

الباب الحادى عشر

**إنتاج نباتات خالية من الفيروس  
باستخدام زراعة الأنسجة**

**Production Of Virus Free  
Plants Using Tissue Culture**



## إنتاج نباتات خالية من الفيروس

### بأستخدام زراعة الأنسجة

## Production Of Virus Free Plants Using Tissue Culture

إن التزايد العددي للفيروس عادة ما يكون مصاحبا لعمليات تمثيلية عادية فى النبات، دون أن يتدخل فى هذه العمليات. ومن المعروف أن هناك بعض المشبطات الفيروسية التى يكون تأثيرها ساما أيضا على بعض النباتات، وبالإضافة إلى ذلك فإنه لا يمكنها القضاء على الفيروس فى كل خلايا النبات؛ حيث يعود الفيروس الى التضاعف مرة أخرى، بعد انتهاء المعاملة، ويعود بذلك الى تركيزه الأسمى.

كما أن قتل الناقلات الحشرية والنيماتودية قد لا يمنع أنتشار الفيروسات النباتية، كما أن بعض الفيروسات تنتشر ميكانيكيا والبعض الآخر يكون محمولا على الإبر الفكية للحشرات؛ مما يعنى أنها تنتقل مباشرة بعد أن تدفع الحشرة بخرطومها إلى أنسجة النبات، ومثل هذه الفيروسات لا يمكن مقاومتها باستعمال المبيدات الحشرية.

ومن حسن الحظ أن أغلب الفيروسات المعروفة لا تنتقل عن طريق البذور أى إن بذور النباتات المصابة تنتج فى أغلب الاحوال نباتات سليمة، ومع ذلك فإن مثل هذه النباتات لا يعتمد عليها كلية، لأنها إذا ما أصيبت، فإن العدوى تنتقل من جيل إلى جيل عن طريق التكاثر الخضرى؛ مما يجعل المحصول بعد عدة سنوات مصاباً بنسبة كبيرة قد تقرب من ١٠٠٪، خصوصا إذا ما كانت الفيروسات متخفية أى لا تظهر لها أعراض مرئية.

وفى بعض الحالات يمكن العثور على نبات أو أكثر خالٍ من الفيروس، وإذا كان المحصول مصابا بفيروسات مختلفة فإنه يجب اللجوء إلى عمليات الاختبار الروتينية مثل التشخيص السيرولوجى والبيولوجى باستعمال نباتات الاختبار، وكذا الميكروسكوب الإلكتروني أما

بالنسبة لتلك المحاصيل التي تكون مصابة تماما بالفيروسات، فإن هناك طرقاً يمكن استخدامها لتخليص مثل هذه المحاصيل من الإصابة بفيروسات معروفة، ومن هذه الطرق المعاملة الحرارية أو زراعة الأنسجة الميرستيمية أو كليهما معا.

### زراعة المرستيميات القمية Meristem - Tip Culture

لقد لاحظ Kotte & Robbins, 1922 نمو قمة الجذور على محاليل معدنية مزودة بالسكريات والأسبارجن والبيبتون. واستطاع White, 1943 زراعة جذور طماطم مصابة بفيروس TMV فى المعمل. وبتقطيع هذه الجذور واختبار المناطق المختلفة بالحقن على عائل يعطى أعراضاً موضعية للفيروس. تأكد أن تركيز الفيروس فى المناطق الامامية اقل بالمقارنة بالاجزاء القاعدية، أما قمة الجذر فلم يوجد دليل على احتوائها على الفيروس. أيضا لاحظ Limasset & Cornuet, 1949 أن النباتات المصابة جهازياً ينخفض تركيز الفيروس بالقرب من نقطة النمو (apical meristem). وفى نقطة النمو نفسها لم يوجد الفيروس فى نصف الحالات. وهذا أدى إلى أن Morel & Martin, 1952 افترضوا أنه يمكن عزل المرستيم الطرفى (apical meristem) فى النباتات المصابة جهازياً فى المعمل، وذلك للحصول على نباتات، خالية من الفيروس. ويتوقف نجاح العلاج على الفيروس المرغوب استئصاله، وكذا على خصائص النبات.

فمن المعروف أن العلاج الحرارى يكون مفيداً فى حالة الفيروسات الخيطية، وكذلك بالنسبة للأمراض المتسببة عن ميكوبلازما.. وهناك أربع مراحل للعملية العلاجية:

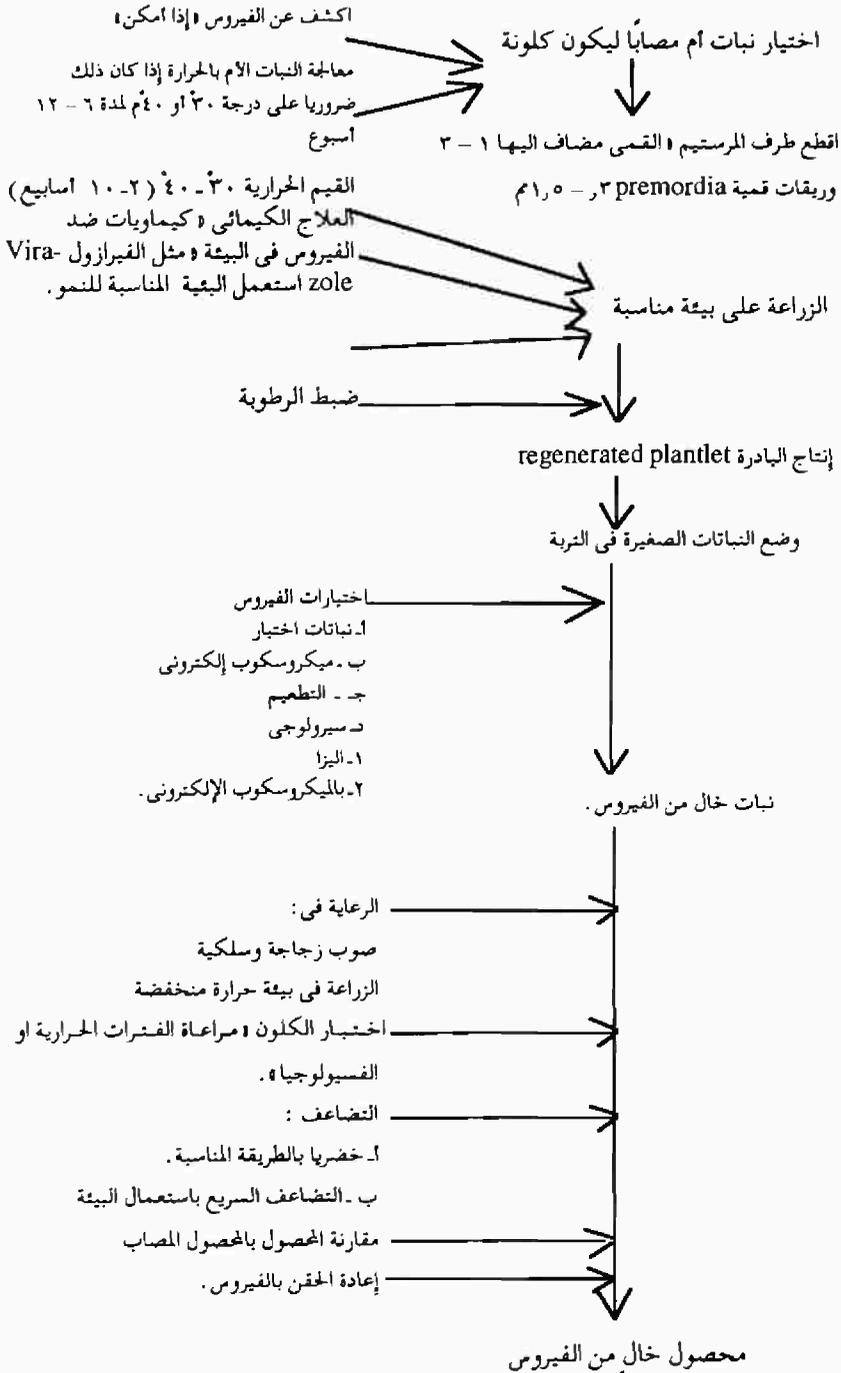
١ - تعريف الفيروس وتشخيصه.

٢ - العلاج.

٣ - اختبار النباتات المعاملة.

٤ - الإكثار مع استمرار الفحص مع العمل على عدم حدوث الإصابة ثانية، وسبق أن تحدثنا عن العلاج الحرارى.

وعند استعمال اصطلاح Virus free فإنه سرف يقصد بذلك أن النبات خالٍ من الفيروسات التى تم اختباره بالنسبة لها، ومع ذلك فقد يحتوى النبات على فيروسات أخرى غير معروفة أو لم يتم اختباره بالنسبة لها. وفى الحقيقة أن كثيراً ما تكتشف الفيروسات غير المعروفة فى نباتات، تم تخليصها من الفيروسات المعروفة، ولذلك فإنه يفضل القول بأن النبات virus tested عن استعمال اصطلاح Virus free، ويجب ان يكون معروفاً أن مثل النباتات لا تكون منيعة، ولكنها قد تصاب مرة أخرى.



( شكل : ١١ - ١ ) - تخطيط يوضح إنتاج نباتات خالية من الفيروس بزراعة قمة المرستيم في البيئة -

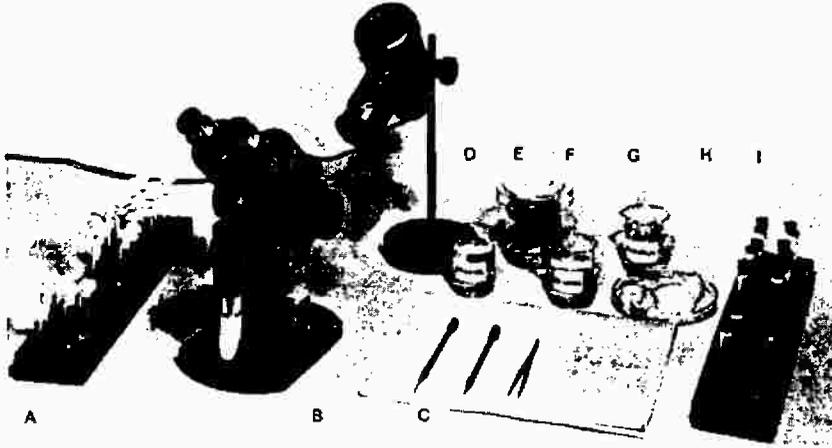
## فيروسات النبات

وقد نجح العلماء فى تدعيم هذه الطريقة عندما أدخلوا نبات الداليا من الفيروسات حيث وضعت بعض المرستيمات المفصولة على بيئات مغذية مختلفة، فأعطت نباتات بطول ١-٢ سم دون جذور، وبتطعيمها على بادرات صغيرة خالية من الفيروس حصلنا على نباتات سليمة. ومنذ ذلك العمل استعمل هذا التكنيك بواسطة علماء كثيرين لشفاء الأصناف المهمة المصابة فى عدد كبير من المحاصيل.

يحاط المرستيم بخلايا نشطة الانقسام أبعادها (٠,١ سم) قطراً، و (٠,٢٥ م) طولاً. وكقاعدة يقطع المرستيم فى كل من الفرع الرئيسى أو البراعم الإبطية، وتأخذ الاسم نفسه. تكون فرصة النمو غالباً أقل عندما تقطع من المرستيم واحد أو اثنين من منشأ الورقة (Leaf primordia)، أما القمم التى تكون حوالى (١ م) تأخذ فرصة أحسن فى النمو، ولكنها تكون أقل فى فرصة إخلائها من الفيروس.

### التكنيك والبيئة Technique and Medium :

المرستيمات سواء طرفية أو جانبية تكون محمية بواسطة الأوراق النامية أو طبقات «حراشيف» تمتد لتحميها. للتعقيم السطحى للفروع تغمر عدة ثوانٍ فى كحول ٩٦٪، ثم تغمر فى محلول من ٥٠ جم / لتر هيبوكلوريد الكالسيوم التجارى لمدة ١٠ - ٢٠ دقيقة، ثم تغسل عدة مرات فى ماء معقم. إذا لم تتوفر غرفة معقمة يجرى تقطيع المرستيمات فى معمل خالٍ من الاتربة، ومن المرغوب جدا رش المكان بالكحول قبل الاستعمال. ويحتاج بينوكلار تكبير (٢٠ - ٤٤٠x)، ويعقم بعد كل عزل بواسطة قماش مبلل بالكحول. بجانب بينوكلار يوضع ٦ - ١٠ قطع ورق ترشيح معقم، و٢ بيكر سعة ١٠٠ مل يملأ أحدها بالكحول والآخر بالماء المعقم (شكل ١١ - ٢). لمنع أى تلوث ميكروبى أو فيروسى، يكون من المهم وضع الإبر وأدوات التقطيع فى الكحول. يمسك الفرع باليد تحت بينوكلار ثم تفصل الأوراق غير الناضجة ومنشئ الورقة Leaf primordia بواسطة الضغط الخفيف بالإبرة بواسطة اليد الأخرى، ثم تفصل قمة المرستيم فى بعض الأنواع مثل الكرايزانثم، يكون المرستيم مفلطحاً واحتواؤه على Primordia عند القطع غير متاح.



