اعتمدت لجنة المعايير بالنيابة عن هيئة تدابير الصحة النباتية بروتوكول التشخيص هذا في يناير/كانون الثاني 2015

هذا الملحق جزء ملزم من المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية 27

المعيار الدولي رقم 27

الملحق 7

المعايير الدولية لتدابير الصحة النباتية

المعيار الدولي 27: بروتوكولات تشخيص

بروتوكول التشخيص: 7

فيرود درنة البطاطا المغزلية

Potato spindle tuber viroid

(اعتمد في 2016 ونشر في 2016)

المحتويات

1- معلومات عن الآفة

الفيرودات (أشباه الفيروسات) هي جزيئات من الحمض النووي الريبي RNA تتألف من جديلة وحيدة غير مغلفة مغلقة الدائرة بشكل ترابطي يبلغ طولها 293–401 نيوكليوتايد تُنسخ نسخاً متماثلاً بأنزيمات مضيفة (Hammond & Owens, 2006). وفي العادة، يبلغ طول فيرود درنة البطاطا المغزلية (من نوع *Pospiviroid*) 359 نيوكليوتيد، ولكن تفيد تقارير أن هناك مستخلصات منها يبلغ طولها 341–364 نيوكليوتيد (Wassenegger *وآخرون*، 1994؛ Shamloul *وآخرون*، 1997؛ Jeffries، 1998). وقد وصفت سلالات خفيفة وشديدة الأعراض على أساس أعراض في أصناف البندورة الحساسة؛ على سبيل المثال، *Solanum lycopersicum L.* (بندورة) *cv. Rutgers* (Fernow, 1967).

المجموعة الطبيعية المضيفة لفيرود درنة البطاطا المغزلية ضيقة نسبيا. فالمضيفات الطبيعية الرئيسية هي من نوع *Solanum* spp. المدّادة–المشكّلة–للدرنات، مثلاً *Solanum tuberosum* L. (بطاطا) و*S. lycopersicum* (بندورة). كما وجد فيرود درنة البطاطا المغزلية أيضاً في *Capsicum annuum* و*Persea americana* و*S. muricatum*. واكتشف أساساً في عائلة أنواع نباتات الزينة المتكاثرة نباتياً من العائلة الباذنجانية Solanaceae – وهي *Brugmansia* spp. و*Cestrum* spp. و*Datura* sp. و*Lycianthes rantonetti* و*Petunia* spp. و*Physalis peruviana* و*Solanum* spp. و*Streptosolen jamesonii* – ولكن أيضا في *Chrysanthemum* sp و*Dahlia* × *hybrida* وفي عائلة النجميات Asteraceae (للاطلاع على مزيد من تفاصيل المضيفات الطبيعية، أنظر المركز الدولي للزراعة والعلوم البيولوجية (CABI)، (بدون تاريخ)). أما المجموعة المضيفة التجريبية لهذا الفيرود فواسعة تشمل أنواع في العائلة الباذنجانية Solanaceae، ولكن أيضا بعض الأنواع في تسع عائلات أخرى على الأقل. ويظهر معظم المضيفين أعراضاً مرضية قليلة أو لا يظهروا أية أعراض (Singh, 1973؛ وSingh *وآخرون* 2003).

وفي بعض بلدان أو دول في أفريقيا وآسيا وأوروبا الشرقية وأمريكا الشمالية، وجد أن فيرود درنة البطاطا المغزلية يصيب *S. tuberosum* (منظمة حماية النباتات في أوروبا ومنطقة البحر الأبيض المتوسط (EPPO)/المركز الدولي للزراعة والعلوم البيولوجية (CABI) 1997)، وأمريكا الوسطى (Badilla *وآخرون* 1999)، وأمريكا الجنوبية ومنطقة الشرق الأوسط (Hadidi وآخرون، 2003). غير أن توزيعه الجغرافي أوسع نطاقا في أنواع نباتات الزينة وغيرها من المضيفات (للتوزيع الجغرافي، أنظر (CABI) (بدون تاريخ)).

وفي *Solanum tuberosum*، الوسيلة الرئيسية لانتشار فيرود درنة البطاطا المغزلية هو التكاثر النباتي. كما أنه ينتشر أيضاً عن طريق الاتصال وأساساً عن طريق الآلات في الحقول وقطع بذور درنات البطاطا (Hammond & Owens, 2006). وهو ينتقل في بذور البطاطا الحقيقية – قد يكون ما يصل إلى 100 في المائة من البذور مصاباً (Fernow *وآخرون*، 1970؛ Singh، 1970) – وأيضاً في حبوب اللقاح (Grasmick & Slack, 1985؛ Singh *وآخرون*، 1992). وقد أفاد Bokx De وPirone (1981) أن هناك معدل انتقال منخفض عن طريق *Macrosiphum euphorbiae* ولكن ليس عن طريق الفصيلتين *Myzus persicae* أو *Aulacorthum solani* – ومع ذلك تفيد تقارير عن استحواذ تجريبي للفيرود وانتقاله عن طريق *M. persicae* من نباتات مصابة بكل من الفيرود وفيروس التفاف أوراق البطاطا (PLRV) (Salazar وآخرون، 1995؛ Singh & Kurz، 1997). وتبين لاحقاً أن

الفيرود مغلف بتنافر ضمن جزيئات فيروس التفاف أوراق البطاطا PLRV (Querci وآخرون، 1997)، وتلك ظاهرة قد تكون لها آثار هامة على انتشار الفيرود في الظروف الحقلية.

وينتشر الفيرود في *Solanum lycopersicum* بسهولة عن طريق الاتصال وتبين أيضاً أنه ينتقل عن طريق حبوب اللقاح والبذور (Kryczynski *وآخرون*، 1988؛ Singh، 1970). كما تبين أن الانتقال عن طريق بذور البندورة يساهم في انتشار الفيرود على المستوى الدولي (van Brunschot *وآخرون*، 2014). ومن الممكن أن ينتشر الفيرود أيضاً في بذور الفلفل (Lebas *وآخرون*، 2005).

وقد تقوم أنواع نباتات الزينة المصابة بدور مصدر للعدوى إذا ما تنوولت قبل لمس نباتات أخرى معرضة، وتبين أنها مسار لانتشار الفيرود على الصعيد الدولي (Navarro وآخرون، 2009؛ Verhoeven *وآخرون*، 2010). ولم يتبين أي انتقال للفيرود مع *Apis mellifera* أو *Bombus terrestris* أو*Frankliniella occidentalis* أو *Thrips tabaci* (Nielsen *وآخرون*، 2012).

إن فيرود درنة البطاطا المغزلية هو الفيرود الوحيد الذي من المعروف أنه يصيب طبيعياً أنواع *Solanum* المزروعة. غير أن فيرود *Mexican papita* يصيب الأنواع البرية *S. cardiophyllum* (*Martinez-Soriano وآخرون*، 1996). أما تجريبياً، فإن أنواعاً أخرى من الفيرويد من جنس *Pospiviroid* تصيب *S. tuberosum* (*Verhoeven وآخرون*، 2004).

وبالإضافة إلى فيرود درنة البطاطا المغزلية، وجد أن فيرودات pospiviroids أخرى تصيب طبيعياً *S. lycopersicum*، بما في ذلك *Citrus exocortis viroid* (CEVd؛ Mishra *وآخرون*، 1991)، و*Columnea latent viroid* (CLVd؛ Verhoeven *وآخرون*، 2010)، و*Mexican papita viroid* (MPVd؛ Ling & Bledsoe, 2009)، و *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd؛ Reanwarakorn *وآخرون*، 2011) و *Tomato apical stunt viroid* (TASVd؛ Walter 1987)، و *Tomato chlorotic dwarf viroid*(TCDVd؛ Singh *وآخرون*، 1999) و *Tomato planta macho viroid* (TPMVd؛ Galindo *وآخرون*، 1982).

2- المعلومات التصنيفية

الاسم: فيرود درنة البطاطا المغزلية (PSTVd)

المرادفات: فيروس درنة البطاطا المغزلية، فيروس البطاطا القوطي، فيروس تورّد القمة في البندورة

الوضع التصنيفي: Pospiviroidae، *Pospiviroid*

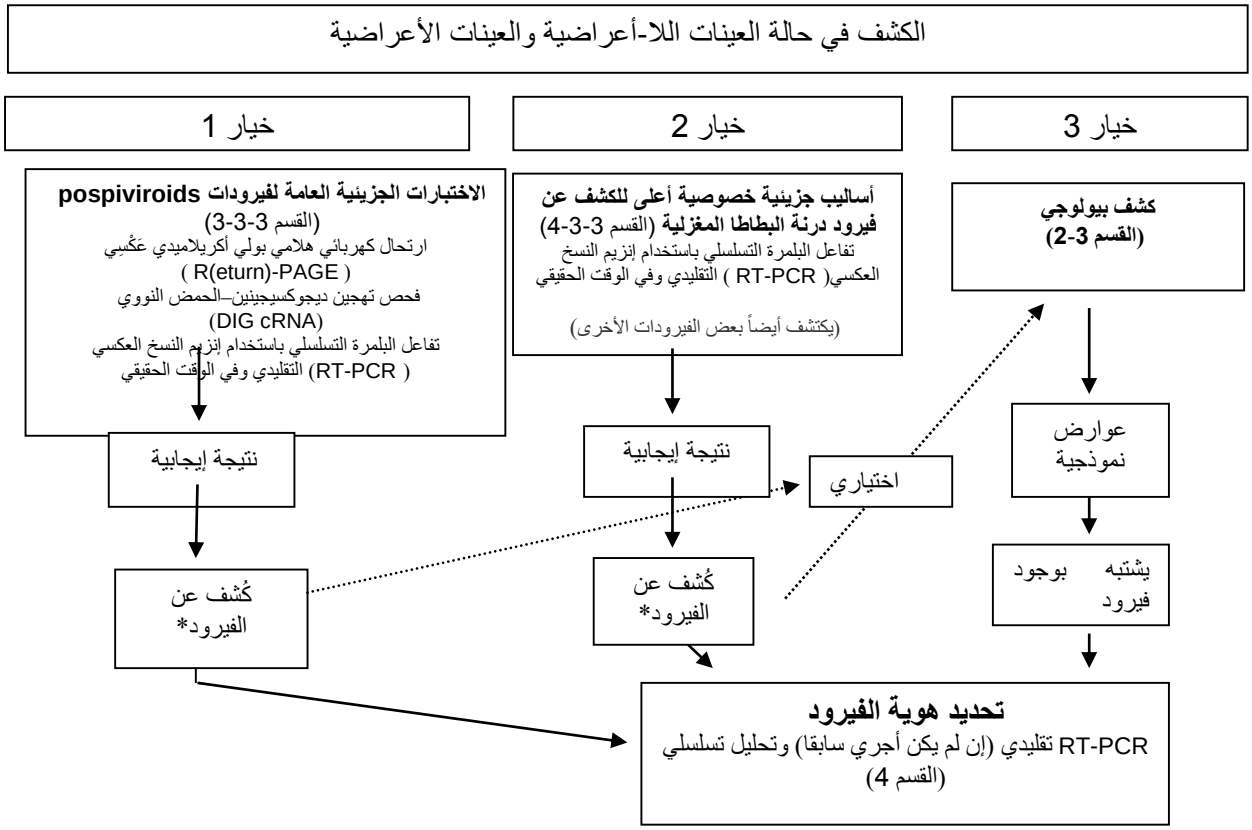
الأسماء الشائعة: درنة البطاطا المغزلية

3- الكشف

يعتمد ظهور الأعراض وشدتها على سلالة فيرود درنة البطاطا المغزلية وعلى الصنف المستنبت وبيئته. ففي صنف *S. tuberosum*، قد لا تظهر أعراض الإصابة أو تنتج أعراض تتراوح من المعتدل إلى الشديد (تخفيض في حجم النبات واستقامته وترتيب أوراق الشجر مع اتجاه عقارب الساعة عندما يُنظر إلى النباتات من أعلى؛ وأوراق خضراء غامقة ومغضَنة). وقد ينخفض حجم الدرنات أو تكون متشوهة الشكل أو مغزلية أو تأخذ شكل الدمبل مع عيون ناتئة بارزة موزعة توزيعاً منتظما (EPPO، 2004). وفي صنف *S. lycopersicum*، تشمل الأعراض التقزم والالتواء إلى أسفل والتغضَن والالتواء الجانبي للوريقات الجديدة وإخضرار وإحمرار وهشاشة ونخر الأوراق وإنخفاض حجم الفاكهة وعدم نضوج الفاكهة (Mackie *وآخرون*، 2002؛ Hailstones *وآخرون* 2003؛ Lebas *وآخرون*، 2005). وفي صنف *C. annuum*، تكون الأعراض دقيقة، إذ تظهر أوراق الشجر بالقرب من أعلى النبات هامشاً ذا حدّ متموج (Lebas *وآخرون*، 2005). ولا تظهر كافة أنواع نباتات الزينة التي دُرست حتى الآن أعراضا (Verhoeven, 2010).

ولأن الإصابات بفيرود درنة البطاطا المغزلية قد تكون بلا أعراض، يتطلب الكشف عنه وتحديد هويته إجراء اختبارات. ويمكن الكشف بالاختبارات البيولوجية والجزيئية التي يبينها الشكل 1 كخيارات، ولكن لتحديد هوية فيرود درنة البطاطا المغزلية، ينبغي إجراء تسلسل sequencing على الناتج من تفاعل البلمرة التسلسلي PCR، إذ أن الاختبارات ليست محددة به وستكتشف فيرودات أخرى. وسيساهم التسلسل أيضاً في الحيلولة دون الإبلاغ عن نتائج إيجابية كاذبة. وإذا اعتبرت القدرة الإمراضية هامة، يمكن القيام بفهرسة بيولوجية. وإذا ما جرى تحديد هوية الفيرود لأول مرة في البلد المعني، يمكن أن يؤكد التشخيص مختبر آخر.

وينبغي إدراج ضوابط ملائمة في جميع الاختبارات للتقليل إلى الحد الأدنى من مخاطر النتائج الإيجابية االزائفة أو السلبية الكاذبة.



الشكل 1– متطلبات الحد الأدنى للكشف عن فيرود درنة البطاطا المغزلية وتحديد هويته

* في حالات معينة، قد لا يلزم تحديد الهوية لكل عينة فيرود–إيجابية؛ مثلاً، عند التعامل مع تفشي الفيرود.

ملاحظة: في حالة الاشتباه بوجود فيرود في عينة معينة (أي أن الأعراض النموذجية موجودة)، عندما يعطي الاختبار نتيجة سالبة، ينبغي إجراء اختبارات أخرى للتأكد من النتيجة.

إن هذا الملحق معني بالكشف عن فيرود درنة البطاطا المغزلية؛ ولم يوضع للكشف عن أنواع أخرى من pospiviroid وتحديد هويتها. غير أنه ينبغي الأخذ بالاعتبار احتمال وجود فيرودات أخرى عند اختيار طريقة الكشف وتحديد الهوية. ولذا، يصف هذا الملحق طرق كشف غير محددة تكشف عن جميع الفيرودات المعروفة؛ بما في ذلك فيرودات pospiviroids مثل فيرود درنة البطاطا المغزلية. ويلزم لتحديد الهوية إجراء تسلسل sequencing على الناتج من تفاعل البلمرة التسلسلي PCR.

ويرد وصف لبروتوكولات الكشف عن فيرود درنة البطاطا المغزلية في الأنسجة من الأوراق والدرنات ومن البذور النباتية (الحقة). غير أن الكشف الموثوق في أنسجة البذور يشكّل تحدياً بشكل خاص.

