المعيار الدولي 27
الملحق 5

المعايير الدولية لتدابير الصحة النباتية

المعيار الدولي 27 بروتوكولات التشخيص

بروتوكول التشخيص (ب.ت) رقم 5:

Phyllosticta citricarpa (McAlpine) Aa على الثمرة

(2014)

المحتويات

1- معلومات عن الآفة ..... **ب ت 5 2**

2- المعلومات التصنيفية ..... **ب ت 5-3**

3- الكشف ..... **ب ت 5-3**

3-1 الأعراض على الثمرة ..... **ب ت 5-3**

3-2 الأعراض على الأوراق والأغصان ..... **ب ت 5-4**

3-3 مقارنة بين أعراض البقعة السوداء في الحمضيات والأعراض الناشئة عن كائنات أخرى أو عوامل لا إحيائية ..... **ب ت 5-4**

4- تحديد هوية الآفة ..... **ب ت 5-5**

4-1 الأسلوب ألف: عزل واستنبات فطر *P. citricarpa* ..... **ب ت5-6**

4-1-1 أوساط المستنبتات ..... **ب ت5 -6**

4-1-2 الخصائص الاستنباتية ..... **ب ت 5-6**

4-1-3 الشكل والتركيب ..... **ب.ت 5-7**

4–1–4 مقارنة الخصائص الاستنباتية وخصائص الشكل والتركيب بين فطر *P. citricarpa* وأنواع *Phyllosticta* المماثلة..**ب ت 5–7**
4–2 الأسلوب باء: الفحوص الجزيئية.....**ب ت 5–8**
4–2–1 تحديد هوية *P. citricarpa* باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدي.....**ب ت 5–8**
4–2–1–1 معلومات عامة .....**ب ت 5–8**
4–2–1–2 الأساليب .....**ب ت 5–9**
4–2–1–3 معلومات إجرائية أساسية.....**ب ت 5–10**
4–2–2 تحديد هوية *P. citricarpa* باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل الآني.....**ب ت 5–10**
4–2–2–1 معلومات عامة .....**ب ت 5–10**
4–2–2–2 الأساليب .....**ب ت 5–11**
4–2–2–3 معلومات إجرائية أساسية.....**ب ت 5–12**
4–2–3 تحديد هوية فطر *P. citricarpa* باستخدام تتابع مباعد النسخ الداخلي .....**ب ت 5–12**
4–2–3–1 معلومات عامة .....**ب ت 5–12**
4–2–3–2 الأساليب .....**ب ت 5–13**
4–2–3–3 معلومات إجرائية أساسية.....**ب ت 5–13**
5– السجلات .....**ب ت 5–13**
6– جهات الاتصال للحصول على مزيد من المعلومات .....**ب ت -5–13**
7– شكر وتقدير .....**ب ت -5 14**
8– المراجع .....**ب ت 5 –14**
9– الأشكال.....**ب ت 5–17**

1– معلومات عن الآفة

آفة *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa هي الكائن المسبب لمرض "البقعة السوداء في الحمضيات"، وهي فطر يسبب تبقع الأوراق وتلطخ ثمار الحمضيات من الجنس *citrus* و البونسيروس *Poncirus* و*fortunella* والأصناف المهجَّنة منها. وباستثناء البرتقال الحمضي (النارنج) (*Citrus aurantium*) وأصنافه الهجينة، والليمون العريض الأوراق فإن كل أنواع الحمضيات التي تُنتج على المستوى التجاري عرضة للإصابة بالمرض (Aguilar-Vildoso *et al.*, 2002; Kotzé, 2000). وتعتبر ثمار الليمون الحمضي عرضة بشكل خاص للإصابة بهذه الآفة وبالتالي فهي في العادة أول نوع من الحمضيات تظهر عليه أعراض المرض حالما يدخل الكائن الممرض إلى منطقة جديدة (Kotzé, 2000).

وسُجلت أولى حالات الإصابة بمرض البقعة السوداء في أستراليا في عام 1895 في البرتقال الحلو(Benson, 1895). ويوجد المرض حالياً في بعض المناطق المنتجة للحمضيات في أفريقيا وآسيا وأستراليا وأمريكا الشمالية وأمريكا الجنوبية (المركز الدولي للزراعة والعلوم البيولوجية، 2011؛ ومنظمة وقاية النباتات في أمريكا الشمالية، 2010؛ وSchubert،

وآخرون، 2012). ولم ترد أي بلاغات عن هذا الكائن من أوروبا أو أمريكا الوسطى أو منطقة البحر الكاريبي (المركز الدولي للزراعة والعلوم البيولو جية، 2011؛ والمركز الدولي للزراعة والعلوم البيولوجية/منظمة وقاية النباتات في أوروبا والبحر المتوسط، 1998؛ ومنظمة وقاية النباتات في أوروبا والبحر المتوسط/المركز الدولي للزراعة والعلوم البيولوجية، 1997؛ ومنظمة وقاية النباتات في أمريكا الشمالية، 2010).

وينطوي فطر *P. citricarpa* على آثار اقتصادية ناجمة أساساً عن التشوهات الخارجية التي يحدثها الفطر مما يجعل ثمار الحمضيات غير مناسبة لأسواق المنتجات الطازجة (Spósito, 2003). وقد ينجم عن الإصابات الشديدة سقوط الثمار قبل نضجها (Kotzé, 2000). وتحدث بعض الخسائر بسبب تساقط الثمار في السنوات التي تكون فيها الظروف مهيأة لظهور الآفة وعندما تترك الثمار على الأشجار بعد ذروة موسم النضج (المركز الدولي للزراعة والعلوم البيولوجية، 2011). وبالإضافة إلى ما سبق، فإن الإصابات غير الظاهرة (غير المصحوبة بأعراض) في الثمار في موسم الحصاد قد تظهر أعراضها في أثناء النقل أو التخزين (Kotzé, 1996).

وتتأثر دراسة وباء البقعة السوداء في الحمضيات بتوافر اللقائح، والظروف البيئية المواتية للعدوى (مثل الطقس الدافئ والأمطار والرطوبة)، ودورة نمو شجرة الحمضيات، وعمر الثمرة والأوراق بالنسبة لحساسيتها للعدوى (Kotzé, 1981, 2000). وفي المناطق التي يقتصر فيها هطول الأمطار على موسم وحيد، تمثل الأجسام الثمرية المحتوية على الأبواغ الزقية التي لا تتكون إلا على دُبال الأوراق المصدر الرئيسي للقائح. وتشكِّل دوارق أبواغ *P. citricarpa* أيضاً مصدراً مهماً للقائح عندما لا تقتصر الأمطار على موسم واحد تبقى فيه الثمار المصابة التي تنمو في غير موسمها على الأشجار بعد الإزهار والإثمار، أو في الحالات التي يحدث فيها تزهير متعاقب وشاذ في أنواع وأصناف الحمضيات المزروعة، (Kotzé, 1981; Spósito *et al*., 2008, 2011)

وتتكون الأجسام الثمرية في غضون مدة تتراوح بين 40 و180 يوماً من سقوط الأوراق، تبعاً لمعدل تواتر الرطوبة والجفاف وكذلك درجات الحرارة السائدة (Kotzé, 1981). وتسقط أوراق الحمضيات على مدار السنة في بعض البلدان وتسقط في مواسم معيَّنة في بلدان أخرى، ويؤثر ذلك على توافر اللقائح. وتتراوح درجة الحرارة المثلى لتكون الأجسام الثمرية بين 21 و28 درجة مئوية؛ ولا تتكون الأجسام الثمرية في درجة حرارة تقل عن 7 درجات مئوية أو تزيد على 35 درجة مئوية (Lee and Huang, 1973). وتنطلق الأبواغ الزقية خلال تساقط الأمطار وفي بعض الأحيان في أثناء الري أو عندما يتكون الندى بكثافة (Kiely, 1949a; Kotzé, 2000)، وتتأثر كثيراً بنمط هطول الأمطار (Kotzé, 1981). وتنطلق الأبواغ الزقية عنوة إلى ارتفاع يصل إلى 1.2 سنتيمتر فوق الأجسام الثمرية وتحملها تيارات الهواء خلال ظلة الأشجار ولمسافات طويلة (Kiely, 1949a). وتبدأ الفترة الحرجة للعدوى عند الإثمار وتستغرق مدة تتراوح بين 4 و6 أشهر، ولكن الأعراض الأولى على الثمرة لا تظهر إلاّ بعد أكثر من 6 أشهر بعد الإثمار (Baldassari *et al*., 2006). وفي البرازيل، تعتبر ثمرة برتقال "الفالينسيا" (Valencia) و"ناتال" (Natal) عرضة للإصابة حتى بعد ما لا يقل عن 24 أسبوعاً من سقوط 75 في المائة من التويجات عندما يتراوح قطرها بين 5 و6 سنتيمترات (Baldassari *et al*., 2006).

وعقب العدوى، يظل الفطر في حالة كمون حتى يكتمل نمو الثمرة أو تصل إلى مرحلة النضج، فتبدأ الأعراض في الظهور بعد عدة أشهر من العدوى (Kotzé, 2000). وتظل الأوراق عرضة للإصابة منذ تكونها حتى عمر 10 أشهر (Truter *et al.*, 2007).

وتتكون الدوارق المحتوية على أبواغ على الثمرة والأوراق والأغصان الميتة، وسويقات الثمار، وتتكون بكثرة على دُبال الدوارق (Kotzé, 2000). ويمكن أن تتناثر على الغطاء النباتي أو تنتقل من الثمار المصابة التي يتأخر قطافها إلى الثمار والأوراق الصغيرة التي لا تزال في مرحلة حساسة للعدوى (Agostini et al., 2006; Spósito et al., 2008). ويتميز أيضاً فطر P. citricarpa بأبواغه الصغيرة اللاجنسية، التي يرد وصفها في إطار تناول الجنس Leptodothiorella (Kiely, 1949a). وهذه الأبواغ الغبيرية الصغيرة التي يشار إليها أيضاً باسم الحالة "النطفية" (Kiely, 1949a) تظهر في العادة على الأوراق الساقطة قبل تكون الأجسام الثمرية. على أن دور الأبواغ الغبيرية الصغيرة في بيولوجيا فطر P. citricarpa لا يزال غير واضح.

ومما يعزز ظهور الأعراض على الثمرة الناضجة ارتفاع درجة الحرارة، وشدة الضوء، والجفاف، وضعف الشجرة. وتكثر البقع السوداء في أشجار الحمضيات الكبيرة أكثر منها في الأشجار الصغيرة (Kotzé, 2000). ويفترض أن ينتشر فطر *P. citricarpa* إلى الأشجار الجديدة من خلال الشتلات المصابة أو مواد الزراعة الأخرى وليس عن طريق ثمار الحمضيات (Kotzé, 2000; Timmer, 2004).

وتجدر الإشارة إلى أنه في ثمار الحمضيات التي لا تظهر عليها أعراض أو الثمار التي تظهر عليها بقع صغيرة للغاية (يقل قطرها عن 2 ملليمتر) بدون دوارق، قد توجد نبْتَات طفيلية داخلية غير مُمرضة من فطر *Phyllosticta capitalensis* Henn (كان يشار إليها من قبل على سبيل الخطأ باسم *Guignardia mangiferae* A.J. Roy) (Glienke *et al.*, 2011)، التي سُجلت في الكثير من السلالات النباتية. وتناول Baayen وآخرون (2002) الخصائص الاستنباتية وخصائص الشكل والتركيب والخصائص الجزيئية التي تميِّز فطر *P. capitalensis* عن فطر *P. citricarpa*. وعلاوة على ذلك فإن أعراض *P. citricarpa* قد تلتبس مع الأعراض التي يسببها فطر *Phyllosticta citriasiana* Wulandari, Crous & Gruyter وهو كائن مُمرض وصف حديثاً ولم يظهر حتى الآن إلاّ على ثمرة البوميلو (الشادوك) *Citrus maxima* (Wang *et al.*, 2012; Wulandari *et al.*, 2009). وأما القدرة الإمراضية لفطر *P. citriasiana* في أنواع الحمضيات الأخرى فهي غير معروفة. ووصف Wulandari وآخرون (2009) الخصائص الاستنباتية وخصائص الشكل والتركيب والخصائص الجزيئية التي تميِّز فطر *P. citriasiana* عن فطر *P. citricarpa*، وهو النوع المرمض للحمضيات. وهناك نوعان من فطر *Phyllosticta* تم وصفهما مؤخراً، مرتبطان بفطر *Citrus* spp. *Phyllosticta citrichinaensis*، ويسبب هذان النوعان من الفطر بقعاً صغيرة غائرة تتراوح بين بنية ورمادية ولها هامش بني داكن وهالات ذات لون أخضر زيتوني على أوراق البوميلو. ويسبب الكائن المرمض أيضاً بقعاً صغيرة تتراوح بين بنية وسوداء مشابهة لاسوداد ثمار اليوسفي والبرتقال (Wang *et al.*, 2012). واكتشف فطر *P. citribraziliensis* كنبتة طفيلية داخلية في الأوراق السليمة للحمضيات في البرازيل(Glienke *et al.*, 2011).

2- المعلومات التصنيفية

الاسم: *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa، 1973

الأسماء المرادفة: *Phoma citricarpa* McAlpine، 1899

Guignardia citricarpa Kiely، 1948

Phyllostictina citricarpa (McAlpine) Petr.، 1953

Leptodothiorella sp. (spermatial state)

الوضع التصنيفي: Eukaryota, Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Dothideomycetes, Botryosphaeriales, Botryosphaeriaceae

الأسماء الشائعة: البقعة السوداء في الحمضيات (انظر المركز الدولي للزراعة والعلوم البيولوجية (2011) للتعرف على الأسماء الشائعة باللغات الأخرى)

المرجع: بنك الفطريات MycoBank 320327

3- الكشف

يمكن أن تحتوي ثمار الحمضيات والبونسيروس والكوكوات وسويقاتها وأوراقها وأغصانها والأصناف المهجّنة منها على فطر *P. citricarpa* (المركز الدولي للزراعة والعلوم البيولوجية، 2011).

