

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

المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية رقم 27

بروتوكولات تشخيص الآفات الخاضعة للوائح

البروتوكول التشخيصي 12: البلازما النباتية

اعتمد في 2016؛ نُشر في 2016

المحتويات

- 1- معلومات عن الآفة 2
- 2- معلومات تصنيفية 3
- 3- الكشف وتحديد الهوية..... 3
- 1-3 التفاعل المتسلسل للبوليميراز التقليدي المتداخل 6
- 2-3 التفاعل المتسلسل للبوليميراز في الوقت الحقيقي 7
- 3-3 شواهد الاختبارات الجزيئية..... 9
- 4-3 تفسير نتائج التفاعل المتسلسل للبوليميراز..... 10
- 1-4-3 التفاعل المتسلسل للبوليميراز التقليدي المتداخل 10
- 2-4-3 التفاعل المتسلسل للبوليميراز في الوقت الحقيقي 10
- 5-3 تحليل التسلسل..... 11
- 4- السجلات 11
- 5- جهات الاتصال للحصول على معلومات إضافية..... 12
- 6- التقدير والشكر 12
- 7-المراجع 12

1- معلومات عن الآفة

كان Doi et al. (1967) أول مكتشفي البلازما النباتية خلال بحثهم عن العامل المسبب لاصفرار النجمية. وقد سميت تلك الكائنات وحيدة الخلية، بأشبه المفطورات بسبب تشابهها المورفولوجي بالمفطورات الحيوانية وبسبب شدة تأثيرها بالمضادات الحيوية من نوع تتراسيكلين (Ishie et al., 1967). وتعتبر أنواع البلازما النباتية من الممرضات النباتية الإجبارية البدائية النوى التي تخلو من الجدران الخلوية، وهي متعددة الأشكال ويتراوح متوسط قطرها بين 200 و800 نانومتر. وهي تعيش في الخلايا الغريالية للحاء عوائلها النباتية. وتمتاز البلازما النباتية بجينومات يتراوح حجمها من حوالي 550 إلى 1500 كيلو قاعدة -وهي نسبياً جينومات صغيرة مقارنة ببدايات النوى الأخرى - وهي تفتقر إلى عدة وظائف للتصنيع الحيوي (Marcone et al., 1999؛ Davis et al., 2005؛ Bai et al., 2006؛ Oshima et al., 2013).

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

وقدّر Seemüller et al. (2002) أن هناك حوالي 1000 نوع نباتي يصاب بالبلازما النباتية، وتعتبر معظم عوائله النباتية من ثنائيات الفلقة. وقد اكتشف عدد أقل من أنواع البلازما النباتية لدى وحيدات الفلقة، وغالبية ما تنتمي مثل هذه العوائل إلى فصليتي النخيليات والنجيليات (Seemüller et al. 2002).

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

ويمكن للبلازما النباتية أن تنتقل بواسطة الحشرات الناقلة، ونبات الحامل المتعرّش الطفيلي، والتطعيم، كما يمكن انتشارها عن طريق التكاثر الخضري للأجزاء المصابة من النبتة. وتقتصر الحشرات الناقلة للبلازما النباتية، والمسؤولة عن نسبة كبيرة من انتشارها الطبيعي، على النطاطات الورقية والنطاطات النباتية والبسيلا (نصفيات الأجنحة، عنقيات الخرطوم) التي تتغذى كلها من اللحاء، وتنقل الممرضات بإمعان. ووضع (Weintraub and Beanland 2006) قائمة

اعتمدت لجنة المعايير بالنيابة عن هيئة تدابير الصحة النباتية بروتوكول التشخيص هذا في يناير/كانون الثاني 2016.

هذا الملحق جزء ملزم من المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية رقم 27.

بأكثر من 90 نوعاً يعرف عنه أنه ناقل يمكن لبعضه نقل أكثر من بلازما نباتية واحدة. وثمة طرق أخرى لنقل البلازما النباتية تشمل الانتقال بواسطة نبات الحامول المتعرّش الطفيلي والتطعيم. وتعتبر نباتات الحامول (من نوع *Cuscuta* and *Cassytha* spp.) طفيليات للكروم تمدّ أوعية اتصال بعوائلها من خلال مرآشف. وعندما يقام جسر بين نبات سليم وآخر مصاب بالبلازما النباتية، تنتقل البلازما النباتية إلى النبات السليم عبر قنوات اللحاء الناقلة. ويمكن نقل الآفة بالتطعيم والإكثار الدقيق للنباتات ضمن زراعة الأنسجة، لحفظ البلازما النباتية لأغراض مرجعية (IPWG، بدون تاريخ). يمكن الاطلاع على مزيد من المعلومات حول البلازما النباتية، بما في ذلك صور تظهر الأعراض المرضية وقائمة

