

الباب السادس

إنتاج نباتات خالية من الأمراض

أ- إنتاج نباتات خالية من الفيروسات

تسبب الفيروسات أمراضا كثيرة مثل موزايك البطاطس Potato mosaic وتورد القعة في 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، فعثلا تسبب فيروسات (V. Y) مرض التفاف الأوراق فى البطاطس وفقد ٣٠٪ تقريبا من المحصول العالمى من الدرناات، وانتقالها من جيل إلى جيل يؤدي إلى تدهور خطير فى محصول الدرناات 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 ١١ طنا إلى ٢٠ طنا بالمكتار 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 انتشار الإصابة. ويخترق الفيروس أنسجة النبات ببطء حتى يصل إلى نسيج اللحاء الحامل للمواد الغذائية الممتلئة وينتقل الفيروس إلى أجزاء النبات المختلفة بسرعة انسياب تيار المواد الغذائية الحاملة له وفى الاتجاه الذى تنجذب 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 حتى يكتمل تمددها وتصبح قادرة على بناء وتصدير المواد الممتلئة بدلا من جذبها. ويتقدم عمر النبات تنجذب المواد الممتلئة حاملة الفيروسات إلى مناطق التخزين مثل الدرناات والأبصال والثمار وغيرها، حيث تعتبر مناطق جذب أخرى (Sharabash, 1981 a, b; 1980; 1977.. وثبت أن تواجد الفيروسات 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 كالتالى:

- فيروسات تتحرك فى الخلايا الحية فقط.
- فيروسات تنتشر فى اللحاء فقط مثل فيروس تجعد الأوراق والتفاف الأوراق فى البطاطس.
- فيروسات تنتشر فى الخلايا البرانشيمية فقط مثل فيروس موزايك الخيار وفيروس تبرقش البطاطس. بالرغم أن سرعة تحرك الفيروسات منخفضة فى الخلايا البرانشيمية.
- فيروسات تنتشر فى الخلايا البرانشيمية واللحاء على السواء مثل فيروس موزايك التبغ.
- فيروسات تنتشر بصورة غير منتظمة فى أعضاء النبات المختلفة مثل فيروس تبرقش التبغ (TMV) Mosaic Virus Tobacco.

- فيروسات تنتشر فى مساحات من ورقة النبات يفصلها مساحات بينية خالية من الفيروس مثل موزايك نباتات البييتونيا والكرب 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 فى إظهار أعراض تبرقش أوراق البطاطس. وقد تظهر أعراض الإصابة الفيروسية على الأوراق على هيئة بقع صفراء أو خضراء باهته متبادلة مع مناطق خضراء داكنة (موزايك) كما فى البطاطس والقاصوليا والفلفل والقمح والقصب، أو فى صورة خطوط باهتة اللون Streak على أوراق القصب، أو اصفرار كما فى أوراق الخوخ. وقد تظهر الأعراض فى صورة التفاف أو تجعد الأوراق كما فى البطاطس والطماطم، أو تقزم للسوق كما فى القمح والشعير، أو تقرحات على السوق كما فى قوباء الموالح. وقد تظهر الأعراض على الأزهار مثل تدهور Breaking out أزهار التيوبل وندوة البراعم Bud blight فى فول الصويا. وقد تظهر على الثمار على هيئة تبرقش كما فى موزايك الخيار.

الاحتياطات اللازمة لإنتاج نباتات خالية من الفيروس

الأدوات المستخدمة فى التكاثر الخضرى هى المصدر الرئيسى للغالبية العظمى لعدوى وانتشار الفيروسات بين النباتات. ولو حظ 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 الفيروسية، ويفضل تنميتها فى صوبة نظيفة خالية من الفيروسات ومحمية من مسببات الإصابة بالفيروسات مثل الحشرات الماصة والقوارض والنيماطودا.

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

٣- الارتفاع بمستوى النظافة الشخصية للعاملين ونظافة ملابسهم وأحذيتهم.

٤- تكون جميع مراحل الزراعة العملية تحت ظروف معقمة.

٥- المحافظة على النباتات الجديدة الناتجة في المعمل ومنع إصابتها. وقد يستلزم إبقاء النباتات الخالية من الفيروسات نامية في 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 رئيسى أو جانبى جميعها مناسبة للزراعة العملية. وتختلف نسبة النجاح باختلاف موقع البرعم وعمر الساق الحامل للبرعم إن كان حديثاً أو معمرًا. 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 المرستيم 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 في المرستيم على إعاقة انتقال الفيروس إليه (White, 1934a).

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

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

– احتمال وجود مثبطات نمو طبيعية في الخلايا المرستيمية تكون سببا في 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 في بذور بعض الأنواع النباتية.

المعاملات المساعدة للتخلص من الفيروس

(أ) المعاملة الحرارية

هي وسيلة فعالة في تثبيط نشاط العديد من الفيروسات المتماثلة في 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. وفي هذه الحالة يفضل المرستيم ثم يحضن بعد زراعته مباشرة في العمل عند ٣٥-٣٨ م° لمدة ٥-١٠ أسابيع. وتساعد هذه الطريقة بنجاح على التخلص أو خفض كثافة الفيروس في البطاطس والكريزانثم والقرنفل والقراولة.