3-1 الأعراض على الثمرة

تظهر عدة أعراض (مثل البقع الصلبة، أو النمش، أو الاسوداد الكاذب، أو البقع الخبيثة) على الثمرة تبعاً لدرجة الحرارة ونُضج الثمرة (Kotzé, 2000). ومن المستبعد أن يؤكد بدقة وجود فطر *P. citricarpa* على الثمرة من خلال الفحص البصري وحده لأن الأعراض متغيِّرة في مظهرها ويمكن بسهولة الخلط بينها وبين الأعراض التي تسببها ممرضات الحمضيات الأخرى أو الأعطاب الميكانيكية أو الناتجة عن البرودة أو الحشرات (Kotzé, 2000; Snowdon, 1990; L. Diaz, رسالة شخصية). وفيما يلي الأعراض الأربعة المعروفة على نطاق واسع على النحو الذي وصفه Kiely (19601949, 1949b, a).

البقع الصلبة. هي أكثر أعراض البقعة السوداء في الحمضيات شيوعاً، وهي تتألف من إصابات سطحية يتراوح قطرها بين 3 و10 ملليمترات ويتراوح لون مركزها بين الرمادي والأسمر ولها هامش يتراوح لونه بين البني الداكن والأسود (الشكل 1–ألف). ويصبح مركز الإصابة في المراحل المتقدمة من تطور الأعراض شبيهاً بفوهة البركان. ويمكن أن تظل البقع الصلبة الفردية صغيرة أو تلتحم مكونة بقعاً أكبر. وقد تظهر حول هذه البقع هالة صفراء عندما تكون الثمرة خضراء أو هالة خضراء عندما تكون الثمرة صفراء أو برتقالية. وتتكون في كثير جداً من الأحيان دوارق في منتصف هذه البقع (الشكل 1(أ)) ويمكن اكتشافها باستخدام عدسة يدوية أو مجهر تشريح. وتظهر البقع الصلبة في العادة عندما تبدأ الثمرة في النُضج، بل وحتى قبل أن يتغيَّر لونها، وعلى جانب الثمرة الأكثر تعرضاً لضوء الشمس (Kotzé, 1981, 2000). وفي

العديد من الحالات يمكن التعرف بسهولة على البقع السوداء في الحمضيات من خلال الأماكن المصابة ببقع صلبة محتوية على دوارق.

النمش. بقع رمادية أو سمراء أو مائلة إلى الاحمرار أو عديمة اللون يتراوح قطرها بين ملليمتر واحد و3 ملليمترات، وغائرة قليلاً في المنتصف ولا تحيط بها أي هالات (الشكل 1– باء). ويتحول لون البقع إلى بنيّ بمرور الوقت وتكاد تخلو دائماً من الدوارق (الشكل 1(ب)). ويتكون النمش في معظمه بعد تغيُّر لون الثمرة وقد يظهر أيضاً كبقع تابعة حول البقع الصلبة (Bonants *et al.*, 2003) (الشكل 1– جيم). وقد يلتحم النمش مكوناً بقعاً أكبر تتحول إلى بقع خبيثة (الشكل 2– جيم) وبخاصة في أثناء تخزين الثمرة (Kotzé, 1981, 2000).

الاسوداد الكاذب أو التلطخ. يظهر في العادة على الثمرة الخضراء في شكل لطخة بارزة بنية داكنة أو سوداء يحيط بها في كثير من الأحيان بقع صغيرة داكنة اللون (FUNDECITRUS, 2005) (الأشكال 2– ألف، و2(أ)، و2– باء). وتخلو البقع من أي دوارق وقد تتلاحم مع تقدم الموسم (المركز الدولي للزراعة والعلوم البيولوجية، 2011). ويلاحظ هذا العَرَض في المناطق المنتجة للحمضيات حيث فطر *P. citricarpa* يوجد لمدة طويلة (FUNDECITRUS, 2005).

البقع الخبيثة أو البقع المنتشرة أو البقع الخبيبة. بقع غائرة غير منتظمة يتراوح لونها بين الأحمر والبني أو قد تكون عديمة اللون، وتظهر في الثمار الناضجة المصابة بكثافة في نهاية الموسم (الشكل 2– جيم). وتتكون في النهاية دوارق كثيرة في هذه البقع في ظروف الرطوبة الشديدة (Kotzé, 2000). وتنمو البقع الخبيثة سريعاً لتغطي ثلثي سطح الثمرة في غضون أربعة أو خمسة أيام. وهذه البقع هي الأشد ضرراً لأنها، خلافاً للأعراض الأخرى، تمتد في عمق الطبقة الوسطى للغلاف السمري (الألبيدو) مخترقة في بعض الأحيان القشرة بكاملها وتتسبب في سقوط الثمرة قبل نضجها وتنجم عنها خسائر بالغة بعد الحصاد (Kotzé, 1981).

وأشارت التقارير أيضاً إلى ظهور عرضين إضافيين، كما هو مبيَّن أدناه، في ثمار الليمون ولكن بوتيرة أقل.

البقع الشريطية. بقع صفراء سطحية لها مركز يتراوح لونه بين الأصفر الداكن والبني، وهي ناعمة الملمس وليس لها أي هوامش محددة (Aguilar-Vildoso *et al.*, 2002) (الشكل 2– دال) ويظهر هذا العرض على الثمرة الخضراء وقد يغطي جزءاً كبيراً من سطحها (Goes, 2001). وتخلو البقع من أي دوارق وتظهر في كثير من الأحيان كشبكة بنية على خلفية صفراء. وتتجمع فيما يبدو الثمار التي تظهر عليها البقع الشريطية في العادة في أعلى الشجرة (M. Spósito، رسالة شخصية).

البقع المتشققة. بقع بنية داكنة أو سوداء سطحية بارزة قليلاً، وهي متفاوتة في حجمها، ولها سطح مشقوق وهوامش غير منتظمة (Goes *et al.*, 2000) (الشكل 2– هاء). وتخلو البقع من الدوارق وتظهر على الثمرة التي يزيد عمرها على ستة أشهر. ويرتبط هذا العرض بوجود قراد الحمضيات *Phyllocoptruta oleivora* Ashmead (FUNDECITRUS, 2005; Spósito, 2003).

وتجدر الإشارة إلى أنه يمكن ملاحظة أكثر من عرض واحد من الأعراض المبيَّنة أعلاه أو أكثر من مرحلة من المراحل الوسيطة بين الأعراض في نفس الثمرة (الشكل 1– جيم، و1 (ج)).

وفي بعض المناطق التي يرتفع فيها ضغط اللقائح، يمكن أن تظهر الأعراض أيضاً في الثمرة الصغيرة وفي كأس الزهرة وفي سويقتها. وتتميَّز الأعراض التي تظهر على كأس الزهرة بأنها حمراء أو بنية داكنة وتشبه البقع النمشية. وتظهر الأعراض في الثمرة الصغيرة وسويقات الزهرة كبقع سوداء صغيرة (Aguilar-Vildoso *et al.*, 2002). ولم ترد تقارير تفيد بظهور تلك الأعراض على الثمرة الصغيرة وكأس وسويقة الزهرة إلاّ من البرازيل.

3-2 الأعراض على الأوراق والأغصان

تظهر البقعة السوداء في الحمضيات في العادة على الأوراق كعدوى كامنة غير مصحوبة بأعراض ظاهرة (Sutton and Waterston, 1966). وإذا ظهرت الأعراض فإنها تبدأ كبقع دبوسية ظاهرة على وجهي الورقة. وهذه البقع التي قد تزداد حجماً حتى تصل في قطرها إلى 3 ملليمترات تكون دائرية ويتحول لون مركزها إلى الرمادي أو البني الشاحب ويحيط بها هامش بني داكن أو أسود وهالة صفراء (Kotzé, 2000) (الشكل 3– ألف). وقد تحتوي البقعة في مركزها أحياناً على دوارق في سطح الورقة المجاور للمحور.

وقد تظهر أيضاً بقع مماثلة لتلك البقع على الأوراق في الأغصان الصغيرة ويشيع ظهورها في الليمون الحمضي *C. limon* أكثر من أنواع الحمضيات الأخرى (M. Truter، رسالة شخصية). وتكون الأعراض صغيرة (يتراوح قطرها بين 0.5 و2 ملليمتر) حول بقع غائرة قليلاً يحفّها هامش بُني أو أسود ومركز يتراوح لونه بين الرمادي والبني الفاتح (الشكل 3– باء). وقد توجد أحياناً دوارق في مركز البقع.

3-3 مقارنة بين أعراض البقعة السوداء في الحمضيات والأعراض الناشئة عن كائنات أخرى أو عوامل لا إحيائية

تتفاوت الأعراض على الثمرة في شكلها، وتشبه في كثير من الأحيان الأعراض التي تسببها مُمرضات الحمضيات الأخرى (مثل فطر *P. citriasiana, P. citrichinaensis, Diaporthe citri, Mycosphaerella citri, Alternaria alternata* pv. *citri, Septoria* spp., *Colletotrichum* spp) أو عن طريق الحشرات أو الأعطاب الميكانيكية أو الناتجة عن البرودة، لا سيما في حالة النمش (Bonants *et al.*, 2003; Snowdon, 1990; Wang *et al.*, 2012; Wulandari *et al.*, 2009; L. Diaz, رسالة شخصية).

وبالنظر إلى أن الأعراض التي يسببها فطر *P. citricarpa* على ثمرة الحمضيات تشبه الأعراض التي تسببها الكائنات المرضة الأخرى، لا يمكن إجراء تشخيص موثوق إلاّ باستخدام الأساليب المبيَّنة أدناه.

4– تحديد هوية الآفة

يبين هذا البروتوكول طريقة كشف فطر *P. citricarpa* وتحديد هويته في ثمار الحمضيات التي تظهر عليها أعراض الإصابة. وينبغي فحص ثمرة الحمضيات لاكتشاف أي أعراض من قبيل البقعة السوداء (انظر القسم 3). وفي حالة الاشتباه بوجود أعراض في شكل بقع أو إصابات، تفحص الأعراض بعدسات مكبِّرة أو مجهر تشريح للتأكد من وجود دوارق. وإذا كانت الدوارق موجودة في البقع الصلبة كما هو موضح في القسم 1.3 وخصائص الشكل والتركيب للدوارق والأبواغ متماشية مع تلك الموجودة في القسم 3.1.4، فإن *P. citricarpa* قد تكون موجودة. على أنه بالنظر إلى أن دوارق فطر *P. citricarpa* وأبواغه تشبه كثيراً دوارق وأبواغ فطر *P. citriasiana* وهو الكائن المُمرض في البوميلو *C. maxima*

الذي تم وصفه مؤخراً (Wulandari *et al.*, 2009)، ويمكن التأكد من هوية فطر *P. citricarpa* بيقين فقط عن طريق تطبيق الأساليب التشخيصية المبيَّنة أدناه (الشكل 4). ويستخدم الأسلوب التشخيصي ألف (العزل والاستنبات) لتحديد هوية فطر *P. citricarpa* على ثمرة الحمضيات، ولكن يمكن استخدمه أيضاً لتحديد هوية الفطر على الأوراق والأغصان والسويقات، بينما ينطبق الأسلوب باء (الفحص الجزيئي) على الثمرة فقط.

وإذا كانت الخصائص الاستنباتية للمستعمرات المزروعة في وسط من أغار الكرز المستخلص بالغلي وأغار دقيق الشوفان، بعد تطبيق الأسلوب ألف، غير متسقة مع الخصائص الاستنباتية للفطر *P. citricarpa* (انظر القسم 4–1–4)، المتطلبات (1)، و(2)، و(3)، و(4))، فإن مادة النبات تعتبر خالية من فطر *P. citricarpa*. ويوصى في حالة المستنبتات المشابهة لفطر *P. citricarpa* التي لا تنتج دوارق ناضجة في غضون 14 يوماً، باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل وتتابع مباعد النسخ الداخلي (انظر القسم 4–2–1) أو تفاعل البلمرة المتسلسل الآني (انظر القسم 4–2–2). على أن عزل واستنبات الكائن في وسط مناسب ثم إجراء اختبار جزيئي مباشر للمستنبتات يستغرق الكثير من الوقت وبالتالي لا يفضَّل استخدامه في عمليات التشخيص التي تجري للشحنات التي يعد الوقت عاملاً حاسماً فيها.

ويتاح أسلوبان لتفاعل البلمرة المتسلسل (التقليدي والآني) لاكتشاف وتحديد هوية فطر *P. citricarpa* على ثمرة الحمضيات (انظر القسمين 4–2–1، و4–2–2). على أنه لوحظ مؤخراً في أثناء الاختبار الروتيني لثمار البوميلو التي ظهرت عليها أعراض نمطية أن أسلوب تفاعل البلمرة المتسلسل الآني الذي استحدثه Gent-Pelzer وآخرون (2007) لا يسمح بأي تضخيم (J.P. Meffert، رسالة شخصية). ويرجع السبب في ذلك إلى أن الأعراض المشابهة لأعراض البقعة السوداء في البوميلو تنجم عن فطر *P. citriasiana*، وهو نوع وُصف حديثاً ويرتبط ارتباطاً وثيقاً بفطر *P. citricarpa* (Wulandari *et al.*, 2009). وبالنظر إلى أنه ليس من الواضح ما إذا كان فطر *P. citricarpa* قادراً على إحداث أعراض نمطية في البوميلو، فإن ثمرة هذا النوع من الحمضيات التي تظهر عليها أعراض شبيهة بأعراض البقعة السوداء ينبغي اختبارها هي الأخرى للتأكد من وجود فطر *P. citricarpa*.

ويمكن استخدام أسلوب تفاعل البلمرة المتسلسل الآني الذي استحدثه Gent-Pelzer وآخرون (2007) (انظر القسم 4–2–2) في التشخيص الإيجابي لفطر *P. citricarpa* لأنه لن يعطي إشارة إيجابية إلاّ عندما يكون فطر *P. citricarpa* موجوداً وليس فطر *P. citriasiana* أو فطر *P. capitalensis*. ويعطي أسلوب تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدي (كما هو مبيَّن في القسم 4–2–1) تضخيماً عندما يوجد فطر *P. citricarpa* أو فطر *P. citriasiana*. وفي هذه الحالة وبعد الحصول على إشارة إيجابية، ينبغي إجراء عزل واستنبات (انظر القسم 4–1)، أو استخدام أسلوب تفاعل البلمرة المتسلسل الآني (انظر القسم 4–2–2) أو تتابع مباعد النسخ الداخلي (انظر القسم 4–21) للتمييز بين النوعين. ولا تتوافر أي بيانات عن تفاعلات فطر *P. citrichinaensis* الذي وصف مؤخراً في الصين، في هذه الفحوص الجزيئية.

