



## بروتوكول تشخيصي 2: *Plum pox virus*

تركزت هذه الصفحة فارغة عمداً

اعتمدت هيئة تدابير الصحة النباتية بروتوكول التشخيص هذا في أغسطس/آب 2018  
هذا الملحق هو جزء إلزامي من المعيار الدولي رقم 27

المعيار الدولي رقم 27

## بروتوكولات تشخيص الآفات الخاضعة للوائح

### بروتوكول التشخيص 2: فيروس جذري البرقوق (الخوخ\*) *Plum pox virus*

(اعتمد في 2018، نشر في 2020)

[\* يستخدم مصطلح البرقوق أو الخوخ مراعاة للاختلافات المحلية في البلدان الناطقة باللغة العربية]

#### المحتويات

1-3	معلومات حول الآفة	1-3
2-3	معلومات تصنيفية	2-3
3-3	الكشف وتحديد هوية الآفة	3-3
4-3	نطاق النباتات العائلة	4-3
5-3	الأعراض	5-3
6-3	الكشف بالطرق البيولوجية	6-3
7-3	أخذ العينات للفحوصات المصلية والجزئية	7-3
8-3	الكشف وتحديد الهوية بالطرق المصلية	8-3
9-3	الفحص المصلي غير المباشر بأجسام مضادة من نوع سانديش للمنتصات المناعية المرتبطة بالإنزيمات	9-3
10-3	الفحص المصلي بأجسام مضادة من نوع سانديش للمنتصات المناعية المرتبطة بالإنزيمات	10-3
11-3	الكشف وتحديد الهوية بالطرق الجزئية	11-3
12-3	تنقية الحمض النووي الريبي والاصطباغ المناعي وتوليف الحمض النووي الصبغي cDNA	12-3
13-3	تفاعل البوليميراز المتسلسل مع النسخ العكسي	13-3
14-3	النسخ العكسي المرتبط بالمناعة - تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل	14-3
15-3	النسخ العكسي التعاوني - تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل (Co-RT-PCR)	15-3
16-3	التفاعل الأني لإنزيم البلمرة المتسلسل للنسخ العكسي (RT-PCR)	16-3
17-3	تحديد هوية السلالات	17-3
18-3	التحديد المصلي لهوية السلالات	18-3
19-3	التحديد الجزيئي لهوية السلالات	19-3
20-3	النسخ العكسي - تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل (RT-PCR)	20-3
21-3	النسخ العكسي المرتبط بالمناعة - تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل	21-3
22-3	النسخ العكسي التعاوني - تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل	22-3
23-3	التفاعل الأني لإنزيم البلمرة المتسلسل للنسخ العكسي	23-3
24-3	ضوابط الاختبارات الجزيئية	24-3
25-3	السجلات	25-3
26-3	نقاط الاتصال للحصول على معلومات إضافية	26-3
27-3	شكر وتقدير	27-3
28-3	المراجع	28-3

## 1- معلومات حول الآفة

الشاركا (جدري الخوخ أو البرقوق) هو أحد أخطر الأمراض الفيروسية للفاكهة ذات النواة الحجرية. وتم الإبلاغ لأول مرة عن هذا المرض في البرقوق *Prunus domestica* في بلغاريا في الفترة 1917-1918 وتم وصفه بأنه مرض فيروسي في عام 1932. وانتشر الفيروس منذ ذلك الحين بشكل مطرد 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 الشاركا الذي يسببه فيروس جدري الخوخ (*Plum pox virus*) على النباتات المنتجة لجنس *Prunus* (العائلة الوردية Rosaceae). وهو يتسبب في إحداث أضرار كبيرة لأشجار المشمش (*Prunus armeniaca*)، والبرقوق (*P. domestica*)، والدراق (*P. persica*)، والبرقوق الياباني (*P. salicina* و *P. persica*) لأنه يقلل من الجودة ويتسبب في سقوط الثمرة قبل نضجها. وتشير التقديرات إلى أن تكاليف مكافحة الشاركا في جميع أنحاء العالم منذ سبعينات القرن الماضي تزيد على 10 مليارات يورو (Cambra et al., 2006b).

وفيروس جدري البرقوق (*Plum pox virus*) هو أحد أفراد جنس *Potyvirus* في عائلة فيروسات *Potyviridae*. وجسيمات الفيروس عبارة عن عصيات مرنة تبلغ نحو 700 نانومتر x 11 نانومتر وهي مكونة من جزيء من الحمض النووي الريبي (RNA) الوحيد السلسلة ويضم نحو 10 000 نيوكليوتيد يغطيها نحو 2000 وحدة فرعية من البروتين الوحيد الطبقة (García et al., 2014). وينتقل فيروس جدري البرقوق (*Plum pox virus*) في الحقول بطريقة غير مستمرة عن طريق حشرة المن، ولكن حركة مواد الإكثار النباتية المصابة تمثل الطريقة الرئيسية التي ينتشر بها الفيروس لمسافات بعيدة. ولم يتأكد بعد انتقال الفيروس من خلال البذور واللقاح (Pasquini and Barba, 2015; Iardi and Tavazza, 2006). ويمكن أن ينتقل فيروس جدري البرقوق بشكل ميكانيكي، في ظروف التجربة، إلى العديد من أنواع *Prunus* والعديد من النباتات العشبية مثل *Arabidopsis thaliana*، و *Chenopodium foetidum*، و *Nicotiana benthamiana*، و *Nicotiana clevelandii*، و *Nicotiana glutinosa* و *Pisum sativum* (Barba et al., 2011).

ويمكن، حالياً، تصنيف عزلات فيروس جدري البرقوق (*Plum pox virus*) ضمن تسع سلالات أحادية النمط الخلوي:

Rec (Recombinant)، D (Dideron)، M (Marcus)، C (Cherry)، EA (El Amar)، W (Winona) ومتحدة W (James et al., 2013). (Ancestor Marcus) An و CR (كرز روسي)، و T (Turkish). وللسلالات تسلسل جينومي موحد، وقد تختلف من حيث الأعراض، والقدرة الإمراضية، ونطاق الكائنات العائلة، وحجم الوباء وقابلية الانتقال بالمن. وتنتمي معظم السلالات التي يتم عزلها إلى فيروس جدري البرقوق (*Plum pox virus*) للسلالتين D و M. ويمكن لسلالتي D و M لفيروس جدري البرقوق (*Plum pox virus*) أن تصيب بسهولة المشمش والبرقوق، ولكنهما تتباينان في قدرتهما على إصابة أنواع الدراق. وتتباين هاتان السلالتان أيضاً من حيث قدرتهما الإمراضية؛ حيث تتسبب سلالة M عموماً بأوبئة أسرع وأعراضاً أشد مما تسببه سلالة D في *P. domestica* و *P. armeniaca* و *P. Persica* و *P. Salicina*. أما سلالة EA فهي تقتصر جغرافياً على مصر ولا يوجد إلا القليل من المعلومات عن تأثيراتها الوبائية وخصائصها البيولوجية. وقد تم تحديد عدد من السلالات المعزولة من الفيروس التي تصيب نوعي الكرز الحلو (*Prunus avium*) والكرز الحامض (*Prunus cerasus*) في العديد من البلدان الأوروبية. وتشكل هذه العزلات سلالتين مميزتين تم تعريفهما بأنهما PPV-C و PPV-CR. وتم الكشف عن نوع غير عادي من فيروس جدري البرقوق (*Plum pox virus*) في البرقوق الأوروبي (*P. domestica*) في كندا (PPV-W) وهو يمثل سلالة مختلفة من فيروس جدري البرقوق (*Plum pox virus*) في كندا (James et al., 2013). وتم 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 و M لفيروس

