الباب الثانى

التعقيم Sterilization

يجب المحافظة على نظافة وتعقيم معمل زراعة الأنسجة وخاصة حجرة الحقن ومعمل النمو. لأن التلوث يعنى فساد المزروعات وضياع الوقت والمجهود وفقدًا للكيماويات.

مصادر تلوث معمل زراعة الأنسجة

١- تلوث المواد الكيميائية الداخلة فى تركيب البيئة والأدوات المستخدمة فى تداولها، لذلك يجب تخصيص أدوات محددة لكل مادة كيميائية لمنع انتقال التلوث من مادة كيميائية إلى أخرى.

٢- عدم نظافة وتعقيم الأدوات المستعملة وعدم نظافة وتعقيم الأرضيات وعدم إزالة المخلفات بسرعة من المعمل وعدم اهتمام العاملين بالنظافة الشخصية.

٣- النوافذ والأبواب غير محكمة الغلق التى تسمح بدخول الأتربة إلى المعمل هى من المصادر الهامة للتلوث.

ويجب أن يتوفر فى المعمل دقة التصميم الهندسى لمنع نفاذ الأتربة إلى داخله.

١- تعقيم حجرة الحقن

Sterilization of inoculation room

١- تنظف منضدة الكابينة بالكحول ٩٦٪، ولا يستخدم كحول ٧٠٪ حتى لاتترك قطرات من الماء بعد تطاير الكحول وتصبح مصدرا للتلوث. ثم تجفف الكابينة بقطعة من القماش الجيد الذى لا يترك أية بقايا.

٢- يفضل تشغيل الكابينة لمدة ١٥ دقيقة قبل بدء العمل للتأكد من سلامتها.

٣- تترك أحيانا لمبات الأشعة فوق البنفسجية (UV) مضاءة طوال الليل لتعقيم حجرة الحقن ومحتوياتها قبل استخدامها فى اليوم التالى، وقد يفضل إضاءتها قبل بدء العمل بفترة لا تقل ولا تزيد عن ٣٠ دقيقة مع التأكد من غلق الأبواب بإحكام. ويجب عدم النظر إليها أثناء تشغيلها لحماية العين من الأضرار.

كابينة تيار الهواء المعقم Laminar flow hood

يتم فى هذه الكابينة فصل الأجزاء النباتية وزراعتها فى أوعية الزراعة المعملية. ويجب أن يتوفر فيها التعقيم التام أثناء إجراء الزراعة. وتتميز هذه الكابينة بقدرتها على تنقية وتعقيم الهواء المار بداخلها. حيث يمر الهواء الجوى بضغط ثابت خلال مرشحات أقل من ميكرون لمنع مرور ذرات التراب وما تحمله من كائنات دقيقة، ثم يمر الهواء داخل الكابينة بعد أن يصبح على درجة عالية من النقاوة والتعقيم. ويجب تغيير الفلتر بآخر جديد سنويا. ويثبت فى سقف الكابينة لمبات فلوروسنت كمصدر للإضاءة. ويتوفر فى الكابينة مصدر غاز يستخدم كلهب لتعقيم الأدوات المستخدمة فى الزراعة والحقن أو يستخدم بدلا منه مصباح كحولى.

٢- نظافة وتعقيم الأدوات المعملية

١- نظافة الأدوات الزجاجية

تنظف الأوعية الزجاجية والأدوات المعملية فى حجرة الغسيل. وتنظف الزجاجيات الجديد منها الذى لم يسبق استعماله فى إناء يحتوى على خليط من حمض الكروميك وحمض الكبريتيك أو منظف صناعى. ثم تغسل تحت تيار ماء جار لفترة لا تقل عن ٥ دقائق يعقبها غسيل بماء مقطر معقم مرتين متتاليتين، ثم تحفظ جميعها بعيدا عن الأتربة. ويعاد غسلها مرتين بالماء المقطر قبل استخدامها إذا خزنت لفترة طويلة. فإذا تلوثت الأرضية بمخلوط الحامضين المذكورين أو

