اعتمد بروتوكول التشخيص هذا من قبل لجنة المعايير نيابة عن هيئة تدابير صحة النباتات

في أغسطس/آب 2014

هذا المحلق هو جزء واجب الاتباع من المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية 27:2006

المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية 27

الملحق 6

المعايير الدولية لتدابير الصحة النباتية

بروتوكولات التشخيص للمعيار الدولي 27

بروتوكول التشخيص 6:

جرثومة تقرح الحمضيات Xanthomonas citri subsp. citri

(2014)

بيان بالمحتويات

1– معلومات عن الجرثومة 2

2– المعلومات التصنيفية 3

3– كيفية الكشف عن الجرثومة 4

3–1 الكشف عن الجرثومة في النباتات التي تحمل أعراضها 4

3–1–1 الأعراض 4

3–1–2 عزل الجرثومة 5

3–1–3 الكشف المصلي: الفلورة المناعية غير المباشرة 6

3–1–4 الكشف الجزيئي 8

3–1–4–1 الشواهد الخاصة بالاختبار الجزيئي 8

3–1–4–2 استخراج الحمض النووي من الأنسجة المصابة للحمضيات 9

3–1–4–3 تفاعل البوليميراز المتسلسل التقليدي 9

3–1–4–4 تفاعل البوليميراز المتسلسل الآني 11

3–1–5 تفسير نتائج كلّ من تفاعل البوليميراز المتسلسل التقليدي والآني 12
3–1–6 الكشف بواسطة المقايسات البيولوجية 13
3–1–6–1 اختبار التطعيم في الأوراق المقصوصة على شكل أقراص 13
3–1–6–2 تخصيب الأوراق المنفصلة 14
3–2 كشف الجرثومة في النباتات عديمة الأعراض 14
4– تحديد الجرثومة 15
4–1 الطرق القائمة على تفاعل البوليميراز المتسلسل 16
4–2 الكشف المصلي 18
4–2–1 DAS-ELISA 18
4–2–2 اختبار "إليزا" غير المباشر 19
4–3 اختبار القدرة الإمراضية 19
4–4 الوصف والخصائص الكيميائية الحيوية 20
4–5 التحديد الجزيئي 21
4–5–1 تحليل السلاسل متعددة المواقع 21
4–5–2 أخذ البصمات بطريقة Rep-PCR 22
5– السجلات 23
6– نقاط الاتصال للحصول على معلومات إضافية 23
7– شكر وتقدير 23
8– المراجع 24
9– الأشكال 28

1– معلومات عن الجرثومة

إن جرثومة *Xanthomonas citri subsp. citri* هي العامل الرئيسي المسبّب للقرحة البكتيرية في الحمضيات. وهي تلحق الضرر بالكثير من الأنواع المزروعة للفصيلة السذابية (منظمة وقاية النباتات في أوروبا والبحر المتوسط، 1979) – في المقام الأول الحمضيات وبرتقال الكمكوات (*Fortunella*) والبرتقال ثلاثي الأوراق (*Poncirus*)، – التي تنمو في الظروف المناخية الاستوائية وشبه الاستوائية السائدة في العديد من بلدان آسيا وأمريكا الجنوبية وأوسيانيا وأفريقيا، وكذلك في ولاية فلوريدا بالولايات المتحدة الأمريكية (المركز الدولي للزراعة والعلوم البيولوجية، 2006؛ منظمة وقاية النباتات في أوروبا والبحر المتوسط، 2006).وقد تم تحديد سلالتين شاذتين لجرثومة *Xanthomonas citri subsp. Citri* لهما مجموعة محدودة من العوائل وتعرفان باسم السلالة A* والسلالة A^w (Sun وآخرون، 2004؛ Vernière وآخرون، 1998). وتضرّ السلالة A* بالليمون المكسيكي (*Citrus aurantiifolia*) ضمن الظروف الطبيعية السائدة في آسيا. فيما تتسبب السلالة A^w بتقرحات

في كل من الليمون المكسيكي (*Citrus aurantiifolia*) وليمون "أليماو" الكبير الأوراق (*Citrus macrophylla*) في فلوريدا بالولايات المتحدة الأمريكية، وذلك ضمن الظروف الطبيعية (Cubero وGraham، 2002، 2004). ومن المعلوم أنّ كلا من هاتين السلالتين يسبب كلوما غير مألوفة في أنواع الحمضيات الأخرى في سياق التجارب (Escalon وآخرون، 2013).

يطرأ التقرّح البكتيري في الحمضيات عادةً على الشتول والأشجار اليافعة والناضجة لأنواع العوائل التي لديها استعداد للإصابة بالجرثومة حيث تحصل فورة لبراعم وأوراق تنمو بصورة نشطة ما بين أواخر الصيف وحتى الخريف، وذلك في معظم مناطق زراعة الحمضيات. أما الكلوم الناجمة عن الهواء والأشواك والحشرات والأضرار المادية أو الميكانيكية، فتيسّر إصابة الأنسجة الناضجة بالجرثومة. ويمكن لغزو جرثومة *Phyllocnistis citrella* المعروفة بنقّابة أوراق الحمضيات، أن تزيد من تعرّض أوراق النبتة للإصابة بالتقرح البكتيري للحمضيات (Hall وآخرون، 2012).

يمكن لجرثومة *X. citri subsp. citri* البقاء حيةً في الأنسجة المريضة للنبتة، كنبات عالق على كل من النباتات العوائل وغير العوائل، وأيضا كأعفين على نشارة القش أو في التربة. غير أن الكلوم الحاصلة خلال البيات الشتوي، لا سيما تلك التي تتكون على البراعم المضلّعة، تشكّل أهم مصادر للقاح من أجل الموسم التالي. وتعتمد الآليات الرئيسية لانتشار الجرثومة ضمن المسافات القصيرة على حركة الرياح وترشش الماء ضمن النبتة نفسها وفيما بين النبتات: فتنتشر البكتيريا بواسطة مياه الأمطار التي تنساب على سطح الكلوم ومن ثم تترشّش على البراعم السليمة (المركز الدولي للزراعة والعلوم البيولوجية، 2006). ولحركة المواد النباتية المصابة، بما في ذلك البراعم الخشبية والجذور والشتول والأشجار المبرعمة، دور في انتشار الجرثومة على مسافات بعيدة. وليس هناك أي دليل على أن هذا المُمرض ينتقل بواسطة البذور (المركز الدولي للزراعة والعلوم البيولوجية، 2006).

2- المعلومات التصنيفية

الاسم: *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Gabriel وآخرون، 1989) Schaad وآخرون، 2007

المرادفات: *Xanthomonas smithii* subsp. *citri* (Gabriel وآخرون، 1989) Schaad وآخرون، 2007

Xanthomonas axonopodis pv. citri (Hasse) Vauterin وآخرون، 1995

Xanthomonas citri (Hasse سابقا، 1915) Gabriel وآخرون، 1989

Xanthomonas campestris pv. aurantifolii، Gabriel وآخرون، 1989

Xanthomonas campestris pv. citri، (Hasse) Dye، 1978

Xanthomonas citri f.sp. aurantifoliae، Nameketa وOliveira، 1972

Pseudomonas citri، Hasse، 1915

الوضع التصنيفي: بكتيريا، متقلبات، متقلبات غاما، ممرضات الحمضيات، مستصفريات

الأسماء الشائعة: قرحة الحمضيات، التقرح البكتيري للحمضيات، التقرح الآسيوي

ملاحظة: في الفترة الأخيرة جرى تغيير تصنيف الجرثومة من *X. axonopodis pv. citri* إلى *X. citri subsp. citri* (سلالات المجموعة "ألف") واستعيدت التسمية التي أطلقها Gabriel وآخرون وأصبح الاسم المتعارف عليه لمرض التقرح البكتيري في الحمضيات الآن *X. citri subsp. citri* (Bull وآخرون، 2010؛ Schaad وآخرون، 2006). أما مجموعات السلالات الآخرى لجرثومة *X. campestris pv. citri* فقد أعيد تصنيفها لتصبح الآن تحت فئة *Xanthomonas fuscans subsp. aurantifolii* (المجموعات باء وجيم ودال) وفئة *Xanthomonas alfalfae subsp. citrumelonis* (المجموعة هاء) (Schaad وآخرون، 2006).

3– كيفية الكشف عن الجرثومة

3–1 الكشف عن الجرثومة في النباتات التي تحمل أعراضها

يمكن تشخيص تقرّح الحمضيات من خلال مراقبة الخصائص المورفولوجية للمستعمرات في المستنبتات المغذية وعن طريق الاختبار المصلي (بواسطة الفلورة المناعية) والاختبار الجزيئي (بواسطة تفاعل البوليميراز المتسلسل) والمقايسة البيولوجية لأوراق النبتة المقصوصة على شكل أقراص أو أوراقها المنفصلة. وينبغي تضمين الاختبارات كجرثومة شواهد إيجابية وسلبية (أنظر القسم 4 للاطلاع على الشواهد المرجعية).

3–1–1 الأعراض

يتسبّب هذا المرض عادة بالتبقّع وبكلوم شبيهة بالفجوات على قشرة الثمرة وعلى أوراقها وسيقانها وبراعمها. وقد تظهر أعراض تقرّح الحمضيات على الشتول في أي موسم من المواسم وعلى الأشجار الفتية بدءا من أواخر الصيف وحتى الخريف، عندما تحصل فورة من البراعم المضلّعة النامية بأعداد كبيرة (المركز الدولي للزراعة والعلوم البيولوجية، 2006) (الأشكال 1 إلى 4). وتصبح الحالات المرضية متقطعة الحدوث مع بلوغ الأشجار مرحلة النضج الكامل لثمارها، إذ يُنتج عدد أقل من البراعم المضلّعة، كما أن أنسجة الأوراق الأقدم والثمار الناضجة تكون أكثر مقاومة للإصابة بتقرح الحمضيات في الظروف الطبيعية. وتعتمد شدّة المرض أيضا على مدى استعداد أصناف وأنواع العوائل من النباتات للإصابة بالجرثومة (Goto، 1992).

الأعراض على الثمار. تتشكّل كلوم شبيهة بالفجوات على سطح الثمرة وقد تكون مشتتة، كلا على حدة في أنحاء الثمرة، أو قد تنشأ كلوم متعددة معا وبوتيرة غير منتظمة. ويمكن ملاحظة تحلّب مواد راتنجية على الثمار اليانعة المصابة. غير أن الكلوم لا تتوسع أبدا إلى درجة اختراق القشرة الخارجية للثمرة.

الأعراض على الأغصان. في الظروف المناخية الجافة، تكون بقعة القرحة فلّينية أو اسفنجية القوام، وتكون منتفخة ومشققة السطح. أما في الظروف المناخية الرطبة، فتتسع الإصابة بسرعة ويبقى السطح غير مشقق وتصبح حدوده زيتية. وفي الأصناف

الأقل تعرضا للإصابة، قد تتشكل طبقة من الجسأة بين الأنسجة المريضة والسليمة. ويمكن التعرّف على ندبة التقرح عبر حك سطحها الخشن بواسطة سكين من أجل إزالة الطبقة الفلينية الخارجية لتنكشف كلوم يتراوح لونها بين البني الفاتح والداكن في الأنسجة السليمة للحاء الأخضر. وقد يختلف شكل المنطقة الفاسدة اللون، وقد يتراوح حجمها بين 5 و10ملم، بحسب مدى استعداد العائل للإصابة بالجرثومة.

الأعراض على الأوراق. تظهر أولا بقع صفراء زاهية على الجانب السفلي من الأوراق، ويلي ذلك بروز مفاجئ لكلوم سمراء على جهتي الورقة التي لا تلبث أن تصبح خشنة ومشققة وشبيهة بالفلين. وقد تكون القرحة محاطة بكفاف صفراء رطبة للغاية أو بهالة شاحبة.

وقد يصعب التمييز بين أعراض قرحة الحمضيات على الأغصان والأوراق والثمار، وبين التبقّع أو الأعراض الشبيهة بالبقع التي تصيب الأوراق جرّاء بكتيريا أو فطريات أخرى تضرّ بالحمضيات، أو جرّاء الاضطرابات الفسيولوجية. أمّا أنواع البكتيريا الأخرى التي قد تؤدي إلى أعراض شبيهة بتقرّح الحمضيات فهي *X. alfalfae subsp. Citrumelonis* و*X. fuscans subsp. aurantifolii*. ولكل من هاتين الجرثومتين نطاق محدود من عوائل الجرثومة وهما تتسببان بأعراض أقل عدوانية ونادرا ما تنتجان كلوما على الثمرة (Schaad وآخرون، 2005، 2006). ويعرف عن تبقّع الحمضيات الذي يسببه فطر *Elsinoë fawcettii* أنّ أعراضه شبيهة بأعراض تقرّح الحمضيات، ولا سيما على أنواع العوائل التي تتسم بمقاومتها لتبقع الحمضيات (Taylor وآخرون، 2002)، ولكنّ كلوم التبقع في هذه الحالة تكون بشكل عام أكثر جفافا وأقل انتظاما من كلوم تقرّح الحمضيات، وتنقصها أحيانا الهالة الصفراء الاعتيادية. ويمكن التفريق بين تبقع الحمضيات وبين تقرح الحمضيات بناء على انعدام الارتشاح البكتيري.

