الفصل الأول : أساسيات عامة

1.1. وحدة بحوث الأمراض الفايروسية

هي مجموعة المنشآت اللازمة لانجاز البحوث والدراسات الفايروسية والتي تشمل تجارب التشخيص والتنقية وتحضير المصول المضادة وبقية الاختبارات الفايروسية، فضلا عن الاستفادة منها في التدريس والتدريب. تضم الوحدة المنشآت التالية :

1.1.1. مختبر فايروسات النبات

تخصص بناية للمختبر بمساحة كافية تحددها الإمكانات المتيسرة ، ويفضل أن يكون في الطابق الأرضي ويؤثث بأعداد كافية من "الطاولات المختبرية" Benches المصنوعة من الألمنيوم أو الخشب الصقيل المزودة "بمغاطس" Sinks مختبرية كافية مجهزة بشبكة ماء صافي ، ويستفاد من هذه الطاولات لوضع الأجهزة والمعدات المختبرية عليها بالطريقة المناسبة التي تنظّم العمل بشكل مريح لتنفيذ التجارب وللتدريس أيضا. يزوّد المختبر بشبكة إنارة جيدة ونظام للتبريد والتدفئة مع ساحبات للهواء ، وان تكون الشبابيك محمية من الخارج بالسلك المانع لدخول الحشرات. يجهز المختبر بالأجهزة والمعدات وأنواع الزجاجيات المبينة في الجدولين (1–1و 1–2) والتي تعد ضرورية لانجاز التجارب الفايروسية.

الجدول (1–1) : الأجهزة والمعدات المستعملة في مختبر الفايروسات

اسم الجهاز	الاسم الانكليزي
غماء	Hood
غرفة الزرع ذات الجو المعقم	Laminar air flow cabinet
جهاز انتباذ منضدي ذو دوّار ثابت الزاوية بسرعة قصوى 3000 دورة / دقيقة .	Bench top centrifuge
جهاز انتباذ ذو دوّار ثابت الزاوية بسرعة قصوى 1000 دورة / دقيقة	Low speed centrifuge

Cooled high speed centrifuge with fixed angle and swing- out rotor	جهاز انتباذ فائق السرعة مبرد بنوعين من الدوّارات الثابتة، وذو الجيوب المتحركة وبسرعة 40000 دورة /دقيقة
pH meter	مقياس الدالة الحامضية
Magnetic stirrer , hot plate	رجّاج مغناطيسي ذو سطح ساخن
Shaker	هزّاز منضدي
Oven	فرن كهربائي مزوّد بنظام تفريغ الهواء
Incubator	حاضنة
Cooled incubator	حاضنة مبردة
Water bath	حمام مائي مزود بمروحة لتدوير الماء
Oil bath	حمام زيتي
U.V. Spectrophotometer	جهاز المطياف بالأشعة فوق البنفسجية
Distilator	جهاز تقطير
Autoclave	المعقام
Microscopes	مجاهر ضوئية
Binoculars	مجاهر بسيطة
Transmission electron microscope	مجهر الكتروني نافذ
Ultra microtome	مشراح فائق
Microscope with digital camera	مجهر ضوئي مزود بكاميرا رقمية
Close – up photography equipment	كاميرا تصوير فوتوغرافي للعينات

Blender	خلاط كهربائي
Pressing machines	عصّارات يدوية أو كهربائية لسحق العينات
Refrigerator	ثلاجة
Deep freezer	مجمدة حوضية
Balance	ميزان حساس كهربائي
Alarm	ساعة توقيت
Thermometers	محارير زئبقية
Lenses	عدسات تكبير يدوية
Mortar & pistils	هاونات ومدقات خزفية مختلفة الأحجام
Micropipette	ماصات دقيقة بأحجام مختلفة
ELISA unit	منظومة اليزا
Cork borer	ثاقبة فلين
Millipore filters	مرشحات دقيقة
Filter papers	ورق ترشيح بحجوم مختلفة
Litmus papers	ورق اللتموس
Para film	غشاء البارافلم

الجدول(1-2): أنواع الزجاجيات المستخدمة في مختبر الفايروسات

الاسم الانكليزي	أنواع الزجاجيات المختبرية
Flasks	دوارق بأحجام مختلفة
Bakers	بيكرات بأحجام مختلفة

Petri dishes	أطباق بتري زجاجية وبلاستيكية بأقطار مختلفة
Cylinders	اسطوانات زجاجية بأحجام مختلفة
Funnels	أقماع زجاجية وخزفية بأحجام مختلفة
Pipettes	ماصات بأحجام مختلفة
Desiccators	مجففات بأحجام مختلفة
Erlenmeyer flasks	دوارق ايرلنماير بأحجام مختلفة
Test tubes	أنابيب اختبار زجاجية وبلاستيكية
Pasteur pipettes	ماصات باستور
Glass rods	قضبان زجاجية

يجهز المختبر بأنواع المواد الكيمائية اللازمة لانجاز التجارب الفايروسية والمبينة في الجدول (1-3) ، والتي يجب أن تحفظ في ظروف خزن ملائمة وفي عبواتها الأصلية التي عبئت بها من قبل الشركات المنتجة لوجود الملصقات التي تضم المعلومات الهامة عن المادة والتي تشمل رمزها الكيماوي ووزنها الجزيئي وظروف خزنها ومدة صلاحيتها ومخاطر استعمالها ، وهي معلومات هامة ستفقد أن خزنت المواد في عبوات عادية بديلة.

الجدول (1-3): أهم الكيماويات المستعملة في مختبر الفايروسات

اسم المادة	الرمز الكيماوي	الاسم الانكليزي
الايثانول المطلق 99% والايثانول المخفف 70%	C_2H_5OH	Ethanol
البيوتانول	$CH_3(CH_2)_3OH$	Butanol
الكلوروفورم	$CHCL_3$	Chloroform
رابع كلوريد الكاربون	CCL_4	Carbon tetrachloride

Ether	$(C_2H_5)_2O$	الايثر
Acetone (propanone)	$(CH_3)_2CO$	الأسيتون
Sodium sulphite anhydrous	Na_2SO_4	كبريتيت الصوديوم اللامائية
Sodium thioglycollate (sodium mercapto – acetate)	$HSCH_2$-COONa	ثايوكلايكوليت الصوديوم (ميركابتوخلات الصوديوم)
Cysteine hydrochloride	CH_2SHCH-$(NH_2)COO$ H – HCL	هيدروكلورايد الستين
Benzoic acid	C_6H_5COOH	حامض البنزويك
Sodium hypochlorite	NaOCL	هايبوكلورايت الصوديوم6%
Sodium azide	NaN_3	أزايد الصوديوم
Glycerin or Glycerol	CH2OH.CH OH.CH2OH	الجليسرين
Trisodium phosphate (TSP)	Na_3PO_4	الفوسفات ثلاثي الصوديوم
Ammonium sulphate	$(NH_4)_2SO_4$	كبريتات الامونيوم
Polyethylene glycol 6000	$HO(CH_2CH$ $_2O)Nh$	الكلايكول متعدد الايثلين (وزن جزيئي 6000)
Carborundum (Silicon carbide)	SiC	مسحوق الكاربورندم (حجم حبيبات 600مليميكرومتر)
Celite	مركب عضوي معقد	مسحوق السيلايت
Alumina (Aluminum oxide)	Al_2O_3	الالومينا
Magnesium trisilicate	$MgOSIO_2$	سليكات المغنيسيوم الثلاثية

Sodium laurylsulphate (Sodium dodecyl sulphate)	$CH_3(CH_2)11OSO_3Na$	كبريتات لوريل الصوديوم (كبريتات دودسيل الصوديوم)
Triton X-100		الترايتون أكس 100
Tween - 80(Polyoxyethylene sorbiton mono-oleate)		التوين 80 (متعدد اوكسي ايثلين السوربتون أحادي الاوليت
Giemsa stain		صبغة الجمسا
Phloxine –B (Acid red)		صبغة الفلوكسين – بي
Methyl green		صبغة اخضر المثيل
Uranyl acetate	$UO_2(CH_3COO)_2 2H_2O$	صبغة خلات اليورانيل
Phosphotungistic acid	$H_3PO_4.12WO_3.XH_2O$	صبغة حامض الفوسفوتنكستك
Dextran B Dextran C	مادة كربوهيدراتية معقدة	الدكستران – باء الدكستران – سي
Potassium dihydrogen Orthophosphate	KH_2PO_4	فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين
Disodium hydrogen Orthophosohate	Na_2HPO_4	الفوسفات ثنائية الصوديوم أحادية الهيدروجين

