منظمة الأغذية و الزراعة
للأمم المتحدة

الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات
حماية الموارد النباتية في العالم من الآفات

المعيار
الدولي رقم
27
الملحق 2

عربي

بروتوكول تشخيصي 2:
Plum pox virus

صادر عن أمانة الاتفاقية
الدولية لوقاية النباتات

تركت هذه الصفحة فارغة عمداً

المعيار الدولي رقم 27

بروتوكولات تشخيص الآفات الخاضعة للوائح

بروتوكول التشخيص 2: *Plum pox virus*

(اعتمد في 2018، نشر في 2019)

المحتويات

1- معلومات حول الآفة 2
2- معلومات تصنيفية 3
3- الكشف وتحديد الهوية 3
3-1 نطاق النباتات المضيفة 4
3-2 الأعراض 4
3-3 الكشف بالطرق البيولوجية 5
3-4 أخذ العينات للاختبارات المصلية والجزيئية 5
3-5 الكشف وتحديد الهوية بالطرق المصلية 6
3-5-1 اختبار الممتصات المناعية المرتبطة بالإنزيمات غير المباشرة لشطيرة ثنائي الأجسام المضادة 6
3-5-2 اختبار ممتصات المناعة المرتبطة بإنزيمات شطيرة ثنائي الأجسام المضادة 7
3-6 الكشف وتحديد الهوية بالطرق الجزيئية 7
3-6-1 تنقية الحمض النووى الرّيبى والاصطياد المناعى وتوليف الحمض النووى المكمّل ... 8
3-6-2 التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي للاصطياد المناعي 8
3-6-3 النسخ العكسي للأسر المناعي - تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل 9
3-6-4 النسخ العكسي التعاوني - تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل (Co-RT-PCR) 10
3-6-5 تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل للنسخ العكسي (RT-PCR) في الوقت الحقيقي 11
4- تحديد هوية السلالات 13
4-1 التحديد المصلي لهوية السلالات 14
4-2 التحديد الجزيئي لهوية السلالات 15
4-2-1 تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل للنسخ العكسي (RT-PCR) 15
4-2-2 النسخ العكسي للأسر المناعي - تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل 16
4-2-3 النسخ العكسي التعاوني - تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل 16
4-2-4 تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل للنسخ العكسي في الوقت الحقيقي 16
5- شواهد الاختبارات الجزيئية 17
6- السجلات 18
7- نقاط الاتصال للحصول على معلومات إضافية 19
8- الاعتراف والشكر 20
9- المراجع 20

1- معلومات حول الآفة

الشـــاركا (جدري الخوخ) هو أحد أخطر الأمراض الفيروســية لفاكهة النواة. وتم الإبلاغ لأول مرة عن هذا المرض في *Prunus domestica* في بلغاريا في الفترة 1917-1918 وتم وصـــفه بأنه مرض فيروســي في عام 1932. وانتشـر الفيروس منذ ذلك الحين بشـكل مطّرد في أنحاء كبيرة من أوروبا وحول حوض البحر المتوسط والشرق الأدنى. وظهر الفيروس بتوزيع محدود في أمريكا الجنوبية وأمريكا الشمالية وآسيا (منظمة وقاية النباتات في أوروبا والبحر المتوسط، 2006؛ والمركز الدولي للزراعة والعلوم البيولوجية، 2018).

ويؤثر مرض الشـاركا الذي يسـببه فيروس جدري الخوخ *(Plum pox virus)* على النباتات المنتجة لجنس برونوس (عائلة Rosaceae). وهو يتســبب في إحداث أضــرار كبيرة لفاكهة المشــمش (*Prunus. armeniaca*)، والبرقوق الأوروبي (*P. domestica*)، والبرقوق اليـابـاني، والخوخ (*P. persica* و*P. salicina*) لأنه يقلل من الجودة ويتسـبب في سـقوط الثمرة قبل نضـجها. وتشـير التقديرات إلى أن تكاليف مكافحة الشـاركا في جميع أنحاء العالم منذ سـبعينات القرن الماضـي تزيد على 10 000 مليون يورو (Cambra *et al*., 2006b).

وفيروس جدري الخوخ *(Plum pox virus)* هو أحد أفراد جنس *Potyvirus* في عائلة فيروســات *Potyviridae*. وجسـيمات الفيروس عبارة عن عصـيات مرنة تبلغ نحو 700 نانو متر x 11 نانو متر وهي مكونة من جزيء من الرنا الوحيدة الجديلة وتضــم نحو 10 000 نيوكليوتيد يغطيها نحو 2000 وحدة فرعية من غطاء بروتيني وحيد (*García et al*., 2014). وينتقل فيروس جدري الخوخ *(Plum pox virus)* في الحقول لفترة وجيزة عن طريق حشــرة المنّ، ولكن حركة المواد النباتية المصــابة المنتشـرة تمثل الطريقة الرئيسـية التي ينتشـر بها الفيروس على مسـافات بعيدة. ولم يتأكد بعد انتقال الفيروس من خلال البذور واللقاح (Pasquini and Barba, 2006; Ilardi and Tavazza, 2015). ويمكن أن ينتقل فيروس جدري الخوخ بشكل ميكانيكي، في ظروف تجريبية، إلى العديد من أنواع *Prunus* والعديد من النباتات العشــبية مثل *Arabidopsis thaliana*، و*Chenopodium foetidum*، و *Nicotiana benthamiana*، و*Nicotiana clevelandii*، و*Nicotiana glutinosa* و*Pisum sativum* (Barba *et al*., 2011).

ويمكن، حاليا، تصـنيف عزلات فيروس جدري الخوخ *(Plum pox virus)* ضـمن تسـع سـلالات من أصل واحد:

D (Dideron)، M (Marcus)، C (Cherry)، EA (El Amar)، W (Winona) ومتحدة Rec (Recombinant)). T (Turkish)، وCR (كرز روسي)، وAn (Ancestor Marcus) (James *et al*., 2013). وللسلالات تسلسلات جينومية، وقد تختلف من حيث العوارض، والقدرة الإمراضية، ونطاق الكائنات المعيلة، والوباء وقابلية انتقال الأرقة. وتنتمي معظم عزلات فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) للسلالتين D وM. ويمكن لسلالتي D وM لفيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) أن تصيبا بسهولة المشمش والبرقوق، ولكنهما تتباينان في قدرتهما على إصابة أنواع الخوخ. وتتباين هاتان السلالتان أيضاً من حيث قدرتهما الإمراضية؛ حيث تتسبّب عزلة M عموماً بأوبئة أسرع وأعراضاً أشد مما تسببه عزلات D في *P. armeniaca* و*P. domestica* و*P. Persica* و*P. Salicina*. أما عزلات EA فهي تقتصر جغرافياً على مصر ولا يتاح سوى القليل من المعلومات عن تأثيراتها الوبائية وخصائصها البيولوجية. وقد تم تحديد عدد من عزلات الفيروس التي تصيب نوعي الكرز الحلو (*Prunus avium*) والكرز الحمضي (*Prunus. cerasus*) في العديد من البلدان الأوروبية. وتشكِّل هذه العزلات سلالتين مميَّزتين تم تعريفهما بأنهما *PPV*-C وPPV-CR . وتم الكشف عن نوع غير عادي من فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) في البرقوق الأوروبي (*P. domestica*) في كندا (PPV-W) وهو يمثِّل سلالةً مختلفة من فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*). وتمّ الكشف منذ ذلك الحين عن PPV-W في العديد من البلدان في أوروبا (James *et al*., 2013). وإضافة إلى ذلك، فإن الأنواع الناجمة عن الاتحاد الطبيعي بين السلالتين D وM لفيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) تسمى PPV-Rec وهي تتسم

بسلوك وبائي مماثل لسلالة D. وأفادت التقارير بوجود نوع جديد من سلالة recombinant في تركيا وعُرّفت بأنها سلالة T (Ulubaş Serçe *et al.*, 2009). وتمّ وصف عزلة وحيدة من PPV-An واقتراحه كأصل محتمل لفيروس PPV-M (Palmisano *et al.*, 2012). ولم يتم اقتراح سلالة جديدة من الكرز الحامض المكيّف (Tat)، لا C ولا CR (Chirkov *et al.*, 2016).

ويمكن الحصول على معلومات إضافية عن فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*)، بما في ذلك الرسوم التوضيحية لأعراض المرض، من Barba *et al.* (2011) والمركز الدولي للزراعة والعلوم البيولوجية (2018)، ومنظمة وقاية النباتات في أوروبا والبحر المتوسط (2004، 2006 و2018 ب) و García *et al.* (2014) و PaDIL (2018).

2- معلومات تصنيفية

الاسم: *فيروس جدري الخوخ (Plum pox virus)* (اختصاراً PPV)
المرادف: *فيروس الشاركا*
الوضع التصنيفي: *Potyvirus*، *Potyviridae*
الأسماء الشائعة: *جدري الخوخ، الشاركا*.

3- الكشف وتحديد الهوية

ويمكن كشف فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) باستخدام الاختبارات البيولوجية أو المصلية أو الجزيئية؛ ويقتضي تحديد هوية الفيروس اختبارا مصليا أو جزيئيا. والاختبار المصلي أو الجزيئي هو المقتضى الأدنى لكشف وتحديد هوية الفيروس (وذلك مثلاً أثناء التشخيص الروتيني لآفة منتشرة على نطاق واسع في بلد ما). وفي الحالات التي تشترط فيها المنظمة القطرية لوقاية النباتات الاطمئنان إلى مدى أبعد بالنسبة لتحديد هوية الفيروس (مثل كشف الفيروس في منطقة غير معروف أنه يتواجد فيها أو كشفه في شحنة صادرة عن بلد من المعلن أنها خالية من الفيروس) فإنه يجوز إجراء اختبارات إضافية. وينبغي، حيثما تم تحديد هوية الفيروس في المرة الأولى باستخدام طريقة جزيئية، اللجوء إلى طريقة ذات حساسية تحليلية عالية، أو إذا أمكن طريقة جزيئية تستهدف منطقة جينوم مختلفة أو تسلسل الجينوم. كما يجوز إجراء اختبارات إضافية، بما في ذلك الطرق المصلية التي تستهدف عناصر البروتين أو الطرق المستخدمة لتحديد سلالة الفيروس الموجود. وفي جميع الحالات، يجب أن تشمل الاختبارات ضوابط إيجابية وسلبية. وتبين الأقسام التالية التقنيات الموصى بها.

