اعتمدت لجنة المعايير بالنيابة عن هيئة تدابير الصحة النباتية بروتوكول التشخيص هذا في أغسطس/آب 2016.
هذا الملحق جزء مُلزم من المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية رقم 27.

المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية رقم 27
بروتوكولات تشخيص الآفات الخاضعة للوائح

بروتوكول التشخيص 15: فيروس تِريستيزا الحمضيات *Citrus tristeza virus*

اعتُمد في 2016؛ نُشر عام 2019

بيان المحتويات

1- معلومات حول الآفة 3
2- معلومات تصنيفية 4
3- طرق الكشف وتحديد الهوية 5
3-1 النباتات العائلة 5
3-2 الأعراض 6
3-3 الفهرسة البيولوجية 7
3-4 أخذ العينات وإعداد العينات من أجل الاختبار المصلي والجزيئي 8
3-4-1 أخذ العينات 8
3-4-2 إعداد دمغ الأنسجة 9
3-4-2-1 إعداد دمغ الأنسجة من أجل الاختبار المصلي 9
3-4-2-2 إعداد دمغ الأنسجة وسحق الأرقات من أجل اختبار التضخيم الجزيئي 9
3-4-3 إعداد المستخرجات النباتية لاختبار التضخيم المصلي والجزيئي 9
3-5 الاختبارات المصلية 10
3-5-1 فحص إليزا لدمغ الأنسجة المباشر 10
3-5-2 اختبار ساندويتش ثنائي الأجسام المضادة-إليزا **DAS-ELISA** 11
3-6 الاختبارات الجزيئية 12
3-6-1 تنقية الحمض النووي الرّيبي والاصطياد المناعي وتوليف الحمض النووي المكمّل.. 13
3-6-1-1 تنقية الحمض النووي الرّيبي المكمّل 13
3-6-1-2 الاصطياد المناعي 13
3-6-1-3 توليف الحمض النووي المكمّل 13
3-6-2 التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي للاصطياد المناعي..... 14
3-6-3 التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي المتداخل للاصطياد المناعي في أنبوب مغلق واحد 14
3-6-4 الاعتبارات العامة للتفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي، والتفاعل المتداخل 15

5-6-3 التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي الآني 15
7-6-3 تفسير نتائج التفاعل المتسلسل للبوليميراز التقليدي والآني 17
1-6-3 شواهد الاختبارات الجزيئية..... 17
1-7-6-3 التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي التقليدي والتفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي للاصطياد المناعي..... 18
2-7-6-3 التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي الآني..... 18
7-3 التثبت من الصلاحية عبر دراسة لأداء الاختبار..... 18
4- تحديد السلالات العدائية لفيروس تريستيزا الحمضيات 19
1-4 الفهرسة البيولوجية..... 20
2-4 الاختبارات المصلية التي تستخدم **MCA13** 20
5- السجلات 21
6- جهات الاتصال للحصول على معلومات إضافية 22
7- شكر وتقدير 22
8- المراجع 23
9- الأشكال 26

1- معلومات حول الآفة

يتسبب فيروس تِريستيزا الحمضيات *Citrus tristeza virus* بأحد أكثر الأمراض إضراراً بالحمضيات والأوبئة الأشد تدميراً التي غيّرت مسار قطاع الحمضيات (Moreno *et al.*, 2008). تشير كلمة "تريستيزا"، التي تعني باللغة البرتغالية "الحزن" أو "الكآبة"، إلى التدهور الذي يظهر على الكثير من أنواع الحمضيات حين تطعّم على أصل (*Citrus aurantium*) البرتقال المر أو (*Citrus limon*) (الليمون الحامض). وعلى الرغم من أن تريستيزا هو بشكل عام مرض يصيب اتحاد البراعم (Román *et al.*, 2004) فإن بعض سلالات هذا الفيروس تتسبب بمتلازمات أخرى بما فيها تنقر السوق والتقزم وتراجع الإنتاجية ورداءة جودة الثمار لدى العديد من الأصناف التجارية حتى حين تكون مطعمة على أصول مقاومة لتريستيزا.

ومن الأرجح أن فيروس تِريستيزا الحمضيات قد نشأ في ماليزيا وغيرها من بلدان جنوب شرق آسيا التي تعد المنشأ المفترض للحمضيات وانتشر من ثم في السواد الأعظم للبلدان التي تنمو فيها الحمضيات من خلال انتقال المواد النباتية المصابة بالآفة. وقد أدى الانتشار المحلي للآفة في مراحل تالية، تسببت به أصناف حشرات المن الناقلة للمرض، إلى أوبئة كبرى.

وأفيد للمرة الأولى عن فناء أشجار مطعمة على أصل البرتقال المر في جنوب أفريقيا خلال مطلع القرن العشرين، وفي الأرجنتين والبرازيل خلال الثلاثينيات، والأرجح أن ذلك قد حدث عقب إدخال نبتات مصابة بفيروس تِريستيزا الحمضيات التي تفشت فيها من الحمضيات السوداء توكسوبتيرا سيتريسيدا (كيركالدي) (*Toxoptera citricida* Kirkaldy) التي تعد الأكثر فعالية في نقل الفيروس. وإن التدهور الذي يتسبب به فيروس تِريستيزا الحمضيات قد فتك بأشجار مطعمة على أصل البرتقال المر أو أصابها بالعقم (Cambra *et al.*, 2000a؛ Bar-Joseph *et al.*, 1989). وقد تفشى فيروس تِريستيزا الحمضيات في الولايات المتحدة وبعض بلدان البحر الكاريبي وبعض البلدان المتوسطية (لا سيما إيطاليا والمغرب). وقد أصاب الفيروس ما يقدر بـ 38 مليون شجرة في الأمريكتين (لا سيما الأرجنتين والبرازيل وفنزويلا وولاية كاليفورنيا (الولايات المتحدة))، و60 مليون شجرة في حوض البحر الأبيض المتوسط (لا سيما إسبانيا مع إصابة حوالي 50 مليون شجرة) وما يقدر بخمسة ملايين شجرة في أمكنة أخرى، فيصبح المجموع أكثر من 100 مليون شجرة. ويمكن مكافحة مرض تريستيزا عبر استخدام أنواع من أصول الحمضيات المتحملة لآفة تريستيزا. هناك بعض السلالات العدائية للفيروس التي تتسبب بتنقر السوق في أصناف معينة من الحمضيات، بغض النظر عن الأصل المستخدم. ويؤثر ذلك تأثيراً كبيراً في جودة الثمرة والغلة لدى عدة ملايين من الأشجار المصابة بهذه السلالات العدائية في معظم قطاعات الحمضيات حول العالم، باستثناء تلك الموجودة في حوض البحر الأبيض المتوسط حيث السلالات العدائية غير موجودة أو غير مهيمنة. ومن أجل التعاطي بفعالية مع مرض تنقر السوق، اعتمدت بعض قطاعات الحمضيات استراتيجية تقضي بتلقيح الأشجار بشكل وقائي بواسطة سلالات متوسطة الحدة لفيروس تِريستيزا الحمضيات، أو ممارسة الحماية الوقائية بواسطة التلقيح (da Graça and van Vuuren, 2010؛ Broadbent *et al.*, 1991).

ويعتبر فيروس تِريستيزا الحمضيات العنصر الأكبر والأكثر تعقيداً في جنس كلوستيروفيروس (فيروس اصفرار البنجر (*Closterovirus*) (Moreno *et al.*, 2008). وتتسم الجسيمات الحموية بأشكالها المتلوية والخيطية، ويبلغ طولها 2 000 نانومتر وقطرها 11 نانومتراً وهي تحتوي جينوم للحمض النووي الرّيبي غير مقطع وإيجابي الاتجاه وأحادي الجديلة. يحتوي جينوم فيروس تريسيتيزا الحمضيات على 12 إطاراً مفتوح القراءة يقوم بترميز ما لا يقل عن 17 بروتيناً ومنطقتين غير مترجمتين. أما الإطاران مفتوحا القراءة 7 و8 فيرمّزان بروتينات ذات

أوزان جزيئية تبلغ 27.4 كيلودالتون (P27) و24.9 كيلودالتون (P25). وقد تم تحديدها على أنها القشور البروتينية للفيروس. إن تنوّع فيروس تِريستيزا الحمضيات أكبر مما كان يعتقد في السابق؛ فقد اشتق تركيبان وراثيان عن المجموعة الأصل أو نميا من خلال إعادة التكوّن مع سلالات موصوفة سابقاً (Harper *et al.*, 2008). وأمّا مجموعات الفيروس الموجودة في أشجار الحمضيات عبارة عن أشباه أصناف بطبيعتها، ذلك أنّ أكثر من مزيج معقد من التركيبات الوراثية للفيروس وأحماض ريبية نووية فيروسية شائبة قد تطور خلال مرحلة التكاثر الخضري لعزلات الفيروس على المدى البعيد من خلال التطعيم والاختلاط بين تلك العزلات وبين العزلات التي تنقلها حشرات المن. وجراء ذلك، تحتوي عزلات الفيروس أعداداً من تسلسلات متباينة، يهيمن تسلسل واحد منها عادة على سواه (Moreno *et al.*, 2008).

وينتقل الفيروس بسهولة في سياق الاختبارات عبر تطعيم الحمضيات السليمة بمواد نباتية مصابة بالفيروس. كما ينتقل طبيعياً من خلال أنواع معينة لمن الحمضيات السوداء بطريقة شبه مطردة. أما الناقل الأكثر فعالية لفيروس تريستيزا الحمضيات حول العالم، فهي ت. سيتريسيدا (*T. citricida*). تتسم ت. سيتريسيدا بحضورها الراسخ في كل من آسيا وأستراليا وأفريقيا جنوب الصحراء الكبرى وأمريكا الوسطى والجنوبية ومنطقة البحر الكاريبي وفلوريدا (الولايات المتحدة) وشمال البر الإسباني الرئيسي والبرتغال فضلاً عن جزر مادیرا (Moreno *et al.*, 2008؛ Ilharco *et al.*, 2005). بيد أن أفيس غوسيبي غلوفر (*Aphis gossypii* Glover) تعد الناقل الرئيسي للفيروس في إسبانيا وإسرائيل وبعض مناطق زراعة الحمضيات في كاليفورنيا (الولايات المتحدة) وكل المواقع التي تغيب عنها ت. سيتريسيدا (*T. citricida*) (Marroquín *et al.*, 2004؛ Cambra *et al.*, 2000a؛ Yokomi *et al.*, 1989). هناك تقارير تفيد عن التأثيرات النسبية لأصناف المن الناقلة في انتشار فيروس تِريستيزا الحمضيات (Gottwald *et al.*, 1997). وهناك أنواع أخرى من المن التي وصفت كذلك على أنها من ناقلات فيروس تِريستيزا الحمضيات (Moreno *et al.*, 2008)، بما فيها أفيس سبيريكولا باتش (*Aphis spiraecola Patch*) وتوكسوبتيرا أورانتي (*Toxoptera aurantii*) (Boyer de Fonsicolombe)، وميزوس برسيكي (*Myzus persicae*) (Sulzer) وآفيس كراكسيفورا كوخ (*Aphis craccivora* Koch) ويورولوكون جاسيا (*Uroleucon jaceae*) (Linnaeus). وعلى الرغم من أن الأدلة تشير إلى أن أنواع المن المذكورة هي ناقلات أقل فعالية للفيروس مقارنة بتوكسوبتيرا سيتريسيدا (*T. citricida*) وآفيس غوسيبي (*A. gossypii*) في سياق الدراسات الاختبارية لانتقال الآفة، إلا أنها من أنواع المن المهيمنة في بعض المناطق وبالتالي يرجح أنها تؤدي دوراً في انتشار الفيروس إذ تعوّض على قلة فعاليتها في النقل بكثرة عددها (Marroquín *et al.*, 2004).

وشكّل انتشار الفيروس عبر المكان والزمان في بساتين الحمضيات موضوع دراسات في أنحاء مختلفة من العالم (Gottwald *et al.*, 2002). وتقدم تلك الدراسات دليلاً على أن فترة زمنية طويلة قد تفصل ما بين إدخال أول مصدر لزرعة الفيروس وما بين تطور وباء تريستيزا (Garnsey and Lee, 1988).

2- معلومات تصنيفية

الاسم: فيروس تِريستيزا الحمضيات (*Citrus tristeza virus*)

المرادفات: فيروس تريستيزا

الوضع التصنيفي: فيروس اصفرار البنجر (*Closterovirus*) فيروسات اصفرار البنجر (*Closteroviridae*)

الأسماء الشائعة: فيروس تِريستيزا، فيروس تِريستيزا الحمضيات

3- طرق الكشف وتحديد الهوية

يمكن كشف فيروس تريستيزا الحمضيات وتحديده بواسطة اختبارات التضخيم البيولوجية أو المصلية أو الجزيئية (الشكلان 1 و2). يعتبر استخدام أي من تلك الاختبارات شرطاً بالحد الأدنى لكشف الفيروس وتحديده (أي خلال التشخيص الروتيني للآفة حين تكون منتشرة على نطاق واسع في بلد معين). أما في الحالات التي تفرض فيها المنظمة الوطنية لوقاية النباتات المزيد من اليقين في تحديد الفيروس (مثلاً كشف الفيروس في منطقة لا يطرأ فيها عادة، أو كشفه في شحنة قادمة من بلد أعلن عن خلوه من الفيروس)، ينبغي تنفيذ المزيد من الاختبارات. وحيثما تنفذ عملية التحديد الأولية بواسطة اختبار جزيئي للتضخيم، ينبغي للاختبارات اللاحقة أن تكون مصلية، والعكس صحيح. ويمكن إجراء مزيد من الاختبارات كذلك من أجل تحديد أية من سلالات تريستيزا هي الموجودة، وفي هذه الحالة قد تدعو الحاجة إلى سَلسلَة الأمبليكونات بواسطة تفاعل البوليمراز التسلسلي. في جميع الأحوال، لكي تكون الاختبارات قابلة للوثوق بها، يجب أن تتضمن شواهد إيجابية وسلبية. يرد في الأقسام التالية وصف للتقنيات الموصى بها لاختبارات التضخيم البيولوجية والمصلية والجزيئية. ويعرض الشكل 2 مخططاً انسيابياً لعملية تحديد سلالات فيروس تِريستيزا الحمضيات.

