الباب الحادى عشر

إنتاج نباتات خالية من الفيروس باستخدام زراعة الأنسجة

Production Of Virus Free Plants Using Tissue Culture

obeikandl.com

obeikandl.com

إنتاج نباتات خالية من الفيروس
بأستخدام زراعة الأنسجة
Production Of Virus Free Plants Using Tissue Culture

إن التزايد العددى للفيروس عادة ما يكون مصاحبا لعمليات تمثيلية عادية فى النبات، دون أن يتدخل فى هذه العمليات. ومن المعروف أن هناك بعض المثبطات 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 الأصلى.

كما أن قتل الناقلات الحشرية والنيماتودية قد لايمنع انتشار 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 انسجة النبات، ومثل هذه الفيروسات لا يمكن مقاومتها بأستعمال المبيدات الحشرية.

ومن حسن الحظ أن أغلب الفيروسات المعروفة لا تنتقل عن طريق البذور أى إن بذور النباتات المصابة تنتج فى أغلب الأحوال 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 مصابًا 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 مختفية فإنه يجب اللجوء إلى عمليات الاختبار الروتينية مثل التشخيص السيرولوجى والبيولوجى باستعمال نباتات الاختبار، وكذا الميكروسكوب الإلكترونى أما

بالنسبة لتلك المحاصيل التى تكون مصابة تماما بالفيروسات، فإن هناك طرقًا 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 والببتون. واستطاع White, 1943 زراعة جذور طماطم مصابة بفيروس TMV فى المعمل. وبتقطيع هذه الجذور واختبار المناطق المختلفة بالحقن على عائل يعطى أعراضًا موضعية للفيروس. تأكد أن تركيز الفيروس فى المناطق الأمامية أقل بالمقارنة بالأجزاء القاعدية، أما قمة الجذر فلم يوجد دليل على احتوائها على الفيروس. أيضا لاحظ Limasset & Cornuet , 1949 أن النباتات المصابة جهازيًا 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 افترضا أنه يمكن عزل المرستيم الطرفى (apical meristim) فى النباتات المصابة جهازيا فى المعمل، وذلك للحصول على نباتات، خالية من الفيرس. 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 ـ تعريف الفيروس وتشخيصه.

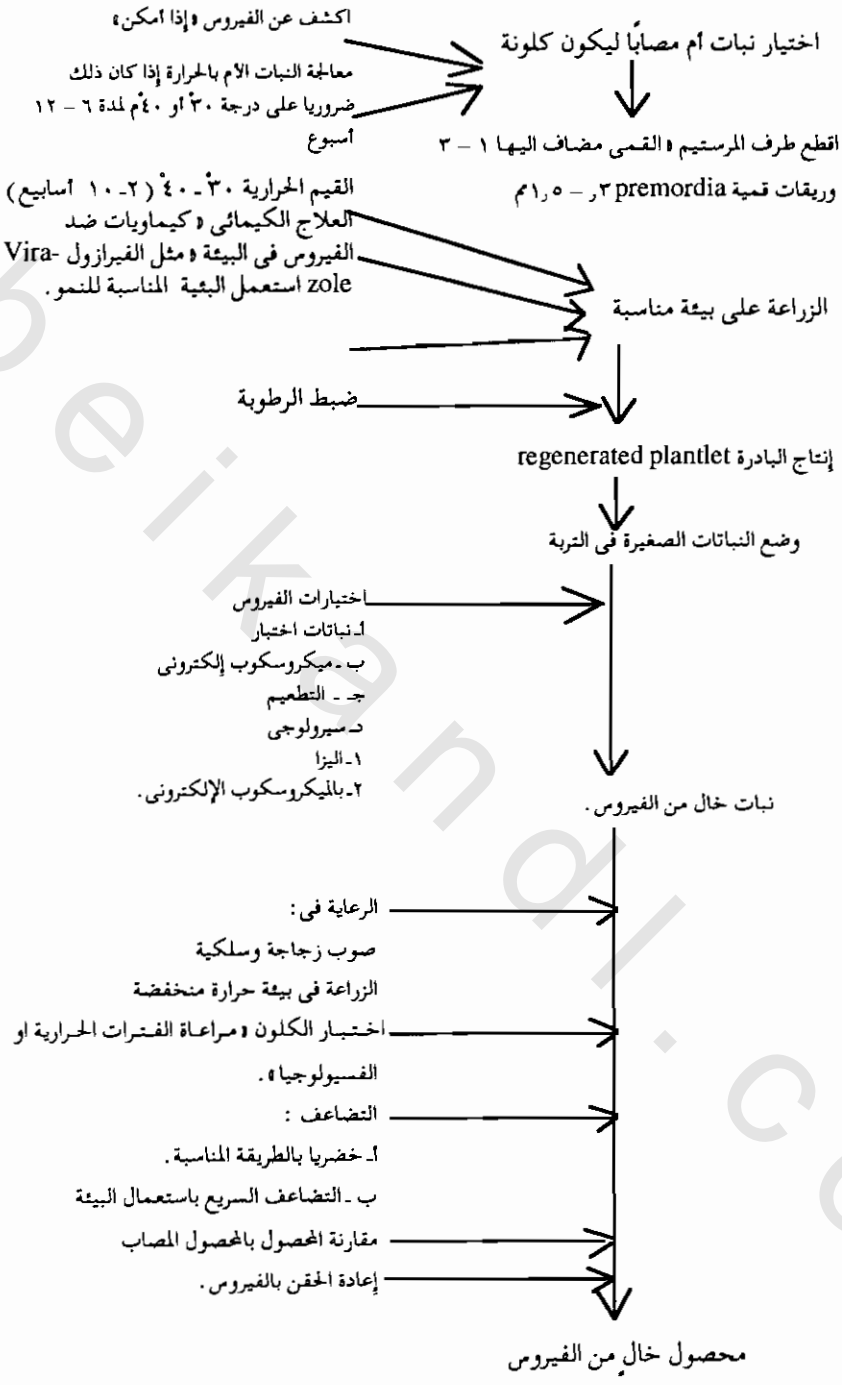
٢ ـ العلاج.

٣ ـ اختبار النباتات المعاملة.

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

وعند استعمال اصطلاح Virus free فإنه سوف 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 معروفًا أن مثل النباتات لا تكون منيعة، ولكنها قد تصاب مرة أخرى.

obeikandl.com



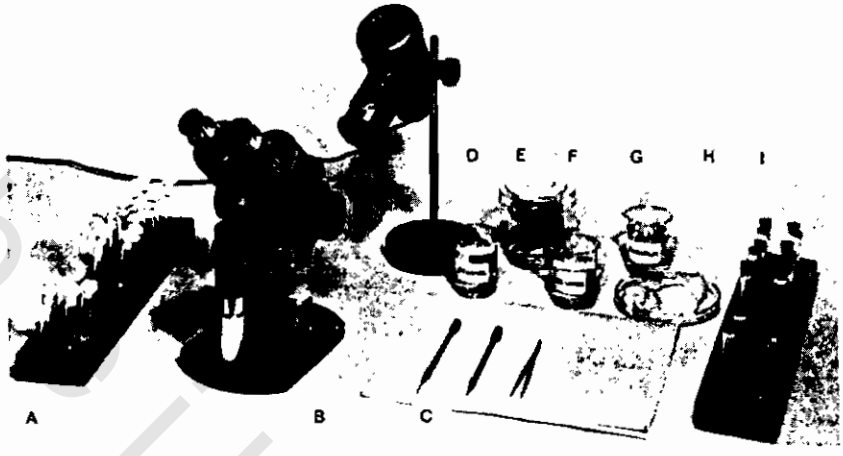
(شكل: ١١ – ١) - تخطيط يوضح إنتاج نباتات خالية من الفيروس بزراعة قمة المرستيم فى البيئة -

