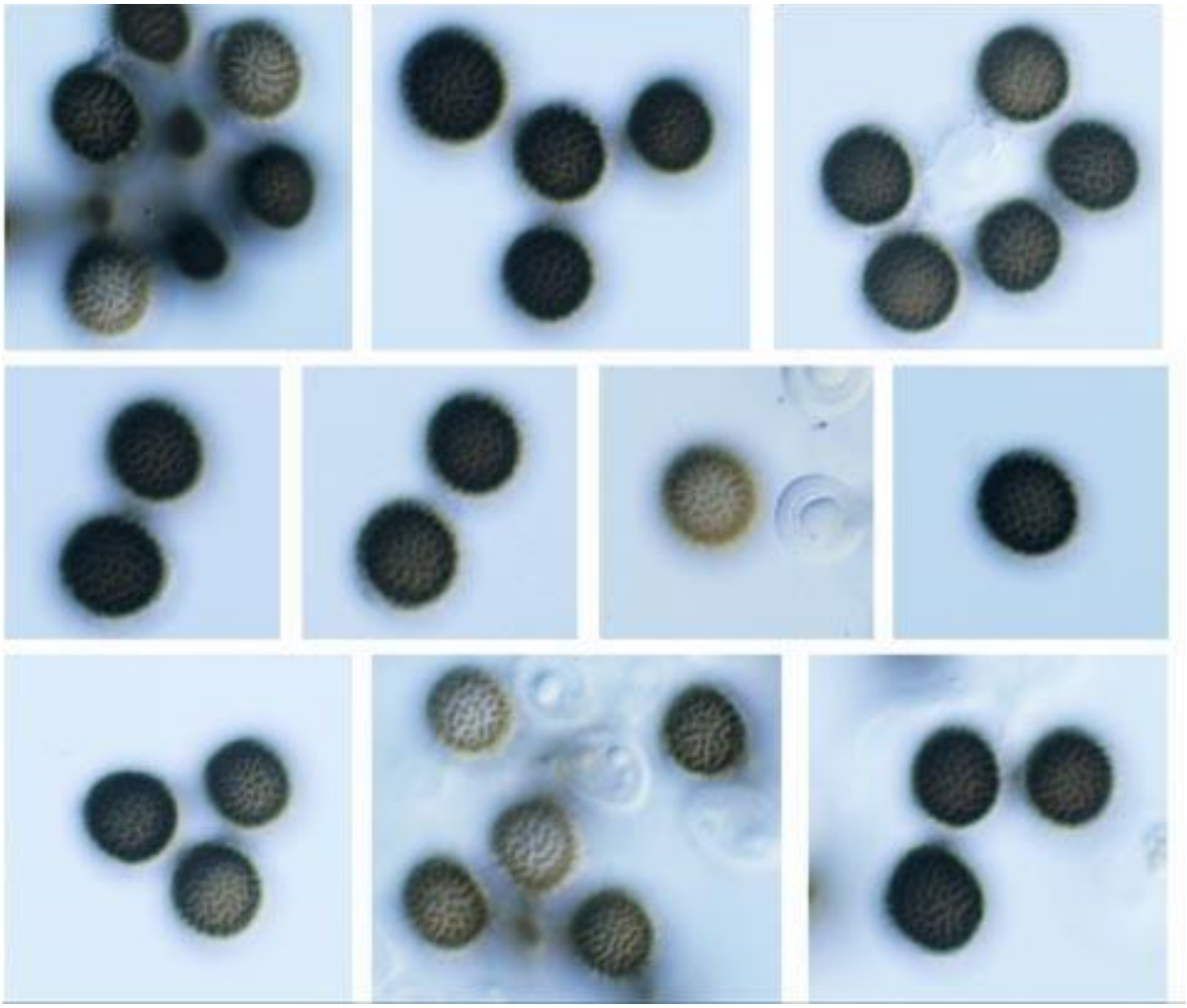
الشكل 5– البوغات النهائية لنخر Tilletia indica تظهر الأنماط الزخرفية السطحية. الأشواك مرتبة بكثافة إما بشكل فردي (شوكاء بكثافة) وإما بشكل نتؤات ضيقة متقاربة (مخية الشكل تقريبا). المقياس: 10 ملم: 17 ميكرومترا.