جدري البرقوق (*Plum pox virus*) تسمى PPV-Rec وهي تنتم بسلوك وبائي مماثل لسلالة D. وتم الإبلاغ عن نوع ثانٍ من سلالة المؤتلف (recombinant) في تركيا وعُرِّفت بأنها سلالة T (Ulubaş, 2009). وتم وصف عزلة وحيدة من PPV-An واقتراحه كأصل محتمل لفيروس PPV-M (Palmisano et al., 2012). ولم يتم اقتراح سلالة جديدة من الكرز الحامض المكثف (Tat)، لا C ولا CR (Chirkov et al., 2016).

ويمكن الحصول على معلومات إضافية عن فيروس جدري البرقوق (*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 و 2018 ب) و García et al. (2014) و PaDIL (2018).

## 2- معلومات تصنيفية

الاسم:	فيروس جدري الخوخ أو البرقوق ( <i>Plum pox virus</i> ) (اختصاراً PPV)
المرادف:	فيروس الشاركا
الوضع التصنيفي:	Potyvirus، Potyviridae
الأسماء الشائعة:	جدري الخوخ أو البرقوق، الشاركا.

## 3- الكشف وتحديد هوية الآفة

ويمكن كشف فيروس جدري البرقوق (*Plum pox virus*) باستخدام الاختبارات البيولوجية أو المصلية أو الجزيئية؛ ويقتضي تحديد هوية الفيروس اختباراً مصلياً أو جزيئياً. والاختبار المصلي أو الجزيئي هو المقتضى الأدنى لكشف وتحديد هوية الفيروس (وخاصة 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 منشؤها بلد أعلن أنه خالٍ من الفيروس) فإنه يجوز إجراء اختبارات إضافية للتأكد من هوية الفيروس. ويفضل، حيثما تم تحديد هوية الفيروس في المرة الأولى باستخدام الطريقة الجزيئية، اللجوء إلى طريقة ذات حساسية تحليلية عالية، أو إذا أمكن استخدام طريقة جزيئية تستهدف منطقة جينوم مختلفة أو تسلسل الجينوم. كما يجوز إجراء فحوصات 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 البرقوق وتحديد هويته. وقد استخدمت بعض التقنيات الجديدة والمتقدمة للكشف عن فيروس جدري البرقوق مثل فحص التضخيم المتساوي الحرارة بواسطة العروة<sup>1</sup> (Varga and James, 2006b) والجيل الجديد لتقنيات السلسلة (Rodamilans et al., 2014). لكن بما أنه لم تتم المصادقة بشكل كامل بعد على الجيل الجديد لتقنيات السلسلة وفحص التضخيم المتساوي الحرارة بواسطة العروة كأدوات للكشف الروتيني عن فيروس جدري البرقوق، مرفقةً ببروتوكولات منشورة لوصفها، لم تُدرج هذه التقنيات في بروتوكول التشخيص هذا.

<sup>1</sup> 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.

وفي بروتوكول التشخيص هذا، يجري وصف الطرق (بما في ذلك الإشارة إلى الأسماء التجارية) كما نشرت، إذ أنها تحدد المستوى الأصلي للحساسية والنوعية والقابلية للتكرار الذي تم الوصول إليه. ويجوز تعديل الإجراءات المخبرية الواردة في البروتوكولات لكي تتواءم مع معايير المختبرات الفردية، شريطة المصادقة عليها بالشكل المناسب.

### 1-3 نطاق النباتات العائلة

في الظروف الطبيعية، يصيب فيروس جذري البرقوق (*Plum pox virus*) بسهولة أشجار الفاكهة من جنس شجرة *Prunus* (عائلة Rosaceae) المستخدمة كأنواع تجارية أو أصول نباتية. وتشمل النباتات العائلة الرئيسية أنواع المشمش، والبرقوق الكرزي (الجرانك) والدراق البري الصيني (*P. davidiana*)، وكرز المحلب (*P. mahaleb*) والياباني، والخوخ، ، ، وأصل البرقوق ماريانا (*P. marianna*)، و *P. mume* و *P. persica* و *P. salicina* وأنواع هجينة بينها. وهناك سلالات من فيروس جذري البرقوق (C و CR) التي تصيب بشكل طبيعي الكرز الحلو والكرز الحامض (James et al., 2013). وقد يصاب في بعض الأحيان اللوز (*P. dulcis*) بفيروس جذري البرقوق (Llácer and Cambra, 2006). كما يصيب الفيروس الكثير من أنواع فاكهة *Prunus* البرية أو المستخدمة في الزينة من قبيل الكرز الرملي (*P. besseyi*)، وكرز الرمال الأرجواني الأوراق (*P. cistena*)، واللوز القزمي (*P. glandulosa*)، والبرقوق الدامسون (*P. insititia*)، وكرز الغار (*P. laurocerasus*)، والبرقوق البري الشوكي (جراصيا) (*P. spinosa*)، وكرز نانكينغ (*P. tomentosa*)، واللوز الزهري (*P. triloba*) (James and Thompson, 2006). وفي ظروف التجارب، يمكن نقل فيروس جذري البرقوق ميكانيكياً إلى عدة أنواع من *Prunus spp* والعديد من النباتات العشبية (انظر القسم 1)

### 2-3 الأعراض

قد تظهر أعراض فيروس جذري البرقوق على الأوراق، والبراعم، واللحاء، والبتلات، والثمار، والنواة في الحقل. وعادة ما 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 نمط الخط على البرقوق الأمريكي

(*American plum line pattern virus*). ومن أعراض النوع 'GF 31' *P. cerasifera* ظهور ثقل بني بلون الصدا وتشقق اللحاء.

وقد تشمل أعراض الأزهار زوال اللون (خطوط زهرية) على التويجات وأعراض تكسر الأزهار (Barba et al., 2011). ويمكن أن تظهر هذه الأعراض في بعض أنواع الدراق عندما تصاب بفيروس جذري البرقوق من سلالة PPV-M أو في اللوز القزميرونس جلاندولوسا (*P. glandulosa*) المصابة بفيروس جذري البرقوق 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. domestica* و *P. armeniaca*، تشبه التشوهات الناجمة عن الإصابة بفيروس تبقع الأوراق اليخضوري في التفاح. وقد يظهر على الثمار المصابة اسمرار داخلي وتصمغ 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 المشروبات الروحية المنتجة من الثمار المصابة بسبب نكهتها غير المستساغة.