كليهما فتنظف باستخدام مصدر مائى ذى ضغط عالٍ. لذلك يجب أن تكون أرضية المعمل مقاومة للأحماض. ويجب استعمال قفازات وبلاط مقاومة للأحماض. وتنظف الزجاجيات المستعملة بسرعة قبل جفاف الآجار والتصاقه بجدار الوعاء. ويبدأ تنظيف الأنابيب بإزالة السدادات ثم توضع فى ماء ساخن. ويستخدم ملقاط وفرشاة مناسبة للتخلص من الآجار وبقايا النباتات الموجودة فى الأنابيب. ويفضل استخدام غسالة أطباق لغسل الأوانى الزجاجية، ثم تشطف بماء مقطر خالٍ من الأيونات، ثم تجفف جيدا فى فرن تجفيف بعد التأكد من نظافتها، ثم تخزن بسرعة بقدر الإمكان لتقليل فرصة تلوثها.

٢ - تعقيم الأدوات المعملية

الأدوات المعملية تشمل جميع الأوانى الزجاجية والبلاستيكية المستخدمة فى الزراعة والأدوات الأخرى مثل السكاكين والمشارط والملاقط والمقصات وغيرها. ويتم التعقيم بأشعة جاما أو بالضغط البخارى باستخدام الأوتوكلاف أو بالحرارة الجافة. ولا تستخدم الأوعية البلاستيكية منخفضة الجودة إلا مرة واحدة لأنها لا تتحمل حرارة التعقيم المرتفعة، ولها عمر افتراضى تصبح بعده غير صالحة للاستعمال. ويستخدم الإشعاع بنجاح فى تعقيم الأدوات المعدنية والأوانى الزجاجية والبلاستيكية بصرف النظر عن جودتها. ويفضل استخدام الأوتوكلاف أو أفران الحرارة الجافة فى تعقيم الأوانى الزجاجية. والأوانى البلاستيكية التى تتحمل حرارة التعقيم عادة مرتفعة الثمن وتعقم مثل الزجاجيات ولها بعض المشاكل مثل انبعاث الإيثلين منها، وهو مركب ضار للبيئة وسام للنباتات. وتعقم الأدوات الزجاجية بالحرارة الجافة فى فرن حرارته ١٥٠°م لمدة ساعة واحدة، على أن تكون من الزجاج المقاوم للحرارة مثل Pyrex أو بوروسليكات Borosilicate وهى مرتفعة الثمن، والأنواع الرخيصة منها لا تتحمل الحرارة المرتفعة، وينفرد منها كاتيونات سامة مثل الصوديوم والرصاص والزئبق إلى البيئة الغذائية. ويستخدم الزجاج البيركس بصفة خاصة لزراعة البروتوبلاست والخلايا الفردية والأنسجة المرستيمية. ويجب الأخذ فى الاعتبار ما يلى:

١- تغلف الأدوات المعملية مثل السكاكين والمشارط والملاقط والمقصات وغيرها بورق ألومنيوم قبل تعقيمها فى الأوتوكلاف، وتظل مغلفة بعد تعقيمها للحفاظ عليها معقمة حتى وقت استعمالها. وتوضع الماصات والحقن داخل علب خاصة بها ثم تغلف كل علبة بورق ألومنيوم للمحافظة عليها بعد التعقيم.

٢- عند الزراعة المعملية يغمس طرف الآلة المستخدمة فى كحول، ثم تعرض إلى لهب من مصباح بنز ثم يوضع فى ماء معقم ليبرد. ويجب عدم وضع أية أداة فى كحول بعد تعرضها مباشرة لمصدر حرارى حتى لا يحدث انفجار أو التهاب للكحول و قد يؤذى القائم بالزراعة المعملية.

٣- يجب عدم ملامسة الأدوات المعملية سطح البيئة الغذائية عند نقل وزراعة الجزء أو النسيج النباتى.