شكل (١١ - ٢): الأجهزة والأدوات التي تستعمل في قطع المرستيم لزراعتها على بيئة في الأنابيب «أ» ميكروسكوب «ب» ولبية «ج» ولبية «د» ورق ترشيح معقم، وعليه إبرة وسلاح مشرط وملقط «C» إيثنانول «D»، براعم معقمة «E»، ماء معقم «F»، برفاين ، معقم في إيثنانول «G»، قطعة قطن معقم في الإيثنانول «H»، أنابيب معقمة ومغطاة ببرافين معقم «I».

بعد ذلك توضع العينة في بيئة مغذية في أنبوبة الزراعة بواسطة قضيب النصل ببطء واحتراس. وفي البيئة السائلة تتركز المرستيمات على قنطرة من ورق الترشيح المغمور جزئياً في السائل.

تستعمل أشكال وأحجام من أنابيب الزراعة، خصوصاً الأنابيب الضيقة (قطر ١٠ مم) ويستعمل زجاج بيركس، وتغطي الأنابيب باغطية بلاستيك أو المونيوم.

كما يمكن استخدام سدادات من القطن، على أن تعقمها باللهب، ثم تغطي بالبرافين ويجب أن يكون إغلاق الأنابيب محكماً، وهذه الطريقة في غلق الأنابيب تمنع تلوثها لاثني عشر شهراً.

ويجب مراعاة ألا تحرق سدادات القطن عند تعقيمها باللهب، لأنها تكون ذات تأثير سام

في البداية وضعت البيئة المغذية بواسطة بيئة هوايت White, 1934، والتي يضاف إليها عناصر محدودة، وبعد ذلك أضيفت تحسينات عديدة للبيئات. وهناك بيئة جديدة وضعت بواسطة موراشينجى وسلوج Murashinge & Sloop, 1962 (جدول ١١ - ١)، وهي تتميز بتركيز عالٍ من أيونات البوتاسيوم والأمونيوم والـ myo - inositol، ووجد أن زيادة التركيزات مهمة في حالة زراعته قمة المرستيم في البطاطس، والتي تعطى نباتات أكثر اخضراراً وأقوى نمواً عن التي أضيفت إليها تركيزات قليلة من العناصر الكبرى. ويضاف الحديد في أشكال مختلفة، ويبدو أن iron - Chelate كان أحسنها. وكمصدر للكربون يضاف الجلوكوز، الفركتوز أو السكروز والأخير أكثر استعمالاً. وبجانب خليط من الفيتامينات، درس تأثير أنواع من مشجعات النمو. رغم أنه من المعروف أن الأوكسين Naphthalene Acetic acid (NAA) والأوكسين 3-indole acetic acid «IAA» تنبه تكوين الجذور، ولكن استمرار استعمالها قد يثبط نمو الجذور. وعملية نقل المرستيم القمي إلى بيئة جديدة خالية من مواد النمو تكون ضرورية. وعلى العكس 1966 حفظ Nishizawa & Nishi نبات الزنبق Lily لمدة ٢٤ ساعة.

جدول ١١ - ١: تركيب البيئات التي استخدمها مولر  
 (١٩٦٤) في زراعة القمم المرستيمية

<b>1 - Major salts</b>	<b>١ - أملاح رئيسية</b>	mg l
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	كربونات كالسيوم	500
KNO <sub>3</sub>	نترات بوتاسيوم	125
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	كبريتات مغنسيوم	125
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	فوسفات بوتاسيوم	125
KCl	كلوريد البوتاسيوم	1000
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	كلوريد الامونيوم	1000
Minor elemnts	عناصر صفري:	
FeCl <sub>3</sub> . 6H <sub>2</sub> O	كلوريد الحديدك	1
ZnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	كبريتات الزنك	1
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	حمض البوريك	1
MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	كبريتات المنجنيز	0.1
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	كبريتات النحاس	0.03
AlCl <sub>3</sub>	كلوريد الالومنيوم	0.03
NiCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	كلوريد النيكل	0.03
KI	يوريد البوتاسيوم	0.01
Organic constituents	مكونات عضوية (١)	
Gibbrllic acid	حمض الجبريليك	0.1 mg/l
Sucrose	سكر	20 g/l
Difco agar	آجار	6 g/l
<b>2 - Organic constituents II (alternative)</b>	<b>٢ - مكونات عضوية</b>	
Mg	مغنسيوم	100
Difo agar	آجار	1
Myo - inositol	انيسيتول	1
Ca- pantothenate	بانسوثينات الكالسيوم	1
Nicotinic acid	حمض النيكوتين	1
Pyridoxine HCl	بيريدوكسين	1
Thiamine HCL	ثيامين	0.1
X- Napthalene acetic acid	نفتالين حمض الخليك	0.01
Gibberellic acid	حمض الجبريليك	20 g/l
Biotin Sucrose	بيوتين - سكر	6 g/l

## فيروسات النباتات

وقد استخدم محلول 20/g/I من NAA & قبل قطع المرستيم القمى، وهكذا استفاد بتأثير الأوكسين دون التعرض لسميته.

أما تأثير حمض الجبريليك Gibberellic acid فقد وجد أن له تأثيراً خاصاً؛ حيث يمنع الانقسام غير المنتظم unorganized الذى يؤدى لتكوين الكالوس، ويشجع المرستيم على النمو السريع. وعلى العكس مثل حالة القرنفل تحت هذه الظروف تفشل الجذور فى النمو- أيضاً إذا تواجد NAA يكون من الضرورى النقل الى بيئة مشابهة خالية من حمض الجبريليك وأما السيتوكينين «Cytokinin» قد يحتاج إليه لتشجيع المرستيم الساكن على النمو، وقد يضاف أيضاً المواد heat labile بعد تعقيمها بالترشيح الدقيق.

بمجرد نمو المرستيم وإخراج جذور تنقل إلى أصص صغيرة، تحتوى خليطاً من السماد البلدى وللحفاظ على رطوبة النباتات تغطى بأوعية زجاجية. وإذا لم تتمكن من إنتاج جذور تطعم على بادرات سليمة (Wuth & Dode, 1970).

وقد تمكن Buys, 1969 من فصل نباتات القرنفل دون جذور ونقلها للتربة، ويعتقد أن الجذور النامية والخارجية من المرستيم القمى فى أنبوبة المزرعة يكون استعمالها قليلاً فى التربة.

وعندما يصل النبات للحجم المناسب يختبر لوجود الفيروس بالسيرولوجى أو الميكروسكوب الإلكتروني أو بالحقن على العوائل المشخصة. وحتى يأخذ التركيز القليل جدا من الفيروس المحتمل تواجده فى النبات الناتج الفرصة للظهور وزيادة التركيز، تصبح عملية إعادة الاختبار ضرورية.

العوامل التى تتحكم فى استئصال الفيروس:

### Factors controlling Virus eradication

#### ١- حجم المرستيم القمى : Meristem - tip size

عند استخدام تكنيك زراعة المرستيم القمى لإنتاج نباتات خالية من الفيروس لأول مرة، اعتقد الكثير من المشتغلين أن النباتات المنتجة تكون سليمة؛ لأن الفيروس لم يغزو الخلايا

المرستيمية في البرعم. وفيما بعد وجد في حالات عديدة أن هذا الاعتقاد غير صحيح، والرأى الحالى يقول بأن الفيروسات قد تغزو الخلايا المرستيمية بدرجات مختلفة تعتمد على نوع الفيروس ونوع العائل (Mori, 1977). فمثلا فيروس PVX & TMV قد سجل غزوهما للمرستيم القمى بدرجة كبيرة عن فيروس PVY & CMV.

إن نجاح إنتاج نباتات خالية من الفيروس بواسطة زراعة المرستيم القمى يعتمد على الحجم الأولى للقمة المستعملة في الزراعة. وكما ذكر بواسطة Stone, 1968 في القرنفل المصاب بفيروسات Iatet, Vein mottle, carnation mottle. يختلف حجم القمة من (٠١ - ٢ مم) في القطر، وهذه القمة تتكون غالباً من قبة مرستيمية (meristemetic dome) واثنين أو أكثر من Leaf primordia. عموماً يتناسب عدد النباتات الخالية من الفيروس الناتجة تناسباً عكسياً مع حجم القمة. هكذا في بعض الحالات من الممكن قطع مرستيم قمى خالٍ من الفيروس من عضو نباتى مصاب، وإعادة إنباته ليعطى نباتاً سليماً. ولكن في حالات أخرى تستأصل الفيروسات من المرستيم القمى أثناء زراعة النسيج.

في نباتات عديدة يكون من المستحيل قطع القمة بحجم صغير لتجنب الفيروس أو القضاء عليه in Vivo فيما بعد. وفي هذه الحالات يجب أخذ قمة كبيرة للزراعة، وهذه بالتالى تحتوى تركيزاً عالياً من الفيروس، ورغم ذلك يظل الاحتمال قائماً في الحصول على نباتات خالية من الفيروس من هذه الانسجة المصابة بواسطة المعاملة الحرارية أو بالكيمياء.

لوحظ أيضاً أن إخراج الجذور قد يتأثر بحجم النسيج المزروع. فقد وجد Stone, 1963 أن قمة القرنفل الأصفر من (٠٢ مم) لا تعطى جذوراً، وبينما الأكبر من (٧٥٠ مم) تنتج نباتات محتوية على mottle virus. القمة التى يتراوح طولها بين (٠٢ - ٠٥ مم) لها فرصة أحسن في إنتاج نباتات خالية من الفيروس. وفي حالة Cassava القمم أكبر من (٠٢ مم) فقط تعطى نباتات كاملة، بينما تعطى القمم الأقل من (٠٢ مم) تعطى إما كالوس أو كالوس مع جذوره. في كل أصناف Cassava الهندى والنيجيرى، لا يعتبر وجود leaf primordia أساسياً لإنتاج نباتات. ولكن في rhubarb من المهم قطع القمم ذات ٢-٣ primordial Leaves والقمم الأصغر لا تنمو.

## ٢ - درجة pH البيئة:

درجة حموضة البيئة لها تأثير محدود على النمو، وعموماً تكون بين ٥,٥ - ٥,٨، ويجب الأخذ في الاعتبار انخفاض pH أثناء التعقيم بالاوتوكلاف. ذكر Stone, 1963 أن المرستيمات القمية للقرنفل تنمو أحسن على pH 5.5 (حوالي ٥٩٪) عن pH 6 (حوالي ٤٪) لاحظ Mellor & Stace Smith أن درجة pH في البيئة تنخفض خلال أسبوع من ٥,٤ الى ٥,٧. يثبط إخراج الجذور عند انخفاض pH البيئة.

## ٣ - الضوء والحرارة والموسم:

أنابيب الزراعة المحتوية على المرستيمات القمية توضع تحت ضوء فلورسنت، ولاغلب النباتات ١٦ ساعة ضوء يومياً وحرارة حول ٢٢م تكون كافية. المرستيمات القمية في البطاطس تنمو أحسن على ٢٥م، بينما الأبصال قد تحتاج حرارة ١٢ - ١٥م. وبخصوص النسبة البلازجونيوم، ذكر Pillai & Wildebrant, 68 أن فترة الإظلام ضرورية ربما لتقليل التأثير المثبط للمواد الفينولية.

أوضح عديد من الباحثين فترة تأثير الموسم على عملية زراعة المرستيم. ذكر Stone, 1963 أن بقاء مرستيم القرنفل يكون أحسن في بداية الربيع وبداية الخريف عن الشتاء والصيف. بينما ذكر Vanos, 1964 أن المرستيم القمي في القرنفل المعزول في الشتاء يخرج جذوراً بسهولة أكثر، ولكن المرستيمات المعزولة في الصيف تعطى نسبة عالية من النباتات الخالية من الفيروس.

وجد Moller & Stace - Smith - 1969 أن أصناف البطاطس التي تفصل قماتها في الربيع وأول الصيف تعطى جذوراً أكثر عن التي تؤخذ متأخراً عن ذلك. في الأبصال والكورمات، أحسن النتائج حصل عليها عندما تفصل في نهاية فترة الكمون.

## ٤ - المعاملة الكيماوية: Chemotherapy

اقترح «Quak, 1961» أن وجود الكيماويات المشجعة للنمو في بيئة الزراعة يسبب استئصال الفيروس أثناء زراعة الأنسجة. ولكن لا توجد تجارب تدعم هذا الرأي. أوضحت

التجارب التالية والتي فيها زرعت الأنسجة المرستيمية المصابة بفيروس CMV على بيئات تحتوى تركيزات مختلفة من Cytokinin & auxin، أن هذه المركبات فى بعض الأحيان تخفض تركيزات الفيروس ولكنها لا تستأصله. واقترحت الدراسات الأخيرة أن إضافة كيمواويات (anti - metabolite) مثل Virazol (Ribavirin) فى بيئة الزراعة تكون أكثر كفاءة. هذه الكيمواويات فى العادة مع المعاملة الحرارية تمنع تضاعف الفيروس فى الأنسجة المصابة؛ حيث يقف تخليق الفيروس، ويستمر تدهور الفيروس حتى يحدث الاستئصال. ذكر Shipard, 1977 أن Virazole استأصل PVX فى أنسجة الدخان المزروعة، وحديثاً وجد أن الفيروزول بتركيز (50 - 100 mg/l) استأصل فيروس موزايك الخيار من أنسجة *N. rustica*.