وقد نجح العلماء فى تدعيم هذه الطريقة عندما أخلوا نبات الداليا من الفيروسات حيث وضعت بعض المرستيمات المفصولة على بيئات مغذية مختلفة، فأعطت نباتات بطول ١ـ ٢ سم دون جذور، وبتطعيمها على بادرات صغيرة خالية من الفيروس حصلا 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 (١ر٠ سم) قطرًا، و (٢٥ر٠ م) طولاً. وكقاعدة يقطع المرستيم فى كل من الفرع الرئيسى أو البراعم الإبطية، وتأخذ الاسم نفسه. تكون فرصة النمو غالبًا أقل عندما تقطع من المرستيم واحد أو اثنين من منشأ الورقة (Leaf primordia)، أما القمم التى تكون حوالى (١م) 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 ـ ٢٠ دقيقة، ثم تغسل عدة مرات فى ماء معقم. إذا لم تتوفر غرفة معقمة يجرى تقطيع المرستيمات فى معمل خالٍ من الأتربة، ومن المرغوب جدا رش المكان بالكحول قبل الاستعمال. ويحتاج بينوكلار تكبير (٢٠ ـ ٤٠x)، ويعقم بعد كل عزل بواسطة قماش مبلل بالكحول. بجانب البينوكلار يوضع ٦ ـ ١٠ قطع ورق ترشيح معقم، و٢ بيكر سعة ١٠٠ مل يملا 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 البينوكلار 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 مفلطحًا واحتواؤه على Primordia عند القطع غير متاح.



شكل (١١ – ٢): الأجهزة والأدوات التى تستعمل فى قطع المرستيم لزراعتها على بيئة فى الأنابيب «أ» ميكروسكوب «x ١٠ ـ ٤٠»، ولمبة «ب» ورق ترشيح معقم، وعليه إبرة وسلاح مشرط وملقط «C» إيثانول «D»، براعم معقمة «E» ، ماء معقم «F»، براڤين ، معقم في إيثانول «G» قطعة قطن معقم في الإيثانول «H» أنابيب معقمة ومغطاة ببراڤين معقم «I».

بعد ذلك توضع العينة فى بيئة مغذية فى أنبوبة الزراعة بواسطة قضيب النصل ببطء واحتراس. وفى البيئة السائلة ترتكز المرستيمات على قنطرة من ورق الترشيح المغمور جزئيا فى السائل.

تستعمل أشكال وأحجام من أنابيب الزراعة، خصوصًا الأنابيب الضيقة (قطر ١٠ مم) ويستعمل زجاج بيركس، وتغطى الأنابيب بأغطية بلاستيك أو ألمونيوم.

كما يمكن استخدام سدادات من القطن، على أن تعقمها باللهب، ثم تغطى بالبرافين ويجب أن يكون إغلاق الأنابيب محكمًا، وهذه الطريقة فى غلق الأنابيب تمنع تلوثها لاثنى عشر شهرا.

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

على القمة النامية.

فى البداية وضعت البيئة المغذية بواسطة بيئة هوايت White, 1934، والتى يضاف إليها عناصر محدودة، وبعد ذلك أضيفت تحسينات عديدة للبيئات. وهناك بيئة جديدة وضعت بواسطة موراشينجى وسلوج Murashinge & Sloog, 1962 (جدول ١١ – ١)، وهى تتميز بتركيز عالٍ من أيونات البوتاسيوم والأمونيوم والـ myo - inositol، ووجدا أن زيادة التركيزات مهمة فى حالة زراعه قمة المرستيم فى البطاطس، والتى تعطى نباتات أكثر اخضرارا وأقوى نمواً عن التى أضيفت إليها تركيزات قليلة من العناصر الكبرى. ويضاف الحديد فى أشكال مختلفة، ويبدو أن iron - Chelate كان أحسنها. وكمصدر للكربون يضاف الجلوكوز ، الفركتوز أو السكروز والأخير أكثر استعمالا. وبجانب خليط من الفيتامينات، درس تأثير أنواع من مشجعات النمو. رغم أنه من المعروف أن الأوكسين Napthalene Acetic acid (NAA) والاوكسين 3- indole acetic acid «IAA» تنبه تكوين الجذور، ولكن استمرار استعمالها قد يثبط نمو الجذور. وعملية نقل المرستيم القمى 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 التى استخدمها مولر

(١٩٦٤) فى زراعة القمم المرستيمية

1 - Major salts	١ – أملاح رئيسية	mg l
$Ca(NO_3)_2 . 4H_2O$	كربونات كالسيوم	500
KNO_3	نترات بوتاسيوم	125
$MgSO_4 . 7H_2O$	كبريتات مغنسيوم	125
KH_2PO_4	فوسفات بوتاسيوم	125
KCl	كلوريد البوتاسيوم	1000
$(NH_4)_2 SO_4$	كلوريد الأمونيوم	1000
Minor elemnts	عناصر صغرى:	
$FeCl_3 . 6H_2O$	كلوريد الحديديك	1
$ZnSO_4 . 4H_2O$	كبريتات الزنك	1
$H_3 BO_3$	حمض البوريك	1
$MnSO_4 . 4H_2O$	كبريتات المنجنيز	0.1
$CuSO_4 . 5H_2O$	كبريتات النحاس	0.03
$AlCl_3$	كلوريد الالومنيوم	0.03
$NiCl_2 . 6H_2O$	كلوريد النيكل	0.03
KI	يوريد البوتاسيوم	0.01
Organic constituents	مكونات عضوية (١)	
Gibbrllic acid	حمض الجبريليك	0.1 mgl
Sucrose	سكر	20 g.l
Difco agar	آجار	6 g.l
2 - Organic contstituents II (alternative)	**٢ – مكونات عضوية**	
Mg	مغنسيوم	100
Difo agar	آجاد	1
Myo - inositol	انيوسيتول	1
Ca- pantothenate	بانسوثينات الكالسيوم	1
Nicotinic acid	حمض النيلوتين	1
Pyridoxine HCI	بيريدوكسين	1
Thiamine HCL	ثيامين	0.1
X- Napthalene acetic acid	نفثالين حمض الخليك	0.01
Gibberellic acid	حمض الجبريليك	20 gl
Biotin Sucrose	بيوتين – سكر	6 gl

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

أما تأثير حمض الجبريليك Gibberellic acid فقد وجد أن له تأثيراً خاصًا؛ 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 - أيضا إذا تواجد NAA يكون من الضرورى النقل الى بيئة مشابهة خالية من حمض الجبريليك وأما السيتوكنين « Cytokinin » قد يحتاج إليه لتشجيع المرستيم الساكن على النمو، وقد يضاف أيضا المواد heat Iabile بعد تعقيمها بالترشيح الدقيق.

بمجرد نمو المرستيم وإخراج جذور تنقل إلى أصص صغيرة، تحتوى خليطًا 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 الإلكترونى أو بالحقن على العوائل المشخصة. وحتى يأخذ التركيز القليل جدا من الفيروس المحتمل تواجده فى النبت 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 فى البرعم. وفيما بعد وجد فى 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 فى الزراعة. وكما ذكر بواسطة Stone, 1968 فى القرنفل المصاب بفيروسات Iatet, Vein mottle, carnation mottle. يختلف حجم القمة من (١ر٠ - ٢مم) فى القطر، وهذه القمة تتكون غالبًا من قبة مرستيمية (meristematic dome) واثنين أو أكثر من Leaf primordia. عمومًا يتناسب عدد النباتات الخالية من الفيروس الناتجة تناسباً عكسيًّا مع حجم القمة. هكذا فى بعض الحالات من الممكن قطع مرستيم قمى خالٍ من الفيروس من عضو نباتى مصاب، وإعادة إنباته ليعطى نباتاً سليمًا. ولكن فى حالات أخرى تستأصل الفيروسات من المرستيم القمى أثناء زراعة النسيج.