ويرد في هذا البروتوكول التشخيصي وصف للطرق (بما في ذلك الإشارة إلى الأسماء التجارية) كما هي منشورة، إذ أن هذه حددت المستوى الأصلي للحساسية والخصوصية و/أو قابلية التكرار. ولا يعني استخدام أسماء الكواشف الكيمائية أو الأجهزة في بروتوكولات التشخيص المصادقة عليها ضمناً ولا استبعاد البعض الآخر الذي قد يكون مناسباً أيضاً. ويمكن تعديل الإجراءات المخبرية الواردة في البروتوكولات لتتوافق مع معايير المختبرات المفردة، شريطة أن يتم

التحقق من صحتها بشكل كاف. وتوفر منظمة حماية النباتات في أوروبا ومنطقة البحر الأبيض المتوسط (EPPO 2014) توصيات بشأن التحقق من الطرق في التقنيات التشخيصية للنبات phytodiagnostics.

ويتحدد أداء أي اختبار جزيئي بكل من المصفوفة التي سيجري اختبارها والخيار المتبنى لإعداد العينة اللاحقة واستخراج الحمض النووي وطرق الكشف وتحديد الهوية. ويقدم الجدول 1 نظرة عامة على بيانات التحقق المتوفرة لمصفوفات مختلفة ومجموعات من الطرق. ويرد وصف لتفاصيل هذه الطرق في الفقرة المقابلة لكل طريقة أو في المراجع المشار إليها.

3-1 أخذ العينات

يعرض المعيار 31 من المعايير الدولية لتدابير الصحة النباتية ISPM 31 (منهجيات أخذ العينات من الشحنات) إرشادات عامة لأخذ العينات.

النباتات الدقيقة الصغر (ميكروبلانتس) لصنف *S. tuberosum* وصنف *S. tuberosum* المربى في دفيئات زجاجية. بالنسبة للميكروبلانتس، ينبغي استخدام النبتة بكاملها كعينة أو اتخاذ أعلى ثلثين من النبتة كعينة في ظروف معقمة، لتمكين بقية النبات من مواصلة النمو. وينبغي أن يكون عمر الميكروبلانتس أربعة إلى ستة أسابيع بحيث يبلغ طول ساقه حوالي 5 سم وتكون أوراقه جيدة التكوين. وبالنسبة للنباتات التي تنمو في دفيئات زجاجية، ينبغي استخدام ورقة ممتدة تماماً من كل نبتة. ويكون تركيز الفيرود أخفض في درجات الحرارة ومستويات الضوء المنخفضة، ولذا ينبغي أن تنمّى النباتات عند درجة حرارة تبلغ 18 درجة مئوية على الأقل ولفترة ضوئية تبلغ 14 ساعة على الأقل. ويمكن استكثار الميكروبلانتس أو الأوراق؛ ويعتمد معدل الاستكثار على طريقة الاختبار المستخدم وينبغي التحقق من صحته.

النباتات من صنف *S. tuberosum* المزروعة في الحقل – ينبغي استخدام ورقة طرفية غير متدهورة بسبب العمر وممتدة تماماً من أعلى كل نبتة. ويمكن استكثار الأوراق معاً للاختبار؛ ويعتمد معدل الاستكثار على طريقة الاختبار المستخدم وينبغي التحقق من صحته.

درنات ***S. tuberosum*** – يكون الفيرود موزعاً بانتظام في درنات ***S. tuberosum*** المصابة (Shamloul وآخرون، 1997). ويحدث بكميات متساوية تقريباً في الأجزاء المختلفة من الدرنات المصابة الأساسية والثانوية (Roenhorst وآخرون، 2006). ويكون التركيز على أعلى مستوى له بعد الحصاد مباشرة. ولا ينخفض التركيز في الدرنات المخزنة على 4 درجات مئوية انخفاضاً كبيراً لمدة تصل إلى ثلاثة أشهر، لكنه يمكن أن ينخفض بعد ستة أشهر من التخزين بأكثر من 10^4 مرات. ويمكن أن تستخدم كعينة نواة منفردة من أي جزء من الدرنة ويمكن استكثارها؛ ويعتمد معدل الاستكثار على طريقة الاختبار المستخدم وينبغي التحقق من صحته.

أوراق المحاصيل الأخرى وأنواع نباتات الزينة – تستخدم أوراق صغيرة العمر ممتدة تماماً. ويمكن استكثارها معاً للاختبار؛ ويعتمد معدل الاستكثار على طريقة الاختبار المستخدم وينبغي التحقق من صحته. وتجدر ملاحظة أن تركيز الفيرود يتأثر بعمر/نضج النباتات، وهناك في كثير من الأحيان تقلبات موسمية. وبالإضافة إلى ذلك، يحتوي بعض الأنواع على كيماويات حيوية قد تحول دون انتقال الفيرود إلى نباتات الاختبار (مثل صنف *Brugmansia spp*) أو دون

تفاعل البلمرة التسلسلي باستخدام إنزيم النسخ العكسي (RT-PCR) (مثل صنف *Calibrachoa spp.* وصنف *Solanum jasminoides* وصنف *S. jamesonii*).

البذور– قد يختلف تركيز الفيرود اختلافاً كبيرا بين البذور وقد يختلف مستوى الإصابة من أقل من 1 في المائة إلى 100 في المائة. وهذا يجعل من الصعب جداً التوصية بحجم عينة ومعدل استكثار معينين (EUPHRESCO, 2010). وبالنسبة لصنف *S. lycopersicum*، استخدمت معدلات استكثار من 100 – 1000 لاختبار منفرد. ويعتمد معدل الاستكثار على طريقة الاختبار المستخدم وينبغي التحقق من صحته.

ويمكن أن تزرع بذور البطاطا في وسط إنماء (كالسماد العضوي) في صوانٍ وتختبر الشتلات/النباتات بطريقة غير مدمرة باستخدام الإجراء ذاته الموصوف للنباتات التي تنمو في دفيئات زجاجية (EPPO, 2006).

3–2 الكشف البيولوجي

سيتيح إلقاح نباتات *S. lycopersicum* (أصناف Rutgers أو Moneymaker أو Sheyenne) الكشف عن كثير من الفيرودات ولكن ليس كلها (مثلاً، ليست البندورة مضيفاً لـ*Iresine viroid 1* من مجموعة pospiviroid (IrVd-1؛ Spieker, 1996؛ Verhoeven *وآخرون*، 2010)) ويوفر أدلة بصرية على الإمراضية. غير أنه قد لا تكتشف بعض المستخلصات بسبب انعدام الأعراض. وعلاوة على ذلك، قد لا تكون الأعراض تشخيصية لفيرود درنة البطاطا المغزلية. وقد تتطلب الفهرسة البيولوجية قدراً كبيراً من مساحة الدفيئة الزجاجية، وقد يتطلب لاستكمال الاختبار عدة أسابيع أو أكثر. ولم ينجز أي عمل لمقارنة حساسية هذه الطريقة بحساسية طرق أخرى موصوفة في هذا البروتوكول، فإذا كانت أقل حساسية من الطرق الجزيئية، فإنها قد تكون أقل ملاءمة لاختبار البذور. غير أن من الممكن أن يضخم الفيرود في الفهرسة البيولوجية إلى مستوى يتيح الكشف عنه بطرق أخرى.

يطحن 200–500 ملليغرام تقريباً من أنسجة الورق أو الجذر أو الدرنة في كمية صغيرة تبلغ 0.1 ميليمولار من دارئ تلقيح الفوسفات (تكفي نسبة تمييع 1:1) الذي يحتوي على كاربورندم (400 مش). ويتكون دارئ الفوسفات (بدرجة حموضة 7.4) بجمع 80.2 ملليغرام من 1 ميليمولار K_2HPO_4 M مع 19.8 ملليغرام من 1 ميليمولار KH_2PO_4 M وتعديل الحجم بماء مقطر ليبلغ 1 لتر.

تُلقح نباتات البندورة غير الناضجة التي تنتشر فيها ورقة أو ورقتان مكتملتان. ويُغمس باللقاح إصبع في قفاز أو برعم قطن أو مسحة قطن ويحكّ سطح الورقة برفق باللقاح ثم تشطف الأوراق فورا بالماء حتى يزال الكاربورندم. وتنمّى النباتات بحيث تكون درجات الحرارة اليومية بين 24 و39 درجة مئوية في فترة ضوئية تبلغ 14 ساعة تستكمل بإنارة بخار الصوديوم بحوالي $\mu E/m^2/s650$ (Grassmick & Slack, 1985). وقد تؤدي درجات الحرارة الأخفض والإضاءة الأقل إلى تقليل حساسية الفحص. وتفحص النباتات أسبوعيا للتحقق من وجود أعراض لمدة تصل إلى ستة أسابيع بعد التلقيح. وتشمل أعراض فيرود درنة البطاطا المغزلية التقزم والالتواء إلى أسفل والتغضَن والالتواء الجانبي للوريقات الجديدة وإخضرار وإحمرار وهشاشة ونخر الأوراق.

سيتيح اختبار أحيائي على البندورة الكشف عن العديد من فيرودات pospiviroid (باستثناء IrVd-1، انظر أعلاه)؛ ولذا ينبغي إجراء تفاعل البلمرة التسلسلي باستخدام إنزيم النسخ العكسي (RT-PCR) على الحمض النووي المستخرج من نباتات مؤشرة للأعراض وينبغي تسلسل منتج تفاعل البلمرة التسلسلي لتحديد الهوية.

3–3 الكشف الجزيئي

3–3–1 إعداد العينات

ميكروبلانتس ومواد أوراق وجذور– استخدمت بنجاح أجران ومدقات أو خلاطات (مثل Homex 6 (Bioreba)) بأكياس استخراج (Bioreba) لطحن المواد. وقد تُيسّر التجانس إضافة كمية صغيرة من المياه أو من محلول دارئ (تعتمد تركيبته على الطريقة المستخدمة في استخراج الحمض النووي) أو تجميد العينة (مثلاً، في نيتروجين سائل).

وقد تم التحقق من صحة الإجراء التالي (أنظر الجدول 1) بالتضافر مع استخراج الحمض النووي باستخدام الطريقة 2 للاستخراج الخرزي المغناطيسي وفحص GenPospi بـ RT-PCR في الوقت الحقيقي الموصوف في هذا الملحق. وتجري مجانسة حوالي 1 غرام من الأنسجة في كيس استخراج باستخدام خلاط Homex 6 (Bioreba) مع 3.5 ملليغرام (بتراوح 1:2–1: 5 (وزن/حجم)) GH زائد محلول دارئ (6 ميليمولار غوانيدين هيدروكلوريد؛ و0.2 ميليمولار أَسيتاتُ الصُّوديوم؛ على درجة حموضة 5.2؛ و25 ميليمولار إيثيل ثُنَائي أمين حِمض الخليك الرباعي (EDTA)؛ و2.5 في المائة (بولي فينيل البيروليدون–10)، وبعد ذلك تحضن العينات لمدة 10 دقائق على 65 درجة مئوية بـ 850 دورة في الدقيقة في ثيرموميكسير (خلاّط حراري) (أو بالهز (ويُقلب الأنبوب ثلاث) مرات) وبطرد مركزي إضافي لمدة دقيقتين بقوة 000 16 غرام قبل استخراج الحمض النووي.

درنات *S. tuberosum* – تتجانس نوى الدرنة تماماً بالماء أو بمحلول دارئ (يعتمد تكوينه على الطريقة التي استخدمت لاستخراج الحمض النووي؛ 1ملليغرام لكل غرام نواة الدرنة). وقد استخدمت بنجاح طاحونة مثل Homex 6 مع أكياس استخراج. وييسر التجانس تجميد النوى (مثلاً على –20 درجة مئوية) قبل إضافة المياه أو المحلول الدارئ.

البذور– للأعداد الصغيرة من البذور (أقل من 100)، يمكن استخدام آلة Lyser Tissue (مثلاً، Retsch TissueLyser (Qiagen)). وللأعداد الأكبر من البذور، يمكن استخدام خلاط مجداف (مثل MiniMix (Interscience)) أو خلاط (مثل Homex 6) بكمية دنيا من محلول دارئ (تعتمد تركيبته على الطريقة المستخدمة لاستخراج الحمض النووي). ويمكن أيضا سحق البذور بمطرقة (Bertolini وآخرون، (b2014) أو باستخدام جرن ومدقة. وقد لا تكون الطريقة الأخيرة عملية للاستخدام الروتيني، إذ أن من الصعب ضبط التلوث. بدلاً من ذلك، يمكن استخدام النيتروجين السائل لتجميد العينة، لتطحن بعد ذلك في مطحنة خليوية (يمكن استخدام هذه الطريقة لأنواع الأنسجة الأخرى).

لقد تم التحقق من صحة الإجراء التالي (أنظر الجدول 1) بالتضافر مع استخراج الحمض النووي باستخدام الطريقة 2 للاستخراج الخرزي المغناطيسي وفحص RT-PCR في الوقت الحقيقي لـ Boonham *وآخرون* (2014) الوارد

في هذا الملحق. وتنقع كل عينة من العينات الفرعية الثلاث المكونة من 000 1بذرة في 20 ملليغرام من GH زائد محلول دارئ في 100 ملليغرام BagPage (Interscience) لمدة 30–60 دقيقة على درجة حرارة الغرفة، وتجانس لمدة 90 ثانية باستخدام BagMixer (Interscience) وتحضن (أو تهز أو تُفصل بالطرد المركزي كما للميكروبلانتس ومواد الورق والجذور) قبل استخراج الحمض النووي.

دمغ الأنسجة و/أو هرسها– تضغط عنيقات الورق أو البراعم المنفصلة على أغشية نايلون. ويمكن عمل عدة دمغات أو مسحوقات متداخلة جزئياً من أوراق و/أو براعم منفصلة مختلفة على حوالي 0.5 سم^2 من غشاء نايلون وفقاً لـ (Bertolini وآخرين (2014، a2008)، ويُقصّ الغشاء المحتوي على العينة المثبتة ويدخل في أنبوب صغير. وتنبغي مناولة العينة المثبتة بملاقط نظيفة. ويمكن خزن عينات الأنسجة المدموغة على درجة حرارة الغرفة في بيئة جافة ومعتمة لمدة ثلاثة أشهر على الأقل. ولاستخراج الحمض النووي الريبي من الغشاء، يضاف 100 ميكرولتر من دارئ الجليكاين لكل أنبوب صغير يحتوي على عينة ثابتة تدوّر بعد ذلك وتوضع على جليد حتى تضخيم تفاعل البلمرة التسلسلي (PCR).

3–3–2 استخراج الحمض النووي

يمكن استخدام مجموعة واسعة من طرق استخراج الحمض النووي تتراوح من أطقم الأدوات التجارية إلى طرق منشورة في مجلات علمية. وقد استخدمت أطقم أدوات ودوارئ وإجراءات استخراج الحمض النووي التالية بنجاح للكشف عن فيرود درنة البطاطا المغزلية.

أدوات تجارية– يمكن استخدام أطقم أدوات تجارية من مثل RNeasy (Qiagen) وMasterPure (Epicentre) وSbeadex (LGC Genomics) وفقا لإرشادات الشركة المصنعة. وقد قيّمت أطقم أدوات RNeasy لاستخراج الحمض النووي لفيرود درنة البطاطا المغزلية من مصفوفات مختلفة كجزء من مشروع EUPHRESCO للكشف عن فيرودات Pospiviroids ووبائياتها (EUPHRESCO, 2010).

الطريقة الواردة في Mackenzie وآخرين (1997)– تجانس الأنسجة النباتية (1:10 (وزن/حجم)) في محلول دارئ بسيط (4 ميليمولار غوانيدين إيزوثيوسيانات، و 0.2 ميليمولار أسيتات الصوديوم، و 25 ميليمولار إيثيل ثُنَائي أمين حِمض الخليك الرباعي (EDTA)، و2.5 في المائة بولي فينيل البيروليدون–40 (وزن/حجم)، و1 في المائة 2–مركابتوإيثانول (حجم/حجم) يضاف قبل الاستخدام مباشرة). ثم يخلط ملليلتر واحد من المزيج المتجانس مع 100 ميكرولتر من 20 في المائة من ساركوسيل (وزن/حجم) ويُحضن على 70 درجة مئوية لمدة 10 دقائق في خلاط حراري (ثيرموميكسير)، مع ارتجاج بقوة 200 1 دورة في الدقيقة، ويمكن استخدام هذه الطريقة لاستخراج حمض نووي ذي جودة من مجموعة واسعة من الأنواع النباتية.