#### ٥ - المعاملة الحرارية: Thermotherapy

فى سنة ١٨٨٩ ذكر فى جاوا أن قصب السكر الذى يعانى من مرض Sereh المتسبب عن فيروس ينمو أحسن بعد حفظه على ٥٠-٥٢م° فى الماء لمدة ٣٠ دقيقة (Kobus, 1890). وكانت تستعمل أيضاً ضد فرض تقزيم الخلفة والخلل البكتيرى فى مناطق كثيرة من العالم؛ حيث كانت عدة آلاف من الأطنان من قطع قُطب السكر، تعامل كل سنة فى حمام مائى كبير قبل زراعتها.

وفى سنة ١٩٣٦ وجد Kunkel أن أشجار الخوخ يمكن معالجتها من الاصفرار بعد المعاملة بالماء الساخن للأشجار الساكنة على ٥٠م° لمدة ١٠ دقائق. وقد اكتشف أيضاً أن النتيجة تكون أفضل إذا نمت الأشجار لمدة ٣-٤ أسابيع فى الهواء الساخن ٣٥-٣٨م°. وفى الحقيقة المعاملة بالماء الساخن عموماً، تكون أقل ضرراً للنباتات أو الأجزاء الساكنة من النبات عن الهواء الساخن.

وكان Kassanis, 1950 أول من ذكر أن قدرة الفيروس على الإصابة والتضاعف فى النباتات على ٣٦م° لا ترتبط بدرجة الحرارة المثبطة له. فمثلاً فيروس Tomato bushy stunt له درجة حرارة مثبطة هى ٨٠م° ولكنه لا يستطيع إصابة النبات على ٣٦م°، ويستأصل من

النبات تماماً بحفظه على هذه الدرجة. قد يعزى استئصال الفيروس هكذا بالتعريض الطويل للنباتات المصابة لدرجة حرارة حول ٣٧م إلى النظام التمثيلي، الذي يغير التوازن بين تخليق الفيروس وانتهيار الفيروس في النبات، أو إلى فشل الفيروس في التضاعف على هذه الدرجة، وعموماً الفيروسات التي يمكن استئصالها بالحرارة هي الكروية. وهناك فيروسان غير كرويين معروفان، يمكن استئصالهما بالمعاملة الحرارية هما Plum pox virus & Apple chlorotic leaf spot.

ويلاحظ أنه ليست كل الفيروسات في النبات لها حساسية متشابهة للمعاملة الحرارية، ولاستئصال فيروسات عديدة قد تكون عدة أسابيع مدة كافية، بينما في فيروسات أخرى في النبات نفسه، وتحت الظروف نفسها قد تأخذ فترة أطول كثيراً، وربما طويلة جداً عن التي يتحملها النبات كما في التفاح والقرنفل. وأيضاً سلالات الفيروس الواحد قد تختلف في تحملها للمعاملة الحرارية.

في بعض الحالات يوضع النبات الكامل على حرارة بين ٣٥ - ٤٠م لفترة، تتراوح بين أيام قليلة إلى عدة أشهر. هذا يستعمل أساساً في الفراولة لأنها لا تنتج أشطاء. وفي rasp - berries حيث تموت القصبات في السنة الثانية بعد حمل الثمار، فهذا لا يمكن استعمالها في تطعيم القمم المعاملة.

تستأصل فيروسات كثيرة من قمة الفروع المأخوذة من النباتات النامية، وتحفظ على حرارة حوالي ٣٧م لفترات مختلفة. بعد المعاملة الكافية تزرع هذه القمم، أو تطعم على بادرات خالية من الفيروس. وهذه الطريقة تستعمل بنجاح لتنقية أصناف من محاصيل مستديمة من عدد من الفيروسات؛ خصوصاً النباتات التي يسهل زراعة قممها أو تطعيم قممها.

على العموم يمكن القول أن المعاملة الحرارية لا تثبط الفيروس، ولكن تمنعه من غزو الفروع النامية أثناء المعاملة. ذكر Welsh & Nyland, 95 أن عدة براعم إبطية ساكنة في عدد من الأصناف فقدت الفيروس الذي بها، ولذلك لا يستبعد حدوث تثبيط للفيروس.

#### زراعة المرستيم بعد المعاملة الحرارية: Meristem culture after heat treatment

رغم أن البيئة تكون مناسبة لنمو المرستيمات. فإن قليلاً منها ينمو والقليل منها يكون

خاليا من الفيروس. ولهذا فإن علماء كثيرين أجروا معاملة حرارية للمادة النباتية، ثم زراعة كمية من المرستيمات القمية منها.

ويفترض أنه خلال المعاملة الحرارية يشبط تضاعف الفيروس؛ حيث إن المعاملة الحرارية قد تعوق التمثيل الغذائي وتخفيض النمو في المرستيمات، فإنه يلزم تجارب لمعرفة إلى أى مدى يمكن حفظ المرستيمات على الحرارة العالية مع استمرار نموها، بالعمل على الكرايزانثم، صنف بلانش. وجد Hakkaart & Quak, 1964 أن المواد النباتية المعاملة بالحرارة لمدة ١٠، ٢٠، ٣٠ يوماً على الترتيب تنتج نسبة مثوية من النباتات الخالية من الفيروس تزيد من ٩ حتى ٩٠ تقريباً، فى حين أن المعاملة الحرارية لمدة ٤٠، ٥٠، ٦٠ يوماً لا تغير هذه النسبة المثوية، ولكنها تخفض بوضوح عدد المرستيمات النامية. يبدو أن التأثير يختلف حسب الصنف تحت الدراسة، فبالمقارنة وجد أن الصنف Migoli ينتج عدداً قليلاً من النباتات بعد ٢٠، ٣٠ يوماً من المعاملة الحرارية، والتي تكون خالية من فيروس بنسبة ١٠٠٪، ٧٠٪ على الترتيب، وكانت غير المعاملة ٩٪.

كان نمو القمم المفصولة بواسطة Vine, 1968 من نباتات الفراولة بعد وضعها أسبوع أو أكثر على ٣٥م، ونسبة عالية منها وصلت للنضج عن الأخرى غير المعاملة، والتي كانت أيضاً خالية من Crinkle and Vein chlorosis.

عادة تطبق المعاملة الحرارية على المادة النباتية الاصل قبل قطع المرستيم القمى. وضع Walke & Cooper, 1975 المرستيم القمى المصاب من *N. rustica*، والنامية فى بيئة ساكنة أو متحركة على ٣٢م، وبواسطة هذه الطريقة استأصل، CMV, alfalfa mosaic virus أو انخفض تركيزهما بشدة، بينما ظلت المزارع المتحركة نفسها على ٣٢م، وربما زاد تركيزه بعض الشيء عنه على ٢م.

يمكن القول أنه فى حالة الفيروسات الصعبة الاستئصال بواسطة زراعة المرستيم القمى، يؤخذ تطبيق المعاملة الحرارية قبل القطع فى الاعتبار. وهذه الطريقة المشتركة تكون مفضلة، عندما يكون النمو بطيئاً ونسبة النباتات الخالية من الفيروس صغيرة (مثل حالة

القرنفل). وفي هذه الحالات تكون المعاملة الحرارية المسبقة، وايضاً قطع القمم بطول « ٢-١ م » لها فرصة أحسن في النمو والبقاء، معطية نباتات خالية من الفيروس.

### تواجد الفيروس في الأنسجة المرستيمية : *Virus in meristematic tissue*

زراعة المرستيمات القمية تهتم الباحثين في امراض النبات؛ نظراً لأهميتها العملية والاقتصادية. في الخمسينيات أدى التأثير المثبط للفيروس لعديد من هرمونات النمو إلى الاعتقاد أن التركيزات العالية من الهرمونات في المرستيمات تثبط الفيروس، وهذه النظرية لم تثبت. ذكر بعض الباحث سنة ١٩٦٥ أن تركيز الفيروس ينخفض بواسطة النمو السريع للكالوس. وأظهرت اختبارات الحقن بمستخلص خلايا كالوس الدخان التعارض بين انقسام الخلية وتضاعف الفيروس. في الأنسجة النشطة الانقسام يغلب تخليق النيكلوبروتين الطبيعي وبعدها وأثناء استطالة الخلية يكون هناك تخليق للنيكلوبروتين الفيروسي.

ودعمت هذه النظرية بملاحظات Crowley & Mamson, 1960، حيث ربطا بين طول قمة الجذور الخالية من الفيروس في نباتات الطماطم المصابة بالفيروس بالحد الذي يحدث عنده الانقسام الميتوزي. تسبب مثبطات النمو في البيئة تقصيراً في منطقة الانقسام الميتوزي في قمة الجذر، وتحدد المنطقة الخالية من الفيروس بالحدود نفسها. ذكر Hollings & Stone, 1964 أن المرستيم القمي المفصول من نباتات القرنفل المصابة بفيروس Carnation mottle تحتوي هذا الفيروس في تركيزات، يمكن أن تعطى البقع المرضية في *C. amaranticolor*، في حين أن بعد ٣٠ ساعة على بيئة مغذية تصبح المرستيمات غير معدية، ولذلك يقترح أن التفاعل مع البيئة المغذية يمنع تواجد الفيروس في القمة. النتائج نفسها وجدت بواسطة Walkey et al, 1969 في المرستيم القمي في *N.rustica* المصاب بفيروسات Cherry leaf roll أو Arabis mosaic؛ حيث فصلوا المرستيمات دون leaf primordia، وطحنوا كل مرستيم في نقطة من فوسفوتنجستات الصوديوم، التي توضح رؤية جزيئات الفيروس الكروية. وبالميكروسكوب الإلكتروني شوهدت جسيمات فيروسية، مع أن هذه القمم المزروعة تعطى نباتات سليمة. وقد ثبت أيضاً وجود الفيروسات العسوية S, X, M في المرستيمات القمية المفصولة من البطاطس، والتي تعطى غالباً نباتات خالية

من هذه الفيروسات .

فى الوقت الحاضر لا يوجد تفسير علمى عن حقيقة أن بعض الفيروسات دون الأخرى يمكن استئصالها بزراعة المرستيمات القمية . الاختلاف فى إمكانية استئصال الفيروسات قد يكون بسبب الاختلاف فى التأثير التثبيطى للبيئة المغذية، بالإضافة إلى الاختلاف فى درجة توزيعها فى القمة

والاحتمال المقترح أن هناك تنافساً بين تخليق الفيروس، وبين تخليق النيكلوبيروتين اللازم لانقسام الخلية يبدو أنه غير صحيح . ولكن يمكن أن يعزى للتأثير المفيد للمعاملة الحرارية على استئصال الفيروسات من الأطراف، وتفسير هذه النظرية غير مفهوم تماماً ولكن هذا لا يقلل من الأهمية العملية لزراعة المرستيمات القمية .

### تأثير استئصال الفيروسات : Effect of limination of viruses

إن زراعة المرستيمات القمية استعمل بواسطة عديد من العلماء للحصول على أجزاء من النباتات التى تتكاثر خضرياً خالية من الفيروس . وهدف تطبيق هذا التكنيك مضاعف؛ فالنباتات الناتجة تمدنا بمادة نباتية، يمكن دراسة تأثير الفيروسات فيها، وايضاً تشكل قاعدة للإنتاج التجارى . ويجب أن نضع فى اعتبارنا أن استئصال الفيروس لا يعطى مناعة، ويجب توقع إعادة الإصابة «الانتكاس» . وايضا سرعة الانتكاس وطبيعة درجات المقاومة يجب أن تقدر بواسطة دراسة الوبائية للفيروسات تحت الدراسة .

مع أن عديداً من الفيروسات معروفة فى القرنفل، إلا أن Hakkart, 1964 وصف الاعراض والخسائر الحادثة بفيروسات Ring spot vein mottle & Carnation mottle فى القرنفل صنف وليام . ومع أنه لا تظهر أعراض واضحة عند الحقن الصناعى بفيروس mottle فإن نمو النباتات المصابة ينخفض بوضوح . وفيروسات Ring spot Vein mottle تعطى أعراضاً على الأوراق، وتخفض كلاً من نوعية وكمية المحصول . النباتات المصابة بالتبقع الحلقي تكون أكثر فقراً فى إنتاج الأزهار عن النباتات السليمة ويسبب فيروس Vein mottle انكسار لون الأزهار .

استأصل Stone 1973 فيروسات Narcissus degeneration, Arabis mosaic من نبات

**Narcissus tazette** صنف جراند سوليل بواسطة زراعة المرستيمات القمية. الأصيل الخالية من الفيروس تنمو أسرع وأكثر قوة عن الأصل. الأزهار أكبر وأغنى في اللون والسيقان أكثر في النباتات السليمة عن المصابة.