وتجدر الإشارة إلى أن كؤوس التكاثر اللاجنسي في النَّبْتَات الطفيلية الداخلية الشائعة المعروفة باسم *Colletotrichum* spp قد تكون موجودة في بعض الأحيان وقد تبدو شبيهة بدوارق فطر *P. citricarpa*. على أن فطر *Colletotrichum* spp يمكن تمييزه بوجود شعيرات في كؤوس التكاثر اللاجنسي، وتكوّن كتل من الأبواغ ذات لون قرنفلي أو وردي على سطح الأماكن المصابة، وشكل وتركيب الأبواغ (Kotzé, 2000).

وتوصف في هذا البروتوكول الأساليب (بما فيها الإشارات المرجعية للأسماء التجارية) بالصيغة التي نشرت بها، لأن هذه الأساليب تحدِّد المستوى الأصلي للخصوصية المتحققة. ويمكن تعديل الإجراءات المختبرية المعروضة في هذه الأساليب بما يناسب المعايير المستخدمة في فرادى المختبرات شريطة التثبت من صحتها على نحو كافٍ.

1-4 الأسلوب ألف: عزل واستنبات فطر *P. citricarpa*

تستأصل الأجزاء المصابة من الثمرة باستخدام مثقاب فللين أو مشرط يغمس في إيثانول تركيزه 70 في المائة لمدة 30 ثانية ويطَّهر سطحه باستخدام هيبوكلوريت صوديوم تركيزه 1 في المائة لمدة دقيقتين، ويشطف مرتين في ماء مقطر معقم ويجفف بورقة تجفيف (Peres *et al.*, 2007). ولزيادة تواتر العزل، يجب استئصال الإصابات بدقة وتُزال الأنسجة التي لا تظهر عليها الأعراض قبل وضعها على الشرائح (N.A. Peres، رسالة شخصية). وتوضع الأجزاء المصابة بعد ذلك معقمة في أطباق بيتري (Petri) (يبلغ قطرها 9 سنتيمترات) مع أغار الكرز أو أغار ديكستروز البطاطس (انظر القسم 4–1–1) أو أغار ديكستروز البطاطس مع 50 ميكروغراماً/ملليلتر من البنسلين و50 ميكروغراماً/ ملليلتر من الستربتومايسين (منظمة وقاية النباتات في أوروبا والبحر المتوسط، 2003). وإذا استُخدم أغار ديكستروز البطاطس وتكونت عليه مستنبتات شبيهة بفطر *P. citricarpa* ذات لون داكن وبطيئة النمو، تنقل بعد ذلك إلى أطباق أغار الكرز لاختبار معدل نمو المستعمرات وإلى أطباق أغار دقيق الشوفان (انظر القسم 4–1–1) لتقييم إنتاج الصبغ الأصفر. وينبغي في الوقت ذاته وضع المستنبتات التي تنمو في وسط أغار ديكستروز البطاطس في إضاءة فوق بنفسجية قريبة في درجة حرارة 22 مئوية لتيسير إحداث تكون الدوارق. وتعتبر المستنبتات منتمية إلى فطر *P. citricarpa* عندما (1) تنمو ببطء على أغار الكرز المستخلص بالغلي (انظر القسم 4–1–2)؛ (2) تنتج دوارق وأبواغ مميزة لفطر *P. citricarpa* (انظر القسم 4–1–2)؛ (3) تنتج صبغاً أصفر على أغار دقيق الشوفان بالرغم من أن مستفردات فطر *P. citricarpa* ليست كلها منتجة لهذا الصبغ على أغار دقيق الشوفان (Baayen *et al.*, 2002).

وينطوي هذا الأسلوب على العيوب التالية: (أ) فطر *P. citricarpa* بطئ النمو نسبياً ويزداد نموه في كثير من الأحيان بتأثير فطريات أخرى في المستنبت (مثل فطر *C. gloeosporioides*) (Peres *et al.*, 2007) نظراً لعدم وجود أي وسط استنباتي انتقائي لفطر *P. citricarpa*؛ (ب) هذا الأسلوب يستغرق وقتاً طويلاً لأنه يتطلب ما يتراوح بين 7 و14 يوماً لإنتاج الدوارق.

1-1-4 أوساط المستنبتات

أغار الكرز المستخلص بالغلي. يُصنع عصير الكرز بغلي 1 كيلو غرام من الكرز بعد إخلائه من النوى والسويقات في 1 لتر من ماء الصنبور لمدة ساعتين تقريباً. وترشَّح العصارة باستخدام قطعة من الشاش وتصب في زجاجات بعد تعقيمها لمدة 30 دقيقة في درجة حرارة 110 درجة مئوية (على أن يكون الأُس الهيدروجيني 4.5) وتُخزَّن لحين استخدامها. ويضاف 20 غراماً من الأغار التقني رقم 3 إلى 0.8 لتر من الماء المقطر في زجاجة ويعقَّم المزيج لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة 121 درجة مئوية. وبعد التعقيم مباشرة، يضاف 0.2 لتر من عصارة الكرز المعقمة ويُمزج الخليط جيداً ويُعقَّم لمدة 5 دقائق في درجة حرارة 102 مئوية (Gams *et al.*, 1998).

أغار دقيق الشوفان. يتاح هذا الأغار تجارياً. ويمكن بدلاً من ذلك إعداده باستخدام الأسلوب التالي: يوضع 30 غراماً من رقائق الشوفان في قطعة من الشاش وتعلَّق في إناء يحتوى على ماء صنبور، ويترك ليغلي لمدة ساعتين تقريباً ثم تعصر

الرقائق وترشَّح باستخدام قطعة من الشاش، وتعقم العصارة لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة 121 درجة مئوية. ويضاف 20 غراماً من الأغار التقني رقم 3 في زجاجة تحتوي على لتر واحد من خلاصة دقيق الشوفان، ويعقَّم المزيج لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة 121 مئوية (Gams *et al.*, 1998).

أغار ديكستروز البطاطس. يتاح هذا الأغار تجارياً. ويمكن بدلاً من ذلك إعداده وفقاً للأسلوب الذي بيَّنه Hawksworth وآخرون (1995).

4-1-2 الخصائص الاستنباتية

تنمو مستعمرات فطر *P. citricarpa* ببطء في أغار الكرز المستخلص بالغلي؛ ويتراوح متوسط قطرها بين 25 و30 ملليمتراً بعد 7 أيام في درجة حرارة 22 مئوية في الظلام (Baayen *et al.*, 2002). وعندما تنمو المستعمرات على أغار ديكستروز البطاطس فإنها تتميَّز بوجود هوامش غير منتظمة مبطَّنة بأفاطير عديمة اللون تشكل منطقة شفيفة أوسع كثيراً (الشكل 5 –ألف). ويكون مركز المستعمرة داكناً وبداخله أفاطير هوائية يتراوح لونه بين الرمادي والأخضر الشاحب ويحتوي في كثير من الأحيان على خصلات صغيرة متعددة. وتكون المستعمرة في ناحيتها العكسية داكنة بدرجة كبيرة في منتصفها ومحاطة بمساحات بنية تميل إلى الرمادي والأصفر البرتقالي (Baayen *et al.*, 2002). ويبدأ تكون الأسداء بعد 7 أو 8 أيام بينما تتكون الدوارق الناضجة المحتوية على الأبواغ عموماً في غضون 10 أو 14 يوماً (الشكل 5–باء). وفي حالة أغار دقيق الشوفان، تكون المستعمرات بعد 14 يوماً في درجة حرارة 25 درجة مئوية في الظلام، مفلطحة ومتمددة ويتراوح لونها بين الأخضر الزيتوني والرمادي الذي يميل إلى الشحوب بالقرب من منطقة الهامش وتحتوي على مساحات ضئيلة أو متوسطة من الأفاطير الهوائية (Glienke *et al.*, 2011). ويتكون في كثير من الأحيان على أغار دقيق الشوفان صبغ أصفر مميِّز ينتشر في الوسط الاستنباتي حول المستعمرة (الشكل 6–دال، الصف العلوي) بالرغم من أن مستفردات فطر *P. citricarpa* ليست كلها منتجة لهذا الصبغ الأصفر (Baayen *et al.*, 2002). ويُنتج هذا الصبغ الأصفر بكميات ضئيلة على أغار الكرز المستخلص بالغلي وعلى أغار ديكستروز البطاطس.

4-1-3 الشكل والتركيب

تتفاوت البيانات المنشورة عن شكل وتركيب *P. citricarpa* تفاوتاً كبيراً، ويرجع ذلك في جانب منه إلى الالتباس بشأن هوية مختلف أنواع فطر *Phyllosticta* المرتبطة بالحمضيات (Baayen *et al.*, 2002; Glienke *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012; Wulandari *et al.*, 2009). وتشير خصائص الشكل والتركيب التالية إلى الإخصاب وأبواغ التكاثر في فطر *P. citricarpa* التي تتكون أساساً في المستنبت؛ وتستند هذه الخصائص إلى البيانات المأخوذة عن Sutton وWaterston(1966) و van der Aa(1973)، بالصيغة المنقحة والمعدَّلة في Baayen وآخرين (2002).

الأجسام الثمرية. تتكون الأجسام الثمرية على دُبال الأوراق وفي المستنبت (De Holanda Nozaki, 2007)، ولكنها لا تتكون على أي مادة نباتية أخرى (مثل الأوراق المثبتة، أو الثمار). وتوجد هذه الأجسام منفردة أو مجتمعة، ويتراوح شكلها بين كروية وكمثرية، وتكون غائرة، وبنية داكنة أو سوداء، ويتراوح حجمها بين 125 و360 ميكروناً، وتحتوي على حلمة وحيدة أو فتيحة منقارية، ويغطي سطحها في كثير من الأحيان زوائد مشيجية. وتتألف طبقة جدارها الخارجي من خلايا زاوّية ذات جدران سميكة بنية، بينما تتألف طبقة الجدار الداخلي من خلايا زاوّية أو كروية ذات جدران أقل سمكاً وعديمة اللون.

الزقاق. تكون في شكل حُزم محصورة بين جدارين ودبوسية ومحتوية على ثمانية أبواغ ولكنها مستديرة الطرف. وتبلغ أبعادها 40–65 ميكروناً × 12 – 15 ميكروناً قبل تمزق الجدار الخارجي، وتصبح أسطوانية دبوسية وتمتد في طولها لتصل إلى ما يتراوح بين 120 و150 ميكروناً قبل التفرُز.

الأبواغ الزقّية. تكون قصيرة، وعديمة الحواجز، وشفافة، وأسطوانية، ومنتفخة في الوسط، ومقوَّسة قليلاً، وتبلغ أبعادها 12 – 16 ميكروناً × 4.5 – 6.5 ميكرون، وذات قطبية متغايرة، ولها أطراف غير متساوية ومنفرجة الزاوية. ويتصل طرفها العلوي الأصغر بزائدة عريضة غير خلوية ومخاطية في شكل غطاء، ويتراوح طولها بين ميكرون واحد و2 ميكرون، وأما طرفها الأدنى فله زائدة حادة مجعَّدة يتراوح طولها بين 3 و6 ميكرونات.

الدوارق. تتكون على الثمرة والأوراق المربوطة والأغصان الميتة ودُبال الأوراق، وكذلك في المستنبت. وتوجد الدوارق منفردة أو في بعض الأحيان مجمَّعة، وتكون كروية وغائرة ويكون لونها بنياً داكناً أو شبه داكن، ويتراوح قطرها بين 70 و330 ميكروناً. ويبلغ سمك جدارها الدورقي 4 خلايا، وتكون صلبة من الخارج وشبه لحمية من الداخل، ولها فتيحة خارجية داكنة ومحلَّمة قليلاً، ودائرية ويتراوح قطرها بين 10 ميكرونات و15 ميكروناً.

أبواغ التكاثر. يتراوح شكلها بين بيضي وإهليجي، وزجاجية، وعديمة الحواجز، وتحتوي على العديد من القطيرات، وتبلغ أبعادها 9.4 –12.7 ميكرون × (5 – 8.5) ميكرون، ولها زائدة مخززية الشكل وعديمة اللون وغمد جيلاتيني عديم اللون لا يكاد يرى ويقل سمكه عن 1.5 ميكرون (الأشكال 5– جيم، و5– دال و6– ألف). وهي تتخذ شكل أبواغ برعمية من حوامل غبيرات زجاجية ووحيدة الخلية واسطوانية يصل طولها إلى 9 ميكرونات.

الحالة النطفية. وصفت هذه الحالة في الجنس *Leptodothiorella*، وتتكون على العوائل وفي المستنبت الخالص. وتتخذ شكل قضيب كروي عند طرفيه وقلما تكون اسطوانية، أو مستقيمة، أو مقوَّسة قليلاً، وتبلغ أبعادها 5–8 ميكرونات × 0.5 – 1 ميكرون.

4.1.4 مقارنة الخصائص الاستنباتية وخصائص الشكل والتركيب بين فطر *P. citricarpa* وأنواع *Phyllosticta* المماثلة

تشبه مستنبتات *P. citricarpa* بدرجة كبيرة مستنبتات *P. citriasiana* (Wulandari *et al.*, 2009) ومستنبتات *P. capitalensis* الطفيلية الداخلية غير المرضة للحمضيات (Baayen *et al.*, 2002؛ Glienke *et al.*, 2011).

ويمكن تحديد هوية مستعمرات *P. citricarpa* عن طريق الجمع بين ما يلي:

(1) فنمو المستعمرة على أغار الكرز المستخلص بالغلي (رغم تداخل النطاقات)؛
(2) سُمك الغمد المخاطي المحيط بالأبواغ (الأشكال 5– جيم، و5– دال، و6– ألف، و6– باء، و6– جيم)؛
(3) طول الزائدة البوغية؛
(4) وجود صبغ أصفر على أغار دقيق الشوفان بالرغم من أن مستفردات فطر *P. citricarpa* ليست كلها منتجة للصبغ الأصفر (Baayen *et al.*, 2002; Wulandari *et al.*, 2009).

ويتضمن الجدول 1 معلومات مفصَّلة عن الخصائص المميزة لفطر *P. citricarpa* والأنواع ذات الصلة. وبالإضافة إلى ذلك، يمكن تمييز فطر *P. citrichinaensis* عن فطر *P. citricarpa* من خلال زائدته البوغية الأطول التي يتراوح طولها بين 14 و26 ميكرون (Wang *et al.*, 2012).

الجدول 1 – أهم الخصائص الاستنباتية وخصائص الشكل والتركيب في فطر *Phyllosticta citricarpa* وفطر *Phyllosticta citriasiana* وفطر *Phyllosticta capitalensis* (Baayen *et al.*, 2002; Wulandari *et al.*, 2009)

* On cherry decoction agar (CHA) medium after 7 days at 22 °C in darkness.

