الباب السادس

إنتاج نباتات خالية من الأمراض

أ- إنتاج نباتات خالية من الفيروسات

تسبب الفيروسات أمراضا كثيرة مثل موزايك البطاطس Potato mosaic وتورد القمة فى الموز Banana-Bunchy Top Virus وموزايك قصب السكر Sugar can mosaic وقوباء الموالح Citrus psorosis والتدهور السريع فى الموالح Citrus tristeza وموزايك التبغ Tobacco mosaic. وتسبب الأمراض الفيروسية خسائر فادحة فى النباتات، فمثلا تسبب فيروسات (V. Y) مرض التفاف الأوراق فى البطاطس وفقد ٣٠٪ تقريبا من المحصول العالمى من الدرنات، وانتقالها من جيل إلى جيل يؤدى إلى تدهور خطير فى محصول الدرنات يصل إلى ٥٠-٨٠ ٪. لذلك أصبح من أهداف الزراعة المعملية الحصول على نباتات خالية من الفيروسات. واهتمت دول كثيرة بإنتاج بطاطس خالية من الأمراض الفيروسية باستخدام زراعة الأنسجة. وواكب ذلك ارتفاع متوسط المحصول من ١١طنا إلى ٢٠طنا بالهكتار فى الفترة ١٩٧٠- ١٩٨٨. وتبنت دول كثيرة تطبيق زراعة الأنسجة مثل الدنمارك (١٩٨٥) والسويد (١٩٨٥) والمكسيك (١٩٨٧) وكوبا (١٩٩٢). ويوجد الآن على الأقل ١٣٦ صنفا تجاريا من البطاطس خالية من الإصابة الفيروسية، بالإضافة إلى أصول مرجعية خالية من الأمراض لبعض المحاصيل الحقلية والبستانية، كذلك تم تحديث أصناف قديمة من البطاطس وغيرها من المحاصيل التى تتميز بارتفاع المحصول والتبكير فى النضج. واصطلاح «خالى من الفيروس» Virus free هو اصطلاح غير دقيق لعدم وجود نباتات خالية من جميع الفيروسات. ولكن توجد نباتات خالية من بعض الفيروسات دون غيرها. وسوف يستخدم الاصطلاح «Virus free» فى هذا العرض للتعبير عن نباتات خالية من فيروسات معروفة ومحددة بواسطة الأجهزة العلمية.

طريقة دخول الفيروس فى النبات

تدخل الفيروسات النبات من خلال الجروح. وتساعد الأدوات الزراعية والحشرات والقوارض والنيماتودا على انتشـار الإصابة. ويخترق الفيروس أنسـجة النبات ببطء حتى يصل إلى نسيج اللحاء الحامل للمواد الغذائية المصنعة. وينتقل الفيروس إلى أجزاء النبات المختلفة بسـرعة انسـياب تيار المواد الغذائية الحاملة له وفى الاتجاه الذى تنجـذب إليه. فيتحرك معها إلى الجذر لأنه منطقة جذب قوية فى مرحلة البادرة. ثم ينتشر من الجذر إلى أعلى الأوراق الحديثة الملتفة التى تعتبر منطقة جذب أخرى حتـى يكتمل تمددها وتصبح قادرة علـى بناء وتصدير المواد المثلة بدلا من جذبها. وبتقدم عمر النبات تنجذب المواد المثلة حاملة الفيروسـات إلى مناطق التخزين مثل الدرنات والأبصـال والثمار وغيرها، حيث تعتبر مناطق جذب أخرى (Sharabash, 1977; 1980 ; 1981 a,b).. وثبت أن تواجد الفيروسـات يكون ضعيفا أو منعدما فى الطرف المرستيمى للقمم النامية. لذلك فإن دراسة حركة الفيروسات وسرعة انتشارها وأماكن تركيزها وعلاقة ذلك بنوع النبات ومراحل نموه لها أهمية عند اختيار حجم المرستيم المناسب للزراعة. ويختلف انتشار الفيروسات فى النباتات كالآتى:

– فيروسات تتحرك فى الخلايا الحية فقط.