طريقة باستخدام دارئ إيثيل ثُنَائي أمين حِمض الخليك الرباعي (EDTA)– تمكن مجانسة الأنسجة النباتية (1:4 (وزن/حجم)) في محلول دارئ بسيط (50 ميليمولار هيدروكسيد الصوديوم، و2.5 ميليمولار إيثيل ثُنَائي أمين حِمض الخليك الرباعي (EDTA)) ثم تُحضن (على حوالي 25 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة أو تفصل بالطرد المركزي (بقوة 000 12 غرام على 4 درجات مئوية لمدة 15 دقيقة). ويمكن أن تستخدم المواد الطافية بعد ذلك تبعاً لمستوى الحساسية المطلوب، إما مباشرة لـ RT-PCR (أقل حساسية) أو تُلطخ على غشاء النيترو–سليلوز وتزال

باستخدام الماء المقطر المعقم (أكثر حساسية) (Singh وآخرون، 2006). وعلى الرغم من أن تركيز الفيرود أقل لطريقة EDTA مما لطرق الاستخراج الأخرى المذكورة، لا ينبغي أن يكون ذلك عاملاً محدداً عندما تستخدم الطريقة مع RT-PCR أو فحص ديجوكسيجينين. وقد استخدمت هذه الطريقة مع صنفي *S. lycopersicum* و *S. tuberosum* ومع مجموعة من أنواع نباتات الزينة.

الفينول– كلوروفورم واستخراج بولي إيتيلين غليكول ذي الخطوتين– تُجانس الأنسجة النباتية ويُستخرج الحمض النووي كما وصفت منظمة حماية النباتات في أوروبا ومنطقة البحر الأبيض المتوسط EPPO (2004). وقد استخدمت لمجموعة واسعة من أنواع النباتات وأنواع الأنسجة (مثل أوراق ودرنات البطاطا) هذه الطريقة إلى جانب ارتحال كهربائي هلامي بولي أكريلاميدي عَكْسِي (PAGE) أو فحص ديجوكسيجينين–الحمض النووي والطريقتين التقليديتين RT-PCR الموصوفتين في هذا البروتوكول التشخيصي.

استخراج بروميد تريميثيلامونيوم سيتيل– تجانس الأنسجة النباتية ويُستخرج الحمض النووي كما وصفت منظمة حماية النباتات في أوروبا ومنطقة البحر الأبيض المتوسط EPPO (2004). وقد استخدمت هذه الطريقة مع RT-PCR في الوقت الحقيقي لمجموعة واسعة من الأنواع والأنسجة النباتية (مثل أوراق وبذور البندورة؛ EUPHRESCO، 2010).

طريقة الاستخراج الخرزي المغناطيسي 1– يستند الإجراء الآلي التالي إلى استخدام معالج الجسيمات المغناطيسي KingFisher mL Magnetic Particle Processor (Thermo Scientific). ومع التعديل المناسب للأحجام، يمكن استخدام نماذج KingFisher أخرى.

لكل عينة، يُنقع على الأقل 200 ملغم نسيج ورقي أو درني أو ما يصل إلى 100 بذرة، وبعد ذلك مباشرة يضاف دارئ استخراج بنسبة 1 غرام من نسيج ورقي أو درني إلى 10 ملغم دارئ و1 غرام بذور إلى 20 ميلليلتر دارئ. ويستمر النقع حتى يتم الحصول على محلول خليوي صافي بحد أدنى من حطام الأنسجة السليمة. ويتكون دارئ الاستخراج من 200 ميكرولتر من 8.39 في المائة (وزن/حجم) من محلول تيتراصوديوم بيروفسفات (درجة حموضة 10–10.9) و100 ميكرولتر من مستحلب B مضاد الرغوة (Sigma) مضاف إلى 9.8 ميلليلتر من دارئ محلول غوانيدين. ويتكون هذا المحلول من 764.2 غرام هيدروكلوريد و7.4 غرام مجفف ثنائي إيثيل ثُنَائي أمين حِمض الخليك الرباعي و30 غرام بولي فينيل البيروليدون–10 و5.25 غرام مونوهيدرات حامض الستريك و0.3 غرام سترات الصوديوم الثلاثية و5 ملليغرام تريتون X-100 و50 ملليغرام إيثانول مطلق و750 ملليغرام ماء.

يصّب حوالي 2 ملليغرام من المحلول في أنبوب طرد مركزي جديد ويفصل بالطرد المركزي بقوة 000 5 غرام لمدة دقيقة واحدة. ويُزال ميليلتر واحد من المادة الطافية ويوضع في الأنبوب الأول (أ) من رف KingFisher mL، ويضاف له 50 ميكرولتر من حبات الخرز المغناطيسية الدوارة لمحلول MAP (أ) (Invitek). ويضاف لأنبوب (ب) 1 ملليغرام من المحلول الدارئ غوانيدين وللأنابيب (ج) و(د) 70 في المائة من الإيثانول ولأنبوب هـ 200 ميكرولتر ماء أو 1 × المحلول الدارئ Tris-EDTA.

ويوضع شريط الأنبوب في KingFisher mL ويدار البرنامج (أنظر الشكل 2). وبعد 20 دقيقة، يوقف الجهاز لإتاحة خطوة تسخين. يوضع شريط الأنبوب في فرن على 65–70 درجة مئوية لمدة 5 دقائق ثم يعاد

إلى KingFisher mL، ويستأنف البرنامج. وفي نماذج KingFisher أخرى، قد تكون خطوة تدفئة أو خطوة حجز للتبخر جزءاً من النموذج. وعند الانتهاء، تنقل الأحماض النووية المزالة إلى أنبوب طرد مركزي صغير.

وقد استخدمت هذه الطريقة لمجموعة واسعة من أنواع النباتات وكذلك لدرنات البطاطا وبذور البندورة. واستخدمت مع فحصين من فحوصات RT-PCR في الوقت الحقيقي موصوفين في هذا الملحق (أنظر القسمين 3–3–3–4 و3–3–4–2). ويمكن في طريقة الاستخراج الخرزي المغناطيسي 1 توقع عتبات أعلى بعدة دورات مما في طرق الاستخراج الأخرى الموصوفة في هذا الملحق، لكن زيادة الإنتاجية من العينات التي يمكن تحقيقها بهذه الطريقة يجعلها طريقة استخراج قيمة (Roenhorst وآخرون 2005).

Plate layout Default: Plate type = KingFisher tubestrip 1000 µl; Plate change message = Change Default
A: volume = 1000, name = Cell lysate or tissue homogenate; volume = 50, name = Magnetic particles;
B: volume = 1000, name = Washing buffer 1 (Various); **C**: volume = 1000, name = Washing buffer 2 (Various); **D**: volume = 1000, name = Washing buffer 3 (Various); **E**: volume = 200, name = Elution buffer (Various)
STEPS COLLECT BEADS Step parameters: Name = Collect Beads; Well = A, Default; Beginning of step: Premix = No; Collect parameters: Collect count = 1. BIND Step parameters: Name = Lysing, Well = A, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 1min 0s, speed = Fast dual mix; Bind parameters: Bind time = 4min 0s, speed = Slow; End of step: Collect beads = No. BIND Step parameters: Name = Lysing, Well = A, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 1min 0s, speed = Fast dual mix Bind; Bind parameters: Bind time = 4min 0s, speed = Slow; End of step: Collect beads = No. BIND Step parameters: Name = Lysing, Well = A, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 1min 0s, speed = Fast dual mix; Bind parameters: Bind time = 4min 0s, speed = Slow; End of step: Collect beads = Yes, count = 4. WASH Step parameters: Name = Washing, Well = B, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 0s, speed = Fast; Wash parameters: Wash time = 3min 0s, speed = Fast dual mix; End of step: Collect beads = Yes, count = 3. WASH Step parameters: Name = Washing, Well = C, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 0s, speed = Fast; Wash parameters: Wash time = 3min 0s, speed = Fast dual mix; End of step: Collect beads = Yes, count = 3. WASH Step parameters; Name = Washing, Well = D, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 0s, speed = Fast; Wash parameters: Wash time = 3min 0s, speed = Fast dual mix; End of step: Collect beads = Yes, count = 3. ELUTION Step parameters; Name = Elution, Well = E, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 10s, speed = Fast; Elution parameters: Elution time = 20s, speed = Bottom very fast; Pause parameters: Pause for manual handling = Yes, message = Heating, Post mix time = 30s, speed = Bottom very fast; Remove beads: Remove beads = Yes, collect count = 4, disposal well = Dear

الشكل 2– KingFisher mL Magnetic Particle Processor (Thermo Scientific)

طريقة الاستخراج الخرزي المغناطيسي 2. يستخدم هذا الإجراء الآلي أطقم أدوات Sbeadex maxi plant kit (LGC Genomics) مع KingFisher 96 system (Thermo Scientific). وينبغي اتباع تعليمات الشركة الصانعة باستثناء استخدام GH زائد محلول دارئ بدلاً من المحلول الدارئ PN المتضمن في أطقم الأدوات هذه.

3–3–3 طرق جزيئية عامة للكشف عن فيرودات الـ pospiviroid

1–3–3–3 ارتحال كهربائي هلامي بولي أكريلاميدي عَكْسِي R-PAGE

أوصي بـ R-PAGE كطريقة للكشف عن فيرود درنة البطاطا المغزلية الذي يصيب أوراق صنف *S. tuberosum* (EPPO, 2004)، لكنه كان أقل حساسية (كان حد الكشف 893 87 بيكوغرام من فيرود درنة البطاطا المغزلية) من طرق جزيئية أخرى قيّمت (حد الكشف 17 بيكوغرام) في اختبار حلقة مع فحص DIG-labelled cRNA، وخطوتان من طريقة RT-PCR التقليدية باستخدام بادئات Shamloul وآخرين (1997) وطريقة Boonham وآخرين (2004) في الوقت الحقيقي (Jeffries & James, 2005، أنظر أيضا الجدول 1).

كما تم استخدام هذه الطريقة بنجاح مع نباتات مضيفة أخرى؛ مثلاً، صنف *C. annuum* وصنف *S. tuberosum* (درنات) وصنف *S. lycopersicum* وبسبب انخفاض حساسيتها، ينبغي التحقق من استكثار العينات.

وتكشف طريقة R-PAGE جميع فيرودات pospiviroids المعروفة؛ لذا، لتحديد هوية فيرود درنة البطاطا المغزلية ينبغي استخدام طريقة RT-PCR على الحمض النووي متبوعة بتسلسل منتج تفاعل البلمرة التسلسلي PCR.

2–3–3–3 التهجين بفحص DIG-labelled cRNA

أوصي بهذه الطريقة للكشف عن فيرود درنة البطاطا المغزلية الذي يصيب أوراق صنف *S. tuberosum* (EPPO, 2004)، وكانت حساسية الكشف عن هذا الفيرود في أوراق صنف *S. tuberosum* 17 بيكوغرام على الأقل (*Jeffries & James, 2005*). وقد اختبر مضيفات أخريات بنجاح، بما في ذلك .*Petunia* spp، و*S. jasminoides*، و*S. lycopersicum*، و*S. tuberosum* (درنات).

يستند الفحص المستخدم على مونومر كامل الطول لفيرود درنة البطاطا المغزلية تنتجه Agdia, Inc.[9] (فئة رقم DLP 08000/0001). وينبغي أن يستخدم هذا الفحص وفقاً لإرشادات الشركة المصنّعة، أو الرجوع إلى EPPO (2004) للاطلاع على تفاصيل الطريقة. وبالإضافة إلى دارئ Ames (EPPO, 2004)، يمكن استخدام البولي إثيلين غليكول وروادئ استخراج أخرى لاستخراج الحمض النووي.

وتكشف هذه الطريقة جميع فيرودات pospiviroids المعروفة؛ لذا، لتحديد هوية فيرود درنة البطاطا المغزلية ينبغي استخدام طريقة RT-PCR على الحمض النووي، متبوعة بتسلسل منتج تفاعل البلمرة التسلسلي PCR.

3–3–3–3 تفاعل البلمرة التسلسلي باستخدام إنزيم النسخ العكسي RT-PCR التقليدية باستخدام بادئات Verhoeven وآخرين (2004)

البادئات المستخدمة في هذا الفحص هي بادئات Pospi1 وVid لـ Verhoeven *وآخرين* (2004). وتكشف بادئات Pospi1 ما يلي: CEVd و*Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) و IrVd-1 وMPVd و PCFVd وفيرود درنة البطاطا المغزلية PSTVd وTASVd وTCDVd وTPMVd، بينما تكشف بادئة Vid: TCDVd PSTVd، إضافة إلى CLVd. ويتيح استخدام بادئي Pospi1 وVid في تفاعلين منفصلين الكشف عن جميع فيرودات

pospiviroids. غير أن عدم تطابق التسلسل في نقاط حرجة في موقع هدف البادئة قد يحول دون الكشف عن بعض خلاصات الفيرودات من نوع pospiviroid (مثلاً، لم تكشف باستخدام هذه البادئات خلاصة من CLVd؛ Steyer وآخرون، 2010) ويتطلب الكشف عن هذه الخلاصات بادئات إضافية. بينت دراسات بالمحاكاة (*In silico*) أن خلاصات فيرود درنة البطاطا المغزلية التالية قد لا يمكن الكشف عنها بسبب عدم تطابق البادئة – التسلسل في مواقف حرجة: بادئات Pospi1: EU879925، EU273604، EF459697، AJ007489، AY372398، AY372394، FM998551، DQ308555، E00278؛ وبادئات Vid: EU273604[2] وبادئات Pospi1 أكثر حساسية من بادئات Vid في الكشف عن فيرود درنة البطاطا المغزلية.

البادئات

Pospi1-FW: 5´-GGG ATC CCC GGG GAA AC-3´ (nucleotide (nt) 86–102)
Pospi1-RE: 5´-AGC TTC AGT TGT (T/A)TC CAC CGG GT-3´ (nt 283–261)
Vid-FW: 5´-TTC CTC GGA ACT AAA CTC GTG-3´ (nt 355–16)
Vid-RE: 5´-CCA ACT GCG GTT CCA AGG G-3´ (nt 354–336)

ظروف التفاعل

ثبت أن أطقم أدوات RT-PCR ذات الخطوة الواحدة (Qiagen) يمكن الركون إليها للكشف عن PSTVd وCEVd وCLVd و(CSVd) وTASVd وTCDVd في عينات مفردة (EUPHRESCO, 2010) ولمجموعة فيرودات pospiviroids الأخرى المدرجة في بداية هذا القسم. وليس من الضروري استخدام محلول–Q الذي يرد وصفه في EUPHRESCO (2010). وعلى الرغم من أنه يمكن استخدام أطقم أدوات RT-PCR مختلفة وظروف تفاعل مختلفة، ينبغي أن التحقق منها للتأكد من أنها صالحة للغرض المقصود وهو الكشف عن جميع فيرودات pospiviroids ذات الصلة.