الخصائص	*P. citricarpa*	*P. citriasiana*	*P. capitalensis*
متوسط حجم الدوارق (بالميكرون)	7.5–6 × 12–10	7–6 × 14–12	7.5–6.5 × 12–11
اتساع الغمد المخاطي (بالميكرون)	أقل من 1.5	1	2.5 – 1.5 (–3)
طول الزائدة الطرفية (بالميكرون)	6–4 (–10)	10–7 (–14)	6–4 (–10)
متوسط حجم البوغ الزقي (بالميكرون)	6.5– 4.5 × 16–12	غير معلوم	7.5 – 6.5 × 17.5–15
متوسط حجم النطفة (بالميكرون)	1–0.5 × 8–5	2–1 × 5–.3	2.5–1.8 × 10–7
متوسط قطر المستعمرة (بالملليمتر)[1]	30–25	20–18	أكثر من 40
درجة الحرارة العظمى المطلوبة للنمو (بالدرجات المئوية)	36–30	33–30	36–30
إنتاج الصباغ الأصفر في وسط أغار دقيق الشوفان	نعم[2]	لا	لا

[1] على أغار الكرز المستخلص بالغلي بعد 7 أيام في درجة حرارة 22 درجة مئوية في الظلام.

[2] تجدر الإشارة إلى أن مُستفرَدات فطر *P. citricarpa* ليست كلها منتجة لصبغ أصفر.

2.4 الأسلوب باء: الفحوص الجزيئية

طُوِّرت أساليب جزيئية مختلفة للتعرف على هوية *P. citricarpa* مباشرة في المستنبتات الخالصة وفي الأجزاء المصابة من الثمرة (Bonants *et al.*, 2003; Gent-Pelzer *et al.*, 2007; Meyer *et al.*, 2006, 2012; Peres *et al.*, 2007; Stringari *et al.*, 2009). ويرد وصف لأسلوبين، هما فحص تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدي الذي استحدثه Peres وآخرون (2007)، وفحص تفاعل البلمرة المتسلسل الآني الذي استحدثه Gent-Pelzer وآخرون (2007) للتعرف على هوية *P. citricarpa*. ويلاحظ أن أسلوب تفاعل البلمرة المتسلسل الآني يولِّد إشارة إيجابية من أي بقعة سوداء وحيدة على ثمرة الحمضيات، بينما قد يعطي أسلوب تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدي في بعض الحالات نتائج غير قاطعة. ويلاحظ أيضاً عدم وجود أي بيانات متاحة عن التفاعلات الإيجابية في الفحوص الجزيئية لفطر *P. citrichinaensis* الذي وصف مؤخراً على الثمار في الصين.

1-2-4 تحديد هوية *P. citricarpa* باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدي

قيِّمت الخصوصية (الخصوصية التحليلية) في دراسة شملت 36 مستفردة من مستفردات *P. citricarpa* و13 مستفردة من *P. capitalensis*، ومستفردات من آفات الحمضيات الشائعة، بما فيها *Alternaria alternata*، و*Colletotrichum acutatum*، و *Colletotrichum gloeosporioides*، و*Diaporthe citri, Mycosphaerella citri* و*Penicillium digitatum*. وفطر *P. citricarpa* هو الوحيد الذي يتميَّز بتفاعل إيجابي. وتبلغ الحساسية (الحساسية التحليلية؛ حد الكشف) 1 بيكوغرام من الدنا/ميكرولتر (Peres *et al.*, 2007). وهذا الأسلوب يضخم الدنا في فطر *P. citricarpa* أو في فطر *P. citriasiana* وهناك ثلاثة أساليب متاحة للتمييز بين النوعين بعد تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدي، وهو العزل والاستنبات (انظر القسم 4–1) وفحص تفاعل البلمرة المتسلسل الآني (انظر القسم 4–2–2) وتتابع مباعد النسخ الداخلي (انظر القسم 4–2–3).

4-1-2-1 معلومات عامة

استحدث هذا البروتوكول Peres وآخرون (2007). ومصدر الدنا هو الأفطور أو الأجزاء المصابة المستأصلة من الثمرة. والغرض من هذا الفحص هو تضخيم جزء منطقة تتابع مباعد النسخ الداخلي الذي يولِّد أمبليكوناً يحتوي على 300 من الأزواج القاعدية. والبادئات القليلة النوكليوتيدات هي:

البادئة الأمامية: GCN (5'-CTG AAA GGT GAT GGA AGG GAG G -3')

البادئة العكسية: GCMR (5'-CAT TAC TTA TCG CAT TTC GCT GC -3')

ويستخدم الكاشف MasterMix Eppendorf®[1] الذي يبلغ تركيزه 2.5 ويحتوي على إنزيم بوليميريز الدنا، كما يستخدم دارئ تفاعل يحتوي على مغنيسيوم$^{+2}$ ونوكليوتيد لتضخيم تفاعل البلمرة المتسلسل. ويستخدم الماء الصالح للفحص الجزيئي في تكوين مزيج التفاعل. وينبغي تنقية هذا الماء (نزع أيوناته أو تقطيره)، وينبغي أن يكون معقماً (بالبخار المضغوط أو بترشيحه من خلال 0.45 ميكرون) وخالياً من إنزيم النوكلياز. ويتم إجراء التضخيم باستخدام جهاز تدوير حراري من نوع بيلتييه (Peltier) مزوَّد بغطاء.

4-1-2-2 الأساليب

استخلاص الحمض النووي وتنقيته

يستخلص الحمض الريبي النووي المنزوع الأكسجين (الدنا) من مستنبتات الفطريات التي تنمو لمدة 7 أيام في ديكستروز البطاطس أو من الأجزاء المصابة في ثمرة واحدة. وفي الحالة الثانية، يستخرج النسيج الذي تظهر عليه الأعراض مع ترك أكبر جزء ممكن من الطبقة الوسطى للغلاف السمري (الألبيدو) والقشرة الخارجية.

ويُستخلص الدنا من الأفطور باستخدام مجموعة أدوات استخلاص الدنا المتاحة تجارياً (مثل مجموعة لوازم استخلاص الدنا النباتي DNeasy Plant Mini Kit (شركة كياجين Qiagen)، ومجموعة QuickPick SML Plant (شركة بايو نوبايل Bio-Nobile) وجهاز العزل الآلي KingFisher® (من إنتاج شركة ثيرمو Thermo)) تبعاً لتعليمات الشركة

[1] لا ينطوي استخدام المنتجات التي تحمل العلامة التجارية ®Eppendorf في تضخيم تفاعل البلمرة المتسلسل في هذا البرتوكول التشخيصي على أي موافقة على هذه المنتجات بما يشكل استبعاداً للمنتجات الأخرى التي قد تكون مناسبة هي الأخرى. وتقدَّم هذه المعلومات للتيسير على مستعملي هذا البروتوكول ولا تعني موافقة من هيئة تدابير الصحة النباتية على المادة الكيميائية و/أو الكاشف و/أو المعدات المذكورة. ويجوز استخدام منتجات معادلة إذا تبيَّن أنها تفضي إلى نفس النتائج.

المصنِّعة. وفي حالة استخلاص الدنا من الأجزاء المصابة في ثمرة واحدة، يمكن استخدام بروتوكول استخلاص الدنا بالتحلل القلوي (Klimyuk *et al.*, 1993)، ثم التنقية باستخدام أسلوب الغميسة، حيث ثبت أنه أكثر الأساليب فعالية (Peres *et al.*, 2007).

أسلوب استخلاص الدنا بالتحلل القلوي. توضع أنسجة الثمرة التي تظهر عليها الأعراض في أنبوب مجهري معقم سعته 2 ملليلتر يحتوي على 40 ميكرولتر من هيدروكسيد صوديوم تركيزه 0.25 مولار، ويحضن في حمام من الماء المغلي (100 درجة مئوية) لمدة 30 ثانية (الفترة الحرجة). وتتم محايدة محتويات الأنابيب عن طريق إضافة 40 ميكرولتر من حمض هيدروكلوريك بتركيز 0.25 مولار، و20 ميكرولتر من محلول Tris-HCl تركيزه 0.5 مولر وأسه الهيدروجيني 8، و0.25 في المائة (حجم/حجم) من Nonidet P-40، وتوضع الأنابيب مرة أخرى في حمام الماء المغلي لمدة دقيقتين. ويمكن استخدام المادة المتكونة مباشرة للتنقية عن طريق استخدام أسلوب الغميسة (انظر أدناه) أو تخزينها في درجة حرارة 4 درجة مئوية لعدة أسابيع. وقبل التنقية بعد التخزين، تحضن العينات في حمام من الماء المغلي لمدة دقيقتين.

أسلوب تنقية الدنا بالغميسة. يضاف 150 ميكرولتر من الإيثانول بتركيز 100 في المائة وقطع صغيرة من طبق التحليل اللوني السيلولوزي الرقيق الطبقة (غميسة) في أنبوب مجهري سعته 2 ملليلتر بعد التحلل القلوي (انظر أعلاه). وتوضع الأنابيب على جوانبها فوق ثلج وترج لمدة 30 دقيقة. ويسحب السائل بالنفخ ويضاف 500 ميكرولتر من دارئ الغسيل (تريزما (Tris) وحمض ايثيلين ثنائي أمين رباعي الخليك (EDTA) بتركيز 10، وهيبوكلورايت الصوديوم أسّه الهيدروجيني 7، وإيثانول بتركيز 95 في المائة) بعد تخفيفه إلى 25 في المائة، وتُقلَب الأنابيب لمزج محتوياتها. ويكرر الغسل مرتين. وتوضع الغمائس في أنابيب جديدة وتجفف في جو مفرَّغ من الهواء. وتوضع الأنابيب بعد ذلك على جوانبها، ويضاف 50 ميكرولتر من المحلول الدارئ Tris-EDTA إلى كل أنبوب. وبعد وضع الأنابيب في حاضنة لمدة 5 دقائق، تُنبذ بقوة طاردة لمدة 10 ثوان، وتنزع الغمائس وتلقى بعيداً ويستخلص الدنا. ويمكن استخدام الدنا المنقى فوراً أو يخزَّن في درجة حرارة 4 مئوية طوال الليل أو في درجة حرارة 20 درجة مئوية تحت الصفر لمدد أطول.

ويمكن بدلاً من ذلك استخلاص الدنا من الإصابات الموجودة في الثمرة باستخدام مجموعات لوازم استخلاص الدنا المتاحة تجارياً وفقاً لتعليمات الشركة المصنِّعة.

تفاعل البلمرة المتسلسل

يتألف المزيج الرئيسي (التركيز لكل 20 ميكرولتر من التفاعل الوحيد) من الكواشف التالية:

الكاشف	التركيز العملي	الحجم لكل تفاعل (ميكرولتر)	التركيز النهائي
ماء صالح للفحص الجزيئي	لا يوجد	0.4	لا يوجد
MasterMix Eppendorf®[1] بتركيز 2.5 (بوليميريز الدنا 0.06 وحدة/ميكرولتر)	2.5 ×	8.0	1 × (024 Taq وحدة/ميكرولتر)
دارئ تفاعل Taq (4 مللي مولر من المغنسيوم $^{+2}$، و500 ميكرومولار من كل dNTP)	2.5 ×	8.0	1 × (1.6 ميللي مولار من المغنسيوم $^{+2}$، 200 ميكرومولار من كل dNTP)
البادئة GCN	10 ميكرومولار	0.8	0.4 ميكرومولار
البادئة GCMR	10 ميكرومولار	0.8	0.4 ميكرومولار
المجموع الفرعي	-	18	-
الدنا	-	2.0	-

الكاشف	التركيز العملي	الحجم لكل تفاعل (ميكرولتر)	التركيز النهائي
المجموع	-	20.0	-

بارامترات تدوير تفاعل البلمرة المتسلسل هي تغير الخواص الطبيعية في درجة حرارة 94 مئوية لمدة دقيقتين؛ و39 دورة في درجة حرارة 94 مئوية لمدة 30 ثانية، و64 درجة مئوية لمدة 30 ثانية، و72 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة؛ وتمديد في درجة حرارة 72 مئوية لمدة 10 دقائق. ويشير منتج تفاعل البلمرة المتسلسل الذي يضم 300 زوجاً قاعدياً إلى وجود الحمض الريبي النووي المنزوع الأكسجين (الدنا) لفطر *P. citricarpa*.

3-1-2-4 معلومات إجرائية أساسية

بعد التضخيم، يمزج 10 ميكرولتر من مزيج التفاعل مع 2 ميكرولتر من دارئ تحميل الدنا بتركيز 6 (شركة بروميغا Promega) ويوضع مع واسم وزن جزيئي (سُلَّم دنا من 100 زوج قاعدي) في هُلام الأغاروس ويفصل كهربائياً ويلون ببروميد الإثيديوم أو كواشف بديلة، ويصوَّر في أشعة فوق البنفسجية (Sambrook *et al.*, 1989).

ويجب إدراج الدنا من سلالة مرجعية لفطر *P. citricarpa* (ضبط إيجابي) كعينة إضافية لضمان نجاح التضخيم. ويجب إجراء تضخيم تفاعل البلمرة المتسلسل أيضاً على عينة تكون فيها خلاصة دنا *P. citricarpa* قد استُبدلت بخلاصة الدنا من أنواع أخرى ذات صلة أو على عينة من القشرة الخارجية للثمرة (ضبط سلبي). ويتطلب رصد التلوث المحتمل في الكاشف والإشارات الإيجابية الكاذبة استبدال العينة بماء (ضبط التفاعل). وينصح بإدراج عنصر لضبط التضخيم الداخلي من أجل رصد التثبيط.

2-2-4 تحديد هوية *P. citricarpa* باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل الآني

قيِّمت الخصوصية (الخصوصية التحليلية) باستخدام السلالة المرجعية لفطر *P. citricarpa*، CBS 111.20 (التي تمثل 10 من مجموعة من تتابع مباعد النسخ الداخلي لمستفردات فطر *P. citricarpa*؛ (Baayen *et al.*, 2002)، والسلالة المرجعية لفطر *P. capitalensis*، GC14 (التي تمثل المجموعة الثانية من تتابع مباعد النسخ الداخلي لمستفردات *P. capitalensis*؛ (Baayen *et al.*, 2002) و12 من آفات الحمضيات الأخرى (*Alternaria* spp., *Penicillium* spp., *Colletotrichum* spp)، و*Phyllosticta artocarpina* و*Guignardia bidwellii* ولم ينشأ تفاعل إيجابي إلاّ من فطر *P. citricarpa*. وتبلغ الحساسية (الحساسية التحليلية؛ حد الكشف) 10 أجزاء من الدنا لكل تفاعل، وتبلغ الحساسية التشخيصية 100 في المائة (Gent-Pelzer *et al.*, 2007).