Diammonium hydrogen orthophosphate	$(NH_4)_2HPO_4$	الفوسفات ثنائية الامونيوم أحادية الهيدروجين
Osmium tetraoxide	OsO_4	رابع اوكسيد الاوزميوم
Bentonite		البنتونايت
Nicotine	$C_5H_4NC_4H_7NCH_3$	النيكوتين
Polyvinyl pyrrolidone	$(CH_2)_3CONCHCH_2$	بوليفنيل البايروليدون
Charcoal (activated)	C	الفحم الخشبي المنشط (حجم الحبيبات 50 −210 مليميكروميتر)
Diethyl ammonium diethyl dithiocarbamate	$(C_2H_5)_2NCSSNH_2(CH_2)$	الامونيوم ثنائي الاثيل ثنائي الاثيل ثنائي الكبريت كارباميت
Sodium hydroxide (pellets)	NaOH	هيدروكسيد الصوديوم (حبيبات)
Hydrochloric acid	HCl	حامض الهيدروكلوريك (36%)
Hydrogen peroxide	H_2O_2	فوق اوكسيد الهيدروجين
Agar- powder (Agar -Agar, Nobel-Agar)	مادة كربوهيدراتية معقدة	مسحوق الاكار
Agarose-powder	مادة كربوهيدراتية	مسحوق الاكاروز

	معقدة	

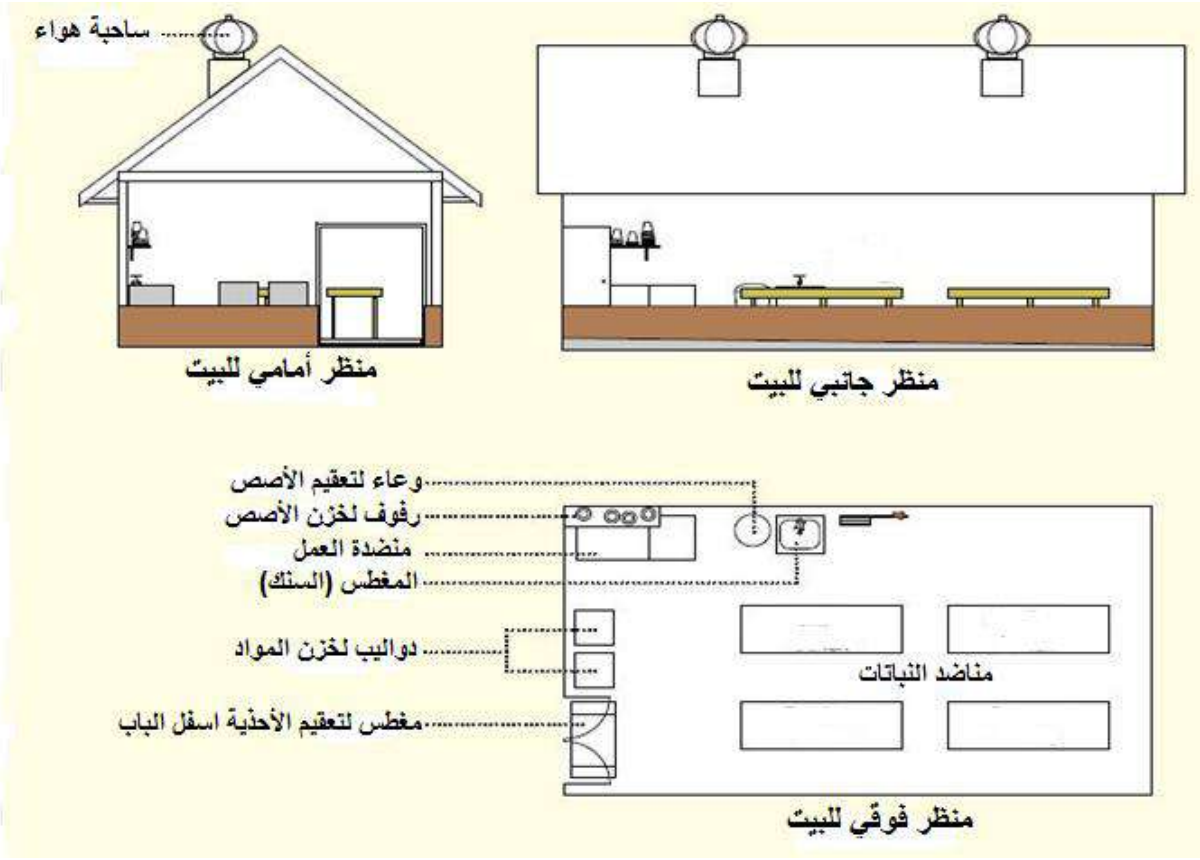
يجب التخلص من كافة الكيمياويات التي انتهت مدة صلاحيتها بطريقة أمينة وأفضل الطرق هي ردمها في حفر عميقة في الأرض بعيدا عن المناطق الزراعية ومصادر المياه كي لا تؤثر على البيئة وصحة الإنسان والحيوان والنبات و تحذير العاملين عند استعمال المواد الكيماوية السامة والخطرة لأخذ الاحتياطات اللازمة عند التعامل معها ، مع الانتباه إلى العلامات والرموز الدولية الدالة على خطورة المواد الكيماوية والمبينة على الملصقات المثبتة على العبوات.

2.1.1. البيت الزجاجي

يعد البيت الزجاجي Greenhouse من المنشآت الأساسية في وحدة البحوث الفايروسية لسببين رئيسين هما (1) التحكم في ظروف إنبات نباتات الاختبار وخاصة الحرارة والرطوبة، أي إمكانية زراعة النباتات تحت ظروف مسيطر عليها وفي أي وقت يشاءه الباحث في غير موسمها الطبيعي (2) توفير الحماية اللازمة للنباتات من التلوث بفايروسات غير مرغوب فيها تأتي عن طريق الناقلات وخاصة الحشرات وهذا ما يحصل في الحقول المفتوحة ويربك النتائج.

ينشأ البيت بمساحة مناسبة وفي موقع قريب من مختبر الفايروسات بحيث يخدمه طريق مبلط يسمح بوصول السيارات و الآليات الأخرى لنقل التربة والأصص والنباتات والوقود وانجاز أعمال الصيانة بسهولة. ويفضل ان يقام في منطقة مفتوحة خالية من الأبنية والحواجز التي تحجب عنه ضوء الشمس و بعيدا عن مناطق التلوث والأتربة، ولا يفضل إنشاؤه في أرض منخفضة تجنبا لتراكم الضباب في الشتاء خصوصا في فترات الصباح الباكر مسببا ذلك انخفاض شدة الإضاءة فيه. ينشأ البيت على ارض مستوية تماما مع اختيار الاتجاه المناسب له ليكون في الإتجاه الممتد من الشرق إلى الغرب والذي يسمح بنفاذ اكبر كمية من ضوء الشمس شتاءا أثناء حركة الشمس خلال النهار. تفرش أرضية البيت بتربة مزيجيه جيدة النوعية لأنها قد تستعمل لتنفيذ بعض التجارب الفايروسية بالزراعة المباشرة فيها. يزوّد البيت بمصدر للطاقة الكهربائية لغرض الإنارة ، ويفضل استعمال الاضائة البيضاء– الباردة (الفلورسينت) التي توزع بشكل متجانس فيه، مع نظام تبريد وتدفئة للحفاظ على درجة الحرارة فيه ضمن الحدود المقبولة وهي 20–30 مْ. كما يجب توفير مصدر للمياه لغرض سقي النباتات مع شبكة مجاري مناسبة. يستحسن زراعة مصدات رياح (أشجار غابات) مناسبة في الجهتين الشمالية والغربية للبيت وعلى مسافة 10م عنه لحمايته من الرياح الباردة وأفضل تلك الأشجار هي الكازورينا والسرو كما يمكن استعمال أنواع من الشبابيك البلاستيكية المنفذة للهواء بنسبة 50 % كمصدات رياح بديلا للأشجار.

كما ويجب إنشاء هياكل البيوت الزجاجية وفق المواصفات القياسية ، وهي إما من الخشب أو الحديد أو الألمنيوم ، ومن أهم أنواعها الجملون المسمى "المستنبت ألكرمي" Vinery ، (الشكل 1-1) والذي يبنى بشكل بيت مستقل أو عدة بيوت متصلة، والأبعاد المعتادة للبيت هي 5×9×4,5 (العرض × الطول × الارتفاع) ، ويفضّل أن يبنى جدار من البلوك أو الحجر بارتفاع 60 سم عن الأرض ليرتكز عليه الهيكل المعدني، ينشأ للبيت بابين متقابلين من الجهتين الأمامية والخلفية بينهما ممر مبلط بالاسمنت أو البلاط يتوسط البيت طوليا ، ويزود كلا البابين بآخر إضافي من السلك المشبك المانع للحشرات بفاصلة متر واحد بينهما ، ويراعى وجود شبابيك تصمم لتفتح للأعلى في منطقة التقاء السقف بجانبي البيت.



الشكل (1–1) : نموذج لبيت زجاجي مستقل و عدة بيوت متصلة (الشكل العلوي) ، مع مخطط لبيت زجاجي نموذجي مؤثث لإجراء التجارب الفايروسية ، (الشكل السفلي).