كذلك، يصف بروتوكول التشخيص هذا الطرق المترسخة للكشف عن فيروس جدري الخوخ وتحديد هويته. وقد استُخدمت بعض التقنيات الجديدة والمتقدمة للكشف عن فيروس جدري الخوخ مثل اختبار التضخيم المتساوي الحرارة بواسطة العروة[1] (Varga and James, 2006b) وتسلسل الجيل الجديد (Rodamilans *et al.*, 2014). لكن بما أنه لم تتم المصادقة بشكل كامل بعد على تسلسل الجيل الجديد واختبار التضخيم المتساوي الحرارة بواسطة العروة كأدوات للكشف الروتيني عن فيروس جدري الخوخ، مرفقةً ببروتوكولات منشورة لوصفها، لم تُدرج هذه التقنيات في بروتوكولات التشخيص.

وفي بروتوكول التشخيص هذا، يجري وصف الطرق (بما في ذلك الإشارة إلى الأسماء التجارية بحسب ما هي منشورة، إذ أنها تحدد المستوى الأصلي للحساسية أو التخصص و/أو قابلية النسخ

[1] لدى استعمال اختبار التضخيم المتساوي الحرارة بواسطة العروة بصورة منتظمة في منطقة تعتمد نظام البراءات مثل اليابان (البراءات رقم 3,313,358، و3,974,441 و4,139,424) والولايات المتحدة الأمريكية (البراءات رقم US6,410,278، وUS6,974,670 وUS7,494,790)، والاتحاد الأوروبي (البراءات رقم 1,020,534، و1,873,260 و2,045,337 و2,287,338) والصين (البراءة رقم ZL008818262) وجمهورية كوريا (البراءة رقم 10-0612551)، وأستراليا (البراءة رقم 779160)، والاتحاد الروسي (البراءة رقم 2,252,964)، من الضروري أن يتلقى المستخدمون ترخيصاً من شركة Eiken Chemical Co., Ltd قبل استخدامه.

الذي تم بلوغه. ويجوز تعديل الإجراءات المخبرية الواردة في البروتوكولات لكي تتواءم مع معايير المختبرات الفردية، شريطة المصادقة عليها بالشكل المناسب.

1-3 نطاق النباتات المضيفة

في الظروف الطبيعية، يصيب فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) بسهولة أشجار الفاكهة من جنس شجرة *Prunus* (عائلة Rosaceae) المستخدمة كأنواع تجارية أو فسائل جذرية: وتشمل النباتات المضيفة الكبيرة أنواع المشمش، والبرقوق الأوروبي والياباني، والخوخ، والخوخ البري الصيني (*P. davidiana*)، وكريز المحلب (*P. mahaleb*)، وبرقوق ماريانا (*P. marianna*)، و *P. mume* و *P. persica* و *P. salicina* وأنواع هجينة بينها. وهناك سلالات من فيروس جدري الخوخ (C وCR) التي تصيب بشكل طبيعي الكرز الحلو والكرز الحامض (James *et al.*, 2013). وقد يصاب في بعض الأحيان اللوز (*P. dulcis*) بفيروس جدري الخوخ (Llácer and Cambra, 2006). كما يصيب الفيروس الكثير من أنواع فاكهة *Prunus* البرية أو المستخدمة في الزينة من قبيل الكريز الكندي (*P. besseyi*)، وكرز الرمال الأرجواني الأوراق (*P. cistena*)، واللوز القزمي (*P. glandulosa*)، والإجاص (*P. insititia*)، وكرز الغار (*P. laurocerasus*)، والبرقوق البري الشائك (*P. spinosa*)، وكريز نانكينغ (*P. tomentosa*)، واللوز الزهري (*P. triloba*) (James and Thompson, 2006). وفي ظروف التجارب، يمكن نقل فيروس جدري الخوخ ميكانيكياً إلى عدة أنواع من *Prunus spp* والعديد من النباتات العشبية (انظر القسم 1)

2-3 الأعراض

قد تظهر أعراض فيروس جدري الخوخ على الأوراق، والخلفات، واللحاء، والتويجات، والثمار، والنواة. والمعتاد أن تظهر الأعراض بوضوح على الأوراق في بداية موسم النمو، وتشمل الأعراض ظهور لون أخضر فاتح خفيف؛ وظهور بقع أو خطوط أو حلقات مصفرة؛ وزوال لون العروق أو اصفرارها؛ أو حتى تشوه الأوراق. وبعض هذه الأعراض التي تظهر على الأوراق تشبه الأعراض التي تسببها فيروسات أخرى مثل فيروس التبرقش النطاقي على البرقوق الأمريكي (*American plum line pattern virus*). ومن أعراض النوع *P. cerasifera* 'GF 31' ظهور تفلن بني بلون الصدأ وتشقق اللحاء.

وقد تشمل أعراض الأزهار زوال اللون (خطوط زهرية) على التويجات وأعراض تكسّر الأزهار (Barba *et al.*, 2011). ويمكن أن تظهر هذه الأعراض في بعض أنواع الخوخ عندما تصاب بفيروس جدري الخوخ من سلالة PPV-M أو في بروزوبيس جلاندولوسا (*P. glandulosa*) المصابة بفيروس جدري الخوخ من سلالة PPV-D.

وتظهر على الثمار المصابة بقع صفراء أو حلقات أو أشكال طولية ذات لون أصفر فاتح. وقد تتشوه الثمار أو تصبح غير منتظمة في شكلها وتتكون عليها مناطق بنية أو نخرية تحت الحلقات الباهتة. وبعض التشوهات التي تصيب الفاكهة وخاصة *P. armeniaca* و *P. domestica*، تشبه التشوهات الناجمة عن الإصابة بفيروس بقع الشحوب اليخضوري في أوراق التفاح. وقد يظهر على الثمار المصابة اسمرار داخلي وتصمُّغ لب الثمرة وانخفاض جودتها. وفي الحالات الشديدة، تسقط الثمار المصابة قبل الأوان من الأشجار. ويظهر عموماً على ثمار الأنواع المبكرة النضج أعراض أوضح من الأعراض التي تظهر على الأنواع المتأخرة النضج. وتظهر عادةً على نواة ثمار *P. armeniaca* المريضة حلقات أو بقع باهتة نمطية. ولا يمكن تسويق الكحول أو المواد الروحية المنتجة من الثمار المصابة بسبب نكهتها غير المستساغة.

وتطور المرض وحدته يتوقفان بقوة على النبات المضيف والأحوال المتاخمة؛ وقد يبقى الفيروس كامنا لعدة سنوات في المناخ البارد.

كما يمكن مشاهدة الأعراض على نباتات مضيفة مختلفة مثلاً على الموقع الشبكي لقاعدة البيانات العالمية الخاصة بمنظمة حماية النباتات في أوروبا ومنطقة البحر الأبيض المتوسط (https://gd.eppo.int/taxon/PPV000).

3-3 الكشف بالطرق البيولوجية

والنباتات الدالة الرئيسية المستخدمة لفهرسة الفيروس هي فسائل الصنف 'GF 31' *P. cerasifera* و 'GF 305' *P. persica*، و*P. persica* × *P. davidiana* Nemaguard، أو *P. tomentosa*. ويتم الحصول على النباتات الدالة من البذور، حيث تزرع في خليط من التربة الجيدة الصرف ويتم الاحتفاظ بها في صوبة مقاومة للحشرات في درجة حرارة تتراوح بين 18 و25 درجة مئوية حتى تكبر بدرجة تكفي لطعمها (يصل ارتفاعها في العادة إلى 25 -30 سنتيمتراً ويتراوح قطرها بين 3 و4 مليمترات). ويمكن، كبديل، تطعيم فسائل أخرى من فاكهة *Prunus* بطعم من النباتات الدالة. ويجب طعم النباتات الدالة باستخدام الطرق التقليدية مثل طعم البراعم (Desvignes, 1999)، باستخدام ما لا يقل عن أربع نسخ متكررة لكل نبات دال. ويتم الاحتفاظ بالنباتات الدالة المطعمة في نفس الظروف، ويتم تقليمها بعد ثلاثة أسابيع بحيث لا يزيد ارتفاعها عن بضعة سنتيمترات فوق الطعمة العلوية (Gentit, 2006). وينبغي معاينة النباتات المطعمة لمراقبة الأعراض لمدة ستة أسابيع على الأقل. ويلاحظ ظهور الأعراض، وبخاصة خطوط وأشكال صفراء، على النمو الجديد بعد 3-4 أسابيع، ويجب مقارنتها بالضوابط الإيجابية والصحية. ويمكن الاطلاع على صور للأعراض الناجمة عن الفيروس التي تظهر على النباتات الدالة في Damsteegt *et al.* (1997، 2007) وGentit (2006).

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

ويمكن أيضاً استخدام النباتات العشبية للكشف البيولوجي عن فيروس جدري الخوخ (Barba *et al.*, 2011). ويمكن أن ينتقل الفيروس ميكانيكياً إلى أنواع عشبية عديدة (انظر القسم 1).

4-3 أخذ العينات للاختبارات المصلية والجزيئية

تتاح توجيهات عامة بشأن منهجيات أخذ العيّنات في المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية رقم 31 (منهجيات أخذ العيّنات من الشحنات). وفي بعض الظروف (أي خلال التشخيص الروتيني لآفة متوطنة على نطاق واسع في البلد)، يمكن اختبار نباتات عديدة بشكل متزامن باستخدام عيّنة كبيرة منبثقة من عدد من النباتات. ويتوقف القرار باختبار نباتات فردية أو متعددة على تركّز الفيروس في النباتات ومستوى اليقين الذي تفرضه المنظمة الوطنية لوقاية النباتات. وغالباً ما تُشحن المواد النباتية الخاصة بالخوخ كقطع ساكنة. وفي هذه الحالة، يمكن استخدام البراعم أو نسيج القشرة (أجزاء اللحاء) مباشرةً للاختبار.