3-1-2 عزل الجرثومة

من الضروري الحصول على عيّنات مستخرجة حديثا للتمكن من عزل جرثومة *X. citri subsp. citri* من المواد النباتية التي تحمل أعراض الإصابة بها. وينبغي تحليل المادة النباتية بأسرع وقت ممكن بعد جمعها؛ ويمكن تخزينها على درجة حرارة تتراوح بين 4 و8 درجات مئوية إلى أن يتم استخدامها. وعندما تكون الأعراض متقدمة جدا أو حين لا تكون الظروف البيئية مؤاتية، يمكن لعدد خلايا *X. citri subsp. citri* القابلة للزرع أن يكون متدنيا جدا، وقد يؤدي العزل إلى اكتظاظ الأطباق المخبرية بأعداد مفرطة من البكتيريا المتنافسة التي تقتات بالعفن أو من البكتيريا المضادة. ويجب التنبه بشكل خاص لتجنب الالتباس بين مستعمرات *X. citri subsp. citri* وبين جرثومة *Pantoea agglomerans* التي تُعزل هي أيضا عادة من الكلوم الناتجة عن التقرحات، والتي تنتج مستعمرات مشابهة مورفولوجيا في المستنبتات البكتيرية الاعتيادية. وتكون *Pantoea agglomerans* عادة أسرع نموا ولون مستعمراتها أشد صفرة من اللون الأصفر/الليموني الباهت لمستعمرات *X. citri subsp. citri*.

يمكن عزل العامل السببي عبر مسح عينات من الكلوم على أطباق المستنبتات الملائمة والتي تتسم مستعمرات *X. citri subsp. citri* الموجودة عليها بمظهر نموذجي. ولا توجد حتى الآن مستنبتات انتقائية لـ*X. citri subsp. citri* حصرا.

تنحّل الكلوم عبر نقعها في محلول ملحي تتراوح كميته بين 0.5 و1.0مل (وهو عبارة عن مياه معقّمة مقطّرة مع كلوريد الصوديوم حتى 0.85 في المائة، على درجة حموضة 7.0)، وعند المقتضى يمكن تطهيرها مسبقا بواسطة 1 في المائة من هيبوكلوريت الصوديوم لمدة دقيقة واحدة وشطفها ثلاث مرات بواسطة الماء المعقم المقطّر، وسحقها. تُمسح عينة بكمية قاسمة تامّة من المستخلص على مستنبت التغذية. أما مستنبت العزل الذي يعتبر مناسبا عامة فيتكوّن من الأجار المغذّي المزود بالغلوكوز بنسبة 0.1 في المائة، ومزيج الخميرة والببتون والغلوكوز والأجار (مستخلص من الخميرة، 5غ؛ وبكتوببتون، 5غ؛ وغلوكوز، 10غ، وأجار 20غ، وماء مقطّر، لتر واحد، على درجة حموضة 7.0) ومستنبت واكيموتو: (مرق البطاطا 250مل؛ سكروز، 15غ؛ ببتون، 5غ؛ $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$، 0.8غ؛ $Ca(NO_3)_2 \cdot 7\ H_2O$، 0.5غ؛ بكتو^{TM}أجار، 20غ؛ ماء مقطّر، لتر واحد؛ على درجة حموضة 7.2). يمكن إضافة مادة السيكلوهيكسيميد المعقمة بواسطة الفلتر (100ملغ/لتر) عند الضرورة كمبيد للفطريات بعد تعقيم المستنبت بواسطة الغلي.

يكون المظهر الخارجي للمستنبتات الثلاثة مستديرا ومحدبا وأملس الأطراف، كما تكون المستعمرة مخاطية ولونها أَصفر فاتح. يتم تقييم النمو بعد الحضن على درجة حرارة تتراوح ما بين 25 و28 درجة مئوية لمدة ثلاثة إلى خمسة أيام. في عيّنات الثمار التجارية قد تكون البكتيريا مجهدة وقد لا يكون من السهل استزراعها؛ وبالتالي قد تدعو الحاجة إلى فترات أطول للحضن أو يمكن استخدام المقايسات البيولوجية من أجل استخراج البكتيريا من العيّنات، بحسب الوصف الوارد في القسم 3-1-6-2. ويؤدي إدراج مادتي كاسوغاميسين وسيفالكسين في المستنبت (مستنبت KC أو KCB شبه الانتقائي) إلى إثباط عدد من البكتيريا التي تقتات بالعفن كما ييسّر عزل المرض (Graham وآخرون، 1989، Pruvost وآخرون، 2005).

في بروتوكول التشخيص هذا، تم وصف الطرق (بما في ذلك الإشارة إلى الأسماء التجارية) بحسب ما هي منشورة حيث أنها تحدد المستوى الأصلي الذي تحقق بالنسبة للحساسية والخصوصية و/أو إمكانية الاستنساخ. ولا ينطوي استخدام أسماء المواد الكيميائية (مثل الأسماء التجارية) المصادقة عليها واستبعاد بعضها الآخر الذي قد يكون مناسبا أيضا. ويمكن مواءمة الإجراءات المخبرية الواردة في البروتوكولات للمعايير الخاصة بمختبرات فردية، شريطة أن تكون مجازة تماما.

3-1-3 الكشف المصلي: الفلورة المناعية غير المباشرة

يتطلب إجراء الكشف المصلي (بواسطة الفلورة المناعية والفحص المناعي المرتبط بالإنزيم (المشار إليه فيما يلي بتسمية "إليزا")، عددا من الشواهد الضرورية لضمان الوثوق بنتائج الاختبار. يجب تضمين كل اختبار شواهد إيجابية وسلبية. ويمكن أن تتألف الشواهد الإيجابية من سلالة مرجعية لجرثومة *X. citri subsp. citri* يعاد استعلاقها في عينة مستخرجة من النبتة العائل السليمة (من أجل الكشف عن الجرثومة في المادة النباتية) أو في محلول ملحي مدروء بالفوسفات (من أجل كشفها في الزرع الجرثومي). ويجب أن تتكون الشواهد السلبية من عينات مستخرجة من نبتة عائل سليمة (من أجل كشف الجرثومة في المادة النباتية) أو مستعلق من أصناف بكتيرية غير مستهدفة (من أجل تحديد الجرثومة في الزرع الجرثومي).

من أجل الكشف المصلي للخلايا البكتيرية، يتمّ جمع مقدار عروة مختبر من زرع حديث من الطبق، ويعاد استعلاقه في 1مل من المحلول الملحي المدروء بالفوسفات (كلوريد الصوديوم، 8غ؛ كلوريد البوتاسيوم، 0.2غ؛ $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$، 2.9غ؛ فوسفات هيدروجين البوتاسيوم، 0.2غ؛ ماء مقطر حتى لتر واحد؛ على درجة حموضة 7.2) وذلك من أجل تكوين حوالي 10^8 وحدات مشكّلة لمستعمرات/مل (منظمة حماية النباتات في أوروبا ومنطقة البحر الأبيض المتوسط، 2009).

من أجل الكشف المصلي في النسيج النباتي، ينبغي اختيار عينات تحمل أعراض الآفة – براعم وأغصان وأوراق وثمار، وكلها مصابة بكلوم نخرية أو أنسجة ناتجة عن قرحات على أغصان النبتة أو فروعها أو جذعها أو عنقها. وينبغي العمل على العينات بناء على الإجراءات العامة الموصى بها للاختبار المصلي المحدّد الواجب التطبيق. وعموما، يتم طحن النسيج النباتي في محلول دارئ مضاد للتأكسد معدّ حديثا (بولي فينيل البيروليدون-10، 20غ؛ مانيتول، 10غ، حمض الأسكوربيك، 1.76غ، غلوتياتون مخفف، 3غ، محلول ملحي مدروء بالفوسفات، 10ميليمولار، لتر واحد؛ على درجة حموضة 7.2) أو في محلول ملحي مدروء بالفوسفات (كلوريد الصوديوم، 8غ، كلوريد البوتاسيوم، 0.2غ؛ $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$، 2.9غ؛ فوسفات هيدروجين البوتاسيوم، 0.2غ؛ ماء مقطر حتى لتر واحد؛ على درجة حموضة 7.2) قبل الاستخدام في الاختبارات المصلية. وينبغي لكلا المحلولين أن يكونا معقمين بالفلتر بواسطة غشاء معقّم سماكته 0.22 ميكرومتر.

توضع أجزاء قاسمة تامة يبلغ حجم الواحدة منها 25ميكرولترا من كل زرع بكتيري أو عينة نباتية يجب اختبارها، بواسطة الماصّة على شريحة مجهر متعددة النوافذ ومغطاة بالبلاستيك، فتترك لتجف بالكامل ومن ثم تعدّل بلطف بواسطة الحرارة عبر تمريرها فوق النار. ويتم تحضير شرائح منفصلة لكل جرثومة أو عينة خاضعة للاختبار وأيضا للشواهد الإيجابية والسلبية المستخدمة لـ"إليزا". ويتم تذويب مصل مضاد متاح تجاريا أو أجسام مضادة أحادية التنسيل بواسطة محلول ملحي مدروء بالفوسفات (على درجة حموضة 7.2) ويضاف 25ميكرولترا من محلولات مخففة مناسبة إلى نوافذ كل شريحة. ويمكن أن تتكون الشواهد السلبية من مصل عادي (سابق لرد فعل المناعة) في محلول مخفف ومحلول ملحي مدروء بالفوسفات. ومن ثم يتم حضن الشرائح في حجرة رطبة على درجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة. تنفض الشرائح لنزع القُطَيرات عنها وتشطف بالمحلول الملحي المدروء بالفوسفات، ويغسل كل منها ثلاث مرات لمدة خمسة دقائق في المحلول الملحي المدروء بالفوسفات. تجفف الشرائح برفق بالورق النشاف قبل وضع 25ميكرولترا من إيزوتيوسيانات الفُلورسِيّن المقترن لغاما غلوبولين المذوب بالشكل المناسب بواسطة الماصة في كل من النوافذ. يتم حضن الشرائح في الظلام على درجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة قبل أن تشطف وتغسل وتجفف برفق بالورق النشاف. وأخيرا تضاف 10ميكرولتر من 0.1 ميليمول/لتر من الغليسيرين المدروء بالفوسفات (على درجة حموضة 7.6) مع عامل مضاد للذبول، إلى كل نافذة وتغطى الأخيرة من ثمّ بساترة.

تعاين الشرائح المغمورة بالزيت بواسطة مجهر فلورسنتي بقوة مكبّرة تبلغ 600 أو 1 000 مرة. يتفلور إيزوتيوسيانات الفُلورسِيّن المقترن بلون أخضر فاقع تحت الضوء فوق البنفسجي للمجهر. وفي حال بيّن الشاهد الإيجابي ذو الجرثومة المعروفة، عن خلايا بكتيرية عصوية الشكل وفلورية، فيما لا تظهر الشواهد السلبية ذات المصل العادي والمحلول الملحي المدروء بالفوسفات أية فلورة، ينبغي تفقد نوافذ العينات بحثا عن خلايا بكتيرية فلورية بنفس حجم جرثومة *X. citri subsp. citri* وشكلها. تسمح هذه الطريقة بكشف 10^3 وحدات مشكلة لمستعمرات/مل تقريباً.

3-1-4 الكشف الجزيئي

3-1-4-1 الشواهد الخاصة بالاختبار الجزيئي

من أجل الركون إلى نتيجة الاختبار، فمن الضروري وجود الشواهد المناسبة – التي تعتمد على نوع الاختبار المستخدم ومستوى الجزم المطلوب. بالنسبة إلى تفاعل البوليميراز المتسلسل، فإن الشاهد الإيجابي للحمض النووي، والشاهد الداخلي والشاهد السلبي للتضخيم (بدون شاهد نموذج) هي شواهد الحد الأدنى التي يجب استخدامها. ويجب تناول هذه الشواهد وغيرها لكل مجموعة من الحمض النووي المستخرجة من عينات الاختبار كما هو موصوف أدناه.

الشاهد الإيجابي للحمض النووي. يمكن استخدام حمض نووي معد مسبقا (مخزّن)، أو حمض نووي كامل الجينوم أو شاهد مصطنع (كمنتج مستنسخ لتفاعل البوليميراز المتسلسل) بمثابة شاهد لرصد كفاءة تضخيم تفاعل البوليميراز المتسلسل.

الشواهد الداخلية. من أجل تفاعل البوليميراز المتسلسل التقليدي والآني، يتوجب إدماج جينة لتدبير شؤون التركيب الوراثي للنبات مثل COX (Weller وآخرون، 2000) أو الحمض النووي الريبي S16 (Weisberg وآخرون) أو غليسيرألدهيد نازعة 3 – الفوسفات (Mafra وآخرون، 2012) في بروتوكول تفاعل البوليميراز المتسلسل كشاهد من أجل استبعاد احتمال الشواهد السلبية المضللة بسبب فشل استخراج الحمض النووي أو تدهوره أو وجود مثبطات لتفاعل البوليميراز المتسلسل.