وجد Walkey & Cooper, 1972 أن الأصناف التجارية من الراوند في بريطانيا تصاب بشدة بالفيروسات. ولم يتمكننا من تقدير تأثير الإصابة الفيروسية على قوة ومحصول هذه الأصناف؛ حتى أصبحت الأجزاء الخالية من الفيروس متاحة نتيجة لزراعة المرستيمات القمية. حوالى ٦٠ - ٩٠٪ حيث لوحظت زيادة في محصول البتلات مقارنة بالنباتات المصابة بالفيروس.

من الممكن في الفراولة أن تظل المادة النباتية «التواة» في الأنابيب في المعمل، وهذا يعنى أنه للحصول على الأعداد اللازمة من النباتات يجرى إكثارها في المعمل، ويلاحظ أنه إذا اشتمل ذلك على طور الكالوس يجب عدم تجاهل حدوث الطفرات.

إن إنتاج بذور القنبيط يكون من أمهات مختارة بعناية، والتي تكون ناتجة من محصول متكاثر خضريا لعدة أعوام، تكون مصابة بشدة بالفيروسات، والذي قد يؤدي لحفض محصول البذور وموت النباتات؛ وباستعمال زراعة أنسجة القنبيط نجح Walkey سنة ١٩٧٤ في إنتاج نوية خالية من الفيروس.

تمكن Gippert & Schmelzor, 1973 من استئصال الفيروسات من عدد من أصناف البلارجونيم باستعمال زراعة المرستيمات القمية. وعلى الرغم من أن الفيروسات لا تسبب أعراضاً على البلارجونيم، إلا أنه لوحظ أن النباتات الناتجة من المرستيم القمي كانت أقوى من العادية، وتعطى ٢٠ - ٣٠٪ حشاش أكثر، بالإضافة الى تحسن فى القدرة على تكوين الجذور، وهكذا زاد الإنتاج حوالى ٣٥٪.

إن إخلاء الأصناف المهمة اقتصادياً فى المحاصيل التى تتكاثر خضريا من الفيروسات ليست كافية للوقاية من تأثير الفيروسات. فالأصناف تظل محتفظة بقابليتها للإصابة، ومن البداية يجب أن تهدف التدابير لمنع إعادة إصابتها. هذه التدابير تتحدد من ناحية وبائية الفيروسات، ومن ناحية أخرى بالمحصول الذى يكون نامياً إما فى الحقل أو فى الصوب، وقد

يحتاج أعواماً عديدة كفترة زراعة .

فى بعض الحالات كما فى أشجار الفاكهه إعادة الإصابة بالفيروسات غير محتملة إذا كانت الجذور والأغصان خالية من الفيروس . وأيضاً إذا لم تتواجد نواقل للفيروسات . وفى محاصيل مثل القرنفل والكريزانثم والفراولة والبطاطس تكون مهددة بإعادة الإصابة عن طريق الحشرات أو ميكانيكا، والتي يمكن خفضها بواسطة تدابير صحية عديدة، وفى أى حالة يجب اختبار النبات الأم « أو النواة »، جماعياً وفردياً لتواجد الفيروس . وهكذا يمكن اكتشاف إعادة الإصابة فى الحال .

ومن الواضح إن إعادة الإصابة لا تحدث فى النباتات الخالية من الفيروس، والتي نتجت من زراعة المرستيمات القمية، وظلت باقية فى الأنايب وبهذا اقترح Boxus, 1974 .

### التسجيل - حفظ الأصول والمحصول : Indexing, Stock maintenance and yield

بمجرد تدعيم النباتات المنتجة فى التربة، يكون من الضرورى التأكد من خلوها من الفيروس . وحيث تظهران بعض الفيروسات تظهر متأخرة، فإن اختبار الفيروس يجب أن يجرى مرات عديدة اثناء السنة الأولى بعد الزراعة، وذلك قبل أن يستخدم النبات كمصدر . بالإضافة إلى أن هذه الاختبارات يجب ان تجرى على أمهات النباتات الخالية من الفيروس الباقية كمصدر .

تعتمد طريقة اختبار الفيروس على الصنف النباتى والتسهيلات المتاحة . فى الماضى كان يستخدم التطعيم والفحص بالميكروسكوب الإلكتروني للورقة والعصير النباتى، والنقل بالعصير إلى العائل القابل للإصابة، والاختبارات السيرولوجية المختلفة . . . كوسائل للاختبار . وحديثاً حيث تستخدم ELIZA والفحص بالميكروسكوب الإلكتروني للسيرولوجى توفرت طرق عالية الحساسية .

فى الماضى كانت النباتات المنتجة وكذلك اختبارات الخلو من الفيروس، توضع عموماً فى تجهيزات مانعة للحشرات . وذكرت الدراسات الحديثة أن الامهات الخالية من الفيروس يمكن تخزينها لأوقات طويلة بواسطة وضع الأنسجة المزروعة والمعقمة على درجات حرارة منخفضة

(Mullin & Schlegel, 1976)، وهذا التكنيك يكون أقل تكلفة واستهلاكاً للوقت .

ظهرت دلائل كثيرة على أن النباتات الناتجة من قمة المرستيم عادة تظهر قليلاً أو لا تظهر اختلافات وراثية عن النباتات الأصل . ومن الضروري اكتشاف أى تغيرات طفيفة فى الصفات الزراعية للنباتات الناتجة، فمثلاً الملاحظات السابقة أكدت أن تغيرات فسيولوجية قليلة قد تحدث كنتيجة لغياب الفيروس؛ ففى التفاح حدثت تغيرات قليلة فى لون الثمرة ووقت التزهير والأثمار، وفى الراوند سجلت تغيرات كبيرة فى كمية الحرارة المنخفضة اللازمة لكسر السكون (Case, 1973)، وبالتالي يجب أن يوضع فى الاعتبار اختيار الأجزاء المناسبة من ناحية الصفات الزراعية .

بمجرد اختبار الأم المناسبة وتكاثر النبات للإنتاج التجارى، يكون من الضرورى إجراء الاختبارات الحقلية لقياس المحصول الخالى من الفيروس كمأً ونوعاً، بالإضافة إلى أنه من المهم إجراء هذه التجارب لقياس معدل انتكاس الإصابة بالفيروس فى المناطق المختلفة . يتاثر معدل الانتكاس بوبائية الفيروس، تحت الدراسة ودرجة عزل المحصول السليم . وعموماً يمكن القول أن الفيروسات المحمولة بالمن تكون أول ما ينتكس، خصوصاً إذا زرع المحصول السليم بجانب مصدر للفيروس .

إنتاج البطاطس الخالية من الفيروس بواسطة زراعة الأنسجة :

## Production of Virus - free Potatoes by tissue culture

### ١ - مقدمة : Introduction

#### أ - نبذة تاريخية : Historical

تعتبر البطاطس *Solanum tuberosum* واحدة من أهم محاصيل الغذاء العالمية خصوصاً فى المناطق الشمالية الباردة من العالم . سنة ١٩٣٣ سجل أكثر من ٦٠٠ صنف، وهى فى ازدياد عاماً بعد عام . وكثيراً ما تختفى أصناف عديدة تكون مرغوبة وذات إنتاج عالٍ لتدهورها تدريجياً فى القوة وكمية المحصول، قبل أن نكتشف أن هذا التدهور نتيجة الإصابة بفيروس أو أكثر . وعندما تسبب هذه اعراضاً مرئية يمكن أن نكتشفها،

ولكن الفيروسات الأخرى غير المظهرة للأعراض Symptomless تكون صعبة التشخيص والمقاومة. وبعد زيادة المعلومات عن فيروسات البطاطس تحسنت طرق الكشف عنها كثيراً، وأمکن معرفة أن كل الأصناف المهمة مصابة بواحد أو أكثر من الفيروسات المعتدلة أو الكامنة.

#### ب - خسائر المرض : Disease losses

بعد الحصول على البطاطس الخالية من الفيروس، أجريت التجارب لتقدير الفقد في المحصول الناتج عن الإصابة بكل فيروس على حدة. وكانت النتائج متغيرة، فكل صنف يختلف في حساسيته تجاه فيروس معين، وكذلك تضم الفيروسات لسلاسل تختلف في شدتها.

ذكر Norris, 1953 أن الإصابة بفيروس PVX تسبب خسائر في المحصول، تتراوح بين ٥ - ٧٥٪ حسب سلالة الفيروس - والصنف - وعوامل أخرى، أهمها تواجد فيروسات أخرى كامنة ومختلطة مع PVX. مثل فيروس PVS وهو أحد الفيروسات التي لم تكتشف، حتى سنة ١٩٥١ عندما سجل في هولندا، ووجد أنه واسع الانتشار حيثما توجد البطاطس، ولا يوجد شك في وجوده غير مشخص في عديد من الأصناف المستعملة، وفيروسات أخرى عديد تؤثر في المحصول تشمل PVA, PVY.

تبعاً لذلك استعمل تكنيك زراعة الأنسجة لإنتاج نباتات خالية من الفيروس في صنف كنج إدوارد، وتم مضاعفة ال Clone الناتج ومقارنته بالعشائر المصابة بفيروس PVM، فوجد أن العشائر الخالية من الفيروس أنتجت نباتات قوية، ومحصولاً أكثر بنسبة ١٠٪ « Bawden & Kassanis, 1965 » إلا أن التأثير المفيد لاستئصال الفيروس قد يقابله جزئياً زيادة القابلية للإصابة بالفطريات؛ فقد ذكر Muller & Munro, 1951 أن البطاطس الخالية من PVX & PVY عالية القابلية للإصابة للفطر *Phytophthora infestans*. كما وجد أن الدرنات الخالية من فيروس PVX إذا قتلت عرشها، وتركت ٢-٣ أسابيع في الأرض تكون أكثر قابلية للعفن الجاف Fusarium عن الدرنات المصابة بفيروس PVX، بينما التي حصدت بعد ٤ - ٥

أسابيع من قتل عرشها لم يلاحظ تغير في قابليتها للإصابة. ومن هذه الملاحظات يعتقد أن الإصابة بالفيروس تغير الحالة الغذائية والفسيولوجية في نبات البطاطس.

والإصابة بفيروس PVS, PVX عادة لا تظهر أعراضاً على البطاطس، وتسبب خسائر مؤثرة في المحصول، وإنه بإجراء زراعة الأنسجة يمكن استئصال كل سلالات هذين الفيروسين. وأكثر من ذلك أن العشائر Clones الناتجة من زراعة المرستيم تكون خالية أيضاً من البكتريا والفطريات الممرضة.

### ج - طرق الاستئصال : Methods of Eradication

إن زراعة أنسجة براعم البطاطس كطريقة للحصول على نباتات خالية من الفيروس من أمهات مصابة، طورت لدرجة أصبح النجاح معها مضموناً. تستعمل ثلاث طرق في محاولة عزل الأنسجة الخالية من الفيروس التي يعاد زراعتها لتعطي جذوراً. الأولى تعتمد على ملاحظة أن تركيز الفيروس ينخفض في الأجزاء الخضرية الحديثة عن القديمة في النباتات المصابة، وبواسطة عزل المرستيم القمي أو قمة الجذر من النباتات المصابة وتنميتها على بيئة مغذية، أمكن الحصول على أنسجة خالية من الفيروس، ولكن هذه ليست دائماً تعطي نباتات ذات جذور. والثانية باستعمال antimetabolites سواء بتطبيقها على النبات المصاب قبل فصل الدعم أو بإضافتها للبيئة المغذية ونلاحظ أن بعض antimetabolites تخفض تركيز الفيروس، دون أن تضر أنسجة النبات، والثالثة هي تعريض النبات المصاب لحرارة قرب 37م، والتي تخفض أو تثبط تضاعف بعض الفيروسات. والمرستيمات القمية المفصولة من النباتات المعاملة بالحرارة تكون غالباً خالية من الفيروسات، التي ليست من السهل استئصالها بزراعة المرستيمات وحدها.

### ٢ - زراعة المرستيم : Meristem

#### أ - أنسجة الزراعة : Tissues for culturing

عادة تختار لزراعة الأنسجة البراعم المرستيمية من طرف الساق أو عيون الدرناات أو إبط

الورقة. وتكون الأسبقية للفرع الابتدائي الذى تكشف، وذلك لأنه يحتاج فقط للاستطالة وإخراج الجذور فقط. وقد يكون لزراعة الأنسجة الأخرى قيمة عملية قليلة، ولكن يجب معرفة أى جزء من نبات البطاطس لازماً لإنتاج نبات كامل.

اكتشف Bajaz & Dionne, 1966 إمكانية الحصول على نباتات خالية من PVX بزراعة جذور البطاطس، وتمكننا من تنمية ثلاث مزارع للجذور خالية من PVX، ونجحنا سنة ١٩٦٨ فى إنتاج تركيبات تشبه العقيد على الجذور المنزرعة. وهذه التركيبات تميل للاخضرار ولكنها لا تنمو لتعطى افرعاً.