٤- يفضل استخدام ماصات Pipettes أو سرنجات Syringes معقمة لضمان عدم تلوث البيئة الغذائية. وتخصص واحدة منها جديدة ومعقمة لكل نوع من المحاليل المستخدمة.

٥- يجب تغطية الشعر تماما ووضع كمامة فوق الأنف والفم. وتطهير الأيدى وأى جزء آخر مكشوف من الذراع بالكحول حتى لا يكون مصدرا لتلوث البيئات الغذائية والأجزاء النباتية.

٣- تعقيم البيئة الغذائية

Sterilization of nutritional medium

يجب التأكد من نقاوة وتعقيم المركبات الداخلة فى تكوين البيئة ومنع تلوثها. ويفضل تحضيرها قبل الاستعمال مباشرة، ويجب ألا تزيد فترة تخزينها عن ١٤ يوما.

١- التعقيم بالأوتوكلاف

تعقم معظم البيئات الغذائية فى الأوتوكلاف، وهو جهاز تعقيم بخارى تحت ضغط يتميز بسرعة وسهولة التشغيل. ويختلف الأوتوكلاف فى شكله وحجمه فمنه

الأفقـى الذى يتم تحميله من الأمام، والرأســى الذى يتم تحميله من أعلى. والنوع الأفقى أســهل استعمالا وأعلى ســعرا. وتصل حرارة التعقيم ١١٥– ١٣٥°م. لذلك فالأوتوكلاف قادر على تحطيم جميع الكائنات الدقيقة والفيروسات. وتعتمد كفاءة التعقيم على مدة التشـغيل والضغط البخارى المستعمل ودرجة الحرارة وحجم المواد المطلوب تعقيمهـا. ويحتاج تعقيم الأحجام الكبيرة من البيئة الغذائية الموجودة فى عبـوة واحـدة إلى فترة زمنية أطول لضمان تجانس توزيع حرارة التعقيم (جدول ١) كذلـك تحتـاج إلى فترة أطول بعد تعقيمها لكى تفقـد حرارتها المرتفعة. وقد يؤدى إطالة فترة التعقيم أو فترة ما بعد التعقيم إلى تلف البيئة أو احتراق بعض مكوناتها مثل السـكر. لذلـك يفضل توزيع البيئة على أنابيـب أو دوارق بمعدل ٢٠– ١٠٠ مللـى لكل منها لضمان اكتمال وتجانس التعقيم وحماية مكوناتها من التغيير. ويتم التعقيم بعد ١٥– ٢٠ دقيقة عند ١٢١°م وضغط بخارى واحد كيلوجرام/ سم٢. وتغلق أنابيـب الاختبار أو الدوارق الزجاجية المحتوية على بيئة غذائية قبل وضعها فى الأوتوكلاف بسـدادة من القطن محاطة بطبقة من الشـاش للمحافظة على تعقيمها بعد التعقيم. وقد تسـتخدم أغطية مخصصـة للأنابيب والدوارق الزجاجية على أن تكـون غير محكمة الغلق لتسـاعد على تمدد الهواء داخلهـا ومنع انفجارها داخل الأوتوكلاف. وقد تسـتخدم أغطيـة تحتوى على نتوءات داخلية تلامس السـطح الخارجى للأنبوبة الزجاجية وتسـمح بتبادل الغازات. ويسـتخدم أيضا قطع مربعة مناسـبة من ورق الألومنيوم سمك ٠,٢٥ ملليمتر؛ حيث توضع قطعة ورق الألومنيوم فـوق فوهة الأنبوبة أو الدورق ثم تطوى أطرافهـا برفق حول محيط العنق، ويؤدى إحكام غلق الأوعية إلى عزل محتواها عن المحيط الخارجى وخلق ظروف لا هوائية داخلها. ويتميز غطاء الألومنيوم بإمكان رفعه وإعادة تعقيمه واستعماله لإضافة مادة كيميائية أو جزء نباتى. ويمكن استخدام غشاء من البوليثين polythene بعد تعقيمه فى ٧٠٪ كحول إيثايل بدلا من ورق الألمونيوم.