بالحشرات الناقلة وقاعدة بيانات عن تصنيف البلازما النباتية، على الموقعين الإلكترونيين التاليين:

COST Action FA0807 Integrated Management of Phytoplasma Epidemics in Different Crop Systems (الإدارة المتكاملة لأوبئة البلازما النباتية في أنظمة المحاصيل المختلفة) (<http://www.costphytoplasma.ipwgnat.org/>)

ومركز موارد البلازما النباتية (<http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/phytoplasma.html>)

2- معلومات تصنيفية

الاسم: البلازما النباتية (الفيتوبلازما)

المترادفات: كائنات مشابهة للمفطورات (MLO)، مفطورات

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

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

3- الكشف وتحديد الهوية

تعتبر تقنيات التفاعل المتسلسل للبوليميراز، الطريقة المختارة لكشف البلازما النباتية. ويعتمد نجاح الكشف الجزيئي للبلازما النباتية على أخذ العينات من الأنسجة النباتية بالطريقة المناسبة، وعلى الطرق الموثوقة لاستخراج حمض النواة (Palmano, 2001؛ Firrao et al., 2007). ويمكن لأنواع البلازما النباتية أن تكون موزعة بشكل غير متجانس

وبمستوى متفاوت على امتداد النبتة وبخاصة في العوائل الخشبية، ويُعتبر النسيج الذي تظهر عليه أعراض الإصابة مثالياً لكشف وجود البلازما النباتية (Constable *et al.*, 2003؛ Garcia-Chapa *et al.*, 2003؛ Christensen *et al.*, 2004؛ Necas and Krška, 2006). ويمكن أن تصاب بعض النباتات العائلة بعدوى عديمة الأعراض، وإذا ما تم الاشتباه بها فمن المهم أخذ العينات بشكل وافٍ من مختلف أنسجة النبتة.

وتؤثر كمية البلازما النباتية الموجودة لدى النبات العائل في موثوقية اختبار التفاعل المتسلسل للبوليميراز (Marzachi, 2004). ويمكن لكمية البلازما النباتية أن تتأثر بسلالتها أو أنواعها وبأنواع النباتات العائلة وتوقيت الإصابة والظروف المناخية. ويعتبر توقيت أخذ عينات من أنسجة النباتات هاماً على اعتبار أن تموضع البلازما النباتية وكميتها في النبات قابلان للتأثر بالتغيرات الموسمية (Seemüller *et al.*, 1984؛ Jaraus *et al.*, 1999؛ Berges *et al.*, 2000؛ Constable *et al.*, 2003؛ Garcia-Chapa *et al.*, 2003؛ Prezelj *et al.*, 2012).

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

وأفيد عن طرق متنوعة لاستخراج الأحماض من النوى بهدف كشف البلازما النباتية بواسطة التفاعل المتسلسل للبوليميراز. وهناك عدد من الطرق التي تستعين بمرحلة للتخصيب من أجل تركيز البلازما النباتية قبل استخراج حمض النوى (Kirkpatrick *et al.*, 1987؛ Ahrens and Seemüller, 1992؛ Prince *et al.*, 1993). ويمكن لهذه التقنيات أن تكون مفيدة في حال العوائل التي توجد فيها البلازما النباتية بكميات متدنية، مثل النباتات الخشبية المعمرة، أو في حال العوائل "الصعبة" التي قد تستخرج، بالاقتران مع استخراج حمض النوى، مستويات مرتفعة من المركبات مثل السكريات المتعددة والبولي فينول القادرة على كبح التفاعل المتسلسل للبوليميراز. ويتم في بعض الطرق المبسطة، طحن الأنسجة النباتية مباشرة في دارئ متحلل متوفر تجارياً، أو في محلول دارئ قائم على بروميد تريميثيلامونيوم سيتيل. ويتم استخدام 2 في المائة من بروميد تريميثيلامونيوم سيتيل (ثبت أنّ المحلول بنسبة 3 في المائة أكثر موثوقية في حال كرمة العنب) (Daire *et al.*, 1997؛ Angelini *et al.*, 2001). ويتم بعد ذلك استخراج الحمض النووي مباشرة من الحلالة باستعمال أعمدة دوران السيليكا المتوفرة تجارياً (Green *et al.*, 1999؛ Palmano, 2001) أو الخرزات المغناطيسية (Mehle *et al.*, 2013) أو باستعمال مذيبات عضوية (Daire *et al.*, 1997؛ Zhang *et al.*, 1998). تنفذ الطريقة التي تستعين بالخرزات المغناطيسية بواسطة جهاز آلي لاستخراج حمض النوى (مثال KingFisher

اعتمدت لجنة المعايير بالنيابة عن هيئة تدابير الصحة النباتية بروتوكول التشخيص هذا في يناير/كانون الثاني 2016.