لا تستعمل أنسجة الدرناات كمصدر للنبت الخالى من الفيروس، على الرغم من أنه درس نمو وتكشف الأنسجة البرانشيمية للدرناات.

وقد وجد Okazawa وزملائه سنة ١٩٦٧ أن الأوكسين ضرورى لبداية تكوين الكالوس والكينتين Kinetin لاستمرار النمو والتكشف. عند زراعة قرص من أنسجة الدرنة «16 X 10 mm» ينتج نبتة صغيرة جدا على سطح القرص. أعاد Anstis & Northcote, 73 زراعة قطع من الكالوس الناتج من أنسجة الدرناات ولكن لم تتكون الفروع، على الرغم من تكون الجذور على أحد الكالوسات.

وحتى الآن تجرى تجارب عديدة على السوق - الدرناات - الجذور وأنسجة البطاطس الأخرى لاكتشاف ظاهرة النمو بالكالوس، والتي تحتاج لتكشف أفرع ذات جذور لتصبح ذات أهمية عملية. والدراسات العديدة على تكشف الأنسجة أظهرت أنه، على الرغم من المجهود الكبير إلا أنه لازالت هناك مشاكل عديدة دون حل، ويبدو أن استعمال الأنسجة له قيمة ضعيفة عن استعمال المرستيمات فى استئصال الفيروسات.

### ب - بيئة الزراعة : Culture media

تؤدى زيادة تركيزات العناصر الصغرى فى البيئة المغذية إلى زيادة نجاح نمو المرستيمات المفصولة لنباتات ذات جذور (جدول ١١ - ٢) يوضح المعادن المستخدمة فى بيئة

البطاطس، وفي عام ١٩٦٤ تمكن Morel & Muller من تحسين البيئة السابقة لهما ( سنة ١٩٩٥ ) بالزيادة الكبيرة لكمية البوتاسيوم وإضافة سلفات الأمونيوم وحمض الجبريليك ( $GA_3$ ). وضع Murashige & Skoog, 1962 البيئة (MS- 62)، والتي تتميز بزيادة الأمونيوم والبوتاسيوم، وتستمر وقتاً أطول أربعة أضعاف بيئة النيترات. وبمقارنتها بيئات عديدة وضعت بواسطة Muth & Bode, 70, Stace - Smith & Mellor, 68 Christensen, 70 , Topio, 72 وجد أن أحسنها هي (MS- 62). العناصر الصغرى (الدقيقة) التي عادة تستعمل في المزارع. يضاف الحديد عادة في شكل Fe - ethylenediamintetra acetic acid (Fe - EDTA) أكثر من صورة كلوريد الحديد أو السلفات. ذكر Shige & Skoog, 1962 أن العامل المخلبي (EDTA) يحسن كثيراً من قابلية الحديد للامتصاص وأيضا العناصر الصغرى الأخرى.

جدول ١١ - ٢ : العناصر الغذائية المعدنية التي استخدمت في بيئات

عديدة لزراعة القمم المبرستيمية للبطاطس .

	WHITE, 1954 (MANZER, 1958)	HELLER, 1953 (GAUTHERET, 1959)	MOREL and MARTIN, 1955 (PALUDAN, 1971)	MOREL and MULLER, 1962	MURASHIGE and SKOOG, 1962
<b>العناصر الكبرى Macronutrients:</b>					
نترات الكالسيوم	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	288		500	500
نترات بوتاسيوم	KNO <sub>3</sub>	80		125	1900
نترات صوديوم	NaNO <sub>3</sub>		600		
نترات الامونيوم	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>				1650
كبريتات الامونيوم	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> · SO <sub>4</sub>			1000	
كلوريد بوتاسيوم	KCl	65	750	1000	
فوسفات بوتاسيوم	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>			125	170
فوسفات الصوديوم	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	19	125		
كلوريد الكالسيوم	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O		75		440
كبريتات المغنسيوم	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	737	250	125	125
كبريتات الصوديوم	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200			370
<b>العناصر الصغرى Micronutrients:</b>					
كلوريد الحديدك	FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O		1	1	
كبريتات الحديدك	Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	2.5		25	
كبريتات الحديد	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O				27.8
	Na <sub>2</sub> · EDTA				37.3
كبريتات المنجنيز	MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	6.7	0.1	0.8	0.1
حمض البوريك	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.5	1	0.025	1
كبريتات الزنك	ZnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	2.2	0.8	0.04	0.8
يوريد البوتاسيوم	KI	0.75	0.01	0.25	0.01
مولبيدات الصوديوم	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O				0.25
كبريتات النحاس	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O		0.03	0.025	0.03
كلوريد الالومنيوم	AlCl <sub>3</sub>		0.03		0.03
كلوريد النيكل	NiCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O		0.03	0.025	0.03
كلوريد الكوبالت	CoCl <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O			0.025	0.025

المضافات العضوية في بعض البيئات موضحة في جدول ( ١١ - ٣ ). اكتشاف الاحتياجات من المواد العضوية لزراعة الأنسجة صعب جداً، فبعضها يعتمد على الآخر فمثلاً نحتاج لزيادة مادة ما عند إضافة مادة أخرى. ويعتمد الاحتياج لمواد أخرى على المغذيات المتاحة في محلول المعادن أو على نوع وعمر الأنسجة المعزولة. وبالإضافة للمواد العضوية الموجودة في جدول ( ١١ - ٣ ) يستعمل بعض الباحثين  $GA_3$ . وقد وجد Mellor & Stace - smith, 69 أن  $GA_3$  ليس له تأثير كبير على النمو، وقد حذف من البيئة الأخيرة لهما.

في بعض الأصناف تعطى البراعم المفصولة كلها تقريباً نباتات، وفي أصناف أخرى تعطى نباتات قليلة جداً، والتي قد يتحسن نموها بإضافة  $GA_3$ . وجد Pannazio & Re-dolfi, 1973 أن إنتاج الجذور في المرستيمات على البيئة MS - 62 السائلة دون إضافة  $GA_3$  كان ١٧٪، وبإضافة  $GA_3$  زادت إلى ٦٦٪. وقد اقترحا أن الاختلاف بين نتائجهم والنتائج السابقة يكون بسبب اختلاف فترات الإضاءة - الموسم - الأصناف - عمر النبات الأم أو نقاوة الكيماويات، ويضاف احتمال آخر هو النقل الدوري للبراعم النامية إلى بيئة طازجة.

كما وجد أن إضافة الفحم النشط إلى MS - 62 تسرع من نمو البراعم المفصولة، وتزيد عدد النباتات ذات الجذور، ويكون مفيداً خصوصاً للأصناف التي لا تعطى جذوراً على بيئة MS - 62.

وقد تدعم بيئة الزراعة ٥ - ٠,٨٪ آجار. وأحسن التجهيزات لزراعة المرستيم عبارة عن أنبوبة اختبار (12 X 100 mm) وبغطاء مقاوم للحرارة مصمم، بحيث يسمح بتغيير الهواء في الأنبوبة. وفي البيئات السائلة تدعم بقنطرة من ورق الترشيح، ولكنها غير ضرورية.

جدول ( ١١ - ٣ ) : الإضافات العضوية (مجم / ل) للبيئات المستخدمة  
في مزارع القمم البرستيمية للبطاطس.

	WHIE, 1954 (MANZER, 1958)	MOREL and MARTIN, 1955 (PALUDAN, 1971)	MURASHIGE and SKOOG, 1962
بيوتين Biotin		0.001	
كالسيوم بانتوثينات Ca- Pantothenate		0.001	
ستيسين Cysteine		0.01	
جليسين Glycine	30		
اندول ٣ حمض الخليك Indol - 3 - acetic acid			
إنوسيتول Inositol		0.001	2.0
كينيتين Kinetin			1-30
نفتالين اسيتيك Napthaleneacetic acid		0.001	100
نيكوتينيك أسيد Nicotinic acid	0.5		0.04-10
بيريدوكسين Pyridoxine. HCl	0.1		0.5
ثيامين Thiamine. HCl	0.1	0.001	0.5
جلوكوز Glucose		40000	0.1
سكروز Sucrose	20000		30000

ج - عوامل التكشف وتكوين الجذور :

### Factors in development and rooting

١ - حجم البرعم المفصول : Size of excised bud :

لوحظ أن حجم المرستيم المفصول يؤثر على تكوين الجذور، ولكن وجود Leaf primordia يؤثر أكثر في التكشف . باستعمال مرستيم بطول ( ١ ر . مم ) وجد Kassanis & Varma, 1967 أن النتائج كانت أحسن كثيراً عندما يشتمل على Leaf Primordia.

وجد Stace - Smith & Meller, 68 أن البرعم بطول ١ مم أو أكثر يكون جذوراً أكثر من البراعم الأصغر. إن حجم البرعم يؤثر أيضاً على استئصال الفيروسات خصوصاً PVS. وعادة ترفض البراعم أقل من ٠.٣ مم؛ لأنها لا تكون جذوراً، والآن ترفض البراعم أطول من ٠.٧ مم لاحتتمال إصابتها بالفيروسات. وفي هذا المدى الضيق للحجم هناك اختلافات قليلة في تكوين الجذور.

## ٢ - الظروف البيئية للزراعة: Cultural environment

الظروف البيئية المستخدمة عادة في زراعة مرستيمات البطاطس هي ٢٠ - ٢٣م وإضاءة ٢٠٠٠ - ٤٠٠٠ لوكس لمدة ٢١ ساعة في اليوم درس Pennazio & Redolfi, 1973 تأثير ثلاثة أساليب للإضاءة: لمبات غنية بالضوء الأحمر، لمبات إضاءة طول اليوم، ١:٢ خليط من الاثنين فكانت عملية تكوين الجذور تحت كل أسلوب حوالى ٨١، ٤٣، ٦٧٪ على التوالي، وكذلك كانت النباتات تحت الضوء الخليط أكثر قوة، ولا يوجد اختلاف في النسبة المثوية لتكوين الجذور تحت كثافة ضوئية ٢٠٠٠ - ٤٠٠٠ لوكس، ولكن نمو الأوراق والجذور كان أحسن على ٤٠٠٠ لوكس.

وهناك مقارنة لتأثير الحرارة على نمو المرستيمات في أصناف عديدة، زرعت في بيئة MS - 62 سائلة على ثلاث درجات حرارة. فعلى ٢٩م بعض الأصناف نمت أسرع وأعطت جذوراً في ٥ أسابيع، والنمو في الأخرى كان غير طبيعي، الأوراق أكبر وسميكة وشاحبة اللون والجذور قليلة أو غائبة، وإذا لم تنقل هذه البراعم لبيئة جديدة تموت غالباً. وعلى ٢٦م النمو كان أبطأ، ولكن نمو الأفرع يسبق نمو الجذور. الأفرع عديمة الجذور تغرق في البيئة السائلة، ويجب تدعيمها بقنطرة من ورق الترشيح لمنع غمرها وموتها. أما على ٢٣م يبطلو النمو جداً، ولكن الجذور والأفرع تنمو عادة في وقت واحد.

وإذا اصفرت البراعم يمكن نقلها لبيئة طازجة دون قنطرة ورق الترشيح، وإذا لم تنقل تظل متوقفة عن النمو لعدة أشهر، وتستعيد نموها النشط عند نقلها لبيئة طازجة. بعض الأفرع عديمة الجذور، والتي غرقت في البيئة السائلة تصبح رفيعة وتتشوه ثم تتلف (شكل ١١ - ٤). وهذه يمكن رفعها بورق الترشيح أو بتطعيمها على جذور طماطم. وقد وجد

Morel & Martin, 55 ان النباتات النامية على آجار غالباً تتعفن عندما نقلها للتربة، ولكن السوق المقطوعة والمطعمومة على نبات طماطم صغيرة جيدة وتؤخذ خلال شهر، وهي ذات جذور. وقد تمكن Mellor & Smith. 1969 من إسراع إخراج الجذور للأفرع، بواسطة قطع جزء رقيق من القاعدة، ثم تعريض السطح المقطوع لهرمون جذور، ثم الزراعة فى رمل أو تربة.

### ٣ - عوامل أخرى : Other factors

كما وجد فى بعض الاحيان أن اختلاف الأصناف يحدد معدل النمو فى المزارع؛ حيث لاحظ، Quak 1961 أن بعض أصناف البطاطس لا تنمو جيداً على البيئة التى تكون مناسبة جداً لأصناف أخرى. وقد وجد أيضاً أنه فى أصناف عديدة براعم قليلة، تتكشف لتعطى أفرعاً وجذوراً خلال شهرين من الفصل، بينما فى أخرى وتحت ظروف الزراعة نفسها تستغرق ٤ - ٦ شهور، مع تجديد المزرعة مرة أو مرتين.

البراعم المأخوذة من فرع واحد تختلف أيضاً فى نموها. فمثلاً يكون الموقع على الفرع واحداً وحجم البرعم (٣-٧ رمم)، ولكن بعد شهرين من القطع يعطى برعماً أو اثنين أفرعاً وجذوراً وأوراقاً لها لون طبيعى، بينما الأخرى تعطى أوراقاً صغيرة شاحبة، ودون أفرع أو جذور، ونقل الأخيرة الى بيئة طازجة غالباً ما يسبب موجة من النمو الضعيف.