ويتوقف تطور أعراض المرض وحدته بقوة على الذبذبات العائل والظروف المناخية؛ وقد يبقى الفيروس كامناً لعدة سنوات في المناخ البارد.

كما يمكن مشاهدة الأعراض على النباتات العائلة المختلفة، مثلاً على الموقع الإلكتروني لقاعدة البيانات العالمية الخاصة بمنظمة وقاية النباتات في أوروبا ومنطقة البحر الأبيض المتوسط (<https://gd.eppo.int/taxon/PPV000>).

### 3-3 الكشف بالطرق البيولوجية

أهم النباتات الدالة الرئيسية المستخدمة لكشف الفيروس هي شتول الصنف 'GF 31' *P. cerasifera* و *P. persica* 'GF 305'، *P. persica* × *P. davidiana* Nemaguard و *P. tomentosa*، ويتم الحصول على النباتات الدالة من البذور، حيث تزرع في خليط من التربة الجيدة الصرف ويتم الاحتفاظ بها في دفيئة واقية من الحشرات في درجة حرارة تتراوح بين 18 و 25 درجة مئوية حتى تكبر وتكون جاهزة للتطعيم (يصل ارتفاعها في العادة إلى 25-30 سنتيمتراً ويتراوح قطرها بين 3 و 4 مليمترات). ويمكن، بدلاً من ذلك، تطعيم شتول أخرى من أجناس *Prunus* بطعم من النباتات الدالة. ويجب تطعيم النباتات الدالة باستخدام الطرق التقليدية مثل التطعيم بالبراعم (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 الطعم العلوي (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 (Damsteeg et al. (2007، 1997) و (Gentit (2006).

ولا توجد أي بيانات كمية منشورة عن نوعية التطعيم أو حساسيته أو دقته. وتستخدم الطريقة على نطاق واسع في نظم 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 البرعم الخشبي حيث تتطلب مرافق متخصصة من قبيل الدفيئات التي يتم فيها التحكم بدرجات الحرارة، وقد تختلط الأعراض المشاهدة مع أعراض عوامل أخرى قابلة للانتقال بواسطة التطعيم. فضلاً 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 جذري البرقوق (Barba et al., 2011). ويمكن أن ينتقل الفيروس ميكانيكياً إلى أنواع عشبية عديدة (انظر القسم 1).

### 4-3 أخذ العينات للفحوصات المصلية والجزيئية

تتاح توجيهات عامة بشأن منهجيات أخذ العينات في المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية رقم 31 (منهجيات أخذ العينات من الشحنت). وفي بعض الظروف (أي خلال التشخيص الروتيني لأفة منتشرة على نطاق واسع في البلد)، يمكن فحص نباتات عديدة بشكل متزامن باستخدام عينة كبيرة منبثقة من عدد من النباتات. ويتوقف القرار بفحص نباتات فردية أو متعددة على تركيز الفيروس في النباتات ومستوى الثقة الذي تفرضه المنظمة الوطنية لوقاية النباتات. وغالباً ما تُشحن المواد النباتية الخاصة بالبرقوق كعقل ساكنة. وفي هذه الحالة، يمكن استخدام البراعم أو نسيج اللحاء (أجزاء اللحاء) مباشرة للفحص.

واختيار عينة مناسبة أمر بالغ الأهمية لكشف فيروس جذري البرقوق. وينبغي عند أخذ العينات، مراعاة بيولوجيا الفيروس والظروف المناخية المحلية، وبخاصة الظروف المناخية خلال موسم النمو. وفي حال وجود الأعراض العادية، ينبغي جمع العينات من الأزهار، والأوراق أو الثمار التي تظهر عليها الأعراض. وأما في النباتات الخالية من الأعراض، ينبغي أخذ العينات من البراعم

الفنية التي تبلغ سنة من العمر على الأقل وتكون ذات أوراق ناضجة ومتفتحة بالكامل، تُجمع من وسط كل من الأغصان الرئيسية (الكشف غير دقيق في البراعم الفتية التي تكون دون السنة من العمر). كما يجب أخذ العينات من أربعة مواقع مختلفة على الأقل (مثلاً، من أربعة أغصان أو أربع أوراق) في كل نبتة؛ هذا بالغ الأهمية نظراً إلى التوزع غير المتساوي لفيروس جدري البرقوق. ولا يجب أخذ العينات خلال الأشهر التي تشهد الارتفاع الأكبر في درجات الحرارة. فالفحوصات على عينات يتم جمعها في فصل الخريف أقل دقة من الفحوصات 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 فحص البراعم من العقل الساكنة باستخدام الذسخ العكسي – تفاعل البوليميريز المتسلسل أو تفاعل البلمرة المتسلسل الآني، سيما أنها التقنيات المفضلة لفحص الأوراق الناضجة. ويمكن تخزين الأزهار، والأوراق، والبراعم الفتية وقشرة الثمار بدرجة تبلغ أربع درجات مئوية لمدة عشرة أيام كحد 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 للفحص.

### 5-3 الكشف وتحديد الهوية بالطرق المصلية

فحوصات الممتصات المناعية المرتبطة بالإنزيمات يوصى بها 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 بحوالي 4-10 ملليلترات (v/w 2:1) من عازل الإستخلاص (أو على النحو الموصى به من قبل الشركة المصنعة لمجموعة ELISA) باستخدام جهاز كهربائي لمجانسة الأنسجة أو مدحاة يدوية، أو مطرقة، أو أداة أخرى مماثلة. ويتألف عازل الاستخلاص من محلول ملحي مدرء بالفوسفات pH 7.2-7.4 (PBS) يحتوي على 2 في المائة من بولي فينيل بيروليدون و0.2 في المائة من ديثيو كاربامات ثنائي إيثيل السوديوم (Cambra et al., 1994)، أو عازل بديل ملائم. وينبغي مجانسة المادة النباتية تماماً واستخدامها طازجة.

### 1-5-3 الفحص المصلي غير المباشر بأجسام مضادة من نوع ساندويش للممتصات المناعية المرتبطة بالإنزيمات

الفحص المصلي غير المباشر بأجسام مضادة من نوع ساندويش للممتصات المناعية المرتبطة بالإنزيمات 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 المحددة من الجهة الصانعة.

وتبين أن الجسم المضاد الأحادي الكلون الوحيد 5B-IVIA (MAb) يكتشف معظم أو جميع سلالات فيروس جدري البرقوق (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 5B-IVIA (MAb) (Glasa et al., 2013; Chirkov et al., 2013). ويمكن أيضاً كشف السلالة المفترضة المتكيفة مع الكرز بواسطة 5B-IVIA (MAb) (Chirkov et al., 2016). إنما لم تتم الإفادة عن كشف PPV-An باستخدام 5B-IVIA (MAb) (Palmisano et al., 2012).