يؤثث البيت بخزانات معدنية لحفظ المواد والأدوات، و طاولات خشبية أو معدنية غير قابلة للصدأ ترتّب بانتظام وبمسافات مناسبة على جانبي الممر لتوضع عليها الأصص بأنواعها ، ويفضل أستخدام الأصص الفخارية عوضا عن البلاستيكية والتي تتمتاز بطول فترة الاستعمال ومقاومتها لتاثير أشعة الشمس بالاضافة الى انها آمنه للبيئة (الشكل 1–2)، وكذلك بأنواع من الأجهزة أهمها جهاز قياس الحرارة والرطوبة ويفضل أن يكون من النوع الذي يسجل المعلومات ورقيا Thermohydrography ، وكذلك بأنواع المرشّات اللازمة لرش المبيدات لمكافحة الحشرات والأمراض الفطرية التي قد تصيب النباتات ، وكذلك "أجهزة التضبيب" Fumigators لرفع مستوى الرطوبة الجوية عند الحاجة ، ومعدات الخدمة الزراعية اليدوية ، (الشكل 1–3). يفضل وضع عدد من البراميل المعدنية المزودة بأغطية في احد جوانب البيت لخزن التربة المعقمة فيها. ويخصص موقع خارج البيت وقريبا منه لبناء حوض كونكريتي مفتوح من احد جوانبه وبدون سقف لغرض رمي التربة المستعملة فيه بعد انتهاء التجارب وكذلك مخلفات النباتات.

تستعمل لتغطية هيكل البيوت الزجاجية، إحدى المواد التالية :

***الزجاج** : وهو الأكثر شيوعا، وأن الألواح الزجاجية المستعملة هي بسمك 3–4 ملم ويتوقف ذلك على مساحة القطع المستعملة إذ يزداد سمك الزجاج بزيادة مساحة القطعة. ينفذ الزجاج حوالي 90% من الضوء الساقط عليه ولكن لا يسمح بنفاذية الأشعة تحت الحمراء لذا فهو يحتفظ بالحرارة المنبعثة من التربة أثناء الليل ويمنع تسربها للخارج مما يقلل من تكاليف التدفئة ، أما عيوبه فهي سهولة كسره وخصوصا في المناطق التي يكثر فيها البرد (الحالوب) لذلك يفضل وضع شبكة سلكية فوقه لحمايته، وارتفاع تكاليف استبداله. يثبّت الزجاج على الهيكل بمعجون من النوع الجيد الذي لا يسرّب المياه ، ويطلى صيفا بالبوراكس أو بأصباغ خفيفة زرقاء أو وردية فاتحة لتقليل الإضاءة من الخارج والتي تزال شتاءا.

***ألواح الألياف الزجاجية (الفايبركلاس)** : تعد بديلا جيدا للزجاج وهي ألواح مرنة تمتاز بقابليتها على تشتيت أشعة الشمس الساقطة عليها مما يؤدي إلى تجانس شدة الاضائة داخل البيت، كما أنها أكثر مقاومة للكسر من الزجاج وتتحمل ضربات البرَد ودرجات الحرارة المنخفضة وتتراوح نفاذيتها للضوء بين 92–95 % للفايبركلاس الشفاف، و 64 % للفايبركلاس الأصفر. كما أن هذه الألواح هي اقل قابلية للتوصيل الحراري من الزجاج مما يقلل فقد الحرارة لذلك يكون البيت اقل حاجة للتبريد والتدفئة مقارنة بالتغليف بالألواح الزجاجية، إلا أن مساوئها هي تجمّع الأتربة ونمو الطحالب عليها مما يقلل من نفاذيتها للضوء كما انها قابلة للاشتعال.

الشكل (1–2) : أنواع من الأصص الفخارية والبلاستيكية المستعملة لزراعة الشتلات

(أ)

(ب)

(ج)

(د)

الشكل (1-3) : أنواع من الأجهزة والمعدات المستعملة في البيوت الزجاجية والبلاستيكية

(أ) جهاز رقمي لقياس الحرارة والرطوبة (ب) مرشّة مروحية لرش المبيدات أو لترطيب جو البيت (ج) مرشّة ظهرية (د) جهاز القياس الورقي للحرارة والرطوبة .

3.1.1. البيت البلاستيكي

يمكن أن يستعاض عن البيت الزجاجي بالبيت البلاستيكي Plastic house وذلك لارتفاع ثمن الأول ، واستعملت البيوت البلاستيكية في منتصف ستينات القرن العشرين لأول مرة في بريطانيا. ينشأ البيت البلاستيكي بنفس مواصفات البيت الزجاجي من ناحية الموقع والمساحة والتي يمكن زيادتها أو تقليصها حسب الحاجة ، ويتم بناء هيكله بواسطة أنابيب معدنية خاصة بشكل أقواس بقطر 2/1 انج وطول 6متر

مثقبة على مسافات منتظمة لتثبيت النايلون عليها ، وان لم تتوفر يمكن استعمال أنابيب الماء الصافي وبذات القياسات حيث تثنى لتصبح كل منها بشكل قوس بنصف قطر 2متر مع مراعاة أن يبدأ ثنيها على بعد 30 سم من طرفيها بحيث تكون الثلاثين سنتمتر الأولى مستقيمة عند وضعها على الأرض بشكل عمودي عند تركيب الأقواس. يتم أعداد أساسات البيت بغرز أنابيب معدنية بقطر انج واحد وطول متر واحد في التربة على طول مسار حدود البيت ومن كلا جانبيه الطوليين ويكون عددها ضعف عدد الأقواس والمسافة بين أنبوب وآخر 1,5 متر ، ثم تثبت الأقواس بإدخال طرفيها داخل أنابيب الأساسات لمسافة 15 سم على الأقل ثم يغطى البيت بالنايلون الزراعي الشفاف بتثبيته بأسلاك في ثقوب الأقواس ، ويفضّل استعمال قطعة واحدة منه بطول وعرض 50 × 75متر تفرش أولا على الأرض قرب أحد الجانبين الطوليين للبيت ثم تسحب لتغطية الهيكل مع مراعاة شدها لتقاوم الرياح ، وتترك مسافة زائدة منها من الجانبين لتطمر في خندق يحفر على طول جانبي البيت بعمق 30 سم، ثم يركّب الإطار الخشبي لبابي البيت الأمامي والخلفي. يتم حفر خندقين على الجانبين الطوليين للبيت بعرض وعمق25 ×25سم لتصريف مياه الأمطار. يفضل وضع النايلون في يوم دافئ تزيد حرارته عن 15مْ لان وضعه وهو منكمش بسبب برودة الجو سيؤدي إلى ارتخائه في الأيام الحارة نتيجة تمدده ، (الشكل 1-4).

تستعمل في تغطية البيوت البلاستيكية أنواع مختلفة من الأغطية البلاستيكية Cladding materials ذات النفاذية المنخفضة للضوء وخاصة تلك التي تناسب مناخ المناطق الحارة كما في العراق، وأهم الأغطية المستعملة في البيوت البلاستيكية هي :

* **النايلون الزراعي الشفّاف** : وهو ارخص أنواع الأغطية وأكثرها شيوعا وهو مصنوع من "البولي ايثيلين" Polyethylene، وينتج بعرض يصل إلى 12متر وبأطوال مختلفة، وبذلك يمكن استعمال قطعة واحدة منه لتغطية البيت بأكمله، وهو مناسب لكل أنواع النباتات إلا أن نفاذيته لضوء الشمس اقل من الزجاج، فهو ينفذ 88% من الضوء العادي، و 80% من الأشعة فوق البنفسجية و 77% من الأشعة تحت الحمراء المنبعثة من التربة ليلا، وتفيد هذه الخواص في تقليل الحاجة للتهوية أثناء النهار ولكن تزداد الحاجة للتدفئة ليلا. من مساوئه سرعة تلفه بسبب تعرضه للشمس خلال فصل الصيف لذلك فهو لا يقاوم عادة أكثر من سنة واحدة.

الشكل (1-4) : منظر خارجي وداخلي لبيت بلاستيكي نموذجي وسلسلة لمجمع من البيوت البلاستيكية

* **البولي فينايل كلوريد Polyvinyl chloride (PVC)** : هو أكثر مقاومة من البولي ايثيلين ويبقى بحالة جيدة لمدة ثلاث سنوات ، أما نفاذيته للضوء فمماثلة للبولي ايثيلين ويسمح فقط بنفاذية 12% من الأشعة تحت الحمراء مما يؤدي إلى رفع حرارة البيت في الليل بحوالي 2-3 مْ عن الجو الخارجي. من عيوبه تجمّع الأتربة عليه مما يقلل من نفاذيته للضوء.

* **الاثيلين فينايل أسيتيت Ethylene – vinyl acetate** : هو أكثر مقاومة لأشعة الشمس من سابقه إذ يبقى بحالة جيدة بين 2–5 سنوات ، وهو أكثر كلفة ونفاذية للضوء من البولي ايثيلين إلا انه اقل نفاذية للأشعة تحت الحمراء.