والاختيار الملائم للعينات حاسم الأهمية لكشف فيروس جدري الخوخ. وينبغي للعيّنات أن تأخذ في الاعتبار بيولوجيا الفيروس والظروف المناخية المحلية، وبخاصة الظروف المناخية خلال موسم النمو. وفي حال وجود الأعراض العادية، ينبغي جمع العيّنات من الأزهار، والأوراق أو الثمار التي تظهر عليها الأعراض. وأمّا في النباتات الخالية من الأعراض، ينبغي أخذ العيّنات من البراعم الفتية التي تبلغ سنة من العمر على الأقل وتكون ذات أوراق ناضجة ومتفتحة بالكامل، تُجمع من وسط كل من الأغصان الرئيسية (الكشف غير موثوق في البراعم الفتية التي تكون دون السنة من

العمر). كما ويجب أخذ العينات من أربعة مواقع مختلفة على الأقل (مثلاً، من أربعة أغصان أو أربع أوراق) في كل نبتة؛ هذا حاسم الأهمية نظراً إلى التوزّع غير المتساوي لفيروس جدري الخوخ. ولا يجب أخذ العيّنات خلال الأشهر التي تشهد الارتفاع الأكبر في درجات الحرارة. فالاختبارات على عيّنات يتم جمعها في فصل الخريف أقل موثوقية من الاختبارات على العينات التي يتم جمعها في وقت سابق من فصل الربيع. ومن المستحسن أن تُجمع المواد النباتية من الأجزاء الداخلية من قمة الشجرة. ففي فصل الربيع، يمكن للعينات أن تكون أزهاراً، أو براعم فتية ذات أوراق متفتحة بالكامل، أو ثماراً. وأما في الصيف والخريف، فيمكن استخدام الأوراق الناضجة وقشرة الثمار الناضجة التي تُجمع من الحقل أو دور التعبئة للتحليل. وفي الصيف، يمكن اختبار البراعم من الأجزاء الساكنة باستخدام النسخ العكسي – تفاعل البوليميريز المتسلسل أو تفاعل البلمرة المتسلسل الآني، سيما أنها التقنيات المفضّلة لاختبار الأوراق الناضجة. ويمكن تخزين الأزهار، والأوراق، والبراعم الفتية وقشرة الثمار بحرارة تبلغ أربع درجات مئوية لمدة عشرة أيام كحدّ أقصى قبل التجهيز. كذلك، يمكن تخزين الثمار لمدة شهر عند أربع درجات مئوية قبل التجهيز. وفي الشتاء، يمكن استخدام البراعم الساكنة أو أنسجة اللحاء من الجزء القاعدي من الأغصان الصغيرة، أو البراعم الفتية أو الأغصان، أو الداربات الكاملة للاختبار.

5-3 الكشف وتحديد الهوية بالطرق المصلية

اختبارات الممتصات المناعية المرتبطة بالإنزيمات مستصوبة بدرجة كبيرة في فحص عدد كبير من العينات.

ولتجهيز العينة على سبيل المثال، يوزن 0.2 إلى 0.5 غرام تقريباً من المادة النباتية الطازجة وتقطع إلى أجزاء صغيرة وتوضع في أنبوب ملائم أو كيس بلاستيكي. وتتم مجانسة العينة بمعدل لدرء الاستخلاص يبلغ 4-10 ملليلترات (v/w 2:1) (أو حسبما يوصي به مصنّع عدّة اختبارات الممتصات المناعية المرتبطة بالإنزيمات) باستخدام جهاز كهربائي لمجانسة الأنسجة أو مدحاة يدوية، أو مطرقة، أو أداة أخرى مماثلة. ويتألف عامل درء الاستخلاص من محلول ملحي مدروء بالفوسفات pH 7.2–7.4 (PBS) يحتوي على 2 في المائة من بولي فينيل بيروليدون و0.2 في المائة من ديثيو كاربامات ثنائي إثيل الصوديوم (Cambra *et al.*, 1994)، أو عامل درء بديل ملائم. وينبغي مجانسة المادة النباتية تماماً واستخدامها طازجة.

1-5-3 اختبار الممتصات المناعية المرتبطة بالإنزيمات غير المباشرة لشطيرة ثنائي الأجسام المضادة

اختبار الممتصات المناعية المرتبطة بالإنزيمات غير المباشرة لشطيرة ثنائي الأجسام المضادة DASI-ELISA، الذي يسمى أيضاً شطيرة ثلاثي الأجسام المضادة (TAS)-ELISA، ينبغي إجراؤه وفقاً لما جاء في Cambra *et al.* (1994) باستخدام جسم مضاد محدد أحادي الكلون مثل 5B-IVIA وفقاً للتعليمات المحدَّدة من الجهة الصانعة.

وتبيّن أن الجسم المضاد الأحادي الكلون الوحيد 5B-IVIA (MAb) يكتشف معظم أو جميع سلالات فيروس جدري الخوخ (Cambra *et al.*, 2006a). وسوف يكشف 5B-IVIA (MAb) عزلات من سلالة CR، إنما ينبغي تعديل المستخرجات لتحليل درجة حموضة 6.0 بهدف تعزيز الاعتراف بـ MAb 5B-IVIA(Glasa et al., 2013; Chirkov et al., 2013). ويمكن أيضاً كشف السلالة المفترضة المتكيفة مع الكرز بواسطة MAb 5B-IVIA (Chirkov *et al.*, 2016). إنما لم تتم الإفادة عن كشف PPV-An باستخدام MAb 5B-IVIA (Palmisano *et al.*, 2012).

وفي اختبار DIAGPRO الحلقي (Harju *et al.*, 2000) أجراه 17 مختبراً باستخدام مجموعة من عشر تتضمن عينات مصابة بفيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) (من سلالة PPV-D، PPV-M وPPV-D+M) وعينات سليمة على السواء من فرنسا وإسبانيا، كانت طريقة DASI-ELISA

باستخدام MAb 5B-IVIA دقيقة بنسبة 95 في المائة (عدد النتائج السلبية الصحيحة والنتائج الإيجابية الصحيحة المشخصة بالتقنية/المقسومة بعدد العينات المختبرة). وكانت هذه الدقة أكبر من الدقة التي تحققت سواء باستخدام تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل للنسخ العكسي لأسر المناعة (IC-RT-PCR) التي بلغت 82 في المائة من الدقة، أو طريقة تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل للنسخ العكسي التعاوني (Co-RT-PCR) التي بلغت 94 في المائة من الدقة (Olmos *et al.*, 2007; Cambra *et al.*, 2008). وبلغت النتائج السلبية الصحيحة (عدد النتائج السلبية الصحيحة المشخَّصة بالتقنية/مقسومة على عدد النباتات السليمة) المحدَّدة من خلال DASI-ELISA باستخدام MAb 5B-IVIA ما نسبته 99 في المائة مقارنة بتفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل للنسخ العكسي في الوقت الحقيقي باستخدام الحمض النووي المنقي (89.2 في المائة) أو العينات المبقعة (98 في المائة) أو IC-RT-PCR للأسر المناعي (96.1 في المائة). كما أشار Capote *et al.*(2009) إلى وجود احتمال بنسبة 98.8 في المائة في أن تكون النتيجة الإيجابية المتحققة في الشتاء من خلال DASI-ELISA باستخدام MAb 5B-IVIA نتيجة صحيحة. وقد تُظهر المضادات الحيوية تبايناً بين الدفعات، لذا ينبغي التحقق من الأداء قبل الاستخدام الروتيني.

ويكشف الجسم المضاد الأحادي الكلون 5B-IVIA جميع سلالات فيروس جدري الخوخ التي تمّ اختبارها، وبخاصة بشكل حساس وموثوق (Cambra *et al.*, 1994; Cambra *et al.*, 2006a; Glasa *et al.*,2013; Chirkov *et al.*, 2013; Chirkov *et al.*, 2016). كما أن العديد من مجموعات اللوازم التجارية التي تستخدم أجسام مضادة متعددة الكلون متاحة مع بعض بيانات المصادقة (Gougherty *et al.*, 2015؛ منظمة وقاية النباتات في أوروبا والبحر الأبيض المتوسط، 2018أ). إنما اتضح أنها أقل تحديداً وتفتقر إلى التجانس بين مختلف الدفعات (Cambra *et al.*, 2006a)، ويجب بالتالي المصادقة عليها قبل استخدامها. ويوصى باستخدام طرق إضافية في حالات استخدام مضادات أجسام متعددة الكلون في اختبار، وحين تفرض المنظمة الوطنية لوقاية النباتات درجة إضافية من اليقين في تحديد فيروس جدري الخوخ.

2-5-3 اختبار ممتصات المناعة المرتبطة بإنزيمات شطيرة ثنائي الأجسام المضادة

يستخدم النظام التقليدي أو نظام بيوتين/ستريبتافيدين لشطيرة ثنائي الأجسام المضادة DAS-ELISA باستخدام الأطقم القائمة على الجسم المضاد المحدَّد الأحادي الكلون 5B-IVIA أو الأجسام المضادة المتعددة الكلون التي ثبت أنها تكتشف معظم سلالات فيروس جدري الخوخ، بما في ذلك سلالات D، M وRec بدون تفاعلات تبادلية مع الفيروسات أو المواد النباتية الأخرى (Cambra *et al.*, 2006a; Capote et al., 2009). وينبغي إجراء الاختبار وفقاً لتعليمات الجهة الصانعة.

6-3 الكشف وتحديد الهوية بالطرق الجزيئية

قد تكون الطرق الجزيئية مثل تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل للنسخ العكسي أكثر تكلفة من الطرق المصلية، وبخاصة في الاختبارات الواسعة النطاق. على أن الطرق الجزيئية، وبخاصة طريقة RT-PCR في الوقت الحقيقي، تُعد عموماً أكثر حساسية من الطرق المصلية. كما أن استخدام RT-PCR في الوقت الحقيقي يساعد أيضاً على تلافي الحاجة إلى أي معالجة في مرحلة ما بعد التضخيم (مثل الارتحال الكهربائي للهلام) ولذلك فإنها أسرع وأقل تعرضاً إلى التلوث (مع الحمض النووي المستهدف) من طريقة PCR التقليدية.