فى نباتات عديدة يكون من المستحيل قطع القمة بحجم صغير لتجنب الفيروس أو القضاء عليه in Vivo فيما بعد. وفى هذه الحالات يجب أخذ قمة كبيرة للزراعة، وهذه بالتالى تحتوى تركيزاً عاليًا من الفيروس، ورغم ذلك يظل الاحتمال قائمًا فى الحصول على نباتات خالية من الفيروس من هذه الأنسجة المصابة بواسطة المعاملة الحرارية أو بالكيماويات.

لوحظ أيضًا أن إخراج الجذور قد يتأثر بحجم النسيج المزروع. فقد وجد Stone, 1963 أن قمة القرنفل الأصفر من (٢ر٠ مم) لا تعطى جذوراً، وبينما الأكبر من (٧٥٠ر مم) تنتج نباتات محتوية على mottle virus. القمة التى يتراوح طولها بين (٢ر٠ - ٥ر٠مم) لها فرصة أحسن فى إنتاج نباتات خالية من الفيروس. وفى حالة Cassava القمم أكبر من (٢ر٠مم) فقط تعطى نباتات كاملة، بينما تعطى القمم الأقل من (٢ر٠مم) تعطى إما كالوس أو كالوس مع جذوره. فى كل أصناف Cassava الهندى والنيجيرى، لا يعتبر وجود leaf primodia أساسيًّا لإنتاج نباتات. ولكن فى rhubarb من المهم قطع القمم ذات ٢-٣ primordial Leaves والقمم الأصغر لا تنمو.

٢ ـ درجة pH البيئة:

درجة حموضة البيئة لها تأثير محدود على النمو، وعمومًا تكون بين ٥,٥ ـ ٨,٥، ويجب الأخذ فى الاعتبار انخفاض pH أثناء التعقيم بالأوتوكلاف. ذكر Stone, 1963 أن المرستيمات القمية للقرنفل تنمو أحسن على pH5.5 (حوالى ٥٩٪) عن pH 6 (حوالى ٤٪) لاحظ Mellor & Stace Smith أن درجة pH فى البيئة تنخفض خلال أسبوع من ٥,٧ الى ٥,٤. يثبط إخراج الجذور عند انخفاض pH البيئة.

٣ ـ الضوء والحرارة والموسم:

أنابيب الزراعة المحتوية على المرستيمات القمية توضع تحت ضوء فلورسنت، ولأغلب النباتات ١٦ ساعة ضوء يومياً وحرارة حول ٢٢°م تكون كافية. المرستيمات القمية فى البطاطس تنمو أحسن على ٢٥°م، بينما الأبصال قد تحتاج لحرارة ١٢ ـ ١٥°م. وبخصوص النسبة البلارجونيوم، 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 فى بداية الربيع وبداية الخريف عن الشتاء والصيف. بينما ذكر Vanos, 1964 أن المرستيم القمى فى القرنفل المعزول فى الشتاء يخرج جذوراً بسهولة اكثر، ولكن المرستيمات المعزولة فى الصيف تعطى نسبة عالية من النباتات الخالية من الفيروس.

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

٤ ـ المعاملة الكيماوية: Chemotheropy

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

التجارب التالية والتى 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 كيماويات (anti - metabolite) مثل Virazol (Ribavirin) فى بيئة الزراعة تكون أكثر كفاءة. هذه الكيماويات 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، وحديثًا وجد أن الفيرازول بتركيز (50 - 100 mg/1) استأصل فيروس موزايك الخيار من أنسجة *N. rustica*.

٥ ـ المعاملة الحرارية : Thermotherapy

فى سنة ١٨٨٩ ذكر فى جاوا أن قصب السكر الذى يعانى من مرض Sereh المتسبب عن فيرس ينمو أحسن بعد حفظه على ٥٠ـ٥٢م فى الماء لمدة ٣٠ دقيقة (Kobus, 1890). وكانت تستعمل أيضًا ضد فرض تقزيم الخلفة والخلل البكتيرى فى مناطق كثيرة من العالم؛ حيث كانت عدة آلاف من الآطنان من قطع قَطب السكر، تعامل كل سَنة 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 أيضًا أن النتيجة تكون أفضل إذا نميت الأشجار لمدة ٣ـ٤ أسابيع فى الهواء الساخن ٣٥ـ٣٨م. وفى الحقيقة المعاملة بالماء الساخن عمومًا، تكون أقل ضررًا للنباتات او 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 تمامًا بحفظه على هذه الدرجة. قد يعزى استئصال الفيروس هكذا بالتعريض الطويل للنباتات المصابة لدرجة حرارة حول ٣٧°م إلى النظام التمثيلى، الذى يغير التوازن بين تخليق الفيروس وانهيار الفيروس فى النبات، أو إلى فشل الفيروس فى التضاعف على هذه الدرجة، وعمومًا الفيروسات التى يمكن استئصالها بالحرارة هى الكروية. وهناك فيروسان غير كرويين معروفان، يمكن استئصالهما بالمعاملة الحرارية هما Plum pox virus & Apple chlorotic leaf spot.

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

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

تستأصل فيروسات كثيرة من قمة الفروع المأخوذة من النباتات النامية، وتحفظ على حرارة حوالى ٣٧°م 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؛ خصوصًا النباتات التى يسهل زراعة قمتها أو تطعيم قمتها.

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 فى عدد من الأصناف فقدت الفيروس الذى 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 قليلا 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 يثبط تضاعف الفيروس؛ حيث إن المعاملة الحرارية قد تعوق التمثيل الغذائى وتخفض النمو فى 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 يومًا على الترتيب تنتج نسبة مئوية من النباتات الخالية من الفيروس تزيد من ٩ حتى ٩٠ تقريبا، فى حين أن المعاملة الحرارية لمدة ٤٠، ٥٠، ٦٠ يومًا لا تغير هذه النسبة المئوية، ولكنها تخفض بوضوح عدد المرستيمات النامية. يبدو أن التأثير يختلف حسب الصنف تحت الدراسة، فبالمقارنة وجد أن الصنف Migoli ينتج عددًا قليلاً من النباتات بعد ٢٠، ٣٠ يومًا من المعاملة الحرارية، والتى 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 ٣٥°م أسرع، ونسبة عالية منها وصلت للنضج عن الأخرى غير المعاملة، والتى كانت أيضا خالية من Crinkle and Vein chlorosis.

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

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 بطيئًا ونسبة النباتات الخالية من الفيروس صغيرة (مثل حالة

القرنفل). وفى هذه الحالات تكون المعاملة الحرارية المسبقة، وأيضًا قطع القمم بطول «١-٢مم» لها فرصة أحسن فى النمو والبقاء، معطية نباتات خالية من الفيروس.