1-2-2-4 معلومات عامة

استحدث هذا البروتوكول Gent-Pelzer وآخرون (2007). ومصدر الحمض النووي هو الأفطور أو الأجزاء المصابة المستأصلة من الثمرة. والغرض من الفحص هو تضخيم جزء منطقة تتابع مباعد النسخ الداخلي لتوليد أمبليكون مكون من 69 زوجاً قاعدياً. وفيما يلي البادئات القليلة النوكليوتيدات المستخدمة:

البادئة الأمامية: GcF1 (5'-GGT GAT GGA AGG GAG GCC T-3')

البادئة العكسية: GcR1 (5'-GCA ACA TGG TAG ATA CAC AAG GGT-3')

ويوسم مسبار التحليل المائي (5'-AAA AAG CCG CCC GAC CTA CCT TCA-3') عند الطرف رقم '5 باستخدام الصبغ المخبر المتفلور FAM (6–كربوكسي فلورسين) ويعدل عند الطرف رقم3' باستخدام صبغة TAMRA (6–كربوكسي رباعي ميثيل الأمين) أو الصبغ المُخَمّدّ Eclipse® Dark Quencher (شركة يوروجنتيك Eurogentic).

يحتوي المزيج الرئيسي Premix Ex Taq Master Mix الذي يبلغ تركيزه 2 (تاكارا Takara)[2] على إنزيم تاك بوليميريز ودارئ تفاعل يحتوي على كلوريد مغنيسيوم ونوكليوتيد لتضخيم تفاعل البلمرة المتسلسل. ويضاف صبغ روكس (ROX) المرجعي (تاكارا، بتركيز 50) إلى المزيج الرئيسي Premix Ex Taq. ويستخدم ماء الفحوص الجزيئية في تكوين مزيج التفاعل. وينبغي تنقية الماء (بإزالة أيوناته أو تقطيره) وتعقيمه (بالبخار المضغوط أو بترشيحه من خلال 0.45 ميكرون) وينبغي أن يكون خالياً من النوكلياز. ويتم إجراء التضخيم باستخدام التدوير الحراري لتفاعل البلمرة المتسلسل الآني.

4-2-2-2 الأساليب

استخلاص الحمض النووي وتنقيته

يستخلص الدنا من حشوات الأفطور (الذي يبلغ قطره 0.5 سنتيمتر) المأخوذ من حواف مستعمرة مستنبتة على أغار الكرز المستخلص بالغلي (انظر القسم 4–4–1) في درجة حرارة 22 مئوية في الظلام أو من الإصابات الموجودة في الثمرة. وتستأصل الأجزاء المصابة من القشرة وينزع أكبر قدر ممكن من الألبيدو المحيط وتقشَّر الأنسجة. وتقطع حشوات الأفطور أو الأجزاء المصابة إلى قطع صغيرة وتوضع في أنبوب طرد مركزي مجهري مزوَّد بغطاء علوي محكم، ويحتوي الأنبوب على خرزات من الفولاذ غير القابل للصدأ (يبلغ قطرها 3.2 ملليمتر)، و125 ميكرولتر من دارئ الاستخلاص (محلول ملحي مدروء بالفوسفات تركيزه 0.02 مولار، ومادة توين (Tween) رقم 20 بتركيز 0.5 في المائة، وبولي فاينيل البيروليدون 2 في المائة، وزلال مصل أبقار 0.2 في المائة). ويرج الأنبوب في مخفقة خرز لمدة 80 ثانية بسرعة تبلغ 5000 دورة في الدقيقة. ويعرَّض المزيج لطرد مركزي لمدة 5 ثوان بسرعة قصوى (بقوة تسارع 100 16) في أنبوب الطرد المركزي المجهري، ويستخدم 75 ميكرولتر من المادة الطافية الناشئة لاستخلاص الدنا. ويمكن استخلاص الدنا باستخدام لوازم استخلاص الدنا المتاحة تجارياً وفقاً لتعليمات الشركة المصنِّعة. ويبلغ الحجم النهائي لمحلول الدنا 50 ميكرولتر. وينقى الدنا بعد ذلك في أعمدة دوَّارة مملوءة ببولي فاينيل البيروليدون. وتجهَّز الأعمدة باستخدام 0.5 سم من بولي فاينيل بولي البيروليدون، وتوضع على أنبوب تفاعل فارغ وتغسل مرتين باستخدام 250 ميكرولتر من ماء الفحص الجزيئي عن طريق تعريض العمود لطرد مركزي لمدة 5 دقائق بقوة تسارع 4000. ويوضع معلق الدنا على عمود بولي فاينيل البيروليدون ويعرَّض لطرد مركزي لمدة 5 دقائق بقوة تسارع 4000. ويستخدم الجزء المتدفق كمدخل في فحص تفاعل البلمرة المتسلسل. ويمكن استخدام الدنا بعد تنقيته فوراً أو يخزَّن في درجة حرارة 4 مئوية طوال الليل أو في درجة حرارة 20 مئوية تحت الصفر لمدد زمنية أطول. ويستخدم بولي فاينيل البيروليدون كمركب قابل للذوبان في دارئ الاستخلاص. وبولي فاينيل بولي البيروليدون هو بولي فاينيل البيروليدون المتشابك بروابط تساهمية ويستخدم كمادة ترشيح غير قابلة للذوبان.

[2] لا ينطوي استخدام المنتجات التي تحمل العلامة التجارية Takara في المزيج الرئيسي Premix Ex Taq ×2 في هذا البروتوكول التشخيصي على أي موافقة على هذه المنتجات بما يشكل استبعاداً للمنتجات الأخرى التي قد تكون مناسبة هي الأخرى. وتقدَّم هذه المعلومات للتيسير على مستعملي هذا البروتوكول ولا تعني موافقة من هيئة تدابير الصحة النباتية على المادة الكيميائية و/أو الكاشف و/أو المعدات المذكورة. ويجوز استخدام منتجات معادلة إذا تبيَّن أنها تفضي إلى نفس النتائج.

تفاعل البلمرة المتسلسل

يتألف المزيج الرئيسي (التركيز لكل 30 ميكرولتر من التفاعل الوحيد) من الكواشف التالية:

الكاشف	التركيز العملي	الحجم لكل تفاعل (ميكرولتر)	التركيز النهائي
ماء صالح للفحص الجزيئي	لا يوجد	13.1	لا يوجد
مزيج رئيسي (Premix Ex Taq) (تاكارا)[2]	2 ×	15	1 ×
البادئة GcF1	50 ميكرومولار	0.15	0.25 ميكرومولار
البادئة GcR1	50 ميكرومولار	0.15	0.25 ميكرومولار
المسبار GcP1	5 ميكرومولار	0.6	0.10 ميكرومولار
المجموع الفرعي	-	29.0	-
الدنا	-	1	-
المجموع	-	30.0	-

يمكن إضافة 0.6 ميكرولتر من صبغ روكس المرجعي بتركيز 50 عند الاقتضاء؛ وفي هذه الحالة، يستخدم 12.5 ميكرولتر من ماء تفاعل البلمرة المتسلسل.

وتبلغ بارامترات تدوير تفاعل البلمرة المتسلسل 95 درجة مئوية لمدة 10 دقائق، و40 دورة في درجة حرارة 95 مئوية لمدة 15 ثانية، و60 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة. وتم الوصول إلى الحد الفاصل للدورات، وهو 40، باستخدام نظام اكتشاف التتابع ABI PRISM® 7700 أو 7900 (شركة النُظم البيولوجية التطبيقية) والمواد والكواشف المستخدمة على النحو المبيَّن أعلاه. وينبغي ملاحظة ما يلي:

- ينبغي أن يكون منحنى التضخيم أُسياً.
- تعتبر العينة إيجابية إذا كانت قيمة الدورة الدنيا الناتجة عنها تقل عن 40، شريطة أن تكون عناصر ضبط التلوث سلبية.
- تعتبر العينة سلبية إذا كانت قيمة الدورة الدنيا الناتجة عنها لا تقل عن 40 شريطة أن تكون عناصر ضبط الفحص وتثبيط الاستخلاص إيجابية.

وينبغي التحقق من قيمة الحد الفاصل للدورات في كل مختبر عند إجراء الاختبار للمرة الأولى.

3-2-2-4 معلومات إجرائية أساسية

ويجب إدراج الدنا المأخوذ من سلالة مرجعية من فطر *P. citricarpa* (ضبط إيجابي) كعينة إضافية لضمان نجاح التضخيم. ويجب أيضاً إجراء تضخيم تفاعل البلمرة المتسلسل على عينة تكون فيها خلاصة دنا فطر *P. citricarpa* قد استُبدلت بخلاصة الدنا من أنواع أخرى ذات صلة (مثل *P. citriasiana*) أو على عينة من القشرة الخارجية السليمة (ضبط سلبي). ويتطلب رصد التلوث المحتمل للكاشف وأي نتائج إيجابية كاذبة أن يستعاض عن العينة بالماء (ضبط التفاعل).

وللتحقق من التفاعلات السلبية الكاذبة الناشئة عن تثبيط تفاعل التضخم، يمكن أن يضاف إلى مزيج التفاعل 12.5 جزء من عنصر ضبط التضخم الداخلي، و75 نانو مولار من البادئة الأمامية لعنصر ضبط التضخم الداخلي

(FIAC ('-TGG CCC TGT CCT TTT ACC AG-3'5، و75 نانو مولر من البادئة العكسية لعنصر ضبط التضخم الداخلي ('-TTT TCG TTG GGA TCT TTC GAA-3'5) و50 نانو مولار من مسبار التحليل المائي لعنصر ضبط التضخم الداخلي MBG ('-ACA CAA TCT GCC-3'55) الموسوم بالصبغ المخبر المتفلور VIC™ (شركة يوروجنتيك) ويمكن إضافة الصبغ المخمد Eclipse® Dark Quencher (شركة يوروجنتيك) إلى مزيج التفاعل.

4-2-3 تحديد هوية فطر *P. citricarpa* باستخدام تتابع مباعد النسخ الداخلي

4-2-3-1 معلومات عامة

يمكن تأكيد هوية العينات الإيجابية التي يتم التعرف عليها من خلال تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدي عن طريق التتابع (Baayen *et al.*, 2002). وفيما يلي وصف لأسلوب تتابع مباعد النسخ الداخلي ولمنطقتين من مورِّث الرنا الريباسي الفطري.

وفيما يلي البادئات القليلة النوكليوتيدات:

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

البادئة العكسية: ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (White *et al.*, 1990).

4-2-3-2 الأساليب

استخلاص الحمض النووي وتنقيته

ينبغي استخلاص الدنا من حشوة مساحتها 1 سنتيمتر مربع مأخوذة من مستنبت نقي لمستفردة الآفة. وتستخدم مجموعة لوازم الاستخلاص المناسبة أو يستخلص الدنا باتباع أسلوب تقليدي أكثر، مثل الأسلوب الذي يصفه Hughes وآخرون (2000). وينبغي تخزين الدنا المستخلص في درجة حرارة 4 مئوية لاستخدامه فوراً أو يخزَّن في درجة حرارة 20 مئوية تحت الصفر في حالة عدم إجراء الاختبار في نفس اليوم.

تفاعل البلمرة المتسلسل

يبلغ مجموع حجم تفاعل البلمرة المتسلسل الوحيد 50 ميكرولتر، ويتألف من الكواشف التالية:

الكاشف	التركيز العملي	الحجم لكل تفاعل (ميكرولتر)	التركيز النهائي
ماء صالح للتحليل الجزيئي	لا يوجد	37.5	لا يوجد
دارئ تفاعل البلمرة المتسلسل 10 × (+ 15 مللي مولار من كلوريد المغنسيوم) (شركة روش)[3]	2 ×	5	1 × (تاك 0.024 وحدة/ميكرولتر)
ديوكسي نوكليوتيدات	10 مللي مولار (لكل منها)	4	8 مللي مولار (لكل منها)
البادئة ITS1	10 ميكرو مولار	0.6	0.12 ميكرو مولار

[3] لا ينطوي استخدام المنتجات التي تحمل العلامة التجارية Roche في درء تفاعل البلمرة المتسلسل وإنزيم تاك يوليميريز الدنا في هذا البروتوكول التشخيصي على أي موافقة على هذه المنتجات بما يشكل استبعاداً للمنتجات الأخرى التي قد تكون مناسبة هي الأخرى. وتقدَّم هذه المعلومات للتيسير على مستعملي هذا البروتوكول ولا تعني موافقة من هيئة تدابير الصحة النباتية على المادة الكيميائية و/أو الكاشف و/أو المعدات المذكورة. ويجوز استخدام منتجات معادلة إذا تبيَّن أنها تفضي إلى نفس النتائج.

البادئة ITS4	10 ميكرو مولار	0.6	0.12 ميكرو مولار
إنزيم تاك بوليميريز الدنا (شركة روش)[3]	5 وحدة/ميكرولتر	0.3	0.03 وحدة/ميكرولتر
المجموع الفرعي	-	48	-
الدنا	-	2	-
المجموع	-	50	-

وتبلغ بارامترات تدوير تفاعل البلمرة المتسلسل 94 درجة مئوية لمدة 30 ثانية؛ و40 دورة في درجة حرارة 94 مئوية لمدة 15 ثانية، و55 درجة مئوية لمدة 60 ثانية، و72 درجة مئوية لمدة 30 ثانية؛ و72 درجة مئوية لمدة 5 دقائق. ويبلغ حجم الأمبليكون 550 زوجاً قاعدياً (Baayen *et al.*, 2002).

تتابع الأمبليكونات

المزيج المضخَّم (5 ميكرولتر من المزيج) يوضع على هلام الأغاروس بتركيز 1.5 في المائة للتحقق من تفاعلات الاختبار الإيجابية. وتنقى الكمية المتبقية التي تبلغ 45 ميكرولتر من تفاعلات الاختبار الإيجابية باستخدام مجموعة لوازم تنقية تفاعل البلمرة المتسلسل المناسبة وفقاً لتعليمات الشركة المصنِّعة. ويتم إجراء التتابع مع البادئة الأمامية ITS1 والبادئة العكسية ITS4.