يضاف ميكرولتران اثنان من مزيج المعايرة إلى 23 ميكرولتر من المزيج الرئيسي الذي يتألف من 1.0 ميكرولتر من كل من البادئات الأمامية والعكسية (10 ميكرومتر)، 5 ميكرولتر من 5 X رادئ RT-PCR ذي الخطوة الواحدة، 10 ميكرولتر من مزيج أنزيم RT-PCR ذي الخطوة الواحدة و1.0 ميكرولتر dNTPs (10 ميليمولار لكل dNTPs) و14 ميكرولتر ماء. ويكون برنامج التدوير الحراري على النحو التالي: 50 درجة مئوية لمدة 30 دقيقة؛ 95 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة؛ 35 دورة من 94 درجة مئوية لمدة 30 ثانية، 62 درجة مئوية لمدة 60 ثانية و72 درجة مئوية لمدة 60 ثانية؛ وخطوة تمديد نهائية من 72 درجة مئوية لمدة 7 دقائق.

الارتحال الكهربائي الهلامي

بعد RT-PCR، ينبغي تحليل منتجات تفاعل البلمرة التسلسلي PCR (حوالي 197 زوج قاعدي (bp) و 359 زوج قاعدي لبادئي Pospi1 و Vid على التوالي) بواسطة الارتحال الكهربائي الهلامي (2 في المائة من هلام الأجاروز) وتسلسل تفاعل البلمرة المتسلسل من الحجم الصحيح لتحديد أنواع الفيرود. في الممارسة، أدى تسلسل منتج 197 زوج قاعدي دائماً إلى تحديد مماثل لتسلسل الجينوم الكامل للفيرويد.

4–3–3–3 تقنية RT-PCR في الوقت الحقيقي باستخدام فحص GenPospi (Botermans *وآخرون*، 2013)

يستخدم فحص GenPospi تقنية TaqMan RT-PCR في الوقت الحقيقي للكشف عن جميع الأنواع المعروفة من جنس *Pospiviroid*. وهو يتألف من تفاعلين إثنين يعملان بالتوازي: يستهدف الأول (مزيج التفاعل 1) جميع الـ Pospiviroid ما عدا CLVd (Botermans *وآخرون*، 2013)؛ أما الثاني (مزيج التفاعل 2) فيستهدف على وجه التحديد CLVd (Monger *وآخرون*، 2010). ولرصد استخراج الحمض النووي، يستخدم ضبط داخلي *nad5* يستند إلى البادئات التي وضعها Menzel *وآخرون* (2002) لتضخيم الحمض النووي من ميتوكوندريا النبات (جينة نازع الهيدروجين *NADH dehydrogenase*). وقد بين التحقق من الطريقة (انظر الجدول 1) على أوراق البندورة أن فحص GenPospi كشف عن خلاصات من جميع أنواع فيرودات Pospiviroid بمعدل إصابة نسبي يصل إلى 0.13 في المائة (أي ما يعادل التخفيف بنسبة 1:770). وكان الفحص محدداً إذ لم تلاحظ أية تفاعلات تتقاطع مع فيرودات أو فيروسات أخرى أو مع حمض نووي آخر من النباتات المضيفة. وقد كانت نسبة قابلية التكرار وقابلية الإعادة 100 في المائة وبدا الفحص متيناً في مقارنات بين المختبرات. وثبت أن فحص GenPospi مناسب لفرز أنواع فيرودات pospiviroid على نطاق واسع. وينبغي التحقق من هذا الفحص لمصفوفات غير أوراق البندورة

البادئات

TCR-F 1-1: 5′-TTC CTG TGG TTC ACA CCT GAC C-3′ (Botermans *et al.*, 2013)
TCR-F 1-3: 5′-CCT GTG GTG CTC ACC TGA CC-3′ (Botermans *et al.*, 2013)
TCR-F 1-4: 5′-CCT GTG GTG CAC TCC TGA CC-3′ (Botermans *et al.*, 2013)
TCR-F PCFVd: 5′-TGG TGC CTC CCC CGA A-3′ (Botermans *et al.*, 2013)
TCR-F IrVd: 5′-AAT GGT TGC ACC CCT GAC C-3′ (Botermans *et al.*, 2013)
TR-R1: 5′-GGA AGG GTG AAA ACC CTG TTT-3′ (Botermans *et al.*, 2013)
TR-R CEVd: 5′-AGG AAG GAG ACG AGC TCC TGT T-3′ (Botermans *et al.*, 2013)
TR-R6: 5′-GAA AGG AAG GAT GAA AAT CCT GTT TC-3′ (Botermans *et al.*, 2013)
CLVd-F: 5′-GGT TCA CAC CTG ACC CTG CAG-3′ (Monger *et al.*, 2010)
CLVd-F2: 5′-AAA CTC GTG GTT CCT GTG GTT-3′ (Monger *et al.*, 2010)
CLVd-R: 5′-CGC TCG GTC TGA GTT GCC-3′ (Monger *et al.*, 2010)
nad5-F: 5′-GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT-3′ (Menzel *et al.*, 2002)
nad5-R: 5′-CTC CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA-3′ (Menzel *et al.*, 2002)

المسبارات

pUCCR: 6FAM-5′-CCG GGG AAA CCT GGA-3′-MGB (Botermans *et al.*, 2013)
CLVd-P: 6FAM-5′-AGC GGT CTC AGG AGC CCC GG-3′-BHQ1 (Monger *et al.*, 2010)
nad5-P: VICr-5′-AGG ATC CGC ATA GCC CTC GAT TTA TGT G-3′-BHQ1 (Botermans *et al.*, 2013)

يستند مزيجا التفاعلين الاثنين إلى أطقم أدوات TaqMan RNA-to-Ct™ 1 (Applied Biosystems)

مزيج التفاعل 1 (جميع فيرودات الـ pospiviroids باستثناء CLVd + 5nad)

يتألف مزيج التفاعل من 12.5 ميكرولتر من 2 × مزيج TaqMan RT-PCR، و0.6 ميكرولتر من 1 × مزيج أنزيم TaqMan RT، و0.75 ميكرولتر (10ميكرومولار) من البادئات الأمامية (TCR-F 1-1, TCR-F 1-3, TCR-F 1-4, TCR-F IrVd, TCR-F PCFVd and *nad5*-F) والبادئات العكسية (TR-R1, TR-R CEVd, TR-R6 and *nad5*-R) (تركيز نهائي 0.3 ميكرومولار لكل منها)، و0.25 ميكرولتر من 10 ميكرومولار من مسبار TaqMan pUCCR (تركيز نهائي 0.1 ميكرومولار) و0.5 ميكرولتر من10 ميكرومولار من مسبار TaqMan *nad5-P* (تركيز نهائي 0.2 ميكرومولار). يضاف ماء صالح للفحص الجزيئي و2 ميكرولتر من مزيج معايرة الحمض النووي الريبي RNA للتوصل إلى حجم نهائي يبلغ 25 ميكرولتر.

مزيج التفاعل 2 ((nad5 + CLVd)

يتألف مزيج التفاعل من 12.5 ميكرولتر من 2 × مزيج TaqMan RT-PCR و0.6 ميكرولتر من 1 × مزيج أنزيم TaqMan RT، و0.75 ميكرولتر (10ميكرومولار) من البادئة الأمامية (CLVd-F وCLVd-F2 وnad5-F) وبادئات عكسية (CLVd-R وnad5-R) (تركيز نهائي 0.3 ميكرومولار لكل منها)، و0.25 ميكرولتر من 10 ميكرومولار من مسبار TaqMan CLVd-P (تركيز نهائي 0.1 ميكرومولار) و0.5 ميكرولتر من10 ميكرومولار من مسبار TaqMan *nad5-P* (تركيز نهائي 0.2 ميكرومولار). يضاف ماء صالح للفحص الجزيئي و2 ميكرولتر من مزيج معايرة الحمض النووي الريبي RNA للتوصل إلى حجم نهائي يبلغ 25 ميكرولتر.

برنامج التدوير الحراري لكل من مزيجي التفاعل هو: 48 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة، و95 درجة مئوية لمدة 10 دقائق، تليها 40 دورة من (95 درجة مئوية لمدة 15 ثانية و60 درجة مئوية لمدة 1 دقيقة).

لهذه الطريقة، فسّر Botermans *وآخرون*. (2013) قيم Ct الناتجة التي تقل عن 32 على أنها إيجابية؛ وتلك التي بين 32 و37 على أنها غير حاسمة وتتطلب تأكيدا، وتلك التي لا تقل عن أو تساوي 37 على أنها سلبية. غير أن هذه القيم قد تستبعد مستويات الإصابة المنخفضة في بعض الأنسجة، وينبغي أن تحدد في كل مختبر.

3–3–4 طرق جزيئية ذات خصوصية عالية للكشف عن فيرود درنة البطاطا المغزلية

3–3–4–1 تقنية RT-PCR التقليدية باستخدام بادئات Shamloul وآخرين، (1997)

بادئات RT-PCR المستخدمة في هذا الفحص هي بادئات Shamloul وآخرين، (1997)، التي يصفها أيضا Weidemann وBuchta (1998). وستكتشف البادئات MPVd وPSTVd وCDVd وTPMVd. وقد أظهرت دراسات بالمحاكاة أن خلاصات فيرود درنة البطاطا المغزلية التالية قد لا تكتشف بسبب عدم تطابق البادئة – التسلسل في نقاط حرجة: AY372394 وDQ308555 وEF459698 للبادئة العكسية. وإذا لم يضخم الحمض النووي الريبي باستخدام هذه البادئات، يمكن استخدام بادئات Vid.

البادئات

3H1-F: 5′-ATC CCC GGG GAA ACC TGG AGC GAA C-3′ (nt 89–113)
2H1-R: 5′-CCC TGA AGC GCT CCT CCG AG-3′ (nt 88–69)

الطريقة 1 (RT-PCR الخطوة الواحدة Superscript مع Platinum® Taq (Invitrogen))

لكل تفاعل، يضاف 1 ميكرولتر من مزيج معايرة الحمض النووي الريبي إلى 24 ميكرولتر من المزيج الرئيسي المكون من 1.0 ميكرولتر من كل من البادئات الأمامية والعكسية (15 ميكرومتر)، 12.5 ميكرولتر من 2 X رادئ تفاعل، و0.5 ميكرولتر من RT/Platinum Taq و7.6 ميكرولتر ماء. ويكون برنامج التدوير الحراري على النحو التالي: 43 درجة مئوية لمدة 30 دقيقة؛ 95 درجة مئوية لمدة 2 دقيقة؛ وبعد ذلك 10 دورات من 94 درجة مئوية لمدة 30 ثانية، 64 درجة مئوية لمدة 90 ثانية و72 درجة مئوية لمدة 45 ثانية؛ وخطوة تمديد نهائية من 72 درجة مئوية لمدة 10 دقائق و20 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة.

الطريقة 2 (RT-PCR من خطوتين)

باستخدام RT-PCR من خطوتين، تكون حساسية الكشف عن فيرود درنة البطاطا المغزلية في صنف S. tuberosum 17 بيكوغرام – وهذا هو أقل تركيز اختبر، لكن الحساسية التي تحققت تفاوتت بين المختبرات، ويكتشف معظم المختبرات 89 بيكوغرام على الأقل (Jeffries & James, 2005). أنظر EPPO (2004) لوصف الطريقة 2.

بعد RT-PCR، تحلل منتجات تفاعل البلمرة التسلسلي PCR (حوالي 360 زوج قاعدي) بواسطة الارتحال الكهربائي الهلامي كما وصف وتسلسل أمبليكونات amplicons تفاعل البلمرة المتسلسل من الحجم الصحيح لتحديد أنواع الفيرود.

وقد استخدم فحص ضبط داخلي ببادئات nad 5 (Menzel وآخرون، 2002) مع هذه الطريقة في تفاعل بسيط (منفصل) (Seigner وآخرون، 2008). وتستخدم البادئات عند تركيز نهائي يبلغ 0.2 ميكرومتر. ويتشكل الأمبليكون من 181 زوجاً قاعديا.

nad5 sense: 5´-GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGTT-3´ (nt 968–987 and 1836–1838)
nad5 antisense: 5´-CTCCAGTCACCAACATTGGCATAA-3´ (nt 1973–1995)

2–4–3–3 RT-PCR في الوقت الحقيقي باستخدام بادئات Boonham وآخرين (2004)

البادئات المستخدمة والمسبار المستخدم لهذا الفحص يصفهما Boonham وآخرون (2004). غير أن هذا الفحص كفحوص الوقت الحقيقي المنشورة كلها لا يحدد فيرود درنة البطاطا المغزلية على وجه التحديد. فإذا تم الحصول على نتيجة إيجابية عن طريق RT-PCR في الوقت الحقيقي، ينبغي تحديد هوية الفيرود باستخدام RT-PCR وتسلسل تقليديين.

ويكتشف هذا الفحص PSTVd وMPVd وTCDVd وPMVd. وكانت الحساسية للكشف عن فيرود درنة البطاطا المغزلية في صنف S. tuberosum باستخدام طريقة CTAB للاستخراج 17 بيكوغرام، وكان ذلك أدنى تركيز اختبر (Jeffries & James, 2005). وعن طريق اختبار منوعات فيرود درنة البطاطا المغزلية والأوليغونيكليوتايدات الاصطناعية، ثبت أن هذا الفحص يكتشف جميع منوعات التسلسل المعروفة. وحددت هذه من دراسات بالمحاكاة على أنها حالات عدم تطابق البادئة–التسلسل مع إمكانية الفشل في الكشف (Boonham وآخرون 2005). غير أن

الخلاصتين المتشعبتين VIR-06/7L وVIR-06/10L اللتين وصفهما مؤخرا Owens وآخرون (2009) قد لا يكتشفا بسبب إدخال قاعدة (قواعد) إضافية في موقع رابط المسبار (W. Monger، اتصال شخصي، 2011).[1]

البادئات

PSTV-231-F: 5´-GCC CCC TTT GCGCTG T-3´ (nt 232–247)
PSTV-296-R: 5´-AAG CGG TTC TCG GGA GCT T-3´ (nt 297–279)
PSTV-251T: FAM-5´-CAG TTG TTT CCA CCG GGT AGTAGC CGA-3´ TAMRA (nt 278–252)

تضخّم بادئات الضبط الداخلي COX جينة السيتوكروم أوكسيديز 1 الموجودة في ميتوكوندريا النبات (Weller وآخرون، 2000).

COX-F: 5´-CGT GCG ATT CCA GAT TAT CCA-3´
COX-R: 5´-CAA CTA CGG ATA TAT AAG RRC CRR ACC TG-3´
COXsol-1511T: VIC-5´-AGG GCA TTC CAT CCA GCG TAA GCA-3´ TAMRA

مزيج التفاعل هو لصفيحة من 96 بئرا (96 well-) وتعديل لطريقة EPPO (EPPO, 2004) إذ أنه يتضمن تفاعلاً مزدوجاً للكشف عن PSTVd وCOX وتفاعلاً بسيطاً للكشف عن PSTVd (Roenhorst وآخرون، 2005).

يتألف مزيج التفاعل من 13.75 ميكرولتر ماء من 2 × مزيج Master Mix (Applied Biosystems)، و1.25 ميكرولتر من 40 × MultiScribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems) و1.5 ميكرولتر من كل من بادئتي PSTV-231-F و PSTV-296-R (10 ميكرومولار) ومسبار 1.0 ميكرولتر PSTV-251T (5 ميكرومولار). ويقسم مزيج التفاعل هذا بالتساوي إلى حجمين من 22 ميكرولتر، أ و ب. ويضاف ميكرولتران اثنان من الماء إلى كل من أ وب ويضاف 0.75 ميكرولتر من كل من بادئة COX (10 ميكرمولار) و0.5 ميكرولتر من مسبار COXsol-1511T (5 ميكرمولار). ويضاف ميكرولتر واحد من الحمض النووي الريبي المستهدف إلى كل من أ وب لعمل مزيج تفاعل نهائي من 25 ميكرولتر لكل بئر من صفيحة التفاعل. ويكشف بمزيج تفاعل أ عن PSTV، ويكشف بمزيج تفاعل ب عن PSTV وCOX.