– فيروسـات تنتشـر فى اللحاء فقط مثل فيروس تجعد الأوراق والتفاف الأوراق فى البطاطس.

– فيروسـات تنتشـر فى الخلايا البرانشـيمية فقط مثل فيروس موزايك الخيار وفيروس تبرقش البطاطس. بالرغم أن سرعة تحرك الفيروسات منخفضة فى الخلايا البرانشيمية.

– فيروسـات تنتشـر فى الخلايا البرانشـيمية واللحاء على السواء مثل فيروس موزايك التبغ.

– فيروسـات تنتشر بصورة غير منتظمة فى أعضاء النبات المختلفة مثل فيروس تبرقش التبغ Mosaic Virus Tobacco (TMV).

– فيروسات تنتشر فى مساحات من ورقة النبات يفصلها مساحات بينية خالية من الفيروس مثل موزايك نباتات البيتونيا والكرنب والتبغ.

أعراض الإصابة الفيروسية

لا تدل أعراض الأمراض الفيروسية غالبا على الفيروس المسبب لها، فقد تتشابه وتتداخل بعض الفيروسات فى مظهر الإصابة. فمثلا تشترك فيروسات A, S, Y, X فـى إظهار أعراض تبرقش أوراق البطاطس. وقد تظهر أعراض الإصابة الفيروسـية علـى الأوراق علـى هيئة بقع صفـراء أو خضراء باهته متبادلـة مع مناطق خضراء داكنة (موزايك) كما فى البطاطس والفاصوليا والفلفل والقمح والقصب، أو فى صورة خطوط باهتة اللون Streak على أوراق القصب، أو اصفرار كما فى أوراق الخوخ. وقد تظهـر الأعراض فى صورة التفاف أو تجعد الأوراق كما فى البطاطس والطماطم، أو تقزم للسـوق كما فى القمح والشعير، أو تقرحات على السوق كما فى قوباء الموالح. وقـد تظهر الأعراض على الأزهار مثل تدهـور Breaking out أزهار التيولب وندوة البراعـم Bud blight فى فول الصويـا. وقد تظهر على الثمار على هيئة تبرقش كما فى موزايك الخيار.

الاحتياطات اللازمة لإنتاج نباتات خالية من الفيروس

الأدوات المسـتخدمة فى التكاثـر الخضرى هى المصدر الرئيسـى للغالبية العظمى لعدوى وانتشار الفيروسات بين النباتات. ولوحظ أن ٨٠ نوعا من حوالى ٦٠٠ نوع من الفيروسات كانت البذور أحد مصادر العدوى. لذلك يستلزم قبل الدخول فى برنامج إنتاج نباتات خالية من الفيروسات أن يتوفر الآتى:

١– تكون نباتات الأم خالية من الإصابة الفيروسـية، ويفضل تنميتها فى صوبة نظيفة خالية من الفيروسات ومحمية من مسببات الإصابة بالفيروسات مثل الحشرات الماصة والقوارض والنيماتودا.

٢- المحافظة على سلامة العينات النباتية والأدوات المستخدمة فى فصلها من نبات الأم والأدوات والأوانى المستخدمة فى الزراعة فهى جميعها مصدر لإعادة التلوث بالفيروس.

٣- الارتفاع بمستوى النظافة الشخصية للعاملين ونظافة ملابسهم وأحذيتهم.

٤- تكون جميع مراحل الزراعة المعملية تحت ظروف معقمة.

٥- المحافظة على النباتات الجديدة الناتجة فى المعمل ومنع إصابتها. وقد يستلزم إبقاء النباتات الخالية من الفيروسات نامية فى المعمل تحت ظروف بيئية نظيفة مع متابعتها وفحصها والكشف عليها للتأكد من سلامتها.