4-2-3-3 معلومات إجرائية أساسية

التضخيم والتحليل

ينبغي إذابة الدنا المستخلص عند اللزوم. وينبغي إعداد ما يكفي من مزيج التفاعل لاختبار ما لا يقل عن عينة واحدة من المستفردة المجهولة، وعنصر ضبط إيجابي يحتوي على دنا قابلة للتضخيم وعنصر ضبط سلبي محمَّل مع الماء بدلاً من الدنا. وتذاب العينات في هلام الأغاروس بتركيز 1.5 في المائة. وتقارن التتابعات التوافقية لعينات الاختبار (مع استبعاد تتابعات البادئة) مع سلالة مؤكدة للمحتم السابق لفطر *P. citricarpa*، CBS 127454 (رقم الانضمام إلى قاعدة بيانات بنك الجينات GenBank accession number JF343583) في المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). وينبغي أن يتراوح مستوى التأكد من الهوية بين 99 في المائة و100 في المائة.

5- السجلات

ينبغي الاحتفاظ بالسجلات والأدلة المبيَّنة بالتفصيل في القسم 2–5 من المعيار الدولي 27: 2006 .

وفي الحالات التي قد تتأثر فيها أطراف متعاقدة أخرى تأثراً سلبياً بنتائج التشخيص، ينبغي الاحتفاظ بسجلات وأدلة النتائج (لا سيما المستنبتات، والشرائح، وصور مستنبتات الفطريات، وصور الأعراض والعلامات، وصور خلاصات الدنا، وهلام الفصل) لمدة لا تقل عن سنة.

6- جهات الاتصال للحصول على المزيد من المعلومات

يمكن الحصول على المزيد من المعلومات عن فطر *P. citricarpa* وأساليب اكتشافه وتحديد هويته من الجهات التالية (حسب ترتيبها الأبجدي):

ARC-Plant Protection Research Institute, Biosystematics Division: Mycology, Private Bag x134, Queenswood 0121, South Africa (Dr Mariette Truter; tel.: +27 12 8088281; fax: +27 12 8088297; e-mail: truterm@arc.agric.za).

Plant Research International, PO Box 26, 6700 AA Wageningen, The Netherlands (Dr Peter J.M. Bonants; tel.: +31 31 7480648; fax +31 31 7418094; e-mail: peter.bonants@wur.nl).

Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz-ESALQ/USP, Piracicaba, São Paulo, Brazil (Dr Marcel B. Spósito; tel.: +55 19 34294190 ext. 4190; fax +55 19 34294414; e-mail: mbsposito@usp.br).

University of Florida, Citrus Research and Education Center (CREC), 700 Experiment Station Rd, Lake Alfred, FL 33850, USA (Dr Lavern W. Timmer; tel.: +1 863 9561151; fax: +1 863 9564631; e-mail: lwtimmer@ufl.edu).

University of Florida, Citrus Research and Education Center (CREC), 700 Experiment Station Rd, Lake Alfred, FL 33850, USA (Dr Lavern W. Timmer; tel.: +1 863 9561151; fax: +1 863 9564631; e-mail: lwtimmer@ufl.edu).

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

7.– شكر وتقدير

أعد المشروع الأصلي لهذا البروتوكول كل من:

Dr Irene Vloutoglou, Benaki Phytopathological Institute, 8, St Delta St, GR-145 61 Kifissia, Athens, Greece (tel.: +30 210 8180231; fax: +30 210 8077506; e-mail: i.vloutoglou@bpi.gr).

Dr Johan Meffert, Plant Protection Service, 15, Geertjesweg, 6706 EA Wageningen, The Netherlands (tel.: +31 417 496837; fax +31 317 421701; e-mail: j.p.meffert@minlnv.nl).

Dr Luis E. Diaz, Ministry of Husbandry, Agriculture and Fisheries, General Directorate of Agricultural Services, Mycology Department, Av. Millán 4703, CP 12900, Montevideo, Uruguay (tel.: +598 2 3043992; fax: +598 2 3043992; e-mail: ldiaz@mgap.gub.uy).

8. المراجع

Aa, H.A. van der. 1973. Studies in *Phyllosticta* I. *Studies in Mycology*, 5: 1–110.

Agostini, J.P., Peres, N.A., Mackenzie, S.J., Adaskaveg, J.E. & Timmer, L.W. 2006. Effect of fungicides and storage conditions on postharvest development of citrus black spot and survival of *Guignardia citricarpa* in fruit tissues. *Plant Disease*, 90: 1419–1424.

Aguilar-Vildoso, C., Baldini, J., Feichtenberger, E., de Goes, A. & Spósito, M. 2002. *Manual técnico de procedimentos da mancha preta dos Citros*. Brasilia, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimiento, Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal. Projeto CE-MERCOSUL ALA 93/143. 59 pp.

Baayen, R.P., Bonants, P.J.M., Verkley, G., Carroll, G.C., van der Aa, H.A., de Weerdt, M., van Brouwershaven, I.R., Schutte, G.C., Maccheroni Jr, W., Glienke de Blanco, C. & Azevedo, J.L. 2002. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). *Phytopathology*, 92: 464–477.

Baldassari, R.B., Reis, R.F. & de Goes, A. 2006. Susceptibility of fruits of the 'Valência' and 'Natal' sweet orange varieties to *Guignardia citricarpa* and the influence of the coexistence of healthy and symptomatic fruits. *Fitopatologia Brasiliera*, 31: 337–341.

Benson, A.H. **1895. Some fruit pests: Black spot of the orange. *Agricultural Gazette of New South Wales*, 6: 249–251.**

Bonants, P.J.M., Carroll, G.C., de Weerdt, M., van Brouwershaven, I.R. & Baayen, R.P. 2003. Development and validation of a fast PCR-based detection method for pathogenic isolates of the Citrus Black Spot fungus, *Guignardia citricarpa*. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 503–513.

CABI. 2011. *Guignardia citricarpa. Crop Protection Compendium*, 2011 edn. Wallingford, UK, CAB International. Available at http://www.cabi.org/isc/?compid=5&dsid=26154&loadmodule=datasheet&page=481&site=144 (last accessed 2014-08-19)

CABI/EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 1998. *Guignardia citricarpa*. *Distribution maps of quarantine pests for Europe*, no. 204. Wallingford, UK, CAB International.

De Holanda Nozaki, M. 2007. Produção de estruturas reprodutivas e efeito do ambiente nos tipos de sintomas produzidos por *Guignardia citricarpa* EM *Citrus* spp. PhD Thesis, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Brazil. 85 pp.

EPPO/CABI. 1997. *Guignardia citricarpa. In* I.M. Smith, D.G. McNamara, P.R. Scott & M. Holderness, eds. *Quarantine pests for Europe*, 2nd edn, pp. 773–781. Wallingford, UK, CAB International. 1440 pp.

FUNDECITRUS. 2005. Manual de Pinta Preta. Brazil, Araraquara: Fundo Paulista de Defesa da Citricultura. 10 pp. (Boletim Tecnico).

Gams, W., Hoekstra, E.S. & Aptroot, A. 1998. *CBS course of mycology*, 4th edn. Baarn/Delft, The Netherlands, Centraal Bureau voor Schimmelcultures. 165 pp.

Gent-Pelzer, M.P.E. van, van Brouwershaven, I.R., Kox, L.F.F. & Bonants, P.J.M. 2007. A TaqMan PCR method for routine diagnosis of the quarantine fungus *Guignardia citricarpa* on citrus fruit. *Journal of Phytopathology*, 155: 357–363.

Glienke, C., Pereira, O.L., Stringari, D., Fabris, J., Kava-Cordeiro, V., Galli-Terasawa, L., Cunnington, J., Shivas, R.G., Groenewald, J.Z. & Crous, P.W. 2011. Endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species, with reference to those associated with Citrus Black Spot. *Persoonia*, 26: 47–56.

Goes, A. de, Baldassari, R.B., Feichtenberger, E., Aguilar-Vildoso, C.I. & Spósito, M.B. 2000. Cracked spot, a new symptom of citrus black spot in Brazil. *In Abstracts of the 9th Congress of the International Society of Citriculture*, p. 145. Orlando, FL, USA, University of Florida.

Goes, A. de. 2001. Mancha preta dos Citros: Situação atual e perspectivas futuras. *Ciência e Prática, Bebedouro, 20 December 2001*, pp. 5–7.

Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C. & Pegler, D.N. 1995. *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi*, 8th edn. Wallingford, UK, CAB International. 650 pp.

Hughes, K.J.D., Inman, A.J. & Cooke, D.E.L. 2000. Comparative testing of nested PCR-based methods with bait-plant tests for detecting *Phytophthora fragariae* var. *fragariae* in infected strawberry roots from fruit crops in the UK. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 30: 533–538.

Kiely, T.B. 1949a. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* n. sp., the ascigerous stage of *Phoma citricarpa* McAlp., and its relation to black spot of citrus. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales*, 73: 249–292.

Kiely, T.B. 1949b. Black spot of citrus. *The Agricultural Gazette of New South Wales*, 60: 17–20.

Kiely, T.B. 1960. Speckled blotch of citrus. *The Agricultural Gazette of New South Wales*, 71: 474–476.

Klimyuk, V.I., Carroll, B.J., Thomas, C.M. & Jones, J.D. 1993. Alkali treatment for rapid preparation of plant material for reliable PCR analysis: technical advance. *Plant Journal*, 3: 493–494.

Kotzé, J.M. 1981. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. *Plant Disease*, 65: 945–950.

Kotzé, J.M. 1996. History and epidemiology of citrus black spot in South Africa. *In* International Society of Citriculture. *Proceedings of the 8th International Citrus Congress* (Sun City, South Africa, 1966), pp. 1296–1299. Orlando, FL, USA, ISC.

Kotzé, J.M. 2000. Black spot. *In* L.W. Timmer, S.M. Garnsey & J.H. Graham, eds. *Compendium of Citrus Diseases*, 2nd edn, pp. 23–25. Saint Paul, MN, USA, APS Press. 128 pp.

Lee, Y.S. & Huang, C.S. 1973. Effect of climatic factors on the development and discharge of ascospores of the citrus black spot fungus. *Journal of Taiwan Agricultural Research*, 22: 135–144.

Meyer, L., Sanders, G.M., Jacobs, R. & Korsten, L. 2006. A one-day sensitive method to detect and distinguish between the citrus black spot pathogen *Guignardia citricarpa* and the endophyte *Guignardia mangiferae*. *Plant Disease*, 90: 97–101.

Meyer, L., Jacobs, R., Kotzé, J.M., Truter, M. & Korsten, L. 2012. Detection and molecular identification protocols for *Phyllosticta citricarpa* from citrus matter. *South African Journal of Science*, 108.

NAPPO (North American Plant Protection Organization). 2010. Phytosanitary Alert System: Confirmation of citrus black spot (*Guignardia citricarpa*) in Florida, United States. NAPPO. Available at http://www.pestalert.org/oprDetail.cfm?oprID=421 (last accessed on 2011-09-26).

OEPP/EPPO. 2003. Diagnostic protocols for regulated pests: *Guignardia citricarpa*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 33: 271–280.

Peres, N.A., Harakava, R., Caroll, G.C., Adaskaveg, J.E. & Timmer, L.W. 2007. Comparison of molecular procedures for detection and identification of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae*. *Plant Disease*, 91: 525–531.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schubert, T.S., Dewdney, M.M., Peres, N.A., Palm, M.E., Jeyaprakash, A., Sutton, B., Mondal, S.N., Wang, N.-Y., Rascoe, J. & Picton, D.D. 2012. First report of *Guignardia citricarpa* associated with citrus black spot on sweet orange (*Citrus sinensis*) in North America. *Plant Disease*, 96: 1225.

Snowdon, A.L. 1990. Black spot. *In* A.L. Snowdon, ed. *A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables, Vol. I. General Introduction and fruits*, pp. 62–63. London, UK, Wolfe Scientific Ltd. 302 pp.

Spósito, M.B. 2003.Dinâmica temporal e especial da mancha preta (*Guignardia citricarpa*) e quantifição dos danos causados à cultura dos citros. PhD Thesis, Universidade de São Paulo, Brazil. 112 pp.

Spósito, M.B., Amorim, L., Bassanezi, R.B., Bergamin Filho, A. & Hau, B. 2008. Spatial pattern of black spot incidence within citrus trees related to disease severity and pathogen dispersal. *Plant Pathology*, 57: 103–108.

Spósito, M.B., Amorim, L., Bassanezi, R.B., Yamamoto, P.T., Felippe, M.R. & Czermainski, A.B.C. 2011. Relative importance of inoculum sources of *Guignardia citricarpa* on the citrus black spot epidemic in Brazil. *Crop Protection*, 30: 1546–1552.

Stringari, D., Glienke, C., Christo, D., Maccheroni Jr, W. & Azevedo, J.L. 2009. High molecular diversity of the fungus *Guignardia citricarpa* and *Guignardia mangiferae* and new primers for the diagnosis of the citrus black spot. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52: 1063–1073.

Sutton, B.C. & Waterston, J.M. 1966. *Guignardia citricarpa.* CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria No. 85. Wallingford, UK, CAB International.

Timmer, L.W. 2004. Evaluating the risks of introduction of citrus black spot into the U.S. *In 2004 Annual Report*, pp. 36–38. Visalia, CA, USA, California Citrus Research Board.