تواجد الفيروس فى الأنسجة المرستيمية : Virus in meristematic tissue

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

ودعمت هذه النظرية بملاحظات Crowley & Mamson, 1960، حيث ربطا بين طول قمة الجذور الخالية من الفيروس فى نباتات الطماطم المصابة بالفيروس بالحد الذى يحدث عنده الانقسام الميتوزى. تسبب مثبطات النمو فى البيئة تقصيراً فى منطقة الانقسام الميتوزى فى قمة الجذر، وتتحدد المنطقة الخالية من الفيروس بالحدود نفسها. ذكر Hollings & Stone, 1964 أن المرستيم القمى المفصول من نباتات القرنفل المصابة بفيروس Carnation mottle تحتوى هذا الفيروس فى تركيزات، يمكن أن تعطى البقع الموضعية فى *C. amaranticolor*، فى حين أن بعد ٣٠ ساعة على بيئة مغذية تصبح المرستيمات غير معدية، ولذلك يقترح أن التفاعل مع البيئة المغذية يمنع تواجد الفيروس فى القمة. النتائج نفسها وجدت بواسطة Walkey et al, 1969 فى المرستيم القمى فى *N.rustica* المصاب بفيروسات Cherry leaf roll أو Arabis mosaic؛ حيث فصلوا المرستيمات دون leaf primordia، وطحنوا كل مرستيم فى نقطة من فوسفوتنجستات الصوديوم، التى توضح رؤية جزيئات الفيروس الكروية. وبالميكروسكوب الإلكترونى شوهدت جسيمات فيروسية، مع أن هذه القمم المزروعة تعطى نباتات سليمة. وقد ثبت أيضًا وجود الفيروسات العصوية S, X, M فى الميرستيمات القمية المفصولة من البطاطس، والتى تعطى غالبًا 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 تنافسًا بين تخليق الفيروس، وبين تخليق النيكلوبروتين 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 تمامًا 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 خضريًا خالية من الفيروس. وهدف تطبيق هذا التكنيك مضاعف؛ فالنباتات الناتجة تمدنا بمادة نباتية، يمكن دراسة تأثير الفيروسات فيها، وأيضًا تشكل قاعدة للإنتاج التجارى. ويجب أن نضع فى اعتبارنا أن استئصال الفيروس لا يعطى مناعة، ويجب توقع إعادة الإصابة «الانتكاس». وأيضا 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 الأعراض 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 أعراضًا على الأوراق، وتخفض كلاً من نوعية وكمية المحصول. النباتات المصابة بالتبقع الحلقى تكون أكثر فقراً فى إنتاج الأزهار عن النباتات السليمة ويسبب فيرس Vein mottle انكسار لون الأزهار.

استأصل Stone 1973 فيروسات Narcissus degeneration, Arabis mosaic من نبات

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

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

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

إن إنتاج بذور القنبيط يكون من أمهات مختارة بعناية، والتى تكون ناتجة من محصول متكاثر خضريا لعدة أعوام، تكون مصابة بشدة بالفيروسات، والذى قد يؤدى لخفض محصول البذور وموت النباتات؛ وباستعمال زراعة أنسجة القنبيط نجح Walkey سنة ١٩٧٤ فى 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 أعراضًا على البلارجونيم، إلا أنه لوحظ أن النباتات الناتجة من المرستيم القمى كانت أقوى من العادية، وتعطى ٢٠ـ ٣٠٪ حشات 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 ناميا إما فى الحقل أو فى الصوب، وقد

يحتاج أعوامًا عديدة كفترة زراعة .

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

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

التسجيل ـ 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 الإلكترونى للورقة والعصير النباتى، والنقل بالعصير إلى العائل القابل للإصابة، والاختبارات السيرولوجية المختلفة... كوسائل للاختبار. وحديثًا حيث تستخدم ELIZA والفحص بالميكروسكوب الإلكترونى للسيرولوجى توفرت طرق عالية الحساسية.

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

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

ظهرت دلائل كثيرة على أن النباتات الناتجة من قمة المرستيم عادة تظهر قليلا أو لا تظهر اختلافات وراثية عن النباتات الأصل. ومن الضرورى اكتشاف أى تغيرات طفيفة فى الصفات الزراعية للنياتات 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 الراوئد سجلت تغيرات كبيرة فى كمية الحرارة المنخفضة اللازمة لكسر السكون (Case, 1973)، وبالتالى 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 كمّاً ونوعًا، 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. وعموما يمكن القول أن الفيروسات المحمولة بالمن تكون أول ما ينتكس، خصوصًا 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 خصوصا فى المناطق الشمالية الباردة من العالم. سنة ١٩٣٣ سجل أكثر من ٦٠٠ صنف، وهى فى ازدياد عامًا بعد عام. وكثيراً ما تختفى أصناف عديدة تكون مرغوبة وذات إنتاج عالٍ لتدهورها تدريجيا فى القوة وكمية المحصول، قبل أن نكتشف أن هذا التدهور نتيجة الإصابة بفيروس أو أكثر. وعندما تسبب هذه أعراضًا 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، وأمكن معرفة أن كل الأصناف المهمة مصابة بواحد أو أكثر من الفيروسات المعتدلة أو الكامنة.

ب ـ خسائر المرض: Disease losses

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

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

تبعا لذلك استعمل تكنيك زراعة الأنسجة لإنتاج نباتات خالية من الفيروس فى صنف كنج إدوارد، وتم مضاعفة الـ 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 ٢ـ٣ أسابيع فى الأرض تكون أكثر قابلية للعفن الجاف Fusarium عن الدرنات المصابة بفيروس PVX، بينما التى حصدت بعد ٤ ـ ٥

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

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

جـ ـ 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 مضمونًا. تستعمل ثلاث طرق فى محاولة عزل الأنسجة الخالية من الفيروس التى يعاد زراعتها لتعطى جذورًا. الأولى تعتمد على ملاحظة أن تركيز الفيروس ينخفض فى الأجزاء الخضرية الحديثة عن القديمة فى النباتات المصابة، وبواسطة عزل المرستيم القمى أو قمة الجذر من النباتات المصابة وتنميتها على بيئة مغذية، أمكن الحصول على أنسجة خالية من الفيروس، ولكن هذه ليست دائما تعطى نباتات ذات جذور. والثانية باستعمال antimetabolites سواء بتطبيقها على النبات المصاب قبل فصل الدعم أو بإضافتها للبيئة المغذية ونلاحظ أن بعض الـ antimetabolites تخفض تركيز الفيرس، دون أن تضر أنسجة النبات، والثالثة هى تعريض النبات المصاب لحرارة قرب ٣٧°م، والتى تخفض أو تثبط تضاعف بعض الفيروسات. والمرستيمات القمية المفصولة من النباتات المعاملة بالحرارة تكون غالبا خالية من الفيروسات، التى ليست من السهل استئصالها بزراعة المرستيمات وحدها.

٢ – زراعة المرستيم : Meristem

أ ـ أنسجة الزراعة : Tissues for culturing

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

الورقة. وتكون الأسبقية للفرع الابتدائى 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 لازمًا لإنتاج نبات كامل.

اكتشف Bajaj & Dionne, 1966 إمكانية الحصول على نباتات خالية من PVX بزراعة جذور البطاطس، وتمكنا من تنمية ثلاث مزارع للجذور خالية من PVX، ونجحا سنة ١٩٦٨ فى إنتاج تركيبات تشبه العقد على الجذور المنزرعة . وهذه التركيبات تميل للاخضرار ولكنها لا تنمو لتعطى أفرعًا.

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

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 الدرنات ولكن لم تتكون الفروع، على الرغم من تكون الجذور على أحد الكالوسات.