هذا الملحق جزء ملزم من المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية رقم 27.

من Thermo Scientific¹). وإن غالبية طرق الاستخراج مثبتة الصلاحية بالكامل لمجموعة متنوعة من العوائل النباتية. ويتم اختيار الطريقة تبعاً للعائل قيد الاختبار ومدى توفر المرافق والتجهيزات. وقد يكون من العملي تطبيق طريقة تتضمن مرحلة لتخصيب البلازما النباتية للعوائل الخشبية المعمرة، فيما تطبق طريقة مبسطة للعوائل العشبية. ومن المهم، لإجراء التشخيصات الروتينية، إثبات صلاحية طريقة استخراج العائل المحدد لضمان الموثوقية.

تم تصميم عدد من بادئات التفاعل المتسلسل للبوليميراز الشاملة التي تسمح بتضخيم جينة الحمض النووي الريباسي 16S لأية بلازما نباتية معروفة. البادئتان الأكثر شيوعاً هما P1/P7 (Schneider؛ Deng and Hiruki, 1991) و زوج البوادي R16F2n/R16R2 (Lee *et al.*, 1993؛ Gundersen and Lee, 1996) اللتان يمكن استخدامهما في بروتوكول التفاعل المتسلسل للبوليميراز المتداخل. ويقوم زوج البوادي P1/P7 بتضخيم أحد منتجات التفاعل المتسلسل للبوليميراز الذي يحتوي على جينة الحمض النووي الريباسي 16S كاملةً، فضلاً عن المنطقة المبادعة 16S/23S للحمض النووي الريباسي. أفيد أنّ حساسية التفاعل المتسلسل للبوليميراز في الوقت الحقيقي تفوق أو تضاهي حساسية التفاعل المتداخل وذلك بحسب البلازما النباتية -العائل (Christensen *et al.*, 2004) كما أن هذا التفاعل أكثر قابلية للتحليل ذي الإنتاجية العالية إذ لا داعي للمعالجة بعد المضاعفة. ويعتبر التفاعل المتسلسل للبوليميراز في الوقت الحقيقي باستخدام مسابر TaqMan أكثر تخصصاً كذلك وينطوي على احتمال أقل لانتقال التلوث بين الأدوات والعينات لدى التفاعل المتسلسل للبوليميراز التقليدي ولا سيما التفاعل المتداخل. يمكن ورود نتائج إيجابية كاذبة مع أنواع البكتيريا القريبة جداً من البلازما النباتية، في مقاييسات التفاعل المتسلسل للبوليميراز التي يوصي بها هذا البروتوكول - وهذه مساومة لا غنى عنها من أجل تنفيذ مقاييسات شاملة (Fránová, 2011؛ Pilotti *et al.*, 2014). ومن الممكن تنفيذ مقاييسات أكثر تخصصاً للتفاعل المتسلسل للبوليميراز، أو في حال كانت النتيجة حرجة (مثل عينات الحجر الصحي ما بعد الدخول، والسجل الجديد للعوائل، والتوزيعات الجديدة)، تنبغي سلسلة منتج التفاعل التقليدي.

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

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

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

3-1 التفاعل المتسلسل للبوليميراز التقليدي المتداخل

إن بادئتي التفاعل المتسلسل للبوليميراز المستخدمتين في هذا الاختبار هما P1 (Deng and Hiruki, 1991) و P7 (Schneider *et al.*, 1995) لتفاعل المرحلة الأولى:

P1 (أمامية): 5'-AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T-3'

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

أما بادئتا تفاعل المرحلة الثانية فهما R16F2n (Gundersen and Lee, 1996) و R16R2 (Lee *et al.*, 1993):