في بروتوكول التشخيص هذا جرى وصف الطرق (بما فيها الإشارة إلى الأسماء التجارية) بحسب ما هي منشورة، إذ أنها تحدد المستوى الأصلي للحساسية أو التخصص و/أو قابلية النسخ الذي تم بلوغه. وإن استخدام أسماء الكواشف أو المواد الكيميائية أو التجهيزات في بروتوكولات التشخيص هذه لا ينطوي على تأييدها من أجل استثناء أخرى قد تكون مناسبة هي أيضاً. ويجوز تعديل الإجراءات المخبرية الواردة في البروتوكولات لكي تتواءم مع معايير المختبرات الفردية، شريطة المصادقة عليها بالشكل المناسب.

3-1 النباتات العائلة

ضمن الظروف الطبيعية، تصيب آفة تريستيزا بسهولة معظم أنواع الحمضيات وأنواع البرتقال الياباني (*Fortunella*) وبعض الأنواع المعروفة عامة بأنها من قريبات الحمضيات التي تنتمي إلى فصيلة السذابيات والمعرضة هي أيضاً لأن تكون نباتات عائلة لتريستيزا، وهي *Aegle* و*Aeglopsis* و*Afraegle* و*Atalantia* و*Citropsis* و*Clausena* و*Eremocitru* و*Hespertusa* و*Merrillia* و*Microcitrus* و*Pamburus* و*Pleiospermium* و*Swinglea* (Timmer *et al.*, 2000؛ Duran-Vila and Moreno, 2000). إن معظم كلونات بونسيروس تريفولياتا *Poncirus trifoliata* (البرتقال ثلاثي الأوراق) والكثير من هجيناتها فضلاً عن فورتونيلا كراسيفوليا *Fortunella crassifolia* (كمكوات ميوا) وبعض أصناف الحمضيات الكبرى (*Citrus grandis*) (البوميلو)، مقاومة لمعظم سلالات فيروس تريستيزا الحمضيات (Moreno *et al.*, 2008). وبالتالي، فإن الفيروس غائب أو موجود بنسب متدنية جداً في تلك الأنواع. أما سيتروس رتيكولاتا (*Citrus reticulata*) (برتقال المندرين)، وسيتروس سيننسيس (*Citrus sinensis*) (البرتقال الحلو) وسيتروس لاتيفوليا (*Citrus latifolia*) (حامض اللايم) فكلها من الأصناف الأشد تعرضاً للإصابة الطبيعية بالفيروس، تليها سيتروس باراديزي (*Citrus paradisi*) (الجريب فروت)، وسيتروس أونشيو (*Citrus unshiu*) (مندرين ستسوما) وأصناف الليمون الحامض (*Citrus limon*). ومن بين الأنواع المستخدمة كجذور للتطعيم، يعد كل من سيتروس ماكروفيلا (*Citrus macrophylla*) (ليمون أليماو) وسيتروس فولكاميريانا (*Citrus volkameriana*) (ليمون فولكامير) وسيتروس رشني (*Citrus reshni*) (مندرين كليوباترا) وسيتروس ليمونيا (*Citrus limonia*) (لايم رانغبور أو المندرين الحامض) من الأنواع شديدة التعرض للإصابة بشكل طبيعي بالفيروس، فيما أن برتقال سيترانج

من نوعي كاريزو (Carrizo) وترويير (Troyer) (وهما هجينان بين البرتقال الحلو والبرتقال ثلاثي الأوراق) وسيتروس أورانتيوم (*C. Aurantium*)، فقليلاً ما يصابان بالآفة. يتسم جذر البرتقال ثلاثي الأوراق بونسيروس تريفولياتا (*P. trifoliata*) والجريب فروت سيتروس باراديزي (*C. paradisi*) × البرتقال ثلاثي الأوراق بونسيروس تريفولياتا (*P. trifoliata*) (الستروميلو) بمقاومة معظم سلالات الفيروس. أما باسيفلورا غراسيليس (*Passiflora gracilis*) وباسيفلورا كوروليا (*Passiflora coerulea*) فمن النبتات العائلة الاختبارية من غير الحمضيات.

2-3 الأعراض

يتفاوت ظهور الأعراض في النبتات الحمضية العائلة لفيروس تريستيزا تفاوتاً كبيراً إذ أنها تتأثر بالظروف البيئية وأنواع النباتات العائلة ومدى عدائية سلالة الفيروس. بالإضافة إلى ذلك، قد يبقى الفيروس كامناً لسنوات عدة. وتكون بعض سلالات الفيروس متوسطة العدائية ولا تولّد آثاراً ملحوظة في معظم أنواع الحمضيات التجارية، بما فيها الحمضيات المطعمة على أصل سيتروس أورانتيوم (*C. aurantium*). وبشكل عام، تعتبر فاكهة المندرين مقاومة بشكل خاص للإصابة بالفيروس. وعادة ما يخلو كل من سيتروس سيننسيس (*C. sinensis*) وسيتروس أورانتيوم (*C. aurantium*) (كشتول لا كأصول مطعمة)، وسيتروس جامبهيري (*Citrus jambhiri*) (*الليمون الخشن*) وسيتروس ليمونيا (*C. limonia*) من الأعراض لدى إصابته بالفيروس، ولكن قد يكون لها رد فعل على بعض السلالات العدائية. وإن الحمضيات العائلة التي تظهر عليها أعراض قد تتضمن اللايم والجريب فروت وبعض أصناف البوميلو وبرتقال أليماو والبرتقال الحلو وبعض الحمضيات الهجينة وبعض قريبات الحمضيات من فصيلة السذابيات المذكورة في القسم 3-1.

ووفقاً لسلالة الفيروس المعينة أو نوع الحمضيات أو المطعوم-الأصل، قد لا يؤدي الفيروس إلى ظهور أي أعراض أو إلى ظهور متلازمة واحدة من أصل ثلاث أي: تريستيزا؛ أو تنقر السوق؛ أو اصفرار الشتول الذي يلاحظ بشكل رئيسي في ظروف الدفيئة. تصف الفقرات التالية هذه المتلازمات الثلاث. ويبين الشكل 1 الأعراض الرئيسية التي يتسبب بها فيروس تِريستيزا الحمضيات.

وإن آفة تريستيزا هي النتيجة الأبرز للإصابة بالفيروس من الناحية الاقتصادية (وهي من الأمراض التي تصيب اتحاد البراعم) وتتسم بتدهور الأشجار المطعمة على أصل البرتقال المر أو الليمون الحامض. فيعاني مطعوم البرتقال الحلو واليوسفي والجريب فروت على تلك الأصول، من التقزم والاخضرار وكثيراً ما يفنى بعد عدة أشهر أو سنوات (يعاني خلالها تدهوراً بطيئاً)، فيما أن المطاعيم الأخرى تعاني تدهوراً سريعاً أو انهياراً بعد مرور أيام قليلة على ظهور أولى الأعراض. ينجم التدهور عن التأثيرات الفيزيولوجية للفيروس في قشرة الأصل شديد التعرض للإصابة، تحت اتحاد البراعم مباشرة. أما الأشجار التي تتدهور بوتيرة بطيئة، فكثيراً ما يظهر عليها انتفاخ فوق مستوى اتحاد البراعم وخط بني اللون عند نقطة اتحاد البراعم مباشرة، وتنقّر على شكل بقع نقطية مقلوبة (تشقق مخرومي الشكل) على الوجه الداخلي لقشرة أصل البرتقال المر. ويعتبر التقزم وتقوّس الأوراق وشفافية العروق وشحوب الأوراق وتنقر السوق وتقلص حجم الثمار، من الأعراض الشائعة التي تظهر على النبتات العائلة المعرضة للإصابة. بيد أن بعض عزلات الفيروس ولا سيما في قطاع الحمضيات في حوض البحر المتوسط، لا تؤدي إلى ظهور أعراض التدهور إلا بعد مرور سنوات عدة على الإصابة حتى في الأشجار المطعمة على البرتقال المر.

وبوسع السلالات العدائية لفيروس تريستيزا الحمضيات أن تلحق ضرراً فادحاً بالأشجار، بما في ذلك التنقر على جذع وأغصان اللايم والجريب فروت والبرتقال الحلو. وقد يسبب تنقر

السوق أحياناً ظهور نتوءات أو لزوجة على جذوع الأشجار البالغة وأطرافها، وثقوب عميقة في الخشب تحت المناطق الغائرة للقشرة، وتراجع في جودة الثمار والغلال. يؤثر السواد الأعظم من سلالات فيروس تريستيزا الحمضيات في أصل برتقال أليماو تأثيراً خطيراً بما أن الأصل يصاب بتنقر يحد بدوره من حيوية الشجرة.

أما متلازمة اصفرار الشتول فتتسم بالتقزم أو إنتاج الأوراق المصفرة أو الشاحبة، ومحدودية شبكة الجذور وتوقف نمو الأشجار المطعمة على شتول البرتقال المر والجريب فروت والليمون الحامض المزروعة ضمن ظروف الدفيئة (أي على حرارة تتراوح بين 20 و26 درجة مئوية).

3-3 الفهرسة البيولوجية

تهدف الفهرسة البيولوجية إلى الكشف عن وجود فيروس تريستيزا الحمضيات في المدخلات النباتية أو النباتات المختارة أو العينات النباتية التي يجري تقييم وضعها الصحي، ولتقدير درجة عدائية العزلة على شتول سيتروس أورانتيفوليا *Citrus aurantifolia* (الليمون المكسيكي أو البلدي أو العماني) أو سيتروس ماكروفيلا *C. macrophylla* أو سيتروس باراديزي ماكفاديين *Citrus paradisi* Macfadyen جريب فروت دنكان (Duncan). والنبتة الدالة عبارة عن طعم جرى تلقيحه بموجب الطرق التقليدية وإبقائه ضمن الظروف القياسية (Roistacher, 1991)، مع أربع إلى ست نسخ (أو مع نسختين إلى ثلاث في حال تعذر سحب كمية كافية من العينات). وإن كلا من شفافية العروق في الأوراق اليانعة، أو تقوّس الأوراق أو اعوجاجها أو قصر الفواصل العقدية، أو تنقر السوق أو ظهور أعراض اصفرار الشتول على تلك النباتات الحساسة الدالة، يعد دليلاً على الإصابة بفيروس تريستيزا الحمضيات بعد تلقيح الطعم. وتقارن بداية ظهور الأعراض ببداية ظهورها على النباتات المستخدمة كشواهد سلبية وإيجابية. يمكن الاطلاع على رسوم توضيحية للأعراض الناجمة عن فيروس تريستيزا الحمضيات في النباتات الدالة لدى Roistacher (1991) و Moreno *et al.* (2008).

وتستخدم الفهرسة البيولوجية على نطاق واسع في سياق خطط إصدار الشهادات، وهي تعد من الطرق الحساسة والموثوقة لكشف السلالات الجديدة أو غير الاعتيادية للفيروسات. إلا أن لديها بعض السلبيات، فهي ليست اختباراً سريعاً (إذ يستغرق تطور الأعراض بين 3 إلى 6 أشهر ما بعد التلقيح)؛ ويمكن استخدامها فقط لاختبار خشب التطعيم؛ وهي تتطلب مرافق مخصصة مثل الدفيئة مضبوطة الحرارة المانعة للحشرات؛ كما تستوجب موظفين مخصصين قادرين على زرع نباتات عائلة دالة سليمة وقوية قادرة على إظهار الأعراض الملائمة، وموظفين من ذوي الخبرة يستطيعون أن يفسروا بدقة أعراض الأمراض التي يمكن أن يكون ثمة لبس بينها وبين أعراض الآفات الأخرى المنتقلة عبر الطعوم.زد على أن سلالات فيروس تِريستيزا الحمضيات التي لا تنتج أعراضاً (أي السلالات الكامنة) غير قابلة للكشف على النباتات المستخدمة كشواهد (مثل سلالة K لفيروس تريستيزا الحمضيات التي وصفها Albertini *et al.* (1988)).

هناك القليل فقط من البيانات الكمية المنشورة بشأن التخصص والحساسية وغيرهما من بارامترات التشخيص ومصداقية المقايسات البيولوجية عبر تطعيم النباتات المستخدمة كمؤشرات (الفهرسة) للكشف عن فيروس تريستيزا الحمضيات أو تشخيصه أو تحديده. قام Cambra *et al.* (2002) في مشروع بروتوكولات التشخيص الأوروبية (DIAGPRO) و Vidal *et al.* (2012) بمقارنة فهرسة الليمون المكسيكي مع الفحص المناعي المرتبط بالإنزيم (ELISA) (إليزا) لدمغ الأنسجة المباشر (القسم 3-5-1) (باستخدام الجسمين المضادين أحاديي الكلون 3DF1 + 3CA5 والتفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي الآني لدمغ الأنسجة (القسم 3-6-5)

فاستنتجوا أن أيةً من هاتين الطريقتين المخبريتين تستطيع الحلول محل الفهرسة البيولوجية التقليدية لليمون المكسيكي بهدف كشف فيروس تريستيزا الحمضيات.