ويتوفر فى الأسـواق أجهزة لتحضير وتعقيم كميات ما بين ٠,٥– ١٦ لترا. ويتم تعقيمهـا تحت ضغط بخارى. ويتم خلـط البيئة مع التقليب أثنـاء التعقيم لضمان

الخلط الجيد وإذابة جميع مكوناتها وسرعة التسخين وتجانس الحرارة فى البيئة. وبعد التعقيم تبرد البيئة بسرعة تحت تيار ماء جار. ثم تضاف المكونات التى تتحمل الحرارة أولا مع التقليب. بعدها تصبح البيئة معقمة صالحة للتوزيع فى أوانى الزراعة.

جدول (١) مدة التعقيم بالأتوكلاف عند درجة حرارة ١٢١°م

حجم البيئة الغذائية (مللى)^{3}	الوقت اللازم للتعقيم (دقيقة)
٢٠ — ٢٥	١٥
٢٥ — ٥٠	٢٠
٥٠ — ٥٠٠	٢٥
٥٠٠ — ١٠٠٠	٣٠
١٥٠٠	٣٥
٢٠٠٠	٤٠

سلبيات التعقيم بالأوتوكلاف

(أ) حدوث تحلل مائى للسكروز إلى فركتوز وجلوكوز وسكريات وأحماض سكرية. وارتفاع حرارة التعقيم أكثر من اللازم قد يؤدى إلى كرملة السكر.

(ب) حدوث تغيير فى رقم حموضة البيئة الغذائية (pH) بمقدار ٠,٣—٠,٥ وحدة، مما يسبب انفصالا لبعض مكوناتها وحدوث بعض التفاعلات الجانبية بينها وانخفاض فاعليتها.

(جـ) حدوث تحطيم لبعض المركبات الداخلة فى تكوين البيئة مثل الكولشيسين والزياتين Zeatin والجبريلين وفيتامين (B_1) وThiazol وPyrimidine وفيتامين B (Partothenic) وVitamin C والمضادات الحيوية والإيثريل Ethrel والإيثلين Ethylene .

٢- التعقيم بالمرشحات Sterilization by filtration

يستخدم للتعقيم مرشحات خاصة مثل Millipore MF filters ذات مسامية ٠,٢٢ ميكروميتر للتخلص من جميع الجسيمات العالقة والكائنات الدقيقة، حيث تمرر المحاليل والبيئات السائلة وغيرها خلال أغشية الفلتر.

وتستخدم هذه الطريقة بدلا من التعقيم بالضغط البخارى (الأوتوكلاف). والتعقيم بالترشيح يؤدى إلى احتفاظ البيئة بمكوناتها الغذائية بدون تغيير ويؤخذ عليه ادمصاص بعض المركبات على سطح الفلتر، ولذلك يفضل استبعاد الكمية الأولى من الراشح لاحتمال عدم مطابقته للمواصفات المطلوبة، كما أن بعض الفيروسات قد تكون صغيرة ولها القدرة على المرور خلال الفلتر.

٤- تعقيم الأجزاء النباتية Sterilization of explants

الأجزاء النباتية المفصولة من نباتات نامية فى الحقل عادة تكون ملوثة بأنواع مختلفة من الكائنات الدقيقة. ويعتبر الهواء والأتربة ومياه الرى والآفات وغيرها أهم مصادر للتلوث. وزراعة الأجزاء النباتية الملوثة يؤثر تأثيرا سيئا على نمو وتطور النموات. لذلك فتعقيم الأجزاء النباتية القادمة من الحقل شرط أساسى.

خطوات التعقيم

١- يغسل الجزء النباتى تحت تيار مستمر من ماء الصنبور لمدة ١- ٢ ساعة لتنظيف سطحه الخارجى جيدا والتخلص من الأتربة العالقة عليه وتخفيض الحمل الميكروبى.