شاهد التضخيم السلبي (بدون شاهد نموذج) من أجل إنجاز تفاعل البوليميراز المتسلسل التقليدي والآني، يضاف ماء تفاعل البوليميراز المتسلسل الذي كان قد استعمل من أجل إعداد خليط التفاعل، في مرحلة التضخيم وذلك من أجل استبعاد النتائج الإيجابية المضللة الناجمة عن التلوث خلال إعداد خليط التفاعل.

الشاهد الإيجابي للاستخراج. يستخدم هذا الشاهد لضمان أن الحمض النووي المستخرج من الهدف متوفر بكمية كافية لتضخيم تفاعل البوليميراز المتسلسل. يستخرج الحمض النووي من الأنسجة المصابة للعائل أو من الأنسجة النباتية السليمة المزوجة مع الهدف، بمستوى الكثافة التي تشكل حدّ الكشف الذي ينص عليه البروتوكول.

على الشاهد الإيجابي أن يبلغ تقريبا نسبة واحد على عشرة من كمية نسيج الأوراق المستخدمة لكل نبتة من أجل استخراج الحمض النووي. وبالنسبة إلى تفاعل البوليميراز المتسلسل، يجب إيلاء العناية الواجبة لتجنب التلوث التبادلي الناتج عن الرذوذ الناجمة عن الشاهد الإيجابي أو عن العينات الإيجابية. وعند المقتضى، على الشاهد الإيجابي المستخدم في المختبر أن يسلسل بحيث يمكن مقارنة السلسلة بسهولة مع السلاسل التي تم الحصول عليها من أمبليكونات تفاعل البوليميراز المتسلسل ذات الحجم الصحيح. وبدلا من ذلك، يمكن تشكيل شواهد إيجابية مصطنعة بواسطة سلسلة معروفة والتي يمكن بدورها أن تقارَن بأمبليكونات تفاعل البوليميراز المتسلسل ذات الحجم الصحيح.

شاهد الاستخراج السلبي. يستخدم هذا الشاهد لرصد التلوث خلال استخراج الحمض النووي ورد الفعل المتبادل مع نسيج العائل. ويضم الشاهد حمضا نوويا استخرج من أنسجة العائل غير المصابة وتم تكبيره لاحقا. وينصح باستخدام شواهد متعددة حين يتم اختبار أعداد كبيرة من العينات الإيجابية.

3-1-4-2 استخراج الحمض النووي من الأنسجة المصابة للحمضيات

جرى استخراج حمض نووي من أنسجة الحمضيات المصابة للمرة الأولى على يد Hartung وآخرين (1993) مع بروتوكول بروميد الستريمونيوم، ولكن هناك طرق تجارية وبروتوكول قائم على الإيزوبروبانول (لا يستوجب الفينول) قد خضعت لتقييم واسع (Llop وآخرون، 1999). كما تم استخراج الحمض النووي بنجاح من أنسجة الحمضيات باستخدام أدوات تجارية لاستخراج الحمض النووي (مثل Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit) (Coletta-Filho وآخرون، 2006).

في بروتوكول الإيزوبروبانول، يتم تقطيع الكلوم أو المواد النباتية التي يشتبه بأن تكون مصابة الى أجزاء صغيرة، فتغمر بمحلول ملحي مدروء بالفوسفات وتخلط في خلاط دوار لمدة 20 دقيقة على درجة حرارة الغرفة. يتم تصفية المادة الطافية بواسطة فلتر (من أجل نزع المادة النباتية) ومن ثم تخضع للطرد المركزي بسرعة 10 000 قوة ج لمدة 20 دقيقة. ويعاد استعلاق المادة المترسبة في 1مل من المحلول الملحي المدروء بالفوسفات: فيتم حفظ كمية قدرها 500ميكرولتر لمزيد من التحاليل أو لعزلها مباشرة على أطباق الأجار، فيما توضع كمية 500ميكرولتر في جهاز الطرد المركزي بسرعة 10 000 قوة ج لمدة 10 دقائق. فيعاد استعلاق المادة المترسبة في 500ميكرولتر من محلول دارئ للاستخراج (200ميليمولار من ثلاثي حمض الهيدروكلوريك، على درجة حموضة 7.5؛ 250ميكرومولار كلوريد الصوديوم؛ 25ميليمولار إيثيل ثُنَائي أمين حِمض الخليك الرباعي؛ 0.5 في المائة دوديسيل كبريتات الصوديوم؛ 2 في المائة من متعدد فينيل بيروليدون)، وتوضع في الدوامة وتترك لمدة ساعة على درجة حرارة الغرفة مع هزّها بشكل متواصل. يوضع المزيج من ثم في جهاز الطرد المركزي بسرعة 5 000 قوة ج لمدة 5 دقائق وبعد ذلك تنقل كمية من 450ميكرولترا من المادة الطافية إلى أنبوب جديد وتخلط مع 450ميكرولترا من الإيزوبروبانول. يتم خلط المزيج برفق ومن ثم يترك لساعة واحدة من الوقت على درجة حرارة الغرفة. يمكن تحسين الترسب باستخدام Pellet Paint Co-Precipitant (Cubero وآخرون، 2001). يوضع المزيج في جهاز الطرد المركزي على سرعة 13 000 قوة ج لمدة 10 دقائق فيتم التخلص من المادة الطافية وتجفف المادة المترسبة. يعاد استعلاق المادة المترسبة في 100ميكرولتر من الماء. ويتم استخدام عينة من 5ميكرولتر في 50 ميكرولتر من تفاعل البوليميراز المتسلسل.

3-1-4-3 تفاعل البوليميراز المتسلسل التقليدي

هناك عدة أزواج من البادئات متاحة لتشخيص جرثومة *X. citri subsp. citri*. تستهدف البادئتان 2 و3 لـ Hartung وآخرين (1993) جزءا من الحمض النووي متعدد الأشكال لقطعة الحصر ذات التكوين والطول لبكتير *Bam*HI يخص جرثومة *X. citri subsp. citri*، وهما تستعملان كثيرا في المقايسات المطبقة على المواد النباتية بسبب جودة خصوصيتهما وحساسيتهما (حوالي 10^2 وحدات مشكّلة لستعمرات/مل). أما البادئتان *J-pth1* و*J-pth2* فتستهدفان جزءا من 197 زوجا من القواعد لإشارة التموضع النووية في الجينة المسؤولة عن القدرة المرضية *pthA* في سلالات *Xanthomonas* التي تتسبب

بأعراض التقرح في الحمضيات. وتشمل تلك السلالات *X. citri subsp. citri* و*X. fuscans subsp. aurantifolii* والسلالتين الشاذتين A^* وA^w لجرثومة *X. citri subsp. citri* اللتين اكتشفتا في فلوريدا (Cubero وGraham، 2002). هاتان البادئتان شاملتان ولكن حساسيتهما أقل من بادئتي Hartung وآخرين (1993) (إذ تبلغان 10^4 وحدات مشكّلة لمستعمرات/مل في المواد النباتية). إلا أن بادئتي Hartung لا تستطيعان الكشف عن سلالة A^w لجرثومة *X. citri subsp. citri* وجميع سلالات *X. fuscans subsp. aurantifolii*. في الحالات التي يتشبه فيها بوجود سلالتي A^* وA^w الشاذتين لجرثومة *X. citri subsp. citri* – مثلا حين تظهر أعراض التقرح البكتيري للحمضيات على عائلين هما الليمون المكسيكي وليمون "أليماو" الكبير الأوراق – يجب استخدام مجموعتي البادئات كلاهما.

بروتوكول Hartung وآخرين لتفاعل البوليميراز المتسلسل (1993)

البادئتان هما:

2 (عكسية): 5′-CAC GGG TGC AAA AAA TCT-3′

3 (تقدمية): 5′-TGG TGT CGT CGC TTG TAT-3′

يتم إعداد خليط تفاعل البوليميراز المتسلسل في أنبوب معقم وهو مكون من مادة دارئة لتفاعل البوليميراز المتسلسل (50ميليمولار من ثلاثي حمض الهيدروكلوريك، على درجة حموضة 9؛ 20ميكرومولار من كلوريد الصوديوم؛ 1 في المائة تريتون X-100؛ 0.1 في المائة جيلاتين؛ 3ميكرومولار كلوريد المغنيسيوم)، 1 ميكرومتر من كل من البادئة 2 والبادئة 3، 0.2 ميكرومولار ثلاثي فوسفات النيوكليتيد منقوص الأكسجين و1.25 وحدة من بوليميراز الحمض النووي تاك. تضاف عينة من الحمض النووي المستخرج بحجم 5ميكرولتر إلى 45ميكرولتر من خليط تفاعل البوليميراز المتسلسل من أجل التوصل إلى ما مجموعه 50ميكرولترا لكل تفاعل. وتتمثل ظروف التفاعل في خطوة مسخ أولية على حرارة 95 درجة مئوية لمدة دقيقتين تليها 35 دورة على حرارة 95 درجة مئوية لمدة 60 ثانية، فـ58 درجة مئوية لمدة 70 ثانية فـ72 درجة مئوية لمدة 75 ثانية وخطوة استطالة أخيرة على حرارة 72 درجة مئوية لمدة 10 دقائق.أما حجم الأمبليكون فيبلغ 222 زوجاً من القواعد.

بروتوكول Cubero و Graham (2002) لتفاعل البوليميراز المتسلسل

البادئتان هما:

J-pth1 (تقدمية): 5′-CTT CAA CTC AAA CGCC GGA C-3′

J-pth2 (عكسية): 5′-CAT CGC GCT GTT CGG GAG-3′

يعدّ مزيج تفاعل البوليميراز المتسلسل في أنبوب معقم وهو يتكوّن من مادة دارئة تاك مركّزة مرة واحدة، و3ميكرومولار من كلوريد المغنيسيوم، 1ميكرومتر لكل من بادئتي *J-pth1* و*J-pth2*، و0.2 ميكرومولار من كل ديوآسينيوآليتيد و1 وحدة من بوليميراز الحمض النووي تاك. تتم إضافة عينة من الحمض النووي المستخرج بحجم 2.5ميكرولتر إلى 22.5 ميكرولتر من خليط تفاعل البوليميراز المتسلسل من أجل التوصل إلى ما مجموعه 25ميكرولتر عن كل ردة فعل. أما ظروف التفاعل فعبارة

عن خطوة أولية من المسخ على حرارة 94 درجة مئوية لمدة 5 دقائق، تليها 40 دورة على حرارة 93 درجة مئوية لمدة 30 ثانية، فـ58 درجة مئوية لمدة 30 ثانية و72 درجة مئوية لمدة 45 ثانية، وخطوة استطالة نهائية على حرارة 72 درجة مئوية لمدة 10 دقائق.أما حجم الأمبليكون فيبلغ 198زوجاً من القواعد.

كما تم تطوير تفاعل البوليميراز المتسلسل المدمج، والالتقاط المناعي، والكشف بواسطة قياس الألوان لمنتجات تفاعل البوليميراز المتسلسل المدرج، من أجل الرصد المباشر والحساس لجرثومة *X. citri subsp. citri* في النبتات (Hartung وآخرون، 1993). وقد أفيد عن استعراض للحساسية النسبية لمختلف البروتوكولات والبادئات في المستنبتات الخالصة ومستخلصات الثمار (Golmohammadi وآخرون، 2007).

3-1-4-4 تفاعل البوليميراز المتسلسل الآني

بعد الحصول على الحمض النووي من المواد النباتية باستخدام البروتوكول الذي سبق وصفه من قبل Llop وآخرين (1999)، يعاد استعلاق المادة المترسبة في 100ميكرولتر من الماء المعقم البالغ النقاء وتخزينها على حرارة 20 درجة مئوية تحت الصفر، إلى أن تستخدم.

وقد تم تصميم مجموعة من البادئات، *J-pth3* (5'-ACC GTC CCC TAC TTC AAC TCA A-3') و*J-pth4* (5'-CGC ACC TCG AAC GAT TGC-3')، ومسبار تاكمان الموافق لها (*J-Taqpth2*) (5'-ATG CGC CCA GCC CAA CGC-3') الموسوم عند الطرف 5′ بـ 6- كربوكسي فلوريسثين وعند الطرف 3′ برباعي ميثيلين ثنائي الأمين، بناء على سلاسل جينة *pth*، وهي جينة رئيسية للقدرة المرضية تستخدم في الدراسات الأخرى تحديدا لكشف سلالات *X. citri subsp. citri* (Cubero وGraham، 2005). وتشمل تلك السلالات كلا من *X. citri subsp. citri*، و*X. fuscans subsp. aurantifolii* والسلالتين المعروفتين لجرثومة *X. citri subsp. citri* أي A* وA^w المكتشفتين في فلوريدا.