وفي اختبار DIAGPRO الحلقي (Harju *et al.*, 2000) أجراه 17 مختبراً باستخدام لوحة من عشر عينات تتضمن عينات مصابة بفيروس جدري البرقوق (*Plum pox virus*) (من سلالة PPV-D، PPV-M و PPV-D+M) وعينات سليمة 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 مقسومة على عدد العينات المفحوصة). وكانت هذه الدقة أكبر من الدقة التي تحققت سواء باستخدام النسخ العكسي المرتبط بالمناعة - تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل (IC-RT-PCR) التي بلغت 82 في المائة من الدقة، أو طريقة النسخ العكسي التعاوني - تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل (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 المشخصة بالتقنية/مقسومة على عدد النباتات السليمة) المحددة من خلال DASI-ELISA باستخدام MAb 5B-IVIA ما نسبته 99 في المائة مقارنة التفاعل الآني لأنزيم البلمرة المتسلسل للنسخ العكسي باستخدام الحمض النووي المنقي (89.2 في المائة) أو العينات المبعدة (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 البرقوق التي تم 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 التحقق (Gougherty *et al.*, 2015؛ منظمة وقاية النباتات في أوروبا والبحر الأبيض المتوسط، 2018). 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 الفحص، وحين تفرض المنظمة الوطنية لوقاية النباتات درجة إضافية من اليقين في تحديد فيروس جدري البرقوق.

### 3-5-2 الفحص المصلي بأجسام مضادة من نوع ساندويش للمنتجات المناعة المرتبطة بالإنزيمات

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

### 3-6 الكشف وتحديد الهوية بالطرق الجزيئية

قد تكون الطرق الجزيئية مثل تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل للنسخ العكسي أكثر تكلفة من الطرق المصلية، وبخاصة في الفحوصات الواسعة النطاق. على أن الطرق الجزيئية، وبخاصة طريقة RT-PCR الآني، تُعد عموماً أكثر حساسية من الطرق المصلية. كما أن استخدام RT-PCR الآني 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 RNA)، فإن استخلاص الحمض النووي الريبي ينبغي إجراؤه باستخدام البروتوكولات التي تم التحقق منها بشكل ملائم. وينبغي وضع العينات في أكياس بلاستيكية لتجنب التلوث المتبادل بينها خلال عملية الاستخلاص. وبدلاً من ذلك، يمكن في

طريقة RT-PCR الأني وضع المستخلصات النباتية المبقة أو أجزاء الأنسجة المطبوعة أو مساحيق المواد النباتية التي من الممكن أن تجمد على الورق النشاف أو أغشية من النيلون لأغراض التحليل (Olmos *et al.*, 2005 Osman and Rowhani, 2006; Capote *et al.*, 2009). ويوصى بفحص العينات المبقة أو الأنسجة المطبوعة باستخدام طريقة RT-PCR الأني عوضاً عن طريقة PCR التقليدية بسبب حساسيتها الأعلى.

وتحدد كل من الطرق التالية حجم العينة المستخلصة التي ينبغي استخدامها كوحدة معيارية. وتبعاً لحساسية الطريقة المستخدمة، يتباين الحد الأدنى للتركيز اللازم لكشف فيروس جدري البرقوق على النحو التالي: طريقة RT-PCR يبلغ التركيز في وحدة الحمض النووي الريبي المعيارية 100 fg في الملييلتر؛ طريقة Co-RT-PCR، يبلغ التركيز في وحدة الحمض النووي الريبي المعيارية 1 fg في الملييلتر؛ وطريقة RT-PCR الأني، يبلغ التركيز في وحدة الحمض النووي الريبي المعيارية 2 fg في الملييلتر.

### 1-6-3 تنقية الحمض النووي الريبي والاصطياد المناعي وتوليف الحمض النووي الصبغي cDNA

#### 1-1-6-3 تنقية الحمض النووي الريبي

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

#### 2-1-6-3 الاصطياد المناعي

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

#### 3-1-6-3 توليف الحمض النووي الصبغي (c)DNA

بما أنه ليس من السهل حفظ الحمض النووي الريبي خلال تخزينه، فمن المحبذ توليف حمض نووي صبغي (c)DNA يمكن حفظه لفترات طويلة مع شروط بالحد الأدنى فيما خص الحرارة، مقارنة بالاشتراطات التي تخص الحمض النووي الريبي.

#### 2-6-3 تفاعل البوليميراز المتسلسل مع النسخ العكسي

تمت المصادقة على البادئات المستخدمة في طرق تفاعل البوليميراز المتسلسل مع النسخ العكسي الوارد وصفها أدناه، وهي تُعتبر مراجع للكشف العام عن فيروس جدري البرقوق 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 فائدة أخرى في البادئات التي حدّدها (Wetzel *et al.*, 1991) في أنها تتيح أيضاً التعرّف إلى السلالتين الأكثر شيوعاً من فيروس جدري البرقوق حين تفرق بتحليل منتج ذات 243 زوجاً قاعدياً باستخدام قطعة الحصر ذات التكوين والطول المتعدد.

بادئات تفاعل البوليميراز المتسلسل مع النسخ العكسي 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)، و 250 ميكرو مولار من dNTPs، ووحدة واحدة من إنزيم النسخ العكسي<sup>2</sup> AMV، و 0.5 من وحدات إنزيم بلمرة Taq DNA، و 2.5 ميكرو لتر  $\times 10$  عازل إنزيم البلمرة Taq، و 1.5 مللي مولار من كلوريد الماغنيزيوم  $MgCl_2$ ، و 0.3 في المائة من Triton X-100 ووحدة الحمض النووي الريبي المعيارية من مستوى 5 ميكرو لتر. وأجري التفاعل في جهاز تدوير حراري بالمعايير التالية: 45 دقيقة عند درجة حرارة 42 درجة مئوية، ودقيقتان عند درجة حرارة 94 درجة مئوية، و 40 دورة في 30 ثانية عند درجة حرارة 94 درجة مئوية، وفي 30 ثانية سواء عند درجة حرارة 60 درجة مئوية (البادئتان P1 و P2) 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 البرقوق من مناطق البحر المتوسط (قبرص، ومصر، وفرنسا، واليونان، وإسبانيا، وتركيا). وتمكنت من اكتشاف 20 جزءاً من الحمض النووي الريبي الفيروسي، أي ما يقابل 2000 جزيئاً فيروسياً (Wetzel *et al.*, 1991)، وقام Levy and Hadidi (1994) بتقييم طريقتهما باستخدام عزلات فيروس جدري البرقوق من مصر، وفرنسا، وألمانيا، واليونان، وهنغاريا، وإيطاليا، وإسبانيا، ورومانيا.