برنامج التدوير الحراري هو: 48 درجة مئوية لمدة 30 دقيقة و95 درجة مئوية لمدة 2 دقيقتين و40 دورة من 95 درجة مئوية لمدة 15 ثانية و60 درجة مئوية لمدة 1 دقيقة.

3–3–4–3 RT-PCR في الوقت الحقيقي (Plant Print Diagnòstics kit)

البادئات المستخدمة والمسبار المستخدم لهذا الفحص يصفهما Boonham وآخرون (2004) وهي متوفرة كطقم أدوات من Plant Print Diagnòstics (Ref. PSTVd/100) ويكشف الفحص CLVd وPSTVd وTCDVd، ويفترض الكشف عن جميع خلاصات PSTVd الـ 327 الموجودة في بنك الجينات GenBank لأن دراسات المحاكاة أظهرت أن جميع حالات عدم التطابق بين البادئة والتسلسل كانت في نقاط غير حرجة (N. Duran-Vila، اتصال شخصي، 2014).

ترد بيانات التحقق في الجدول 1.

[1] اعتبارا من 1 مارس/آذار 2010 (W. Monger, personal communication, 2011)

البادئات

PSTVd-F: 5’-CCT TGG AAC CGC AGT TGG T-3’ (nt 339–357)
PSTVd-R: 5’-TTT CCC CGG GGA TCC C-3’ (nt 87–102)
PSTVdP: FAM-5’-TCCTGTGGTTCACACCTGACCTCCTGA-3’ TAMRA (nt 19–45)

يحتوي كوكتيل تفاعل البلمرة التسلسلي بادئات مجففة بالتبريد ومسبقاً (مزودة في طقم الأدوات) يمكن أن يضاف إليها أي مزيج RT-PCR رئيسي تجاري. ولكل تفاعل، يضاف مزيج معايرة حمض نووي ريبي من 3 ميكرولتر إلى 9 ميكرولتر من كوكتيل تفاعل البلمرة التسلسلي المكون من 6 ميكرولتر تجاري 2 × دارئ، و0.6 من كل من بادئة أمامية وعكسية (10 ميكرومولار) و0.36 ميكرولتر مسبار TaqMan (5 ميكرمولار) و0.5 ميكرولتر من 25 × مزيج إنزيم RT-PCR و0.94 ميكرولتر ماء لعمل حجم تفاعل نهائي من 12 ميكرولتر.

برنامج التدوير الحراري هو: 45 درجة مئوية لمدة 10 دقائق، و95 درجة مئوية لمدة 10 دقائق و40 دورة من (95 درجة مئوية لمدة 15 ثانية و60 درجة مئوية لمدة 1 دقيقة).

لهذه الطريقة، تعتبر العينة إيجابية إذا أنتجت قيمة Ct أقل من 40 وكانت الضوابط السلبية كلها سلبية (لا تضخيم). وتعتبر العينة سلبية إذا أنتجت قيمة Ct لا تقل عن 40 وتظهر الضوابط الإيجابية تضخيما.

3–4 ضوابط للاختبارات الجزيئية

كي تعتبر نتيجة الاختبار موثوقة، من الضروري وجود ضوابط مناسبة تعتمد على نوع الاختبار المستخدم ومستوى الجزم المطلوب لكل من سلسلة استخلاص وتضخيم للحمض النووي للآفة المستهدفة أو الحمض النووي المستهدف. وبالنسبة لتفاعل البلمرة التسلسلي في الوقت الحقيقي، فإن الضابط الإيجابي للحمض النووي والضابط الداخلي والضابط السلبي للتضخيم (دون مزيج معايرة) هي ضوابط الحد الأدنى التي ينبغي أن تستخدم.

الضبط الإيجابي للحمض النووي. يستخدم هذا الضبط لرصد كفاءة الفحص (باستثناء الاستخراج). ويمكن استخدام حمض نووي معد مسبقا (مخزّن) أو حمض نووي كامل الجينوم مضخم أو ضابط مصطنع (منتج مستنسخ من تفاعل بلمرة تسلسلي) ولّد باستخدام زوج البادئة نفسه المستخدم للكشف. ويمكن أيضاً استخدام ضابط لحدّ الكشف (غير إلزامي).

الضبط الداخلي لتفاعل البلمرة التسلسلي التقليدي وفي الوقت الحقيقي، ينبغي إدراج جينة تدبير شؤون التركيب الوراثي للنبات (HKG) مثل COX أو NAD في بروتوكول التفاعل لاستبعاد احتمال ظهور حالات سلبية زائفة بسبب فشل استخراج الحمض النووي أو تدهوره أو وجود مثبطات لتفاعل البلمرة التسلسلي. ويفضل استخدام بادئات الضبط الداخلي في تفاعل مزدوج مع بادئات pospiviroid/PST. ولكن بما أنه قد يكون من الصعب تحقيق ذلك دون التقليل من حساسية الاختبار للفيرود، يوصى، حيثما كان ذلك عمليا، بعمل تفاعل ثنائي لبادئات pospiviroid/PST مع بادئات HKG وكذلك تفاعل بسيط مع بادئات pospiviroid/PST فقط.

لقد ثبت أن شظية خماسي نازع الهيدروجين NADH لميتوكوندريا nad5 مؤشر موثوق لأداء إجراء الاستخراج لخطوة النسخ العكسي لتفاعل البلمرة التسلسلي التقليدي (Menzel وآخرون، 2002). وقد اختبر مقابل العديد من

الأنـواع النباتيـة، بمـا في ذلـك *S. tuberosum* وأنـواع *Solanum* الأخـرى (*S. bonariensis*، *S. dulcamara*، *S. jasminoides*، *S. nigrum*، *S. pseudocapsicum*، *S. rantonnetii*، *sisymbrifolium*) و *Acnistus arborescens S* و*Atropa belladonna* و *Brugmansia spp* و*.Capsicum spp*، و*.Cestrum spp* و *Lochroma cyanea* و*Lochroma spp. Nicotiana spp* و*.Physalis spp* (Seigner وآخـرون، 2008). وتشمل بادئات *nad5* إنترون ولذا فإنها لن تضخّم مـن الحمـض النـووي. ويضـخم الحمـض النـووي الـريبي بعـد إزالـة الإنترون.

على الرغم من أن COX استخدم كضابط داخلي في هـذا البروتوكـول، فـإن بادئـات COX ستضـخم الحمـض النووي الريبي والحمض النووي. ولذا فإنه يوفر مؤشراً على نوعية الحمـض النـووي المضـخم بـدلاً مـن الحمـض النـووي الريبي وحده ولا يضبط خطوة النسخ العكسي.

وعندما لا يذكر الضابط الداخلي COX أو *nad5* في وصف طريقة لتفاعل البلمرة التسلسلي، ينبغي على المختبر اختيار ضابط داخلي والتحقق من صحته.

ضابط التضخيم السلبي (دون ضابط مزيج معايرة). هذا الضابط ضروري لـتفاعل البلمرة التسلسلي التقليدي وفي الوقت الحقيقي لاستبعاد الإيجابيات الزائفة الناجمـة عـن التلـوث أثنـاء إعـداد مـزيج التفاعـل. وفي مرحلـة التضـخيم، يضاف ماء تفاعل البلمرة التسلسلي الذي كان قد استعمل لإعداد مزيج التفاعل.

ضابط الاستخراج الإيجابي يسـتخدم هـذا الضـابط لضـمان أن يكـون الحمـض النـووي المسـتخرج مـن الفـيرود المستهدف متوفراً بكمية ونوعية كافية لتفاعل البلمرة التسلسلي وأن يكون الهدف قابلاً للاكتشـاف. ويسـتخرج الحمـض النووي من الأنسجة المصابة للمضيف أو من الأنسجة النباتية السليمة الممزوجة بالفيرود.

وينبغي أن يبلغ الضابط الإيجابي تقريبـاً نسـبة واحـد إلى عشـرة مـن كميـة نسـيج الأوراق المسـتخدمة لكـل نبتـة لاستخراج الحمض النووي الريبي. وإذا جرى استكثار العينات، ينبغي عندئذ تعـديل كميـة الضـابط الإيجـابي تبعـاً لـذلك (مثلاً 10 حصص من عينة من 20 ملغ استكثرت لاستخراج الحمـض النـووي الـريبي، 2 ملـغ ورقـة مصـابة + 198 ملـغ نسيج بطاطا سليمة). وإذا لم يكشف عن ذلك، ينبغي تكرار الاختبار أو خفض معدل الاستكثار حتى يتحقـق كشـف يمكـن الركون إليه.

وبالنسبة للنسخ العكسي لتفاعل البلمرة التسلسـلي، يجـب إيـلاء عنايـة لتجنـب التلـوث بـالرذاذ مـن الضـابط الإيجابي أو من العينات الإيجابية. وينبغي أن يسلسل الضابط الإيجابي المستخدم في المختبر كي تمكن مقارنـة السلسـلة بسهولة مع السلاسل التي يتم الحصول عليها من أمبليكونات تفاعل البلمرة التسلسلي ذات الحجم الصحيح. وبـدلاً مـن ذلك، يمكن تشكيل ضوابط إيجابية مصطنعة بواسطة سلسلة معروفة يمكن بدورها أن تقارَن بأمبليكونـات تفاعـل البلمـرة التسلسلي ذات الحجم الصحيح.

ضابط الاستخراج السلبي يستخدم هذا الضابط لرصد التلـوث خـلال اسـتخراج الحمـض النـووي و/أو التفاعـل المتبادل مع النسيج المضيف. ويتكون الضابط من حمض نووي يسـتخرج مـن نسـيج مضـيف غـير مصـاب ضُـخّم لاحقـا. ويستحسن إدراج ضوابط متعددة حين يتوقع أن تكون هناك أعداد كبيرة من العينات الإيجابية.

3–5 تفسير نتائج من تفاعل البلمرة التسلسلي التقليدي وفي الوقت الحقيقي

3–5–1 تفاعل البلمرة التسلسلي التقليدي

لا يعتبر تفاعل البلمرة التسلسلي الخاص بالفيرود صالحاً إلا:

- عندما ينتج ضابط الحمض النووي الإيجابي الحجم الصحيح للفيرود.
- عندما لا ينتج أي أمبليكون من الحجم الصحيح في ضبط الاستخراج السلبي وضبط التضخيم السلبي.

وفي حال استخدمت بادئات الضوابط الداخلية COX و/أو *nad5* أيضا، فإنه ينبغي عندئذ أن ينتج الضابط السلبي (أي النسيج النباتي السليم) (في حال استخدامه) وضابط الحمض النووي الإيجابي، وكل عينة من عينات الاختبار شريطاً يبلغ 181 زوجاً قاعدياً. ويشير عجز العينات عن تحقيق تضخيم مع بادئات الضوابط الداخلية، مثلا، إلى أن استخراج الحمض النووي قد فشل أو أن الحمض النووي لم يدرج في مزيج التفاعل، أو أن خطوة النسخ العكسي قد فشلت، أو أن هناك مركّبات مثبطة لتفاعل البلمرة التسلسلي في خلاصة الحمض النووي أو أن الحمض النووي قد فسد.

وتعتبر العينة إيجابية إذا أنتجت أمبليكون من الحجم الصحيح. ولتحديد نوع الفيرود يجب أن يسلسل منتج تفاعل البلمرة التسلسلي.

3–5–2 تفاعل البلمرة التسلسلي في الوقت الحقيقي

لا يعتبر تفاعل البلمرة التسلسلي صالحاً إلا:

- عندما ينتج ضابط الحمض النووي الإيجابي منحنى تضخيم مع البادئات الخاصة بالفيرود.
- عندما لا يشاهد أي منحنى تضخيم (أي عندما تكون قيمة Ct 40 أو أي قيمة أخرى يحددها المختبر بعد التحقق منها) مع ضابط الاستخراج السلبي وضابط التضخيم السلبي.

وفي حال استخدمت بادئات الضوابط الداخلية COX و*nad5* أيضا، فإنه ينبغي عندئذ أن ينتج الضابط السلبي (في حال استخدامه) وضابط الحمض النووي الإيجابي وكل عينة من عينات الاختبار منحنى تضخيم. ويشير عجز العينات عن إنتاج منحنى تضخيم مع بادئات الضوابط الداخلية، مثلا، أن استخراج الحمض النووي قد فشل أو أن الحمض النووي لم يدرج في مزيج التفاعل أو أن هناك مركّبات مثبطة لتفاعل البلمرة التسلسلي في الحمض النووي المستخرج أو أن الحمض النووي قد فسد.

وتعتبر العينة إيجابية إذا أنتجت منحنى تضخيم نموذجيا. وترد معلومات محددة عن قيمة Ct الفاصلة لطريقتين في القسمين 3–3–3–4 و3–3–4–3.

4– تحديد الهوية

ينبغي تحديد فيرود درنة البطاطا المغزلية عن طريق سَلسلة المنتج الذي يحصل عليه من تفاعل البلمرة التسلسلي بالنسخ العكسي التقليدي باستخدام بادئات Shamloul أو Vid الموصفة في القسمين 3–3–4–1 و3–3–3–3 على التوالي، وعن طريق البحث عن تطابق التسلسل في قواعد بيانات التسلسل الجيني العامة. وقد تتعين الاستعانة

بمتخصصين للمساعدة على تحديد الهوية. إذا ضخّم منتج تفاعل البلمرة التسلسلي تضخيماً ضعيفاً أو كانت العينة مصابة بأكثر فيرود واحد من نوع pospiviroid، فإن استنساخ منتج تفاعل البلمرة التسلسلي قد يكون فعالاً في تمكين الحصول على تسلسل معين.

وينبغي أن يعاد اختبار عينة إيجابية كشف عنها بواسطة تفاعل البلمرة التسلسلي بالنسخ العكسي في الوقت الحقيقي، إذا لزم الأمر للتأكيد، باستخدام تفاعل البلمرة التسلسلي بالنسخ العكسي التقليدي لتمكين تسلسل المنتج وتحديد هويته. وسيعطي تسلسل منتج تفاعل البلمرة التسلسلي في الوقت الحقيقي مباشرة معلومات عن التسلسل لا تتيح تحديداً يمكن الركون إليه. فهو سيتيح تحديد المنتج كفيرود، ولكنه لن يتيح تحديد الأنواع أو التمييز عن الضابط الإيجابي المستخدم. ومع ذلك، وبسبب تزايد حساسية تفاعل البلمرة التسلسلي بالنسخ العكسي في الوقت الحقيقي، قد لا يمكن الحصول على منتج بتفاعل البلمرة التسلسلي بالنسخ العكسي التقليدي. وفي حالة استكثار العينات، فإن إعادة اختبار عينات فرعية أصغر قد يزيد من موثوقية التضخيم بواسطة تفاعل البلمرة التسلسلي بالنسخ العكسي التقليدي. وبدلاً من ذلك، يمكن تلقيح العينات في نباتات بندورة لزيادة تركيز الفيرود إلى مستويات يمكن الكشف عنها بتفاعل البلمرة التسلسلي بالنسخ العكسي التقليدي. لكن هذا النهج لم يقيّم، وإذا كانت النتائج غير حاسمة قد يتطلب ذلك إعادة أخذ العينات وتكرار الاختبار.

4–1 التسلسل وتحليل التسلسل

ينبغي ألا يقوم بتحليل التسلسل إلا شخص خبير. وإذا لم تتوفر في المؤسسة نفسها مرافق للتسلسل، ينبغي استخدام شركة تجارية. وستحدد الشركة احتياجاتها لتسلسل منتجات تفاعل البلمرة التسلسلي. وسيرسل المنتج المنقى (والبادئات الأمامية والعكسية إذا طلبت) إلى الشركة لإجراء التسلسل. وقد يقوم بعض الشركات أيضاً بتنقية المنتج إذا لزم الأمر.