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

وتحدد كل من الطرق التالية حجم العينة المستخلصة التي ينبغي استخدامها كوحدة معيارية. وتبعا لحساسية الطريقة المستخدمة، يتباين الحدّ الأدنى للتركز اللازم لكشف فيروس جدري الخوخ على النحو التالي: طريقة RT-PCR يبلغ التركيز في وحدة الرنا المعيارية 100 fg في المللليتر؛ طريقة Co-RT-PCR، يبلغ التركيز في الرنا المعيارية 1 fg في الميلليلتر؛ وطريقة RT-PCR في الوقت الحقيقي، يبلغ التركيز في وحدة الرنا المعيارية 2 fg في الميلليلتر.

3-6-1 تنقية الحمض النووي الرّيبي والاصطياد المناعي وتوليف الحمض النووي المكمّل

3-1-6-1 تنقية الحمض النووي الرّيبي

يجب أن تتم تنقية الحمض النووى الرّيبى باستخدام البروتوكولات مثبتة الصلاحية بالطرق الملائمة، أو باستخدام مجموعة لوازم لتنقية الحمض النووي الرّيبى تبعاً لتعليمات الجهة المصنّعة. ويجب تخزين الحمض النووى الرّيبى المستخرج على حرارة 70 درجة تحت الصفر (مفضلة) أو 20 درجة تحت الصفر إلى أن يستخدم كنموذج، وذلك لأقل من عام واحد. وينبغى تخزين كميات صغيرة تفادياً لفساد الحمض النووي الرّيبي جراء دورات التجميد-التذويب المتكررة.

3-1-6-2 الاصطياد المناعي

يعتبر الاصطياد المناعى خياراً بديلاً عن تنقية الحمض النووي الرّيبى. تحقيقاً لهذه العملية، يعدّ مزيج مخفف من الأجسام المضادة ويُستخدم لتغليف الأنابيب الدقيقة المستخدمة في تفاعل النسخ العكسي. انظر الجزء 3-6-2 للاطّلاع على تفاصيل عن الإجراء.

3-1-6-3 توليف الحمض النووي المكمّل

بما أنه ليس من السهل حفظ الحمض النووي الرّيبي خلال تخزينه، فمن المحبذ توليف حمض نووي مكمّل يمكن حفظه لفترات طويلة مع شروط بالحد الأدنى فيما خصّ الحرارة، مقارنة بالاشتراطات التي تخص الحمض النووي الرّيبي.

3-6-2 التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي للاصطياد المناعي

تمّت المصادقة على البادئات المستخدمة فى طرق التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي للاصطياد المناعى الوارد وصفها أدناه، وهى تُعتبر مراجع للكشف العام عن فيروس جدري الخوخ حتى وإن وُجدت بادئات أخرى واسعة الطيف متاحة (Olmos *et al.*, 2006). ولم تُلاحظ أي نتائج إيجابية خاطئة في الدراسات التي تصف تطوير هذه الطرق والمصادقة عليها (Wetzel *et al.*, 1991; Levy and Hadidi, 1994). وتتمثل منفعة أخرى في البادئات التي حدّدها Wetzel *et al.* (1991) في أنها تتيح أيضاً التعرّف إلى السلالتين الأكثر شيوعاً من فيروس جدرى الخوخ حين ترفق بتحليل منتج ذات 243 زوجاً قاعدياً باستخدام قطعة الحصر ذات التكوين والطول المتعددة.

بادئات التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي للاصطياد المناعي المستخدمة في هذه الطريقة هي إما بادئات Wetzel *et al.* (1991):

P1 antisense (5′-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3′)

P2 sense (5′-CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA-3′)

أو بادئات Levy and Hadidi (1994):

3′NCR sense (5′-GTA GTG GTC TCG GTA TCT ATC ATA-3′)

3′NCR antisense (5′-GTC TCT TGC ACA AGA ACT ATA ACC-3′)

ويتكون خليط التفاعل البالغ 25 ميكرو لتر من: 1 ميكرو مولار من كل بادئة (P1 و P2 أو الزوج البادئ 3′NCR)، و250 ميكرو مولار من dNTPs، ووحدة واحدة من إنزيم النسخ العكسي[2] AMV ، و0.5 من وحدات إنزيم بلمرة الدنا Taq، و2.5 ميكرو لتر 10× عامل درء إنزيم البلمرة Taq، و1.5 مللي مولار من كلوريد الماغنيزيوم $MgCl_2$، و0.3 في المائة من Triton X-100 ووحدة رنا معيارية من مستوى 5 ميكرو لتر. وأُجري التفاعل في جهاز تدوير حراري بالمعايير التالية: 45 دقيقة عند درجة حرارة 42 درجة مئوية، ودقيقتان عند درجة حرارة 94 درجة مئوية، و40 دورة في 30 ثانية عند درجة حرارة 94 درجة مئوية، وفي 30 ثانية سواء عند درجة حرارة 60 درجة مئوية (البادئتان P1 وP2) أو عند درجة حرارة 62 مئوية (البادئات 3′NCR)، وستين ثانية عند درجة حرارة 72 درجة مئوية، ويعقب ذلك تمديد نهائي لمدة 10 دقائق عند درجة حرارة 72 درجة مئوية. وتُحلل نواتج PCR بواسطة الارتحال الكهربائي للهلام. ويولد زوج البادئات P1/P2 243 زوجاً قاعدياً فيما تنتج بادئات 3′NCR 220 أمبليكون.

وتم تقييم طريقة Wetzel *et al.* (1991) عن طريق اختبار عزلات فيروس جدري الخوخ من مناطق البحر المتوسط (قبرص، ومصر، وفرنسا، واليونان، وإسبانيا، وتركيا). وتمكّنت من اكتشاف 20 جزءاً من الرنا الفيروسي، أي ما يقابل 2000 جزيئاً فيروسياً (Wetzel *et al.*, 1991)، وقام Levy and Hadidi (1994) بتقييم طريقتهما باستخدام عزلات فيروس جدري الخوخ من مصر، وفرنسا، وألمانيا، واليونان، والمجر، وإيطاليا، وإسبانيا، ورومانيا.

3-6-3 النسخ العكسي للأسر المناعي - تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل

يجوز إجراء مرحلة الأسر المناعي وفقاً لما حدده Wetzel *et al.* (1992)، باستخدام نسخ النبات المستخلص مثلما في القسم 3-5 مع استعمال أنابيب أو أكياس بلاستيكية إفرادية لتجنب التلوث. ويمكن استخدام أي جسم مضاد تمّ التحقق منه بشكل ملائم. وقد تمت المصادقة على هذا الاختبار فقط لعزلات من سلالات D وM الموزعة على نطاق واسع.

ويتم تحضير محلول (1 ميكرو غرام مللي لتر) من الأجسام المضادة المتعددة الكلون أو الجسم المضاد المحدد الأحادي الكلون لفيروس جدري الخوخ (مثلاً: 5B-IVIA) في الدارئ الكربوني pH 9.6. وتوضع قسامات من الأجسام المضادة المخفّفة في 100 ميكرو لتر في أنابيب طرد مركزي دقيقة PCR وتحضن عند درجة 37 مئوية لمدة 3 ساعات. ثم تُغسل الأنابيب مرتين باستخدام 150 ميكروليتر من محلول التعقيم PBS-Tween (دارئ الغسل) وتُشطف مرتين بالماء الخالي من الريبونيكليس. ويُنقّى المستخلص النباتي (100 ميكرو لتر؛ انظر القسم 3-5) عن طريق الطرد المركزي (5 دقائق بمعدل 15 500 غرام)، ويضاف الناتج إلى أنابيب PCR المغطاة. وتُترك الأنابيب لمدة ساعتين على الثلج أو في درجة حرارة 37 مئوية، ثم تُغسل ثلاث مرات باستخدام 150 ميكرو لترا من محلول التعقيم PBS-Tween. ويتم تحضير خليط تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل للنسخ العكسي كما هو مبيَّن في القسم 3-6-2 باستخدام بادئات Wetzel *et al.* (1992)، ويضاف مباشرة إلى أنابيب PCR المغطاة. ويتم إجراء التضخيم حسب ما هو مبيَّن في القسم 3-6-2.

وبصورة عامة، تتطلب طريقة IC-RT-PCR استخدام أجسام مضادة محددة، وإن كانت طرق التقييد المباشر قد تزيل هذا المتطلب. وتم التحقق من طريقة IC-RT-PCR باستخدام الجسم المضاد الأحادي الكلون 5B-IVIA في اختبار حلقي (DIAGPRO) كشف عن دقة بنسبة 82 في المائة في اكتشاف فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) (Olmos *et al.*, 2007; Cambra *et al.*, 2008). وأشار Capote *et al.* (2009) إلى وجود احتمالات بنسبة 95.8 في المائة بأن تكون النتيجة الإيجابية التي تحققها طريقة IC-RT-PCR في الشتاء باستخدام الجسم المضاد الأحادي الكلون 5B-IVIA نتيجة إيجابية صحيحة.

[2] إن استخدام أسماء المواد الكاشفة، والمواد الكيميائية أو المعدات في بروتوكولات التشخيص هذه لا يعني الموافقة عليها باستثناء مواد أخرى قد تكون أيضاً ملائمة.