الصور مقدمة من A. Inman، مختبر العلوم المركزي، يورك، المملكة المتحدة.



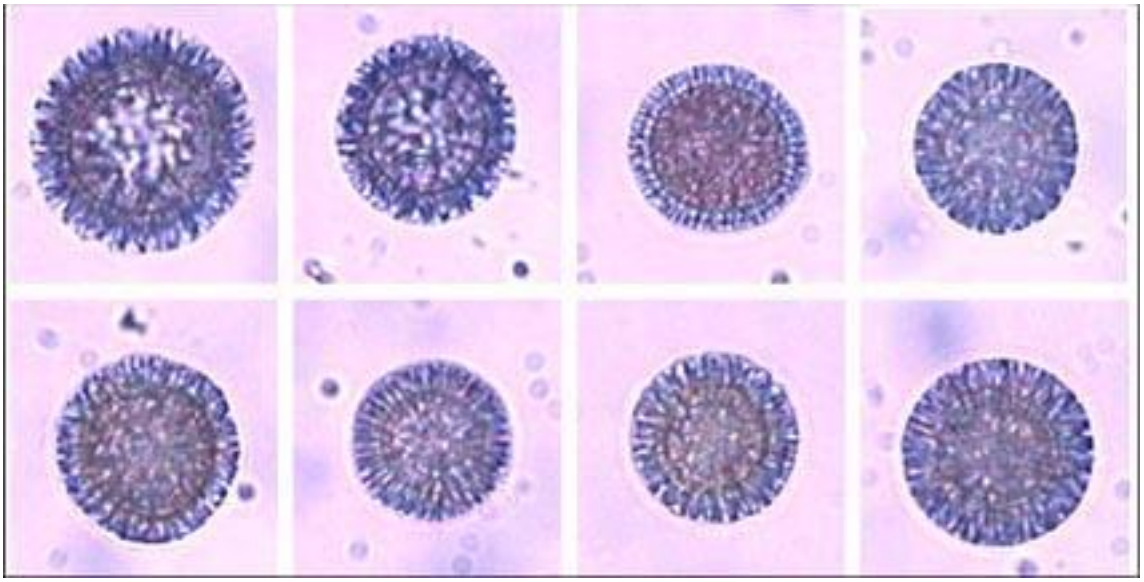
الشكل 6– البوغات النهائية لنخر Tilletia walkeri تظهر أنماطها الزخرفية السطحية. الأشواك مرتبة بخشونة وتتراوح بين أشكال مخية غير مكتملة ونتؤات مرجانية أو تكتلات سميكة. المقياس: 10 ملم= 17 ميكرومترا.

الصور مقدمة من A. Inman، مختبر العلوم المركزي، يورك، المملكة المتحدة.