شكل ( ١١ - ٣ ) : الت كشف الطبيعي وغير الطبيعي لبراعم بطاطس في بيئة سائلة. الخطوات المتتابعة أثناء عملية الت كشف مبينة في (A - C) بعض البراعم تغرق وتموت عند تمددها على كويرى من ورقة الترشيح (D - E) وبرعم بعد نقله إلى ورق ترشيح بدأ يستكمل تكشفه (F).

بمجرد خروج الجذور تستمر النباتات في النمو دون نقل حتي تزدهم أنبوبة المزرعة بالجذور، التي تلتف الأفرع على قمته. ويمكن الاحتفاظ بالنباتات لمدة غير محدودة بواسطة نقل قمة الفرع ( طول ٢ - ٣ سم ) إلى بيئة جديدة على فترات كل ٤ شهور، أو عندما تقترب البيئة في الأنبوبة القديمة من الجفاف، وفي الحرارة المنخفضة يقلل الفصل وتطول المدة بين كل تجديد .

### ٣ - استئصال الفيروس : Virus Eradication

#### أ - العوامل التي تؤثر على الاستئصال : Factors influencing eradication

##### ١ - مضادات البناء الحيوى : Antimetabolites

تشير مراجع زراعة الأنسجة الى فائدة antimetabolites فى بيئة الزراعة . أجريت بعض التجارب على مزارع الكالوس وأخرى على قطع من عقل الساق، ولكن الأغلب على المرستيمات القمية . بعض antimetabolites فى تركيز لا يضر النبات يثبط تضاعف PVX، ولكن تقارير قليلة نشرت عن الاستئصال، ذكر Noris ١٩٥٤ أن PVX قد يستأصل بعد المعاملة بواسطة مالاكيت أخضر malachite green بينما تظل أغلب براعم المعاملة مصابة، ولكن فى عديد منها يتأخر ظهور الفيروس، وواحد فقط يصبح خالياً من PVX. استعمل Vasti 1973 مرستيمًا قمياً بطول ٣ - ٤ مم مع malachite green أو الثيوبوراسيل فى البيئة . وعند إضافتها للبيئة مفردة فإن كل الستة نباتات malachite green ونباتين مع ثيوبوراسيل أصبحت خالية من PVX، وعندما تعامل القمم المفصولة بخليط من الاثنين، كانت كفاءتهما أقل .

##### ٢ - حجم البرعم المفصول : Size of Excised Bud

حجم المرستيم المفصول له أهمية قصوى فى تحديد النجاح؛ خصوصا فى PVS&PVX، قطع Kassanis & Varma, 1967 مرستيمات بطول ١ ر ٠ مم، وبدون أو مع Leaf primor-dium، ولاحظا أن ١٩٦/٢٠ فقط برعم تكشفوا لنباتات، ولكن ١٩ منها كانت خالية من الفيروس . . فصل Accatine, 1966 مرستيمات معها اثنين من Leaf primordia، وذكر أن

كل ١٨ نباتاً كانت خالية من فيروسات PVM - PVY - PLRV، ولكن ستة فقط منها كانت مصابة بفيروس PVX و١٥ بفيروس PVA.

جدول (١١ - ٤): تأثير إضافة مضادات البناء الحيوى إلى البيئة الصناعية

على تثبيط فيروس البطاطس في القمم المفصولة.

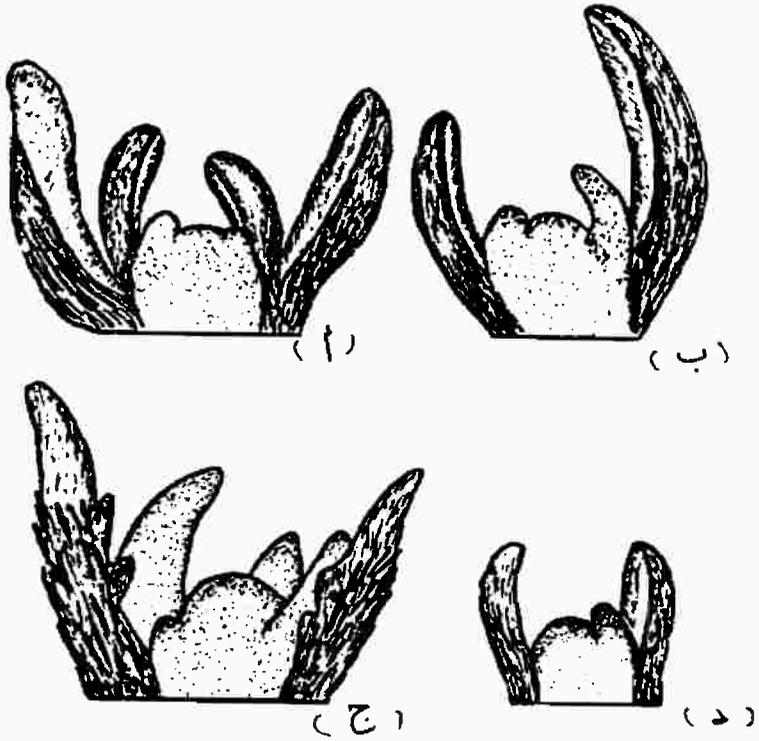
المؤلف	الاستئصال	التثبيط	مضاد البناء الحيوى	
NORRIS, 1954	+	+	أخضر ملاكايت	١٠
THOMSON, 1956	-	-	أخضر ملاكايت	٥
MANZER, ,1958	-	-	أخضر ملاكايت	٢ - ١
MANZER, ,1958	-	-	ثيوبوراسيل	٢ - ١
QUAK, 1961	+	+	٤ر٢ داي كلورو	٤ - ٣
VASTI,1973	+	+	فينوكس حمض الخليك	٠,٧ - ٠,٥
VASTI,1973	+	+	أخضر ملاكايت	
PENNAZIO,1973	-	-	ثيوبوراتيل	
PENNAZIO,1973	-	-	ازجوانين	
PENNAZIO,1973	+	-	فلويراسيل	
PENNAZIO,1973	-	-	ثيوبوراتيل	
PENNAZIO,1973	-	-	فلوروفينايل	
PENNAZIO,1973	-	-	الانين	

لاحظ Kassanis & Varma, 1967 إن أصناف البطاطس المختلفة لها مرستيمات ذات أشكال وأحجام مختلفة. وقد وجد أنه في الفرع الواحد قد يختلف الحجم الذى يوصى به فى المراجع. يختلف اختيار حجم البرعم، فبعضهم يأخذ بالطول الكلى والآخرين بعدد leaf primordia. وكلا الاختيارين يعطيان فكرة تقريبية عن حجم الأنسجة اللازمة.

شكل ( ١١ - ٦ ) يوضح أنواعاً من المرستيمات وصعوبة تحديد حجم كل منها، ففي شكل ( ١١-٥ ) يظهر برعم جانبي ذو اثنين من leaf primordia وأربعة من rudimentray leaves وإزالة الأخيرة فقط تجعل طول المرستيم حوالى ٢،٠ مم. وشكل ( ١١-٥ ) يوضح برعماً جانبياً أيضاً له اثنان من leaf primordia، وإذا تركنا الاثنان يصبحان أصغر من البرعم الأول. أيضاً اختيار حجم المرستيم الطرفى صعب. والبرعم الطرفى عادة أكثر فى العرض عن الطول، ويحاط بواسطة whorl of leaf primordia، ( شكل ١١-٦-أ ).. ومن غير المرغوب فيه الحجم الكبير للأنسجة والعدد الكبير من leaf primordia. يوضح شكل ( ١١-٦-د ) البرعم الجانبي لنباتات البطاطس بعد عدة أشهر من الزراعة، وهناك أكثر من ٦ براعم على النبات الواحد، والتي تتميز بصغرها وتجانسها فى الشكل والحجم. ومثل هذه النباتات تمد الباحثين بالمادة النباتية الموحدة للمرستيمات لزراعتها تحت الظروف المختلفة.

### ٣ - المعاملة الحرارية : heat treatment

المعاملة الحرارية للنباتات المصابة قبل فصل البراعم، تسهل استئصال بعض الفيروسات التى من الصعب استئصالها بزراعة المرستيم وحده. وبعد المعاملة الحرارية تصبح براعم كثيرة نسبياً خالية من الفيروس، والتي تستعمل عادة فى الزراعة. ومن فيروسات البطاطس التى يصعب استئصالها- PSTV - Aucuba masaic - PLRV - PVA - PVY - PVM - PVX - PVS , PSTV ، وكل هذه تشمل سلالات تتميز بمقاومتها للمعاملة الحرارية عن الأخرى. مثلاً Kassanis, 1970 استأصل PLRV من كل الدرناات بواسطة المعاملة الحرارية وحدها، بينما وجد - Mellor & Stace smith, 1971 سلالات من PLRV تظل باقية بعد المعاملة الحرارية وزراعة المرستيم، كما وجد أن PVY & PVA غالباً ما تستأصل بزراعة المرستيم دون المعاملة المسبقة بالحرارة.



شكل (١١-٤): رسومات تبين القمة المبرستيمية والأوراق حولها أ و ب تمثل براعم جانبية و جـ برعم طرفي به قمة مبرستيمية كبيرة وعدد أكبر من الأوراق البدائية (بريمورديا) و د: برعم جانبي من النبات Plantlet بعد عدة أشهر من زراعة. الخط الوسطى بين جـ ، د ، ٠.٢ مم.

وجد (Morel et al (1968) ان هذين الفيروسين يستأصلان من ٨٥-٩٠٪ من المرستيمات بينما PVS & PVX اقل من ١٪ فقط. ولكن (Kassanis (1965) وجد ان PVA بقى في  $\frac{39}{70}$  نبات نمت من براعم قطعت بعد معاملة ١٢ - ٢٠ يوم على ٣٧م. وتقارير أخرى أكدت أن PVA بقى في نباتات أخليت من PVX.

لم تجد معلومات منشورة عن aucuba mosaic في البطاطس، ولكن لدينا نتائج لأبحاث أولية على نباتات تكشف عن مرستيمات سبق تعريضها للحرارة؛ حيث ظل  $\frac{4}{70}$  نبات مصاباً فقط.

الفيروسان PVS, PVX نادرة الاستئصال دون أن تفصل البراعم وهي صغيرة جداً أو تعامل النباتات المصابة بالحرارة قبل فصل البراعم. قارن Mellor & Stace - Smith, 1970 سهولة استئصال PVS, PVX من ٢١ نبات مصاب بكلتا الفيروسين، وقد وجدنا أن PVX عادة أكثر تأثيراً بالمعاملة الحرارية عن PVS، حيث يبقى في حوالي ٣٪ من البراعم المفصولة بعد ٤ - ٦ أسبوع من المعاملة الحرارية ونادراً بعد معاملة أطول، وقد وجدنا أن أكثر سلالات PVX تحملاً للحرارة تبقى في ٣٪ من البراعم المفصولة بعد معاملة حرارية ١٠ أسابيع.

فيرويد الدرنة المغزلية في البطاطس أكثر صعوبة في الاستئصال فقد فصلت براعم في نباتات مصابة بحددة بالفيرويد، بعد معاملة حرارية ٢ - ١٤ أسبوع فظلت الإصابة الحادة في ٦٢ من ٦٦ نباتاً، أما الأربعة الباقية فأصبحت معتدلة الإصابة. واستعمل واحد من الأربعة كمصدر في التجارب التالية. والبراعم التي فصلت بعد ٢ - ١٢ أسبوعاً من المعاملة وجدنا معدل الاستئصال صغير جداً ٦/٢٤٨ فقط. النتائج المختلفة لمحاولات الاستئصال في الفيروسات اقترحت أن هذا المصدر للفيرويد قد يكون غير عادي المقاومة للحرارة، وأن الفيرويد من مصادر أخرى قد يكون أقل صعوبة في الاستئصال. درجة الحرارة واستمرار المعاملة الحرارية استخدم بواسطة عديد من الباحثين، عندما تكون درجة الحرارة ٣٧م يكون الاستمرار ٣ أسابيع أو أقل، حيث يتحدد ذلك بمدة بقاء درنات البطاطس حية والانخفاض الطفيف في درجة الحرارة يزيد البقاء كثيراً، أخبر (Mellor & Stace - Smith (1967) بقاء الدرنات وكذلك تكشف النباتات من الأجزاء الجذرية في درجات الحرارة المختلفة ووجد

تغير حرارة الهواء يومياً من ٣٣ - ٣٧م وحرارة التربة من ٣٠ الى ٣٣م تبقى الدرناات حوالى ١٠ اسابيع والاجزاء الجذرية أكثر من ٦ شهور. وبعد ٤ شهور معاملة تتكشف بعض النباتات الخالية من PVX من قطعة نسيج كبيرة نسبياً. وتزيد النسبة بطول المعاملة الحرارية.. ففي الاجزاء الجذرية تكون الأفرع النامية أثناء المعاملة رقيقة، والبراعم الجانبية صغيرة، وذات عدد قليل من الاوراق الأولية Rudimentary leaves. أما النامية من أجزاء درناات فتكون أفرعاً قوية وبراعم جانبية سميكة، كل منها ذات أوراق أولية عديدة قد تزال قبل فصل البراعم.