4-6-3 النسخ العكسي التعاوني - تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل (Co-RT-PCR)

بادئات RT-PCR المستخدمة في النسخ العكسي التعاوني - تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل هي بادئات Wetzel *et al.* (1991; P1 and P2) و Olmos *et al.* (2002; P10 and P20):

البادئة الداخلية P1 (5′-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3′)

البادئة الداخلية P2 (5′-CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA-3′)

البادئة الخارجية P10 (5′-GAG AAA AGG ATG CTA ACA GGA-3′)

البادئة الخارجية P20 (5′-AAA GCA TAC ATG CCA AGG TA-3′)

ويتكون خليط التفاعل المؤلف من 25 ميكرو لترا من الآتي: 0.1 ميكرو مولار من كلّ من بادئات P1 **و**P2، و0.05 ميكرو مولار من كلّ من بادئات P10 و P20، و400 ميكرو مولار dNTPs، ووحدتان من إنزيم النسخ العكسي AMV، ووحدة واحدة من إنزيم البلمرة Taq DNA، و2 ميكرو لتر 10 دارئ التفاعل، و3 مللي مولار كلوريد الماغنيزيوم $MgCl_2$، و5 في المائة من سلفوكسيد ثنائي المتيل، و0.3 في المائة من Triton X-100. و5 ميكرو لترات من وحدة الرنا المعيارية. ويتم إجراء تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل للنسخ العكسي بمعايير التدوير الحراري التالية: 45 دقيقة في درجة حرارة 42 مئوية، ودقيقتان في درجة حرارة 94 مئوية، و60 دورة لمدة 15 ثانية عند درجة حرارة 94 درجة مئوية، و15 ثانية عند درجة حرارة 50 درجة مئوية، و30 ثانية عند درجة حرارة 72 درجة مئوية ويعقبها تمديد نهائي لمدة 10 دقائق عند درجة حرارة 72 درجة مئوية حرارة الغرف.

ويقترن تفاعل RT-PCR بكشف لوني للأمبليكونات باستخدام مسبار عام لفيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) يسمى digoxigenin´3 ويشار إليه بالرمز (DIG-3) (5′-TCG TTT ATT TGG CTT GGA TGG AA-DIG-3′)، على النحو التالي. يتم تحويل الدنا المكمِّل (cDNA) المضخَّم عند درجة حرارة 95 درجة مئوية لمدة 5 دقائق ويوضع فوراً على الثلج. وتوضع قسامة من 1 ميكرو لتر من العينة على غشاء من النايلون. ثم يجفف الغشاء في درجة حرارة الغرفة ويتم الربط التصالبي بالتعريض للأشعة فوق البنفسجية لمدة 4 دقائق بمعدل 254 نانو متر. ولإجراء التهجين الأوّلي، يوضع الغشاء في أنبوب تهجين عند درجة حرارة 60 درجة مئوية لمدة ساعة واحدة باستخدام دارئ تهجين قياسي. ويترك المحلول ويتم التهجين عن طريق مزج المسمبار 3′DIG باستخدام دارئ تهجين قياسي بتركيز نهائي مقداره 10 Pmol مللي لتر ، قبل وضعه في حاضنة لمدة ساعتين عند درجة حرارة 60 درجة مئوية. ويغسل الغشاء مرتين لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة الغرفة باستخدام 2 محلول غسل ومرتين لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة الغرفة باستخدام 0.5 محلول غسل. ويعادل بعدها الغشاء لمدة دقيقتين في دارئ الغسل قبل نقعه لمدة 30 دقيقة في محلول معوق معقم بمعدل 1 في المائة (1 غرام من كاشف كيميائي معوق مذاب في 100 ملليلتر من دارئ من حمض الماليك). ويوضع الغشاء في حاضنة في درجة حرارة الغرفة مع الأجسام المضادة المترافقة لأنزيمات الفوسفاتيز القلوية المضادة للديغوكسيجينين بتركيز مقداره 1 إلى 000 5 في محلول معوق بمعدل 1 في المائة (وزن/حجم) لمدة 30 دقيقة. ثم يغسل الغشاء مرتين لمدة 15 دقيقة بدارئ الغسيل، وتتم معادلته لمدة دقيقتين بدارئ الكشف (100 مللي مولار من كلوريدرات الميثان الأميني، 100 مللي مولار من كلوريد الصوديوم، وأس هيدروجيني معدله 9.5). ويتم تحضير محلول الطبقة التحتية عن طريق مزج 45 ميكرو لتر من محلول NBT (75 مللي غرام مللي لتر من ملح تترازوليوم النيتروجين الأزرق في 70 في المائة (حجم/حجم) من ثنائي متيل أميد النمل) و35 ميكرو لتر من محلول BCIP (50 مللي غرام مللي لتر من ملح توليدنيوم فسفات بروم خماسي - كلور رباعي - إندوليل ثلاثي في 100 في المائة من ثنائي متيل أميد النمل) في 10 مللي لتر من دارئ الكشف. وبعد وضعه في حاضنة لمدة ساعة مع الطبقة التحتية، يوقف التفاعل عن طريق الغسل بالماء.

وثبت أن هذه الطريقة أكثر حساسية 100 مرة من طريقة RT-PCR باستخدام طريقة Wetzel *et al.* (1991) (Olmos *et al.*, 2002). وتم التحقق من هذه الطريقة من خلال الاختبار الحلقي (DIAGPRO) وحققت دقة بنسبة 94 في المائة (Olmos *et al.*, 2007; Cambra *et al.*, 2008).

5-6-3 تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل للنسخ العكسي (RT-PCR) في الوقت الحقيقي

يمكن إجراء RT-PCR في الوقت الحقيقي باستخدام TaqMan، أو[2] SYBR Green I. وتم وصف طريقتي TaqMan للكشف العام عن فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) (Schneider *et al.*, 2004; Olmos et al., 2005). والبادئات ومسبار TaqMan المستخدمة في الطريقة الأولى هي التي أشار إليها Schneider et al. (2004):

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

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

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

ويتكون خليط التفاعل البالغ 25 ميكرو لتر من الآتي: 1 خليط تفاعل (0.2 مللي مولار من كل dNTP، و1.2 مللي مولار من كبريتات ماغنيزيوم $MgSO_4$)، و200 نانو مولار من كلّ من البادئات الأمامية والعكسية، و100 نانو مولار من مسبار TaqMan، 4.8 مللي مولار من كبريتات الماغنيزيوم $MgSO_4$، و0.5 ميكرو لتر من خليط RT/Platinum Taq في الوقت الحقيقي (RT-PCR الخطوة الواحدة Superscript مع Platinum Taq (بوليميراز الدنا؛ Invitrogen)[2]. و5 ميكرولترات من قالب الرنا. ويتم إجراء RT-PCR في جهاز تدوير حراري بالمعايير التالية: 15 دقيقة عند درجة حرارة 52 مئوية، و5 دقائق عند درجة حرارة 95 درجة مئوية، و60 دورة بمعدل 15 ثانية عند درجة حرارة 95 درجة مئوية، و30 ثانية عند درجة حرارة 60 درجة مئوية. وتحلل نواتج PCR في الوقت الحقيقي وفقاً لتعليمات الجهة الصانعة للمعدات.

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

واستخدمت في الطريقة الثانية البادئات ومسبار TaqMan التي أشار إليها Olmos *et al.* (2005):

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

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

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

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

ويتألف خليط التفاعل البالغ 25 ميكرولتر من الآتي: 1 ميكرو مولار من البادئة P241، 0.5 ميكرو مولار من كل من البادئتين P316D و P316M، و200 نانو مولار من مسبار TaqMan، و1 خليط TaqMan Universal PCR Master (النُظم Applied Biosystems)[2]، و1 خليط MultiScribe، ومثبط RNase (النُظم Applied Biosystems)[2] و5 ميكرو لتر من قالب الرنا. ويتم إجراء RT-PCR في جهاز تدوير حراري بالمعايير التالية: 30 دقيقة عند درجة حرارة 48 درجة مئوية، و10 دقائق عند درجة حرارة 95 درجة مئوية، و40 دورة بمعدل 15 ثانية عند درجة حرارة 95 درجة مئوية، 60 ثانية عند 60 درجة مئوية، ويبرّد بسرعة إلى درجة حرارة الغرفة. وتحلل نواتج PCR في الوقت الحقيقي وفقاً لتعليمات الجهة الصانعة للمعدات.

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

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

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

ويجوز إدراج بادئات الضوابط الداخلية التالية (Menzel *et al.*, 2002) لكفالة صحّة نتائج الاختبار:

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

ويستخدم بروتوكول من خطوتين لإجراء طريقة RT-PCR. ويتألف مزيج تفاعل النسخ العكسي (RT) من الآتي: 2 ميكرو لتر من البادئة P1 10 ميكرو مولار، و2 ميكرو لتر من 10 البادئة Nad5-R 10 ميكرو مولار، و4 ميكرو غرامات من مجموع الرنا، و5 ميكرو لتر ماء. ويوضع المزيج في حاضنة عند درجة حرارة 72 درجة مئوية لمدة 5 دقائق، ثم يوضع على الثلج. وتُضاف بعد ذلك العناصر التالية: 4 ميكرو لتر من 5 دارئ السلالة الأولى (Invitrogen)[2]، و2 ميكرو لتر من ثنائي التيوتريتول 0.1 مولار، و1 ميكرو لتر dNTPs 10 مللي مولار، و0.5 ميكرو لتر من RNaseOUT™ (40 وحدة ميكرو لتر) (Invitrogen)[2]، و1 ميكرو لتر Superscript II (Invitrogen)[2]، و2.5 ميكرو لتر ماء. ويوضع المزيج في حاضنة عند درجة حرارة 42 درجة مئوية لمدة 60 دقيقة ثم عند درجة حرارة 99 درجة مئوية لمدة خمس دقائق. ويتكون خليط تفاعل PCR البالغ 24 ميكرو لترا على النحو التالي: 400 نانو مولار من البادئة PPV-U، و350 نانو مولار من البادئة PPV-FM، و150 نانو مولار من البادئة PPV-FD، و200 نانو مولار من البادئة PPV-RR، و100 نانو مولار من البادئة Nad5-F، و100 نانو مولار من البادئة Nad5-R، و200 ميكرو مولار dNTPs، و2 مللي مولار من كلوريد الماغنيزيوم $MgCl_2$، و1 دارئ كرزاي (Karsai *et al.*, 2002)، و1 إلى 000 42 SYBR Green I[2] و0.1 ميكرو لتر من إنزيم البلمرة العالي الدقة لحمض Platinum Taq DNA (Invitrogen)[2]. ويضاف خليط التفاعل و1 ميكرو لتر من cDNA المخفف (4:1) إلى أنبوب الطرد المركزي (PCR) الدقيق المعقَّم أو ما يعادله. ويتم إجراء PCR في جهاز تدوير حراري بالمعايير التالية: دقيقتان عند درجة حرارة 95 مئوية، و39 دورة بمعدل 15 ثانية عند درجة 95 درجة مئوية، و60 ثانية عند درجة حرارة 60 درجة مئوية، ثم يبرّد سريعاً إلى درجة حرارة الغرفة. ويُجرى تحليل منحنى الذوبان من خلال الوضع في حاضنة عند درجة حرارة 60 درجة مئوية إلى 95 درجة مئوية عند 0.1 درجة مئوية/ثانية من معدل الذوبان وعلى أن يكون متوسط المنحنى الممهَّد نقطة واحدة.