أهمية المرستيم فى إنتاج نباتات خالية من الفيروس

المرستيمات التى تفصل من براعم طرفية أو قاعدية على فرع رئيسىأو جانبى جميعها مناسبة للزراعة المعملية. وتختلف نسبة النجاح باختلاف موقع البرعم وعمر الساق الحامل للبرعم إن كان حديثا أو معمرا. واستخدم المرستيم بنجاح فى إنتاج نباتات خالية من الفيروسات من الداليا Dahlias والبطاطس وعديد من الأنواع النباتية مثل Carrots, Potatoes Raspberry, Cherry, Grapes, Tobacco, Trifolium, Lolium, Forsythia., ومن الواضح أن للمرستيم أهميته فى إنتاج نباتات خالية من الفيروس لكثير من الأنواع النباتية، ولم يكن له نفس الأهمية فى أنواع نباتية أخرى بسبب سهولة انتشار الفيروس فى جميع أنسجتها.

أسباب خلو المرستيم من الفيروسات

- يتكون المرستيم من خلايا نشطة وسريعة الانقسام. وهذه الخلايا لا تحتوى على مواد غذائية بالقدر المناسب لنشاط وانقسام الفيروس. وقد يكون ذلك سببا فى عدم وجود الفيروس فى النسيج المرستيمى. بينما الخلايا الواقعة أسفل المنطقة المرستيمية تكون بطيئة الانقسام قادرة على الزيادة فى الحجم والامتلاء بالمواد الغذائية. وعلى ذلك فإن الفيروس يزداد نشاطه ويتكاثر بسهولة فى الخلايا أسفل المنطقة المرستيمية.

– يساعد عدم اكتمال نمو اللحاء والخشب فى المرستيم على إعاقة انتقال الفيروس إليه (White, 1934a).

– غياب البلازمودزماتا Plasmodesmata بين خلايا المرستيم، وهى أوعية تربط بين الخلايا غير المرستيمية. وقد يكون ذلك سببا فى غياب الفيروسات من المرستيم.

– قد يكون ارتفاع تركيز منظمات النمو فى الخلايا المرستيمية سببا فى تثبيط نشاط الفيروس وإعاقة حركته وقدرته على النفاذ. وقد يكون عدم توفر الإنزيمات فى الخلايا المرستيمية سببا فى وقف نشاط وتكاثر الفيروس.

– احتمال وجود مثبطات نمو طبيعية فى الخلايا المرستيمية تكون سببا فى انخفاض تركيز الفيروس. وقد يكون ذلك سببا لخلو البذور من الفيروسات.

وبالرغم من هذه الآراء فإنها غير كافية لتعليل خلو مرستيمات بعض الأنواع النباتية دون غيرها من الفيروسات ووجود فيروسات فى بذور بعض الأنواع النباتية.

المعاملات المساعدة للتخلص من الفيروس

(أ) المعاملة الحرارية

هى وسيلة فعالة فى تثبيط نشاط العديد من الفيروسات المتماثلة فى الحجم Iso-metric viruses والمايكوبلازما ويجب اختيار درجة الحرارة المناسبة والمدة اللازمة لتثبيط حيوية الفيروس دون أن تؤثر على حيوية النبات.

١- معاملة المرستيم بالحرارة

تطبق هذه المعاملة إذا كانت نباتات الأم مصابة بأكثر من فيروس. وفى هذه الحالة يفصل المرستيم ثم يحضن بعد زراعته مباشرة فى المعمل عند ٣٥– ٣٨°م لمدة ٥– ١٠ أسابيع. وتساعد هذه الطريقة بنجاح على التخلص أو خفض كثافة الفيروس فى البطاطس والكريزانثم والقرنفل والفراولة.