* **الميلار بولستر Mylar polyester** : هي مادة شفافة جدا ولكن تنخفض شفافيتها تدريجيا بعد عدة سنوات من استعمالها ونفاذيتها للضوء مقاربة لنفاذية الزجاج ومقاربة لكلفته.

4.1.1. الغرفة المظلمة

تنشأ ملاصقة لمختبر الفايروسات وبقياسات تناسب الحاجة، وتزود بباب واحد ومن دون أية شبابيك مع مراعاة التهوية بواسطة ساحبة هواء وتوفير نظام تدفئة وتبريد ، وتجهّز الغرفة برفوف خشبية أو معدنية بعدة طبقات لوضع الأصص. وتستعمل لحفظ النباتات قبل تلقيحها ميكانيكيا بالفايروسات حيث تزداد حساسية النباتات للإصابة الصناعية بالفايروسات إذا حفظت في الظلام لمدة 24ساعة قبل التلقيح، كما يمكن استعمالها لتربية مزارع المن وأنواع الحشرات والناقلات الأخرى المستعملة في نقل الفايروسات.

5.1.1. غرفة تربية الأرانب (عنبر التربية).

يتم إنشاءها قريبة لمختبر الفايروسات وبأبعاد مناسبة حسب الحاجة لغرض تربية الأرانب لتحضير المصول الفايروسية. وهي غرفة عادية تبلط أرضيتها بالاسمنت وتزوّد بشبكة مجاري لتصريف مياه غسيل الفضلات المتساقطة من أقفاص التربية وذلك لكثرة تبوّل وتبرّز هذه الحيوانات. تجهّز بشبابيك كافية للتهوية مزودة بسلك مانع للحشرات مع إنارة مناسبة ويفضل أن لا تزيد شدة الإضاءة عن 3 وات /م ^{2} من مساحة الغرفة. يجب توفير مصدر تدفئة للغرفة شتاءا لحماية الولادات الحديثة لان معظم نفوق هذه الولادات ناتج عن النزلات البردية، كما يجب خفض حرارة الغرفة صيفا برش الأرضية باستمرار بالماء حيث أن أفضل درجة حرارة لتربية الأرانب تتراوح بين 18 – 28مْ. تجهّز غرفة تربية الأرانب بنوعين من الأقفاص وهما :

***أقفاص التربية** : والتي تصنع من هيكل خشبي أو معدني مغلف بالسلك المشبك وتفضل الأقفاص المعدنية لأنها أطول عمرا وأسهل تنظيفا، كما أن الأقفاص الخشبية تتشرب البول فتكون مصدرا للعدوى بالأمراض البكتيرية خاصة بكتريا الكوكسيديا ، وأن الأبعاد المعتمدة للقفص هي100×75×60 سم ، (الطول × العرض × الارتفاع). تصنع أرضية القفص من سلك معدني مشبك (BRC) ضيق الفتحات بحيث يكون الجانب الأملس منه للأعلى ، أو تصنع الأرضية من قطع خشبية بفاصل سنتمتر واحد بينها لتسمح بتساقط المخلفات. ويزود القفص بباب من الأمام ، ويفضل عمل بطرية أقفاص تضم عدد من الأقفاص بطابقين، وتزوّد الأقفاص بالمعالف والمساقي التي يتم تثبيتها على الأقفاص من الخارج وكما

مبين في الشكل (1-5) وذلك بدلا من وضع العلف والماء داخل القفص لان الأرانب كثيرة الحركة. إن أفضل غذاء للأرانب هو البرسيم وجريش الحبوب النجيلية والبقولية والكسبة وهي مركزات تخلط مع العليقة مثل كسبة فول الصويا أو الكتان أو بذور القطن أو السمسم.

الشكل (1-5) : أقفاص تربية الأرانب.

***أقفاص الولادة :** تحتاج الإناث عند الولادة إلى أقفاص خاصة لتضع فيها صغارها، وهي أقفاص مستقلة عن صندوق التربية وتصنع عادة من الخشب وتفرش بالكارتون والقش النظيف مع الاستبدال المستمر ، (الشكل 1-6).

الشكل (1-6): أقفاص ولادة الارانب

2.1. التلوث والتعقيم

يجب تجنب التلوث بالفايروسات النباتية الملوثة عند أجراء التجارب الفايروسية ، واهم تلك الفايروسات وأكثرها خطورة هي "الفايروسات الثابتة" Stable viruses القادرة على البقاء خارج النسيج النباتي لفترة طويلة وتحمّلها لظروف الحرارة والجفاف، ومنها فايروس موزائيك التبغ (TMV) وفايروس البطاطا أكس (PVX) إذ تصل قدرة بقاء الأول في الأوراق الجافة إلى حوالي 50 سنة ، فيما تبقى جسيمات فايروس TMV فعالة وملوثة لأسطح مناضد البيوت البلاستيكية والزجاجية والادوات الاخرى لمدة شهر، ويتحمل درجات حرارة بين 90-95 مْ في العصير الخام ، لذا يتوجب اتخاذ إجراءات التعقيم المناسبة لمنع حدوث حالات التلوث بهذه الفايروسات، وإذا ما حصل التلوث فانه سيربك نتائج الاختبارات وخاصة تجارب التشخيص. يوجد نوعين من الطرق المعتمدة للتخلص من التلوث بالطفيليات الممرضة للنبات وهما : (1) التعقيم Sterilization وهو قتل الخلايا الخضرية لأنواع الكائنات الحية الدقيقة وأبواغها وكذلك الفايروسات في المادة تحت التعقيم ، وهو المستعمل للتخلص من الفايروسات النباتية الملوثة (2) التطهير Disinfection وهو قتل الخلايا الخضرية فقط والقادرة على العدوى المسببة للإصابة ويتم هذا عادة بواسطة البسترة عند 65 مْ لمدة 30 دقيقة، وهذا النوع من التعقيم لا يستعمل مع فايروسات النبات. ولغرض تجنب التلوث فانه يجب أولا معرفة مصادره ومن ثم اختيار الطريقة الأنسب للتعقيم.

1.2.1. مصادر التلوث بالفايروسات النباتية الملوثة

1.1.2.1. الزجاجيات والأدوات المعدنية

هي إحدى أهم مصادر التلوث بالفايروسات وخاصة الثابتة إذا ما تم استعمالها مباشرة بعد تلوثها بها ، أما الزجاجيات والأدوات المعدنية الجديدة التي لم يسبق استعمالها فانه ليس من المحتمل تلوثها بالفايروسات النباتية لذا يمكن استعمالها دون تعقيم لعدم وجود فايروسات نباتية ملوثة للجو.

2.1.2.1. أيدي العاملين وملابسهم

تعد الأيدي والملابس مصدرا مهما للتلوث بالعديد من الفايروسات المنقولة ميكانيكيا وخصوصا عند نقل الشتلات وذلك بسبب ملامسة أوراق النباتات المصابة، وتظهر هذه المشكلة بوضوح في البيوت الزجاجية والبلاستيكية ومع فايروسات موزائيك التبغ (TMV) وموزائيك الطماطة (ToMV) والبطاطا أكس (PVX) إذ تنتقل بأيدي العاملين الذين تلامس أيديهم وملابسهم أوراق النباتات المصابة إلى النباتات الكاشفة الحساسة بسهوله عن طريق كسر الشعيرات النباتية الدقيقة التي تغطي بشرة أوراق العديد من أنواع هذه النباتات ، كما سجلت حالات من نقل فايروس موزائيك التبغ إلى الشتلات بواسطة أيدي العاملين المدخنين الذين تلامس أيديهم التبغ الجاف المصاب بالفايروس والذي يبقى فعالا فيه لسنوات عديدة.

3.1.2.1. الناقلات

ويشمل ذلك كل النواقل الفايروسية وهي الحشرات والحلم والنيماتودا والفطريات والتي يمكن أن تنقل الفايروسات غير المرغوب بها والتي تجلبها من الحقول المفتوحة وتدخلها إلى البيوت الزجاجية والبلاستيكية وتلوث نباتات الاختبار فتربك النتائج وتفسدها.

4.1.2.1. التربة

سجل في السنوات الاخيرة وجود عدد كبير من المسببات الفايروسية القاطنة للتربة والمنتشرة بدون ناقلات حيوية، وهناك اشارة الى وجود اكثر من 50 نوعا فايروسيا تعود الى 12 عائلة فايروسية قاطنة للتربة soil-borne viruses. حيث تتلوث التربة المستعملة للزراعة في البيوت البلاستيكية والزجاجية بأنواع عدة من هذه الفايروسات الثابتة المتبقية في الأنسجة النباتية المصابة أو التي استعملت تربتها في تجارب سابقة وهي ذات ذات تاثير اقتصادي ملموس على المحاصيل الزراعية ، ومنها فايروسات الإصفرار التماوتي لعروق البنجر السكري (BNYVV) ، والموزائيك والتبرقش الاخضر للخيار (CGMMV) وموزائيك التبغ (TMV) وموزائيك الطماطة (ToMV) وخشخشة التبغ (TRV)، فايروس موت التبغ (TNV) والتقزم الشجيري للطماطة (TBSV) وموزائيك الزهرة العربية (ArMV) ، إذ تنقل هذه الفايروسات إلى جذور النباتات السليمة وتدخل عن طريق الجروح الموجودة في الجذور الناتجة من احتكاك الجذور بحبيبات التربة.