وحتى الآن تجرى تجارب عديدة على السوق ـ الدرنات ـ الجذور وأنسجة البطاطس الأخرى لاكتشاف ظاهرة النمو بالكالوس، والتى 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 ـ 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، وفى 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)، والتى تتميز بزيادة الأمونيوم والبوتاسيوم، وتستمر وقتًا أطول أربعة أضعاف بيئة النيترات. وبمقارنتها بيئات عديدة وضعت بواسطة Muth& Bode, 70, Stace - Smith & Mellor, 68 Christensen, 70 , Topio, 72 وجد أن احسنها هى (MS- 62). العناصر الصغرى (الدقيقة) التى عادة تستعمل فى المزارع. يضاف الحديد عادة فى شكل - Fe ethylenediamintetra acetic acid (Fe - EDTA) أكثر من صورة كلوريد الحديد أو السلفات. ذكر Shige & Skoog, 1962 أن العامل المخلبى (EDTA) يحسن كثيراً من قابلية الحديد للامتصاص وأيضا العناصر الصغرى الأخرى.

جدول ١١ - ٢ : العناصر المغذية المعدنية التى استخدمت فى بيئات عديدة لزراعة القمم المرستيمية للبطاطس.

		WHITE, 1954 (MANZER. 1958)	HELLER, 1953 (GAUTHERET, 1959)	MOREL and MARTIN, 1955 (PALUDAN, 1971)	MOREL and MULLER, 1964	MURASHIGE and SKOOG. 1962
العناصر الكبرى Macronutrients:						
نترات الكالسيوم	$Ca(NO_3)_2 . 4H_2O$	288		500	500	
نترات بوتاسيوم	KNO_3	80		125		1900
نترات صوديوم	$NaNO_3$		600			
نترات الأمونيوم	$NH4NO_3$					1650
كبريتات الأمونيوم	$(NH_4)_2 . SO4$				1000	
كلوريد بوتاسيوم	KCl	65	750		1000	
فوسفات بوتاسيوم	KH_2PO_4			125	125	170
فوسفات الصوديوم	$NaH_2PO_4 . 4H_2O$	19	125			
كلوريد الكالسيوم	$CaCl_2 . 2H_2O$		75			440
كبريتات المغنسيوم	$MgSO_4 . 7H_2O$	737	250	125	125	370
كبريتات الصوديوم	Na_2SO_4	200				
العناصر الصغرى Micronutrients:						
كلوريد الحديديك	$FeCl_3 . 6H_2O$		1		1	
كبريتات الحديديك	$Fe_2 (SO4)_3$	2.5		25		
كبريتات الحديد	$FeSO_4 . 7H2O$					27.8
	$Na_2 . EDTA$					37.3
كبريتات المنجنيز	$MnSO_4 . 4H_2O$	6.7	0.1	0.8	0.1	22.3
حمض اليوريك	H_3BO_3	1.5	1	0.025	1	6.2
كبريتات الزنك	$ZnSO_4 . 4H_2O$	2.2	0.8	0.04	0.8	8.6
يوديد البوتاسيوم	KI	0.75	0.01	0.25	0.01	0.83
موليبدات الصوديوم	$Na_2M_oO_4 . 2H_2O$					0.25
كبريتات النحاس	$CuSO_4 . 5H_2O$		0.03	0.025	0.03	0.025
كلوريد الالومنيوم	$AlCl_3$		0.03		0.03	
كلوريد النيكل	$NiCl_2 . 6H_2O$		0.03	0.025	0.03	
كلوريد الكوبالت	$CoCl_2 . H_2O$			0.025		0.025

obeikandl.com

المضافات العضوية فى بعض البيئات موضحة فى جدول (١١ – ٣). اكتشاف الاحتياجات من المواد العضوية لزراعة الأنسجة صعب جدا، فبعضها يعتمد على الآخر فمثلا نحتاج لزيادة مادة ما عند إضافة مادة أخرى. ويعتمد الاحتياج لمواد أخرى على المغذيات المتاحة فى محلول المعادن أو على نوع وعمر الأنسجة المعزولة. وبالإضافة للمواد العضوية الموجودة فى 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.

فى بعض الأصناف تعطى البراعم المفصولة كلها تقريبًا نباتات، وفى أصناف أخرى تعطى نباتات قليلة جدا، والتى قد يتحسن نموها بإضافة GA_3 . وجد Pannazio & Re-dolfi, 1973 أن إنتاج الجذور فى المرستيمات على البيئة MS - 62 السائلة دون إضافة GA_3 كان ١٧٪، وبإضافة GA_3 زادت الى 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 الدورى للبراعم النامية الى بيئة طازجة.

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

وقد تدعم بيئة الزراعة ٥ر – ٨ر٠٪ آجار. وأحسن التجهيزات لزراعة المرستيم عبارة عن أنبوبة اختبار (12 X 100 mm) وبغطاء مقاوم للحرارة مصمم، بحيث يسمح بتغير الهواء فى الأنبوبة. وفى البيئات السائلة تدعم بقنطرة من ورق الترشيح، ولكنها غير ضرورية.

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

		WHITE, 1954 (MANZER, 1958)	MOREL and MARTIN, 1955 (PALUDAN,1971)	MURASHIGE aad SKOOG, 1962
بيوتين	Biotin		0.001	
كالسيوم بانتوثنيات	Ca- Pantothenate		0.001	
سيستين	Cysteine		0.01	
جليسين	Glycine	30		
اندول ٣ حمض الخليك	Indol - 3 - acetic acid			
اينوسيتول	Inositol		0.001	2.0
كينيتين	Kinetin			1-30
نفثالن استيك	Napthaleneacetic acid		0.001	100
نيكوتنيك اسيد	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

جـ - عوامل التكشف وتكوين الجذور:

Factors in developmemt and rooting

١ ـ 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 (١,٠ 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 أيضًا على استئصال الفيروسات خصوصا PVS. وعادة ترفض البراعم أقل من ٠,٣ مم؛ لأنها لا تكون جذوراً، والآن ترفض البراعم أطول من ٠,٧ مم لاحتمال إصابتها بالفيروسات. وفى هذا المدى الضيق للحجم هناك اختلافات قليلة فى تكوين الجذور.

٢ ـ الظروف البيئية للزراعة : Cultural environment

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

وهناك مقارنة لتأثير الحرارة على نمو المرستيمات فى أصناف عديدة، زرعت فى بيئة MS - 62 سائلة على ثلاث درجات حرارة . فعلى ٢٩ْم بعض الأصناف نمت أسرع وأعطت جذوراً فى ٥ أسابيع، والنمو فى الأخرى كان غير طبيعى، الأوراق أكبر وسميكة وشاحبة اللون والجذور قليلة أو غائبة، وإذا لم تنقل هذه البراعم لبيئة جديدة تموت غالبًا. وعلى ٢٦ْم النمو كان أبطأ، ولكن نمو الأفرع يسبق نمو الجذور . الأفرع عديمة الجذور تغرق فى البيئة السائلة، ويجب تدعيمها بقنطرة من ورق الترشيح لمنع غمرها وموتها. أما على ٢٣ْم يبطؤ النمو جداً، ولكن الجذور والأفرع تنمو عادة فى 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، والتى غرقت فى 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 غالبًا تتعفن عندما نقلها للتربة، ولكن السوق المقطوعة والمطعومة على نبات طماطم صغيرة جيدة وتؤخذ خلال شهر، وهى 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 ـ عوامل أخرى: Other factors

كما وجد فى بعض الأحيان 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 أيضًا أنه فى أصناف عديدة براعم قليلة، تتكشف لتعطى أفرعًا وجذوراً خلال شهرين من الفصل، بينما فى أخرى وتحت ظروف الزراعة نفسها تستغرق ٤ ـ ٦ شهور، مع تجديد المزرعة مرة أو مرتين.