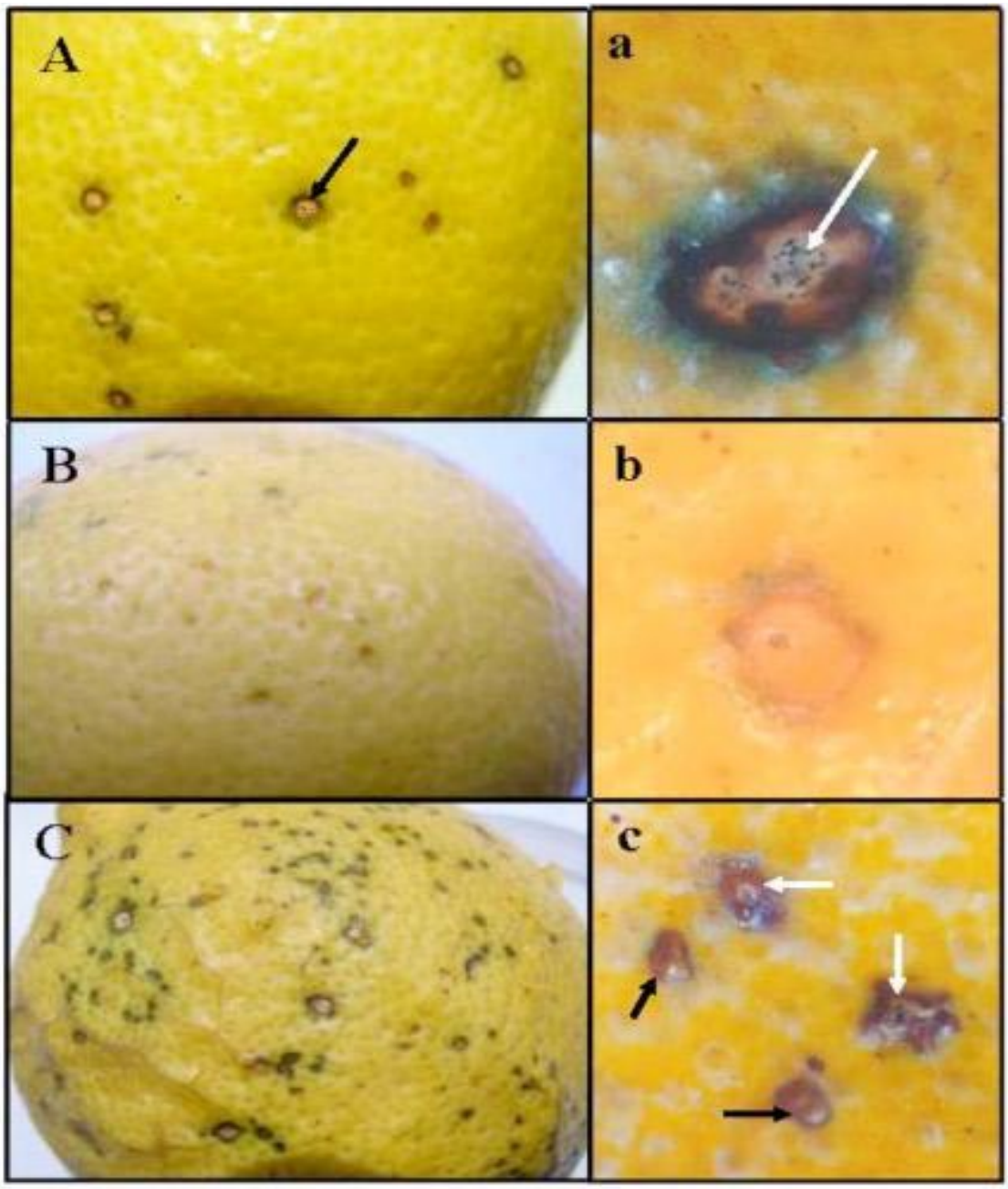
Truter, M., Labuschagne, P.M., Kotzé, J.M., Meyer, L. & Korsten, L. 2007. Failure of *Phyllosticta citricarpa* pycnidiospores to infect Eureka lemon leaf litter. *Australasian Plant Pathology*, 36: 87–93.

Wang, X., Chen, G., Huang, F., Zhang, J., Hyde, K.D. & Li, H. 2012. *Phyllosticta* species associated with citrus diseases in China. *Fungal Diversity*, 52: 209–224.

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

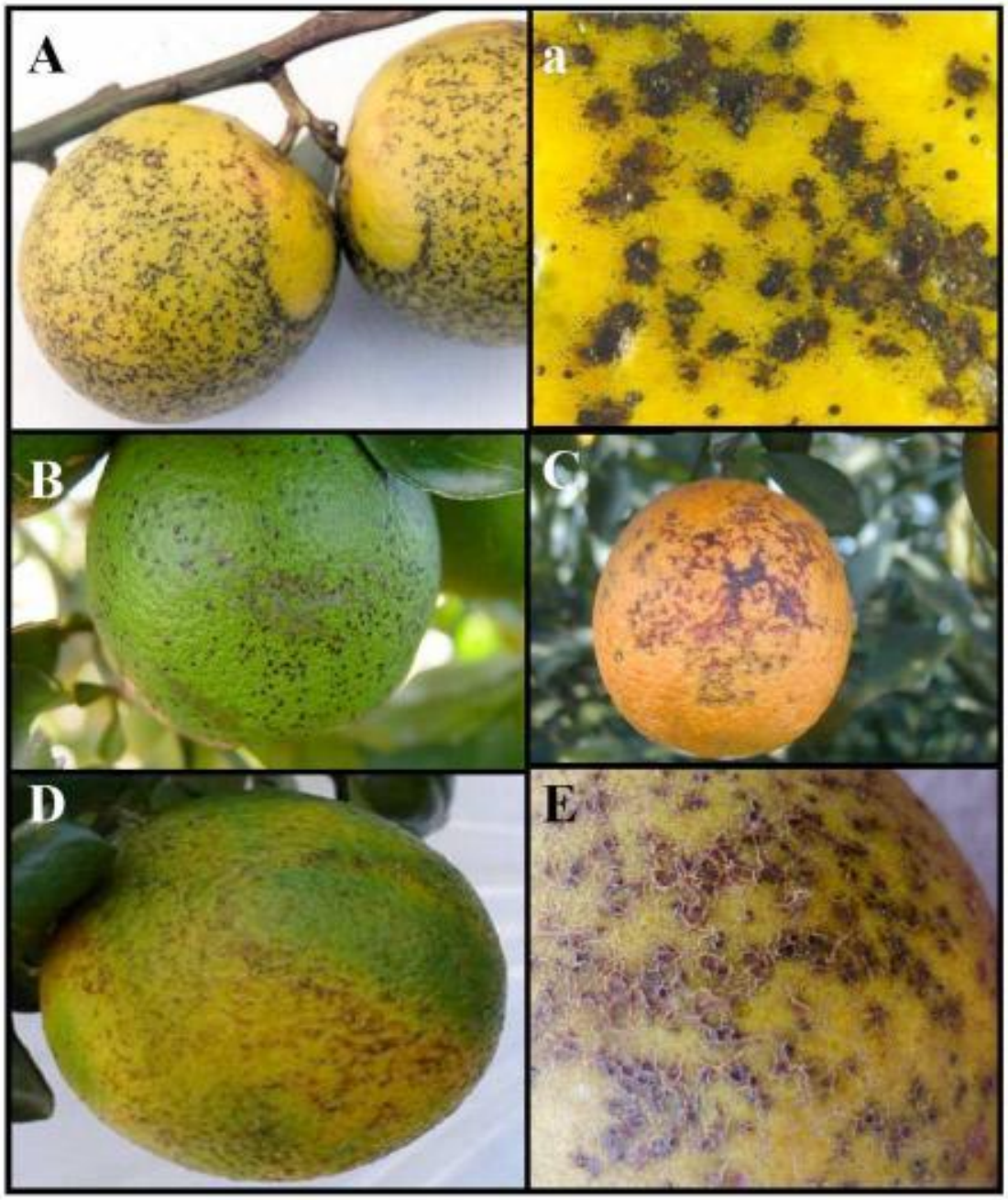
Wulandari, N.F., To-anun, C., Hyde, K.D., Duong, L.M., de Gruyter, J., Meffert, J.P., Groenewald, J.Z. & Crous, P.W. 2009. *Phyllosticta citriasiana* sp. nov., the cause of Citrus tan spot of *Citrus maxima* in Asia. *Fungal Diversity*, 34: 23–39. Available at http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD34-2.pdf (last accessed 2018-08-19)

9- الأشكال



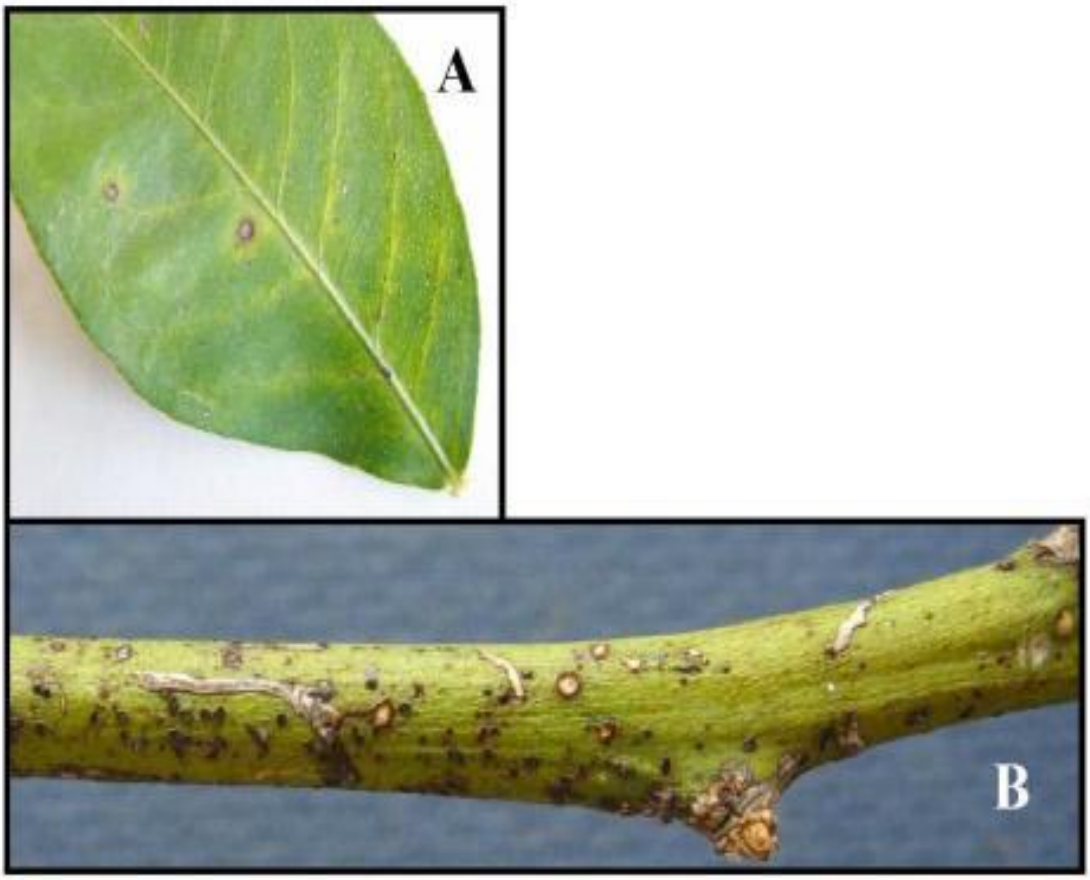
الشكل 1. أعراض البقع الصلبة والبقع النمشية التي يسببها فطر *Phyllosticta citricarpa* على البرتقال الحلو (*Citrus sinensis*) والليمون الحمضي (*Citrus limon*): (ألف، أ) إصابات البقع الصلبة على البرتقال الحلو حيث توجد إصابات أكبر محتوية على دوارق الطور الناقص لفطر *Phyllosticta citricarpa* (الأسهم)؛ (باء) إصابات ببقع نمشية على الليمون؛ (ب) إصابات ببقع نمشية على البرتقال الحلو (الإصابات غائرة قليلاً في المنتصف وخالية من الدوارق)؛ (جيم) إصابات ببقع صلبة ونمشية على الليمون؛ (ج) إصابات ببقع نمشية (الأسهم السوداء) والمرحلة الوسيطة بين الإصابة بالبقع النمشية والبقع الصلبة المحتوية على دوارق (الأسهم البيضاء) على الليمون الحلو.

الصور من إهداء من E. Feichtenberger معهد البيولوجيا، سوروكابا، البرازيل.



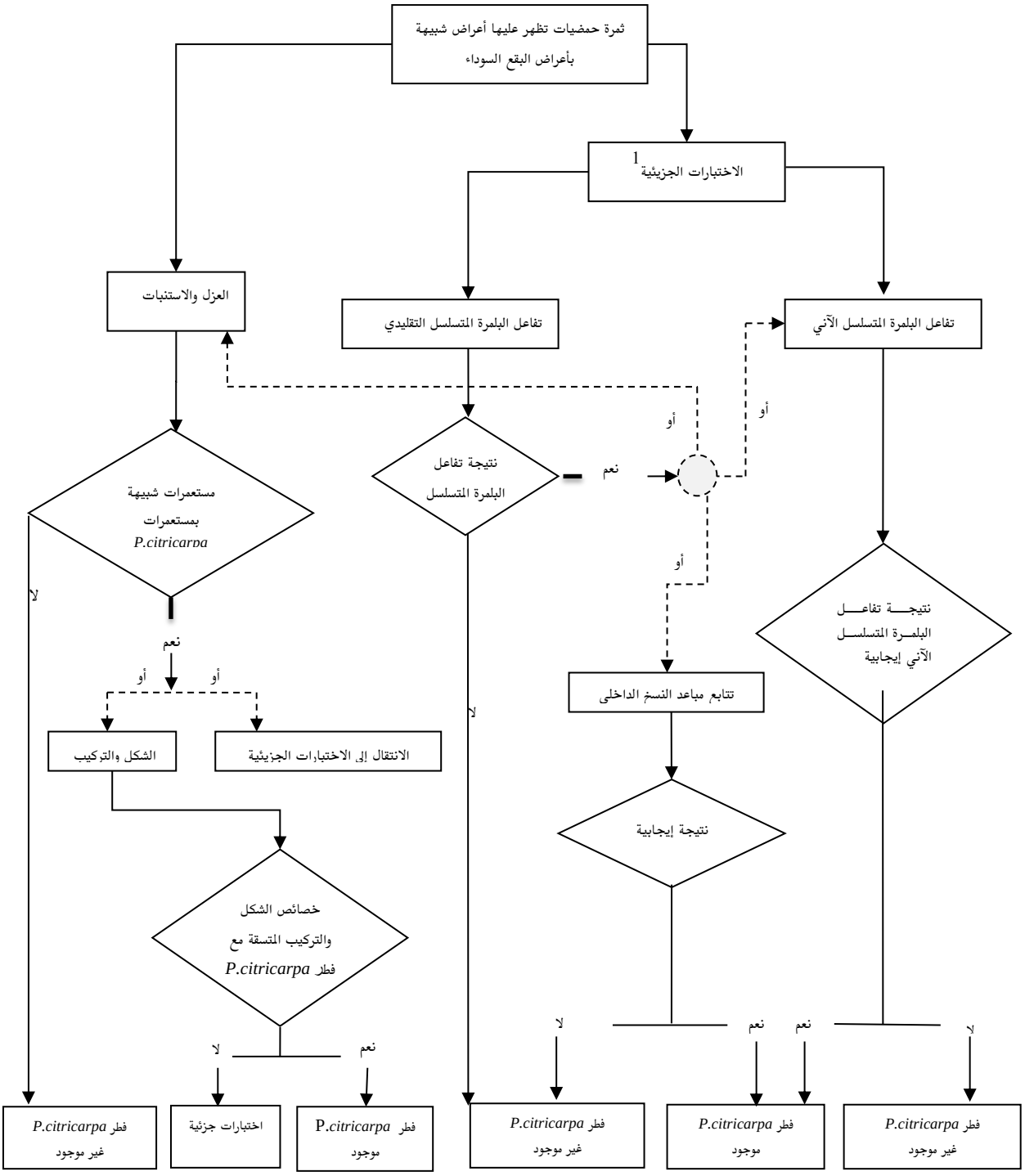
الشكل 2. لاسوداد الكاذب، والبقع الخبيثة، والبقع الشريطية، والبقع المتصدِّعة التي يسببها فطر *Phyllosticta citricarpa* على ثمار البرتقال الحلو (*Citrus sinensis*) والليمون (*Citrus limon*): (ألف) إصابات بالاسوداد الكاذب على ثمرة برتقال حلو ناضجة؛ (أ) إصابات باسوداد كاذب تحيط بها لطخات داكنة على ثمرة برتقال حلو ناضجة؛ (باء) إصابات باسوداد كاذب على ثمرة برتقال حلو خضراء؛ (جيم) إصابات ببقع خبيثة على برتقال حلو (الإصابات غائرة وتمتد إلى مسافة عميقة في الألبيدو)؛ (دال) أعراض بقع شريطية على ثمرة برتقال حلو خضراء؛ (هاء) إصابات ببقع متشققة على البرتقال الحلو (الإصابات ناتئة قليلاً، ومتشققة ومحتوية على هوامش غير منتظمة وخالية من الدوارق).