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

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

ويتكوّن خليط التفاعل البالغة كميته 20 ميكرو لترًا من دارئ بوليميراز الحمض النووي للمستحرة المائية $1 \times$ الذي يحتوي كلوريد المغنيزيوم 1.5 ميليمولار بمقدار 0.5 ميكرومولار لكل بادئة، ونكليوتيدات ثلاثية الفوسفات 200 ميكرومولار، ووحدة من بوليميراز الحمض النووي للمستحرة المائية ونموذج حمض نووي 2 ميكرو لتر. تتألف أطوار التضخيم من مرحلة تمسيخ أولية عند درجة حرارة 94 درجة مئوية لمدة دقيقتين، تعقبها 40 دورة عند درجة حرارة 94 درجة مئوية لمدة ثلاثين ثانية و 53 درجة مئوية (البادئتان P1/P7) أو 50 درجة مئوية للبادئتين (R16F2n/R16R2) لمدة ثلاثين ثانية و 72 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة، ومرحلة تمديد أخيرة عند درجة حرارة 72 درجة مئوية لمدة عشر دقائق. أما بالنسبة إلى التفاعل المتداخل، فيستخدم 1 ميكرو لتر من منتجات تفاعل المرحلة الأولى إما بشكل غير مذوب وإما مذوب بنسبة تصل إلى 1:30، كنموذج لتفاعل المرحلة الثانية. ومن ثم تحلل منتجات التفاعل بواسطة الرحلان الكهربائي الهلامي. وتنتج البادئتان R16F2n/R16R2 تبعاً أمبليكوناً من 1 800 زوج قاعدة، وأمبليكوناً من 1250 زوج قاعدة.

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

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

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

اعتمدت لجنة المعايير بالنيابة عن هيئة تدابير الصحة النباتية بروتوكول التشخيص هذا في يناير/كانون الثاني 2016.

هذا الملحق جزء ملزم من المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية رقم 27.

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

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

2-3 التفاعل المتسلسل للبوليميراز في الوقت الحقيقي

وينفذ التفاعل المتسلسل للبوليميراز في الوقت الحقيقي باستخدام مقايضة TaqMan المصممة لجينة الحمض النووي الريباسي 28S التي استخدمها *Christensen et al.* (2004):

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

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

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

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

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

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

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

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

ويتكون خليط التفاعل البالغة كميته 25 ميكروترراً من خليط المستحرة المائية الرئيسي $\times 1$ للتفاعل المتسلسل للبوليميراز في الوقت الحقيقي، وبادئة أمامية 300 نانومتر، وبادئة عكسية 300 نانومتر، ومسبار FAM 100 نانومتر، ونموذج حمض نووي 2 ميكروتر. يتم اختبار العينات بنسختين لكل منها. تتألف أطوار عملية التضخيم من مرحلة تمسيخ أولية عند درجة حرارة 95 درجة مئوية لمدة 3 دقائق تعقبها 40 دورة عند درجة حرارة 95 درجة مئوية لمدة 15 ثانية و60 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة. قد تتفاوت أطوار التدوير بتفاوت نوع الخليط الرئيسي المستخدم (فعل سبيل المثال تتطلب بعض الخلائط مرحلة لتفعيل البوليميراز عند درجة حرارة 95 درجة مئوية لمدة 10 دقائق فيما تستوجب الخلائط التي تحتوي على جينة UDG فترة تعليق في البداية عند درجة حرارة 50 درجة مئوية لمدة دقيقتين). تحلل نتائج التفاعل المتسلسل للبوليميراز في الوقت الحقيقي بواسطة البرمجيات المرفقة بالأداة التي تتيحها الشركة المصنعة.

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

تم تقييم طريقة التفاعل المتسلسل للبوليميراز في الوقت الحقيقي لجينة الحمض النووي الريباصي 16S عبر اختبار أنواع للبلازما النباتية من 18 مجموعة فرعية، فتبيّن أنّها بنفس حساسية التفاعل التقليدي المتداخل أو تفوقه حساسية عشر مرات، وذلك تبعاً للبلازما النباتية-العائل (Christensen *et al.*, 2004). وتبيّن من اختبار حلقة لكشف البلازما النباتية في الأشجار المثمرة شارك فيه 22 مختبراً أن مقاييس (Christensen *et al.*, 2004) و (Hodgetts *et al.*, 2009) متشابهتين من حيث الحساسية والخصوصية. (EUPHRESO FruitPhytoInterlab Group, 2011).

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

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

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

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

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

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

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

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

وتتكون خلائط التفاعل الخاصة بطريقة COX وتلك التي تخص مقاييسات جينة الحمض النووي الريباصي 18S، من المكونات نفسها، كما يجري تدويرها ضمن الأطوار نفسها المعتمدة لمقاييس البلازما النباتية في الوقت الحقيقي بحيث يمكن تنفيذ المقاييسين بالتزامن في أنبوبين منفصلين. وكبديل عن ذلك، يجوز تنفيذ مقاييس الرقابة الداخلية على مستويات متعددة في الأنبوب نفسه لمقاييس البلازما النباتية، في حال كان المسبار موسوماً بصبغة مخيرة مختلفة، وشريطة أن تكون كميات البادئات والمسارب في أفضل مستوياتها، للحؤول دون أن تصبح كميات البلازما النباتية أقل بكثير من المستويات المرتفعة للحمض النووي النباتي المستخدم كشاهد داخلي.