5.1.2.1. البذور والأجزاء التكاثرية المصابة بالفايروسات

تعد البذور الحاملة للفايروس مصدرا مهما للتلوث إذ قد تُستعمل بذورا تحمل فايروسات معينة وتنتج نباتات مصابة بفايروس غير مرغوب به، وهناك بحدود 185 نوعا من الفايروسات تنقل ببذور أنواع مختلفة من النباتات. وكذلك الحال مع الأجزاء التكاثرية الخضرية كالدرنات والأبصال والأقلام والكورمات والفسائل وغيرها والتي تُستعمل لإنتاج نباتات كاشفة أو نباتات اختبار، فقد يكون مصدر تلك الأجزاء الخضرية من أمهات مصابة بالفايروسات وبالتالي ستنتج نباتات مصابة أيضا مما يربك النتائج، إذ من المعروف أن أي نبات مصاب جهازيا بفايروس معين فان الجزء الخضري الذي سيؤخذ منه سيكون مصابا بذلك الفايروس وسيعطي نباتا مصابا.

6.1.2.1. النباتات المصابة بالفايروسات

قد يستعمل الباحث دون قصد شتلات مصابة أصلا بفايروسات غير مرغوب بها جاءتها عن طريق الناقلات أو النقل الميكانيكي أو البذور، كذلك فان النباتات والأدغال المصابة التي تُترك في البيت الزجاجي ستكون مصدرا مهما للتلوث تُنقل منها الفايروسات إلى نباتات الاختبار الجديدة بواسطة الناقلات أو ميكانيكيا.

2.2.1. طرق التعقيم

1.2.2.1. تعقيم الأدوات الزجاجية والمعدنية

الطريقة (1) : تعقيم الأدوات الزجاجية والمعدنية بالفرن الكهربائي

1. تغسل الأدوات المراد تعقيمها جيدا بالماء والصابون أو بأي مسحوق غسيل ، ثم تنشّف بالورق الصحي المعقم؛

2. توضع في الفرن الكهربائي Oven وتثبت درجة حرارته عند 180مْ ويستمر التعقيم لمدة ساعة بعد استقرار درجة حرارة الجهاز عند هذه الدرجة؛

3. تخرج الأدوات من الفرن وتبرّد بوضعها على أوراق نظيفة على طاولات المختبر ويمكن استعمالها مباشرة أو بعد حين لأنه لا توجد خطورة من إعادة تلويثها بالفايروسات بعد إخراجها من الفرن إذ لا توجد فايروسات نباتية ملوثة للهواء الجوي.

تنويه : لا يُفضل تعقيم الشفرات المعدنية بالفرن لأنه يسبب إتلاف وتثلم نصلها الحاد.

الطريقة (2) : تعقيم الأدوات الزجاجية والمعدنية بالأشعة فوق البنفسجية

1. تغسل الأدوات المستعملة وتجفف كما في الطريقة السابقة؛

2. توضع الأدوات دون تكديس على طاولة نظيفة معقمة مباشرة تحت مصباح الأشعة فوق البنفسجية المنضدي Ultra Violet (UV) lamp الذي يعمل عند الطول الموجي 253 نانومتر ولمدة تعريض

عشر دقائق مع تجنب وقوف الباحث قرب المصباح أثناء فترة التعريض. يمكن تعقيم الأدوات باستعمال غرفة التدفق الهوائي الصفائحية Laminar air- flow cabinet لتعقيم هذه الأدوات لأنها مزودة بمصابيح الأشعة فوق البنفسجية وبنفس المدة أعلاه؛

3. يطفأ المصباح فور انتهاء مدة التعقيم، ويمكن استعمال الأدوات مباشرة أو بعد حين.

تنويه : (1) لا يفضّل استعمال الأشعة فوق البنفسجية مع المواد البلاستيكية ولا مع الأوساط الغذائية لأنها قد تسبب إنتاج مواد مثبطة فيها بسبب التفاعلات الكيموضوئية التي تحدثها (2) لا تخترق هذه الأشعة الأسطح المعدنية والبلاستيكية (3) عند مرورها في الهواء تسبب تكون الأوزون (O_3) ، فيما تكوّن فوق اوكسيد الهيدروجين (H_2O_2) عند مرورها في الماء (4) يجب الابتعاد عن منطقة التعريض خلال التشعيع بسبب التأثير الضار للأشعة على الصحة البشرية وخصوصا تاثيرها المسرطن للجلد.

الطريقة (3) تعقيم الأدوات الزجاجية والمعدنية بالماء المغلي

1. يهيأ إناء معدني أو زجاجي مناسب الحجم وتوضع فيه كمية مناسبة من الماء المقطر؛
2. تغمر المواد المعدنية والزجاجية في الإناء ويعرّض لمصدر حراري لحين الغليان؛
3. تترك المواد تحت الغليان لمدة 15 دقيقة وهي مدة كافية لقتل كل أنواع الفايروسات النباتية؛
4. تخرج المواد وتجفف بورق صحي معقم وتستعمل مباشرة أو تخزن لحين الاستعمال.

تنويه : (1) يفضّل استعمال الماء المغلي المذاب فيه كربونات الصوديوم بتركيز 2 % وتغمر فيه المواد لمدة 20 دقيقة إذ يزيد ذلك من كفاءة التعقيم لقتل الكائنات الأخرى غير الفايروسية بشرط عدم تكوينها للأبواغ وهي البكتريا والأجسام الخضرية للفطريات والفايتوبلازما.

(2) يمكن استعمال طريقة التعقيم بالغليان المتكرر Tyndallization كطريقة محورة لتحسين كفاءة طريقة التعقيم بالغليان العادي وذلك بتعريض المواد إلى التعقيم بالغلي بالماء لمدة خمسة دقائق ثم تركها تبرد لعدة ساعات وإعادة التعقيم بالغليان ولنفس الفترة ، ويمكن تكرار ذلك لعدة مرات لضمان فعالية التعقيم.

الطريقة (4) : تعقيم الأدوات الزجاجية والمعدنية بجهاز المعقام (Autoclave)

1. تهيأ الأدوات المراد تعقيمها بغسلها جيدا بالماء والصابون وتوضع في آنية معدنية وتوضع داخل جهاز المعقام؛
2. يشغل الجهاز عند ضغط 1,5 كغم /سم ^{2} وحرارة 121مْ وتعقم المواد فيه لمدة 15 دقيقة؛
3 . تخرج المواد وتجفف بورق صحي معقم وتستعمل مباشرة أو تخزن لحين الاستعمال.

تنويه : (1) لا يفضل تغليف الأدوات بورق الألمنيوم قبل وضعها بجهاز المعقام لان ذلك سيقلل من كفاءة التعقيم بمنعه وصول البخار إلى سطح المادة ولا تكون الحرارة لوحدها عندئذ كافية للتعقيم (2) إن التأثير المعقم للبخار المسلط بضغط عالي لا يأتي فقط من الحرارة المباشرة ولكن من الكمية الهائلة للحرارة الكامنة المتراكمة التي تنطلق عند تكثيف البخار الساخن والتي تصل إلى 520 كالوري لكل غم منه (cal/g) وعند تكاثفه حول الجسم المراد تعقيمه فان البخار سوف ينكمش إلى حوالي 800/1 من حجمه الأصلي وبذلك سيتكون غشاء مائي عالي الحرارة حول المادة المراد تعقيمها مما يزيد من كفاءة تعقيمها، كما أن عملية التكاثف هذه تسمح بدخول البخار إلى داخل أجسام الطفيليات الملوثة ومنها الفايروسات مؤدية الى قتلها.

الطريقة (5) : تعقيم الأدوات الزجاجية والمعدنية بالكيماويات

يمكن استعمال أنواع عديدة من الكيماويات للتخلص من الفايروسات النباتية الملوثة وأهم تلك المواد محلول "مركب الفوسفات ثلاثي الصوديوم Trisodium phosphate , TSP ، والمحاليل الفينولية المنتجة تجاريا والتي هي من مشتقات حامض الكربوليك Carbolic acid ورمزه الكيماوي C_6H_2OH بتركيز 5%، وكذلك محلول هايبكلورايت الصوديوم NaOCL تركيز 1% التي تعد مطهرة جيدة ضد الفايروسات والفطريات الملوثة للسطوح الصلبة كالبلاستك، الاخشاب والمعادن في البيوت الزجاجية، حيث تغمر فيها الزجاجيات والأدوات المعدنية. وفيما يلي طريقة تحضير محلول TSP المعقم وكيفية استعماله في تعقيم الادوات:

1. يحضّر محلول مركب الفوسفات ثلاثي الصوديوم بمقدار خمسة ألتار بتركيز 10% مع الماء وهي كمية مناسبة للاستعمال المختبري حيث يذاب 400غم من المركب و 200غم من الصابون السائل (مادة ناشرة) في لتر من الماء المغلي ثم يكمل الحجم بالماء باستعمال إناء بلاستيكي مناسب. في حالة عدم توفر الصابون السائل يمكن الاكتفاء بمحلول TSP فقط؛
2 . تهيأ المواد المراد تعقيمها بغسلها أولا بالماء والصابون، ثم تغمر بالمحلول لمدة عشر دقائق؛
3. تخرج المواد من المحلول المعقم وتغسل بالماء المقطر المعقم لإزالة آثاره وتجفف بورق صحي معقم وتستعمل مباشرة أو تخزن لحين الاستعمال.