٢- يغمس الجزء النباتى فى محلول التعقيم للقضاء على ما تبقى من الأحياء العالقة على سطحه. واختيار المادة الكيميائية المعقمة والفترة الزمنية المناسبة للتعقيم يعتمد على حساسية الجزء النباتى المراد تعقيمه. ويؤدى التعقيم الشديد إلى التخلص من الكائنات الدقيقة المنتشرة على السطح الخارجى. وقد يؤدى أيضا إلى تدمير بعض

الأنسجة الخارجية للجزء النباتي. لذلك يجب اختيار مادة التعقيم والفترة المناسبة للتعقيم بدقة.

٣- يغسل الجزء النباتي بالماء المقطر المعقم عدة مرات للتخلص من الآثار المتبقية من مادة التعقيم. مع الاهتمام بإزالة جميع الأنسجة المتضررة والتالفة من تأثير مادة التعقيم.

٤- يقطع الجزء النباتي إلى أحجام مناسبة للزراعة المعملية تحت ظروف معقمة، ويستخدم في ذلك أدوات معقمة جيدا. ثم تزرع الأجزاء النباتية تحت ظروف تعقيم في أوانى الزراعة مثل أنابيب الاختبار ودوارق مخروطية وأطباق بترى تحتوى على بيئة غذائية. ويراعى أن تكون الأوانى والبيئة الغذائية معقمة جيدا.

تعقيم الأجزاء النباتية بالكيماويات Chemical sterilization

تعقم الأجزاء النباتية سطحيا باستخدام مركبات مثل هيبوكلوريت الصوديوم (NaClO) وهيبوكلوريت الكالسيوم وماء البرومين وفوق أكسيد الإيدروجين ونترات الفضة وكلوريد الزئبق وكحول الإيثايل وأكسيد الإيثلين. ويفضل إضافة ٠,٠٥٪ من مادة ناشرة مثل Teepol; Trigetol; Tween-20 إلى محلول التعقيم لتسهيل انتشاره على الأسطح الخارجية للأجزاء النباتية وزيادة كفاءته في قتل الكائنات الدقيقة. ويستخدم هيبوكلوريت الصوديوم بتركيز ١٪ بنجاح في التعقيم لانخفاض أضراره الجانبية. حيث يتحلل هيبوكلوريت الصوديوم إلى كلورين ذات الأثر الفعال في التعقيم، ويتفاعل الصوديوم مع الماء ليكون هيدروكسيد الصوديوم، وهو مركب سهل التخلص منه بالماء. ويحتاج التعقيم من ٥ إلى ٣٠ دقيقة في محلول ١٪ هيبوكلوريت الصوديوم. وإطالة فترة التعقيم قد يكون لها تأثير ضار على الجزء النباتي. وقد يستلزم تغطية الأسطح المجروحة على الجزء النباتي بالبرافين لمنع نفاذ محلول التعقيم إلى الأنسجة الداخلية ومنع خروج السائل الخلوى. ويستخدم البرومين بتركيز ١٪ لتعقيم البذور قبل زراعتها مباشرة. ويسبب البرومين بعض الأضرار للجنين إذا كان غلاف البذرة رقيقا. ويستخدم فوق أكسيد الإيدروجين (H_2O_2)

فى التعقيم، وهو سهل التحلل إلى أكسيجين وماء، وهى شقوق غير ضارة وتتبخر بسهولة. ويسبب هذا المركب بعض الأضرار حيث يفقد النسيج النباتى بعضا من رطوبته أو يؤدى إلى جفافه. ومحلول كلوريد الزئبق المخفف يعقم الأنسجة النباتية بنجاح، خصوصا الأجزاء النباتية المغطاة بطبقة كيوتين أو ذات أسطح غير مستوية. ويؤخذ عليه صعوبة إزالة آثاره المتبقية على الجزء النباتى بالماء. ويمكن إزالته بكحول إيثايل أو مسحوق غسيل أو خليط بينهما. لذلك يجب تحديد فترة التعقيم وتركيز مادة التعقيم المستخدمة لكل نوع نباتى (جدولا ٢، ٣).