### 3-6-3 النسخ العكسي المرتبط بالمناعة - تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل

يجوز إجراء مرحلة النسخ العكسي المرتبط بالمناعة وفقاً لما حدده Wetzel *et al.* (1992)، باستخدام نسخ النباتات المستخلص مثلما في القسم 3-5 مع استعمال أنابيب أو أكياس بلاستيكية فردية لتجنب التلوث. ويمكن استخدام أي جسم مضاد تم التحقق منه بشكل ملائم. وقد تمت المصادقة على هذا الاختبار فقط لعزلات من سلالات D و M 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 البرقوق (مثلاً: 5B-IVIA) في العازل الكربوني pH 9.6. وتوضع قسامات من الأجسام المضادة المخففة في 100 ميكرو لتر في أنابيب طرد مركزي دقيقة PCR وتحضن عند درجة 37 مئوية لمدة 3 ساعات. ثم تُغسل الأنابيب مرتين باستخدام 150 ميكرو ليتر من محلول التعقيم PBS-Tween (عازل الغسيل) وتُشطف مرتين بالماء الخالي من الريبونيكليليس. ويُنفى 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. وتترك الأنابيب لمدة ساعتين على الثلج أو في درجة حرارة 37 مئوية، ثم تُغسل ثلاث مرات باستخدام 150 ميكرو لتراً من محلول التعقيم PBS-Tween. ويتم تحضير خليط النسخ العكسي المرتبط بالمناعة - تفاعل

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

إنزيم البلمرة المتسلسل كما هو مبين في القسم 2-6-3 باستخدام بادئات (Wetzel *et al.* (1992)، ويضاف مباشرة إلى أنابيب PCR المغطاة. ويتم إجراء التضخيم حسب ما هو مبين في القسم 2-6-3.

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 البرقوق (*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.

### 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 لتر من الآتي: 0.1 ميكرو مولار من كل من بادئات P1 و P2، و 0.05 ميكرو مولار من كل من بادئات P10 و P20، و 400 ميكرو مولار dNTPs، و وحدتان من إنزيم النسخ العكسي AMV، و وحدة واحدة من إنزيم البلمرة Taq DNA، و 2 ميكرو لتر 10 دارى التفاعل، و 3 مللي مولار كلوريد الماغنيزيوم MgCl<sub>2</sub>، و 5 في المائة من سلفوكسيد ثنائي المثيل، و 0.3 في المائة من Triton X-100. و 5 ميكرو لترات من وحدة RNA 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، و 60 دورة لمدة 15 ثانية عند درجة حرارة 94 درجة مئوية، و 15 ثانية عند درجة حرارة 50 درجة مئوية، و 30 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 البرقوق (*Plum pox virus*) يسمى 3' digoxigenin ويشار إليه بالرمز (DIG-3) (5'-TCG TTT ATT TGG) (cDNA) (CTT GGA TGG AA-DIG-3')، على النحو التالي. يتم تحويل الحمض النووي الصبغي (cDNA) المضخم 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 الأولي، يوضع الغشاء في أنبوب تهجين عند درجة حرارة 60 درجة مئوية لمدة ساعة واحدة باستخدام عازل تهجين قياسي. ويترك المحلول ويتم التهجين عن طريق مزج المسبار 3'DIG باستخدام عازل 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 دارى الغسل قبل نغعه لمدة 30 دقيقة في محلول معقم بمعدل 1 في المائة (1 غرام من كاشف كيميائي معوق مذاب في 100 ملليلتر من دارى من حمض الماليك). ويوضع الغشاء في حاضنة في درجة حرارة الغرفة مع الأجسام المضادة المترافقة لأنزيمات الفوسفاتيز القلوية المضادة للديغوكسيجينين بتركيز مقداره

1 إلى 5 000 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 كلوريدات 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 نتراتوليوم 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 عازل 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 Wetzal *et al.* (1991) (Olmos *et al.*, 2002). وتم التحقق من هذه الطريقة من خلال الاختبار الحلقي (DIAGPRO) وحقت دقة بنسبة 94 في المائة (Olmos *et al.*, 2007; Cambra *et al.*, 2008).

### 3-5-6 التفاعل الآني لأنزيم البلمرة المتسلسل للنسخ العكسي (RT-PCR)

يمكن إجراء RT-PCR الأنبياستخدام TaqMan، أو SYBR Green I<sup>2</sup>. وتم وصف طريقتي TaqMan للكشف العام عن فيروس جدري البرقوق (*Plum pox virus*) (Schneider *et al.*, 2004; Olmos *et al.*, 2005). والبيانات 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<sub>4</sub>)، و200 نانو مولار من كل من البادئات الأمامية والعكسية، و100 نانو مولار من مسبار TaqMan، و4.8 مللي مولار من كبريتات الماغنيزيوم (MgSO<sub>4</sub>)، و0.5 ميكرو لتر من خليط RT/Platinum Taq الآني (RT-PCR الخطوة الواحدة Superscript مع Platinum Taq (بوليميراز الدنيا؛ Invitrogen)<sup>2</sup>، و5 ميكرو لتر من قالب RNA. 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 مئوية، و30 ثانية عند درجة حرارة 60 درجة مئوية. وتحلل نواتج PCR الآني وفقاً لتعليمات الجهة الصانعة للمعدات.

وتم تقييم طريقة Schneider *et al.* (2004) عن طريق فحص عزلات فيروس جدري البرقوق D المأخوذة من الولايات المتحدة، وعزلات من سلالات PPV-C، وPPV-D، وPPV-EA، وPPV-M، وثمانية أنواع فيروسية أخرى. وكانت هذه الطريقة محدّدة وقادرة على أن تكتشف باستمرار 10-20 جزءاً من RNA الفيروسي (Schneider *et al.* 2004) كما يمكن لهذه الطريقة أن تكتشف فيروس جدري البرقوق (*Plum pox virus*) في عدد من العوائل وفي أوراق وسيقان وبراعم وجذور الدراق (*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 ميكرو لتر من الآتي: 1 ميكرو مولار من البادئة P241، 0.5 ميكرو مولار من كل من البادنتين P316D و P316M، و 200 نانو مولار من مسبار TaqMan، و 1 خليط MultiScribe، و 1 خليط TaqMan Universal PCR Master (النظم Applied Biosystems)<sup>2</sup>، و RNase (النظم Applied Biosystems)<sup>2</sup> و 5 ميكرو لتر من قالب RNA. ويتم إجراء RT-PCR في جهاز تدوير حراري بالمعايير التالية: 30 دقيقة عند درجة حرارة 48 درجة مئوية، و 10 دقائق عند درجة حرارة 95 درجة مئوية، و 40 دورة بمعدل 15 ثانية عند درجة حرارة 95 درجة مئوية، و 60 ثانية عند 60 درجة مئوية، و يبرّد بسرعة إلى درجة حرارة الغرفة. وتحلل نواتج PCR الآني وفقاً لتعليمات الجهة الصانعة للمعدات.