البراعم المأخوذة من فرع واحد تختلف أيضًا فى نموها. فمثلاً يكون الموقع على الفرع واحداً وحجم البرعم (٣ر ـ ٧رم)، ولكن بعد شهرين من القطع يعطى برعمًا أو اثنين أفرعًا وجذوراً وأوراقًا لها لون طبيعى، بينما الأخرى تعطى أوراقًا صغيرة شاحبة، ودون أفرع أو جذور، ونقل الأخيرة الى بيئة طازجة غالبًا ما يسبب موجة من النمو الضعيف.

شكل (١١ – ٣) : التكشف الطبيعى وغيرالطبيعى لبراعم بطاطس فى بيئة سائلة. الخطوات المتتابعة أثناء عمليةالتكشف مبينة فى (A - C) بعض البراعم تغرق وتموت عند تمددها على كوبرى 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 تزدحم أنبوبة المزرعة بالجذور، التى تلتف الأفرع على قمتها .ويمكن الاحتفاظ بالنباتات لمدة غير محدودة بواسطة نقل قمة الفرع (طول ٢ – ٣سم) إلى بيئة جديدة على فترات كل ٤ شهور، أو عندما تقترب البيئة فى الأنبوبة القديمة من الجفاف، وفى الحرارة المنخفضة يقلل الفصل وتطول المدة بين كل تجديد .

٣ – استئصال الفيرس : Virus Eradication

أ – العوامل التى تؤثر على الاستئصال : Factors influencing eradication

١ – مضادات البناء الحيوى : Antimetabolites

تشير مراجع زراعة الأنسجة الى فائدة antimetablites 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 الفيرس، وواحد فقط يصبح خاليًا من PVX. استعمل Vasti 1973. مرستيمًا قميًّا بطول ٣ – ٤ مم مع malachite green أو الثيويوراسيل فى البيئة . وعند إضافتها للبيئة مفردة فإن كل الستة نباتات malachite green ونباتين مع ثيويوراسيل أصبحت خالية من PVX، وعندما تعامل القمم المفصولة بخليط من الاثنين، كانت كفاءتهما أقل .

٢ ـ 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 بطول١ر٠ مم، وبدون أو مع Leaf primor-dium، ولاحظا أن ٢٠ / ١٩٦ 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 PLRV - PVY - PVM، 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.

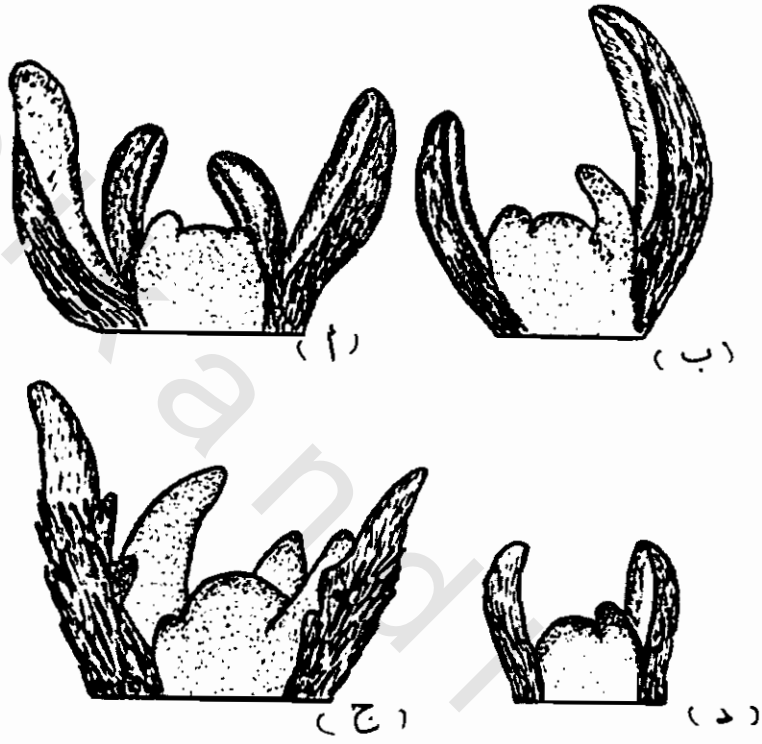
	مضاد البناء الحيوى	التثبيط	الاستئصال	المؤلـــف
١٠	أخضر ملاكايت	+	+	NORRIS, 1954
٥	أخضر ملاكايت	-	-	THOMSON, 1956
١ – ٢	أخضر ملاكايت	-	-	MANZER, ,1958
١ – ٢	ثيويوراسيل	-	-	MANZER, ,1958
٣ – ٤	٢،٤ داى كلورو	+	+	QUAK, 1961
٠،٥ – ٠،٧	فينوكس حمض الخليك	+	+	VASTI,1973
	أخضر ملاكايت	+	+	VASTI,1973
	ثيويوراتيل	-	-	PENNAZIO,1973
	ازجوانين	-	-	PENNAZIO,1973
	فلويوراسيل	-	+	PENNAZIO,1973
	ثيويوراتيل	-	-	PENNAZIO,1973
	فلوروفينايل	-	-	PENNAZIO,1973
	الانين	-	-	PENNAZIO,1973

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

شكل (١١ – ٦) يوضح أنواعاً من المرستيمات وصعوبة تحديد حجم كل منها، ففى شكل (٥–١١) يظهر برعم جانبى ذو اثنين من leaf primordia وأربعة من rudimentray leaves وإزالة الاخيرة فقط تجعل طول المرسيتم حوالى ٠,٢مم. وشكل (٥–١١) يوضح برعمًا جانبيًا أيضا له اثنان من leaf primordia، واذا تركنا الاثنان يصبحان أصغر من البرعم الأول. ايضا اختيار حجم المرسيتم الطرفى صعب. والبرعم الطرفى عادة أكثر فى العرض عن الطول، ويحاط بواسطة whorl of leaf priimordia، (شكل ١١–٦–أ) . . ومن غير المرغوب فيه الحجم الكبير للأنسجة والعدد الكبير من leaf primordia. يوضح شكل (١١–٦–د) البرعم الجانبى لنباتات البطاطس بعد عدة أشهر من الزراعة، وهناك أكثر من ٦ براعم على النبات الواحد، والتى تتميز بصغرها وتجانسها فى الشكل والحجم. ومثل هذه النباتات تمد الباحثين بالمادة النباتية الموحدة للمرستيمات لزراعتها تحت الظروف المختلفة.

٣ – المعاملةالحرارية : 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 نسبيا خالية من الفيرس، والتى تستعمل عادة فى الزراعة. ومن فيروسات البطاطس التى يصعب استئصالها- PVX - PVM - PVY - PVA - PLRV Aucuba masaic - PSTV PVS , PSTV ، وكل هذه تشمل سلالات تتميز بمقاومتها للمعاملة الحرارية عن الاخرى. مثلاً Kassanis, 1970 استأصل PLRV من كل الدرنات بواسطة المعاملة الحرارية وحدها، بينما وجد – Mellor& Stace smith, 1971 سلالات من PLRV تظل باقية بعد المعاملة الحرارية وزراعة المرستيم،كما وجدا 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 (بريموردیا) و د: برعم جانبي من النبت Plantlet بعد عدة أشهر من زراعة. الخط الوسطى بين جـ ، د ٠,٢ مم.

وجد Morel et al (1968) ان هذين الفروسين يستأصلان من ٨٥–٩٠٪ من المرستيمات بينما PVS & PVX أقل من ١٪ فقط. ولكن Kassanis (1965) وجد أن PVA بقى فى $\frac{٣٩}{٣٩}$ نبات نمت من براعم قطعت بعد معاملة ١٢ – ٢٠ يوم على ٣٧م. وتقارير أخرى أكدت أن PVA بقى فى نباتات أخليت من PVX.