وفي ظل الظروف التي حددها Varga and James (2005)، تكون درجات حرارة الذوبان لكل ناتج: الكشف العام عن فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) (جزء من 74 زوجاً قاعديا): 80.08-81.52 درجة مئوية.

سلالات D (جزء من 114 من الأزواج القاعدية): 84.3 درجة مئوية- 84.43 درجة مئوية
سلالات M (جزء من 380 من الأزواج القاعدية): 85.34 درجة مئوية-86.11 درجة مئوية
الضبط الداخلي (جزء من 181 من الأزواج القاعدية): 82.45 درجة مئوية-82.63 درجة مئوية.

وقام Varga وJames (2005) بتقييم طريقتهما باستخدام عزلات سلالة PPV-C، وPPV-D، و-PPV EA، وPPV-M، وسلالة غير معروفة، في النوعين نيكوتيانيا (*Nicotiana*) وبرونوس (*Prunus*).

4- تحديد هوية السلالات

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

وبالنظر إلى تقلُّب فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) فإن الطرق الأخرى بخلاف تحديد التتابع أو بعض التقنيات القائمة على PCR (انظر أدناه) قد تسفر عن نتائج خاطئة في نسبة ضئيلة من العزلات. على أنه يمكن عموماً التمييز بين النوعين D وM لفيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) باستخدام الطرق المصلية أو الجزيئية المبيَّنة أدناه (Candresse and Cambra, 2006; Cambra *et al.*, 2006a; Capote *et al.*, 2006). ولا تتوفر التقنيات لتحديد هوية سلالات مثل An وT سيما أنه لم تتم المصادقة على الطرق لتحديد هويتها ولم تُنشر، أو أنه تمّ توصيف عدد قليل جداً من العزلات حتى الآن.

الشكل 1: الخطوات في طريقة تحديد هوية سلالات *فيروس جدري الخوخ* (*Plum pox virus*)

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

1-4 التحديد المصلي لهوية السلالات

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

وتم التحقق من هذه الطريقة في الاختبار الحلقي (DIAGPRO) حيث تبين أنها دقيقة بنسبة 84 في المائة في اكتشاف PPV-D، و89 في المائة في اكتشاف PPV-M (Olmos *et al.*, 2007; Cambra *et al.*, 2008). وأما الجسم المضاد الأحادي الكلون 4D فهو يخص السلالة PPV-D ولكنه لا يتفاعل مع جميع عزلات PPV-D. علاوةً على ذلك، فإن الجسم المضاد الأحادي الكلون AL المستخدم في كشف السلالة PPV-M يتفاعل مع العزلات التي تنتمي إلى السلالتين M، وRec وT لأن هذه المجموعات تشترك في نفس تتابع الغطاء البروتيني. ولذلك يلزم إجراء اختبار جزيئي للتمييز بين السلالات M وRec وT المكتشفة باستخدام جسم مضاد أحادي الكلون خاص بالسلالة M.

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

2-4 التحديد الجزيئي لهوية السلالات

1-2-4 تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل للنسخ العكسي (RT-PCR)

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

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

ويتكون خليط التفاعل البالغ 25 ميكرو لتر من الآتي: 1 ميكرو مولار من البادئة P1، و1 ميكرو مولار من البادئة PD أو البادئة PM، و250 ميكرو مولار dNTPs، ووحدة واحدة من إنزيم النسخ العكسي AMV (10 وحدات/ ميكرو لتر)، و0.5 وحدة من إنزيم بلمرة الدنا Taq (5 وحدات/ ميكرو لتر)، و2.5 ميكرو لتر 10 دارئ إنزيم البلمرة Taq، و1.5 مللي مولار كلوريد الماغنيزيوم $MgCl_2$، و0.3 في المائة Triton X-100 و2 في المائة فورماميد و5 في المائة ميكرو لترات من وحدة الرنا المعيارية. ويتم إجراء طريقة RT-PCR في جهاز تدوير حراري بالمعايير التالية: 45 دقيقة عند درجة حرارة 42 درجة مئوية، ودقيقتان عند درجة حرارة 94 درجة مئوية، و40 دورة بمعدل 30 ثانية عند درجة حرارة 94 درجة مئوية، و30 ثانية عند درجة حرارة 60 درجة مئوية، و60 ثانية عند درجة حرارة 72 درجة مئوية، ويعقب ذلك تمديد نهائي لمدة 10 دقائق عند درجة حرارة 72 درجة مئوية. وتحلل نواتج PCR عن طريق الارتحال الكهربائي للهلام. وينتج كل من زوج البادئات P1/PD، وزوج البادئات P1/PM امبليكون من 198 زوجاً قاعديا. وقام Olmos *et al.* (1997) بتقييم طريقتهم باستخدام 6 عزلات من السلالة PPV-D، و4 عزلات من السلالة PPV-M.

كما أن الطريقة RT-PCR بالوقت الفعلي مع SYBR Green I^2 التي وضعها Varga and James (2005)، والوارد وصفها بالتفصيل في القسم 3-6-5، ملائمة أيضاً لتحديد هوية السلالات D وM في فيروس جدري الخوخ.

وتحدَّد السلالة PPV-REC باستخدام البادئات mD5 وmM3 الخاصة بالسلالة Rec التي بّينها Šubr *et al.* (2004):

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

ويتكون خليط التفاعل البالغ 25 ميكرو لتر من الآتي (نقلاً عن Šubr *et al.*, 2004): 1 ميكرو مولار من كل بادئة، و250 ميكرو مولار dNTPs، ووحدة واحدة من إنزيم النسخ العكسي AMV (10 وحدات/ ميكرو لتر)، و0.5 وحدة من إنزيم بلمرة الدنا Taq (5 وحدات/ ميكرو لتر)، و2.5 ميكرو لتر 10 دارئ إنزيم البلمرة Taq، 2.5 ملليمتر من كلوريد الماغنيزيوم $MgCl_2$ و0.3 في المائة Triton X-100، و5 ميكرو لتر من الرنا المستخلص (انظر القسم 3-6). ويُجرى النسخ العكسي ببادئات عشوائية عند درجة حرارة 42 درجة مئوية لمدة 45 دقيقة (Glasa *et al.*, 2002). ويُجرى PCR باستخدام إزالة أوّلية للخواص الطبيعية على حرارة 94 درجة مئوية لمدة 3 دقائق، تليها 35 دورة على حرارة 94 درجة مئوية لمدة 45 ثانية، و60 درجة مئوية لمدة 30 ثانية و72 درجة مئوية لمدة 60 ثانية، وتمديد نهائي على حرارة 72 درجة مئوية لمدة 7 دقائق (Šubr *et al.*, 2004). ويحلل ناتج PCR البالغ 605 زوجاً قاعديا من خلال الترحال الكهربائي للهلام.

يتم تحديد هوية PPV-CR باستخدام بادئات CR8597F وCR9023R التي بيّنها Glasa *et al.* (2013):

CR8597F (5′-ATG ATG TGA CGT TAG TGG AC-3′)
CR9023R (5′-TCG TGT GTT AGA CAG GTC AAC-3′)

ويُستخدم بروتوكول RT-PCR بخطوتين لتفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل عن طريق النسخ العكسي لكشف محدد لعزلات PPV-CR (Glasa *et al.*, 2013). ويتم توليف (c)DNA مكمّل من مجموع مستخلصات الرنا (NucleoSpin RNA Plant Kit, Macherey-Nagel) باستخدام بادئات مسدوسة عشوائية والنسخ العكسي في الوقت الحقيقي AMV. ثم تُضاف قاسمة cDNA إلى خليط تفاعل PCR الذي يحتوي على EmeraldAmp GT PCR Master Mix (TaKaRa Bio Inc). ويُجرى PCR بمعايير التدوير الحراري التالية: 60 ثانية عند 98 درجة مئوية، 35 دورة من 89 درجة مئوية لمدة 30 ثانية، و55 درجة مئوية لمدة 30 ثانية و72 درجة مئوية لمدة 30 ثانية، يليها تمديد نهائي بحرارة 72 درجة مئوية لمدة 5 دقائق. وتُحلّل نتائج PCR بالرحلان الكهربائي للهلام. وتضخّم البادئات الخاصة بـ CRمنتج 427 زوجاً قاعدياً في الحجم، وباستهداف منطقة ترميز CP النهائية ′5. وتمّت المصادقة على خصوصية بادئات CR باستخدام عازلات سلالات فيروس جدري الخوخ D, M, Rec, T, W, EA وC (Glasa *et al.*, 2013).

2-2-4 النسخ العكسي للأسر المناعي - تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل

ينبغي إجراء مرحلة الأسر المناعي كما هو مبيَّن في القسم 3-6-3 ويضاف خليط تفاعل PCR مباشرة إلى أنابيب PCR المركزي المغطاة. ويتم تحديد هوية سلالة PPV-D و PPV-M حسب ما هو مبيَّن في القسم 4-2-1

3-2-4 النسخ العكسي التعاوني - تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل

ينبغي إجراء عملية تحديد هوية PPV-D أو PPV-M كما هو مبين في القسم 4-6-3 باستخدام المسبار ′3DIG الخاص بالسلالتين D وM (Olmos *et al.*, 2002):

المسبار الخاص بالسلالة PPV-D: ′5-CTT CAA CGA CAC CCG TAC GGG CA- DIG -′3

المسبار الخاص بالسلالة PPV-M: ′5-AAC GCC TGT GCG TGC ACG T- DIG -′3

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

4-2-4 تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل للنسخ العكسي في الوقت الحقيقي

يتم التعرف تحديداً على السلالة PPV-D وPPV-M باستخدام كيمياء SYBR Green I وفقاً لطريقة Varga، **و**James (2005) (انظر القسم 3-6-5) أو طريقة TaqMan التي وصفها Capote *et al.* (2006).