وقام (Olmos *et al.* 2005) بتقييم هذه الطريقة باستخدام ثلاث عزلات لكل من PPV-D، و PPV-M، وكانت أكثر حساسية من طريقة DASI-ELISA بمقدار 1 000 ضعف باستخدام الجسم المضاد الأحادي الكلون 5B-IVIA. وبلغت نسبة النتائج الإيجابية الصحيحة 97.5 في المائة (عدد النتائج الإيجابية الصحيحة المشخصة بالتقنية مقسومة بعدد النباتات المصابة بفيروس جدري البرقوق) (*Plum pox virus*) المحددة بشكل صحيح من خلال RT-PCR الآني باستخدام TaqMan (Olmos *et al.*, 2005) والحمض النووي المنقى مقارنة بطريقة RT-PCR الآني استخدام العينات المبقة (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، و James (2005) طريقة باستخدام SYBR Green I للكشف المتزامن عن فيروس جدري البرقوق (*Plum pox virus*) وتحديد هوية السلالتين D و M:

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 صحة نتائج الفحص:

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، و 2 ميكرو لتر من البادئة Nad5-R 10 ميكرو مولار، و 4 ميكرو غرامات من مجموع RNA، و 5 ميكرو لتر ماء. ويوضع المزيج في حاضنة عند درجة حرارة 72 درجة مئوية لمدة 5 دقائق، ثم يوضع على الثلج. وتضاف بعد ذلك العناصر التالية: 4 ميكرو لتر من 5 دارى السلالة الأولى (Invitrogen)<sup>2</sup>، و 2 ميكرو لتر من ثنائي التيوتريتول 0.1 مولار، و 1 ميكرو لتر dNTPs 10 مللي مولار، و 0.5 ميكرو لتر من RNaseOUT<sup>TM</sup> (40 وحدة ميكرو لتر) (Invitrogen)<sup>2</sup>، و 1 ميكرو لتر Superscript II (Invitrogen)، و 2.5 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 لتر على النحو التالي: 400 نانو مولار من البادئة PPV-U، و 350 نانو مولار من البادئة PPV-FM، و 150 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 عازل كرزاي (Karsai et al., 2002)، و1 إلى 42 000 SYBR Green I<sup>2</sup> و0.1 ميكرو لتر من إنزيم البلمرة العالي الدقة لحمض (Invitrogen) Platinum Taq DNA. ويضاف خليط التفاعل و1 ميكرو لتر من cDNA المخفف (4:1) إلى أنبوب الطرد المركزي (PCR) الدقيق المعقم 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 الممهّد نقطة واحدة.

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

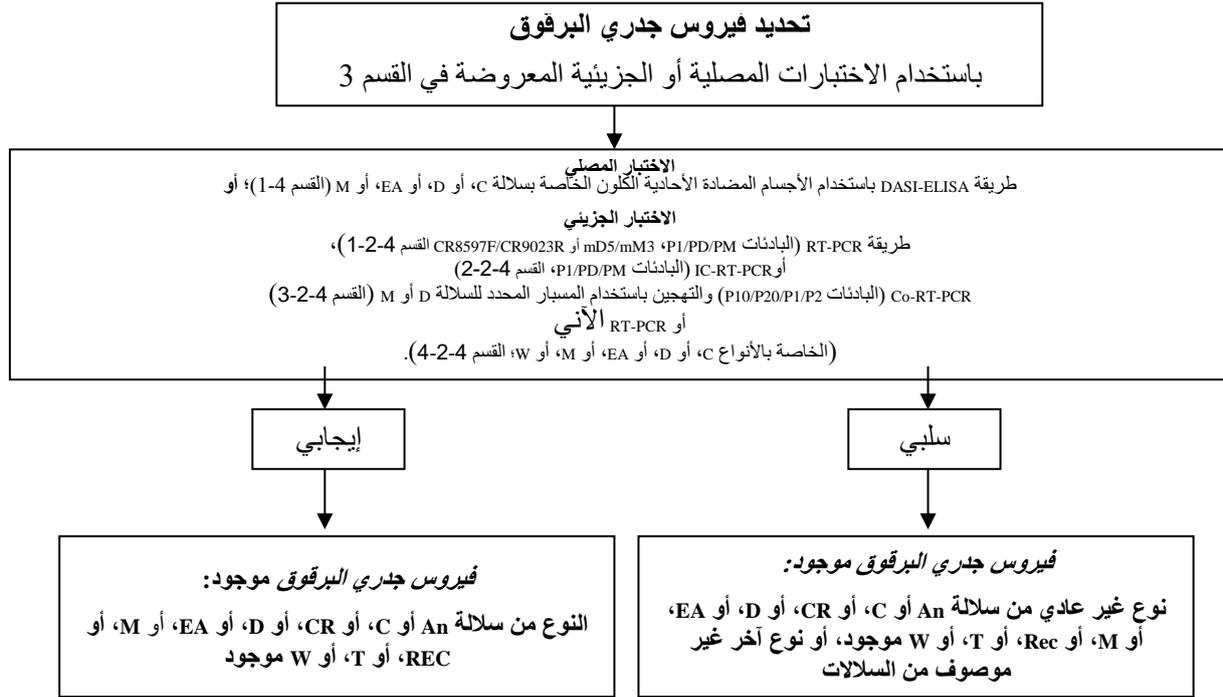
سلالات D (جزء من 114 من الأزواج القاعدية): 84.3 درجة مئوية-84.43 درجة مئوية  
سلالات M (جزء من 380 من الأزواج القاعدية): 85.34 درجة مئوية-86.11 درجة مئوية  
الضبط الداخلي (جزء من 181 من الأزواج القاعدية): 82.45 درجة مئوية-82.63 درجة مئوية.

وقام Varga و James (2005) بتقييم طريقتيها باستخدام عزلات سلالة PPV-C، وPPV-D، وPPV، وEA، 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 البرقوق (التي تستخدم DASI-ELISA، وRT-PCR، وCo-RT- (الأنفي) (انظر الشكل 1). ولا يعتبر تحديد نوع السلالة عنصراً أساسياً لتحديد هوية فيروس جدري البرقوق (*Plum pox virus*)، ولكن المنظمة القطرية لوقاية النباتات قد ترغب في تحديد هوية السلالة وذلك مثلاً للمساعدة على التنبؤ بسلوكها الوبائي.