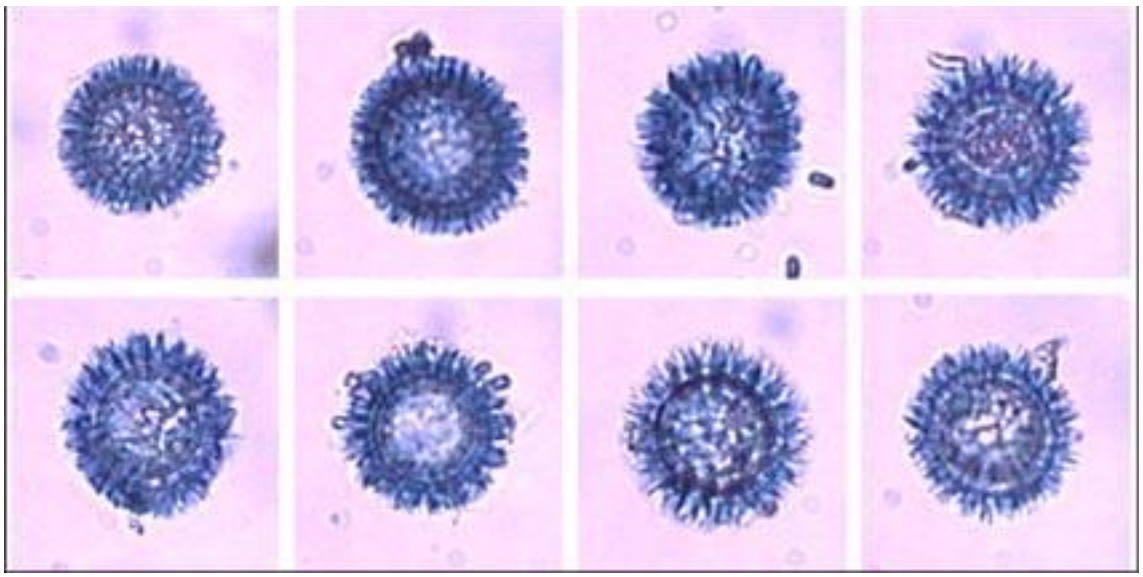


الشكل 7– البوغات النهائية لـــــTilletia horrida تظهر على سطحها أنماط زخرفية. الأشواك مرتبة على شكل قشور مضلعة أو أحيانا على شكل نتؤات مخية. المقياس: 10 ملم = 17 ميكرومترا.

الصور مقدمة من A. Inman، مختبر العلوم المركزي، يورك، المملكة المتحدة.



ألف



باء

الشكل 8– البوغات النهائية لفطر النخر الهندي (ألف) Tilletia indica و(باء) Tilletia walkeri تبين سمات البوغات النهائية حين ينظر إليها من الو سط بعد تبييد ضها ومن ثم صبغها بزرقة اللكتوغليد سرول–التريبان. لاحظ الكفاف الملساء للبوغات النهائية لـــT. indica مقارنة بالكفاف الأقل انتظاما للبوغات النهائية لـــT. walkeri حيث تظهر ثغرات أكثر بروزا بين أشواكها.

الصور مقدمة من A. Inman، مختبر العلوم المركزي، يورك، المملكة المتحدة.

التسلسل التاريخي للمطبوع

هذا ليس جزءا رسميا من المعيار

في مارس/آذار 2006، أضـافت الهيئة في دورتها الأولى موضـوع *Tilletia indica / T. controversa* (2004-014) تحت إطار موضـوع: الفطريات والكائنات الحيّة الشبيهة بالفطريات

في نوفمبر/تشرين الأول 2012، وافقت لجنة المعايير على مشروع لمشاورة الأعضاء من خلال قرار إلكتروني

في يوليو/تموز 2012، أجريت مشاورة الأعضاء

في مايو/أيار 2013، وافقت لجنة المعايير على الاعتماد من خلال قرار إلكتروني (أعيد إلى فريق الخبراء الفني المعني ببروتوكولات التشخيص)

في حزيران/يونيو 2013، تمت عملية التنقيح من قبل فريق الخبراء الفني المعني ببروتوكولات التشخيص

في أكتوبر/تشرين الأول 2013، أرسل إلى لجنة المعايير للموافقة على اعتماده بواسطة قرار إلكتروني

في أكتوبر/تشرين الأول 2013، وافقت لجنة المعايير على المشروع وطرحته لفترة الإبلاغ المحددة بـ45 يوما بواسطة قرار إلكتروني

في ديسمبر/كانون الأول 2013، تمت فترة الإبلاغ المحددة بـ45 يوما

في يناير/كانون الثاني 2014، اعتمدت لجنة المعايير بروتوكول التشخيص نيابة عن الهيئة

في يناير/كانون الثاني 2017، أجرت أمانة الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات تعديلاً تحريرياً في القســم 6**المعيار الدولي لتدابير الصــحة النباتية رقم 27**: 2006: **الملحق 4** فطر النخر الهندي (*Tilletia indica* Mitra) (2014)

آخر تاريخ لتحديث التسلسل التاريخي للمطبوع: يناير/كانون الثاني 2017