تنويه : (1) القدرة التعقيمية لمركب TSP هي بسبب قلويته العالية حيث تبلغ قيمة دالته الحامضية (pH) 11,7 وهي درجة متلفة للفايروسات بسبب دنترتها (تحطيمها) للبروتين الفايروسي.

2.2.2.1. تعقيم الأيدي

لغرض تعقيم الأيدي عند إجراء الاختبارات الفايروسية والأعمال الزراعية في البيوت الزجاجية والبلاستيكية، تتبع أحدى الطرق التالية :

1. غسل الأيدي جيدا ولعدة مرات بالماء والصابون وتجفيفها بالهواء الساخن أو بالورق الصحي المعقم مع مراعاة عدم لمس أية أداة يحتمل أن تكون ملوّثة بعد ذلك.
2. تعقم الأيدي بغمرها لمدة لا تزيد عن دقيقة بمحلول الفوسفات ثلاثي الصوديوم تركيز 10% ثم غسلها بماء مقطر ومعقم وتجفيفها كما في الفقرة أعلاه.
3. غمر الأيدي "بالحليب المنزوع الدهن" Skim milk لعدة دقائق ثم غسلها بماء مقطر ومعقم وتجفيفها كما في الفقرة (1) أعلاه.
4. استعمال القفازات الطبية المعقمة من قبل العاملين ورميها بعد كل استعمال.

تنويه : (1) الحليب الشرش (المزال للدهن) Skim milk يكون غير فعال ضد بعض الفايروسات الملوثة للبيوت الزجاجية مثل فايروس Cymbidium mosaic virus ، لذلك يفضل إستبداله بالحليب المجفف المنزوع الدهن nonfat dry milk بتركيز 20% مع الماء العادي (2) يجب الأنتباه عند رش الحليب الجاف المنزوع الدهن على النباتات حيث أنه يعطي مظهر للنباتات المعاملة وكأنها مصابة بالبياض الدقيقي.

3.2.2.1. تجنب الناقلات الحاملة للفايروسات الملوثة

يجب التخلص من، أو تجنب كافة الناقلات التي يحتمل وجودها في البيت الزجاجي سواء في التربة (فطريات و نيماتودا) أو التي تتطفل على المجموع الخضري (الحشرات والحلم) وهي الأكثر خطورة في نشر الفايروسات وإفساد التجارب الفايروسية، ويتم ذلك باتخاذ الإجراءات التالية :

1. تغطية كافة شبابيك وفتحات البيت الزجاجي أو البلاستيكي بسلك مانع للحشرات بحيث لا يقل عدد الأسلاك في السنتمتر طول عن تسعة، وبذلك ستكون فتحات السلك صغيرة للحد الذي لا يسمح لأصغر الحشرات بالدخول وخاصة حوريات المن مع ضمان توفيره التهوية الجيدة للبيت.
2. يزوّد باب البيت الزجاجي بآخر إضافي مصنوع من السلك المشبك المانع للحشرات وان تكون المسافة بينهما بحدود متر.
3. معاملة البيت الزجاجي أسبوعيا بمبيد حشري عام مناسب لقتل كافة الحشرات إما برش النباتات كافة بمحلول مبيد مناسب باستعمال المرشة الظهرية، أو تضبيب البيت بكامله ببخار المبيد وهي الطريقة الأفضل التي تضمن وصول بخار المبيد إلى كل أرجاء البيت ويتم ذلك باستعمال "المضببات الكهربائية" Electrical misters التي تحوّل محلول المبيد إلى "رذاذ ضبابي" Aerosol مع ضرورة إغلاق كافة

منافذ البيت الزجاجي بإحكام عند التضبيب وعدم دخوله إلا بعد فترة مناسبة، وأن القياس العام المستعمل في هذه الطريقة هو 30 مل من محلول المبيد / ألف قدم ^{3} من حجم البيت.

4. معاملة النباتات المصابة بالحشرات المقيمة كالمن بغمرها مباشرة في محلول المبيد وذلك بمسك الأصيص باليد جيدا ثم قلبه وغمر المجموع الخضري بكامله في محلول المبيد لعدة ثواني ثم إرجاعه لوضعه الطبيعي.

5. مكافحة الناقلات التي تقطن التربة وهي الفطريات والنيماتودا عن طريق تعقيم التربة والمبينة في الفقرة **(4.2.2.1)**.

تنويه : (1) من المفضل أن تكون المبيدات المستعملة سريعة الزوال خلال مدة لا تتجاوز يوم إلى يومين (2) يجب الانتباه عند استعمال أي مبيد لأول مرة في البيت الزجاجي أن يتم اختباره أولا على عدد قليل من النباتات الكاشفة للتأكد من عدم ضرره عليها، حيث يوجد عدد من أنواع النباتات الكاشفة وخاصة أنواع الجنس *Chenopodium* حساسة للرش بأنواع من المبيدات وتعطي بعد الرش أعراضا شبيهة بالأعراض التي تسببها الفايروسات مما يربك النتائج.

4.2.2.1. تعقيم التربة

تعقم التربة للتخلص من الفايروسات المنقولة بها وكذلك من الفطريات والنيماتودا القاطنة والناقلة للفايروسات وكذلك من بذور الأدغال، فضلا عن التخلص من الفطريات الممرضة للنبات وخاصة تلك المسببة لأمراض تعفن الجذور والذبول وسقوط البادرات التي تسبب خسائر في النباتات الكاشفة.

الطريقة (6) : تعقيم التربة بالفورمالين 40%

1. تهيأ التربة الجافة المراد تعقيمها وتعبأ في أكياس بلاستيكية سعة 25 كغم خالية من أية ثقوب؛

2. يضاف محلول الفورمالين 40% بمقدار 50 مل لكل كيس تربة والذي يقفل جيدا بحيث لا يسمح لبخار الفورمالين بالتسرب منه ويترك مقفلا لمدة أسبوعين؛

3. تفتح الأكياس لغرض التهوية لمدة أسبوع للتخلص من الفورمالين المتبخر وتكون التربة بعد ذلك صالحة للاستعمال.

تنويه : (1) الفورمالين 40% وهو عبارة عن محلول "الفورمالديهايد" Formaldehyde المذاب بتركيز 40% في الماء، ورمزه الكيماوي H.CHO وهو معقم كفء يقتل كل أنواع الطفيليات **(2)** بخار الفورمالين ذو قابلية عالية للذوبان في الماء لذلك لا ينصح بتعقيم التربة وهي رطبة لان ذلك يسبب ذوبان بخاره وبقائه فيها لفترة طويلة حتى بعد إنتهاء مدة التعقيم وتبخره تدريجيا منها مما قد يسبب أضرارا صحية للعاملين.

الطريقة (7) : تعقيم التربة بالمبيد باسامايد

يمكن تعقيم تربة البيت الزجاجي أو البلاستيكي أو تربة حقول التجارب المفتوحة الصغيرة المساحة باستعمال أنواع من المبيدات ذات السمية العالية والتأثير العام ومنها "الباساميد المحبب" Granular Basamide الذي يحوي 98% من المادة الفعالة "دازوميت" والذي يقتل كل أنواع النيماتودا وفطريات التربة والحشرات القاطنة فيها والأعشاب الضارة، ويستعمل قبل الزراعة بالطريقة التالية :

1. تسقى التربة جيدا وتترك لمدة أسبوع تقريبا ثم يتم حرثها لتفكيكها وهي رطبة بعمق 20سم؛
2. يضاف المبيد باسامايد نثرا باليد على سطح التربة وبمقدار 20غم/م^2 ؛
3. يخلط المبيد جيدا مع التربة وإيصاله العمق المطلوب وهو بحدود 20 سم؛
4. ترش التربة فورا بالماء رشا خفيفا ثم تسوى بتمرير اسطوانة معدنية ثقيلة (حادلة) عليها لغلق مساماتها؛
5. تترك التربة لمدة 15 يوما ثم تحرث ثانية لغرض التهوية لمدة 10 أيام، لتصبح بعدها صالحة للزراعة.