4-3 أخذ العينات وإعداد العينات من أجل الاختبار المصلي والجزيئي

3-4-1 أخذ العينات

ترد التوجيهات العامة بشأن منهجيات أخذ العينات، في المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية 31 (*منهجيات أخذ العينات من الشحنات*) وفي Cambra *et al* (2002) فيما خصّ أخذ عينات فيروس تِريستيزا الحمضيات تحديداً. يعتبر أخذ العينات بالصورة المناسبة ضرورياً جداً لكشف فيروس تِريستيزا الحمضيات وتحديده بواسطة وسائل التضخيم البيولوجية أو المصلية أو الجزيئية. أما التغييرات في خطة معتمدة لأخذ العينات فقد تفضي إلى نتائج سلبية أو إيجابية كاذبة من بروتوكول تشخيص فعّال. وتتكون العينة القياسية للأشجار البالغة، من خمسة براعم يافعة أو سويقات ثمار، أو عشر أوراق متفتحة بالكامل أو خمس أزهار أو ثمرات قطفت من مختلف أنحاء العرش الخضري لكل شجرة، من كل من الأغصان الأصلية. ويمكن أخذ العينات (سواء أكانت براعم أم أوراق متفتحة بالكامل وسويقات) في أي وقت من السنة، من أشجار البرتقال الحلو واليوسفي والليمون الحامض والجريب فروت في المناخات المتوسطية المعتدلة، إلا أن فصلي الربيع والخريف هما الفترتان الأمثل لأخذ عينات في المناخات الاستوائية وشبه الاستوائية بغية تجميع كميات مرتفعة من فيروس تريستيزا الحمضيات. في تلك المناخات، يلاحظ انخفاض كمية الفيروس في مندرين ستسوما خلال الصيف، وبالتالي فإن الفترة المحبذة لأخذ العينات تضم كل المواسم الخضرية، باستثناء الأيام الحارة (التي تتراوح درجة حرارتها بين 35 و40 درجة مئوية) في فصل الصيف. بيد أنه يمكن أخذ عينات من الجذور خلال الفترات الحارة إذا لزم الأمر. كما أن الأزهار أو الثمار (حين تكون متاحة) تشكل هي أيضاً مواد مناسبة لأخذ العينات (Cambra *et al.*, 2002). ويعتبر نسيج سويقة الثمرة في منطقة بياض النبتة، حيث تلتقي السويقة بالثمرة، أو في العُمَيد، هو الأنسب لأخذ عينات عن الثمرة. ومن الاشتراطات القياسية لأخذ عينات عن نباتات المشاتل، قطف برعمين يافعين أو أربع أوراق من كل نبتة. ويمكن بالعادة جمع رقاقات غير برعمية (وهي قطع صغيرة من القشرة خالية من البراعم) أو حتى أوراق من النباتات المصابة في أي وقت من السنة (ولكن يفضّل أن يكون ذلك خلال الفترة الخضرية) من براعم عمرها عام واحد على الأقل أو ثلاثة أغصان، للفهرسة بحسب Roistacher (1991).

ويمكن تخزين البراعم ومعاليق الأوراق وسويقات الثمرات والأزهار على حرارة 4 درجات مئوية تقريباً حتى 7 أيام قبل معالجتها. ويمكن تخزين الثمار لشهر واحد على حرارة 4 درجات مئوية تقريباً. أما استخدامها بعد هذا الحد الزمني فقد يؤدي إلى انخفاض في الكميات واحتمال أن تفضي طرق التشخيص إلى نتائج سلبية كاذبة.

ويمكن للعينات المركبة التي تخضع إلى الاختبار كعيّنة موحدة، أن تؤخذ في الوقت نفسه (عادة ما تتشكل من ورقتين أو من برعم واحد من نبتة واحدة إلى عشر من نبتات المشاتل، أو عشر أوراق أو خمسة براعم عن كل شجرة بالغة مأخوذة من مختلف أنحاء العرش الخضري) من أجل اختبارات التضخيم المصلية أو الجزيئية. وفي بعض الظروف (مثل المسح الروتيني لفيروس تريستيزا الحمضيات المنتشر على نطاق واسع في بلد معين أو منطقة معينة)، يجوز اختبار نباتات متعددة في الوقت نفسه باستخدام عينة مركبة مشتقة من عدة نبتات. أما اتخاذ القرار ما بين اختبار عينات نبتات فردية وبين اختبار عينات نباتية مركبة بواسطة طرق التضخيم المصلي أو الجزيئي، فيعتمد على كميات الفيروس في النبتات والانتشار المتوقع لفيروس تريستيزا الحمضيات في

المنطقة (Vidal *et al.*, 2012) وحدود الكشف لطريقة الاختبار المنوي تطبيقها، ومستوى اليقين الذي تفرضه المنظمة الوطنية لوقاية النباتات.

يمكن اختبار حشرات المن (سواء أكانت طازجة أم محفوظة في محلول الكحول بنسبة 70 في المائة) كلا على حدة بغية كشف وجود فيروس تريستيزا الحمضيات. وتجمع حشرات المن مباشرة من مستوطنات مستقرة أو تصاد بواسطة الأفخاخ: وينصح باستخدام أفخاخ الامتصاص، أو أفخاخ Moericke التقليدية بالماء الأصفر أو أفخاخ البراعم اللاصقة. يفضل استعمال العينات التي تم جمعها للسحق في التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي الآني (Bertolini *et al.*, 2008) أو في اختبارات التضخيم الجزيئية الأخرى (Marroquín *et al.*, 2004).

3-4-2 إعداد دمغ الأنسجة

3-4-2-1 إعداد دمغ الأنسجة من أجل الاختبار المصلي

تُقصّ البراعم الطرية أو معاليق الأوراق أو سويقات الفاكهة أو مبايض الأزهار بشكل قاطع. ثم تضغط الأجزاء حديثة القص بتأنّ على غشاء من النِتْروسِيلُولُوز أو إستر السيلولوز (0.45 ملم) ويترك الأثر أو الدمغ ليجف لمدة 2 إلى 5 دقائق. ومن أجل الاختبار المصلي الاعتيادي، ينبغي تنفيذ دمغتين على الأقل لكل برعم مختار (دمغة لكل من طرفي البرعم) أو سويقة مختارة، أو دمغة واحدة عن كل سويقة ورقة أو مبيض زهرة. ويمكن الاحتفاظ بالأغشية المدموغة لعدة أشهر في مكان جاف ومظلم.

3-4-2-2 إعداد دمغ الأنسجة وسحق الأرقات من أجل اختبار التضخيم الجزيئي

يوصى بجمع المواد النباتية يدوياً من أجل تفادي تلويث العينات بواسطة المقص. تجمع البراعم الطرية ذات الأوراق المتفتحة بالكامل أو الأوراق الناضجة من مختلف أنحاء العرش الخضري للشجرة. تضغط سويقة ورقتين أو برعمان اثنان مباشرة على ورقة Whatman 3MM (0.45 ملم) أو غشاء من النايلون إيجابي الشحن. تنفذ عدة دمغات متداخلة بشكل جزئي بواسطة عدة أوراق، على ورقة أو غشاء بمساحة 0.5 سنتمتر مربع تقريباً بحسب Bertolini *et al.* (2008). يترك الأثر أو الدمغة ليجف لمدة تتراوح بين دقيقتين و5 دقائق. من أجل اختبار التضخيم الجزيئي الروتيني، ينبغي إجراء دمغة واحدة لكل سويقة ورقة يتم اختيارها. تسحق حشرات المن الفردية مباشرة على ورقة Whatman 3MM[1] على غشاء من النايلون إيجابي الشحن، بواسطة القعر المستدير لأنبوب إبندورف[1] من أجل تقطيع العينة بالكامل (Bertolini *et al.*, 2008). يمكن الاحتفاظ بالأغشية المدموغة أو المسحوقة لعدة أشهر في مكان جاف ومظلم.

وجرى التثبت من صلاحية الطرق المباشرة لإعداد العينات (سواء أتعلق الأمر بدمغ الأنسجة أم بسحقها) من دون إعداد المستخرجات باعتبارها بديلاً عن الإعداد التقليدي للمستخرجات من أجل معالجة العينات (Vidal *et al.*, 2012).

3-4-3 إعداد المستخرجات النباتية لاختبار التضخيم المصلي والجزيئي

تقطّع كمية تتراوح بين 0.2 و0.5غ من المواد النباتية الطازجة قطعاً صغيرة بواسطة شفرات قابلة للرمي أو بواسطة مقصات معالجَة بمادة مبيضة من أجل تفادي انتقال التلوث من عينة إلى أخرى، وتوضع في أنبوب أو كيس بلاستيكي ملائم. يمكن إعداد المستخرجات المخصصة للاختبارات المصلية ضمن أنابيب أو أكياس بلاستيكية. أما العينات المخصصة لاختبار التضخيم الجزيئي فيجب أن تعد فقط في أكياس بلاستيكية فردية من أجل تفادي انتقال

التلوث بين العينات. تتم مجانسة العينة بالكامل في محلول دارئ لاستخراج العينات تتراوح كميته بين 4 و10 ملل (1:20 وزن/حجم، إلا في حال أفاد المصنع خلاف ذلك) بواسطة جهاز كهربائي لمجانسة الأنسجة ومحدلة صغيرة يدوية أو مطرقة أو أداة أخرى مشابهة. إن المحلول الدارئ لاستخراج العينات عبارة عن محلول ملحي منظم بالفوسفات بدرجة حموضة تتراوح بين 7.2 و7.4 (كلوريد الصوديوم، 8غ؛ كلوريد البوتاسيوم، 0.2غ؛ دوديكاهيدرات فوسفات ثنائي الصوديوم، 2.9غ، فوسفات أحادي البُوتَاسِيوم، 0.2غ؛ ماء مقطّر، 1ل) متمم بواسطة ديميثيل ديثيوكارباماتي الصوديوم 0.2 في المائة، أو مركابتو إيثانول 0.2 في المائة، أو أي محلول دارئ آخر مثبت الصلاحية بالطرق المناسبة.

5-3 الاختبارات المصلية

من المحبذ جداً استخدام فحص إليزا بواسطة أجسام مضادة أحادية الكلون أو متعددة الكلون مثبتة الصلاحية، من أجل مسح أعداد كبيرة من العينات بهدف كشف فيروس تريسيتزا الحمضيات وتحديده. وكان إنتاج أجسام مضادة أحادية الكلون تخص فيروس تِريستيزا الحمضيات تحديداً (Permar *et al.*, 1990 ؛Vela *et al.*, 1986) وغيرها من الأجسام المضادة التي راجعها Nikolaeva *et al.*، (1996)، كفيلاً بحل مشكلة تخصص التشخيص، التي كانت قد نشأت عن الأجسام المضادة متعددة الكلون (Cambra *et al.*, 2011)، فزادت بالتالي الحساسية التشخيصية للاختبارات المصلية. وإن مزيجاً مكوناً من الجسمين المضادين أحاديي الكلون 3 DF1 و3 CA5 أو صيغهما المؤتلفة (Terrada *et al.*, 2000)، كفيل بالتعرف على كافة عزلات فيروس تِريستيزا الحمضيات التي جرى اختبارها والتي تعود إلى مجموعات دولية مختلفة (Cambra *et al.*, 1990). ويرد وصف مفصل بتلك الأجسام المضادة أحادية الكلون وتحديد خصائصها وإثبات صلاحيتها في Cambra *et al.* (2000a). وأفيد عن أن مزيجاً من الجسمين المضادين أحاديي الكلون C14 وD121 أنتج في المغرب، يتفاعل مع طائفة واسعة من سلالات فيروس تِريستيزا الحمضيات (Zemzami *et al.*, 1999) ولكن لا توجد بيانات متوفرة تتيح التثبت من ذلك.

1-5-3 فحص إليزا لدمغ الأنسجة المباشر

ينفّذ فحص إليزا لدمغ الأنسجة المباشر، الذي يعرف أيضاً بفحص إليزا للدمغ المناعي أو الاختبار المناعي لتبقيع الأنسجة المباشر، بموجب التعليمات الواردة في Garnsey *et al* (1993) و.Cambra *et al* (2000b) باستخدام الطريقة الموصوفة أدناه. وهناك مجموعة كاملة من اللوازم (تم التثبت من صلاحيتها في اختبارات للأداء وفي العديد من الدراسات المنشورة) قائمة على الجسمين المضادين أحاديي الكلون 3DF1 + 3CA5 اللذين يخصان فيروس تريستيزا الحمضيات (Vela *et al.*, 1986) تتضمن أغشية مدموغة مسبقاً مع شواهد إيجابية وسلبية وكافة الكواشف والمحلولات الدارئة والركيزة، متاحة من Plant Print Diagnòstics SL.[1]. ثمة مجموعة لوازم مشابهة ولكن غير مثبتة الصلاحية، ترتكز على تفاعل الجسمين المضادين 4 C1 و1 D12 اللذين استعان بهما Zebzami *et al.*، (1999)، متاحة من.Agdia[1].