يجري تفاعل البوليميراز المتسلسل الآني عبر إضافة 2ميكرولتر من الحمض النووي النموذج إلى خليط تفاعل يحتوي 12.5ميكرولترا من QuantiMix Easy Kit الذي يضم QuantiMix Easy Master Mix وكلوريد المغنيسيوم (50ميليمولار)، 1ميكرولتر من 10 ميكرومولار من البادئة التقدمية (*J-RTpth3*) و1ميكرولتر من 10ميكرو مولار من البادئة العكسية (*J-RTpth4*) و0.5ميكرولتر من 10 ميكرومولار من مسبار تاكمان (*J-Taqpth2*) والتوصل إلى حجم نهائي للتفاعل يبلغ 25 ميكرولتر مع ماء مقطر معقّم. وقد وُضع البروتوكول الخاص بتفاعل البوليميراز المتسلسل الآني بواسطة نظام ABI PRISM 7 000 لرصد التسلسل. وقد أدّت معدات أخرى إلى نتائج مماثلة (ماريا لوبيز، إبلاغ شخصي، 2013). تتمثل ظروف التضخيم للبادئات والمسبارات في خطوة تفعيل أولية مدتها 15 دقيقة على حرارة 95 درجة مئوية تليها 40 دورة من 15 ثانية على حرارة 95 درجة مئوية ودقيقة واحدة على حرارة 60 درجة مئوية. ويمكن الحصول على عدة كاملة لتفاعل البوليميراز المتسلسل الآني القائم على هذا البروتوكول تتضمن خليطا رئيسيا وأنزيما من Plant Print Diagnostics (http://www.plantprint.net).

يوفر تفاعل البوليميراز المتسلسل الآني خصوصية مشابهة لبادئات جينة *pth* المستخدمة في الطريقة التقليدية لتفاعل البوليميراز المتسلسل (Cubero و Graham، 2002، 2005) ويكشف بشكل موثوق حوالي 10 وحدات مشكّلة لمستعمرات جرثومة *X. citri subsp. citri* من خلال كلوم الأوراق المريضة ومن خلال محلول مخفف للخلايا المزروعة (Mavrodieva وآخرون، 2004). وقد تمت مقارنة هذه الطريقة مؤخرا مع تفاعل البوليميراز العادي والمدمج (Golmohammadi وآخرون، 2007) وأفيد عن أن حساسية الكشف عن *X. citri subsp. citri* في كلوم الثمار تبلغ 10 وحدات مشكّلة لمستعمرات/مل.

3-1-5 تفسير نتائج كلّ من تفاعل البوليميراز المتسلسل التقليدي والآني

تفاعل البوليميراز المتسلسل التقليدي

يعتبر تفاعل البوليميراز المتسلسل الخاص بالمرض المحدّد صالحا فقط إذا تم استيفاء المعايير التالية:

– أن ينتج الشاهد الإيجابي أمبليكونا للجرثومة من الحجم الصحيح.

– عدم إنتاج أمبليكونات من الحجم الصحيح للجرثومة في الشاهد السلبي للاستخراج والشاهد السلبي للتضخيم.

في حال استخدمت بادئات الشاهد الداخلي للحمض الريبي النووي S16 هي أيضاً فإن الشاهد السلبي (أي النسيج النباتي السليم) (في حال استخدم)، والشاهد الإيجابي وكل من عينات الاختبار سوف تنتج شريطةً تبلغ حوالي 1.6 كيلوباز (يعتمد حجم الأمبليكون على أيّة من بادئات الحمض الريبي النووي S16 هي المستخدمة (Weisberg وآخرون، 1991)). وتجدر الملاحظة بأن الشواهد الإيجابية المصطنعة والخاصة بالبلازميد لن تنتج شريطة بحجم 1.6 كيلوباز. ويفيد عجز العينات عن التضخم مع بادئات الشواهد الداخلية، مثلا أن استخراج الحمض النووي لم ينجح أو أن حمض النواة لم يدرج في خليط التفاعل، أو أن المركّبات المثبطة لتفاعل البوليميراز المتسلسل موجودة في الحمض النووي المستخرج أو أن الحمض النووي قد فسد.

وتعتبر عيّنة ما إيجابيةً إذا ما أنتجت أمبليكوناً من الحجم الصحيح.

تفاعل البوليميراز المتسلسل الآني

يعتبر تفاعل البوليميراز المتسلسل الآني صحيحا فقط في حال تم استيفاء المعايير التالية:

– أن ينتج الشاهد الإيجابي منحنى للتضخم بواسطة البادئات الخاصة بالمرض المحدد.

– عدم مشاهدة أي منحنى للتضخم (أي أن قيمة حد الدورة تبلغ 40) مع الشاهد السلبي للاستخراج والشاهد السلبي للتضخم.

وفي حال استخدمت بادئات الشواهد الداخلية COX هي أيضا، فإن الشاهد السلبي (في حال استخدامه) والشاهد الإيجابي وكل من عينات الاختبار يجب أن تنتج منحنى تضخم. ويفيد عجز العينات عن إنتاج منحنى للتضخم مع بادئات الشواهد

الداخلية، مثلا أن استخراج الحمض النووي لم ينجح أو أن حمض النواة لم يدرج في خليط التفاعل، أو أن المركّبات المثبطة لتفاعل البوليميراز المتسلسل موجودة في الحمض النووي المستخرج أو أن الحمض النووي قد فسد.

وسوف تعتبر عينة ما إيجابية إذا أنتجت منحنى نموذجيا للتضخم. ويجب التحقق من قيمة حدّ الدورة في كل مختبر لدى تنفيذ الاختبار للمرة الأولى.

3-1-6 الكشف بواسطة القايسات البيولوجية

3-1-6-1 اختبار التطعيم في الأوراق المقصوصة على شكل أقراص

في هذا الاختبار تم تطعيم أنسجة أوراق الحمضيات المعرضة للإصابة بجرثومة *X. citri subsp. citri* بعينات مستخرجة مريضة وتم حضنها ضمن الظروف المناسبة من أجل تكاثر البكتيريا ونموّ بثرات بدائية للمرض.

تبدأ هذه المقايسة البيولوجية بتعقيم أطباق "إليزا" لمدة 15 دقيقة في فرن ميكروويف وملء جيوبها بـ200ميكرولتر من الأجار بنسبة 1.5 في المائة في ماء معقم، داخل حجرة للتدفق الصفائحي على درجة حرارة الغرفة. تخضع أوراق الحمضيات اليانعة من فصيلة *Citrus paradisi var. Duncan* (أي الليمون الهندي) أو عوائل أخرى معرضة للجرثومة مثل *Citrus aurantifolia* (الليمون المكسيكي) أو *Poncirus trifoliata* (البرتقال ثلاثي الأوراق) إلى تطهير سطحها من الجراثيم لمدة دقيقة واحدة بواسطة 1 في المائة من هيبوكلوريت الصوديوم. ويجب أن تكون الأوراق متفتحة بالكامل ولكن لا يجب أن تكون ناضجة وقاسية. تشطف الأوراق ثلاث مرات بالماء المقطر المعقم ومن ثم يجفف سطحها في حجرة التدفق الصفائحي على درجة حرارة الغرفة. توضع أقراص الأوراق، التي يتم الحصول عليها بواسطة تثقيب الأوراق (بعد تعقيمها بـ95 في المائة من الإيثانول)، مع سطحها المجاور للمحور على الأجار المائي في كل جيب من جيوب الطبق. ويضاف مقدار 50ميكرولترا من كلوم قرحة الحمضيات المنقوعة (4 جيوب مكررة لكل عينة من النبتة).

ويستخدم مستعلق يحتوي جرثومة *X. citri subsp. citri* بكمية 10^5 وحدة مشكّلة لمستعمرات/مل بمثابة شاهد إيجابي، ومحلول ملحي بمثابة شاهد سلبي (4 مرات لكل منهما). تغلق الأطباق (بواسطة البارافيلم مثلا) فيبلغ مستوى الرطوبة النسبية تقريبا 100 في المائة ويتم حضنها على حرارة 28 درجة مئوية لمدة 12 يوما مع تعريضها للضوء بشكل دائم والتأكد من تقدم حالتها بانتظام. ويبدأ تقييم تكوّن البثور البدائية بيضاء اللون في كل من أقراص الأوراق ابتداءً من اليوم الثالث باستخدام مجهر مجسّم وتقنيات لعزل الجرثومة *X. citri subsp. citri* بحسب الوصف الوارد في القسم 3-1-2. ويمكن إخضاع الأقراص الخالية من الأعراض لمزيد من التحليل من أجل كشف وجود بكتيريا حية، عبر عزلها على وسط شبه انتقائي (Verdier وآخرون، 2008). بعد مرور 12 يوما، في حال كانت جرثومة *X. citri subsp. citri* موجودة، تكون الخلايا البكتيرية قد تكاثرت على النسيج النباتي ويكون بالوسع عزلها على الوسط بأعداد أكبر. وتجدر الإشارة إلى أن هذه المقايسة البيولوجية هي طريقة تشخيص محددة جداً وحسّاسة (10^2 وحدة مشكّلة لمستعمرات/مل) (Verdier وآخرون، 2008).

3-1-6-2 تخصيب الأوراق المنفصلة

يمكن أيضا تخصيب جرثومة *X. citri subsp. citri* بشكل انتقائي في الأوراق المنفصلة المجروحة لفصيلة *C. paradisi var. Duncan* (الليمون الهندي) أو غيرها من العوائل الشديدة الحساسية للجرثومة مثل *C. aurantifolia* (الليمون المكسيكي) أو *P. trifoliata* (البرتقال ثلاثي الأوراق). تغسل الأوراق الطرفية اليانعة المأخوذة من نبتات مزروعة في الدفيئة، لمدة 10 دقائق تحت الماء الجاري للصنبور، ويطهّر سطحها بواسطة هيبوكلوريت الصوديوم بنسبة 1 في المائة لدقيقة واحدة، وتشطف بهدف تطهيرها بشكل كامل بواسطة الماء المقطر المعقم. تجرح الجهة السفلى لكل ورقة بطريقة معقمة عبر ثقبها بإبرة أو تجريحها عدة مرات بحركات خفيفة بواسطة مبضع، وتوضع الأوراق كاملة على أجار بنسبة 1 في المائة في ماء معقم داخل جيوب أطباق "إليزا" شرط أن يكون سطحها الأسفل موجها إلى أعلى. تضاف قطيرات يتراوح قدرها بين 10 و20 ميكرولترا مستخرجة من كلوم قرحة الحمضيات المنقوعة، إلى الجراح. تستخدم الشواهد الإيجابية والسلبية الخاصة بالمقايسة البيولوجية لأقراص الأوراق. وبعد فترة 4 أيام إلى 12 يوما على حرارة 25 درجة مئوية في حاضنة مضاءة، يتم تقييم تكوّن البثور ويمكن عزل *X. citri subsp. citri* باستخراجها من أية من البثور أو من أنسجة الأوراق المجروحة الخالية من الأعراض، بحسب ما هو موصوف أعلاه (منظمة حماية النباتات في أوروبا ومنطقة البحر الأبيض المتوسط، 1998).

3-2 كشف الجرثومة في النباتات عديمة الأعراض

يمكن كشف جرثومة *X. citri subsp. citri* في النباتات عديمة الأعراض من خلال العزل والتخصيب على أوساط شبه انتقائية (أنظر أدناه)، والتقنيات المصلية (الفلورة المناعية (القسم 3-1-3)) والاختبار الجزيئي (القسم 3-1-4)

يمكن لعزل جرثومة *X. citri subsp. citri* من النبات عديم الأعراض في أوساط شبه انتقائية أن يتمّ عبر غسل عينة عن الورقة أو الثمرة في محلول مدروء بالببتون، وتركيز المادة الطافية، ومن ثم طليها على الوسط (Verdier وآخرون، 2008). وتشكل عشر أوراق أو ثمرة واحد عيّنةً.

يجري خضّ العيّنات لمدة 20 دقيقة على درجة حرارة الغرفة داخل 50مل من محلول مدروء بالببتون (كلوريد الصوديوم، 8.5 غ؛ ببتون، 1غ؛ توين 20، 250 ميكرولتر، ماء مقطّر، 1 لتر، على درجة حموضة 7.2). أما للعينات بالجملة، فيمكن استخدام 100 ورقة في 200 مل من محلول مدروء بالببتون. ويجري خض فرادى الثمرات لمدة 20 دقيقة على درجة حرارة الغرفة داخل أكياس معقمة تحتوي 50مل من المحلول المدروء بالببتون.