٢- معاملة النباتات بالحرارة

نظـرا لصعوبة الحصول على المرسـتيم أحيانا. لذلك تطبـق المعاملة الحرارية علـى النباتـات المعملية لهـذه النباتات. وتعتـبر البراعم الإبطيـة أكثر الأجزاء اسـتجابة للمعاملة الحرارية. وقد ثبت نجـاح المعاملة الحرارية للنباتات المعملية عند ٣٠- ٣٨°م للتخلص من الفيروسـات والميكوبلازما التىتصيب بعض أشـجار الفاكهة وبعض المحاصيل مثل قصب السكر والكاسافا (Morel, 1964). وبالمعاملة الحراريـة أمكن التخلـص من فيروس تبرقش الخيـار Cucumber mosaic virus من الأفرع النامية بالمعمل كذلك أمكن التخلص من فيروسـات البطاطس بتخزين الدرنات عند ٣٧- ٣٨°م لمدة شـهر قبل فصل المرسـتيم منها لزراعته فى المعمل (Morel, 1964).

(ب) المعاملة بالمواد الكيميائية

انتشار الكائنات الدقيقة مثل الفيروسات والميكوبلازما والبكتيريا والفطر داخل أو بـين الخلايا يحول دون وصول المبيدات إليها والتخلص منها. وقد تضاف مركبات مثل Vidarabine; Virazole (Ribavirine) إلى البيئة الغذائية للمسـاعدة على تثبيط نمـو هذه الكائنات المرضة، ويؤخذ عليهـا ارتفاع ثمنها. وإضافة مركب Virazole (Ribavirine) لبيئـة نباتات الليلى Lily والتفاح يؤدى إلى إنتاج نباتات خالية من الفيروسات. ويثبط مركب Vidarabine عملية التمثيل الضوئى Antimetabolites فى النبـات. كما أن إضافة المضادات الحيوية والمبيـدات البكتيرية مثل: Rifampicin, Penicilin- G, Oxytetracycline, Tetracycline, Streptomycin, Achromycin, Chloromycine, 8- Hydroxy quinoline, Gentamycin. للبيئـة غـير مرغوب فيه لعدم تأثيرها على الفيروسـات، وأن لها تأثيرا مثبطا فقط على البكتريا والفطريات العالقة على الأسطح الخارجية للجزء النباتى، وليس لها تأثير على الإصابة المنتشرة داخـل الخلايا أو بينها. وإضافـة المبيدات البكتيرية إلى المـزارع المعملية بالتركيز

المناسب لقتل البكتريا قد يكون له تأثير سام للنباتات النامية، خصوصا المركبات التى لها تأثير ضار على الريبوسومات أو تكوين مركبات سامة ناتجة من تفاعلها مع مكونات البيئة الغذائية. ويؤدى التركيز العالى من المضادات الحيوية إلى تثبيط النمو واستحداث سلالات ميكروبية مقاومة لها.

طرق إنتاج نباتات خالية من الفيروس

ينتج الآن على الأقل ٦٥ نوعا نباتيا خاليا من الفيروس بزراعة القمم المرستيمية، بجانب كثير من الأصول المرجعية (نباتات أم) كمصدر خالٍ من الأمراض لكثير من المحاصيل الحقلية والبستانية. ويمكن اتباع إحدى الطرق الآتية لإنتاج نباتات خالية من الفيروس:

١- زراعة مرستيم Meristem culture مفصول من عقل طرفية لنبات الأم.
٢- زراعة مرستيم مفصول من نبتة معملية.
٣- زراعة كالس أو بروتوبلاست.
٤- تطعيم المرستيم على أصول جذرية Rootstocks خالية من الفيروس.

١- زراعة مرستيم طرفى من نبات الأم

تفصل عقل طرفية من نباتات الأم. ثم تنظف جيدا بالماء ثم تشطف بالماء المقطر المعقم. مع الحرص على تغلغل الماء بين الأوراق. ثم تزال جميع الأوراق من العقل الطرفية بقدر الإمكان. ثم تغمس لمدة قصيرة فى كحول ٧٠٪ للتخلص من الهواء المتبقى بين قواعد الأوراق والأجزاء الأخرى.