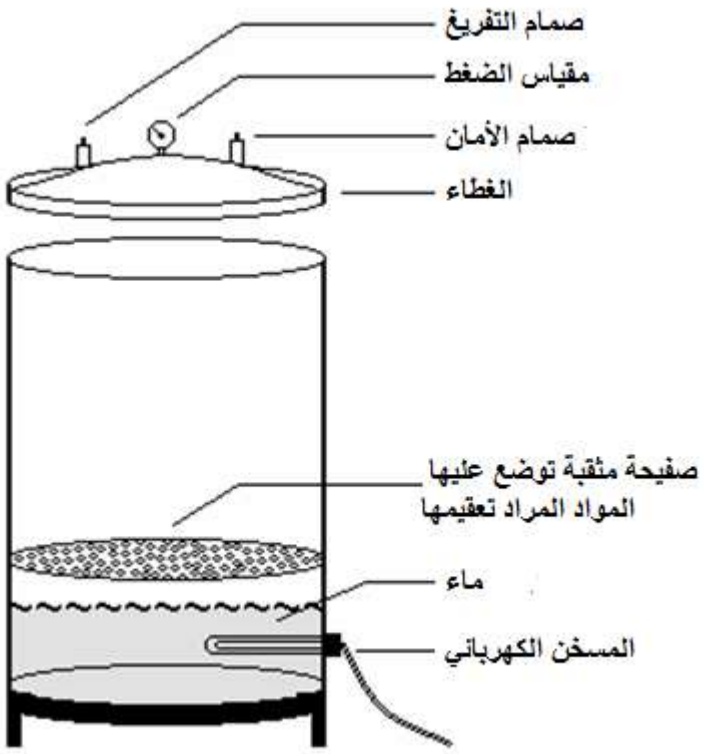
تنويه : (1) إذا استعمل المبيد في البيوت الزجاجية والبلاستيكية فانه يجب نقل كافة النباتات خارج البيت بسبب سميته لها مع مراعاة فترة التهوية الكافية للتربة (2) ضرورة لبس القفازات من قبل العاملين عند نثر المبيد.

الطريقة (8) : تعقيم التربة بالفرن الكهربائي أو المعقام

يمكن استعمال أحد هذين الجهازين لتعقيم التربة إذا كانت كمياتها المطلوبة قليلة.

1. تهيأ التربة الجافة وتنعّم وتوضع في أكياس من الخام (القماش) بوزن كغم واحد لكل كيس وتربط الفوهة جيدا؛
2. توضع الأكياس في "الفرن الكهربائي" Oven أو جهاز "المعقام" Autoclave من دون تكديس أي يتم فرشها؛
3. يشغّل الفرن الكهربائي على 180مْ ويستمر التعقيم لمدة ساعة ونصف من لحظة وصول درجة حرارة الجهاز إلى الدرجة المذكورة. فيما يستعمل جهاز المعقام عند ضغط 1,5 كغم /سم ^{2} وحرارة 121مْ ولمدة نصف ساعة؛
4. تخرج أكياس التربة بعد انتهاء التعقيم ويمكن استعمالها فورا أو خزنها لحين الحاجة.

يبين الشكل (1–7) مخططا لأحد أنواع أجهزة المعقام البسيطة.



الشكل (1-7): مخطط لجهاز المعقام البسيط

تنويه : توجد أنواع من أجهزة المعقام المصممة خصيصا لتعقيم التربة بكميات كبيرة وهي أجهزة كبيرة الحجم مزودة بمجرّات معدنية مسطحة واسعة تفرش عليها التربة وتعقم.

الطريقة (9) : التعقيم الشمسي للتربة (البسترة الشمسية)

تعتمد طريقة "البسترة الشمسية" Solarization على الاستفادة من أشعة الشمس المباشرة خلال شهري تموز وآب في العراق للتعقيم إذ تصل حرارة الشمس في منتصف النهار إلى ما يزيد قليلا عن60 مْ وبالتالي فان الأشعة الشمسية لدينا تمتلك طاقة هائلة حيث يصل مقدار الإشعاع الشمسي خلال أشهر حزيران وتموز وآب بين 19,5 –23,8 كيلو سعرة حرارية/سم^2، لذلك يستفاد من التراكم الحراري خلال الأشهر المذكوره لحرارة أشعة الشمس لتعقيم التربة والتخلص من كل أنواع الطفيليات وبذور الأدغال الموجودة فيها وأهمها أنواع الفطريات *Fusarium* spp ، *Macrophomena* spp و *Rhizoctonia*

solani وغيرها، وكذلك أنواع الديدان الثعبانية وخاصة الأنواع التابعة لجنس *Meloidogyne*، وهي لا تؤثر على بعض الكائنات الحية المترممة المفيدة في التربة ومنها الفطر *Trichoderma* ، كما تقتل بذور العديد من الأدغال الضارة الحولية والمعمرة ومنها الحنيّطة والرويطة والدهنان والحندقوق والثيّل والخبّاز والسعد، وهي طريقه رخيصة التكاليف وغير ملوثة للبيئة ولا تؤثر على الدالة الحامضية للتربة، أو الناقلية الكهربائية لها (Electrical conductivity). لذلك ينصح باستعمالها في العراق ، وتنفذ بالطريقة التالية :

1. تهيأ التربة المراد تعقيمها بإزالة الكتل الكبيرة منها ثم يتم فرشها بسمك 30سم وهي جافة على قطعة مزدوجة الطبقة من النايلون الزراعي الشفاف في مكان مفتوح ومنبسط وجاف؛
2. تغطى التربة بطبقة من البلاستك الأسود وتثبت جوانبه جيدا حولها بوضع كمية مناسبة من التراب فوق جوانب البلاستك لمنع دخول وخروج الهواء؛
3. تترك لمدة ستين يوماً تقريبا تبدأ من أواخر حزيران إلى بداية أيلول، وخلال هذه المدة ونتيجة تعرض التربة المغطاة لأشعة الشمس المباشرة فأن درجة الحرارة سترتفع داخلها إلى ما يقرب من 65مْ؛
4. يرفع الغطاء البلاستيكي الأسود وتستعمل التربة.

تنويه : (1) يمكن استعمال الطريقة ذاتها لتعقيم تربة البيت الزجاجي أو البلاستيكي قبل إنشاءه بتغطية أرضية البيت بعد حرثها بالبلاستك الأسود ولنفس المدة المذكورة حيث يؤدي ذلك إلى تعقيمها (2) لهذه الطريقة سلبية واحدة وهي تأثيرها المتلف للمواد العضوية في التربة مما يسبب إنخفاض نسبتها فيها، إلا انه يمكن تلافي ذلك بتعويض ذلك الفقد بإضافة كمية مناسبة من السماد العضوي المعقم إلى التربة بعد إنتهاء بسترتها الشمسية.

5.2.2.1. تجنب استعمال البذور الحاملة للفايروسات

تنقل العديد من فايروسات النبات بواسطة البذور إما نقلا حقيقيا في الأجنة أو الاندوسبرم، أو نقلا كاذبا في أغلفة البذور، وأن استعمال الباحث لبذور حاملة للفايروسات سيؤدي إلى إدخال أنواع من الفايروسات غير المرغوب بها إلى داخل البيت الزجاجي وسيفسد التجارب الفايروسية ، لذا يتوجب استعمال بذور مضمونة ومصدّقة خالية من الفايروسات وعدم إستعمال بذور مجهولة المصدر وخاصة بذور البقوليات لأنها العائلة النباتية الأكثر نقلا للفايروسات ببذورها ، علما بان أغلبية الفايروسات المنقولة بالبذور لا تعطي أية أعراض خارجية على البذور المصابة لذا لا يمكن الاعتماد على الفحص البصري كوسيلة للكشف عن هذه البذور. تعتمد الإجراءات المتخذة للحصول على بذور خالية من الفايروس على معرفة طريقة النقل هل هو كاذب أم حقيقي لكي تتخذ الإجراءات المناسبة اتجاهها وكما يأتي :

(أ). الإجراءات المتخذة مع النقل الحقيقي للفايروسات في البذور

لا توجد طريقة مضمونة للتخلص من الفايروسات المحمولة حقيقيا بالبذور لذلك فان الإجراء الوقائي هو الطريق الأفضل الذي يضمن حصول الباحث على بذور سليمة يبدأ بها تجاربه ويتم ذلك (1) باستعمال بذور موثوقة ومصدّقة منتجة من قبل شركات إنتاج البذور المتخصصة التي تضمن خلو بذورها من الفايروسات (2) الحصول على البذور من نباتات يقوم الباحث بإكثارها في البيت الزجاجي وأنه متأكد تماما من خلوها من الفايروسات الملوثة. إن هذين هما المصدرين الوحيدين اللذان يضمنان الحصول على البذور الخالية من الفايروسات.