إذا جرت عملية التسلسل في المؤسسة نفسها، ينبغي ترسيخ الطرق واتباعها. وتنبغي سَلسلة كل خيط من منتج تفاعل البلمرة التسلسلي باستخدام بادءات تفاعل البلمرة التسلسلي كبادئات للتسلسل. وينبغي تجميع خيطي الحمض النووي المتسلسلين بشكل مستقل (من استخدام البادئات الأمامية والعكسية) في خيط واحد، وتأكيد قاعدة (هوية) كل موقع نكليوتيد. ومن المفضل أن تستخدم للتحليل مجمِّعات (مثل برمجيات Geneious أو CLC Genomics Workbench أو Lasergene) تستخدم ملفات تتبع electropherograms. وينبغي ترميز الاختلاف بين الخيطين على أنه قاعدة غامضة في التسلسل الذي جرى تعديله. وتمكن بعد ذلك مقارنة التسلسل التوافقي المعدّل (الذي يحدد عن طريق مقارنة الخيطين) مع تسلسلات pospiviroid الموجودة في قاعدة بيانات مناسبة. وفي حالة وجود عدوى مختلطة، قد لا يكون المُخَطَّط الكروماتي chromatogram مقروءا وعندئذ ينبغي استنساخ منتج تفاعل البلمرة التسلسلي وسَلسلته.

ويقتضي الأمر مواءمة متأنية للـ pospiviroids عندما يمكن أن تكون اختلافات قليلة في بضعة نيوكليوتايدات حاسمة في تحديد الفيرود كآفة مسيطر عليها أو غير مسيطر عليها. ولإجراء تحديد أولي لفيرود درنة البطاطا المغزلية، يمكن الإبقاء على تسلسلات البادئات (Shamloul أو Vid) في تسلسل توافقي لأن هذه البادئات تقع في أكثر المناطق المصانة في جينوم الفيرود ومن غير المحتمل أن تؤثر في تحديد الهوية. وإذا ما شوهدت متدليات–أ بناها البوليميريز أثناء التمدد تنبغي إزالتها. ولتحديد الهوية، من المستحسن استخدام تسلسل توافقي معدّل يبدأ من موقع 1 من جينوم الفيرود

لمقارنته مع إحدى قواعد بيانات النيوكليوتايد الشاملة. وينبغي أن يتم البحث في قاعدة بيانات بنك الجينات GenBank للنيوكليوتايد غير الزائد على الموقع الإلكتروني للمركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا البيولوجية أو الأرشيف الأوروبي للنيوكليوتايد على الموقع الإلكتروني لمختبر البيولوجيا الجزئية الأوروبي باستخدام أداة البحث Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). وبالإضافة إلى ذلك، ينبغي أن يرتكز تحديد الهوية على تجميع عنقودي محدد لنتائج (BLAST) في العرض الذي يتخذ شكل شجرة (تصل النقاط المتجاورة).

ووفقاً اللجنة الدولية لتصنيف الفيروسات، المعيار الرئيسي لتحديد هوية الأنواع هو أكثر من 90 في المائة من هوية التسلسل (Owens وآخرون، 2011). ومع ذلك، إذا أظهر التسلسل الذي جرى الحصول عليه هوية تقرب من 90 في المائة، ينبغي إدراج معلمات إضافية، مثل الخصائص البيولوجية. ويبحث فريق الدراسة المعني بالفيرود في اللجنة الدولية لتصنيف الفيروسات حالياً تصنيف الفيرودات ومعايير تحديد الفواصل بين الأنواع.

وعندما تكون دقة التسلسل المطلوبة 100 في المائة، مثلاً، عندما سيقدم تسلسل معين إلى قاعدة بيانات أو عند الاشتباه بأنواع فيرود جديدة، من الضروري إجراء تفاعل البلمرة التسلسلي ثانية ليغطي منطقة تسلسلات البادئات المستخدمة لتفاعل البلمرة التسلسلي الأول وكذلك أية قواعد غامضة من تفاعل البلمرة التسلسلي الأول. وقد يكون مطلوباً لهذا الغرض تصميم مجموعة جديدة من البادئات من التسلسل الأولي، ولكن قد يكون كافياً استخدام زوجي بادئات شملول و Vid.

5- السجلات

ينبغي الاحتفاظ بالسجلات والبراهين حسبما هو مبين في المعيار الدولي رقم 27 (*بروتوكولات تشخيص الآفات الخاضعة للوائح*)

وفي الحالات التي قد تتأثر فيها أطراف متعاقدة أخرى بنتائج التشخيص، وبخاصة في حالة عدم الامتثال وفي حالة ظهور فيرود درنة البطاطا المغزلية في منطقة معينة للمرة الأولى، ينبغي الاحتفاظ بالمواد الإضافية التالية ب تضمن تتبعاً كاملا:

- ينبغي الاحتفاظ بالعينة الأصلية (إذا ما زالت متوفرة) مجمَّدة عند درجة حرارة 80 درجة مئوية تحت الصفر أو تجمّد تجميداً جافاً وتحفظ في درجة حرارة الغرفة.
- ينبغي، عند الاقتضاء، الاحتفاظ باستخراجات الحمض النووي الريبي عند درجة حرارة 80 درجة مئوية تحت الصفر
- ينبغي، عند الاقتضاء، الاحتفاظ بنواتج تضخيم تفاعل البلمرة التسلسلي بالنسخ العكسي عند درجة حرارة 20 مئوية تحت الصفر إلى 80 مئوية تحت الصفر.
- ملفات تتبع تسلسل الحمض النووي المستخدمة لتوليد تسلسل توافقي لتحديد هوية العينات.

وإذا تبين أن للخلاصة خصائص جزيئية أو بيولوجية مختلفة عن الخلاصات المسجلة سابقا، ينبغي أن يقدم إلى منشأة أرشيف لآفات النباتات معترف بها (مثل، Q-bank (قاعدة البيانات الشاملة عن الحجر الصحي لآفات وأمراض النباتات) وDSMZ (معهد لايبنيز الألماني لجمع الكائنات المجهرية ومنابت الخلايا).

وإذا كان هناك دليل على أن أي من الاختبارات المذكورة أخفق في الكشف عن خلاصة معينة لفيرود درنة الطاطا المغزلية، ينبغي إرسال تفاصيل الخلاصة (يفضل رقم دخول بنك الجينات) إلى أمانة الاتفاقية الدولية لحماية النباتات.

6- جهات الاتصال للحصول على معلومات إضافية

يمكن الحصول على مزيد من المعلومات عن هذا البروتوكول من:

Science and Advice for Scottish Agriculture (SASA), Roddinglaw Road, Edinburgh EH12 9FJ, Scotland, UK (Dr C.J. Jeffries, e-mail: colin.jeffries@sasa.gsi.gov.uk).

National Plant Protection Organization, PO Box 9102, 6700 HC Wageningen, The Netherlands (Dr J.W. Roenhorst, e-mail: j.w.roenhorst@nvwa.nl; Dr J.Th.J. Verhoeven, e-mail: j.th.j.verhoeven@nvwa.nl).

Department of Environment and Primary Industries, Biosciences Research Division, AgriBio, 5 Ring Road, La Trobe University, Bundoora, Victoria 3083, Australia (Dr B. Rodoni, e-mail: brendan.rodoni@depi.vic.gov.au).

Canadian Food Inspection Agency (CFIA), Charlottetown Laboratory, 93 Mt Edward Road, Charlottetown, PE, C1A 5T1, Canada (Dr H. Xu, e-mail: huimin.xu@inspection.gc.ca).

Conselleria de Agricultura de la Generalitat Valenciana, Centro de Proteccion Vegetal y Biotecnologia (IVIA), 46113 Moncada (Valencia), Spain (Dr N. Duran-Vila, e-mail: duran_nur@gva.es).

USDA-APHIS, Plant Germplasm Quarantine Program BARC-E, BLD 580, Powder Mill Road, Beltsville, MD 20705, USA (Dr J.A. Abad, e-mail: jorge.a.abad@aphis.usda.gov).

Laboratorios Biológicos, Dirección General de Servicios Agrícolas, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Millán 4703, Montevideo, Uruguay (Dr A. Etchevers, e-mail: anitaetchevers@hotmail.com).

ويمكن أن تقدم المنظمات القطرية الخاصة بوقاية النباتات أو المنظمات الإقليمية لوقاية النباتات أو الأجهزة التابعة لهيئة تدابير الصحة النباتية طلباً لإعادة النظر في بروتوكول التشخيص 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 J. Jeffries (العلوم والمشورة للزراعة الاسكتلندية SASA، المملكة المتحدة) وJ.W. Roenhorst (المنظمة الوطنية لحماية النبات، هولندا) وB. Rodoni (وزارة البيئة والصناعات الأولية، أستراليا)، وH. Xu (الوكالة الكندية للتفتيش على الأغذية (CFIA)، كندا) وN. Duran-Vila (معهد بلنسية للبحوث الزراعية (IVIA)، إسبانيا) و J.A. Abad (دائرة التفتيش المعنية بشؤون الصحة الحيوانية والنباتية التابعة لوزارة الزراعة في الولايات المتحدة USDA-APHIS) (أنظر القسم 6 لتفاصيل الاتصال). وبالإضافة إلى ذلك، شارك J.Th.J. Verhoeven (المنظمة الوطنية لحماية النبات، هولندا) مشاركة كبيرة في صياغة هذا البروتوكول.

ويتوجب توجيه الشكر إلى S.L. Nielsen (الدانمرك) وL. Seigner وS. Winter وM. Wassenegger (ألمانيا)؛ وH. Koenraadt (هولندا)؛ وA. Fox وT. James وW. Monger وV. Mulholland (المملكة المتحدة) لتعليقاتهم المفيدة أثناء وضع هذا البروتوكول.

8- المراجع

يشير المعيار الحالي أيضا إلى معايير دولية أخرى لتدابير الصحة النباتية، وهي متاحة على البوابة الدولية للصحة النباتية https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/ispms

Badilla, R., Hammond, R. & Rivera, C. 1999. First report of Potato spindle tuber viroid in Costa Rica. *Plant Disease*, 83: 1072.

Bertolini, E., Cambra, M., Serra, P., López, M.M., Lopes, S., Durán-Vila, N., Ayres, J., Bové, J. 2010. Procedimiento directo de detección específica de los viroides *Potato spindle tuber viroid* y *Citrus exocortis viroid* mediante dianas inmovilizadas y RT-PCR a tiempo real y kit para su detección. Spanish Patent Nº 2.387.172.

Bertolini, E., Felipe, R.T.A., Sauer, A.V., Lopes, S., Arilla, A., Vidal, E., Mourão-Filho, F.A.A., Nunes, W.M.C., Bové, J.M., López, M.M. & Cambra, M. 2014a. Tissue-print and squash real-time polymerase chain reaction for direct detection of '*Candidatus* Liberibacter' species in citrus plants and psyllid vectors. *Plant Pathology*, doi:10.1111/ppa.12197.

Bertolini, E., Moreno, A., Capote, N., Olmos, A., De Luis, A., Vidal, E., Pérez-Panadés, J. & Cambra, M. 2008. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant tissues and single aphids by real-time PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 120: 177–188.

Bertolini, E., Teresani, G.R., Loiseau, M., Tanaka, F.A.O., Barbé, S., Martínez, C., Gentit, P., López, M.M. & Cambra, M. 2014b. Transmission of '*Candidatus* Liberibacter solanacearum' in carrot seeds. *Plant Pathology*, doi:10.1111/ppa.12245.

Boonham, N., Fisher, T. & Mumford R.A. 2005. Investigating the specificity of real-time PCR assays using synthetic oligonucleotides. *Journal of Virological Methods*, 130: 30–35.

Boonham, N., González, L., Lilia Peralta, E., Blockley, A., Walsh, K., Barker, I. & Mumford, R.A. 2004. Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd). *Journal of Virological Methods*, 116: 139–146.

Botermans, M., van de Vossenberg, B.T.L.H., Verhoeven, J.Th.J., Roenhorst, J.W., Hooftman, M., Dekter, R. & Meekes, E.T.M. 2013. Development and validation of a real-time RT-PCR assay for generic detection of pospiviroids. *Journal of Virological Methods*, 187: 43–50.

CABI. n.d. Invasive species compendium. Datasheet for Potato spindle tuber viroid. Walingford, UK, CABI. Available at http://www.cabi.org/isc/datasheet/43659 (last accessed 18 August 2014).

De Bokx, J.A. & Pirone, P.G. 1981. Transmission of Potato spindle tuber viroid by aphids. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 87: 31–34.

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2004. Diagnostic protocols for regulated pests. PM 7/33. Potato spindle tuber viroid. *EPPO Bulletin*.

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2006. Phytosanitary procedures. PM 3/21 (2). Post-entry quarantine for potato. *EPPO Bulletin*, 34: 443-454.

EPPO. (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2014. PM 7/98 (2) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. *EPPO Bulletin*, 44: 117-147.

EPPO/CABI (I.M. Smith, D.G. McNamara, P.R. Scott & M. Holderness, eds). 1997. *Quarantine pests for Europe*, 2nd edn. Wallingford, UK, CABI. 1425 pp.

EUPHRESCO. 2010. *Detection and epidemiology of pospiviroids (DEP)*. EUPHRESCO Final Report. York, UK, EUPHRESCO. Available at http://www.euphresco.org/downloadFile.cfm?id=536 (last accessed 15 May 2013).

Fernow, K.H. 1967. Tomato as a test plant for detecting mild strains of potato spindle tuber virus. *Phytopathology*, 57: 1347–1352.

Fernow, K.H., Peterson, L.C. & Plaisted, R.L. 1970. Spindle tuber virus in seeds and pollen of infected plants. *American Potato Journal*, 47: 75–80.

Galindo, J., Smith, D.R. & Diener, T.O. 1982. Etiology of planta macho, a viroid disease of tomato. *Phytopathology*, 72: 49–54.

Grasmick, M.E. & Slack, S.A. 1985. Symptom expression enhanced and low concentrations of potato spindle tuber viroid amplified in tomato with high light intensity and temperature. *Plant Disease*, 69: 49–51.

Hadidi, A., Mazyad, H.M., Madkour, M.A. & Bar-Joseph, M. 2003. Viroids in the Middle East. *In* A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles & J. Semancik, eds. *Viroids*, pp. 275–278. Melbourne, Australia, CSIRO Publishing. 392 pp.

Hailstones, D.L., Tesoriero, L.A., Terras, M.A. & Dephoff, C. 2003. Detection and eradication of *Potato spindle tuber viroid* in tomatoes in commercial production in New South Wales, Australia. *Australasian Plant Pathology*, 32: 317–318.

Hammond, R.W. & Owens, R.A. 2006. Viroids: New and continuing risks for horticultural and agricultural crops. APSnet. St Paul, MN, American Phytopathological Society (APS). Available at http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/Viroids.aspx (last accessed 20 December 2012).

Jeffries, C. 1998. *Technical guidelines for the safe movement of germplasm.* No.19. Potato. Rome, FAO/IPGRI. 177 pp.

Jeffries, C. & James, C. 2005. Development of an EU protocol for the detection and diagnosis of *Potato spindle tuber pospiviroid. EPPO Bulletin*, 35:125–132.

Kryczynski, S., Paduch-cichal, E. & Skrzeczkowski, L.J. 1988. Transmission of three viroids by seed and pollen of tomato plants. *Journal of Phytopathology*, 121: 51–57.

Lebas, B.S.M., Clover, G.R.G., Ochoa-Corona, F.M., Elliott, D.R., Tang, Z. & Alexander, B.J.R. 2005. Distribution of *Potato spindle tuber viroid* in New Zealand glasshouse crops of capsicum and tomato. *Australian Plant Pathology*, 34: 129–133.

Ling, K.S. & Bledsoe, M.E. 2009. First report of Mexican papita viroid infecting greenhouse tomato in Canada. *Plant Disease*, 93: 839.