#### ٤ - الإصابة المتضاعفة (المشتركة) : Multiple infection

حصل Pannazio, 1971 على نتائج متعارضة عند زراعة مرستيمات من نباتات معاملة بالحرارة فى صنفين .. ففي أحدهما المصاب بفيروس PVX فقط ٣٤/٤٢ نبات كانت خالية من الفيروس. وفي الآخر المصاب بفيروسات PVX - PVS-PVM -PVY فكان ٣٤/٢ نباتاً خالياً من PVY، كلها من PVM، واغلبها من PVS & PVM وقد عزی صعوبة استئصال PVX من هذا الصنف للإصابة المشتركة للأربعة فيروسات.

درس Close, 1964 تأثير فيروسات عديدة على تركيز PVX وتضاعفه وحركته داخل النبات وعلاقة ذلك بالحرارة. فوجد أن تركيز PVX يزيد فى وجود PVY عما يكون وحده خصوصاً على ٣١م. وعلى هذه الحرارة يقل تضاعف PVX ولا يتحرك جهازياً، ولكن بوجود PVY يستمر فى التضاعف ويتحرك جهازياً.. ويزيد تركيز PVX حوالى ٦٤ مرة. ويبدو أن ملاحظات Close تتوافق مع افتراض Pennazio فاحتمال وجود PVY أثناء المعاملة الحرارية مستعمل عن وجود PVX أيضاً حتى ولو استأصل PVY فيما بعد بفصل البراعم الصغيرة، رغم أن PVX سجل فى القبة المرستيمية فى براعم البطاطس، ولم يسجل PVY عندما زرع Mellor & Stace - Smith مرستيمات من نباتات معاملة بالحرارة فى ١٨ صنف، كان الاستئصال يتراوح بين ٥٤ - ١٠٠٪ حسب نبات المصدر.

#### ب - الاستئصال أثناء الزراعة : Eradication during culture

إن تكتيك إنتاج نباتات خالية من الفيروس بواسطة تكاثر المرستيمات المفصولة من

النباتات المصابة يعتمد على نظرية أن الفيروسات لا تتوزع بانتظام داخل عوائلها، ولهذا فإن قطعة صغيرة من الأنسجة قد تكون خالية من الفيروس، وهناك فكرة أخرى أن تركيز الفيروس ينخفض بالقرب من قمة الأفرع والاختبارات لتقدير امتداد الفيروس في المناطق الطرفية كانت غير كافية، Kassanis, 1967. كان أول من اقترح أن الاختبار بالميكروسكوب الإلكتروني للمرستيمات الطرفية قد يحدد وجود جسيمات الفيروس - Appiano & Pen- nazio, 72، وباستخدام القطاعات الرقيقة والميكروسكوب الإلكتروني كشف وجود PVX في سيتوبلازم الخلايا الطرفية للبطاطس. وقد وجدوا جزيئات في كل المرستيمات التي اختبروها، ولهذا أكدوا أن استئصال الفيروس يتم أثناء الزراعة. هذه الملاحظات أكدها Krylova et al, 1973 بواسطة الفحص بالميكروسكوب الإلكتروني للعصير المتجانس للمرستيمات المصابة بفيروس PVX. وقد فحصوا المرستيمات في ثلاثة أحجام، وقد وجدوا جزيئات قليلة في 100/98 في الطول (0.8 - 0.1)، وأكثر قليلاً في (0.3 - 0.1) وكثيراً في المرستيمات (3 - 5، م). وأيضاً فحصوا عصير المرستيمات بعد 4 أسابيع من الزراعة، ووجدوا أن القطع المزروعة الأقل من (0.1 م) كانت خالية، وفي الطول (0.1 - 0.3 م) كانت قليلة جداً وقد تأكدت هذه الملاحظات بالحقن الميكانيكي.

ميكانيكية استئصال الفيروس أثناء الزراعة غير معروفة. اقترح Ingram 1973 أنه ربما يكون السبب إما بعض العوامل المثبطة التي تنتج أثناء الاستزراع، أو تأثير بعض مكونات البيئة على الفيروس. واقترح Quak أن اختفاء جسيمات الفيروس قد يعزى إلى تفاعل المرستيم مع بيئة المزرعة.

ويميل الرأي لنظرية أخرى قد تكون أكثر احتمالاً. إن تضاعف الفيروس يحتاج إنزيمات، والتي تكون متاحة للخلايا قرب قمة المرستيم، وعند قطع قمة صغيرة تختل مؤقتاً عمليات النمو، وتصبح الإنزيمات المطلوبة لخطوة أو أكثر في تضاعف الفيروس غير متاحة، وهكذا يقف إنتاج جسيمات جديدة. في البراعم الصغيرة يكون الاختلال كبيراً وقد تطول فترة عدم الاستقرار في تضاعف الفيروس للحد الذي يتحلل عنده الحمض النووي الفيروسي Viral RNA، ومن الممكن أن تنتفع به خلية العائل. ولكن في البراعم الكبيرة يكون

الاختلال أقل، وتصبح الإنزيمات متاحة، قبل أن يتحلل كل Viral RNA.

### ج- الاستئصال الناجح : Successful eradication

#### ١ - الكشف عن الفيروس : Virus detection

حيث إن البطاطس معرضة للإصابة بعدديد من الفيروسات غير المرتبطة، وكل منها له سلالات تختلف في الشدة يكون من الصعب، جداً تعريف والكشف عن هذه الفيروسات. وعلى ذلك فإن وسائل الحقن الميكانيكى - النقل بالملن - السيولوجى - الميكروسكوب الإلكتروني - الإلكتروفورسيس Electrophoresis كلها تصبح مطلوبة، إذا كان الهدف هو إنتاج Clone خالٍ من الفيروس، لا يكون من الضروري معرفة أى الفيروسات موجودة قبل المعاملة ولكن يجب تسجيل نبات المصدر، إن استخدام نبات مفرد كمصدر والمعلومات عن محتواه من الفيروسات توضح الاختبارات التى يجب أن تجرى لتحديد أى فيروسات لازالت باقية، ولهذا السبب نحتفظ بنبات من المصدر غير معامل للمقارنة.

من الخبرة السابقة أكثر الفيروسات إصابة هى PVS & PVX، وللكشف عن هذه يستخدم الحقن الميكانيكى على *Chenopodium amaranticolor & Gomphrena glo-bosa* حيث يعطى PVX أعراض موضعية على الأخير مبكراً وغامقه أكثر من PVS ويحتاج الكشف عن PVS فى وجود PVX للسيولوجى ونتائج الاختبارات السيولوجية لفيرس PVS أحياناً غير مؤكدة ويجب عمل مقارنة واضحة السيولوجى أو الحقن الميكانيكى على النباتات المشخصة يمكن استعمالها للكشف عن PVA - PVM - PVY - PVA - PVM aucuba mosaic سلالات فيروس التفاف أوراق البطاطس التى تعطى أعراض مرئية على البطاطس نادرة الوجود، وحيث إن PLRV لا ينتقل ميكانيكياً فإن السلالات الغير مظهره للأعراض يمكن الكشف عنها فقط بالنقل بالملن إلى *Physalis floridana*، وللكشف عن السلالات المعتدلة يختار البادرات المتجانسة وتنمى تحت ظروف بيئية محكمة، وقد نجح Murayam et al 1973 فى تنقية PLRV وتحضير انتسريم ومن الممكن استعمال السيولوجى فى الكشف عن PLRV فى العصير الخام للبطاطس المصابة، الكشف عن فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس يقابله صعوبات النقل إلى بادرات الطماطم مفيد ولكن تظل السلالات المعتدلة دون كشف

بدون Challenge inoculated مع سلالة قوية (Fernow, 1967).

وقد طور Morris & Wright, 1975 تكنيك يشمل استخلاص الأحماض النووية الخلوية وفصلها بواسطة Polyacrylamide gel electrophoresis، وهو يعتمد في الكشف عن السلالات المعتدلة من PSTV.

#### ٢ - الأصناف الخالية من الفيروس : Virus - free cultivars

كان Morel & Martin, 1955 أول من استعمل زراعة المرستيم لاستئصال الفيروسات من البطاطس ومنذ ذلك الحين، طبق هذا التكتيك في عديد من البلدان تشمل أمريكا - فرنسا - بريطانيا - الدنمارك - ألمانيا - فنلندا - اليابان - إيطاليا - كندا.

جدول (١١-٥): تأثير المعاملة الحرارية وحجم البرعم علي تخليص

النباتات من فيروسات S, Y, C, X البطاطس.

المؤلف	استئصال الفيروس		طول النمو م	المعاملة الحرارية		أجزاء البطاطس
	PVS	PVX		فترة التعريض بالأسبوع	درجة الحرارة	
MCD	٦/١	٦/٤	٠,٢-٠,١٥	صفر-١,٥	م <sup>٣٥-٣٢</sup>	الدرنات
M,S	٩/١	٩/٦	٠,٥-٠,٣	صفر	م <sup>٣٧-٣٣</sup>	أجزاء جذبية
P		٥٩/٧	٠,٤	صفر	م <sup>٣٥-٣٣</sup>	نباتات نضجة
		٤٢/٣٤	٠,٤	٣		
S&U	صفر/٣٢	صفر/٣٢	١-١,٦	صفر	م <sup>٣٧-٣٣</sup>	أجزاء ذات جذور
	٨/١	٨/٣	١-٠,٦	٤-٢	م <sup>٣٧-٣٣</sup>	
	١٤/١	١٤/٩	١-٠,٦	٨-٦		
T				صفر	م <sup>٣٧</sup>	درنات منبئة
	١٩/٦			٣		
T	٢٧/٢٣			صفر	م <sup>٣٧</sup>	درنات منبئة
	٦/٥			٢-١,٥		

رموز المؤلف:

MCD: MacDonald 1973.

S, S. M.: Stace Smith and Meller 1968.

P.: Pennazie, 1971.

T: Tapie 1972.

أصبحت العشائر Clones الحالية من الفيروس في كل الاصناف المهمة متاحة الآن. جدول يوضح ذلك من التقارير المنشورة، وهذا الجدول غير مكتمل تماماً، ولكنه يؤكد نجاح هذه الطريقة.

### ملخص الطرق الموصى بها

#### Summary of Recommended Methods

يمكن الحصول على النباتات الخالية من الفيروس من درنات البطاطس بواسطة الطريقة الآتية:

زراعة قطعة من الدرنة ذات عين مفردة فى تربة تحت الظروف العادية . عندما يخرج أول نبت، وبطول ١٥ سم، يقطع القمة بطول ٦-٨ سم، وتزال الورقتان السفليتان ويعامل السطح المقطوع بهرمون الجذور. يزرع الجزء المقطوع فى اوانٍ من البيت قطر ١٠ سم معقمة، وتغطى بناقوس زجاجى لمدة ١٠ أيام. تكون اوانى البيت متماثلة النسيج، ويجب التأكد من أن حرارة التربة أقل من حرارة الهواء اثناء المعاملة، وكذلك صرف وتهوية التربة جيدان، كل هذه تساعد على التعمير تحت المعاملة الحرارية. وأخذ قطعة أخرى يكون بعد أسابيع قليلة، وهذا مفيد لاحتمال موت الأول اثناء المعاملة الحرارية. ويحتفظ بالنبات الاصل للمقارنة مع النباتات المتكشفة فى المزرعة بعد ٤٣ أسابيع من الزراعة، ينقل لحجرة نمو حيث إضاءة (3000-4000 LUS) لمدة ١٦ ساعة يومياً وحرارة الجو ٣٦م أثناء النهار، و ٣٣م اثناء الليل، وبعد أسبوعين تطوش قمة النبات الصغير ليسمح بنمو الفرع، ويترك على النبات على الأقل ورقتان لتشجيع النمو مرة أخرى. تقطع الأوراق من الفرع المفصول، ويترك قطعة صغيرة من كل عنق ورقة، ويلف الفرع فى ورقة مبللة لمنع الذبول. تعقيم الفرع غير ضرورى، ولكن فصل البرعم يتم تحت ظروف معقمة، ويجب تعقيم الادوات بعد كل قطع بواسطة الغمر أولاً فى الكحول ثم الماء المعقم. وتحت تكبير ٢٥ X يفصل كل برعم بالدور. تشد نهاية الجزء الباقى من عنق الورقة لكشف البرعم الجانبى، وبواسطة الإبرة تكسر الأوراق الأولية، ويترك فقط أصغر اثنين من Leaf Primordia. وبواسطة نصل حاد يقطع المرستيم القمى، ثم بالإبرة ينقل إلى سطح البيئة المناسبة. يجب ان يكون البرعم بطول ٣، ٠، ٦-٠، ٠ م.

والبراعم الأصغر فرصتها في البقاء أقل . والأكبر تصبح أكثر إصابة بالفيروس . توضع المزارع على ٢٣م، وإضاءة ١٦ ساعة يومياً .