جدول (٢) الفترة الزمنية (الدقيقة) والتركيز المناسب من مادة هيبوكلوريت الصوديوم

الجزء النباتى	النبات	مدة التعقيم	هيبوكلوريت الصوديوم ٪
أوراق	Anthurium andreanum	30	1
نسيج	Hyacianthus scale	15	1
سوق	Rhododendron	20	1
أذينات	Gerbera	15	1
براعم زهرية	Freesia	20	1
أوراق	Strelitzia	45	1
بذور	Tulipa	30	2
سوق	Phaseolus	15	1
قمم السوق	Nephrolepis	5	1

جدول (٣) بعض المواد المستخدمة فى تعقيم الأجزاء النباتية

مادة التعقيم	التركيز ٪	مدة التعقيم (دقيقة)	التأثير	سهولة الإزالة*
هيبوكلوريت الكالسيوم	10 - 9	30 - 5	جيد جدا	+++
هيبوكلوريت الصوديوم	**2	30 - 5	جيد جدا	+++
ماء البرومين	2 - 1	10 - 2	جيد جدا	+++
فوق أكسيد الأيدروجين	12 - 10	15 - 5	جيد	++++++
نترات الفضة	1	30 - 5	جيد	+
كلوريد الزئبق	1 - 0.1	10 - 2	مقبول	+
مضادات حيوية	5 - 4 مليجرام/ لتر	60 - 30	جيد بوجه عام	++

* التدرج من صعب الإزالة (+) إلى سهل الإزالة جدا (++++++).

** ٢٠ ٪ حجم/حجم من المحلول التجارى.

مواصفات مواد التعقيم

يجب أن تتوفر فى مواد التعقيم سهولة التخلص من آثارها بالشطف فى الماء. وأن تكون غير قابلة للتفاعل مع مكونات النسيج النباتى حتى لا تتكون مركبات لها تأثير ضار على النموات الجديدة. ويجب أن تتحلل بسهولة إلى مكونات أقل سمية من المادة الأصلية وسهولة التخلص منها بالماء. وأثناء تعقيم الأجزاء النباتية

قد يظهر عليها لون بنى نتيجة تكوين صبغة الميلانين. ويمكن منع هذه العملية بغمس الأجزاء النباتية فى محلول حمض أسكوربيك تركيز ١٠٠ ملليجرام/ لتر، ثم غمسها فى حمض الستريك تركيز ١٥٠ ملليجرام/ لتر.

التلوث الذاتى للأجزاء النباتية

يظهر أحيانا نموات للكائنات الدقيقة فى بعض الأوانى المحتوية على مزروعات. وقد يرجع ذلك إلى رداءة التعقيم. وقد يكون مصدر التلوث هى الأنسجة الداخلية للجزء النباتى نفسه التى يصعب على مواد التعقيم الوصول إليها. وتظهر النموات الميكروبية إذا تلامست الأسطح المجروحة على الجزء النباتى للبيئة الغذائية. وتظهر النموات المصابة ضعيفة وشاحبة وتموت، و يجب التخلص من هذه الأوانى فورا. وتساعد البيئة الغذائية الغنية على زيادة انتشار الإصابة الميكروبية. وقد تحدث طفرات ميكروبية قادرة على النمو على البيئة الفقيرة. وقد تكون القمة النامية للساق مصدرا للتلوث لصعوبة تخلل مواد التعقيم بين الأوراق المتجمعة والملاصقة لها. لذلك تعقم القمة النامية على مراحل متتالية تبدأ بغسلها جيدا بالماء ثم تعقم ظاهريا، ثم تزال بعض الأوراق وتعقم مرة ثانية. ويكرر التعقيم بعد كل إزالة لبعض الأوراق. ويفضل أحيانا إجراء اختبار لتقدير كفاءة التعقيم. حيث تحضر بيئة يضاف إليها ٢- ٣٪ تريبتون Tryptone أو بيبتون Peptone. ثم تزرع عليها أجزاء من الطرف القمى لأحد الأفرع بعد قطعها طوليا ويكون السطح المجروح ملامسا للبيئة. وبعد أيام قليلة تظهر بوضوح نموات للكائنات الدقيقة إن وجدت. ونتائج هذه الطريقة غير مشجعة دائما حيث لا توجد بيئة غذائية قياسية يمكن استخدامها كدليل جيد لكل أنواع البكتيريا التى تنمو داخل الأنسجة النباتية. ويساعد على ظهور التلوث الذاتى مايلى:

١-عدم غسل وتعقيم الأيدى. وعدم استخدام أقنعة للفم والأنف وأغطية للشعر وقفازات معقمة. وعدم استخدام بلاط معقمة. وعدم السماح بدخول أعداد كبيرة من

الزائرين داخل حجرة الحقن. والتعقيم الردىء لكابينة الحقن. وعدم تغطية الأحذية بغطاء بلاستيك أو غمس نعل الحذاء فى محلول معقم عند دخول حجرة الحقن. لذلك يجب التأكد من سلامة وتعقيم حجرة الزراعة وكابينة الحقن بدفع هواء معقم داخل الكابينة والتشعيع بأشعة (UV) أثناء الليل وتجديد الفلاتر الأمامية للكابينة سنويا.

٢- عـدم تعقيـم منضدة العمل بكحـول إيثانول ٩٦٪. وعـدم تعقيم الأرضيات. والتعقيم الردىء للأدوات المستخدمة.

٣- قد تكون الأسطح الخارجية للأنابيب والدوارق المخروطية غير معقمة جيدا، لذلـك يفضل تعقيمها ثم تخزينها فى ظروف معقمـة حتى ولو كانت محتوية على بيئة غذائية.

٥- وجود بعض الكائنات الحية مثل العناكب، حيث إن لها القدرة على النفاذ بسهولة خلال الأغطية القطنية وشرائط البلاستيك حاملة معها الكائنات الدقيقة إلى البيئة الغذائية فى الأنابيب والدوارق.

طرق التغلب على التلوث الذاتى

١- زراعة الطرف المرستيمى Meristemic tip

يفضل استخدام القمة المرسـتيمية المحاطة بواحدة أو اثنين من منشئات الأوراق لخلوها من الفيروس. وقد يرجع ذلك إلى عدم اكتمال تكوين الأوعية الناقلة فى القمة المرسـتيمية . ويفصل المرسـتيم من القمة النامية المعقمة، وقد لايسـتلزم تعقيمها إذا كانت مفصولة من نباتات معملية أو مرباة فى صوبة.

٢- إضافة مضادات حيوية للبيئة الغذائية

تضـاف أحيانا بعض المضادات الحيوية للبيئة الغذائية مثل: Benomyl ; Benolate بتركيـز ١٠ ملليجرام/ لتر لإيقاف نشـاط الكائنات الدقيقة، وقد يسـبب المركب Benomyl بعـض الأضرار لنمو الأجـزاء النباتية وتطورها. لذلـك لا يفضل البعض

إضافة مثل هذه المركبات للبيئة لاحتمال تفاعلها مع مكونات البيئة الغذائية وتكوين مركبات سامة للنموات، وقد يكون لها ضرر مباشر للريبوسومات مما يؤدى إلى تثبيط النمـو. وقد تظهر طفـرات فى الكائنات الدقيقة مقاومة للمضادات الحيوية، كما أن المضادات الحيوية ليس لها تأثير على الفيروسات. ومن المركبات المستعملة:

Oxytetracycline; Tetracyclin; Penicilin – G; Streptomycin; Rifampicin; Achromycin; Chloromycin; Gentamycin; 8-Hydroxy – **quinoline**

□□□