٢- معاملة النباتات بالحرارة

نظرا لصعوبة الحصول على المرستيم أحيانا. لذلك تطبق المعاملة الحرارية على النباتات العملية لهذه النباتات. وتعتبر البراعم الإبطية أكثر الأجزاء استجابة للمعاملة الحرارية. وقد ثبت نجاح المعاملة الحرارية للنباتات العملية عند ٣٠-٣٨°م للتخلص من الفيروسات والميكوبلازما التي تصيب بعض أشجار الفاكهة وبعض المحاصيل مثل قصب السكر والكاسافا (Morel, 1964). وبالمعاملة الحرارية يمكن التخلص من فيروس تبرقش الخيار Cucumber mosaic virus من الأفرع النامية بالعمل كذلك يمكن التخلص من فيروسات البطاطس بتخزين الدرناات عند ٣٧-٣٨°م لمدة شهر قبل فصل المرستيم منها لزراعته في العمل (Morel, 1964).

(ب) المعاملة بالمواد الكيميائية

انتشار الكائنات الدقيقة مثل الفيروسات والميكوبلازما والبكتيريا والفطر داخل أو بين الخلايا يحول دون وصول المبيدات إليها والتخلص منها. وقد تضاف مركبات مثل Vidarabine; Virazole (Ribavirine) إلى البيئة الغذائية للمساعدة على تثبيط نمو هذه الكائنات الممرضة، ويؤخذ عليها ارتفاع ثمنها. وإضافة مركب Virazole (Ribavirine) لبيئة نباتات الليلي Lily والتفاح يؤدي إلى إنتاج نباتات خالية من الفيروسات. ويثبط مركب Vidarabine عملية التمثيل الضوئي Antimetabolites في النبات. كما أن إضافة المضادات الحيوية والمبيدات البكتيرية مثل Rifampicin, Penicilin- G, Oxytetracycline, Tetracycline, Streptomycin, Achromycin, Chloromycine, 8- Hydroxy quinoline, Gentamycin. للبيئة غير مرغوب فيه لعدم تأثيرها على الفيروسات، وأن لها تأثيرا ميثبطا فقط على البكتيريا والفطريات العالقة على الأسطح الخارجية للجزء النباتي، وليس لها تأثير على الإصابة المنتشرة داخل الخلايا أو بينها. وإضافة المبيدات البكتيرية إلى المسزاع العملية بالتركيز

المناسب لقتل البكتريا قد يكون له تأثير سام للنباتات النامية، خصوصا المركبات التي لها تأثير ضار على الريبوسومات أو تكوين مركبات سامة ناتجة من تفاعلها مع مكونات البيئة الغذائية. ويؤدي التركيز العالي 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 بيروتوبلاست.
- ٤- تطعيم المرستيم على أصول جذرية Rootstocks خالية من الفيروس.

١- زراعة مرستيم طرفي 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 تعمس لمدة قصيرة في كحول ٧٠٪ للتخلص من الهواء المتبقى بين قواعد الأوراق والأجزاء الأخرى.

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

تعقم العقل الطرفية مرة ثانية في محلول مخفف من هيبوكلوريت صوديوم، ثم تشطف في ماء مقطر معقم. ويفضل الشطف في 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 بوحدة أو اثنتين من الوريقات الأولية (منشئات الأوراق) للمحافظة على رطوبته وحيويته. مع العلم بأن زيادة حجم المرستيم

وزيادة عدد الوريقات حوله يقلل كثيرا من فرصة الحصول على نباتات خالية من الفيروس.

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

البيئة المناسبة لزراعة المرستيم

يختلف كثيرا المحتوى الكيميائي للبيئة المناسبة لزراعة المرستيم باختلاف مرحلة نموه، إن كانت لإنتاج نباتات أو جذور وباختلاف النوع والصنف النباتي. لذلك يفضل الاستفادة من خبرة السابقين في اختيار البيئة المناسبة أو يقوم الباحث بنفسه بتحديد البيئة المناسبة.

يزرع المرستيم عادة في بيئة صلبة وأحيانا في بيئة سائلة مع استخدام كبار ورقية لتثبيته. وتضبط الحموضة عند 5.4-6 pH، ويضاف إليها السكروز بنسبة ٢-٥٪ (وزن/حجم) وبعض الفيتامينات مثل Vitamin-B1; Pyridoxin; Panthothenic; Nicotinic acid. وتضاف الأكسينات والسيبتوكاينينات بتركيزات ٠,١-٠,٥ ملليجرام/ لتر لأهميتها في تنشيط انقسام الخلايا. ويضاف الجبرلين GA₃ أحيانا لتشجيع استطالة الجذر. ويضاف السيبتوكاينينات أحيانا في مرحلة متأخرة وليس بعد فصل المرستيم مباشرة لبعض النباتات مثل البيلارجونيم Pelargonium لتلافى ظهور اللون البنى الذى تسببه السيبتوكاينينات (Morel, 1964; Debergh and Maene, 1977).