توضع الأغشية التي جرى دمغ أنسجتها (الحجم الموصى به: حوالي 7 × 13 سم) في مستوعب ملائم (صينية أو مستوعب محكم الإغلاق أو كيس بلاستيكي)، وتغطى بمحلول من ألبومين المصل البقري بنسبة 1 في المائة في الماء المقطر، وتحضن لساعة واحدة على درجة حرارة البيئة المحيطة أو طيلة الليل (لحوالي 16 ساعة) على حرارة 4 درجات مئوية (هذا الخيار الثاني هو المحبّذ). من المفيد خضها بشكل طفيف خلال هذه المرحلة. يرمى محلول ألبومين المصل البقري ولكن يتم الاحتفاظ بالأغشية داخل المستوعب نفسه. يتم إعداد محلول مقترن يتكون من الجسمين المضادين أحاديي الكلون الخاصين بفيروس تريستيزا الحمضيات 3DF1 + 3CA5

المرتبطين بالفوسفاتاز القلوية، بكميتين متكافئتين (حوالي 0.1 ميكروغرام/ملل من كل جسم مضاد أحادي الكلون في محلول ملحي منظم بالفوسفات) أو من بروتيني الالتحام 3DF1 scFv-AP/S + 3CA5 scFv-AP/S المعبر عنهما في بكتيريا الإشريكية القولونية *Escherichia coli* (بالتذويب المناسب في المحلول الملحي المنظم بالفوسفات (Terrada *et al.*, 2000). يسكب المحلول المقترن على الأغشية حتى يغطيتها ومن ثم تحضن الأغشية لثلاث ساعات على درجة حرارة البيئة المحيطة مع خضها بشكل طفيف. ومن ثم يرمى المحلول المقترن. تشطف الأغشية والمستوعب بواسطة محلول دارئ للغسل (محلول ملحي منظم بالفوسفات، بدرجة حموضة تتراوح بين 7.2 و7.4، مع مادة Tween 20 بنسبة 0.05 في المائة) وتغسل بواسطة الخض (يدوياً أو بواسطة آلة) لمدة خمس دقائق. ومن ثم يرمى المحلول الدارئ للغسل، وتتكرر عملية الغسل مرتين. من ثم تسكب ركيزة الفوسفاتاز القلوية (حبوب سيغما 1 فوسفات 5-برومو-4-كلورو-3-إندوليل السريع/زُرْقَةِ النتروتترازوليوم تبعاً لتعليمات الشركة المصنّعة بتركيز نهائي مقداره 0.33 ملغ/ملل من زُرْقَةِ النتروتترازوليوم و0.175 ملغ/ملل من فوسفات 5-برومو -4-كلورو-3-إندوليل السريع) على الأغشية التي تحضن إلى أن يظهر لون أرجواني-بنفسجي في الشواهد الإيجابي (لمدة تتراوح بين 10 و15 دقيقة). يتم إيقاف التفاعل عبر غسل الأغشية بواسطة المياه الجارية. تمدد الأغشية على ورق ممتصّ وتترك لتجف. تتم معاينة الدمغات بالمجهر بمستوى متدن من التضخيم (من عشر مرات إلى عشرين مرة). أما وجود ترسبات أرجوانية-بنفسجية اللون في المنطقة الوعائية للمادة النباتية فيدل على وجود فيروس تريستيزا الحمضيات.

3-5-2 اختبار ساندويتش ثنائي الأجسام المضادة-إليزا DAS-ELISA

ينفذ اختبار ساندويتش ثنائي الأجسام المضادة-إليزا بناء على تعليمات Garnsey و Cambra (1991) باستخدام الطريقة الموصوفة أدناه. وهناك مجموعات كاملة من الوازم القائمة على الأجسام المضادة أحادية الكلون مثبتة الصلاحية الخاصة بفيروس تريستيزا الحمضيات (Plant Print Diagnòstics SL[1]) (3DF1 + 3CA5) وعلى أجسام مضادة مختلفة متعددة الكلون (Agdia[1], Agritest[1], Bioreba[1], Loewe[1], Sediag[1]).

تستخدم كبيبتان من طبق عيار مجهري لكل عينة، كما تستخدم كبيبتان على الأقل للشواهد الإيجابية والسلبية. يتم إعداد محلول مخفف من الأجسام المضادة متعددة الكلون أو أحادية الكلون (3DF1 + 3CA5) (عادة ما يتكون من 1 إلى 2 ميكروغرام/ملغ من الغلوبولينات المناعية الإجمالية) في محلول دارئ من الكربونات، بدرجة حموضة 9.6 (كبريتيت الصوديوم، ثالث أكسيد الكربون، 1.59 غ، بِيكَرْبُوناتِ الصُّودْيُوم، 2.93 غ؛ ماء مقطر، 1 ل)، وتضاف كمية 200 ميكرولتر إلى كل كبيبة. يحضن الطبق لمدة أربع ساعات على حرارة 37 درجة مئوية، أو طيلة الليل (لحوالي 16 ساعة) على حرارة أربع درجات مئوية. تغسل الكبيبات ثلاث مرات بواسطة محلول دارئ للغسل (محلول ملحي منظم بالفوسفات، بدرجة حموضة تتراوح بين 7.2 و7.4، مع مادة Tween 20 بنسبة 0.05 في المائة). ومن ثم يضاف المستخرج النباتي (القسم 3-4-3)، بمقدار 200 ميكرولتر في كل كبيبة. بعد الحضن لمدة 16 ساعة على حرارة أربع درجات مئوية، تغسل الأطباق لثلاث مرات بحسب التعليمات الموصوفة لفحص إليزا لدمغ الأنسجة المباشر (القسم 3-5-1). تعدّ خلائط محددة بواسطة الجسمين المضادين أحاديي الكلون أو متعددي الكلون (3DF1 + 3CA5) المرتبطين بالفوسفاتاز القلوية بنسب إحلال مناسبة (ما يقارب 0.1 ميكروغرام/ملل في محلول ملحي منظم بالفوسفات مع ألبومين المصل البقري بنسبة 0.5 في المائة) ثم يضاف مقدار 200 ميكروليتر إلى كل كبيبة. يدوم الحضن ثلاث ساعات على حرارة 37 درجة مئوية. ومن ثم تغسل الأطباق مرة أخرى بحسب الطريقة الموصوفة لفحص إليزا لدمغ الأنسجة المباشر (القسم 3-5-1). يعدّ محلول مكوّن من 1 ملغ/ملل من الفوسفاتاز القلوية (فُوسفات البارانِتْروفِنِيل) في ركيزة دارئة (97 ملل من ثنائي إيتانول أمين في 800 ملل من الماء المقطر، بدرجة حموضة معدلة 9.8 مع حمض

الهيدروكلوريك المركز/ ما يجعل الحجم الإجمالي 1000 ملل مع الماء المقطر) ويضاف مقدار 200 ميكرولتر إلى كل كبيبة. تحضن الأطباق على درجة حرارة البيئة المحيطة وتقرأ على مستوى 405 نانومترات بفواصل منتظمة ضمن 120 دقيقة، أو بحسب تعليمات الجهة المورّدة للجسم المضاد أحادي الكلون المستخدم.

تعد نتيجة فحص إليزا سلبية في حال كان متوسط قيمة الكثافة الضوئية لكل واحدة من كبيبات العينات المزدوجة أقل من 0.1 أو إذا كانت أقل من 2 × قيمة الكثافة الضوئية للشاهد السلبي للمستخرجات النباتية السليمة. وتعتبر نتيجة فحص إليزا إيجابية في حال كان متوسط قيمة الكثافة الضوئية لكل واحدة من كبيبات العينات المزدوجة أكبر أو معادلة لـ 2 × قيمة الكثافة الضوئية للشاهد السلبي للمستخرجات النباتية السليمة. ولدى استخدام أجسام مضادة أحادية الكلون، من الضروري أن تكون الشواهد السلبية مشابهة قدر الإمكان للمصفوفة الخاضعة للاختبار في الطبق نفسه.

تم إثبات صلاحية الطريقة التي تستخدم الجسمين المضادين أحاديي الكلون 3DF1 + 3CA5 اختبار الحلقة التابع لمشروع DIAGPRO (Cambra *et al.*, 2002). وترد مقارنة بين تلك الطريقة وبين تقنيات أخرى وبارامترات التشخيص في القسم 3-7.

فيما أن بعض مزائج الأجسام المضادة أحادية الكلون تكشف كافة سلالات فيروس تريستيزا الحمضيات بشكل محدد وحساس وموثوق به، هناك أجسام مضادة متعددة الكلون غير متخصصة كما أن حساسيتها محدودة (Cambra *et al.*, 2011). لذا يحبذ استخدام طرق إضافية في الحالات التي استخدمت فيها أجسام مضادة متعددة الكلون في اختبار للمقايسة، وحين تفرض المنظمة الوطنية لوقاية النباتات درجة إضافية من اليقين في تحديد فيروس تريستيزا الحمضيات.

3-6 الاختبارات الجزيئية

بعد أن أصبح التسلسل الكامل لنُوكْلِيُوتيدات الحمض النووي الرّيبي الجينومي لفيروس تريستيزا الحمضيات متاحاً، وضعت إجراءات تشخيصية مختلفة قائمة على الكشف المحدد من الحمض النووي الرّيبي للفيروس، بما في ذلك التهجين الجزيئي مع مسابر تكميلية للحمض النووي المكمّل أو الحمض النووي الرّيبي المكمّل، وعدة طرق قائمة على التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام النسخ العكسي (Moreno *et al.*, 2008). إن تلك الطرق القائمة على التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي، قد حسنت بدرجة كبيرة حساسية الكشف، فأتاحت التقييم الكمي لنسخ الحمض النووي الرّيبي للفيروس في الأنسجة المصابة للحمضيات أو في أصناف المن الناقلة لفيروس تريستيزا الحمضيات (Bertolini *et al.*, 2008). من شأن استخدام تقنية عالية الإنتاجية من قبيل التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام النسخ العكسي الآني، أن يحول دون الحاجة إلى أية معالجة لاحق (مثل الرحلان الكهربائي بالهلام) ما يجعله بالتالي أسرع، كما أن مجال التلوث فيه أقل مما هو مع التفاعل المتسلسل للبوليميراز التقليدي.

باستثناء التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي للاصطياد المناعي (الذي لا يستوجب عزل الحمض النووي الرّيبي)، ينبغي استخراج الحمض النووي الرّيبي بواسطة البروتوكولات ذات الصلاحية المثبتة بالطرق المناسبة. يجب وضع العينات داخل أكياس بلاستيكية منفصلة من أجل منع التلوث بين الواحدة والأخرى خلال عملية الاستخراج. ويمكن أيضاً لمستخرجات النباتات المنقطة، أو أجزاء الأنسجة المدموغة أو الأجزاء المسحوقة من المواد النباتية أن تثبّت على ورق نشاف أو أغشية من النايلون وأن تحلل بواسطة التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي الآني (Bertolini *et al.*, 2008). لا ينصح باستخدام عينات

منقطة أو مدموغة الأنسجة في التفاعل المتسلسل للبوليميراز التقليدي، فبسبب قلة حساسيته مقارنة بالتفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي الآني، قد يفضي ذلك إلى نتائج سلبية كاذبة.

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

3-6-1-1 تنقية الحمض النووي الرّيبي المكمّل

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

3-6-1-2 الاصطياد المناعي

يعتبر الاصطياد المناعي خياراً بديلاً عن تنقية الحمض النووي الرّيبي. تحقيقاً لهذه العملية، يعدّ مزيج مخفف من الأجسام المضادة مكوّن من 1 ميكروغرام/ملل من الجسمين المضادين متعددي الكلون الخاصين بفيروس تريستيزا الحمضيات (3DF1 + 3CA5، 0.5 ميكروغرام/ملل + 0.5 ميكروغرام/مل) في محلول دارئ من الكربونات، بدرجة حموضة 9.6 (انظر القسم 3-5-2 للاطلاع على تركيبة المحلول الدارئ من الكربونات). من ثمّ يوزع مزيج الجسمين المضادين على أنابيب دقيقة (100 ميكرولتر في كل أنبوب) وتحضن الأنابيب لمدة ثلاث ساعات على حرارة 37 درجة مئوية. تغسل الأنابيب المغلفة بالأجسام المضادة لمرتين بواسطة 150 ميكرولتر من محلول دارئ عقيم للغسل (محلول ملحي منظم بالفوسفات، تتراوح درجة حموضته بين 7.2 و7.4، مع مادة Tween 20 بنسبة 0.05 في المائة؛ انظر القسم 3-4-3 للاطلاع على تركيبة المحلول الملحي المنظم بالفوسفات). ومن الخيارات الممكنة لتنقية المستخرج النباتي (100 ميكرولتر) الاستعانة بالطرد المركزي أو الترشيح بواسطة فلتر ورقي أو استخدامه مباشرة كمستخرج خام فتوزع أجزاء متكافئة منه على الأنابيب الدقيقة المغلفة بالأجسام المضادة. تحضن الأنابيب لمدة لا تقل عن ساعتين على جليد أو لساعتين على حرارة 37 درجة مئوية. وبعد مرحلة الاصطياد المناعي هذه، تغسل الأنابيب الدقيقة ثلاث مرات بواسطة 150 ميكرولترا من محلول دارئ عقيم للغسل. وسوف يجري داخل هذه الأنابيب المغسولة توليف الحمض النووي المكمّل وتضخيم التفاعل المتسلسل للبوليميراز.

3-6-1-3 توليف الحمض النووي المكمّل

بما أن حفظ الحمض النووي الرّيبي خلال تخزينه ليس سهلاً، فمن المحبذ توليف حمض نووي مكمّل يمكن حفظه لفترات طويلة مع شروط بالحد الأدنى فيما خص الحرارة، مقارنة بالاشتراطات التي تخص الحمض النووي الرّيبي. وهناك مجموعات لوازم تجارية عدة متاحة لتوليف الحمض النووي المكمّل.

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

بحسب Olmos وآخرين (1999) البادئتان هما:

PIN1: 5′-GGT TCA CGC ATA CGT TAA GCC TCA CTT-3′
PIN2: 5′-TAT CAC TAG ACA ATA ACC GGA TGG GTA -3′

يتكون مزيج التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي من: ماء فائق النقاء، 14.3 ميكرولتر؛ تاق دنا البلمرة العازلة × 10، 2.5 ميكرولتر؛ كلوريد المغنزيوم 25 ميليمولارا، 1.5 ميكرولتر؛ نكليوتيدات ثلاثية الفوسفات 5 ميلمولار، 1.25 ميكرولتر؛ Triton X-100 بنسبة 4 في المائة، 2 ميكرولتر؛ بادئة PIN1 25 ميكرومولارا، 1 ميكرولتر؛ بادئة PIN2 25 ميكرومولارا، 1 ميكرولتر؛ مادة ثُنائِيُّ ميثيل سَلفُوكسِيد، 1.25 ميكرولترا؛ أنزيم النسخ العكسي AMV 10 وحدة/ميكرولتر، 0.1 ميكرولتر؛ بوليميراز الحمض النووي للمستحرة المائية 5 وحدات/ميكرولتر، 0.1 ميكرولتر. يضاف خليط تفاعلي (25 ميكرولتراً) مباشرة على الأنابيب الدقيقة المغسولة المغلفة بالأجسام المضادة. أما بارامترات التدوير للتفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي فهي كالتالي: 42 درجة مئوية لمدة 45 دقيقة، و92 درجة مئوية لمدة دقيقتين، تعقبهما 40 دورة من (92 درجة مئوية لمدة 30 ثانية و60 درجة مئوية لمدة 30 ثانية و72 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة) مع مرحلة إطالة أخيرة على حرارة 72 درجة مئوية لمدة 10 دقائق تعقبها مرحلة تبريد على حرارة 8 درجات مئوية. أما حجم الأمبليكون المتوقع فيبلغ 131 زوج قواعد.