ومن ثم يخضع المستعلق للطرد المركزي بسرعة 000 6 قوة ج لمدة 20 دقيقة فتحوّل المادة الطافية لخارج الوعاء ويعاد استعلاق المادة المترسبة في 10 مل من محلول ملحي بنسبة 0.85 في المائة. وتمسح عينات بكميات قاسمة تامة (100 ميكرولتر) من محلول بنسبة 100:1 و1000:1 لكل مستعلق، 3 مرات على وسط XOS شبه الانتقائي (مكوّن من السكروز، 20غ، ببتون، 2 غ، غلوتامات أحادي الصوديوم، 5 غ، نترات الكلسيوم، 0.3 غ؛ هيدروجين فوسفات البوتاسيوم، 2 غ؛ حديد حمض ايثيلين ثنائي أمين رباعي الخليك، 1 مغ؛ سيكلوهكسيمايد، 100مغ؛ سيفالكسين، 20 مغ، كازوغاميسين، 20 مغ، بنفسجي المثيل B2، 0.3 مغ، بكتو أجار، 17 غ؛ ماء مقطر، 1 لتر، على درجة حموضة

7.0) (Monier، 1992). بعد الحضن على حرارة 28 درجة مئوية لمدة تتراوح بين 5 و6 أيام، يتم تقييم النمو فضلا عن نوع المستعمرة وخصائص شكلها الخارجي (القسم 3-1-2).

4- تحديد الجرثومة

ينبغي لتحديد المستعمرات المفترضة لجرثومة *X. citri subsp. citri* أن يؤكد من خلال تقنيات عدة لأنّ أنواعا أخرى من آفة *Xanthomonas* مثل *X. fuscans subsp. aurantifolii* و*X. alfalfae subsp. citrumelonis* يمكن أن تعزل من الحمضيات. وتتضمن تلك التقنيات، بالإضافة إلى مراقبة الخصائص المورفولوجية على المستنبتات المغذية، الاختبارات المصلية، والاختبار الجزيئي، والمقايسة البيولوجية لأوراق النبتة المقصوصة على شكل أقراص صغيرة أو الأوراق المنفصلة، واختبار القدرة الإمراضية.

إن متطلبات الحد الأدنى لتحديد المستنبت الخالص تتمثل في النتيجة الإيجابية بواسطة كل من التقنيات الثلاث: (1) تفاعل البوليميراز المتسلسل الذي يستخدم مجموعتين من البادئات (القسم 4-1)؛ (2) التقنية المصلية (الفلورة المناعية، الشطيرة المزدوجة للأجسام المضادة (المشار إليها فيما يلي بتسمية DAS-ELISA) أو "إليزا" غير المباشرة (الأقسام 4-2 و4-2-1 و4-2-2) باستخدام أجسام مضادة محددة أحادية التنسيل؛ و(3) اختبار القدرة الإمراضية عبر تطعيم الحمضيات العوائل لاستيفاء متطلبات فرضيات كوخ (القسمان 4-3 و3-1-6). يمكن إجراء اختبارات إضافية (القسمان 4-4 و4-5) من أجل التثبت أكثر من خصائص السلالة الموجودة. ويجب تضمين الشواهد الإيجابية والسلبية في الاختبارات كافة.

تصف الأقسام التالية التقنيات الموصى بها:

يمكن للمجموعات التالية، من بين أخرى - أن تقدم سلالات مرجعية لآفة *X. citri subsp. citri* (ترد معزولات *X. citri subsp. citri* الموصى بها لاستخدامها، كشواهد إيجابية:)

- NCPPB 3234 من المجموعة الوطنية للبكتيريا المسببة لأمراض النبات، مختبر العلوم المركزي، يورك، المملكة المتحدة

- CFPB 2911 من المجموعة الفرنسية للبكتيريا المرضة للنبات، المعهد الوطني للبحوث الزراعية، أنجيه، فرنسا (هذه سلالة A* لـ*X. citri subsp. citri*)

- ICMP 24 من المجموعة الدولية للكائنات المهجرية للنبات، Landcare Research (Manaaki Whenua) New Zealand Ltd، أوكلند، نيوزيلندا

- ATTC 49118 من مجموعة الأنواع المستنبتة الأمريكية، ماناساس، فيرجينيا، الولايات المتحدة الأمريكية

- IBSBF 1594 من مجموعة المعهد البيولوجي للبكتيريا المستنبتة المرضة للنبات، المركز الاختباري المركزي للمعهد البيولوجي - مختبر العلوم الجرثومية النباتية، كامبيناس، البرازيل

يمكن التأكد من أصالة السلالات فقط إذا تم الحصول عليها مباشرة من المجموعات المستنبتة.

4-1 الطرق القائمة على تفاعل البوليميراز المتسلسل

بالإضافة إلى بروتوكول تفاعل البوليميراز المتسلسل الموصوف في القسم 3-1-4-3، من المستحسن التأكد من تحديد المستنبت الخالص للسلالات المشتبه بها، وذلك عبر استخدام مجموعتين مختلفتين من البادئات. ينبغي أن تكون المجموعة الأولى مكونة من البادئتين *J-pth1/J-pth2* أو *J-Rxg/-Rxc2* (Cubero وGraham، 2002) والمجموعة الأخرى من البادئتين *Xac01/Xac02* (Coletto-Filho وآخرون، 2005) أو *XACF/XACR* (Park وآخرون، 2006) (الجدول 1). وهذا بسبب نتائج البحوث التي تفيد أن معظم أزواج البادئات المنشورة تفتقر إلى الخصوصية (Delcourt وآخرون، 2013). ويمكن التثبت من تحديد الجرثومة عبر سَلسَلة الأمبليكونات الناتجة عن تفاعل البوليميراز المتسلسل ومقارنة سلاسلها مع تلك التي تخص سلالات *X. citri subsp. citri* المودعة لدى قاعدة بيانات بنك الجينات التابع للمركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا البيولوجية.

وقد توصل بروتوكول تفاعل البوليميراز المتسلسل لـCubero وGraham (2002) إلى بادئات لمناطق الفاصل الداخلي المستنسخ للحمضين الريبيين النووين S16 وS23 الخاصة بآفة *X. citri subsp. citri*. وأتاحت الفوارق في سلاسل الفاصل الداخلي المستنسخ تصميم بادئتين محددتين لجرثومة *X. citri subsp. citri* وتكشف هاتان البادئتان السلالتين الشاذتين A* وA^w (Cubero وGraham، 2002). والبادئتان هما:

J-Rxg: 5′-GCGTTGAGGCTGAGACATG-3′

J-RXc2: 5′-CAAGTTGCCTCGGAGCTATC-3′

يُنفّذ تفاعل البوليميراز المتسلسل في خلائط للتفاعل بكمية 25ميكرولتر تحتوي دارئة تاك المركزة مقدار ضعف واحد، و1.5 ميليمولار من كلوريد المغنيسيوم، 0.04 ميكرومولار من بادئة *J-RXg*، 0.04 ميكرومولار من بادئة *J-RXc2*، 0.2 ميكرومولار لكل dNTP و1 وحدة من بوليميراز الحمض النووي تاك. إن ظروف تضخيم تفاعل البوليميراز المتسلسل هي نفسها المستخدمة مع بادئتي *pthA* بحسب ما يرد في القسم 3-1-4-3.

وقد توصل بروتوكول تفاعل البوليميراز المتسلسل لـColetta-Fiho وآخرين (2006) إلى وضع بادئتين بناء على مجموعة جينة *rpf*. والبادئتان هما:

Xac01: 5′-CGCCATCCCCACCACCACCACGAC-3′

Xac02: 5′-AACCGCTCAATGCCATCCACTTCA-3′.

ينفذ تفاعل البوليميراز المتسلسل في خلائط للتفاعل بكمية 25ميكرولتر تحتوي على دارئة تاك المركزة مرة واحدة، و2.0 ميليمولار من كلوريد المغنيسيوم، 0.36 ميكرومولار لكل بادئة، 0.25 ميكرومولار لكل dNTP و1 وحدة لبوليميراز الحمض النووي تاك. تتمثل ظروف تضخم تفاعل البوليميراز المتسلسل بخطوة مسخ أولية على حرارة 94 درجة مئوية لمدة 3 دقائق تليها 36 دورة على حرارة 94 درجة مئوية لمدة 45 ثانية، و60 درجة مئوية لمدة 45 ثانية و72 درجة مئوية لمدة

45 ثانية، وخطوة استطالة نهائية على حرارة 72 درجة مئوية لمدة 5 دقائق.أما حجم الأمبليكون فهو 582 زوجا من القواعد.

طوّر بروتوكول Park وآخرين لتفاعل البوليميراز المتسلسل (2006) بادئتين بناء على تتابع جينة *hrpW*. أما البادئتان فهما:

XACF: 5′- CGTCGCAATACGATTGGAAC-3′

XACR: CGGAGGCATTGTCGAAGGAA-3′.

يتمّ تفاعل البوليميراز المتسلسل في 25 ميكرولتراً من خلائط التفاعل التي تحتوي مادة دارئة تاك مركزة مرة واحدة و1.5 ميليمولار من كلوريد المغنيسيوم و0.10 ميكرومولار من كل من البادئتين، و0.25 ميليمولار من كل فوسفات النيوكليتيد المنقوص الأكسجين وجيلاتين بنسبة 0.01 في المائة ووحدتين من بوليميراز الحمض النووي تاك. وتتمثل ظروف تضخيم تفاعل البوليميراز المتسلسل بمسخ أولي على حرارة 94 درجة مئوية لمدة 5 دقائق، تليها 30 دورة على حرارة 94 درجة مئوية لمدة 15 ثانية، ثم 60 درجة مئوية لمدة 30 ثانية و72 درجة مئوية لمدة 30 ثانية، وخطوة استطالة نهائية على حرارة 72 درجة مئوية لمدة سبع دقائق. أما حجم الأمبليكون فيبلغ 561 زوجاً من القواعد.

الجدول 1– ملخص الأساليب القائمة على تفاعل البوليميراز المتسلسل الموصوفة في بروتوكول التشخيص هذا

بيانات الخصوصية مأخوذة من Delcourt وآخرين (2013)* تشير عملية الكشف غير المحددة إلى النسبة المئوية من جراثيم Xanthomonads والفطور الرمّامة التي ثبتت إصابتها في الاختبار. ** لم تثبت إصابتها بسلالات الفطور الرمّامة.

زوج البادئات	المرجع	حجم الأمبليكون (زوج قواعد)	كشف سلالة *X. citri subsp. citri*	كشف غير محدد (٪)*	حدود الكشف في المواد النباتية
/32	Hartung وآخرون. (1993)	224	لا يشكف سلالات وكافة سلالات A^w A*	17	10^2 وحدات مشكلة لمستعمرات/مل
J-pth1/J-pth2	Cubero وGraham (2002)	198	السلالات كافة	51	10^4 وحدات مشكلة لمستعمرات/مل
J-Rxg/J-Rxc2	Cubero وGraham (2002)	179	السلالات كافة	30	10^4 وحدات مشكلة لمستعمرات/مل
Xac01/Xac02	Coletto-Filho وآخرون (2005)	582	السلالات كافة	16	10^4 وحدات مشكلة لمستعمرات/مل
XACF/XACR	Park وآخرون (2006)	561	السلالات كافة	**6	غيرمعروف

4-2 الكشف المصلي

بالإضافة إلى بروتوكول الفلورة المناعية الموصوف في القسم 3-1-3 يستحسن استخدام مضادات أجسام مختلفة من أجل تحديد المستنبتات الخالصة. ويمكن استخدام طريقة DAS-ELISA أو "إليزا" غير المباشرة أيضا كاختبارين مصليين بديلين لتحديد المستنبتات الخالصة.

4-2-1 DAS-ELISA

بالنسبة إلى اختبار DAS-ELISA تطلى أطباق ميكروتيتر بـ100 ميكرولتر/جيب من محلول مدروء بالكربونات (كربونات الصوديوم، 1.59 غ؛ بيكربونات الصوديوم، 2.93 غ؛ آزيد الصوديوم، 0.2 غ؛ ماء مقطّر، 1 لتر؛ على درجة حموضة 9.6) يحتوي غلوبولينات مناعية مضادة لآفة *X. citri subsp. citri* مذوبة بالشكل المناسب وتحضن طيلة الليل على حرارة 4 درجات مئوية. بعد غسل الأطباق 3 مرات بواسطة خليط من المحلول الملحي المدروء بالفوسفات–التوين (كلوريد الصوديوم، 8غ؛ فوسفات أحادي البوتاسيوم 0.2 غ؛ $Na_2HPO_4{\cdot}12H_2O$ ، 2.9 غ؛ كلوريد البوتاسيوم، 0.2 غ؛ آزيد الصوديوم، 0.2 غ؛ التوين 20، 0.25 مل؛ ماء مقطر، 1 لتر؛ على درجة حموضة 7.4)، تضاف عينة اختبار، أو شاهد سلبي (مادة نباتية سليمة) أو شاهد إيجابي (سلالة مرجعية لآفة *X. citri subsp. citri*) (بقدر 200 ميكرولتر/جيب). يتم تحضين الأطباق لمدة ساعتين على حرارة 37 درجة مئوية. وبعد الغسل يضاف الغلوبولين المناعي المضاد لجرثومة *X. citri* subsp. *citri* المقترن بالفوسفاتاز القلوي المذوب بالشكل المناسب في خليط المحلول الملحي المدروء بالفوسفات–التوين (بقدر 200 ميكرولتر/جيب) وتحضن الأطباق لمدة ساعتين على حرارة 37 درجة مئوية. بعد الغسل يضاف محلول أساسي من مدروء بفوسفات البارا–نيتروفينيل (1مغ/مل) (200 ميكرولتر/جيب) وتحضن الأطباق لمدة تتراوح بين 30 و60 دقيقة على درجة حرارة الغرفة. وتقاس الامتصاصات باستخدام مقياس للطيف الضوئي مجهز بفلتر 405 نانومتر. ويتمثل معيار تحديد إصابة العينة بالآفة في كون قيمة الكثافة البصرية تفوق مرتين قيمة شاهد المادة النباتية السليمة. ويبلغ حدّ الكشف في طريقة DAS-ELISA 10^4–10^5 وحدات مشكلة لمستعمرات/مل (Civerolo وFan، 1982). لا ينصح بهذه الطريقة للكشف المباشر للجرثومة في الأنسجة النباتية.