وفي ما يلي البادئات ومسابير TaqMan المستخدمة في طريقة Capote *et al.* (2006)

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

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

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

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

ويتكون خليط التفاعل البالغ 25 ميكرو لتر من الآتي: 1 ميكرو مولار من كل بادئة، و150 نانو مولار من مسبار MGB-D، أو مسبار MGB-M FAM، و1 خليط TaqMan Universal PCR Master (النُظم Applied Biosystems)[2]، و1 خليط مثبط MultiScribe، وRNase (النُظم Applied Biosystems)[2]. ويضاف خليط التفاعل و5 ميكرو لتر من قالب الرنا المعيارية (القسم 3-6)، ويتم إجراء RT-PCR في جهاز تدوير حراري بالمعايير التالية: 30 دقيقة عند درجة حرارة 48 درجة مئوية، و10 دقائق عند درجة حرارة 95 درجة مئوية، و40 دورة بمعدل 15 ثانية عند درجة حرارة

95 درجة مئوية، و60 ثانية عند درجة حرارة 60 درجة مئوية. وتحلل نواتج PCR في الوقت الحقيقي وفقاً لتعليمات الجهة الصانعة. وقام Capote *et al.* (2006) بتقييم هذه الطريقة باستخدام 12 عزلة لكل من PPV-D وPPV-M، و14 عيّنة مصابة بكلا السلالتين.

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

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

ويجوز إدراج بادئات الضبط الداخلي التالية (Menzel *et al.*, 2002) لكفالة صحة نتائج الاختبار:

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

ويتكون خليط تفاعل RT-PCR البالغ 25 ميكرو لتر على النحو التالي: 2.5 ميكرو لتر من محلول مائي مخفف من الرنا المستخلصة بنسبة 1 إلى 10 (انظر القسم 3-6) و22.5 ميكرو لتر من الخليط الرئيسي. ويتكون الخليط الرئيسي من الآتي: 2.5 ميكرو لتر من دارئ كارزاي (Karsai *et al.*, 2002)؛ و0.5 ميكرو لتر لكل من 5 ميكرو مولار من البادئات PPV-U، أو PPV-RR، وNad5R وNad5F؛ و0.5 ميكرو لتر 10 dNTPs مللي مولار، و1 ميكرو لتر من كلوريد الماغنيزيوم $MgCl_2$ 50 مللي مولار؛ و0.2 ميكرو لتر من RNaseOUT (40 وحدة/ميكرولتر Invitrogen)[2]؛ و0.1 ميكرو لتر من النسخ العكسي Superscript™ III (200 وحدة/ ميكرو لتر، Invitrogen)[2] ؛ و0.1 ميكرو لتر من إنزيم بلمرة الدنا Platinum® Taq العالي الدقة (5 وحدات/ ميكرولتر، Invitrogen)؛ و1 ميكرو لتر من 1: 5 000 (في TE, pH 7.5) SYBR Green I (Sigma)[2] في 16.1 ميكرو لتر ماء. ويتم إجراء التفاعل في جهاز تدوير حراري بالمعايير التالية: 10 دقائق عند درجة حرارة 50 درجة مئوية، ودقيقتان عند درجة حرارة 95 درجة مئوية، و29 دورة بمعدل 15 ثانية عند درجة حرارة 95 درجة مئوية، و60 ثانية عند درجة حرارة 60 درجة مئوية. ويتم إجراء تحليل منحنى الذوبان عن طريق الوضع في حاضنة عند درجة حرارة 60 درجة مئوية حتى 95 درجة مئوية مع معدلات ذوبان 0.1 درجة مئوية/ الثانية ومنحنى بسيط بمعدل نقطة واحدة. وفي ظل الأوضاع التي حددها Varga وJames (2006)، تكون درجات الحرارة لذوبان كلّ منتج:

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

وقام Varga وJames (2006أ) بتقييم طريقتهما باستخدام عزلة لكل من PPV-C، وPPV-D، وPPV-EA، وPPV-W.

5- شواهد الاختبارات الجزيئية

لكي يُأخذ بنتيجة الاختبار التي تم التوصل إليها، ينبغي تناول شواهد ملائمة -بحسب نوع الاختبار المستخدم ودرجة اليقين المطلوبة -لكل سلسلة من سلسلات عزل حمض النواة وتضخيمه للآفة المستهدفة أو حمض النواة المستهدف. وبالنسبة إلى التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي، يتألف الحد الأدنى من الشواهد واجبة الاستخدام من شاهد إيجابي لحمض النواة وشاهد سلبي للتضخيم (لا شاهد نموذج).

الشاهد الإيجابي لحمض النواة. يستخدم هذا الشاهد لرصد كفاءة طريقة الاختبار (بغض النظر عن عملية الاستخراج) والتضخيم، في التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي. ويجوز استخدام حمض نووي ريبي نباتي أو فيروسي أو مواد نباتية مصابة بفيروس جدري الخوخ مدموغة على غشاء. ويجب على الحمض النووي الرّيبي المخزن أو المواد المعدّة المصابة بالفيروس، الخضوع للتحقق بصورة دورية من أجل التثبت من جودة الشاهد مع فترات التخزين الطويلة.

الشاهد الداخلي. بالنسبة إلى التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي في الوقت الحقيقي، يمكن إدراج الحمض النووي الرّيبي المرسال التابع للجينة التنبئية (*nad5*, Menzel *et al.*, 2002) ضمن بروتوكول التفاعل كشاهد داخلي من أجل استبعاد احتمال أية نتائج سلبية كاذبة للتفاعل، جراء فشل استخراج حمض النواة أو فساده أو وجود كوابح للتفاعل.

الشاهد السلبي للتضخيم (لا شاهد نموذج). يعتبر هذا الشاهد ضرورياً من أجل التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي التقليدي والتفاعل في الوقت الحقيقي من أجل استبعاد النتائج الإيجابية الكاذبة جراء التلوث (مع الحمض النووي المستهدف) خلال مرحلة إعداد مزيج التفاعل. ولدى مرحلة التضخيم، يضاف ماء ملائم للتفاعل وخال من إنزيم ريبُونُوكْلَياز، كان قد استخدم لإعداد مزيج التفاعل.

شاهد الاستخراج الإيجابي. يستخدم هذا الشاهد لضمان إتاحة حمض النواة المستهدف الذي تم استخراجه بالكمية والجودة الكافيتين للتفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي، وإمكانية كشف الفيروس المستهدف. ويستخرج حمض النواة من النسيج العائل المصاب بالفيروس أو من أنسجة نباتات أو حشرات سليمة لدغها فيروس جدري الخوخ. لدى عملية التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي، يجب التحوط لتفادي التلوث جراء الرذاذ الناجم عن الشواهد الإيجابية أو العينات الإيجابية.

شاهد الاستخراج السلبي. يستخدم هذا الشاهد لرصد التلوث خلال استخراج حمض النواة و/أو رد الفعل إزاء النسيج العائل. ينطوي هذا الشاهد على حمض نواة استخرج من نسيج عائل غير مصاب فخضع من ثم للتضخيم. ويوصى باستخدام شواهد متعددة حين تكون العينات الإيجابية متوقعة بأعداد كبيرة.

التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي التقليدي والتفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي للاصطياد المناعي في حال التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي للاصطياد حيث لم يتم أي استخراج نووي، ينبغي استخدام عصارة نباتات من فيروس جدري الخوخ الإيجابي المعروف كشاهد إيجابي، وعصارة من نباتات سليمة كشاهد سلبي. ويمكن أيضاً إدراج شاهد تضخم سلبي. ويُستخدم هذا الشاهد الأخير من أجل استبعاد النتائج الإيجابية الكاذبة جراء التلوث خلال مرحلة إعداد مزيج التفاعل ولدى مرحلة التضخيم، يضاف ماء ملائم للتفاعل وخال من إنزيم ريبُونُوكْلَياز، كان قد استخدم لإعداد مزيج التفاعل لاستخدامه كشاهد تضخيم سلبي.

6- السجلات

يجب الاحتفاظ بالسجلات والأدلّة كما جرى وصفها في القسم 2-5 من المعيار الدولي رقم 27 من المعايير الدولية لتدابير الصحة النباتية (*بروتوكولات التشخيص للآفات الخاضعة للوائح*).

وفي الحالات التي قد تتأثر فيها أطراف متعاقدة أخرى بنتائج التشخيص، وبخاصة في حالة عدم الامتثال (المعيار الدولي رقم 13 من المعايير الدولية لتدابير الصحة النباتية *(الخطوط التوجيهية*

للإخطار بعدم الامتثال وإجراءات الطوارئ) وفي حالة ظهور الفيروس في منطقة للمرة الأولى، ينبغي الاحتفاظ بالمواد الإضافية التالية لمدة سنة واحدة على الأقل بطريقة تضمن إمكانية تعقّبها:

- ينبغي الاحتفاظ بالعينة الأصلية (بعد وضع العلامة الملائمة عليها) مجمَّدة، إذا أمكن، عند درجة حرارة 80 درجة مئوية تحت الصفر أو تبرّد تبريداً جافاً وتحفظ في درجة حرارة الغرفة.
- ينبغي، عند الاقتضاء، الاحتفاظ بمستخلصات الرنا عند درجة حرارة 80 درجة مئوية تحت الصفر، وينبغي الاحتفاظ بالمستخلصات النباتية المبقعة أو أجزاء الأنسجة المطبوعة (ورق على ورق أو غشاء من النايلون) في درجة حرارة الغرفة.
- ينبغي، عند الاقتضاء، الاحتفاظ بنواتج تضخيم RT-PCR عند درجة حرارة 80 مئوية تحت الصفر.

7- نقاط الاتصال للحصول على معلومات إضافية

يمكن الحصول على مزيد من المعلومات حول هذا البروتوكول من:

United States Department of Agriculture (USDA), Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), Plant Protection and Quarantine (PPQ), Science and Technology Beltsville Laboratory, Building 580 BARC-East, Powder Mill Road, Beltsville, MD 20705, United States of America (Vessela Mavrodieva; email: vessela.a.mavrodieva@aphis.usda.gov; tel.: +1 3013139208; fax: +1 3023139232).