وبالنظر إلى تقلب فيروس جدري البرقوق (*Plum pox virus*) فإن الطرق الأخرى بخلاف تحديد النتائج 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 البرقوق (*Plum pox virus*) باستخدام الطرق المصلية أو الجزيئية المبيّنة 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 البرقوق (*Plum pox virus*) ويمكن إجراء اختبارات أخرى في الحالات التي تشترط فيها المنظمة القطرية لوقاية النباتات ثقة إضافية في تحديد هوية سلالة فيروس جدري البرقوق (*Plum pox virus*). كما ينبغي تتبع السلسلة الجينومية الكاملة لفيروس جدري البرقوق (*Plum pox virus*) والسلسلة الكاملة أو الجزئية للغطاء البروتيني، والمنطقة الجينية P3-6K1، والجينات البروتينية للمشتلات الهولوية 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 البرقوق (*Plum pox virus*) (M و D) وفقاً لما حدده (Cambra et al., 1994) باستخدام الأجسام المضادة الأحادية الكلون الخاصة بالسلالتين M و D (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. علاوة على ذلك، فإن الجسم المضاد الأحادي الكلون AL المستخدم في كشف السلالة PPV-M يتفاعل مع العزلات التي تنتمي إلى السلالتين M، و Rec و T لأن هذه المجموعات تشترك في نفس تتابع الغطاء البروتيني. ولذلك يلزم إجراء فحص جزئي للتمييز بين السلالات M و Rec و T المكتشفة باستخدام جسم مضاد أحادي الكلون خاص بالسلالة M.

ويجوز إجراء الكشف المصلي عن هوية عزلات فيروس جدري البرقوق (*Plum pox virus*) من المجموعتين EA، و C 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 النسخ العكسي- تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل (RT-PCR)

تحدد السلالتان PPV-D و PPV-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، و 1 ميكرو مولار من البادئة PD أو البادئة PM، و 250 ميكرو مولار dNTPs، ووحدة واحدة من إنزيم النسخ العكسي AMV (10 وحدات/ ميكرو لتر)، و 0.5 وحدة من إنزيم بلمرة Taq DNA (5 وحدات/ ميكرو لتر)، و 2.5 ميكرو لتر 10 دارى إنزيم البلمرة Taq، و 1.5 مللي مولار كلوريد الماغنيزيوم MgCl<sub>2</sub>، و 0.3 في المائة Triton X-100 و 2 في المائة فورماميد و 5 في المائة ميكرو لترات من وحدة RNA 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، و 40 دورة بمعدل 30 ثانية عند درجة حرارة 94 درجة مئوية، و 30 ثانية عند درجة حرارة 60 درجة مئوية، و 60 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 قاعدياً. وقام Olmos *et al.* (1997) بتقييم طريقتهم باستخدام 6 عزلات من السلالة PPV-D، و 4 عزلات من السلالة PPV-M.

كما أن الطريقة RT-PCR بالوقت الفعلي مع SYBR Green I<sup>2</sup> التي وضعها Varga and James (2005)، والوارد وصفها بالتفصيل في القسم 3-6-5، ملائمة أيضاً لتحديد هوية السلالات D و M في فيروس جذري البرقوق.

وتحدد السلالة PPV-REC باستخدام البادئات mD5 و mM3 الخاصة بالسلالة Rec التي بينها (Šubr *et al.* (2004):

mD5 (5'-TAT GTC ACA TAA AGG CGT TCT C-3')

mM3 (5'-CAT TTC CAT AAA CTC CAA AAG AC-3').

ويتكون خليط التفاعل البالغ 25 ميكرو لتر من الآتي (نقلاً عن Šubr *et al.*, 2004): 1 ميكرو مولار من كل بادئة، و 250 ميكرو مولار dNTPs، ووحدة واحدة من إنزيم النسخ العكسي AMV (10 وحدات/ ميكرو لتر)، و 0.5 وحدة من إنزيم بلمرة Taq DNA (5 وحدات/ ميكرو لتر)، و 2.5 ميكرو لتر 10 دارى إنزيم البلمرة Taq، و 2.5 ملليمتر من كلوريد الماغنيزيوم MgCl<sub>2</sub> و 0.3 في المائة Triton X-100، و 5 ميكرو لتر من RNA المستخلص (انظر القسم 3-6). ويجرى النسخ العكسي ببادئات عشوائية عند درجة حرارة 42 درجة مئوية لمدة 45 دقيقة (Glasa *et al.*, 2002). ويجرى PCR باستخدام إزالة أولية للخواص الطبيعية على حرارة 94 درجة مئوية لمدة 3 دقائق، تليها 35 دورة على حرارة 94 درجة مئوية لمدة 45 ثانية، و 60 درجة مئوية لمدة 30 ثانية و 72 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 قاعدياً من خلال الترحال الكهربائي للهلام.

يتم تحديد هوية PPV-CR باستخدام بادئات CR8597F و CR9023R التي بينها (Glasa *et al.* (2013):

CR8597F (5'-ATG ATG TGA CGT TAG TGG AC-3')

CR9023R (5'-TCG TGT GTT AGA CAG GTC AAC-3')

ويستخدم بروتوكول RT-PCR بخطوتين لتفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل عن طريق النسخ العكسي لكشف محدد لعزلات PPV-CR (Glasa *et al.*, 2013). ويتم توليف الحمض النووي الصبغي (c)DNA من مجموع مستخلصات الحمض النووي الريبي RNA (NucleoSpin RNA Plant Kit, Macherey-Nagel) باستخدام بادئات مسدوسة عشوائية والنسخ العكسي الآني 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. وتُحلل نتائج PCR بالرحلان الكهربائي للهلام. وتضخم البادئات الخاصة بـ CR منتج 427 زوجاً قاعدياً في الحجم، وباستهداف منطقة ترميز CP النهائية 5'. وتمت المصادقة على خصوصية بادئات CR باستخدام عازلات سلالات فيروس جدري البرقوق C و D, M, Rec, T, W, EA (Glasa *et al.*, 2013).

#### 4-2-2 النسخ العكسي المرتبط بالمناعة - تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل

ينبغي إجراء مرحلة الإصطياد المناعي كما هو مبين 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 مبين في القسم 1-2-4

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

ينبغي إجراء عملية تحديد هوية PPV-D أو PPV-M كما هو مبين في القسم 3-6-4 باستخدام المسبار 3'DIG الخاص بالسلالتين D و M (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 الأولي والتهجين النهائي عند درجة حرارة 50 درجة مئوية باستخدام مواد العزل القياسية للتهجين الأولي 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 التفاعل الآني لأنزيم البلمرة المتسلسل للنسخ العكسي

يتم التعرف تحديداً على السلالة PPV-D و PPV-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 Mix (النظم Applied Biosystems)، و1 خليط مثبط MultiScribe، و RNase (النظم Applied Biosystems)، ويضاف خليط التفاعل و5 ميكرو لتر من قالب RNA 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 الآني وفقاً

لتعليمات الجهة الصانعة. وقام Capote *et al.* (2006) بتقييم هذه الطريقة باستخدام 12 عزلة لكل من PPV-D و PPV-M، و 14 عيّنة مصابة بكلتا السلالتين.