كل فرع يعطى ٨-١٢ برعمًا، بعضها يتكشف ليعطى نباتات خالية من الفيروس . وحيث إن بعض الأصناف لا تعطي جذوراً وبعض سلالات الفيروس تكون غير عادية البقاء . لتأكيد النجاح يؤخذ فرع آخر ( لغرض فصل البراعم) بعد ٢-٤ أسبوعاً من المعاملة . بعد ٢-٣ شهور من الزراعة تصل إلى طول ٣ سم أو أكثر يمكن نقلها إلى التربة، ولكن هناك نقطة حرجة فعند إزالتها من الأنبوبة، تكون طرية وغمضة جداً وتذبل، إذا لم تحمى بسرعة من فقد الرطوبة. وإذا كانت التربة مروية بعناية وترش النباتات برقة بالماء وتغطي بناقوس زجاجي لمدة أسبوع، يكون النجاح مؤكداً . عادة يكشف عن إصابة النباتات عند نقلها للتربة فتؤخذ ورقة واحدة ٣-٥ سم في القطر إلى نقطة ماء، تستعمل للحقن على العوائل المشخصة *C.amaranticolor* ، *G.globosa*، والنتائج السلبية لهذا الاختبار يجب أن تؤكد بعد عدة أسابيع بإعادة الحقن أو بالسيرولوجي والميكروسكوب الإلكتروني .

### نظرة على علم الفيروسات النباتية

#### في الماضي والحاضر والمستقبل

وقد أوضحت في هذا الكتاب المعلومات الحالية في مجال علم الفيروسات النباتية ويهمننا في هذا الفصل الأخير من الكتاب أن نلقى نظرة على التطور التاريخي لهذا العلم وكذا على التطورات المتوقعة في هذا العلم خلال القرن الحادى والعشرين .

#### نظرة على الماضى :

وقد تم تقسيم المائة سنة الماضية التي تم فيها البحث في مجال الفيروسات النباتية إلى خمسة فترات ومع أنه من الممكن أن يحدث تداخل بين هذه الفترات إلا أنها تعطى لحد كبير فكرة عما تم بحثه من موضوعات في كل فترة فيها .

١ - ١٨٩٠ - ١٩٣٥ وكان النشاط الأساسى في هذه الفترة هو اكتشاف الفيروس كمسبب مرضى جديد يصيب النباتات واكتشاف حقيقة أن هذا المسبب يمر من المرشحات

## فيروسات النباتات

التي تحجز أدق البكتيريا وأطلق عليها حينئذ الفيروسات المرشحة. ولكن ظلت طبيعة هذا المسبب غير معروفة وظلت عدم القدرة على التمييز بين الفيروسات نفسها وبين الأمراض التي تسببها.

٢ - ١٩٣٥ - ١٩٥٠ وقد تم عزل الفيروس سنة ١٩٣٥ وظهر أنه عبارة عن رايبو نيوكلوبروتين سنة ١٩٣٦ وفي السنوات التالية تم اكتشاف وعزل عدد كبير من الفيروسات وتم دراسة خواصها الطبيعية والكيميائية وقد ظهر أنها جميعها تتكون RNA من وبروتين وفي سنة ١٩٥٦ تم التوصل إلى أن الحمض النووي بمفرده قادر على العدوة.

٣ - ١٩٥٦ - ١٩٧٠ وهنا تم اكتشاف الفيروسات النباتية الثامنة ذات الحمض النووي DNA ثنائي الخيط (ds DNA) وكان التقدم الأهم في هذه الفترة هو استخدام الميكروسكوب الاليكترونى فى دراسة الفيروسات النباتية وحدث لتطور كبير فى الميكروسكوب الاليكترونى وكذا فى طرق تحضير العينات للفحص. وقد سمحت طريقة الصبغ السالب برؤية بعض تراكيب الفيروسات المنقاه. كما سمحت فحص القطاعات فائقة الدقة إلى دراسة تأثير بعض الفيروسات على الخلايا النباتية.

٤ - ١٩٧٠ - ١٩٨٠ وقد أدى التطور الكبير فى استخدام أشعة X عالية القدرة على إظهار التركيب ثلاثى الأبعاد للغطاء البروتينى لبعض الفيروسات كما أدى التقدم فى دراسة البروتريلاست إلى تقدم ملحوظ فى دراسة الطريقة التى تتضاعف بها الفيروسات داخل الخية. كما أدت الدراسات in vitro على RNA الفيروس إلى إعطاء بعض المعلومات عن استراتيجية جينوم الفيروسات النباتية.

٥ - ١٩٨٠ - ١٩٩٠ وهذه الفترة تميزت بالتقدم الذى حدث فى معرفة التتابع النيوكليتيدي فى الجينوم الفيروسي وكذا القدرة على إنتاج cDNA معدى من نسخ من ال RNA فى الجينوم الفيروس RNA مما سمح باستخدام تكتيكات التركيب الجينى. وقد أظهر لنا التتابع النيوكليتيدي بتفهم لتركيب الجينوم لمعظم مجموعات الفيروس النباتية. كما تقدمت طرق تشخيص الفيروسات التى تعتمد على تهجين الحمض النووي. كما

تزايدت الآمال لابتكار طرق حديثة لمقاومة الأمراض الفيروسية التي تعتمد على إدخال أجزاء من الجينوم الفيروس إلى نباتات بعض المحاصيل .

### نظرة على المستقبل في علم الفيروسات

من المنتظر أن يتسع مجال الدراسات في القرن القادم سواء في النواحي الأساسية أو العملية وأن يكون هذا المجال غير محدوداً وهذا يتأتى نتيجة للتطور المذهل الذى يحدث فى التكنيات القائمة على أساس تكنولوجيا تحديد الجينات .

### دراسات على التركيب البنائى :

لقد أدى استخدام التحليل بواسطة أشعة X المبلورة إلى زيادة معلوماتنا عن التركيب الدقيق لبعض الفيروسات الصغيرة ومع ذلك فإن هذا التكنيك يجعل مسألة التفسير الموضوعى ممكناً عن طريق إحلال حمض أميني محل آخر فى البروتين الفيروسي . وحيث من الممكن أن يؤدي إلى المزيد من تفهم تفصيلاً لديناميكيه العلاقة بين التركيب والوظيفة فى الكابسيد البروتينى سواء المبنى أو غير المبنى .

### تضاعف الفيروسات :

كثير من الأمور مازالت غير مفهومة فى عملية تضاعف الفيروسات :

- ١ - مثل مناطق التضاعف - وقت التضاعف والميكانيكية التى تم بها تخلص الجينوم الفيروسي من غلافه البروتينى بعد حقنه .
- ٢ - مناطق وميكانيكية تجمع الفيروسات *in vivo* من حزمة من الأحماض النووية والبروتين .
- ٣ - الميكانيكية التى بواسطتها الحمض النووى المحقون يستقر وينظم مواطن التضاعف داخل الخلية والتى قد يتعرض بعضها إلى حدوث تغييرات فى بعض أعضاء العائل .
- ٤ - دور عضيات ( مكونات ) خلية العائل فى تضاعف الفيروس .
- ٥ - الطريقة التى يتم بها تحويل كلى أو جزء من جهاز تمثيل البروتين فى خلايا العائل .

٦ - الطريقة التي يمتاز بها تستطيع الفيروسات توجيه العمليات البنائية في الخلية لإنتاج المركبات اللازمة لتمثيل الفيروس .

٧ - كيف يتم التنسيق بين الوقت . الموضع الذي يتم فيه تمثيل مكونات الجين داخل الخلية .

٨ - الاحداث المحددة لكمية الفيروس النهائية المنتجة داخل الخلية .

٩ - الميكانيكية التي تحدث وتضبط انتقال الفيروس من خلية لأخرى في النسيج المصاب .

وعموماً فإن الطرق العلمية والنظم الموجودة حالياً تسمح بالإجابة لعدد كبير من التساؤلات السابقة بينما يمكن الوصول إلى إجابات عن البعض الآخر خلال السنوات القليلة القادمة وهذه تشمل :

### ١ - الكائنات الانتقالية : Transgenic Organises

حيث التعبير عن الجين الفيروسي المفرد في النباتات الانتقالية يفتح الباب لإمكانيات عديدة لدراسة نقاط متعددة في تضاعف الفيروس *in vivo* بالإضافة إلى تطور النظام الناقل مما يؤدي إلى تطوير التعبير عن الجين الفيروس منفرداً أو بمصاحبة العديد من الانظمة في الترتيبات .

٢ - تطفرو أو إعادة بناء الفيروسات *in vivo* حيث إن القدرة على إحداث تغيرات أساسية *in vitro* أو بحقن في أماكن معينة في الجينوم الفيروس وتركيب الفيروس الهجين *in vitro* .

سوف يفتح إمكانيات عديدة لإجراء تجارب لتوضيح وظائف الجينوم الفيروس والبروتينات المشفرة من أجلها .

٣ - التوصيف في الموقع *in situ* transcrip حيث إنه تحت الظروف المناسبة فإن الـ RNA الرسول يمكن أن يعمل كقالب لإعادة النسخ في *in situ* خلال قطاعات من الانسجة المتينة وهذا يسمح بالتعرف على بداية عملية النسخ وخلال هذه الخطوة فإن النيوكليوتيدات المشعة تستعمل للتعرف على مسار أو تركز الـ RNA الرسول .

٤ - اختيار اللمرة المتسلسل PCR يعتبر طريقة جديدة فعالة التي تفتح المجال لإمكانية دراسة جزيئات الحمض النووي التي قد تتواجد فى نسخة واحدة أو عدة نسخ قليلة فى كل خلية.

٥ - تداخل الأحماض النووية حيث وجدت هذه الظاهرة فى النباتات المصابة بالأحماض النووية الصغيرة للفيروسات النباتية وهذه فى العادة تتكون نتيجة لطفرات فى الجينوم الفيروس الذى يتكون من ٥ أو ٣ تتابعات طرفية فى الجينوم مع حدوث تغيرات داخلية كبيرة.

وهذه من الممكن أن تصبح أدوات نافعه جداً لدراسة مختلف نواحي تضاعف، وميكانيكية بناء الجسيم كما أنها من الممكن أن تعطى فرصاً أكبر للتعديل فى طرق مقاومة الأمراض الفيروسية.

### ٢ - ٣ - أحداث المرض : Induction of the disease

إن دور الجين الفيروس وكذا دور جين العائل فى أحداث المرض يعتبر واحد من أهم المجالات التى يشملها البحث فى الفيروسات النباتية. أن الطرق السابق الإشارة من الممكن أن توصل إلى كثير من النقاط فى هذا الموضوع ولا عطاء مثال على ذلك فإن طبيعة المساحات الخضراء القائمة فى النسيج الذى يحتوى على قليل أو عدم وجود الفيروس مثل الذى يحدث فى أمراض الموزيك لم يمكن التعرف عليها بدقة بعد حيث إن هذه المساحات الخضراء القائمة من النسيج تعتبر مقاومة للإصابة وكان مفترضاً من فترة طويلة أن بعض العمليات مثل Lysogeny من الممكن أن تعطى المقاومة لمثل هذه الأنسجة ولكن حتى الآن لم نتوصل إلى طريقة يمكن بها إثبات تلك الفكرة. إلا أنه من الممكن باستخدام PCR من البحث عن نيوكليوتيدات RNA الفيروس فى صورة الـ DNA فى النسيج الأخضر الغامق وهذه الطريقة من الممكن أن تكون حساسة بدرجة كافية للكشف عن نسخة واحدة من الجينوم الفيروس أو جزء منه فى الخلية الواحدة إن وجد.

## ٢ - المجال العوائلى : Host range

إن حقيقة أن فيروس معين يمكن أن يصيب بعض الأنواع النباتية والأصناف دون غيرها حتى ولو كانت قريبة جداً لبعضها أخذ اهتمام الباحثين في مجال الفيروسات النباتية لعدد من السنين وتم التوصل إلى بعض الإصابات لكن مازال إجراء التجارب ممكناً لتوضيح ذلك فعلى سبيل المثال لو أن خليطاً من سلالات فيروس X البطاطس أخذت من الدنات وحققت في عائل أجبر من العائله الباذنجانية هو *Cyphomandra betaceae* نجد أن نوع معين من السلالات هو الذى يصيب هذا العائل جهازياً إلا أنه ميكانيكياً اختبار هذه السلالة للعائل مازالت غير معروفة وممكن قد يكون التنافس بين ترك البروتين الفيروسي المشفر مع العائل ويمكن اختبار هذه الفترة عن طريق تحديد التتابع النيوكليوتيدى للسلالات المختلفة ولو حدث الاختلاف في الجين المسئول عن التحرك فإنه يمن التغيير عن طريق تبديل الجين بين السلالات.

## ٢ - ٥ - البيئة : Ecology

بالرغم من أن دراسات قليلة قد أجريت على الفيروسات في بيئتها الطبيعية إلا أنه ليس هناك ما يمنع من إجراء مزيد من البحوث في هذا المجال . متى هذه الدراسات سوف توسع .