لم تجد معلومات منشورة عن aucuba mosaic فى البطاطس، ولكن لدينا نتائج لأبحاث أولية على نباتات تكشفت عن مرستيمات سبق تعريضها للحرارة؛ حيث ظل $\frac{٤}{٧٥}$ نبات مصابًا فقط.

الفيروسان PVX, PVS نادرة الاستئصال دون أن تفصل البراعم وهى صغيرة جدًّا أو تعامل النباتات المصابة بالحرارة قبل فصل البراعم. قارن Mellor & Stace - Smith, 1970 سهولة استئصال PVS, PVX من ٢١ نبات مصاب بكلا الفيروسين، وقد وجدا أن PVX عادة أكثر تأثراً بالمعاملة الحرارية عن PVS، حيث يبقى فى حوالى ٣٪ من البراعم المفصولة بعد ٤ – ٦ أسبوع من المعاملة الحرارية ونادراً بعد معاملة أطول، وقد وجدا أن أكثر سلالات PVX تحملا للحرارة تبقى فى ٣٪ من البراعم المفصولة بعد معاملة حرارية ١٠ أسابيع.

فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس أكثر صعوبة فى الاستئصال فقد فصلت براعم فى نباتات مصابة بحدة بالفيرويد، بعد معاملة حرارية ٢ –١٤ أسبوع فظلت الإصابة الحادة فى ٦٢ من ٦٦ نباتًا، أما الأربعة الباقية فاصبحت معتدلة الإصابة. واستعمل واحد من الأربعة كمصدر فى التجارب التالية. والبراعم التى فصلت بعد ٢ –١٢ أسبوعًا من المعاملة وجد ان معدل الاستئصال صغير جدا ٦ / ٢٤٨ فقط. النتائج المختلفة لمحاولات الاستئصال فى الفيروسات اقترحت أن هذا المصدر للفيرويد قد يكون غيرعادى المقاومة للحرارة، وأن الفيرويد من مصادر أخرى قد يكون أقل صعوبة فى 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 فى درجة الحرارة يزيد البقاء كثيراً، أخبر Mellor & Stace - Smith (1967) بقاء الدرنات وكذلك تكشف النباتات من الأجزاء الجذرية فى درجات الحرارة المختلفة ووجد

تغير حرارة الهواء يومياً من ٣٣ – ٣٧م وحرارة التربة من ٣٠ الى ٣٣م تبقى الدرنات حوالى ١٠ أسابيع والأجزاء الجذرية أكثر من ٦ شهور. وبعد ٤ شهور معاملة تتكشف بعض النباتات الخالية من PVX من قطعة نسيج كبيرة نسبيا. وتزيد النسبة بطول المعاملة الحرارية.. ففى الأجزاء الجذرية تكون الأفرع النامية أثناء المعاملة رقيقة، والبراعم الجانبية صغيرة، وذات عدد قليل من الأوراق الأولية Rrudimentary leaves. أما النامية من أجزاء درنات فتكون أفرعًا قوية وبراعم جانبية سميكة، كل منها ذات أوراق أولية عديدة قد تزال قبل فصل البراعم.

٤ ـ الإصابة المتضاعفة (المشتركة) : Multiple infection

حصل Pannazio, 1971 على نتائج متعارضة عند زراعة مرستيمات من نباتات معاملة بالحرارة فى صنفين .. ففى أحدهما المصاب بفيرس PVX فقط ٣٤ / ٤٢ نبات كانت خالية من الفيروس. وفى الاخر المصاب بفيروسات PVX - PVS-PVM -PVY فكان ٢ / ٣٤ نباتًا خاليًا من PVY، كلها من PVM، واغلبها من PVS & PVM وقد عزى صعوبة استئصال PVX من هذا الصنف للإصابة المشتركة للأربعة فيروسات.

درس Close, 1964 تاثير فيروسات عديدة على تركيز PVX وتضاعفه وحركته داخل النبات وعلاقة ذلك بالحرارة. فوجد أن تركيز PVX يزيد فى وجود PVY عما يكون وحده خصوصا على ٣١م. وعلى هذه الحرارة يقل تضاعف PVX ولا يتحرك جهازيًّا، ولكن بوجود PVY يستمر فى التضاعف ويتحرك جهازيًّا.. ويزيد تركيز PVX حوالى ٦٤ مرة. ويبدو أن ملاحظات Closeتتوافق مع افتراض Pennazio فاحتمال وجود PVY أثناء المعاملة الحرارية مسئول عن وجود PVX أيضًا 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 ـ الاستئصال أثناء الزراعة : Eradication during culture

إن تكنيك إنتاج نباتات خالية من الفيرس بواسطةتكاثر 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 فى المناطق الطرفية كانت غير كافية، Kassanis, 1967. كان أول من اقترح أن الاختبار بالميكروسكوب الإلكترونى للمرستيميات الطرفية قد يحدد وجود جسيمات الفيروس Appiano & Pennazio,72 ، وباستخدام القطاعات الرقيقية والميكروسكوب الإلكترونى كشفا وجود PVX فى سيتوبلازم الخلايا الطرفية للبطاطس. وقد وجدوا جزيئات فى كل المرستيمات التى اختبروها، ولهذا أكدوا أن استئصال الفيروس يتم أثناء الزراعة. هذه الملاحظات أكدها Krylova et al,1973 بواسطة الفحص بالميكروسكوب الإلكترونى للعصير المتجانس للمرستيمات المصابة بفيروس PVX. وقد فحصوا المرستيمات فى ثلاثة أحجام، وقد وجدوا جزئيات قليلة فى ٩٨ / ١٠٠ فى الطول (٠,٨ – ١,٠)، وأكثر قليلا فى (٠,١ – ٠,٣) وكثيرا فى المرستيمات (٣، – ٥،م). وأيضًا فحصوا عصير المرستيمات بعد ٤ أسابيع من الزراعة، ووجدوا أن القطع المزروعة الأقل من (٠,١م) كانت خالية، وفى الطول (٠,١ –٠,٣م) كانت قليلة جدًا وقد تأكدت هذه الملاحظات بالحقن الميكانيكى.

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

ويميل الرأى لنظرية أخرى قد تكون أكثر احتمالاً. إن تضاعف الفيروس يحتاج إنزيمات، والتى تكون متاحة للخلايا قرب قمة المرستيم، وعند قطع قمة صغيرة تختل مؤقتًا عمليات النمو، وتصبح الإنزيمات المطلوبة لخطوة أو أكثر فى تضاعف الفيروس غير متاحة، وهكذا يقف إنتاج جسيمات جديدة. فى البراعم الصغيرة يكون الاختلال كبيرًا وقد تطول فترة عدم الاستقرار فى تضاعف الفيروس للحد الذى يتحلل عنده الحمض النووى الفيروسى Viral RNA، ومن الممكن أن تنتفع به خلية العائل. ولكن فى البراعم الكبيرة يكون

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

جـ - الاستئصال الناجح : Successful eradication

١ ـ الكشف عن الفيروس : Virus detection

حيث إن البطاطس معرضة للإصابة بعديد من الفيروسات غير المرتبطة، وكل منها له سلالات تختلف فى الشدة يكون من الصعب، جداً تعريف والكشف عن هذه الفيروسات. وعلى ذلك فإن وسائل الحقن الميكانيكى ـ النقل بالمن ـ السيرولوجى ـ الميكروسكوب الإلكترونى ـ الإلكتروفورسيس Electrophruses كلها تصبح مطلوبة. إذا كان الهدف هو إنتاج Clone خالٍ من الفيروس، لا يكون من الضرورى 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 للسيرولوجى ونتائج الاختبارات السيرولوجية لفيرس PVS أحياناً غير مؤكدة ويجب عمل مقارنة واضحة السيرولوجى أو الحقن الميكانيكى على النباتات المشخصة يمكن استعمالها للكشف عن PVY - PVA - PVM aucuba mosaic سلالات فيرس 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 بالمن 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 انتسيرم ومن الممكن استعمال السيرولوجى 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 فى 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 فى 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.