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

3-3 شواهد الاختبارات الجزيئية

لكي تعتبر نتيجة الاختبار موثوقة، ينبغي تناول شواهد مناسبة - تبعاً لنوع الاختبار المستخدم ومستوى التأكد المطلوب - لكل سلسلة عزل وتضخيم لحمض نواة الآفة المستهدفة. وبالنسبة إلى التفاعل المتسلسل للبوليميراز، فإن الشاهد الإيجابي للحمض النووي والشاهد الداخلي والشاهد السلبي للتضخيم (بدون شاهد نموذج) هي شواهد الحد الأدنى الواجب استخدامها.

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

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

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

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

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

ومن أجل التفاعل المتسلسل للبوليميراز، يجب اتخاذ الحيطة من أجل تجنب انتقال التلوث جراء الرذاذ الناجم عن الشاهد الإيجابي أو عن العينات الإيجابية. وينبغي للشاهد الإيجابي المستخدم في المختبر أن يُسلسل بحيث يصبح ذلك

التسلسل جاهزاً للمقارنته بسهولة مع التسلسلات التي تم الحصول عليها من أمبليكونات التفاعل ذات الحجم الصحيح. وكبدل عن ذلك، يمكن تكوين شواهد إيجابية مصنّعة ذات تسلسل معروف يمكن أن تقارن بدورها بأمبليكونات التفاعل ذات الحجم المناسب.

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

4-3 تفسير نتائج التفاعل المتسلسل للبوليميراز

1-4-3 التفاعل المتسلسل للبوليميراز التقليدي المتداخل

يعتبر التفاعل المتصل بالمرضات موثقاً به فقط في حال:

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

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

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

2-4-3 التفاعل المتسلسل للبوليميراز في الوقت الحقيقي

يحدد التفاعل المتسلسل للبوليميراز في الوقت الحقيقي ما إذا كانت العينة إيجابية أو سلبية فيما خص إصابتها بالبلازما النباتية. من أجل تحديد هوية البلازما النباتية الموجودة في العينات الإيجابية، ينبغي تنفيذ تفاعل تقليدي من أجل الحصول على طول لا يقل عن 1250 زوج قاعدة من جينة الحمض النووي الريباسي 16S الناتجة عن زوج البادئات

اعتمدت لجنة المعايير بالنيابة عن هيئة تدابير الصحة النباتية بروتوكول التشخيص هذا في يناير/كانون الثاني 2016.

هذا الملحق جزء ملزم من المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية رقم 27.

R16F2n/R16R2 من أجل تحليل السلسلة (انظر القسم 3-5). وبدلاً من ذلك، ولبعض أنواع البلازما النباتية، قد يجوز استخدام مقاييس محددة للتفاعل في الوقت الحقيقي مثلاً، مجموعة (انتشار التفاح) SrX16 (Torres et al., 2005) والاصفرار الذهبي (Pelletier et al., 2009).

3-5 تحليل التسلسل

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

4- السجلات

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

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

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

5- جهات الاتصال للحصول على معلومات إضافية

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

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

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

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

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

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

6- التقدير والشكر

أعدّ المسودة الأولى لهذا البروتوكول التشخيصي L.W. Liefting (مختبر الصحة النباتية والبيئة، وزارة الصناعات الأولية، نيوزيلندا) (انظر القسم السابق)، و P. Jones (قسم تفاعلات ممرضات النبات، معهد البحوث Rothamsted Research، المملكة المتحدة)، و F. Constable (قسم التنمية الاقتصادية والعمل والنقل والموارد، فيكتوريا، أستراليا) (انظر القسم السابق)، و E. Torres (قسم الأراضي والاستدامة، برشلونة، إسبانيا) (انظر القسم السابق)، و W. Jelkmann (المركز الاتحادي للبحوث البيولوجية للزراعة والحراثة، معهد وقاية النباتات ومحاصيل الفاكهة، ألمانيا) (انظر القسم السابق) و J. Verhoeven (شعبة وقاية النباتات، قسم التشخيصات، Wageningen، هولندا).