Mackenzie, D.J., McLean, M.A., Mukerji, S. & Green, M. 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 81: 222–226.

Mackie, A.E., McKirdy, S.J., Rodoni, B. & Kumar, S. 2002. Potato spindle tuber viroid eradicated in Western Australia. *Australasian Plant Pathology*, 31: 311–312.

Martinez-Soriano, J.P., Galindo-Alonso, J., Maroon, C.J.M., Yucel, I., Smith, D.R. & Diener, T.O. 1996. Mexican papita viroid: Putative ancestor of crop viroids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 9397–9401.

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

Mishra, M.D., Hammond, R.W., Owens, R.A., Smith, D.R. & Diener, T.O. 1991. Indian bunchy top disease of tomato plants is caused by a distinct strain of citrus exocortis viroid. *Journal of General Virology*, 72: 1781–1785.

Monger, W., Tomlinson, J., Boonham, N., Virscek Marn, M., Mavric Plesko, I., Molinero-Demilly, V., Tassus, X., Meekes, E., Toonen, M. & Papayiannis, L. 2010. Development and inter-laboratory evaluation of real-time PCR assays for the detection of pospiviroids. *Journal of Virological Methods*, 169: 207–210.

Murcia, N., Serra, P., Olmos, A. & Duran-Vila, N. 2009. A novel hybridization approach for detection of citrus viroids. *Molecular and Cellular Probes*, 23: 95–102.

NAK (Dutch General Inspection Service). 2011. *Pospiviroid: Detection of pospiviroid in potato leaves by real-time RT-PCR.* European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method (last accessed 18 August 2014).

Naktuinbouw. 2012a. *Pospiviroid: Real-time RT-PCR (TaqMan RT-PCR) for pospiviroids in leaves of horticultural crops.* European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method (last accessed 18 August 2014).

Naktuinbouw. 2012b. Potato spindle tuber viroid: *Real-time RT-PCR (TaqMan RT-PCR) for* Potato spindle tuber viroid *(PSTVd) and/or* Tomato chlorotic dwarf viroid *(TCDVd) in leaf material of horticultural crops.* European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method (last accessed 18 August 2014).

Naktuinbouw. 2012c. Potato spindle tuber viroid: *Detection of* Potato spindle tuber viroid *(PSTVd) and/or* Tomato chlorotic dwarf viroid *(TCDVd) in tomato seed with real-time RT-PCR (TaqMan RT-PCR).* European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method (last accessed 18 August 2014).

Navarro B, Silletti M.R, Trisciuzzi, V.N. & Di Serio, F. 2009. Characterization of Potato spindle tuber viroid infecting tomato in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 91: 723–726.

Nielsen, S.L., Enkegaard, A., Nicolaisen, M., Kryger, P., Marn, M.V., Pleško, I.M., Kahrer, A. & Gottsberger, R.A. 2012. No transmission of Potato spindle tuber viroid shown in experiments with thrips (*Frankliniella occidentalis*, *Thrips tabaci*), honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus terrestris*). *European Journal of Plant Pathology*, 133: 505–509.

NPPO-NL (National Reference Centre, National Plant Protection Organization). 2013a. Pospiviroid: Validation of a conventional RT-PCR assay for detection and preliminary identification of pospiviroids (expect [sic] CLVd) by Pospi1-FW/Pospi1-RE. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method (last accessed 18 August 2014).

NPPO-NL (National Reference Centre, National Plant Protection Organization). 2013b. Potato spindle tuber viroid: Validation of a conventional RT-PCR assay for detection and identification of CLVd, PSTVd and TCDVd using primers Vid-FW/RE (Verhoeven *et al.* 2004). European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method (last accessed 18 August 2014).

NPPO-NL (National Reference Centre, National Plant Protection Organization). 2013c. Potato spindle tuber viroid: Validation of a conventional RT-PCR test for detection and identification of PSTVd, TCDVd, MPVd and TPMVd using primers 2H1/3H1 described by Shamoul *et al.* (1997). European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method (last accessed 18 August 2014).

NPPO-NL (National Reference Centre, National Plant Protection Organization). 2013d. *Pospiviroid: Development and validation of a real-time RT-PCR assay for generic detection of Pospiviroids.* European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method (last accessed 18 August 2014).

Owens, R. A., Flores, R., Di Serio, F., Li, S.-F., Pallas, V., Randles, J. W., Sano, T. & Vidalakis, G. 2011. Viroids. *In* A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens & E. J. Lefkowitz, eds. Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, pp. 1221–1234. London, Elsevier Academic Press. 1259 pp.

Owens, R.A., Girsova, N.V., Kromina, K.A., Lee, I.M., Mozhaeva, K.A. & Kastalyeva, T.B. 2009. Russian isolates of *Potato spindle tuber viroid* exhibit low sequence diversity. *Plant Disease*, 93: 752–759.

Querci, M., Owens, R.A., Bartolini, I., Lazarte, V. & Salazar, L.F. 1997. Evidence for heterologous encapsidation of potato spindle tuber viroid in particles of potato leafroll virus. *Journal of General Virology*, 78: 1207–1211.

Reanwarakorn, K, Klinkong, S. & Porsoongnurn, J. 2011. First report of natural infection of *Pepper chat fruit viroid* in tomato plants in Thailand. *New Disease Reports*, 24: 6.

Roenhorst, J.W., Jansen, C.C.C., Kox, L.F.F., De Haan, E.G. & Van den Bovenkamp, G.W. 2006. Real-time RT-PCR voor grootschalige toetsing van aardappel op het aardappelspindelknolviroïde. *Gewasbescherming*, 37: 198–203 (in Dutch).

Roenhorst, J.W., Jansen, C.C.C., Kox, L.F.F., de Haan, E.G., van den Bovenkamp, G.W., Boonham, N., Fisher, T. & Mumford, R.A. 2005. Application of real-time RT-PCR for large-scale testing of potato for Potato spindle tuber pospiviroid. *EPPO Bulletin*, 35: 133–140.

Salazar, L.F., Querci, M., Bartolini, I. & Lazarte, V. 1995. Aphid transmission of potato spindle tuber viroid assisted by potato leafroll virus. *Fitopatologia*, 30: 56–58.

Seigner, L., Kappen, M., Huber, C., Kistler, M. & Köhler, D. 2008. First trials for transmission of Potato spindle tuber viroid from ornamental Solanaceae to tomato using RT-PCR and an mRNA based internal positive control for detection. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 115: 97–101.

Shamloul, A.M., Hadidi, A., Zhu, S.F., Singh, R.P. & Sagredo, B. 1997. Sensitive detection of potato spindle tuber viroid using RT-PCR and identification of a viroid variant naturally infecting pepino plants. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19: 89–96.

Singh, R.P. 1970. Seed transmission of potato spindle tuber virus in tomato and potato. *American Potato Journal*, 47: 225–227.

Singh, R.P. 1973. Experimental host range of the potato spindle tuber virus. *American Potato Journal*, 50: 111–123.

Singh, R.P., Boucher, A. & Somerville, T.H. 1992. Detection of potato spindle tuber viroid in the pollen and various parts of potato plant pollinated with viroid-infected pollen. *Plant Disease*, 76: 951–953.

Singh, R.P., Dilworth, A.D., Singh, M. & Babcock, K.M. 2006. An alkaline solution simplifies nucleic acid preparation for RT-PCR and infectivity assays of viroids from crude sap and spotted membrane. *Journal of Virological Methods*, 132: 204–211.

Singh, R.P. & Kurz, J. 1997. RT-PCR analysis of PSTVd aphid transmission in association with PLRV. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19: 418–424.

Singh, R.P., Nie, X. & Singh, M. 1999. Tomato chlorotic dwarf viroid: An evolutionary link in the origin of pospiviroids. *Journal of General Virology*, 80: 2823–2828.

Singh, R.P., Ready, K.F.M. & Nie, X. 2003. Viroids on solanaceous species. *In* A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles & J. Semancik, eds. *Viroids*, pp. 125–133. Melbourne, Australia, CSIRO Publishing. 392 pp.

Spieker, R. L. 1996. A viroid from *Brunfelsia undulata* closely related to the *Columnea* latent viroid. *Archives of Virology*, 141: 1823–1832.

Steyer, S., Olivier, T., Skelton, A., Nixon, T. & Hobden, E. 2010. *Columnea latent viroid* (CLVd): First report in tomato in France. *Plant Pathology*, 59: 794.

van Brunschot, S.L., Verhoeven, J.Th.J., Persley, D.M., Geering, A.D.W., Drenth, A. & Thomas, J.E. 2014. An outbreak of Potato spindle tuber viroid in tomato is linked to imported seed. *European Journal of Plant Pathology*, doi:10.1007/s10658-014-0379-8.

Verhoeven, J.Th.J. 2010. *Identification and epidemiology of pospiviroids.* Wageningen University, Wageningen, Netherlands. (Thesis) Available at http://edepot.wur.nl/137571 (last accessed 20 December 2012).

Verhoeven, J.Th.J., Hüner, L., Virscek Marn, M., Mavric Plesko, I. & Roenhorst, J.W. 2010. Mechanical transmission of Potato spindle tuber viroid between plants of *Brugmansia suaveolens*, *Solanum jasminoides*, potatoes and tomatoes. *European Journal of Plant Pathology*, 128: 417–421.

Verhoeven, J.Th.J., Jansen, C.C.C., Willemen, T.M., Kox, L.F.F., Owens, R.A. & Roenhorst, J.W. 2004. Natural infections of tomato by *Citrus exocortis viroid*, *Columnea latent viroid*, *Potato spindle tuber viroid* and *Tomato chlorotic dwarf viroid*. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 823–831.

Walter, B. 1987. Tomato apical stunt. *In* T.O. Diener, ed. *The viroids*, pp. 321–328. New York, Plenum Press. 365 pp.

Wassenegger, M., Heimes, S. & Sänger, H.L. 1994. An infectious viroid RNA replicon evolved from an *in vitro*-generated non-infectious viroid deletion mutant via a complementary deletion in vivo. *EMBO Journal*, 13: 6172–6177.

Weidemann, H.L. & Buchta, U. 1998. A simple and rapid method for the detection of potato spindle tuber viroid (PSTVd) by RT-PCR. *Potato Research*, 41: 1–8.

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

الجدول 1: نظرة عامة على البيانات للبروتوكولات المستخدمة لاكتشاف فيرود درنة البطاطا المغزلية في أنواع مختلفة من المواد المضيفة وعلى التحقق منها

المصفوفة	حجم العينة	إعداد العينة	استخراج الحمض النووي	طريقة الكشف	ملاحظات بشأن التحقق من الصحة
أوراق بندورة	1 غرام	3.5 ملليغرام (بتراوح 1:2–5:1 (وزن/حجم)) من GH زائد محلول داريء مع Homex 6 (Bioreba)	طقم أدوات RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) أو طقم أدوات Sbeadex maxi plant kit (LGC Genomics) على نظام KingFisher 96 (Thermo Scientific)	تفاعل البلمرة التسلسلي باستخدام إنزيم النسخ العكسي (RT-PCR): فحص GenPospi، Botermans وآخرون، 2013	***حد الكشف:*** كشف جميع أنواع فيرودات Pospiviroid حتى معدل إصابة نسبي يصل إلى 0.13 في المائة (أي ما يعادل تخفيفاً قدره 770 مرة). مع يقين بنسبة 99.7 في المائة لتخفيف أوراق البندورة المصابة في بندورة سليمة ***الخصوصية التحليلية:*** متخصصة إلى درجة عالية بأنواع فيرودات pospiviroid ***الانتقائية:*** لا تأثير على أوراق البندورة ***التكرار وقابلية الإعادة:*** 100 في المائة (Naktuinbouw, 2012a؛ Botermans وآخرون، 2013؛ NPPO-NL, 2013d)
أوراق بندورة	1 غرام	3.5 ملليغرام (بتراوح 1:2–5:1 (وزن/حجم)) من GH زائد محلول داريء مع Homex 6	طقم أدوات RNeasy Plant Mini Kit	RT-PCR في الوقت الحقيقي Boonham وآخرون، (2004)	***حد الكشف:*** الكشف عن ما يصل إلى 10 000 مرة تخفيف أوراق البندورة المصابة في بندورة سليمة ***الخصوصية التحليلية:*** كشف *Mexican papita viroid* (MPVd)، فيرود درنة البطاطا المغزلية (PSTVd)، *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd)، *Tomato planta macho viroid* (TPMVd) (بعض الخصالات) ***الانتقائية:*** لا تأثير على أوراق البندورة ***التكرار وقابلية الإعادة:*** 100 في المائة (Naktuinbouw, 2012b)

المصفوفة	حجم العينة	إعداد العينة	استخراج الحمض النووي	طريقة الكشف	ملاحظات بشأن التحقق من الصحة
أوراق بندورة	1 غرام	3.5 ملليغرام (بتراوح 1:2–1:5 (وزن/حجم)) من GH زائد محلول دارئ مع Homex 6	طقم أدوات RNeasy Plant Mini Kit	RT-PCR: بادئات Pospi1 – أمامي وPospi1– عكسي، Verhoeven وآخرون، (2004)	***حد الكشف:*** الكشف عن جميع أنواع فيرودات Pospiviroid (باستثناء *Columneae latent lviroid* (CLVd)) بمعدل إصابة نسبي يصل إلى على الأقل 2.5 في المائة تخفيف أوراق البندورة المصابة في بندورة سليمة ***الخصوصية التحليلية:*** الكشف عن *Hop latent viroid* (HpLVd، جنس *Cocadviroid*) وفيرود درنة البطاطا المغزلية ***الانتقائية:*** لا تأثير على أوراق البندورة ***التكرار وقابلية الإعادة:*** 100 في المائة (NPPO-NL, 2013a)
أوراق بندورة	1 غرام	3.5 ملليغرام (بتراوح 1:2–1:5 (وزن/حجم)) من GH زائد محلول دارئ مع Homex 6	طقم أدوات RNeasy Plant Mini Kit	RT-PCR: بادئات Vid – أمامي /Vid– عكسي، Verhoeven وآخرون، (2004)	***حد الكشف:*** الكشف عن CLVd وفيرود *درنة البطاطا المغزلية* (PSTVd) وTCDVd بمعدل إصابة نسبي يصل إلى على الأقل 100في المائة (10 في المائة لـ CLVd *) تخفيف أوراق البندورة المصابة في بندورة سليمة * صممت البادئات في الأصل للكشف عن CLVd مكملة لبادئات Pospi1 – أمامي/ Pospi1– عكسي RT-PCR ، Verhoeven وآخرون، (2004) ***الخصوصية التحليلية:*** كشف CLVd، فيرود درنة البطاطا المغزلية PSTVd، TCDVd ***الانتقائية:*** لا تأثير على أوراق البندورة ***التكرار وقابلية الإعادة:*** 100 في المائة (NPPO-NL, 2013b)

المصفوفة	حجم العينة	إعداد العينة	استخراج الحمض النووي	طريقة الكشف	ملاحظات بشأن التحقق من الصحة
أوراق بندورة	1 غرام	3.5 ملليغرام (بتراوح 1:2–1:5 (وزن/حجم)) من GH زائد محلول داريء مع Homex 6	طقم أدوات RNeasy Plant Mini Kit	RT-PCR: Shamloul وآخرون، (1997)	***حد الكشف:*** الكشف عن معدل [1]إصابة نسبي يصل إلى على الأقل 10 في المائة تخفيف أوراق البندورة المصابة في بندورة سليمة ***الخصوصية التحليلية:*** الكشف عن MPVd، فيرود درنة البطاطا المغزلية PSTVd، TCDVd، TPMVd (بعض الخلاصات) ***الانتقائية:*** لا تأثير على أوراق البندورة ***التكرار وقابلية الإعادة:*** 100 في المائة (NPPO-NL, 2013c)
بذور بندورة	3000 بذرة (اختبرت 1000 بذرة ثلاث مرات)	20 ملليغرام (بتراوح 1:2–1:5 (وزن/حجم)) من GH زائد محلول داريء مع BagMixer (Interscience)	طقم أدوات Sbeadex maxi plant kit على نظام KingFisher 96	RT-PCR في الوقت الحقيقي Boonham وآخرون، (2004)	خصائص أداء الفحص كما لأوراق البندورة احتمال الكشف عن بذرة واحدة مصابة في عينة من 1000 بذرة أقل من 95 في المائة عند اختبار ثلاث عينات فرعية كل منها من 1000 بذرة بسبب التلوث السريع لفيرود درنة البطاطا المغزلية من الثمار المصابة إلى البذور السليمة أثناء معالجة (باستخدام المعالجة بالتخمير والبكتيناز) البذور، هناك احتمال كبير لأن تكون هناك بذور ملوثة أكثر في عينة معينة (Naktuinbouw, 2012c).