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

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

Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská, 84505 Bratislava, Slovakia (Miroslav Glasa; email: virumig@savba.sk; tel.: +421 259302447; fax: +421 254774284).

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Plant Protection and Biotechnology Centre, Carretera Moncada-Náquera km 5, 46113 Moncada (Valencia), Spain (Antonio Olmos; email: aolmos@ivia.es; tel.: +34 963424000; fax: +34 963424001).

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

Sidney Laboratory, Canadian Food Inspection Agency (CFIA), British Columbia, V8L 1H3 Sidney, Canada (Delano James; email: Delano.James@inspection.gc.ca; tel.: +1 250 3636650; fax: +1 250 3636661).

ويمكن تقديم طلب لمراجعة بروتوكول تشخيص من جانب المنظمات القطرية لوقاية النباتات، والمنظمات الإقليمية لوقاية النباتات، أو الأجهزة الفرعية التابعة لهيئة تدابير الصحة النباتية من خلال أمانة الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات (ippc@fao.org) التي ستحوّلها بدورها إلى فريق الخبراء الفني المعني ببروتوكولات التشخيص.

8- الاعتراف والشكر

أعدّ المسودة الأولى لبروتوكول التشخيص هذا إسبانيا M. Cambra, A. Olmos and N. Capote, (IVIA, (انظر القسم السابق))، N.L. Africander, (Department of Agriculture, Forestry and Fisheries, وزارة الزراعة في الولايات المتحدة الأمريكية، انظر القسم Stellenbosch South Africa); L. Levy السابق)، S.L. Lenardon (Instituto de Fitopatologia y Fisiologia Vegetal - Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria (IFFIVE-INTA), Córdoba, Argentina), G. Clover (Plant Health & Environment Laboratory, Ministry for Primary Industries, Auckland, New Zealand) and D. Wright (Plant Health Group, Central Science Laboratory, Sand Hutton, York, United Kingdom).

9- المراجع

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

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

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

CABI. 2018. Crop Protection Compendium. Wallingford, UK, CABI. Available at http://www.cabi.org/cpc/ (last accessed 14 February 2018).

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

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

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

Cambra, M., Capote, N., Olmos, A., Bertolini, E., Gorris, M.T., Africander, N.L., Levy, L., Lenardon, S.L., Clover, G. & Wright, D. 2008. Proposal for a new international protocol for detection and identification of *Plum pox virus*. Validation of the techniques. *Acta Horticulturae*, 781: 181–192.

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

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

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

Chirkov, S., Ivanov, P. & Sheveleva, A. 2013. Detection and partial molecular characterization of atypical *Plum pox virus* isolates from naturally infected sour cherry. *Archives of Virology*, 158: 1383–1387.

Chirkov, S., Ivanov, P., Sheveleva, A., Zakubanskiy, A. & Osipov, G. 2016. New highly divergent *Plum pox virus* isolates infecting sour cherry in Russia. *Virology*, 502: 56–62.

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

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

Desvignes, J.C. 1999. *Virus diseases of fruit trees*. Paris, Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes (CTIFL) Centr'imprint. 202 pp.

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2004. Diagnostic protocol for regulated pests: *Plum pox potyvirus*. PM 7/32(1). *EPPO Bulletin*, 34: 247–256.

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2006. Current status of *Plum pox virus* and sharka disease worldwide. *EPPO Bulletin*, 36: 205–218.

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2018a. EPPO Database on Diagnostic Expertise. List of validation data. Available at http://dc.eppo.int/validationlist.php (last accessed 19 March 2018).

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2018b. EPPO Global Database. *Plum pox virus* (PPV000). Available at https://gd.eppo.int/taxon/PPV000 (last accessed 14 February 2018).

García, J.A., Glasa, M., Cambra, M. & Candresse, T. 2014. *Plum pox virus* and sharka: A model potyvirus and a major disease. *Molecular Plant Pathology*, 15: 226–241.

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

Glasa, M., Marie-Jeanne, V., Labonne, G., Šubr, Z., Kúdela, O. & Quiot, J-B. 2002. A natural population of recombinant *Plum pox virus* is viable and competitive under field conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 843–853.

Glasa, M., Prikhodko, Y., Predajňa, L., Nagyová, A., Shneyder, Y., Zhivaeva, T., Šubr, Z., Cambra, M. & Candresse, T. 2013. Characterization of sour cherry isolates of *Plum pox virus* from the Volga basin in Russia reveals a new cherry strain of the virus. *Phytopathology*, 103: 972–979.

Gougherty A.V., Pazdernik K.T., Kaiser M.S. & Nutter Jr, F.W. 2015. Evaluation of sampling and testing efficiencies of *Plum pox virus* eradication programs in Pennsylvania and Ontario. *Plant Disease*, 99(9): 1247–1253.

Harju, V.A., Henry, C.M., Cambra, M., Janse, J. & Jeffries, C. 2000. Diagnostic protocols for organisms harmful to plants – DIAGPRO*. *EPPO Bulletin*, 30: 365–366.

Ilardi, V. & Tavazza, M. 2015. Biotechnological strategies and tools for *Plum pox virus* resistance: Trans-, intra-, cis-genesis, and beyond. *Frontiers in Plant Science*, 6: 379.

James, D. & Thompson, D. 2006. Hosts and symptoms of *Plum pox virus*: Ornamental and wild *Prunus* species. *EPPO Bulletin* 36: 222–224.

James, D., Varga, A. & Sanderson, D. 2013. Genetic diversity of *Plum pox virus*: Strains, disease and related challenges for control. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 35: 431–441.

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

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

Llácer, G. & Cambra, M. 2006. Hosts and symptoms of *Plum pox virus*: Fruiting *Prunus* species. *EPPO Bulletin*, 36: 219–221.

Menzel, W., Jelkmann, W. & Maiss E. 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods*, 99: 81–92.

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

Myrta, A., Potere, O., Crescenzi, A., Nuzzaci, M. & Boscia, D. 2000. Properties of two monoclonal antibodies specific to cherry strain of *Plum pox virus*. *Journal of Plant Pathology*, 82 (suppl. 2): 95–101.

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

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

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

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

Olmos, A., Capote, N. & Candresse, T. 2006. Detection and characterization of *Plum pox virus*: Molecular methods. *EPPO Bulletin*, 36: 262–266.

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

PaDIL (Pests and Diseases Image Library). 2018. Plant Biosecurity Toolbox. Available at http://pbt.padil.gov.au/index.php?q=node/20&pbtID=136 (last accessed 27 February 2018).

Palmisano, F., Boscia, D., Minafra, A., Myrta, A. & Candresse, T. 2012. An atypical Albanian isolate of *Plum pox virus* could be the progenitor of the Marcus strain. *Petria*, 22(3): 224.

Pasquini, G. & Barba, M. 2006. The question of seed transmissibility of *Plum pox virus*. *EPPO Bulletin*, 36: 287–292.

Rodamilans, B., León, D.S., Mühlberger, L., Candresse, T., Neumüller, M., Oliveros, J.C. & García, J.A. 2014. Transcriptomic analysis of *Prunus domestica* undergoing hypersensitive response to *Plum pox virus* infection. *PLOS One*, 9(6): e100477.

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

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

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

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

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

Varga, A. & James, D. 2006b. Use of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of *Plum pox virus*. *Journal of Virological Methods*, 138: 184–190.

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

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

تاريخ المطبوع

هذا ليس جزءاً رسمياً من المعيار
تاريخ هذا المطبوع متصل بالنسخة الصادرة باللغة العربية فقط، وللحصول على لمحة تاريخية شاملة، يرجى الاطلاع على النسخة الصادرة باللغة الإنكليزية للمعيار.

2012-03 هيئة تدابير الصحة النباتية – الدورة السابعة اعتماد المعيار.

المعيار الدولي رقم 27: **الملحق 2.** *فيروس جدري الخوخ (Plum pox virus)*. (2012).

أعادت أمانة الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات في ديسمبر/كانون الأول 2012 تنسيق المعيار (على أفضل وجه باللغة العربية) للاتساق في معلومات الاعتماد، والمراجع، والتعاريف مع النسخة الإنكليزية للمعيار.

2016-12 قامت أمانة الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات بترجمة وإدراج التعديلات الحبرية طبقاً لإجراءات إبطال المعايير المعتمدة من هيئة تدابير الصحة النباتية – الدورة 10 (2015)

2018-08 اعتمدت لجنة المعايير بروتوكول التشخيص نيابة عن هيئة تدابير الصحة النباتية.
المعيار الدولي رقم 27. **الملحق 2.** *فيروس جدري الخوخ (Plum pox virus)*. (2018). روما، الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات، منظمة الأغذية والزراعة.

آخر تحديث لتاريخ المطبوع: 2019-06

الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات

الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات هي اتفاقية صحة نباتية دولية تهدف إلى حماية النباتات المزروعة و النباتات البرية عن طريق منع دخول و انتشار الآفات. تزايد حجم السفريات و التجارة الدولية بشكل كبير عن ذي قبل. فعندما يتنقل البشر والسلع حول العالم فإن الكائنات التي تمثل خطراً علي النباتات تنتقل معهم.

تنظيم :

- هناك أكثر من 180 طرف متعاقد في الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات.
- لكل طرف متعاقد منظمة قطرية لوقاية النباتات و نقطة اتصال رسمية للاتفاقية الدولية لوقاية النباتات.
- تعمل تسع منظمات إقليمية لوقاية النباتات لتيسير تنفيذ الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات في البلدان.
- تتواصل الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات مع المنظمات الدولية ذات الصلة للمساعدة في بناء القدرات الإقليمية و الوطنية.
- أمانة الاتفاقية تقدمها منظمة الأغذية و الزراعة للأمم المتحدة (الفاو).

الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات
Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Rome, Italy
رقم الهاتف: 4812 5705 06 39+
رقم الفاكس: 4819 5705 06 39+
البريد الالكتروني: ippc@fao.org
الموقع الالكتروني: www.ippc.int