7- المراجع

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

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

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

- Angelini, E., Clair, D., Borgo, M., Bertaccini, A. & Boudon-Padieu, E.** 2001. Flavescence dorée in France and Italy: Occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma. *Vitis*, 40: 79–86.
- Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S.A., Jancso Radek, A., Shevchenko, D.V., Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J.W. & Hogenhout, S.A.** 2006. Living with genome instability: The adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology*, 188: 3682–3696.
- Berges, R., Rott, M. & Seemüller, E.** 2000. Range of phytoplasma concentration in various hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 90: 1145–1152.
- Christensen, N.M., Nicolaisen, M., Hansen, M. & Schulz, A.** 2004. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 17: 1175–1184.
- Christensen, N.M., Nyskjold, H. & Nicolaisen, M.** 2013. Real-time PCR for universal phytoplasma detection and quantification. In: M. Dickinson & J. Hodgetts, eds. *Phytoplasma: Methods and protocols*. Methods in molecular biology series, Vol. 938, pp. 245–252. New York, NY, Humana Press. 421 pp.
- Constable, F.E., Gibb, K.S. & Symons, R.H.** 2003. Seasonal distribution of phytoplasmas in Australian grapevines. *Plant Pathology*, 52: 267–276.
- Daire, X.D., Clair, D., Reinert, W. & Boudon-Padieu, E.** 1997. Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to the elm yellows group and to the stolbur subgroup by PCR amplification of nonribosomal DNA. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 507–514.
- Davis, R.E., Jomantiene, R. & Zhao, Y.** 2005. Lineage-specific decay of folate biosynthesis genes suggests ongoing host adaptation in phytoplasmas. *DNA Cell Biology*, 24: 832–840.
- Davis, R.E. & Sinclair, W.A.** 1998. Phytoplasma identity and disease etiology. *Phytopathology*, 88: 1372–1376.
- Davis, R.E., Zhao, Y., Dally, E.L., Lee, I.M., Jomantiene, R. & Douglas S.M.** 2013. ‘*Candidatus Phytoplasma pruni*’, a novel taxon associated with X-disease of stone fruits, *Prunus* spp.: multilocus characterization based on 16S rRNA, *secY*, and ribosomal protein genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 766–776.
- Deng, S. & Hiruki, C.** 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable Mollicutes. *Journal of Microbiological Methods*, 14: 53–61.
- Doi, Y.M., Teranaka, M., Yora, K. & Asuyama, H.** 1967. Mycoplasma or PLT-group like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches’ broom, aster yellows and paulownia witches’ broom. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 33: 259–266.
- EUPHRESKO FruitPhytoInterlab Group.** 2011. European interlaboratory comparison and validation of detection methods for ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’, ‘*Candidatus Phytoplasma prunorum*’ and ‘*Candidatus Phytoplasma pyri*’: Preliminary results. *Bulletin of Insectology*, 64 (Supplement): S281–S284.
- Firrao, G., Garcia-Chapa, M. & Marzachi, C.** 2007. Phytoplasmas: Genetics, diagnosis and relationships with the plant and insect host. *Frontiers in Bioscience*, 12: 1353–1375.
- Foissac, X. & Wilson, M.R.** 2010. Current and possible future distributions of phytoplasma diseases and their vectors. In P.G. Weintraub & P. Jones, eds. *Phytoplasmas: Genomes, plant hosts, and vectors*, pp. 309–324. Wallingford, UK, CABI. 331 pp.
- Fránová, J.** 2011. Difficulties with conventional phytoplasma diagnostic using PCR/RFLP analyses. *Bulletin of Insectology*, 64 (Supplement): S287–S288.
- Garcia-Chapa, M., Medina, V., Viruel, M.A., Lavina, A. & Batlle, A.** 2003. Seasonal detection of pear decline phytoplasma by nested-PCR in different pear cultivars. *Plant Pathology*, 52: 513–520.