تعقم العقل الطرفية سطحيا بغمسها فى محلول ١,٥٪ هيبوكلوريت صوديوم مضافا إليه ٠,٠٥٪ مادة ناشرة مثل Tween-20 أو Teepol أو Trigetol ثم تشطف جيدا فى ماء مقطر معقم. ثم يزال ما تبقى من أوراق صغيرة حول القمة المرستيمية للعقل الطرفية، ويتم ذلك تحت ميكروسكوب ضوئى .(X 40–20)

تعقم العقل الطرفية مرة ثانية فى محلول مخفف من هيبوكلوريت صوديوم، ثم تشطف فى ماء مقطر معقم. ويفضل الشطف فى كحول ٧٠٪ ولا يفضل الشطف بالماء، لأن وجود قطرات ماء لاصقة قد تسبب بعض المشاكل أثناء فصل النسيج المرستيمى تحت الميكروسكوب.

تعاد العقل الطرفية مرة ثانية وتثبت تحت الميكروسكوب لإزالة الوريقات المتبقية حول المرستيم واحدة بعد الأخرى. ويستخدم سلاح شفرة حاد ومعقم. ويكرر التعقيم أثناء هذه الخطوة. وتتم تلك الخطوة والخطوات التالية داخل كابينة معقمة.

يفصل الطرف المرستيمى من القمة النامية بسلاح شفرة معقم عندما تصبح خالية من الأوراق إلا من ١ – ٢ من منشئات الأوراق المحيطة بها. ويستخدم ميكروسكوب ومصدر ضوئى (فلوروسنت) أثناء فصل المرستيم. ويكون شكل القمة المرستيمية على هيئة مكعب تقريبا، وقد يصل قطره ٠,٢ ملليمتر وطوله ٠,٣– ٠,٥ ملليمتر تقريبا. ثم يزرع المرستيم بعد فصله مباشرة فى بيئة غذائية حتى لا يتعرض للجفاف.

ولتقييم كفاءة تعقيم الأجزاء النباتية، يضاف للبيئة ٢ – ٣٪ تريبتون أو بيبتون، ثم تزرع فيها أجزاء نباتية معقمة بعد شقها طوليا بحيث يكون السطح المجروح ملامسا للبيئة. فإذا ظهر بعد أيام قليلة من التحضين نموات لكائنات دقيقة فى البيئة الغذائية يدل ذلك على رداءة التعقيم. ونتائج هذه الطريقة غير مشجعة عادة حيث لا توجد بيئة غذائية محددة يمكن استخدامها كدليل جيد لكل أنواع البكتيريا التى تنمو داخل الأنسجة.

عوامل انجاح المرستيم فى الزراعة المعملية

يجب أن يكون محاطا بواحدة أو اثنتين من الوريقات الأولية (منشئات الأوراق) للمحافظة على رطوبته وحيويته. مع العلم بأن زيادة حجم المرستيم

وزيـادة عدد الوريقات حوله يقلل كثـيرا من فرصة الحصول على نباتات خالية من الفيروس.

٢- تعتمد نسبة نجاح النباتات الخالية من الفيروس على الموسم الزراعى، حيث وجد أن تكوين الجذور على النموات الناتجة من المرسـتيم المنزرع معمليا كان أفضل إذا فصل فى الربيع. وكان ذلك مؤكدا بالنسبة للبطاطس والقرنفل.

البيئة المناسبة لزراعة المرستيم

يختلف كثـيرا المحتوى الكيميائى للبيئة المناسـبة لزراعة المرسـتيم باختلاف مرحلـة نموه، إن كانت لإنتـاج نبتات أو جذور وباختلاف النوع والصنف النباتى. لذلك يفضل الاستفادة من خبرة السابقين فى اختيار البيئة المناسبة أو يقوم الباحث بنفسه بتحديد البيئة المناسبة.