هناك أجسام مضادة أحادية التنسيل متاحة لطريقة "إليزا" ولكن يستحسن استخدامها فقط لتحديد المستنبتات الخالصة بسبب تدني قابلية كشفها في النسيج النباتي. وهناك مجموعات أدوات تجارية لكشف *X. citri subsp. citri* بواسطة "إليزا" متاحة تجاريا (مثلا من Agdia, Inc). بالنسبة إلى البيانات المتعلقة بالخصائص راجع المعلومات الفنية المقدمة من قبل الشركة المصنعة. يعرف عن بعض مضادات الأجسام أحادية التنسيل أنها تتفاعل بشكل متبادل مع آفات *X. axonopodis pv. phaseoli* و*X. campestris pv. zinnea* و*X. alfalfae subsp. citrumelonis* و*Xanthomonas hortorum pv. pelargonii*؛ غير أنه من غير المحتمل لتلك الباثوفارات أن تكون موجودة على الحمضيات.

4-2-2 اختبار "إليزا" غير المباشر

يمكن استخدام اختبار "إليزا" غير المباشر مع الأجسام المضادة أحادية التنسيل التي وصفها Alvarez وآخرون (1991) من أجل تحديد المستنبتات. وهناك مجموعات أدوات تجارية لكشف *X. citri subsp. citri* بواسطة "إليزا" متاحة تجاريا (مثلا من Agdia, Inc). من الناحية النظرية، يمكن لكل سلالات *X. citri subsp. citri* أن تحدد ولكن أفيد عن أن بعض السلالات المميزة من ناحية الشكل الظاهري والتي تم عزلها في جنوب-غرب آسيا، لا تتفاعل مع الأجسام المضادة أحادية التنسيل المتاحة (Vernière وآخرون، 1998).

تخضع مستعلقات المستنبتات الخالصة للطرد المركزي بسرعة تضاهي تقريبا 10 000 قوة ج لمدة دقيقتين ويتم التخلص من المادة الطافية. ويضاف مل واحد من المحلول الملحي المدروء بالفوسفات المركّز مرة واحدة ويعاد استعلاق الخلايا عبر وضعها في الآلة الدوامة. تكرر العملية مرتين أخريين. وبعد عملية الغسل الثالثة يعاد استعلاق الخلايا في مادة دارئة تستخدم للطلاء. ويعدّل التركيز البكتيري من ناحية القياس الضوئي حتى 0.01 $_{600}$ درجة كثافة بصرية (تقريبا 2.5×10^7 وحدة مشكّلة لمستعمرات/مل). توضع أجزاء قاسمة تامة من العينات على أطباق ميكروتيتر (بمعدل جيبين لكل عينة، ومقدار 100ميكرولتر/جيب). ينبغي تضمين شاهد إيجابي (زرع مرجعي أو عينة يزودها المصنّع) وشاهد دارئ سلبي مع بكتير آخر. تحضن الأطباق خلال الليل على حرارة 37 درجة مئوية إلى أن تصبح جافة. ويضاف محلول معوّق (5 في المائة من مسحوق الحليب المجفف الخالي من الدسم في المحلول الملحي المدروء بالفوسفات) (200 ميكرولتر/جيب). تحضن الأطباق لمدة 30 دقيقة على درجة حرارة الغرفة ومن ثم تغسل مرتين بمزيج من المحلول الملحي المدروء بالفوسفات العادي التركيز والتوين. يضاف جسم مضاد أولي مناسب الذوبان إلى مسحوق الحليب المجفف بنسبة 2.5 في المائة في خليط المحلول الملحي المدروء بالفوسفات-التوين (100ميكرولتر/جيب). وتحضن الأطباق لمدة ساعة واحدة على درجة حرارة الغرفة ومن ثم تغسل خمس مرات بمزيج من المحلول الملحي المدروء بالفوسفات العادي التركيز والتوين. ويضاف أنزيم مقترن مناسب الذوبان إلى مسحوق الحليب المجفف بنسبة 2.5 في المائة بمزيج من المحلول الملحي المدروء بالفوسفات العادي التركيز والتوين (100ميكرولتر/جيب). تحضن الأطباق لمدة ساعة واحدة على درجة حرارة الغرفة ومن ثم تغسل خمس مرات بمزيج من المحلول الملحي المدروء بالفوسفات المركّز مرة واحدة. يضاف محلول أساسي معد حديثا يحتوي 1مغ/مل من فوسفات بارا-نيتروفنيل إلى محلول مدروء بثاني أمين الإيثانول (درجة الحموضة 9.8) (100 ميكرولتر/جيب). تحضن الأطباق بين 30 و60 دقيقة على درجة حرارة الغرفة. تقاس الكثافة البصرية بواسطة مقياس طيف الضوء المزود بفلتر 405 نانومتر. ويتم تحديد العينات الإيجابية كما يجري في طريقة DAS-ELISA.

4-3 اختبار القدرة الإمراضية

ينبغي تحديد *X. citri subsp. citri* من حيث قدرتها على الإمراض ضمن مجموعة من العوائل المرجعية مثل *C. paradisi var. Duncan* (الليمون الهندي) و*Citrus sinensis* (برتقال فالنسيا الحلو) أو *C. aurantiifolia* (الليمون المكسيكي)، لتأكيد التشخيص.

إن المقايسات على الأوراق من خلال الخرق بحقنة مزودة بإبرة أو بدونها على أنواع عوائل الحمضيات القابلة للإصابة، تتيح الدلالة على القدرة الإمراضية للمستعمرات البكتيرية. تفضّل الأوراق غير الناضجة المتفتحة بنسبة 50 إلى 70 في المائة بسبب ارتفاع قابليتها للإصابة. تنشأ الكلوم بعد مرور 7 إلى 14 يوما على تطعيم الأوراق السليمة أو الأوراق المنفصلة (Francis وآخرون، 2010؛ Koizumi، 1971) بعد الحضن على حرارة 25 درجة مئوية في بيئة عالية الرطوبة. مع تلك المقايسات، يمكن أن يميّز بسهولة تفاعل *X. citri subsp. citri* التآكلي الشبيه بالجسأة. يعاد استعلاق البكتيريا التي تنمو في وسط سائل أو المستعمرات من طبق أجار حديث الاستخدام، في ماء مقطر معقم ويتم تعديل التركيز ما بين 10^6 و10^8 من أجل تطعيم العوائل بها. وينبغي دائما إدراج شواهد سلبية وإيجابية. وعلى النباتات المطعمة بسلالة الشاهد الإيجابي أن تبقى منفصلة عن نباتات الاختبار.

4-4 الوصف والخصائص الكيميائية الحيوية

إن *X. citri subsp. citri* جرثومة سلبية الغرام ومستقيمة وعصوية الشكل ويبلغ مقاسها 1.5–2.0 × 0.5–0.75 ميكرومتر. وهي قادرة على الحركة بواسطة زائدة قطبية واحدة شبيهة بالسوط. وهي تشترك في العديد من الخصائص الفسيولوجية والكيميائية الحيوية مع أعضاء آخرين من فئة *Xanthomonas*. إنها كيميائية وعضوية التغذية، وهوائية بشكل ملزم وتستقلب الغلوكوز بالأكسدة. الصباغ الأصفر هو الـxanthomonadin. وترد بعض الخصائص الكيميائية الحيوية التي تعرّف عن *X. citri subsp. citri* في الجدول 2.

الجدول 2– الخصائص الكيميائية الحيوية الرئيسية لجرثومة *Xanthomonas citri subsp. citri*

الاختبار	النتيجة
كاتالاز	+
أوكسيداز	– أو ضعيف
خفض النيترات	–
التحليل المائي لـ:	
النشاء	+
الكازيين	+
توين 80	+
إيسكولين	+
تسييل الجيلاتين	+
تسييل هلام البكتات	+
استخدام الأسباراجين	–
يتطلب النمو:	
ميثيونين	+
سيستيين	+
0.02 في المائة من كلوريد ثلاثي فينيل تترازوليوم (كتلة/حجم)	–

4-5 التحديد الجزيئي

تم تحديد ملامح آفات الحمضيات على المستوى الجزيئي، بما فيها جرثومة *X. citri subsp. citri* واعتبر صنف *Xanthomonas* عامة بأنه يتسم بطرق سريعة ودقيقة لإعادة تصنيفه وتحديده. وتشمل الإجراءات التهجين بين الأحماض النووية (Vauterin وآخرون، 1995)، وأخذ بصمات الجينوم (Hartung وآخرون، 1987؛ Lazo وآخرون، 1987)، وتحليل السلاسل متعددة المواقع (Young وآخرون، 2008) وrep-PCR (Cubero وGraham، 2002، 2004).

4-5-1 تحليل السلاسل متعددة المواقع

استخدم نهج تحليل السلاسل متعددة المواقع من أجل التحديد الخاص لجرثومة *X. citri subsp. citri* (Almeida وآخرون، 2010؛ Bui Thi Ngoc وآخرون، 2010؛ Young وآخرون، 2008). يتم تضخيم جينات تدبير شؤون التركيب

الوراثي، بواسطة البادئات، وبناء على ظروف تفاعل البوليميراز المتسلسل التي وصفها كل من Almeida وآخرين (2010) وBui Thi Ngoc وآخرين (2010) وYoung وآخرين، (2008). تقوم هذه الطريقة على سلسلة مواقع متعددة (عادة ما تكون أربع إلى ثماني جينات لتدبير شؤون التركيب الوراثي) وتتم مقارنة تلك السلاسل مع السلاسل المرجعية لصنف *Xanthomonas* المودع لدى قاعدات بيانات النيكليوتيدات؛ مثلا، قاعدة البيانات المشتركة لميكروبات النبات (http://genome.ppws.vt.edu/cgi-bin/MLST/home.pl) (Almeida وآخرون، 2010) وMLVAbank للتنميط الجيني للميكروبات (https://bioinfo-prod.mpl.ird.fr/MLVA_bank/Genotyping/).

4-5-2 أخذ البصمات بطريقة Rep-PCR

يمكن لأخذ البصمات بطريقة Rep-PCR عبر استخدام البادئات المصممة بناء على عناصر بالندرومية لاجينية متكررة — تسلسلات التوافق الجيني المتكرر البكتيري المعوي وعنصر BOX (Louws وآخرون، 1994) — أن يستعمل للتحديد ولتوصيف الخصائص ضمن الظروف المحددة لتفاعل البوليميراز المتسلسل (Cubero وGraham، 2002).

بالوسع استخراج الحمض النووي من المستعلقات البكتيرية (الامتصاص على مستوى 600 نانومتر من 0.2 إلى 0.5) في خطوة واحدة مع كحول إيزو أميل كلوروفورم فينول، المترسبة في الإيثانول والمستعلقة من جديد في الماء الفائق النقاء. يخزن الحمض النووي على حرارة 20 تحت الصفر حتى استعماله. ويمكن أيضا اتباع إجراءات استخراج الحمض النووي الموصوفة في القسم 3-1-4-2.

يتم تفاعل البوليميراز المتسلسل BOX في خلائط للتفاعل بمقدار 25ميكرولتر تحتوي دارئة تاك مركزة مرة واحدة، و6 ميليمولار من كلوريد المغنيسيوم، 2.4 ميكرومتر من بادئة BOX1R (5′-CTACG-GCAAGGCGACGCTGCAG-3′) (Louws وآخرون، 1994)، 0.2 ميكرومتر من كل dNTP، 2 وحدة بوليميراز الحمض النووي تاك و5ميكرولتر من الحمض النووي المستخرج من سلالات Xanthomonad. وتتمثل ظروف التفاعل بخطوة مسخ أولية على حرارة 94 درجة مئوية لمدة 5 دقائق تليها 40 دورة على حرارة 94 درجة مئوية لمدة 30 ثانية، و48 درجة مئوية لمدة 30 ثانية و72 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة، وخطوة نهائية على حرارة 72 درجة مئوية لمدة 10 دقائق. تحلل منتجات تفاعل البوليميراز المتسلسل في هلام الأجاروز بنسبة 3 في المائة في دارئة من ثلاثي أسيتات حمض الإيثيليندياميين رباعي الخليك (40ميليمولار/لتر من ثلاثي الأسيتات؛ 1ميليمولار/لتر حمض الإيثيليندياميين رباعي الخليك؛ درجة الحموضة 8.0) لمدة ساعتين بقوة 110 فولتات وتصبغ ببروميد الإثيديوم.