- Green, M.J., Thompson, D.A. & MacKenzie, D.J.** 1999. Easy and efficient DNA extraction from woody plants for the detection of phytoplasmas by polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 83: 482–485.
- Gundersen, D.E. & Lee, I-M.** 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea*, 35: 144–151.
- Guo, Y.H., Cheng, Z.M. & Walla, J.A.** 2003. Rapid PCR based detection of phytoplasmas from infected plants. *HortScience*, 38: 1134–1136.
- Hodgetts, J., Boonham, N., Mumford, R. & Dickenson, M.** 2009. Panel of 23S rRNA gene-based real-time PCR assays for improved universal and group-specific detection of phytoplasmas. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 2945–2950.
- IPWG (International Phytoplasma Working Group).** n.d. Phytoplasma collection web page. Available at http://www.ipwgnet.org/index.php?option=com_content&view=article&id=29&Itemid=5 (last accessed 17 April 2015).
- IRPCM (International Research Programme on Comparative Mycoplasmaology Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma Taxonomy Group).** 2004. 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1243–1255.
- Ishii, T., Doi, Y., Yora, K. & Asuyama, H.** 1967. Suppressive effects of antibiotics of the tetracycline group on symptom development in mulberry dwarf disease. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 33: 267–275.
- Jarausch, W., Lancas, M. & Dosba, F.** 1999. Seasonal colonization pattern of European stone fruit yellows phytoplasmas in different *Prunus* species detected by specific PCR. *Journal of Phytopathology*, 147: 47–54.
- Jomantien, R., Davis, R.E., Maas, J. & Dally, E.** 1998. Classification of new phytoplasmas associated with diseases of strawberry in Florida, based on analysis of 16S ribosomal-RNA and ribosomal-protein gene operon sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 269–277.
- Kirkpatrick, B.C.** 1991. Mycoplasma-like organisms: Plant and invertebrate pathogens. In A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K.-S. Schleifer, eds. *The prokaryotes*, Vol. III, pp. 4050–4067. New York, NY, Springer Verlag.
- Kirkpatrick, B.C., Stenger, D.C., Morris, T.J. & Purcell, A.H.** 1987. Cloning and detection of DNA from a nonculturable plant pathogenic mycoplasma-like organism. *Science*, 238: 197–199.
- Kreader, C.A.** 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1102–1106.
- Lee, I-M., Bottner-Parker, K.D., Zhao, Y., Davis, R.E. & Harrison, N.A.** 2010. Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on *secY* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60: 2887–2897.
- Lee, I-M., Davis, R.E. & Gundersen-Rindal, D.E.** 2000. Phytoplasma: Phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology*, 54: 221–255.
- Lee, I-M., Gundersen-Rindal, D.E., Davis, R.E. & Bartoszyk, I.M.** 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 1153–1169.
- Lee, I-M., Hammond, R.W., Davis, R.E. & Gundersen, D.E.** 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology*, 83: 834–842.
- Lim, P.-O. & Sears, B.B.** 1992. Evolutionary relationships of a plant-pathogenic mycoplasma-like organism and *Acholeplasma laidlawii* deduced from two ribosomal protein gene sequences. *Journal of Bacteriology*, 174: 2606–2611.

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

- Makarova, O., Contaldo, N., Paltrinieri, S., Kawube, G., Bertaccini, A. & Nicolaisen, M.** 2012. DNA barcoding for identification of 'Candidatus Phytoplasmas' using a fragment of the elongation factor Tu gene. *PLoS ONE*, 7: e52092.
- Marcone, C., Neimark, H., Ragozzino, A., Lauer, U. & Seemüller, E.** 1999. Chromosome sizes of phytoplasmas comparing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology*, 89: 805–810.
- Martini, M., Lee, I.-M., Bottner, K.D., Zhao, Y., Botti, S., Bertaccini, A., Harrison, N.A., Carraro, L., Marcone, C., Khan, A.J. & Osler, R.** 2007. Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 2037–2051.
- Marzachi, C.** 2004. Molecular diagnosis of phytoplasmas. *Phytopathologia Mediterranea*, 43: 228–231.
- Mehle, N., Nikolić, P., Rupar, M., Boben, J., Ravnikar, M. & Dermastia, M.** 2013. Automated DNA extraction for large numbers of plant samples. In: M. Dickinson & J. Hodgetts, eds. *Phytoplasma: Methods and protocols*. Methods in molecular biology series, Vol. 938, pp. 139–145. New York, NY, Humana Press. 421 pp.
- Necas, T. & Krska, B.** 2006. Selection of woody indicators and the optimum plant material and sampling time for phytoplasma ESFY detection. *Acta Horticulturae*, 717: 101–105.
- Oshima, K., Maejima, K. & Namba, S.** 2013. Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas. *Frontiers in Microbiology*, doi: 103389/fmicb.2013.00230.
- Palmano, S.** 2001. A comparison of different phytoplasma DNA extraction methods using competitive PCR. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: 99–107.
- Pelletier, C., Salar, P., Gillet, J., Cloquemin, G., Very, P., Foissac, X. & Malembic-Maher, S.** 2009. Triplex real-time PCR assay for sensitive and simultaneous detection of grapevine phytoplasmas of the 16SrV and 16SrXII-A groups with an endogenous analytical control. *Vitis*, 48: 87–95.
- Pilotti, C.A., Saul, J., Liefting, L.W., Kembu, A. & Kokoa, P.** 2014. Occurrence of a phytoplasma associated with bogia coconut syndrome in Papua New Guinea. *Agricultural Science*, 26: 32–40.
- Prezelj, N., Nikolić, P., Gruden, K., Ravnikar, M. & Dermastia, M.** 2012. Spatiotemporal distribution of flavescence dorée phytoplasma in grapevine. *Plant Pathology*, 62: 760–766.
- Prince, J.P., Davis, R.E., Wolf, T.K., Lee, I.-M., Mogen, B.D., Dally, E.L., Bertaccini, A., Credi, R. & Barba, M.** 1993. Molecular detection of diverse mycoplasma-like organisms (MLOs) associated with grapevine yellows and their classification with aster yellows, X-disease, and elm yellows MLOs. *Phytopathology*, 83: 1130–1137.
- Quaglino, F., Zhao, Y., Casati, P., Bulgari, D., Bianco, P.A., Wei, W. & Davis, R.E.** 2013. 'Candidatus Phytoplasma solani', a novel taxon associated with stolbur- and bois noir-related diseases of plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 2879–2894.
- Schneider, B., Gibb, K.S. & Seemüller, E.** 1997. Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology*, 143: 3381–3389.
- Schneider, B., Seemüller, E., Smart, C.D. & Kirkpatrick, B.C.** 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma like organisms or phytoplasmas. In S. Razin & J.G. Tully, eds. *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasma*, Vol. 1, pp. 369–380. San Diego, CA, Academic Press. 483 pp.
- Seemüller, E., Garnier, M. & Schneider, B.** 2002. Mycoplasmas of plants and insects. In S. Razin & R. Herrmann, eds. *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas*, pp. 91–115. New York, NY, Kluwer Academic Publishers/Plenum Publishers. 572 pp.
- Seemüller, E., Schaper, U. & Zimbelmann, F.** 1984. Seasonal variation in the colonization pattern of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 91: 371–382 (in English with German summary).