المصفوفة	حجم العينة	إعداد العينة	استخراج الحمض النووي	طريقة الكشف	ملاحظات بشأن التحقق من الصحة
أوراق بطاطا (مستنبتة في غرف استنبات) ونباتات بطاطا مستنبتة في أنابيب مختبرية.	200 ملليغرام	20 ميكرولتر من 10 في المائة كبريتات الصوديوم(SDS) ، و180 ميكرولتر دارئ استخراج LiCl، و 400 ميكرولتر فينول–كلوروفورم مع أجران ومدقات	الفينول– كلوروفورم واستخراج بولي إيتيلين غليكول ذو الخطوتين	ارتحال كهربائي هلامي بولي أكريلاميدي عَكْسِي (PAGE) [2]	***حد الكشف:*** 2465 بيكوغرام من فيرود درنة البطاطا المغزلية؛ كان ذلك هو الأقل حساسية من الطرق الجزيئية التي استخدمت في اختبار حلقة دولي ***الخصوصية التحليلية:*** الكشف عن جميع أنواع فيرودات Pospiviroid المعروفة الانتقائية. لا تأثير على صنف البطاطا أو أوراق البطاطا أو النباتات المستنبتة في أنابيب مختبرية ***قابلية التكرار وقابلية الإعادة:*** قابلية الإعادة 51 في المائة في 87,893 بيكوغرام من فيرود درنة البطاطا المغزلية (أعلى تركيز لفيرود درنة البطاطا المغزلية اختبر) و42 في المائة على حد الكشف
أوراق بطاطا (مستنبتة في غرف استنبات) ونباتات بطاطا مستنبتة في أنابيب مختبرية.	200 ملليغرام	بتراوح 1–1 : 5 (وزن/حجم) مع دارئ Ames (EPPO 2004) مع أجران ومدقات	التثبيت على غشاء (Agdia, Inc.) الفينول– كلوروفورم واستخراج بولي إيتيلين غليكول ذو الخطوتين	فحص ديجوكسيجينين[2]	***حد الكشف:*** على الأقل 17 بيكوغرام من فيرود درنة البطاطا المغزلية (أدنى تركيز اختبر) ***الخصوصية التحليلية*** : الكشف عن جميع أنواع فيرودات Pospiviroid المعروفة ***الانتقائية*** : لا تأثير على صنف البطاطا أو أوراق البطاطا أو النباتات النباتات المستنبتة في أنابيب مختبرية ***قابلية التكرار وقابلية الإعادة:*** قابلية الإعادة 100 في المائة في 87,893 بيكوغرام من فيرود درنة البطاطا المغزلية و23 في المائة على 17 بيكوغرام من فيرود درنة البطاطا المغزلية

المصفوفة	حجم العينة	إعداد العينة	استخراج الحمض النووي	طريقة الكشف	ملاحظات بشأن التحقق من الصحة
أوراق بطاطا (مستنبتة في غرف استنبات) ونباتات بطاطا مستنبتة في أنابيب مختبرية.	50–500 ملليغرام	بتراوح 1–9 (وزن/حجم) مع دارئ RH (Qiagen) مع أنبوب طرد مركزي و micropestle أو Homex 6	طقم أدوات RNeasy Plant Mini Kit	وخطوتان ^{2} من طريقة RT-PCR التقليدية باستخدام بادئات Shamloul وآخرين (1997)	***حد الكشف:*** على الأقل 17 بيكوغرام من فيرود درنة البطاطا المغزلية ***الخصوصية التحليلية:*** الكشف عن PVd، فيرود درنة البطاطا المغزلية، TCDVd، TPMVd ***الانتقائية:*** لا تأثير على صنف البطاطا أو أوراق البطاطا أو أو النباتات النباتات المستنبتة في أنابيب مختبرية ***قابلية التكرار وقابلية الإعادة:*** قابلية الإعادة 78 في المائة في 87,893 بيكوغرام من فيرود درنة البطاطا المغزلية (أعلى تركيز لفيرود درنة البطاطا المغزلية اختبر) و44 في المائة على 17 بيكوغرام من فيرود درنة البطاطا المغزلية
أوراق بطاطا (مستنبتة في غرف استنبات) ونباتات بطاطا مستنبتة في أنابيب مختبرية.	1 غرام	3.5 ملليغرام (بتراوح 1:2–1:5 (وزن/حجم)) من المحلول الدارئ GH plus مع Homex 6	3.5 ملليغرام (بتراوح 1:2–1:5 (وزن/حجم)) من المحلول الدارئ GH plus مع Homex 6	طقم أدوات RNeasy Plant Mini Kit أو طقم أدوات Sbeadex maxi plant kit على نظام KingFisher 96	تحليل خصائص الأداء كما لأوراق البندورة ***الحساسية التحليلية:*** تلوث مع الفيروسات التي تحدث عادة في البطاطا ***الانتقائية:*** لا تأثير على أوراق البطاطا أو النباتات المستنبتة في أنابيب مختبرية جرى التحقق من معدلات استكثار تصل إلى 100 (كشف 100في المائة في عينة تتألف من ورقة واحدة مصابة و99 ورقة سليمة؛ NAK, 2011

المصفوفة	حجم العينة	إعداد العينة	استخراج الحمض النووي	طريقة الكشف	ملاحظات بشأن التحقق من الصحة
أوراق بطاطا (مستنبتة في غرف استنبات) ونباتات ودرنات بطاطا مستنبتة في أنابيب مختبرية	1.5 غرام أوراق أو 5 جرام درنات	حوالي 600 ميكرولتر دارئ للأوراق أو حوالي 3 ملليغرام دارئ للدرنات (اختيار الدارئ تبعاً لطريقة الاستخراج المستخدمة)	طقم أدوات RNeasy Plant Mini Kit، أو استخراج بروميد تريميثيلامونيوم سيتيل، أو طقم أدوات عزل الحمض النووي الريبي (Gentra Systems)، تجدر ملاحظة أن طقم الأدوات لم يعد متوفراً	RT-PCR في الوقت الحقيقي: Boonham وآخرون، (2004)	***حد الكشف:*** الكشف عن ما يصل إلى 10,000 مرة تخفيف لانسجة مصابة في أنسجة سليمة ***الحساسية التحليلية:*** الكشف عن MPVd، فيرود درنة البطاطا المغزلية PSTVd ، TCDVd، TPMVd (بعض الخلاصات)؛ لا تلوث مع الفيروسات التي تحدث عادة في البطاطا ***الانتقائية:*** لا تأثير على أوراق البطاطا أو النباتات المستنبتة في أنابيب مختبرية أو الدرنات ***قابلية التكرار وقابلية الإعادة:*** 100 في المائة (اختبار حلقة شاركت فيه أربعة مختبرات) جرى التحقق من معدلات استكثار تصل إلى 100 (كشف 100في المائة في عينة تتألف من ورقة واحدة مصابة و 99 ورقة سليمة؛ Roenhorst وآخرون، 2005، 2006

المصفوفة	حجم العينة	إعداد العينة	استخراج الحمض النووي	طريقة الكشف	ملاحظات بشأن التحقق من الصحة
أنواع نباتات الزينة (أوراق)	1 غرام	3.5 ملليغرام (بتراوح 1:2–1:5 (وزن/حجم)) من المحلول الدارئ GH plus مع Homex 6	طقم أدوات RNeasy Plant Mini Kit أو طقم أدوات Sbeadex maxi plant kit على نظام KingFisher 96	RT-PCR في الوقت الحقيقي: فحص GenPospi، Botermans وآخرون، (2013)	تحليل خصائص الأداء كما لأوراق البندورة ***الحساسية التحليلية:*** تركيز فيرودات Pospiviroid وانتقائية (مركّبات مثبطة) في عصارة الورقة تبعاً لأنواع النبات جرى التحقق من معدلات استكثار تصل إلى 25 لـ *Brugmansia*، *Calibrachoa*، *Cestrum*، *Dahlia*، *Nematanthus*، *Petunia*، *Solanum jasminoides*، *Streptosolen jamesonii* تجدر ملاحظة أن بالنسبة لمصفوفة *Calibrachoa*، *S. jasminoides* *S. jamesonii* شوهدت تأثيرات على تخفيف يزيد على 100. يبدو أن بالنسبة لبعض المحاصيل، مثل *Dahlia*، فترة الصيف هي الفترة المناسبة فقط لإجراء اختبار (يمكن الركون إليه) (Naktuinbouw, 2012a)
أنواع نباتات الزينة (أوراق)	1 غرام			RT-PCR في الوقت الحقيقي: Boonham وآخرون، (2004)	تحليل خصائص الأداء كما لأوراق البندورة ***الحساسية التحليلية:*** تركيز فيرودات Pospiviroid وانتقائية (مركّبات مثبطة) في عصارة الورقة تبعاً لأنواع النبات جرى التحقق من معدلات استكثار تصل إلى 25 لـ *Brugmansia*، *Calibrachoa*، *Dahlia*، *Petunia*، *S. jasminoides*، *S. jamesonii* لاحظ أن بالنسبة لمصفوفة *Calibrachoa*، *S. jasminoides*، *S. jamesonii* شوهدت تأثيرات على تخفيف يزيد على 100 يبدو أن بالنسبة لبعض المحاصيل، مثل Dahlia، فترة الصيف هي فقط الفترة المناسبة لإجراء اختبار (يمكن الركون إليه) (Naktuinbouw, 2012b)

المصفوفة	حجم العينة	إعداد العينة	استخراج الحمض النووي	طريقة الكشف	ملاحظات بشأن التحقق من الصحة
أوراق بندورة وأوراق ودرنات وبذور بطاطا، وأنواع نباتات الزينة (أوراق)	1 غرام اوراق أو درنات بطاطا أو دمغات أوراق على أغشية نايلون	10 ملليغرام (بتراوح 1–10 :1 (وزن/حجم)) مع دارئ الفوسفات (PBS)مع Homex 6	طرق مباشرة (دمغ الأنسجة)، أو طقم أدوات RNeasy Plant Mini Kit أو طقم أدوات عزل الحمض النووي الريبي كيت (Mo Bio)	RT-PCR في الوقت الحقيقي: Bertolini وآخرون، (2010)	***حد الكشف عن***: الكشف عما يصل 10,000 مرة تخفيف لأوراق S. jasminoides مصابة في أوراق سليمة لـ jasminoides وللبندورة ***الخصوصية التحليلية*** : الكشف عن PSTVd CLVd وTCDVd ***الانتقائية*** : لا تأثير على أوراق البطاطا أو درناتها أو بذور البندورة ***قابلية التكرار وقابلية الإعادة:*** 100 في المائة (اختبار حلقة شاركت فيه ثلاثة مختبرات) كانت الحساسية التشخيصية 100 في المائة، وكانت خصوصية التشخيص 100في المائة والدقة النسبية مقارنة بطريقة التهجين الجزيئي (Murcia وآخرون 2009) 100 في المائة. وأجري التحقق من صحة الاختبار على 208 عينات حقلية لأصناف S. jasminoides و.Brugmansia spp و Datura spp وPetunia spp و Dendrathema spp وبطاطا وبندورة. من بين العينات الـ 208، كانت 43 إيجابية صحيحة و150 سلبية صحيحة بكل من الطريقتين. كانت 15 عينة إيجابية زائفة بالتهجين الذي كشف فيه عن فيرود Tomato apical stunt viroid (TASVd) وفيرود Citrus exocortis viroid (CEVd) . لم تكن هناك عينات سلبية زائفة

[1] لأن تركيز الفيرود في مادة الاختبار الأصلية غير معروف، لبعض الفحوص يعبر عن حد الكشف (الحساسية) كقيمة نسبية . تعتبر عصارة ورقة غير مخففة مصابة 100 في المائة (بنسبة 1 غرام مادة أوراق: 3 ملليغرم داري). جرى تحديد الحد النسبي للكشف عن طريق اختبار ثمانية مخففات تسلسلية لعصارة ورقة مصابة في عصارة ورقة سليمة. يعرف الحد النسبي للكشف كمتوسط أدنى معدل إصابة نسبي لكل خلاصة لايزال من الممكن الكشف عنها (دورة حد (Ct) تقل عن 32)، وأضيفت ثلاثة انحرافات معيارية لإعطاء قياس محافظ مع يقين 99.7 في المائة (Botermans *et al* وآخرون 2013).

[2] الطرق الثلاث، الارتحال الكهربائي الهلامي البولي الأكريلاميدي العَكسي R-PAGE و تفاعل البلمرة التسلسلي باستخدام إنزيم النسخ العكسي RT-PCR من خطوتين، باستخدام بادئات Shamloul وآخرون، (1997) قورنتا في اختبار حلقة دولي. (Jeffries and James, 2005).

تاريخ المطبوع

هذا ليس جزءاً رئيسياً من المعيار

2007 03- أضافت الدورة الثانية لهيئة تدابير الصحة النباتية موضوع لبرنامج العمل ((02-06)

112012- راجع فريق الخبراء المعني ببروتوكولات التشخيص مسودة البروتوكول

2013 03- وافقت لجنة المعايير بقرار إلكتروني إلى مشاورة الأعضاء
(2013_eSC_May_10)

2013 07- انعقاد مشاورة الأعضاء

2014 07- استعرض فريق الخبراء المعني ببروتوكولات التشخيص مسودة البروتوكول

2014 09- وافق فريق الخبراء المعني ببروتوكولات التشخيص بقرار إلكتروني إلى لجنة المعايير للموافقة عليها لاعتمادها
(2014_eTPDP_September_01)

2014 11- وافقت لجنة المعايير عليها بقرار إلكتروني إلى فترة الإخطار لبروتوكول التشخيص
(2014_eSC_Nov_13)

2014 12- فترة الإخطار

2015 01- اعتمدت لجنة المعايير بروتوكول التشخيص نيابة عن هيئة تدابير الصحة النباتية (لم تتلق أي اعتراضات رسمية)

المعيار الدولي رقم 27 الملحق 7 *فيرود درنة البطاطا المغزلية* (2016). روما، الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات، الفاو

2015–07 أدرجت أمانة الاتفاقية التعديلات التحريرية وغيرت شكل المعايير بعد إلغاء الإجراء المعياري من الدورة العاشرة للهيئة (2015)

2016–05 اعتمدت لجنة المعايير التنقيح التقني لبروتوكول التشخيص هذا فيما يخص تسلسل بادئة الضبط الداخلي COX-F تماشيًا مع المرجع الوارد في المؤلفات العلمية المقدم (Weller وآخرون، 2000) (القسم "3–3–4–2 RT-PCR في الوقت الحقيقي باستخدام بادئات Boonham وآخرين (2004) ") (2016_eSC_May_15). وأخذ فريق الخبراء المعني ببروتوكولات التشخيص علماً بالتسلسلين في النسخة السابقة لبروتوكول التشخيص وبالتسلسل الحالي بحسب عمل Weller وآخرين.

كان آخر تعديل لتاريخ المطبوع في 2005–2016.