يتم تفاعل البوليميراز المتسلسل ERIC في خلائط للتفاعل بمقدار 25ميكرولتر تحتوي دارئة تاك مركزة مرة واحدة، و3 ميليمولار من كلوريد المغنيسيوم، 1.2ميكرومتر من بادئة ERIC1R (5′-ATGTAAGCTCCT-GGGGATTCAC-3′) وERIC2 (5′-AAGTAAGTGACT-GGGGTGAGCG-3′) (Louws وآخرون، 1994)، 0.2 ميكرومتر من كل dNTP، 2 وحدة بوليميراز الحمض النووي تاك و5 ميكرولتر من الحمض النووي المستخرج من سلالات Xanthomonad. أما ظروف التفاعل فهي نفسها المسجلة لتفاعل البوليميراز المتسلسل BOX. وتظهر منتجات التفاعل في هذه الحالة كما منتجات تفاعل BOX.

يمكن مقارنة البصمات (الأنماط المحددة المعالم) وتحليلها لإيجاد أوجه الشبه بالعين المجردة ولكن يمكن للأنماط أن تتحول أيضا إلى أنماط ناتئة وسلالات مقارنة، عبر استخدام برمجية معلوماتية مثل BioNumerics (للرياضيات التطبيقية). وعلى تحديد الجرثومة أن يرتكز على الشبه مع أنماط سلالات الشاهد (المرجعي) (القسم 4).

ترد خطط الكشف جرثومة *Xanthomonas citri* subsp. *citri* وتحديدها على المواد النباتية الحاملة للأعراض وعديمة الأعراض في الشكلين 5 و6 تباعا.

5– السجلات

ينبغي الاحتفاظ بالسجلات والبراهين حسب ما هو مبين في القسم 2–5 من المعيار رقم 27: 2006 في المعايير الدولية لتدابير الصحة النباتية.

وفي الحالات التي قد تتأثر بها أطراف متعاقدة أخرى سلبا بنتائج التشخيص، يستحسن الاحتفاظ بالعينة الأصلية (ووسمها لتيسير تتبعها) ومستنبت(ات) الآفة، والعينات المحفوظة أو المثبت أو مواد الاختبارات (مثل صور أنواع الجل، ونسخة مطبوعة لنتائج "إليزا"، وأمبليكونات تفاعل البوليميراز المتسلسل) لسنة واحدة على الأقل، لا سيما في حالات عدم الامتثال (المعيار الدولي رقم 13: 2001 *خطوط توجيهية للإبلاغ عن حالات عدم التقيّد باشتراطات الصحة النباتية والإجراءات الطارئة*) وحيث *تكتشف الآفات للمرة الأولى في بلد معين أو منطقة معينة*.

6– نقاط الاتصال للحصول على معلومات إضافية

General Direction of Agricultural Services, Biological Laboratories Department, Av. Millán 4703, CP 12900, Montevideo, Uruguay (Enrique F. Verdier; e-mail: emvermar@adinet.com.uy; tel.: +598 23043992).

Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera Moncada-Náquera km 4.5, 46113 Moncada (Valencia), Spain (María M. López; e-mail: mlopez@ivia.es; tel.: +34 963424000; fax: +34 963424001).

Instituto Nacional de Investigación Agraria y Tecnologia Alimentaria, INIA, Ctra de La Coruña km 6, Madrid, Spain (Jaime Cubero; e-mail: cubero@inia.es; tel.: +34 913473900; fax: +34 913572293).

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

حرر المسودة الأولى لهذا البروتوكول السيد E.F. Verdier من المديرية العامة للخدمات الزراعية، دائرة المختبرات البيولوجية، أوروغواي (أنظر القسم 6 للاطلاع على التفاصيل) ونقحتها السيدة ر. لانفرانكي، مختبر آفات وأمراض النبات، الشعبة الوطنية لصحة الأغذية الزراعية وجودتها، SENASA، جادة Ing. Huergo 11071001 CP، بوينس آيرس، الأرجنتين (ريتا لانفرانكي، البريد الإلكتروني: ritalanfranchi@hotmail.com رقم الهاتف: 43621177 +5411 int

118)؛ السيد إد سيفيرولو، وزارة الزراعة الأميركية، الولايات المتحدة (البريد الإلكتروني: emciv@comcast.net) والسيدة M.M. López، معهد فالنسيا للبحوث الزراعية، إسبانيا (أنظر القسم 6 للاطلاع على التفاصيل). بالإضافة إلى ذلك، شارك السيد ج. كوبيرو من المعهد الوطني للبحوث والتكنولوجيا في مجال الزراعة، إسبانيا (أنظر القسم 6 للاطلاع على التفاصيل) مشاركة كبيرة في صياغة هذا البروتوكول.

8- المراجع

Almeida, N.F., Yan, S., Cai, R., Clarke, C.R., Morris, C.E., Schaad, N.W., Schuenzel, E.L., Lacy, G.H., Sun, X., Jones, J.B., Castillo, J.A., Bull, C.T., Leman, S., Guttman, D.S., Setubal, J.C. & Vinatzer, B. A. 2010. PAMDB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes. *Phytopathology*, 100(3): 208–215.

Álvarez, A.M., Benedict, A.A., Mizumoto, C.Y., Pollard, L.W. & Civerolo, E.L. 1991. Analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* and *X.c.* pv. *citrumelo* with monoclonal antibodies. *Phytopathology*, 81: 857–865.

Bui Thi Ngoc, L., Vernière, C., Jouen, E., Ah-You, N., Lefeuvre, P., Chiroleu, F., Gagnevin, L. & Pruvost, O. 2010. Amplified fragment length polymorphism and multilocus sequence analysis-based genotypic relatedness among pathogenic variants of *Xanthomonas citri* pv. *citri* and *Xanthomonas campestris* pv. *bilvae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(3): 515–525.

Bull, C.T., De Boer, S.H., Denny, T.P., Firrao, G., Fischer-Le Saux, M., Saddler, G.S., Scortichini, M., Stead, D.E. & Takikawa, Y. 2010. Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980–2007. *Journal of Plant Pathology*, 92(3): 551–592.

CABI. 2006. *Crop protection compendium.* Wallingford, UK, CABI.

Civerolo, E.L. & Fan, F. 1982. *Xanthomonas campestris* pv. *citri* detection and identification by enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Disease*, 66: 231–236.

Coletta-Filho, H.D., Takita, M.A., Souza, A.A., Neto, J.R., Destefano, S.A.L., Hartung, J.S. & Machado, M.A. 2006. Primers based on the rpf gene region provide improved detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in naturally and artificially infected citrus plants. *Journal of Applied Microbiology*, 100(2): 279–285.

Cubero, J. & Graham, J.H. 2002. Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1257–1264.

Cubero, J. & Graham, J.H. 2004. The leucine-responsive regulatory protein (lrp) gene for characterization of the relationship among *Xanthomonas* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 429–437.

Cubero, J. & Graham, J.H. 2005. Quantitative real time polymerase chain reaction for bacterial enumeration and allelic discrimination to differentiate *Xanthomonas* strains on citrus. *Phytopathology*, 95: 1333–1340.

Cubero, J., Graham, J.H. & Gottwald, T.R. 2001. Quantitative PCR method for diagnosis of citrus bacterial canker. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2849–2852.

Delcourt, S., Vernière, C., Boyer, C., Pruvost, O., Hostachy, B. & Robène-Soustrade, I. 2013. Revisiting the specificity of PCR primers for diagnostics of *Xanthomonas citri* pv. *citri* by experimental and in silico analyses. *Plant Disease*, 97(3): 373–378.

Dye, D.W. 1978. Genus IX. Xanthomonas Dowson 1939. *In*: Young, J. M., Dye, D. W., Bradbury, J. F., Panagopoulos, C. G., & Robbs, C. F. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 21(1): 153-177.

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 1979. *Xanthomonas axonopodis* pv. c*itri*. Data Sheets on Quarantine Pests. EPPO A1 list No. 1. Paris, EPPO.

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 1998. *Phytosanitary procedure* Xanthomonas axonopodis *pv.* citri. *Inspection, test and survey methods.* EPPO Standard PM 3/27(1). Paris, EPPO.

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2006. PQR database (version 4.5). Paris, EPPO.

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2009. *Indirect immunofluorescence test for plant pathogenic bacteria.* EPPO Standard PM 7/97(1). Paris, EPPO.

Escalon, A., Javegny, S., Vernière, C., Noël, L.D., Vital, K., Poussier, S., Hajri, A., Boureau, T., Pruvost, O., Arlat, M. & Gagnevin, L. 2013. Variations in type III effector repertoires, pathological phenotypes and host range of *Xanthomonas citri* pv. *citri* pathotypes. *Molecular Plant Pathology*, 14(5): 483–496.

Francis, M.I., Pena, A. & Graham, J.H. 2010. Detached leaf inoculation of germplasm for rapid screening of resistance to citrus canker and citrus bacterial spot. *European Journal of Plant Pathology*, 127(4): 571–578.

Gabriel, D.W., Kingsley, M.T., Hunter, J.E. & Gottwald, T. 1989. Reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse) and *X. phaseoli* (ex Smith) to species and reclassification of all *X. campestris* pv. *citri* strains. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39(1): 14–22.

Golmohammadi, M., Cubero, J., Peñalver, J., Quesada, J.M., López, M.M. & Llop P. 2007. Diagnosis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, causal agent of citrus canker in commercial fruits by isolation and PCR based methods. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6): 2309–2315.

Goto, M. 1992. Citrus canker. *In* J. Kumer, H.S. Chaube, U.S. Singh and A.N. Mukhopadhyay, eds. *Plant diseases of international importance,* Vol. III, *Diseases of fruit crops,* pp. 170–208. Upper Saddle River, NJ, Prentice Hall.

Graham, J., Gottwald, T.R., Civerolo, E.L. & McGuire, R.G. 1989. Population dynamics and survival of *Xanthomonas campestris* in soil in citrus nurseries in Maryland and Argentina. *Plant Disease*, 43(5): 423–427.

Hall, D.G., Gottwald, T.R. & Bock, C.H. 2010. Exacerbation of citrus canker by citrus leafminer *Phyllocnistis citrella* in Florida. *Florida Entomologist,* 93(4): 558–566.

Hartung, J.S. & Civerolo, E.L. 1987. Genomic fingerprinting of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* strains from Asia, South America and Florida. *Phytopathology*, 77: 282–285.

Hartung, J.S., Daniel, J.F., Pruvost, O.P. & Civerolo, E.L. 1993. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by the polymerase chain reaction method. *Applied and Environmental Microbiology,* 59(4): 1143–1148.

Hasse, CH. 1915. Pseudomonas citri, the cause of citrus canker. A preliminary report. Journal of Agricultural Research 4, 97-100.

ISPM 13. 2001. Guidelines for the notification of non-compliance and emergency action. Rome, IPPC, FAO.

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

Koizumi, M. 1971. A quantitative determination method for *Xanthomonas citri* by inoculation into detached citrus leaves. *Bulletin of the Horticultural Research Station (Japan), Series B,* 11: 167–182.

Lazo, G.R., Roffey, R. & Gabriel, D.W. 1987. Pathovars of *Xanthomonas campestris* are distinguishable by restriction fragment-length polymorphism. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37: 214–221.

Llop, P., Caruso, P., Cubero, J., Morente, C. & López, M.M. 1999. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *Journal of Microbiology Methods*, 37: 23–31.

Louws, F.J., Fulbright, D.W., Taylor Stephens, C. & Bruijn, F.J. 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 2286–2295.

Mafra, V., Kubo, K.S., Alves-Ferreira, M., Ribeiro-Alves, M., Stuart, R.M., Boava, L.P., Rodrigues, C.M. & Machado, M.A. 2012. Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. *PloS One*, *7*(2), e31263.

Mavrodieva, V., Levy, L. & Gabriel, D.W. 2004. Improved sampling methods for real-time polymerase chain reaction diagnosis of citrus canker from field samples. *Phytopathology*, 94: 61–68.

Monier, L. 1992. *Contribution à la mise au point d´un milieu de culture semi-sélectif pour la détection de* Xanthomonas campestris *pv.* citri, *agent du chancre bactérien des agrumes*. Angers, France, École Nationale d´Ingénieurs des Travaux de l´Horticulture et du Paysage d´Angers, Institut de Recherches sur les Fruits et Agrumes (IRFA). 62 pp [in French].

Namekata, T. de Oliveira, AR. Comparative serological studies between *Xanthomonas citri* and a bacterium causing canker on Mexican lime. *In* Proceedings of International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Wageningen, The Netherlands, 1972, pp.151-152

Park, D., Hyun, J., Park, Y., Kim, J., Kang, H., Hahn, J. & Go, S. 2006. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by PCR using pathovar specific primers based on *hrpW* gene sequences. *Microbiological Research*, 161(2): 145–149.