تم التثبت من صلاحية الطريقة في اختبار الحلقة التابع لمشروع (بروتوكولات التشخيص للكائنات الحية الضارة للنباتات) DIAGPRO (Cambra *et al.*, 2002). ترد مقارنة مع التقنيات الأخرى وبارامترات التشخيص في القسم 3-7.

3-6-3 التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي المتداخل للاصطياد المناعي في أنبوب مغلق واحد

بحسب Olmos *et al.*، (1999) البادئات هي:

PEX1: 5′-TAA ACA ACA CAC ACT CTA AGG-3’
PEX2: 5′-CAT CTG ATT GAA GTG GAC-3’
PIN1: 5′-GGT TCA CGC ATA CGT TAA GCC TCA CTT-3’
PIN2: 5′-TAT CAC TAG ACA ATA ACC GGA TGG GTA-3’

إن أداة تقسيم أنبوب دقيق سعته 0.5 ملل من أجل التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي المتداخل في أنبوب مغلق واحد، هي الموصوفة في Olmos *et al.*، (1999). يتألف الخليط الرئيسي للتفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي من مزيجين تفاعليين، هما:

"المزيج ألف" (يلقى في قعر الأنبوب الدقيق): ماء فائق النقاء، 15.8 ميكرولترا؛ تاق دنا البلمرة العازلة × 10، 3 ميكرولترات؛ كلوريد المغنيزيوم 25 ميليمولارا، 3.6 ميكرولتر؛ نكليوتيدات ثلاثية الفوسفات 5 ميليمولارات، 2 ميكرولترات؛ Triton X-100 بنسبة 4 في المائة، 2.2 ميكرولترات؛ بادئة PEX1 25 ميكرومولارا، 0.6 ميكرولتر؛ بادئة PEX2 25 ميكرومولارات، 0.6 ميكرولتر؛

ثُنـائِيُّ ميثيـل سَلفُوكسِـيد، 1.5 ميكرولتـر؛ أنـزيم النسـخ العكسـي AMV 10 وحـدات/ميكرولتر، 0.2 ميكرولتر؛ وبوليميراز الحمض النووي للمستحرة المائية 5 وحدات/ميكرولتر، 0.5 ميكرولتر.

"**المزيج باء"** (يوضع في المستوعب مخروطي الشكل): ماء فائق النقاء، 2.6 ميكرولتر؛ تـاق دنـا البلمـرة العازلـة ×10، 1 ميكرولتـر؛ بادئـة PIN1 25 ميليمـولارا، 3.2 ميكرولتـر؛ وبادئـة PIN2 25 ميليمولارا، 3.2 ميكرولتر.

أما بارامترات التدوير للتفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي فهي كالتالي: 42 درجة مئوية لمدة 45 دقيقة و92 درجة مئوية لمدة دقيقتين تعقبها 25 دورة من (92 درجة مئوية لمدة 30 ثانية و45 درجة مئوية لمدة 30 ثانية و72 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة). بعد هذه المرحلة الأولى، يخضع الأنبوب لحركة دواميـة وطـاردة (6000 دورة في الدقيقة لمدة 5 ثوان) من أجل خلط المزيج باء بمنتجات عملية التضخيم الأولى. ومن ثم يوضع الأنبوب في جهاز (Thermal cycler) مرة أخرى فيجري التفاعل على الشكل التالي: 40 دورة من (92 درجة مئوية لمدة 30 ثانية، و60 درجة مئوية لمدة 30 ثانية و72 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة) مع مرحلة استطالة أخيرة على حرارة 72 درجة مئوية لمدة عشر دقائق تعقبها مرحلة تبريد على حرارة 8 درجات مئوية. ويبلغ الحجم المتوقع للأمبليكون 131 زوج قواعد.

تـم التثبـت مـن صـلاحية هـذه الطريقـة فـي اختبـار الحلقـة التـابع لمشـروع DIAGPRO (Cambra *et al.*, 2002). ترد مقارنة بالتقنيات الأخرى وبارامترات التشخيص في القسم 3-7.

3-6-4 الاعتبارات العامة للتفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي، والتفاعل المتداخل

قد تدعو الحاجة إلى تعديل بروتوكولات التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي وتحسينها لدى استخدام كواشف أو أجهزة التدوير الحراري (Thermocycler) المختلفة.

في حال تطبيق التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي التقليدي من أجل كشف فيروس تريستيزا الحمضيات، ينصح بتطبيق التفاعل الخاص بالاصطياد المناعي. فإن التفاعل التقليدي من دون الاصطياد المناعي لا يكون حساساً وقد يفضي إلى نتائج سلبية كاذبة. ويحتمل أن يؤثر وجود عوامل كابحة في حساسية التفاعل التقليدي.

تكون نتيجة اختبار عينة ما سلبية في حال تعذر كشف الأمبليكون الخاص بفيروس تريستيزا الحمضيات بالحجم المتوقع في العينة قيد الاختبار، مع أنه قد كُشف في الشواهد الإيجابية. تعد نتيجة الاختبار على عينة ما إيجابية في حال كشف الأمبليكون الخاص بالفيروس بالحجم المتوقع في العينة قيد الاختبار، شريطة عدم حصول أي تضخيم في أي من الشواهد السلبية.

3-6-5 التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي الآني

جرى وصف مقايستين للتفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي الآني، الأولى من قبل Bertolini *et al.* (2008) فيما وصف الأخرى Saponari *et al.* (2008).

بحسب Bertolini *et al.* (2008) البادئتان والمسبار هي:

3′UTR1: 5′-CGT ATC CTC TCG TTG GTC TAA GC-3′
3′UTR2: 5′-ACA ACA CAC ACT CTA AGG AGA ACT TCT T-3′
181T: FAM-TGG TTC ACG CAT ACG TTA AGC CTC ACT TG-TAMRA

يُنفذ التفاعل في كميّة نهائية تبلغ 25 ميكرولتراً. يتكون مزيج التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي الآني من: ماء فائق النقاء، 0.95 ميكرولتر؛ خليط AgPath-ID One-Step RT-PCR Master Mix × 2 من (Applied Biosystems[1]) 12.5 ميكرولتر؛ خليط أنزيمات التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي × 25، 1 ميكرولتر؛ بادئة 3′UTR1 10 ميكرومولارات، 2.4 ميكرولتر؛ بادئة 3′UTR2 10 ميكرومولارات، 2.4 ميكرولتر؛ مسبار T181 مدموغ بـ FAM 5 ميكرومولارات، 0.75 ميكرولتر؛ 5 ميكرولترات من الحمض النووي الرّيبي المستخرج أو المحرر من غشاء مضافاً إلى 20 ميكرولتراً من خليط التفاعل الآني. أما بارامترات دورات التفاعل فهي: 45 درجة مئوية لمدة عشر دقائق و95 درجة مئوية لمدة عشر دقائق تعقبها 45 دورة من (95 درجة مئوية لمدة 15 ثانية و60 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة). ويبلغ الحجم المتوقع للأمبليكون 95 زوج قواعد.

فيما خص التفاعل الآني لدمغ الأنسجة، قدّرت نسبة حساسية التشخيص بـ 0.98، وخصوصيته بـ 0.85 ونسبة الأرجحية الإيجابية والسلبية بـ 6.63 و0.021 تباعاً (Vidal *et al.*, 2012). تدل بارامترات التشخيص تلك على أن التفاعل الآني من أجل دمغ الأنسجة يشكل التقنية الأكثر حساسية لدى مقارنته بفحص إليزا لدمغ الأنسجة المباشر، الأمر الذي يثبت صلاحية استخدامه للكشف والتشخيص الروتينيين لفيروس تريستيزا الحمضيات والتوصية به لتقييم خلو أية مادة نباتية من فيروس تريستيزا الحمضيات. يتيح ارتفاع مستوى حساسية هذه التقنية التحليل الدقيق للعينات المركبة (التي تصل إلى عشر أشجار أو نبتات مشاتل) كعينة تشخيصية واحدة حينما تختبر في أي موسم من السنة، ويتيح أيضاً تحليل أصناف الأرقات من أجل الكشف عن وجود الكميات المتدنية من فيروس تريستيزا الحمضيات. ومن أجل الاطلاع على بارامترات التشخيص الإضافية للتثبت من صلاحية التفاعل الآني من أجل دمغ الأنسجة، انظر القسم 3-7.

بحسب Saponari *et al.* (2008) البادئات والمسبار هي:

P25F: 5′-AGC RGT TAA GAG TTC ATC ATT RC-3′
P25R: 5′-TCR GTC CAA AGT TTG TCA GA-3′
CTV-CY5: CY5-CRC CAC GGG YAT AAC GTA CAC TCG G

وينفذ التفاعل في كمية نهائية تبلغ 25 ميكرولتراً. ويتألف مزيج التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي الآني من: ماء فائق النقاء، 6.6 ميكرولتر؛ مجموعتي لوازم iScript One-Step RT-PCR Kit for Probes (Bio-Rad 1) 12.5 ميكرولتر؛ الخليط الرئيسي لإنزيم النسخ العكسي (iScript)، 0.5 ميكرولتر؛ بادئة P25F، 10 ميكرومولار، 1 ميكرولتر؛ بادئة P25R، 10 ميكرومولارات، 2 ميكرولترات؛ مسبار CTV-CY5 5 ميكرومولارات، 0.4 ميكرولتر؛

[1] توصى في بروتوكول التشخيص هذا الطرق (بما فيها الإشارة إلى أسماء العلامات التجارية) كما نشرت، وهذه تحدِّد المستوى الأصلي للحساسية والخصوصية و/أو إمكانية الاستنساخ المتحققة. ولا يعني استخدام أسماء كواشف أو مواد كيميائية أو معدات في بروتوكولات التشخيص هذه الموافقة عليها دون غيرها من الكواشف والمواد الكيميائية والمعدات التي يمكن أن تكون مناسبة أيضاً. ويمكن تعديل الإجراءات المختبرية الواردة في هذه البروتوكولات بما يناسب معايير المختبرات الفردية، شريطة التثبت منها على النحو الوافي.

و2 ميكرولترات من الحمض النووي الرّيبي المستخرج أو المحرر من غشاء مضافاً إلى 23 ميكرولتراً من خليط التفاعل الآني. أما بارامترات دورات التفاعل فهي: 55 درجة مئوية لمدة دقيقتين، و95 درجة مئوية لمدة 5 دقائق تعقبها 40 دورة من (95 درجة مئوية لمدة 15 ثانية و59 درجة مئوية لمدة 30 ثانية). أما الحجم المتوقع للأمبليكون فهو 101 زوج قواعد.

لم ترد أي بارامترات تشخيص (أي الحساسية والخصوصية والدقة ونسب أرجحية النتائج السلبية والإيجابية وأرجحية الإصابة بالمرض بعد الاختبار) لهذا البروتوكول.

3-6-7 تفسير نتائج التفاعل المتسلسل للبوليميراز التقليدي والآني

3-6-1 شواهد الاختبارات الجزيئية

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

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

الشاهد الداخلي. بالنسبة إلى التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي الآني الذي وصفه Saponari *et al.* (2008)، يجوز إدراج الحمض النووي الرّيبي المرسال التابع للجينة التنبئية(*nad5*) 5 *NADH dehydrogenase* ضمن بروتوكول التفاعل كشاهد داخلي من أجل استبعاد احتمال أية نتائج سلبية كاذبة للتفاعل، جراء فشل استخراج حمض النواة أو فساده أو وجود كوابح للتفاعل. وبما أن هذا الهدف من العوائل، ينبغي التحوط لعدم تلويث المختبر بالحمض النووي لجينة *nad5* الأمر الذي قد يؤدي إلى ثقة كاذبة برد فعل الشاهد الداخلي.

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

شاهد الاستخراج الإيجابي. يستخدم هذا الشاهد لضمان إتاحة حمض النواة المستهدف الذي تم استخراجه بالكمية والجودة الكافيتين للتفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي، وإمكانية كشف الفيروس المستهدف. ويستخرج حمض النواة من النسيج العائل المصاب بالفيروس أو من أنسجة نباتات أو حشرات سليمة قد لدغها فيروس تِريستيزا الحمضيات.

لدى عملية التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي، يجب التحوط لتفادي التلوث جراء الرذاذ الناجم عن الشواهد الإيجابية أو العينات الإيجابية.

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

3-6-7-1 التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي التقليدي والتفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي للاصطياد المناعي

لا يعتدّ بالتفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي الخاص بالممرضات، إلا إذا:

(1) أنتج الشاهد الإيجابي أمبليكوناً للفيروس بالحجم المناسب؛

(2) لم ينتج الشاهد السلبي للاستخراج والشاهد السلبي للتضخيم أمبليكونات للفيروس بالحجم المناسب .