يزرع المرسـتيم عادة فى بيئة صلبة وأحيانا فى بيئة سـائلة مع استخدام كبار ورقية لتثبيته. وتضبط الحموضة عند pH 5.4 - 6، ويضاف إليها السكروز بنسبة ٢- ٥٪ (وزن/ حجم) وبعض الفيتامينات مثل Vitamin-B1; Pyridoxin; Panthothenic; Nicotinic acid. وتضاف الأكسـينات والسـيتوكاينينات بتركيزات ٠,١- ٠,٥ ملليجـرام/ لتر لأهميتها فى تنشـيط انقسـام الخلايا. ويضاف الجبرلين GA_3 أحيانا لتشـجيع استطالة الجذر. ويضاف السـيتوكاينينات أحيانا فى مرحلة متأخرة وليس بعد فصل المرسـتيم مباشـرة لبعض النباتات مثل البلارجونيم Pelargonium لتلافى ظهور اللون البنى الذى تسـببه السيتوكاينينات (Morel, 1964; Debergh and Maene, 1977).

الظروف البيئية المحيطة

تحضن المرسـتيمات بعـد زراعتها عند ٢١-٢٥°م و١٤- ١٦ سـاعة يوميا ضوء فلوروسنت شدته ٨- ١٢ وات/ م٢. وتحتاج معظم نباتات الأبصال إلى حرارة أقل. وقد تسـتخدم لمبات أقل قوة فى الأيام الأولى من زراعة المرسـتيم (Debergh and Maene, 1977; Styer and Chin, 1983).

خطوات إنتاج نباتات خالية من الفيروس

c.f. Pierik,R.L.M. 1987

٢- زراعة مرستيم مفصول من نبات معملى

يستخدم المرستيم الطرفى المفصول من نباتات أو أبصال معملية أو أجنة ناتجة من نسيج النيوسيلة أو مرستيمات لبراعم زهرية لنبات القنبيط الناتج فى المعمل

لإنتـاج نباتات خالية من الفيروس، وقد ثبت نجاح هذه الطريقة فى الحصول على نباتـات تبغ وعنب وليلى وجلاديولس ومـوالح خالية من فيروس Tobacco mosaic virus (TMV) (Mori, et al, 1982).

٣ – زراعة كالس أو بروتوبلاست

يستطيع الكالس الهروب من الإصابة الفيروسية لسرعة انقسامه وعدم احتوائه على قـدر كافٍ من المواد الغذائية اللآزمة لنمـو وتكاثر الفيروس. وتكرار الزراعة الثانوية لكالس نبات التبغ والبطاطس يؤدى إلى إنتاج كالس خالٍ من فيروس البطاطس Potato X-virus. وأمكـن الحصـول على كالس ونبيتات خالية من الفيروس من زراعة متـوك نبات Pelargonium. وتم عزل بروتوبلاسـت من مناطق داكنة الاخضرار من أوراق نبات تبغ كانت مصابة بفيروس (TMV). ونتج عن هذا البروتوبلاست نباتات خاليـة مـن الفـيروس (Mori, et al., 1982). وفى الواقع أن إنتـاج نباتات خالية من الفيروس من الكالس والبروتوبلاسـت لها أهميـة عملية لمربى النباتات لحدوث تغييرات وراثية ونسبة إطفار عالية.

٤- تطعيم المرستيم على أصول جذرية خالية من الفيروس

يسـاعد التطعيم Micro-grafting على إنتـاج نباتات معملية خالية من الفيروس خصوصا للأنواع الخشبية التى يصعب عليها تكوين الجذور فى المعمل. ويتم التطعيم بنبتات معملية خالية من الفيروس على شـتلات أصول جذرية عمر ٢٠– ٤٠ يوما تعرضـت للحـرارة ٣٧– ٣٨°م. ويفضل ألا يزيد عمر شـتلات الأصول الجذرية عن بضعة أشـهر. ويمكن إكثار هذه النباتات مستقبلا بفصل براعم من النموات الجديدة ثم تطعم على شـتلات أصول جذرية خالية من الفيروس (Fridlund, 1980). وبهذه الطريقة تم الحصول على كرمات عنب خالية من الفيروس بعد تطعيمها على أصول جذرية عرضت لحرارة ٣٥°م لمدة ٢١ يوما، وتم بالتطعيم أيضا الحصول على نباتات