الظروف البيئية المحيطة

تحضن المرستيمات بعد زراعتها عند ٢١-٢٥°م ١٤-١٦ ساعة يوميا ضوء فلوروسنت شدته ٨-١٢ وات/ ٢م. وتحتاج معظم نباتات الأبصال إلى حرارة أقل. وقد تستخدم لمبات أقل قوة فى الأيام الأولى من زراعة المرستيم (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 معمل

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

لإنتاج نباتات خالية من الفيروس، وقد ثبت نجاح هذه الطريقة في الحصول على نباتات تبغ وعنب وليملي وجلاديولس وموالح 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 قدر كافٍ من المواد الغذائية اللازمة لنمو وتكاثر الفيروس. وتكرار الزراعة الثانوية لكالس نبات التبغ والبطاطس يؤدي إلى إنتاج كالس خالي من فيروس البطاطس Po-tato X-virus. وأمكن الحصول على كالس ونباتات خالية من الفيروس من زراعة متوك نبات *Pelargonium*. وتم عزل بروتوبلاست من مناطق داكنة الاخضرار من أوراق نبات تبغ كانت مصابة بفيروس (TMV). ونتج عن هذا البروتوبلاست نباتات خالية من الفيروس (Mori, et al., 1982). وفي الواقع أن إنتاج نباتات خالية من الفيروس من الكالس والبروتوبلاست لها أهمية عملية لمربي النباتات لحدوث تغييرات وراثية ونسبة إطفار عالية.

٤- تطعيم المرستيم على أصول جذرية خالية من الفيروس

يساعد التطعيم *Micro-grafting* على إنتاج نباتات معملية خالية من الفيروس خصوصا للأنواع الخشبية التي يصعب عليها تكوين الجذور في المعمل. ويتم التطعيم بنباتات معملية خالية من الفيروس على شتلات أصول جذرية عمر ٢٠-٤٠ يوما تعرضت للحرارة ٣٧-٣٨ م. ويفضل ألا يزيد عمر شتلات الأصول الجذرية عن بضعة أشهر. ويمكن إكثار هذه النباتات مستقبلا بفصل براعم من النموات الجديدة ثم تطعم على شتلات 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

داليا Dahlias خالية من الفيروس وذلك بتطعيم نباتات داليا معملية بدون جذور وخالية من الفيروس على شتلات داليا كاملة النمو وخالية أيضا من الفيروس. وإذا كانت نباتات الداليا المعملية متقدمة في العمر ولم تتكون عليها جذور، فيمكن فصل عقل منها ثم تطعم على شتلات 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 على أعداد كثيرة منها يمكن استخدامها في تطعيمات جديدة. وتنخفض نسبة نجاح المرستيمات المطعمة على نباتات خالية من الفيروس إذا أصيبت بالفيروس أو تعرضت للجفاف أو كانت البيئة الغذائية غير مناسبة أو كانت ساكنة (Morel, 1964). وبهذه الطريقة تم إنتاج نباتات موالح ومشمش 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 *Che-nopodium quinoa*; *Comphrena globosa*; *Chenopodium amaranticolor* وأنواع التبغ Tobacco. حيث تجمع 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 الإلكتروني Electron microscope

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

٢- 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 في الموز

فيروس تورد القمة (Banana Bunchy Top nanavirus (BBTV) من أخطر الأمراض التي تصيب الموز في العالم. وينتشر في 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 في واحد مليلتر منظم فوسفات ملحي (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 في تركيزاته المرتفعة والمنخفضة في عصارة العرق الوسط لنبات الموز بالمقارنة بغيره من الأجهزة مثل DAS-ELISA و PCR (Sadik, 1994).

(ب) إنتاج نباتات خالية من الفطريات

تنتشر جراثيم الفطر في الهواء والتربة. وبسقوط جرثومة على بيئة مناسبة تمتص منها الماء وتنبت منها أنبوبة جرثومية. وتعتمد الجرثومة في هذه المرحلة على ما يحتويه جسمها من مواد غذائية حتى تتمكن من العائل. وتعمل معصاتها Ap- pressorium على تثبيت النيسليوم أثناء نموه وانتشاره. وقد يخترق النيسليوم بشرة النبات مباشرة عن طريق الضغط الميكانيكي 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*. خالية من فطر *Fusarium roseum f. cerialis* وفطريات *Fusarium oxysporum* *Pseudomonas carophylli*; *Pecto-* وبكتريا *f. dianthi*; *Phialophora cinerescens* *bacterium parthenii*. وبزراعة المرستيم يمكن إنتاج نباتات جلادايولس خالية من فطر *Fusarium oxysporum f. gladioli* وهو مرض خطير يصيب الجلادايولس، 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 منيعة 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 الأنثوية الجرثومية من اختراق الأنسجة.
- وجود مواد كيميائية سامة تؤثر على نمو الميكروب وتوقف نموه.
- ارتفاع الضغط الأسموزي 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 ملائمة 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.