وتحدّد هوية PPV-C، و PPV-EA، و PPV-W خصيصاً باستخدام كيمياء SYBR Green I وفقاً لطريقة Varga، و James (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 RNA المستخلصة بنسبة 1 إلى 10 (انظر القسم 3-6) و 22.5 ميكرو لتر من الخليط الرئيسي. ويتكون الخليط الرئيسي من الآتي: 2.5 ميكرو لتر من عازل كارزاي (Karsai *et al.*, 2002)؛ و 0.5 ميكرو لتر لكل من 5 ميكرو مولار من البادئات PPV-U، أو PPV-RR، و Nad5R؛ و 0.5 ميكرو لتر dNTPs 10 ملي مولار، و 1 ميكرو لتر من كلوريد الماغنيزيوم MgCl<sub>2</sub> و 50 ملي مولار؛ و 0.2 ميكرو لتر من RNaseOUT (40 وحدة/ميكرو لتر Invitrogen)؛ و 0.1 ميكرو لتر من النسخ العكسي Superscript™ III (200 وحدة/ميكرو لتر، Invitrogen)؛ و 0.1 ميكرو لتر من إنزيم بلمرة Platinum® Taq DNA العالتي الدقة (5 وحدات/ميكرو لتر، Invitrogen)؛ و 1 ميكرو لتر من 1: 5 000 (في TE، pH 7.5) SYBR Green I (Sigma) 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، و 29 دورة بمعدل 15 ثانية عند درجة حرارة 95 درجة مئوية، و 60 ثانية عند درجة حرارة 60 درجة مئوية. ويتم إجراء تحليل منحني الذوبان عن طريق الوضع في حاضنة عند درجة حرارة 60 درجة مئوية حتى 95 درجة مئوية مع معدلات ذوبان 0.1 درجة مئوية/الثانية ومنحني بسيط بمعدل نقطة واحدة. وفي ظل الأوضاع التي حددها Varga و James (2006)، تكون درجات الحرارة لذوبان كل 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 و James (2006 أ) بتقييم طريقتهما باستخدام عزلة لكل من PPV-C، و PPV-D، و PPV-W، و EA.

## 5- ضوابط الاختبارات الجزيئية

لكي يُأخذ بنتيجة الفحص التي تم التوصل إليها، ينبغي تناول ضوابط ملائمة -بحسب نوع الفحص المستخدم ودرجة اليقين المطلوبة- لكل سلسلة من سلسلات عزل حمض النووية وتضخيمه للآفة المستهدفة أو حمض النووية المستهدف. وبالنسبة إلى التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي، يتألف الحد الأدنى من الضوابط واجبة الاستخدام من ضابط إيجابي لحمض النووية وضابط سلبي للتضخيم (لا يوجد ضابط نموذجي).

الضابط الإيجابي لحمض النووية. يستخدم هذا الضابط لرصد كفاءة طريقة الفحص (بغض النظر عن عملية الإستخلاص) والتضخيم، في التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي.

ويجوز استخدام حمض ريبي نووي نباتي أو فيروسي أو مواد نباتية مصابة بفيروس جدري البرقوق مدموغة على غشاء. ويجب على الحمض النووي الريبي المخزن أو المواد المعدّة المصابة بالفيروس، الخضوع للتحقق بصورة دورية من أجل التثبت من جودة الضابط مع فترات التخزين الطويلة.

**الضابط الداخلي.** بالنسبة إلى التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي الآني، يمكن إدراج الحمض النووي الريبي المرسل التابع للجينة التنبئية (*nad5*, Menzel *et al.*, 2002) ضمن بروتوكول التفاعل كضابط داخلي من أجل استبعاد احتمال أية نتائج سلبية كاذبة للتفاعل، جراء فشل استخراج حمض النواة أو فساده أو وجود مثبطات للتفاعل.

**الضابط السلبي للتضخيم (لا يوجد ضابط نموذجي).** يعتبر هذا الضابط ضرورياً من أجل التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام التفاعل الآني لأنزيم البلمرة المتسلسل للنسخ العكسي التقليدي 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 ريبونوكلياز، كان قد استخدم لإعداد مزيج التفاعل.

**ضابط الاستخراج الإيجابي.** يستخدم هذا الضابط 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 البرقوق. لدى عملية التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي، يجب التحوط لتفادي التلوث جراء الرذاذ الناجم عن الضوابط الإيجابية أو العينات الإيجابية.

**ضابط الاستخراج السلبي.** يستخدم هذا الضابط لرصد التلوث خلال استخراج حمض النواة و/أو رد الفعل إزاء النسيج العائل. ينطوي هذا الضابط على حمض نواة استخراج من نسيج عائل غير مصاب فخضع من ثم للتضخيم. ويوصى باستخدام ضوابط 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 البرقوق الإيجابي المعروف كضابط إيجابي، وعصارة من نباتات سليمة كضابط سلبي. ويمكن أيضاً إدراج ضابط تضخم سلبي. ويُستخدم هذا الضابط الأخير من أجل استبعاد النتائج الإيجابية الكاذبة جراء التلوث خلال مرحلة إعداد مزيج التفاعل ولدى مرحلة التضخيم، يضاف ماء ملائم للتفاعل وخال من إنزيم ريبونوكلياز، كان قد استخدم لإعداد مزيج التفاعل لاستخدامه كضابط تضخم سلبي.

## 6- السجلات

يجب الاحتفاظ بالسجلات والأدلة 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 تعقبها:

- ينبغي الاحتفاظ بالعينة الأصلية (بعد وضع العلامة الملائمة عليها) مجمدة، إذا أمكن، عند درجة حرارة 80 درجة مئوية تحت الصفر أو تبرّد تبريداً جافاً وتحفظ في درجة حرارة الغرفة.
- ينبغي، عند الاقتضاء، الاحتفاظ بمستخلصات RNA 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](mailto: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](mailto: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](mailto: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](mailto: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](mailto: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](mailto: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](mailto: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- شكر وتقدير

أعدّ المسودة الأولى لبروتوكول التشخيص هذا M. Cambra, A. Olmos and N. Capote, (IVIA, إسبانيا (انظر القسم السابق))، N.L. Africander, (Department of Agriculture, Forestry and Fisheries, Stellenbosch South Africa); L. Levy (وزارة الزراعة في الولايات المتحدة الأمريكية، انظر القسم

S.L. Lenardon (Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal - Instituto Nacional de Tecnología 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.

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

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

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

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

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

02-2020 راجعت خدمات الترجمة التابعة لمجموعة مراجعة اللغة الخاصة باللغة العربية بروتوكول التشخيص هذا وقامت أمانة الاتفاقية الدولية لوقاية النبات بدمج التعديلات وفقاً لذلك.

آخر تحديث لتاريخ المطبوع: 02-2020

## 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 ينتقل البشر و السلع 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: +39 06 5705 4812

رقم الفاكس: +39 06 5705 4819

البريد الإلكتروني: [ippc@fao.org](mailto:ippc@fao.org)

الموقع الإلكتروني: [www.ippc.int](http://www.ippc.int)