داليـا Dahlias خالية مـن الفيروس وذلك بتطعيم نبتات داليـا معملية بدون جذور وخالية من الفيروس على شـتلات داليا كاملة النمو وخالية أيضا من الفيروس. وإذا كانت نبتات الداليا المعملية متقدمة فى العمر ولم تتكون عليها جذور، فيمكن فصل عقل منها ثم تطعم على شـتلات خالية من الفيروس. فإذا تكشف منها غصن واحد خالٍ من الفيروس فيمكن تنشيط نمو البراعم الجانبية عليه والحصول منه على أفرع جديدة خالية من الفيروس. وبتكرار الزراعة المعملية للأفرع الجديدة يمكن الحصول علـى أعداد كثيرة منها يمكن اسـتخدامها فى تطعيمات جديدة. وتنخفض نسـبة نجاح المرسـتيمات المطعمة على نباتات خالية من الفـيروس إذا أصيبت بالفيروس أو تعرضت للجفاف أو كانت البيئة الغذائية غير مناسـبة أو كانت ساكنة (Morel, 1964). وبهـذه الطريقة تم إنتاج نباتات موالح ومشـمش وعنب وخوخ وتفاح وكافور وكاميليا خالية من الفيروس.

الكشف عن الفيروس Virus identification

١- استخدام نباتات اختبارية كاشفة Test plants

تستخدم نباتات كاشفة يظهر عليها بسهولة مظاهر الإصابة بالفيروس مثل *Chenopodium quinoa; Comphrena globosa; Chenopodium amaranticolor* وبعض أنـواع التبغ Tobacco. حيث تجمـع عصارة من النبات المراد اختباره، وتلوث بها ورقة على نبات كاشف بعد معاملتها بمسحوق Corborundum لإحداث جروح بها. ويحتاج هذا الاختبار فترة طويلة حتى تظهر أعراض الإصابة.

٢- استخدام الميكروسكوب الإلكترونى Electron microscope

يستلزم لهذه الطريقة توفير جهاز ميكروسكوب إلكترونى ومهارة من العاملين على استعمال الجهاز للكشف عن الفيروسات. ولهذا الجهاز كفاءة عالية فى التعرف إلى الإصابة الفيروسية حتى ولو كانت العينة النباتية منخفضة الإصابة بالفيروس.

٣- استخدام جهاز Immuno Capture Polymerase Chain Reduction (IC-PCR)

تعتبر من أكثر الطرق حساسية للكشف عن الكثافة العالية والمنخفضة للفيروس بالمقارنة بغيرها من الطرق الأخرى المستعملة مثل:

1.PCR = Polymerase Chain Reaction

2. DAS-ELISA= Double Antibody Sandwich- Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay.

3. IC-PCR = Immuno Capture – Polymerase Chain Reaction.

الكشف عن فيروس تورد القمة فى الموز

فيروس تورد القمة Banana Bunchy Top nanavirus (BBTV) من أخطر الأمراض التى تصيب الموز فى العالم. وينتشر فى لحاء النبات بتركيز منخفض، وحشرة المن *Pen-talonia nigronervosa* من أهم الحشرات الناقلة للفيروس. وللكشف عن الفيروس تؤخذ عينة وزنها ٠,١ جرام من العرق الوسط للورقة ثم تحفظ فى واحد ملليلتر منظم فوسفات ملحى Phosphate-buffer saline (PBS) يحتوى على ٠,٥ مولر فوسفات رقم حموضته ٧,٤ ومضاف إليه ٠,١٤ مولر كلوريد صوديوم. وثبت أن جهاز IC-PCR من أكثر الأجهزة حساسية للكشف عن الفيروس فى تركيزاته المرتفعة والمنخفضة فى عصارة العرق الوسط لنبات الموز بالمقارنة بغيره من الأجهزة مثل DAS-ELISA وPCR (Sadik, 1994).