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

رموز المؤلف:

MCD: MacDonald 1973.
S, S. M.: Stace Smith and Meller 1968.
P.: Pennazie, 1971.
T: Tapie 1972.

أصبحت العشائر Clones الخالية من الفيرس فى كل الأصناف المهمة متاحة الآن. جدول يوضح ذلك من التقارير المنشورة، وهذا الجدول غير مكتمل تمامًا، 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 ١٠سم معقمة، وتغطى بناقوس زجاجى لمدة ١٠ أيام. تكون أوانى البيت متماثلة النسيج، ويجب التأكد من أن حرارة التربة أقل من حرارة الهواء اثناء المعاملة، وكذلك صرف وتهوية التربةجيدان، كل هذه تساعد على التعمير تحت المعاملة الحرارية. وأخذ قطعة أخرى يكون بعد أسابيع قليلة، وهذا مفيد لاحتمال موت الأول أثناء المعاملة الحرارية. ويحتفظ بالنبات الأصل للمقارنة مع النباتات المتكشفة فى المزرعة بعد ٤-٣ أسابيع من الزراعة، ينقل لحجرة نمو حيث إضاءة (3000-4000 LUS) لمدة ١٦ ساعة يوميًّا وحرارة الجو ٣٦°م أثناء النهار، و ٣٣°م أثناء 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 الأدوات 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 ٠,٣–٠,٦مم.

والبراعم الاصغر فرصتها فى البقاء أقل . والأكبر تصبح أكثر إصابة بالفيرس. توضع المزارع على ٢٣°م، وإضاءة ١٦ ساعة يوميًا.

كل فرع يعطى ٨ ـ ١٢ برعمًا، بعضها يتكشف ليعطى نباتات خالية من الفيروس. وحيث إن بعض الأصناف لا تعطى جذوراً وبعض سلالات الفيروس تكون غير عادية البقاء. لتأكيد النجاح يؤخذ فرع آخر (لغرض فصل البراعم) بعد ٢ ـ ٤ أسبوعًا من المعاملة. بعد ٢ ـ ٣ شهورمن الزراعة تصل إلى طول ٣ سم أو أكثر يمكن نقلها إلى التربة، ولكن هناك نقطة حرجة فعند إزالتها من الأنبوبة، تكون طرية وغضة جداً وتذبل، إذا لم تحمى بسرعة من فقدالرطوبة. واذا كانت التربة مروية بعناية وترش النباتات برقة بالماء وتغطى بناقوس زجاجى لمدة أسبوع، يكون النجاح مؤكداً. عادة يكشف عن إصابة النباتات عند نقلها للتربة فتؤخذ ورقة واحدة ٣ـ٥ سم فى القطر الى نقطة ماء، تستعمل للحقن على العوائل المشخصة **G.globosa**، **C.amaranticolor**، والنتائج السلبية لهذا الاختبار يجب أن تؤكد بعد عدة أسابيع بإعادة الحقن أو بالسيرولوجى والميكروسكوب الإلكترونى.

نظره على علم الفيروسات النباتية
فى الماضى والحاضر والمستقبل

وقد أوضحت فى هذا الكتاب المعلومات الحالية فى مجال علم الفيروسات النباتية ويهمنا فى هذا الفصل الأخير من الكتاب أن نلقى نظره على التطور التاريخى لهذا العلم وكذا على التطورات المتوقعة فى هذا العلم خلال القرن الحادى والعشرين.

نظرة على الماضى:

وقد تم تقسيم المائة سنة الماضية التى تم فيها البحث فى 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 فى كل فترة فيها.

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

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

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

٣ – ١٩٥٦ – ١٩٧٠ وهنا تم اكتشاف الفيروسات النباتية الثامنة ذات الحمض النووى DNA ثنائى الخيط (ds DNA) وكان التقدم الأهم فى 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 البروتربلاست 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 النيوكليتدى فى الجينوم الفيروسى وكذا القدرة على إنتاج cDNA معدى من نسخ من الـ RNA فى الجينوم الفيروس RNA مما سمح باستخدام تكنيكات التركيب الجينى. وقد أظهر لنا التتابع النيوكليتدى بتفهم لتركيب الجينوم لمعظم مجموعات الفيروس النباتية. كما تقدمت طرق تشخيص الفيروسات التى تعتمد على تهجين الحمض النووى. كما

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

نظرة على المستقبل فى علم الفيروسات

من المنتظر أن يتسع مجال الدراسات فى القرن القادم سواء فى النواحى 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 التطفير الموضعى ممكناً عن طريق إحلال حمض أمينى محل أخر فى البروتين الفيروسى. وحيث من الممكن أن يؤدى 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 الفيروسى 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 التى يمتاز بها تستطيع الفيروسات توجيه العمليات البنائية فى الخلية لإنتاج المركبات اللازمة لتمثيل الفيروس.

٧ – كيف يتم التنسيق بين الوقت. الموضع الذى يتم فيه تمثيل مكونات الجين داخل الخلية.

٨ – الأحداث المحددة لكمية الفيروس النهائية المنتجة داخل الخلية.

٩ – الميكانيكية التى تحدد وتضبط انتقال الفيروس من خلية لأخرى فى النسيج المصاب.

وعمومًا فإن الطرق العلمية والنظم الموجودة حاليًا 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 الفيروسى المفرد فى النباتات الانتقالية يفتح الباب لإمكانيات عديدة لدراسة نقاط متعددة فى تضاعف الفيروس in vivo بالإضافة إلى تطور النظام الناقل مما يؤدى إلى تطوير التعبير عن الجين الفيروس منفردًا أو بمصاحبة العديد من الأنظمة فى الترتيبات.

٢ – تطفر أو إعادة بناء الفيروسات in vivo حيث إن القدرة على إحداث تغيرات أساسية in vitro أو بحقن فى أماكن معينة فى الجينوم الفيروس وتركيب الفيروس الهجين in vitro.

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

٣ – التوصيف فى الموقع in sitn transerip حيث إنه تحت الظروف المناسبة فإن الـ RNA الرسول يمكن أن يعمل كقالب لإعادة النسخ فى in situ خلال قطاعات من الأنسجة المتينة وهذا يسمح بالتعرف على بداية عملية النسخ وخلال هذه الخطوة فإن النيوكليتدات المشعة تستعمل للتعرف على مسار أو تمركز الـ RNA الرسول.

٤ – اختيار اللمرة المتسلسل PCR يعتبر طريقة جديدة فعالة التى تفتح المجال لإمكانية دراسة جزيئات الحمض النووى التى 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 نواحى 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 فأن 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 نيوكليتدات RNA الفيروس ف 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 فى 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 وحقنت فى عائل أجر من العائله الباذنجانية هو *Cyphomandra betaceae* نجد أن نوع معين من السلالات هو الذى يصيب هذا العائل جهازياً إلا أنه ميكانيكًا اختبار هذه السلالة للعائل مازالت غير معروفة وممكن قد يكون التنافس بين ترك البروتين الفيروسى المشفر مع العائل ويمكن اختبار هذه الفترة عن طريق تحديد التتابع النيوكليتدى للسلالات المختلفة ولو حدث الاختلاف فى الجين المسئول عن التحرك فأنه يمن التغيير عن طريق تبديل الجين بين السلالات.

٢ – ٥ – البيئة : Ecology

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