الصور من إهداء صندوق وقاية نباتات الحمضيات (FUNDECITRUS) (ألف، باء، جيم، دال، هاء) وE. Feichtenberger ، معهد البيولوجيا، سوراكابا، البرازيل (أ).



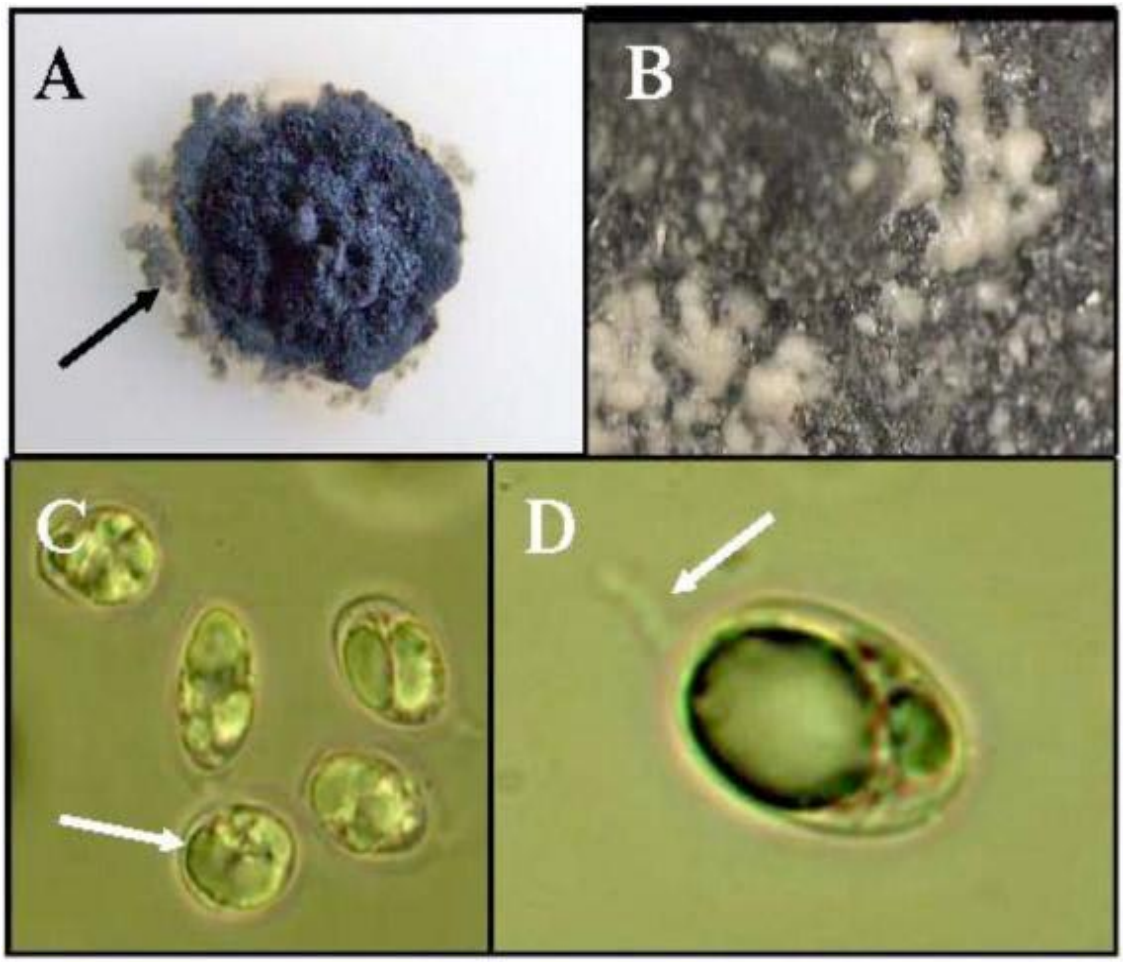
الشكل 3. أعراض البقعة السوداء على الحمضيات الناتجة عن فطر *Phyllosticta citricarpa* على أوراق الليمون الحمضي (*Citrus limon*) (ألف) وأغصانه (باء)

الصور من إهداء *E. Feichtenberger*، معهد البيولوجيا، سوروكابا، البرازيل (ألف)، و*M. Truter*، معهد بحوث وقاية النباتات، مجلس البحوث الزراعية، بريتوريا، جنوب أفريقيا، (باء).



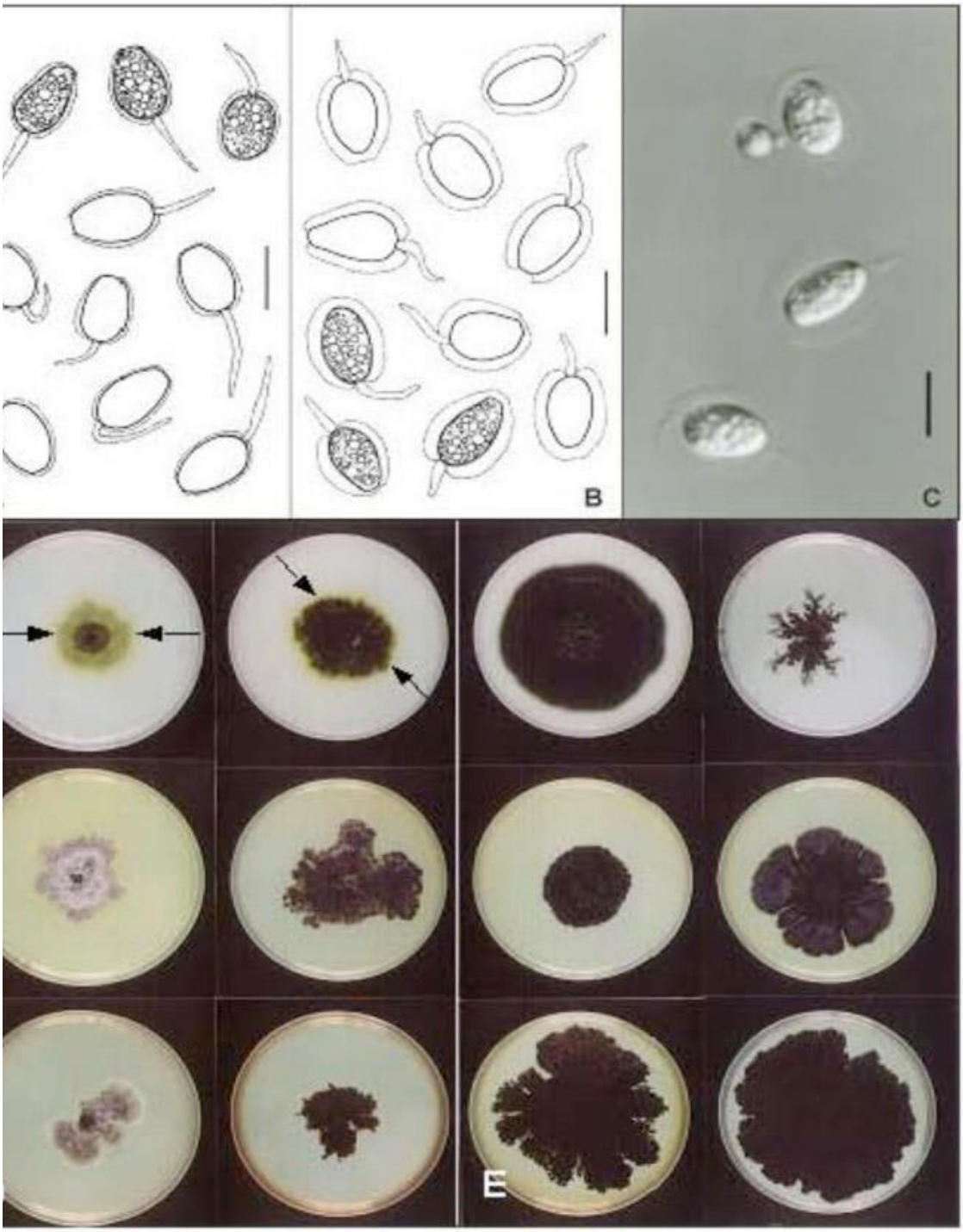
الشكل 4: رسم تخطيطي لتحديد فطر *Phyllosticta citricarpa* على ثمرة الحمضيات

[1] تم التحقق من الفحوص الجزيئية المستخدمة في تحديد هوية الكائن على المستنبتات النقية والإصابات الموجودة في الثمرة وليس على أي مادة نباتية أخرى (مثل الأوراق أو الأغصان). مباعد النسخ الداخلي؛ وتفاعل البلمرة المتسلسل.



الشكل 5. خصائص المستعمرات وشكل وتركيب الدوارق في فطر *Phyllosticta citricarpa*: (ألف) مستعمرة تحتوي على هوامش غير منتظمة تحيط بها منطقة شفافة من أفطور غائر عديم اللون (السهم) بعد 30 يوماً من نموها على أغار ديكستروز البطاطس (الأسّ الهيدروجيني 5.5) في درجة حرارة 25 مئوية ومدة تصوير 12 ساعة؛ (باء) تسرب المادة اللزجة البوغية من دوارق ناضجة؛ (جيم، دال) أبواغ تحتوي على غمد مخاطي رقيق (جيم، السهم) وزائدة مخززية الشكل وعديمة اللون (دال، السهم، وكُبِّرت الصورة 1000 مرة باستخدام زيت الغمر).

الصور من إهداء *L.E. Diaz*، وزارة تربية الحيوانات والزراعة ومصايد الأسماك، مونتيفيديو، أوروغواي.



الشكل 6. شكل وتركيب الأبواغ وخصائصها الاستنباتية في فطر *Phyllosticta citricarpa* و *Phyllosticta capitalensis*: (ألف) أبواغ فطر *P. citricarpa* مزوَّدة بغمد مخاطي رقيق (أقل من 1.5 ميكرون)؛ (باء، جيم) أبواغ فطر *P. capitalensis* مزوَّدة بغمد مخاطي سميك (أكثر من 1.5 ميكرون) (مقياس الرسم = 10 ميكرون) (أُخذت الصورة جيم تحت مجهر ضوئي مزوَّد بتباين لفروق التداخل)؛ (دال، هاء) مستعمرات من فطر *P. citricarpa* (دال) وفطر *P. capitalensis* (هاء) بعد 7 أيام من النمو على أغار دقيق الشوفان (السهم العلوي)، وأغار خلاصة الشعير (السهم الأوسط) وأغار الكرز المستخلص بالغلي (السهم السفلي) (يلاحظ ظهور صبغ أصفر حول مستعمرة فطر *P. citricarpa*

المتكونة على أغار دقيق الشوفان (دال، الأسهم) وعدم وجود هذا الصبغ في مستنبتات فطر *P. capitalensis* المتكونة على نفس الوسط (هاء)).

الصور من إهداء G. Verkley، الهيئة المركزية لمستنبتات الفطريات، أوتريخت، هولندا (ألف، وباء، وجيم) و W. van Lienden، دائرة وقاية النباتات، فاغيننغن، هولندا (دال، هاء)

تاريخ النشر

هذا الجزء ليس جزءا رسميا من المعايير

2006–03 أضافت هيئة تدابير الصحة النباتية موضوع برنامج العمل: الفطريات والكائنات الحية المماثلة للفطريات06-2006

2004–11 أضافت اللجنة التوجيهيـــة موضـــوع *Guignardia citricarpa* (2014-23)

2011–11 وافقت اللجنة التوجيهية على تشاور الأعضاء عبر القرارات الالكترونية (2011_eSC_Nov_06)

2012–07 مشورة الأعضاء

2013–03 تغير العنوان إلى *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa على الثمرة (23–2004)

2013–07 استعراض الفريق الفني المعني ببروتوكولات التشخيص وتقديمه إلى اللجنة التوجيهية للموافقة والاعتماد (2013_eTPDP_Jun_01)

2013–10 موافقة اللجنة التوجيهية على فترة الإخطار 45 يوما عبر القرارات الإلكترونية (2013_eSC_Nov_13)

2014–12/10 فترة إخطار بروتوكولات التشخيص – تلقي اعتراض رسمي

2014–03/02 مراجعة الفريق الفني المعني ببروتوكولات التشخيص في اجتماع على شبكة الإنترنت

2014 موافقة اللجنة التوجيهية على فترة الإخطار 45 يوما عبر القرارات الإلكترونية (2014_eSC_Nov_01)

2014–08/07 فترة إخطار بروتوكولات التشخيص

2014–08 اعتماد اللجنة التوجيهية لبروتوكولات التشخيص نيابة عن هيئة تدابير الصحة النباتية

المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية رقم 27–2006: **المرفق** 5: *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa على الثمرة (2014). روما، الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات – منظمة الأغذية والزراعة

آخر تحديث لتاريخ النشر: 29–08–2014