في حال استخدمت كذلك بادئتا الشاهد الداخلي للجينة المتقدرية للحمض النووي الرّيبي المرسال (nad5) (أمامية: 5′-GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT-3′، عكسية: 5′-CTC CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA-3′، منتج من 181 زوج قاعدة)، ومن ثم شاهد الاستخراج السلبي (النسيج النباتي السليم) (في حال استخدامه)، والشاهد الإيجابي وكل من عينات الاختبار يجب أن تنتج أمبليكوناً من 115 زوج قاعدة. أما عجز العينات عن التضخم بواسطة بادئات الشواهد الداخلية فيشير مثلاً إلى أن استخراج الحمض النووي الرّيبي قد فشل، أو أنه لم يكن مدرجاً في مزيج التفاعل، أو أن مركبات كابحة للتفاعل موجودة في الحمض النووي الرّيبي المستخرج أو أن هذا الأخير قد فسد.

ويعتبر اختبار عينة ما إيجابياً في حال أنتج أمبليكوناً بالحجم الصحيح.

3-6-7-2 التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي الآني

لا يعتبر التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي الآني الخاص بالممرضات موثوقاً به إلا إذا:

(1) أنتج الشاهد الإيجابي منحنى تضخم بواسطة البادئات الخاصة بالفيروس؛

(2) ولم ينتج الشاهد السلبي للاستخراج والشاهد السلبي للتضخيم منحنيي تضخيم بواسطة البادئات الخاصة بالفيروس.

ويعتبر اختبار عينة ما إيجابياً في حال أنتج منحنى تضخيم نموذجياً بطريقة مطردة. ينبغي التحقق من قيمة حد الدورة في كل مختبر لدى إجراء الاختبار للمرة الأولى.

3-7 التثبت من الصلاحية عبر دراسة لأداء الاختبار

في اختبار الحلقة التابع لمشروع DIAGPRO (Cambra *et al.*, 2002) الذي أجرته عشرة مختبرات مستعينة بمجموعة من عشر عينات مرمّزة تتضمن عينات عن أنسجة مصابة بفيروس تريستيزا الحمضيات وعينات عن أنسجة سليمة تعود إلى المجموعة التي يملكها معهد البحوث

الزراعية في فالنسيا (IVIA)، كان اختبار إليزا المباشر لدمغ الأنسجة بواسطة الجسمين المضادين أحاديي الكلون 3DF1 + 3CA5 دقيقاً بنسبة 99 في المائة (عدد النتائج الإيجابية والسلبية الحقيقية التي تم تشخيصها بواسطة تقنية/عدد العينات التي جرى اختبارها). تفوقت نسبة الدقة هذه على النسبة التي حققها اختبار ساندويتش ثنائي الأجسام المضادة- إليزا (الذي بلغت دقته 98 في المائة) والتفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي للاصطياد المناعي (الذي بلغت دقته 94 في المائة) والتفاعل المتسلسل للبوليميراز المتداخل باستخدام إنزيم النسخ العكسي المتداخل للاصطياد المناعي، داخل أنبوب مغلق واحد (الذي بلغت دقته 89 في المائة). وكان مستوى حساسية اختبار إليزا لدمغ الأنسجة المباشر 0.98 فيما أن حساسية التقنيات الأخرى آنفة الذكر قد بلغت 0.96 و0.96 و0.93 تباعاً (Vidal *et al.*, 2012). وبلغت درجة تخصص التشخيص لاختبار إليزا لدمغ الأنسجة المباشر 1.0 فيما أن تخصص تشخيص التقنيات الأخرى قد بلغ 1.0 و0.91 و0.82 تباعاً. وبلغت القيمة التنبؤية الإيجابية (الاختبارات الإيجابية التي تنطوي على المرض؛ (Sackett *et al.*, 1991) لإليزا لدمغ الأنسجة المباشر 1.0، فيما أن القيمة التنبؤية الإيجابية للتقنيات الأخرى قد بلغت 1.0 و0.94 و0.89 تباعاً. وبلغت القيمة التنبؤية السلبية (Sackett *et al.*, 1991) لإليزا لدمغ الأنسجة المباشر 0.97، فيما بلغت القيمة التنبؤية السلبية للتقنيات الأخرى 0.95 و0.94 و0.88 تباعاً، (Harju *et al.*, 2000).

تبين أن فحص إليزا لدمغ الأنسجة المباشر بواسطة الجسمين المضادين أحاديي الكلون 3DF1 + 3CA5 هو أسلوب التحليل الروتيني للمواد النباتية، الأكثر مصداقية وبساطة واقتصاداً، حين يقارن بالفهرسة البيولوجية للبرتقال المكسيكي، وإليزا والتفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي للاصطياد المناعي، والتفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي المتداخل للاصطياد المناعي (Cambra وآخرون، 2002). وقد قام Ruiz-García *et al.* (2005) كذلك بإثبات صلاحية فحص إليزا لدمغ الأنسجة المباشر وبتحليله ليبرهنوا أنه ضاهى فحص إليزا-ساندويتش ثنائي الأجسام المضادة من حيث الحساسية (فقد كشف النظام 97 في المائة من الأشجار الإيجابية باستخدام أربع سويقات) إلا أنه كان أسهل استخداماً وأقل كلفة. تمت مقارنة إليزا لدمغ الأنسجة المباشر بواسطة الجسمين المضادين أحاديي الكلون 3DF1 + 3CA5 بالفهرسة البيولوجية على الليمون المكسيكي وبدمغ الأنسجة بواسطة التفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي الآني من أجل كشف فيروس تريستيزا الحمضيات (Vidal *et al.*, 2012). فتم تقييم بارامترات تشخيصية مختلفة وثبت أن أليزا لدمغ الأنسجة المباشرة هي الطريقة الأكثر تخصصاً ودقة وذات الأرجحية الأعلى لكشف المرض ما بعد الاختبار، أي كان مستوى انتشار الفيروس.

4- تحديد السلالات العدائية لفيروس تريستيزا الحمضيات

يتطلب تحديد سلالات فيروس تِريستيزا الحمضيات اختباراً بيولوجياً أو مصلياً أو جزيئياً للتضخيم.

لا توجد طرق قائمة على حمض النواة، تتيح تحديداً موثوقاً به لأصناف سلالات هذا الفيروس بناء على عدائيتها، بما أن فيروس تِريستيزا الحمضيات هو نمط ظاهري. ولا يزال الأساس الوراثي للتنوع البيولوجي المرتفع لفيروس تريستيزا الحمضيات مجهولاً بدرجة كبيرة (Moreno *et al.*, 2008). ولا يعرف الكثير كذلك عن الدور البيولوجي لتنوعه ولا سيما التداعيات الناجمة عن ائتلافه. فضلاً عن ذلك فإن أصناف تركيباته الوراثية لم يتم توصيفها بعد (Harper, 2013). استخدمت مجموعة واسعة من الطرق الجزيئية من أجل التمييز بين مختلف سلالات فيروس تريستيزا الحمضيات، بما فيها التهجين الجزيئي، وأنماط الحمض النووي الرّيبي

ثنائية الجديلة، وتحاليل مقاطع الحصر للحمض النووي المكمّل المضخم للفيروس، والتضخيم بواسطة التفاعل المتسلسل للبوليميراز لمناطق مختلفة من الجينوم، والتفاعل المتسلسل للبوليميراز الآني (Moreno *et al.*, 2008؛ Yokomi *et al.*, 2010)، وتسلسل الجينوم وإعادة تسلسل التصفيفات المصغرة. وفي فترة غير بعيدة، جرت محاولات لإجراء تحاليل متتابعة للمقايسات المناعية للأنزيمات والرحلان الكهربائي الشعري لتعدد الأشكال أحادي الجديلة (Licciardello *et al.*, 2012). ولكن لا يعتبر أي من تلك التكنولوجيات عمليّ للقيام بتصنيف معوّل عليه لسلالات الفيروس المنتشرة بصورة طبيعية، كما لم يتم التثبت من موثوقية أي منها بعد، ذلك أن تطبيقها يقتصر على غايات البحوث.

ونظراً إلى التنوع الوراثي والبيولوجي للفيروس، فإن التقنيات الأخرى غير السَلسَلة قد تفضي إلى نتائج مضللة لدى محاولة تحديد سلالات الفيروس. وإن استخدام التسلسل العميق، الذي يعرف أيضاً بتسلسل الجيل التالي قد يقدم بسرعة معلومات عن التسلسل الجينومي. بيد أن تسلسل نوكليوتيدات الفيروس لا يمكن أن يتصل بعد بالخصائص البيولوجية للسلالة وبسلوكها (أي عدائيتها وقابليتها للانتقال). وعلى الرغم من أن سلالات الفيروس قد صنفت وقسمت إلى فئات بحسب تنوعها المظهري وعدائيتها ومجموعة عوائلها وتركيبة محدد الأنتيجين وفي فترة أخيرة، عبر الهوية التسلسلية لجينة واحدة أو أكثر (Moreno *et al.*, 2008)لم يظهر أي ترابط واضح مع السلوك البيولوجي (Harper, 2013).

أما الطرق الموصى بها للحصول على معلومات متعلقة بالخصائص البيولوجية لسلالة معينة من فيروس تِريستيزا الحمضيات فهي (الشكل 2):

(1) الفهرسة البيولوجية التي تستعين بمجموعة من النباتات المستخدمة كمؤشرات مثل *C. aurantifolia* و*C. Macrophylla* و*C. sinensis* و *C paradisi* (صنف Duncan) لتقييم تنقر السوق وشتول *C. aurantium* أو *C. limon* لتقييم اصفرار الشتول (Roistacher, 1991؛ Ballester-Olmos *et al.*, 1993).

(2) التفاعلية مع الجسم المضاد أحادي الكلون MCA13 (Permar *et al.*, 1990) التي تتعرف على محدد الأنتيجين المحفوظ حفظاً جيداً في السلالات الحادة (العدائية) للفيروس والمفقود في السلالات المعتدلة (الأقل عدائية) للفيروس (Pappu, *et al.*, 1993). ويرتبط رد الفعل مع MCA13 ارتباطاً قوياً بالقدرة على التسبب بتدهور الأشجار المطعمة على جذر البرتقال المر أو الليمون الحامض. ومعظم سلالات فيروس تِريستيزا الحمضيات التي تنتج تنقراً في سوق الجريب فروت أو البرتقال الحلو، تتجاوب مع MCA13.

1-4 الفهرسة البيولوجية

تتبع الفهرسة البيولوجية للسلالات العدائية لفيروس تريستيزا الحمضيات الإجراءات الواردة في القسم 3-3.

2-4 الاختبارات المصلية التي تستخدم MCA13

1-2-4 فحص إليزا لدمغ الأنسجة المباشر

هناك مجموعة لوازم كاملة قائمة على الجسم المضاد أحادي الكلون الخاص بفيروس تريستيزا الحمضيات (MCA1)، تتضمن أغشية مدمغة مسبقاً مع شواهد سلبية وإيجابية وكافة

الكواشف والمحلولات الدارئة والركيزة، متاحة من. Plant Print Diagnòstics SL[1]. أما الطريقة فهي كالتالي.

الأغشية مدموغة النسيج ومجمدة كما في القسم 3-5-1. يُعد محلول من الجسم المضاد أحادي الكلون الخاص بفيروس تريستيزا الحمضيات (MCA13) المرتبط بالفوسفاتاز القلوية (حوالي 0.1 ميكروغرام/ملل في محلول ملحي منظم بالفوسفات) ويسكب على الأغشية حتى يغطيها، ومن ثم تحضن الأغشية لمدة ثلاث ساعات على درجة حرارة البيئة المحيطة مع خضها برفق. أما عملية غسل وتظهير الأغشية وقراءة النتائج وتفسيرها فهي نفسها الموصوفة في القسم 3-5-1. إن وجود رواسب أرجوانية-بنفسجية صغيرة عادة في المنطقة الوعائية للمادة النباتية، يدل على وجود سلالة لفيروس تريستيزا الحمضيات تتسم بعدائية زائدة.

4-2-2 ساندويتش ثنائي الأجسام المضادة-إليزا

ينفذ اختبار ساندويتش ثنائي الأجسام المضادة-إليزا بحسب تعليمات Garnsey وCambra (1991) باستخدام الطريقة الموصوفة أدناه. وهناك مجموعة لوازم قائمة على الجسم المضاد أحادي الكلون الخاص بفيروس تريستيزا الحمضيات (MCA13) متاحة من Plant Print Diagnòstics SL[1].

تتم عملية التغليف بحسب ما يصفها القسم 3-5-2. يضاف الجسم المضاد أحادي الكلون الخاص بفيروس تريستيزا الحمضيات (MCA13) المرتبط بالفوسفاتاز القلوية كمقترن على درجة تخفيف ملائمة (ما يقارب 0.1 ميكروغرام/ملل في محلول ملحي منظم بالفوسفات مع ألبومين المصل البقري بنسبة 0.5 في المائة). تنفذ عمليات الحضن والغسل وإضافة الركيزة وتفسير النتائج بحسب ما يصفها القسم 3-5-2.

5- السجلات

يجب الاحتفاظ بالسجلات والبراهين بالطريقة الموصوفة في القسم 2-5 من المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية رقم 27 (بروتوكولات التشخيص للآفات الخاضعة للوائح).

وفي الحالات التي قد تتأثر فيها أطراف متعاقدة أخرى بنتائج التشخيص، لا سيما حالات عدم الامتثال، وحيث يكون الفيروس موجوداً في منطقة ما للمرة الأولى، ينبغي الاحتفاظ بالمواد التالية الإضافية، إن كانت ذات صلة، بطريقة تضمن الاقتفاء:

- ينبغي الاحتفاظ بالعينة الأصلية على حرارة 80 درجة مئوية تحت الصفر أو تجفيفها بالتجميد وحفظها على درجة حرارة البيئة المحيطة.
- ينبغي الاحتفاظ بمستخرجات الحمض النووي الرّيبي على حرارة 80 درجة مئوية تحت الصفر و/أو أجزاء من الأنسجة المدموغة و/أو مستخرجات نباتية منقطة، على ورق أو على أغشية من النايلون ينبغي أن تحفظ على درجة حرارة البيئة المحيطة.
- ينبغي حفظ منتجات التضخيم للتفاعل المتسلسل للبوليميراز باستخدام إنزيم النسخ العكسي على حرارة 20 درجة مئوية تحت الصفر.