- Torres, E., Bertolini, E., Cambra, M., Montón, C. & Martin, M.P.** 2005. Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine phytoplasmas from apple proliferation (16 SrX) group. *Molecular and Cellular Probes*, 19: 334–340.
- Weintraub, P. & Beanland, L.** 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology*, 51: 91–111.
- Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N.C., Boonham, N. & Stead, D.E.** 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative multiplex real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2853–2858.
- Werren, J.H., Windsor, D. & Guo, L.** 1995. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 262: 197–204.
- Zhang, Y.P., Uyemoto, J.K. & Kirkpatrick, B.C.** 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *Journal of Virological Methods*, 71: 45–50.

مراحل النشر

لا تعتبر هذه الفقرة جزءاً رسمياً من المعيار

- 11-2004 قامت لجنة المعايير بإضافة الموضوع: الفيروسات والبلازما النباتية (2004-018).
- 04-2006 أضافت الدورة الأولى لهيئة تدابير الصحة النباتية الموضوع.
- 04-2013 مشاوره الخبراء.
- 06-2013 عرضت المسودة على اجتماع الفريق الفني المعني ببروتوكولات التشخيص.
- 05-2014 وافقت لجنة المعايير على عرض المسودة على مشاوره الأعضاء (2014_eSC_May_07).
- 07-2014 مشاوره الأعضاء.
- 03-2015 وافق الفريق الفني المعني ببروتوكولات التشخيص على رفع المسودة إلى لجنة المعايير للموافقة على اعتمادها (2015_eTPDP_May_01).
- 06-2015 موافقة لجنة المعايير على فترة الإخطار لبروتوكول التشخيص (2015_eSC_Nov_04).
- 08-2015 فترة الإخطار لبروتوكول التشخيص.
- 08-2015 تلقي اعتراض رسمي.
- 09-2015 اجتماع الفريق الفني المعني ببروتوكولات التشخيص عبر الإنترنت
- 10-2015 قيام الفريق الفني المعني ببروتوكولات التشخيص بتحليل الاعتراض الرسمي وتنقيحه (2015_eTPDP_Oct_03).
- 11-2015 موافقة لجنة المعايير على فترة الإخطار للبروتوكول التشخيصي وتأييد الرد على الاعتراض الرسمي (2015_eSC_Nov_10).
- 01-2016 اعتمدت لجنة المعايير لبروتوكول التشخيص بالنيابة عن هيئة تدابير الصحة النباتية (مع عدم ورود اعتراضات رسمية)
- المعيار الدولي رقم 27 - الملحق 12. البلازما النباتية (2016). روما، الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات، منظمة الأغذية والزراعة.
- تاريخ آخر تحديث لمراحل النشر 04-2016.