Pruvost, O., Roumagnac, P., Gaube, C., Chiroleu, F. & Gagnevin, L. 2005. New media for the semiselective isolation and enumeration of *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*, the causal agent of mango bacterial black spot. *Journal of Applied Microbiology*, 99(4): 803–815.

Schaad, N.W., Postnikova, E., Lacy, G.H., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P.E., Stromberg, V.K. & Vidaver, A.K. 2005. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel *et al.*, 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel *et al.*, 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker *et al.*, 1935) sp. nov. nom. rev.; and "var. *fuscans*" of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 28: 494–518.

Schaad, N.W., Postnikova, E., Lacy, G.H., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P.E., Stromberg, V.K. & Vidaver, A.K. 2006. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Systematic and Applied Microbiology*, 29: 690–695.

Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P. E., Stromberg, V. K. & Vidaver, A. K. (2007). *Xanthomonas alfalfae* sp. nov., *Xanthomonas citri* sp. nov. and *Xanthomonas fuscans* sp. nov. *In* List of New Names and New Combinations Previously Effectively, but not Validly, Published, Validation List no. 115. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 893–897.

Sun, X., Stall, R.E., Jones, J.B., Cubero, J., Gottwald, T.R., Graham, J.H., Dixon, W.D., Schubert, T.S., Chaloux, P.H., Stromberg, V.K., Lacy, G.H. & Sutton, B.D. 2004. Detection and

characterization of a new strain of citrus canker bacteria from Key/Mexican lime and alemow in South Florida. *Plant Disease*, 88(11): 1179–1188.

Taylor, R.K., Tyson, J.L., Fullerton, R.A. & Hale, C.N. 2002. Molecular detection of exotic phytopathogenic bacteria: A case study involving canker-like symptoms on citrus. *New Zealand Plant Protection*, 55: 53–57.

Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K. & Swings, J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45: 472–489.

Verdier, E., Zefferino, E. & Méndez, S. 2008. Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* on the surface of citrus fruit after postharvest treatment *Fitopatologia*, 43: 24–31.

Vernière, C., Hartung, J.S., Pruvost, O.P., Civerolo, E.L., Álvarez, A.M., Maestri, P. & Luisetti, J. 1998. Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. *European Journal of Plant Pathology*, 104: 477–487.

Weisberg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, B.A. & Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173: 697–703.

Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N.C., Boonham, N., & Stead, D.E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) Assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7): 2853–2858.

Young, J.M., Park, D.C., Shearman, H.M. & Fargier, E. 2008. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Systematic and Applied Microbiology*, 31(5): 366–377.

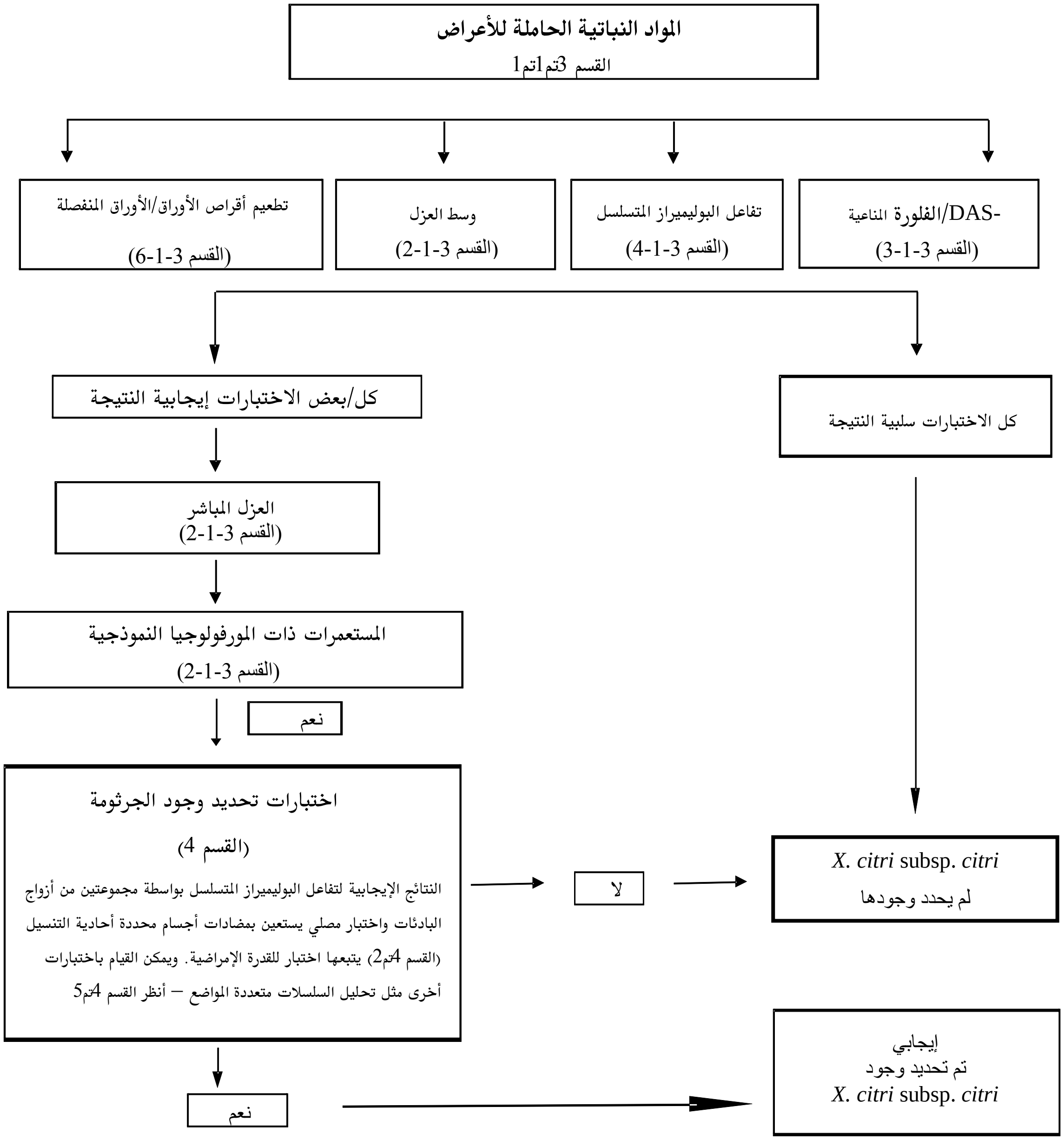
9– الأشكال

الشكل 1– الأعراض النموذجية لقرحة الحمضيات على أغصان الليمون الهندي (*Citrus paradisi*) وسيقانه وثمرته.

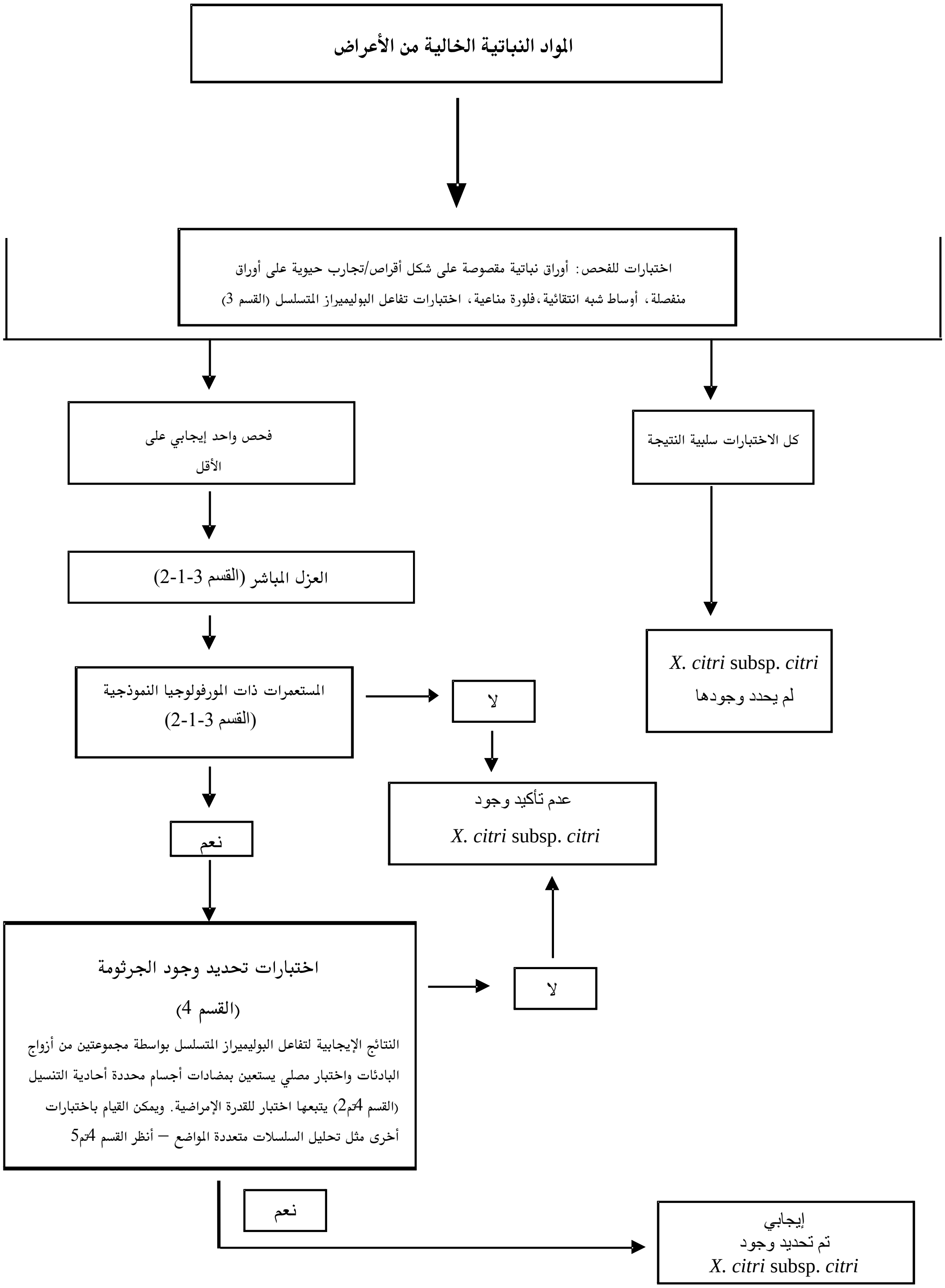
الشكل 2– غصين يحمل أعراض قرحة الحمضيات: كلوم مبكرة على الليمون الهندي (*Citrus paradise*).

الشكل 3– أعراض قرحة الحمضيات على ثمرة البرتقال الحلو (*Citrus sinensis*) (اليسار) والليمون الهندي (*Citrus paradisi*) (وسط ويمين).

الشكل 4– أعراض قرحة الحمضيات على ورقة الليمون (*Citrus limon*) وقد تفاقمت جراء الجراح الناجمة عن نقابة أوراق الحمضيات.



الشكل 5– نظام كشف وتحديد *Xanthomonas citri* **subsp**. *citri* *على المواد النباتية الحاملة للأعراض*.



الشكل 6– نظام لكشف وتحديد *Xanthomonas citri* subsp. *citri* على المواد النباتية الحاملة للأعراض.

تاريخ المطبوع

11-2004 أضافت اللجنة التوجيهية موضوع *Xanthomonas axonopodis pv. Citri* (2004-2011) إلى برنامج العمل

أضافت الدورة الأولى للهيئة (2006) موضوع *Xanthomonas axonopodis pv. Citri* (2004-2011) تحت موضوع: البكتيريا [أضف رقم الموضوع]

11-2012 راجع فريق الخبراء المعني ببروتوكولات التشخيص مشروع البروتوكول المعدل

04-2013 وافقت اللجنة التوجيهية على المشروع لإحالته إلى مشاورة الأعضاء عبر القرارات الإلكترونية (*eSC_May_12_*2013)

07-2013 مشاورة الأعضاء

02-2014 نقحه فريق الخبراء المعني ببروتوكولات التشخيص ورفعه إلى اللجنة التوجيهية للموافقة عليه واعتماده (*eTPDP_Feb_02_*2014)

04-2014 رفع إلى اللجنة التوجيهية لتوافق على اعتماده عبر القرارات الإلكترونية (*eSC_May_16_*2014)

04-2014 وافقت اللجنة التوجيهية على فترة الإخطار 45 يوما عبر القرارات الإلكترونية (*eSC_Nov_03_*2014)

07-2014 اعتمدت اللجنة التوجيهية بروتوكول التشخيص نيابة عن الهيئة (لم تتلق أي اعتراضات رسمية)

المعيار الدولي 2006:27: الملحق 6: *Xanthomonas citri subsp. citri* (2014). روما، الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات، الفاو.

آخر تحديث لتاريخ المنشور: 29-08-2014