6- جهات الاتصال للحصول على معلومات إضافية

يمكن الحصول على معلومات إضافية بشأن هذا البروتوكول على:

Centro de Protección Vegetal, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera Moncada-Náquera km 4.5, 46113 Moncada (Valencia), Spain (Mariano Cambra; e-mail: mcambra@ivia.es or mcambra@mcambra.es)

Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Bento Gonçalves 7712, 91540-000 Porto Alegre, Brazil (Edson Bertolini; e-mail: edson.bertolini@ufrgs.br; tel.: +55 (51) 3308 8100).

APHIS-USDA-PPQ-CPHST, 4700 River Road, Riverdale, MD 20737, United States (Laurene Levy; e-mail: laurene.levy@aphis.usda.gov; tel.: +1 301 851 2078; fax: +1 301 734 8724).

Citrus Research International (CRI), PO Box 28, 1200 Nelspruit, Mpumalanga, South Africa (S.P. Fanie van Vuuren; e-mail: faniev@cri.co.za).

Alico, Inc., Suite 100, 10070 Daniels Interstate Court, Fort Myers, FL 33913, United States (Marta Isabel Francis; e-mail: mfrancis@alicoinc.com; tel.: +1 863 673 4774).

يمكن التقدم بطلب لتنقيح بروتوكول للتشخيص من قبل المنظمات الوطنية لوقاية النباتات، أو المنظمات الإقليمية لوقاية النباتات أو الأجهزة الفرعية لهيئة تدابير الصحة النباتية من خلال أمانة الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات (ippc@fao.org) وهي بدورها تحيله إلى الفريق التقني المعني ببروتوكولات التشخيص.

7- شكر وتقدير

حرر المسودة الأولى لهذا البروتوكول كل من السيد M Cambra (معهد البحوث الزراعية في فالنسيا، إسبانيا (انظر القسم الآنف) وE. Bertolini (معهد البحوث الزراعية في فالنسيا، إسبانيا (انظر القسم الآنف: العنوان الحالي جامعة UFRGS))، وL. Levy دائرة التفتيش المعنية بشؤون الصحة الحيوانية والنباتية التابعة لوزارة الزراعة في الولايات المتحدة) (انظر القسم الآنف))؛ وS.P.F. van Vuuren (معهد CRI، جنوب أفريقيا) (انظر القسم الآنف) وM.I ,Francis ومعهد Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria) (أوروغواي) (انظر القسم الآنف: العنوان الحالي Alico. Inc)).

وقد خضعت معظم التقنيات الوارد وصفها في هذه الوثيقة إلى اختبار الحلقة التابع لمشروع DIAGPRO الممول من الاتحاد الأوروبي، أو خضعت للتقييم في مشاريع مولها المعهد الوطني للتفتيش والتكنولوجيا الزراعية والغذائية (INIA) ووزارة الزراعة والأغذية والبيئة في إسبانيا .

8- المراجع

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

Albertini, D., Vogel, R., Bové, C. & Bové, J.M. 1988. Transmission and preliminary characterization of *Citrus tristeza virus* strain K. *In* L.W. Timmer, S.M. Garnsey & L. Navarro, eds. *Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV)*. pp. 17–21. Riverside, CA. (www.iocv.org/proceedings.html).

Ballester-Olmos, J.F., Pina, J.A., Carbonell, E., Moreno, P., Hermoso de Mendoza, A., Cambra, M. & Navarro, L. 1993. Biological diversity of *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates in Spain. *Plant Pathology*, 42: 219–229.

Bar-Joseph, M., Marcus, R. & Lee, R.F. 1989. The continuous challenge of *Citrus tristeza virus* control. *Annual Review of Phytopathology*, 27: 291–316.

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 RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 120: 177–188.

Broadbent, P., Bevington, K.R. & Coote, B.G. 1991. Control of stem pitting of grapefruit in Australia by mild strain protection. *In* R.H Brlansky, R.F. Lee & L.W. Timmer, eds. *Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV).* pp. 64–70. Riverside, CA (www.iocv.org/proceedings.html).

Cambra, M., Boscia, D., Gil, M., Bertolini, E. & Olmos, A. 2011. Immunology and immunological assays applied to the detection, diagnosis and control of fruit tree viruses. *In* A. Hadidi, M. Barba, T. Candresse & W. Jelkmann, eds. *Virus and virus-like disease of pome and stone fruits*, pp. 303–313. St Paul, MN, APS Press. 429 pp.

Cambra, M., Garnsey, S.M., Permar, T.A., Henderson, C.T., Gumph, D. & Vela, C. 1990. Detection of *Citrus tristeza virus* (CTV) with a mixture of monoclonal antibodies. *Phytopathology*, 80: 103.

Cambra, M., Gorris, M.T., Marroquín, C., Román, M.P., Olmos, A., Martinez, M.C., Hermoso de Mendoza, A., López, A. & Navarro, L. 2000a. Incidence and epidemiology of *Citrus tristeza virus* in the Valencian Community of Spain. *Virus Research*, 71: 85–95.

Cambra, M., Gorris, M.T., Román, M.P., Terrada, E., Garnsey, S.M., Camarasa, E., Olmos, A. & Colomer, M. 2000b. Routine detection of *Citrus tristeza virus* by direct Immunoprinting-ELISA method using specific monoclonal and recombinant antibodies. *In* J. da Graça, R.F. Lee & R.K. Yokomi, eds. *Proceedings of the 14th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV).*, pp. 34–41. Riverside, CA. (www.iocv.org/proceedings.html).

Cambra, M., Gorris, M.T., Olmos, A., Martínez, M.C., Román, M.P., Bertolini, E., López, A. & Carbonell, E.A. 2002. European Diagnostic Protocols (DIAGPRO) for *Citrus tristeza virus* in adult trees. *In* J. da Graça, R. Milne & L.W. Timmer, eds. *Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV).* pp. 69–77. Riverside, CA, (www.iocv.org/proceedings.html)

Duran-Vila, N. & Moreno, P. 2000. *Enfermedades de los cítricos.* Monografías de la Sociedad Española de Fitopatología (SEF) Nº 2. Madrid, Ediciones Mundi-Prensa Libros and SEF (www.sef.es). 165 pp.

Garnsey, S.M. & Cambra, M. 1991. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for citrus pathogens. *In* C.N. Roistacher, ed. *Graft-transmissible diseases of citrus: Handbook for detection and diagnosis*, pp. 193–216. Rome, FAO. 286 pp.

Garnsey, S.M. & Lee, R.F. 1988. Tristeza. *In* J.O. Whiteside, S.M. Garnsey & L.W. Timmer, eds. *Compendium of citrus diseases*, pp. 48–50. APS Press. St. Paul, MN. 80 pp.

Garnsey, S.M., Permar, T.A., Cambra, M. & Henderson, C.T. 1993. Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of *Citrus tristeza virus* (CTV). *In* P. Moreno, J. da Graça and L.W. Timmer, eds. *Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV).* pp. 39–50. Riverside, CA. (www.iocv.org/proceedings.html).

Gottwald, T.R., Garnsey, S.M., Cambra, M., Moreno, P., Irey, M. & Borbón, J. 1997. Comparative effects of aphid vector species on increase and spread of *Citrus tristeza virus*. *Fruits*, 52: 397–404.

Gottwald, T.R., Polek, M.L. & Riley, K. 2002. History, present incidence, and spatial distribution of *Citrus tristeza virus* in the California Central Valley. *In* N. Duran-Vila, R. G. Milne & J.V. da Graça, eds. *Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV).* pp. 83–94. Riverside, CA, (www.iocv.org/proceedings.html).

da Graça, J.V. & van Vuuren, S.P. 2010. Managing *Citrus tristeza virus* losses using cross protection. *In* A.V. Karasev & M.E. Hilf, eds. Citrus tristeza virus *complex and tristeza diseases*, pp. 247–260. Eagan, MN, APS Press. 304 pp.

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

Harper, S.J. 2013. *Citrus tristeza virus*: Evolution of complex and varied genotypic groups. *Frontiers in Microbiology*, doi:10.3389/fmicb.2013.00093.

Harper, S.J., Dawson, T.E. & Pearson, M.N. 2008. Molecular analysis of the coat protein and minor coat protein genes of New Zealand *Citrus tristeza virus* isolates that overcome the resistance of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Australian Plant Pathology*, 37: 379–386.

Ilharco, F.A., Sousa-Silva, C.R. & Alvarez-Alvarez, A. 2005. First report on *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy) in Spain and continental Portugal. *Agronomia Lusitana*, 51: 19–21.

Licciardello, G., Raspagliesi, D., Bar-Joseph, M. & Catara, A. 2012. Characterization of isolates of *Citrus tristeza vírus* by sequential analyses of enzyme immunoassays and capillary electrophoresis-single-strand conformation polymorphisms. *Journal of Virological Methods*, 181: 139–147.

Marroquín, C., Olmos, A., Gorris, M.T., Bertolini, E., Martínez, M.C., Carbonell, E.A., Hermoso de Mendoza, A.H. & Cambra, M. 2004. Estimation of the number of aphids carrying *Citrus tristeza virus* that visit adult citrus trees. *Virus Research*, 100: 101–108.

Moreno, P., Ambros, S., Albiach-Martí, M.R., Guerri, J. & Peña, L. 2008. *Citrus tristeza virus*: A pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular Plant Pathology*, doi:10.1111/J.1364-3703.2007.00455.X.

Nikolaeva, O.V., Karasev, A.V., Powell, C.A., Gumpf, D.J., Garnsey, S.M. & Lee, R.F. 1996. Mapping of epitopes for *Citrus tristeza virus*-specific monoclonal antibodies using bacterially expressed coat protein fragments. *Phytopathology*, 86: 974–979.

Olmos, A., Cambra, M., Esteban, O., Gorris, M.T. & Terrada, E. 1999. New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed tube. *Nucleic Acids Research*, 27: 1564–1565.

Pappu, H.R., Manjunath, K.L., Lee, R.F. & Niblett, C.L. 1993. Molecular characterization of a structural epitope that is largely conserved among severe isolates of a plant virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90: 3641–3644.

Permar, T.A., Garnsey, S.M., Gumpf, D.J. & Lee, R. 1990. A monoclonal antibody that discriminates strains of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology*, 80: 224–228.

Roistacher, C.N. 1991. *Graft-transmissible diseases of citrus: Handbook for detection and diagnosis.* Rome, FAO. 286 pp.

Román, M.P., Cambra, M., Júarez, J., Moreno, P., Durán-Vila, N., Tanaka, F.A.O., Álves, E., Kitajima, E.W., Yamamoto, P.T., Bassanezi, R.B., Teixeira, D.C., Jesús Jr, W.C., Ayres, J.A., Gimenes-Fernandes, N., Rabenstein, F., Girotto, L.F. & Bové, J.M. 2004. Sudden

death of citrus in Brazil: A graft transmissible, bud union disease. *Plant Disease*, 88: 453–467.

Ruiz-García, N., Mora-Aguilera, G., Rivas-Valencia, P., Ochoa-Martínez, D., Góngora-Canul, C., Loeza-Kuk, E.M., Gutíerrez-E, A., Ramírez-Valverde, G. & Álvarez-Ramos, R. 2005. Probability model of *Citrus tristeza virus* detection in the tree canopy and reliability and efficiency of direct immunoprinting-ELISA. *In* M.E. Hilf, N. Duran-Vila & M. A. Rocha-Peña, eds. *Proceedings of the 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV).* pp. 196–204. Riverside, CA. (www.iocv.org/proceedings.html).

Sackett, D.L., Haynes, R.B., Guyatt, G.H. & Tugwell, P. 1991. *Clinical epidemiology: A basic science for clinical medicine*, 2nd edn. Boston, MA, Little Brown and Co. 441 pp.

Saponari, M., Manjunath, K. & Yokomi, R.K. 2008. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan). *Journal of Virological Methods*, 147: 43–53.

Terrada, E., Kerschbaumer, R.J., Giunta, G., Galeffi, P., Himmler, G. & Cambra, M. 2000. Fully "Recombinant enzyme-linked immunosorbent assays" using genetically engineered single-chain antibody fusion proteins for detection of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology*, 90: 1337–1344.

Timmer, L.W., Garnsey, S.M. & Graham, J.H. 2000. *Compendium of citrus diseases.* St Paul, MN, APS Press. 92 pp.

Vela, C., Cambra, M., Cortés, E., Moreno, P., Miguet, J., Pérez de San Román, C. & Sanz, A. 1986. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Citrus tristeza virus* and their use for diagnosis. *Journal of General Virology*, 67: 91–96.