(ب) إنتاج نباتات خالية من الفطريات

تنتشر جراثيم الفطر فى الهواء والتربة. وبسقوط جرثومة على بيئة مناسبة تمتص منها الماء وتنبت منها أنبوبة جرثومية. وتعتمد الجرثومة فى هذه المرحلة على ما يحتويه جسمها من مواد غذائية حتى تتمكن من العائل. وتعمل ممصاتها Ap-pressorium على تثبيت الميسليوم أثناء نموه وانتشاره. وقد يخترق الميسليوم بشرة النبات مباشرة عن طريق الضغط الميكانيكى أو بإفراز الإنزيمات المحللة للجدار

الخلوى. وتستمر الأنبوبة الجرثومية فى نموها حتى تخترق فتحة ثغر ثم تنتشر بين خلاياه وترسل ممصاتها داخلها لتتناول غذاءها.

وتستخدم زراعة المرستيم بنجاح فى إنتاج نباتات خالية من بعض أنواع البكتيريا مثل *Xanthomonas; Bacillus; Pseudomonas; Erwinia.* وبعض أنواع الفطريات مثل Phialophora; Rhizoctonia; Verticillium; Fusarium. وإنتاج نباتات قرنفل خالية من فطر *Fusarium roseum f. cerialis* وفطريات *Fusarium oxysporum f.* dianthi; *Phialophora cinerescens* وبكتريا *Pseudomonas carophylli; Pecto-bacterium parthenii*. وبزراعة المرستيم يمكن إنتاج نباتات جلاديولس خالية من فطر *Fusarium oxysporum* f. gladioli وهو مرض خطير يصيب الجلاديولس، وإنتاج نباتات *Pelargonium* خالية من بكتريا *Xanthomonas pelagonii*، ونباتات بيجونيا *Begonia elatior* خالية من بكتريا *Xanthomonas begoniae*. ونباتات فراولة خالية من فطر *Phytophthora fragariae*.

درجات مقاومة النباتات للأمراض

١- نباتات منيعة Immune plants

نباتات لا تظهر عليها أعراض الإصابة بالمرض بالرغم من توفر الظروف الملائمة لنموه وانتشاره. ولا توجد نباتات منيعة ضد جميع الأمراض، بل قد يكون منيعا ضد مرض معين دون غيره.

٢- نباتات مقاومة Resistant plants

نباتات تظهر عليها أعراض الإصابة بدرجة محدودة ولا تؤثر على نموها وإنتاجيتها. وقد يرجع ذلك إلى:

- صغر حجم الثغور، وقدرة النبات على قفل الثغور بسرعة عند حدوث الإصابة، أو قدرة النبات على شغل غرفة الثغر بخلايا برانشيمية، أو سرعة التئام الجروح.

– وجود شعيرات أو طبقة سميكة من الكيوتين على أسطح النبات تعوق الأنبوبة الجرثومية من اختراق الأنسجة.

– وجود مواد كيميائية سامة تؤثر على نمو الميكروب وتوقف نموه.

– ارتفاع الضغط الأسموزى لبروتوبلاست النبات عن بروتوبلاست الميكروب فلا يستطيع الحصول على غذائه من خلايا النبات.

– عدم وجود مواد غذائية يحتاجها الميكروب مثل بعض الفيتامينات أو الأملاح فيتوقف نموه.

– عدم ملاءمة درجة حموضة البروتوبلاست لنمو الفطر.

٣– نباتات قابلة للإصابة (حساسة) Susceptible plants

نباتات تظهر عليها الإصابة بشدة وتؤثر على نموها وإنتاجيتها.

٤– نباتات شديدة القابلية للإصابة Very susceptible plants

نباتات تموت خلاياها بمجرد وصول ممصات الفطر إليها.

□□□