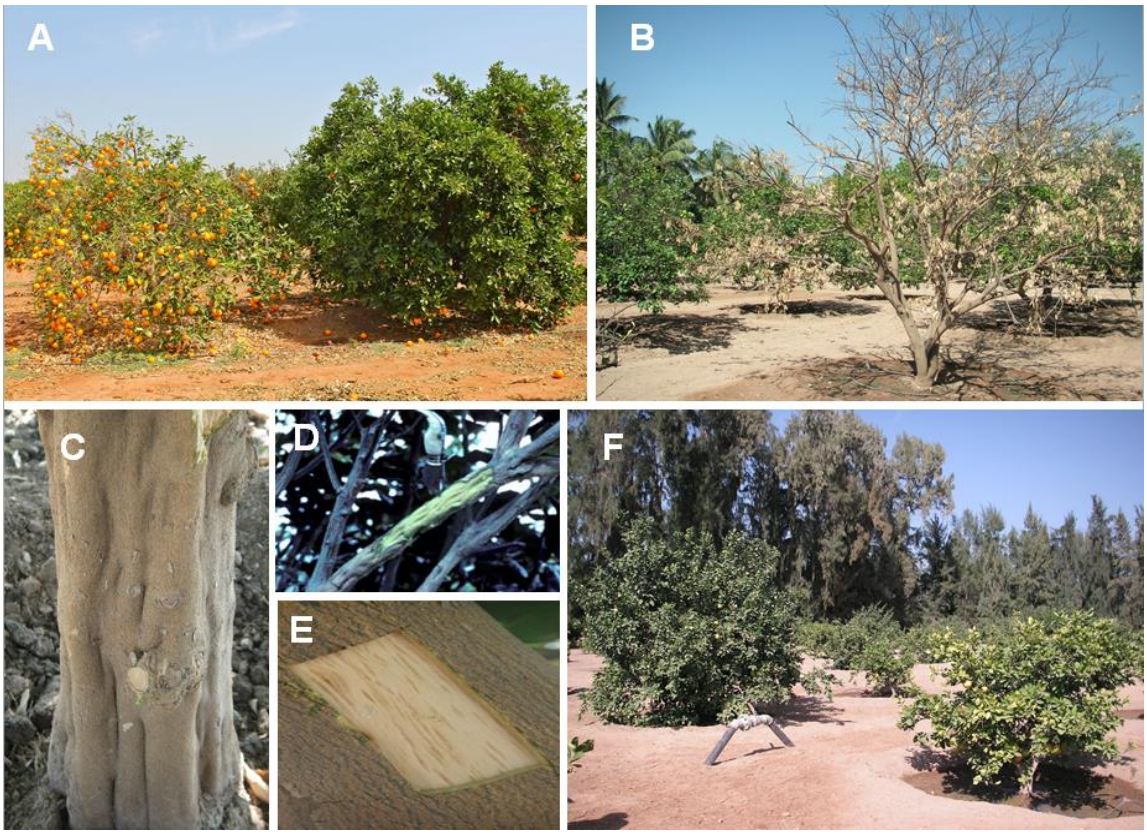
Vidal, E., Yokomi, R.K., Moreno, A., Bertolini, E. & Cambra, M. 2012. Calculation of diagnostic parameters of advanced serological and molecular tissue-print methods for detection of *Citrus tristeza virus*. A model for other plant pathogens. *Phytopathology*, 102: 611-619.

Yokomi, R.K., Garnsey, S.M., Civerolo, E.L. & Gumpf, D. 1989. Transmission of exotic citrus tristeza isolates by a Florida colony of *Aphis gossypii*. *Plant Disease*, 73: 552–556.

Yokomi, R.K., Saponari, M. & Sieburth, P.J. 2010. Rapid differentiation and identification of potential severe strains of *Citrus tristeza virus* by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assays. *Phytopathology*, 100: 319–327.

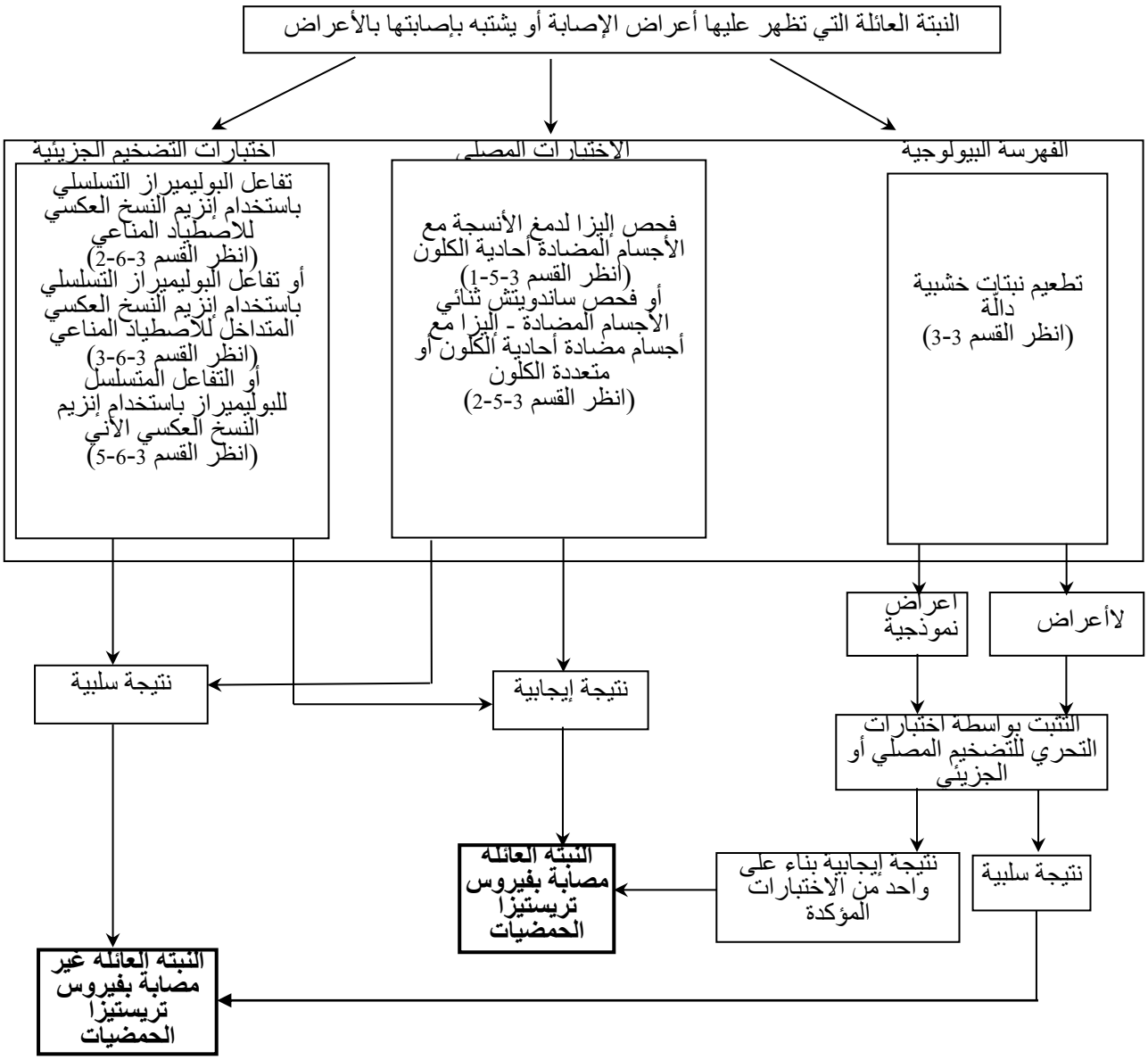
Zemzami, M., Garnsey, S.M., Nadori, E.B. & Hill, J.H. 1999. Biological and serological characterization of *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates from Morocco. *Phytopathologia Mediterranea*, 38: 95–100.

9- الأشكال

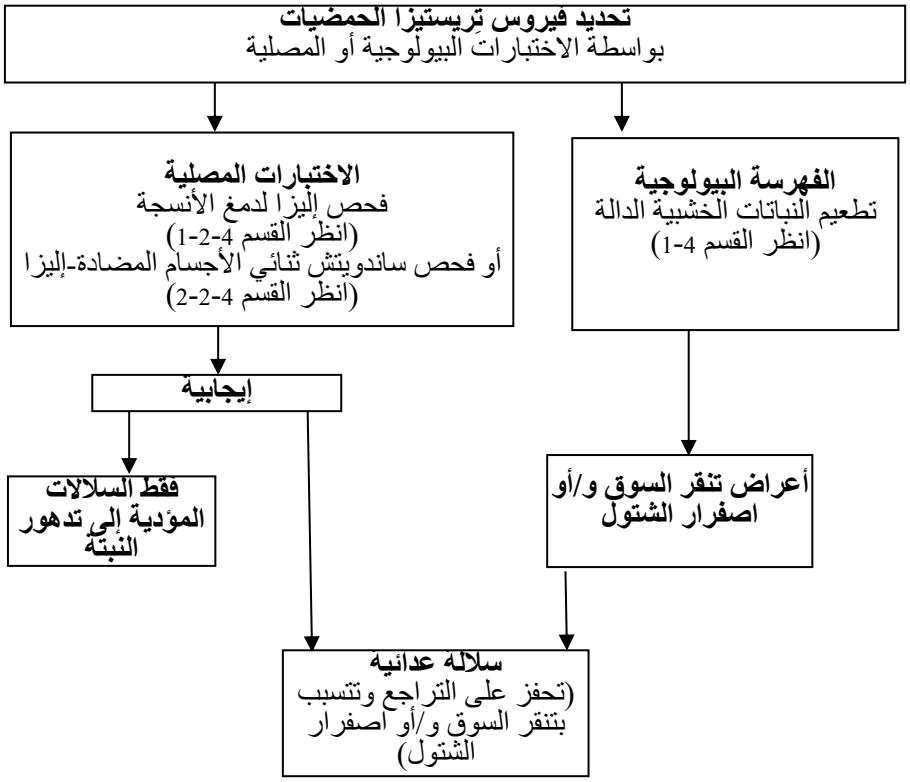


الشكل1- أعراض الإصابة بفيروس تريستيزا الحمضيات (CTV): (ألف) متلازمة تريستيزا أو تدهور حالة شجرة البرتقال الحلو المطعمة على أصل البرتقال المر المصاب بالفيروس (جهة اليسار) وشجرة خالية من الأعراض (جهة اليمين)؛ (باء) الانهيار أو التدهور السريع لشجرة الجريب فروت المطعمة على أصل البرتقال المر؛ (جيم) تنقر على جذع شجرة الجريب الفروت المطعمة على أصل سترانج ترويير (Troyer) جراء سلالة عدائية لفيروس تريستيزا الحمضيات؛ (دال) تنقر شديد على أغصان شجرة الجريب فروت؛ (هاء) تنقر على جذع شجرة البرتقال الحلو المطعمة على أصل مندرين كليوباترا و(واو) تقزم ملحوظ على أشجار البرتقال الحلو المصابة بفيروس تريستيزا الحمضيات المطعمة على أصل سترانج كاريز (Carrizo) (جهة اليمين) مقارنة بشجرة سليمة (جهة اليسار).

الصورة (ألف) تقدمة *P. Moreno*؛ الصور (باء، جيم، هاء) تقدمة *M. Cambra*؛ الصورة (دال) تقدمة*L. Navarro* ؛ الصورة (واو) تقدمة *M. Cambra* و*J.A. Pina.* وجميعها من معهد فالنسيا للبحوث الزراعية (IVIA) ، مونكادا، إسبانيا.



الشكل 2- مخطط بياني يبين *عملية كشف فيروس تريستيزا الحمضيات* وتحديده DAS ساندويتش ثنائي الأجسام المضادة؛ (ELISA) إليزا، (الفحص المناعي المرتبط بالأنزيم)؛IC الاصطياد المناعي؛PCR التفاعل المتسلسل للبوليميراز، RT النَّسْخ العكسي.



الشكل 3- مخطط بياني يبين عملية *كشف فيروس تِريستيزا الحمضيات* وتحديده DAS ساندويتش ثنائي الأجسام المضادة؛ ELISA إليزا (الفحص المناعي المرتبط بالإنزيم).

مراحل النشر

هذه الفقرة لا تشكل جزءاً رسمياً من المعيار.

2004-11 قامت لجنة المعايير بتقديم الموضوع الأساسي: فيروس تِريستيزا الحمضيات (2004-021).

2006-04 قامت الدورة الأولى لهيئة تدابير الصحة النباتية بإضافة الموضوع إلى برنامج العمل: الفيروسات والبلازما النباتية (2006-009).

2006-04 قامت الدورة الأولى لهيئة تدابير الصحة النباتية (2006) بإضافة موضوع برنامج العمل: الخيطيات (2006-008).

2014-04 مشاورة الخبراء

201-01 وافقت لجنة المعايير على رفع الموضوع لمشاورة الأعضاء (2015_eSC_May_02)

2015-02 مشاورة الأعضاء

2015-12 قامت المجموعة التحريرية المعنية ببروتوكولات التشخيص باستعراض مسودة بروتوكول التشخيص وبتقديم الأجوبة على تعليقات الأعضاء

2015-11 عُرض الموضوع على لجنة المعايير للموافقة عليه خلال فترة الإبلاغ عن بروتوكول التشخيص(2016_eTPDP_Feb_02)

2016-03 صدور قرار إلكتروني عن لجنة المعايير للموافقة عليه على أن يرفع خلال فترة الـ 45 يوماً للإبلاغ عن بروتوكول التشخيص (2016_eSC_May_10)

2016-08 اعتمدت لجنة المعايير بروتوكول التشخيص نيابة عن هيئة تدابير الصحة النباتية (بدون تلقي أي اعتراضات).

المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية 27 المرفق 15 فيروس تِريستيزا الحمضيات (2016). روما، الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات، منظمة الأغذية والزراعة.

2017-04: اخدت هيئة تدابير الصحة النباتية ، في دورتها (12) ، علما بالتعديلات التحريرية المقترحة من قبل مجموعة مراجعة اللغة العربية.

2018-01 راجعت خدمات الترجمة التابعة لمجموعة مراجعة اللغة الخاصة باللغة العربية برتوكول التشخيص هذا وقامت أمانة الاتفاقية الدولية لوقاية النبات بدمج التعديلات وفقاً لذلك.

2018-04: الدورة الثالثة عشر لهيئة تدابير الصحة النباتية (CPM-13) في 2018 أحيطت علماً بأن مجموعة مراجعة اللغات راجعت هذا الملحق.

2019-01: قامت أمانة الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات بتصحيح خطأ في الشكل 2.

أخر تحديث لتاريخ المطبوع: 2019-01