(ب). الإجراءات المتخذة مع النقل الكاذب للفايروسات في البذور

(1) الحصول على البذور من المصدرين المذكورين في الفقرة السابقة (2) يمكن التخلص من الفايروسات المحمولة في أغلفة البذور وهي أنواع قليلة العدد أهمها فايروس موزائيك الطماطة (ToMV) ، بإجراء عملية التعقيم السطحي المعتادة للبذور وذلك إذا ما اضطر الباحث لاستعمال بذورا مشكوك بإصابتها حيث أن هذا الإجراء يضمن إتلاف الجسيمات الفايروسية الموجودة في الطبقة السطحية من البذور فضلا عن قتل الطفيليات الأخرى، ويتم ذلك كما يأتي :

الطريقة (10) : التعقيم السطحي لبذور النباتات المستعملة في الاختبارات الفايروسية

1. يتم اختيار البذور السليمة مظهريا واستبعاد المجروحة ميكانيكيا والمشوهة والضامرة؛

2. توضع البذور في قطعة نظيفة من قماش الشاش وتعقد ثم تغمر تماما لمدة 2–3 دقائق في الايثانول 70% أو "الايزوبروبانول" Isopropanol 80%؛

3. ترفع البذور من الكحول المستعمل وتغمر لمدة عشر دقائق في محلول هايبوكلورايت الكالسيوم $Ca(OCL_2)_2$ تركيز 1% وأس هيدروجيني 6 مضافا إليه عدة قطرات من مادة "الترايتون اكس – 100" Triton X-100 أو التوين– 80 Tween-80 لكل 100 مل من محلول هايبوكلورايت الكالسيوم (حجم : حجم) أي بتركيز 0,05 %، وان لم تتوفر هاتين المادتين يمكن استبدالهما بأي نوع من الصابون السائل المتوفر لضمان نشر المادة المعقمة بشكل متجانس على سطح البذور وخصوصا تلك الحاوية على شعيرات أو الخشنة السطح؛

4. ترفع البذور من المادة المعقمة وتغمر في بيكر يحوي ماء مقطر معقم لمدة 2–3 دقائق لإزالة أثر المادة المعقمة؛

5. تفرش البذور بعد إخراجها من الشاش على ورقة ترشيح معقمة لتجفيفها، وبذلك تكون جاهزة للزراعة فورا.

تنويه : (1) التعقيم السطحي للبذور يضمن أيضا التخلص من المسببات الفطرية وخاصة فطريات التعفن الطري وسقوط البادرات وتعفن الجذور المحمولة بالبذور والتي تسبب خسائر كبيرة في شتلات النباتات الكاشفة ونباتات الاختبار في البيوت الزجاجية والبلاستيكية (2) يمكن تعقيم البذور باستعمال محاليل بديلة لمحاليل التعقيم المستعملة أعلاه، وهي مزيج المركب الفينولي الكلوراكس Chlorax والايثانول تركيز 95% بنسبة (1:1 حجم:حجم) ، أو محلول الجلوترالديهايد Glutaraldehyde ورمزه الكيماوي $CHO.CH_2.CH_2.CHO$ بتركيز 2% مع الماء بغمرها فيها لمدة 2–3 دقائق ثم تعامل كما في الطريقة أعلاه، علما بان التأثير القاتل للجلوترالديهايد يأتي من قدرته على استبدال مجموعة الأمين بمجموعة الفورمالديهايد في البروتينات كما يؤثر أيضا على الأحماض النووية.

6.2.2.1. تجنب استعمال الأجزاء التكاثرية الخضرية الحاملة للفايروسات

يجب تجنب استعمال أي جزء تكاثري كالدرنات والأبصال والكورمات والأقلام، الخ في إكثار النباتات السليمة لأغراض البحوث الفايروسية إذا كانت تلك الأجزاء مأخوذة من نباتات مصابة جهازيا بالفايروس لأنها ستعطي نباتات مصابة، لذا يجب الحصول على تلك الأجزاء التكاثرية من نباتات سليمة.

قد يضطر الباحث في بعض الحالات الخاصة لاستعمال أقلام أو أجزاء خضرية مأخوذة من نباتات مصابة بسبب عدم وجود النبات السليم البديل وفي هذه الحالة قد تفيد بعض المعاملات الحرارية في التخلص من الفايروس بالغمر بالماء الساخن أو المعاملة بالهواء الساخن، ويبين الجدول (1–4) بعض هذه المعاملات والفايروسات التي يمكن إبادتها وهي داخل الأجزاء الخضرية المصابة ومن دون التأثير على حيوية تلك الأجزاء.

الجدول(1–4): استعمال الحرارة في إبادة بعض أنواع الفايروسات من الأجزاء الخضرية التكاثرية

اسم الفايروس ومختصره	الجزء النباتي المعامل	نوع المعاملة	درجة الحرارة المئوية	مدة المعاملة (اليوم)
فايروس موزائيك التفاح (AMV)	أقلام تفاح	هواء ساخن	37	28
فايروس التبقع الحلقي للقرنفل (CRSV)	أقلام قرنفل	هواء ساخن	36	28–21
فايروس ترستيزا	أقلام	هواء	32	360–120

الحمضيات (CTV)	حمضيات	ساخن		
فايروس موزائيك الخيار (CMV)	نباتات تبغ وخيار	هواء ساخن	36	28-21
فايروس التخطط الأصفر لقصب السكر.(SCSV)	عقل	ماء ساخن	52	20 دقيقة
فايروس أسبرمي الطماطة (TAV)	نباتات طماطة	هواء ساخن	36	28-21

3.1. النباتات الكاشفة المشخّصة ونباتات الحفظ والإكثار

تتطلب تجارب عزل الفايروسات وتشخيصها حيويا استعمال مجموعة مختارة من "النباتات الكاشفة" Indicator plants والمسماة أيضا "النباتات المشخّصة" Diagnostic plants، فضلا عن "نباتات حفظ وإكثار" العزلات الفايروسية Propagative plants. تلقح هذه النباتات عادة بالفايروسات المراد دراستها بطريقة التلقيح الميكانيكي أو بالناقلات أو بالتركيب، وبذلك فان هذه النباتات تعد "الوسط" medium الذي تحفظ فيه الفايروسات والتي يتم إكثارها فيها، فهي بمثابة الأوساط الزراعية المستعملة لتنمية الفطريات والبكتريا إذ أنه من المعروف أن الفايروسات النباتية لا تنمّى على أوساط غذائية صناعية.

تم اختيار مجموعة كبيرة من أنواع النباتات الكاشفة المشخصة المستعملة عالميا وذلك من خلال عملية انتقاء واسعة نتجت من تجارب قام بها أجيال من الباحثين فأصبح لكل فايروس نباتي مجموعته الخاصة من نباتات التشخيص والإكثار والحفظ. وتعّرف النباتات الكاشفة بأنها النباتات التي تستجيب لكل نوع فايروسي معين بإظهار أعراض متميزة تساعد في تشخيصه. وأول من استعمل النباتات الكاشفة في تشخيص الفايروسات هو العالم "سمث" (Smith) سنة 1931. يبين الجدول (1-5) بعض أنواع النباتات الكاشفة المختارة عالميا لتشخيص الفايروسات ذات الأهمية الاقتصادية، فيما يبين الشكل (1-8) عدد من أهم أنواع النباتات الكاشفة المستعملة في تشخيص فايروسات النبات.

الجدول (1–5) أهم أنواع النباتات الكاشفة المستعملة في تشخيص العديد من أنواع فايروسات النبات.

الاسم العربي للنبات	الاسم العلمي	عدد الفيروسات التي تصيبها	عدد الفيروسات التي لاتصيبها
البنجر السكري	*Beta vulgaris*	102	125
الزربيح (السرمق)	*Chonopodium amaranticolor*	313	158
الرغيلة	*C. album*	100	44
الرغيلة	*C. foetidum*	47	21
الرغلية	*C. quinoa*	334	130
الخيار	*Cucumis sativus*	142	266
الداتورة	*Datura stramonium*	157	200
ورد الجومفرينـــــــا (المحلّدة الكروية)	*Gomphrena globosa*	225	168
الطماطة	*Lycopersicon esculentum*	136	185
التبغ البري	*Nicotiana glutinosa*	200	207
التبغ	*N. rustica*	115	201
التبغ	*N. tabacum*	228	223
التبغ	*N. tabacum* var. white Burley	228	223
التبغ	*N. tabacum* var. Xanthi	228	223
التبغ	*N. tabacum* var. Samsun	228	223
الفاصوليا	*Phaseolus vulgaris*	205	237

88	88	*Physalis floridana*	المنطاد
164	124	*Pisum sativum*	البزاليا
84	44	*Solanum melongena*	الباذنجان
72	109	*Spinacia oleracea*	السبيناغ
76	54	*S. tuberosum*	البطاطا
153	108	*Vicia faba*	الباقلاء
97	57	*Zea mays*	الذرة الصفراء
125	76	*Zinnia elegans*	ورد الزينيا

- الارقام في العمودين تمثل النباتات التي اختبرت تجريبيا اتجاه الفايروس المعني بتلقيحها ميكانيكيا به، (–) لاتوجد معلومات دقيقة.

تعد أنواع التبغ مهمة جدا في الكشف عن العديد من الفايروسات، وأكثرها استعمالا هو التبغ البري *N.glutinosa* ، كما يستعمل نبات البازلاء في الكشف عن فايروسات البقوليات وكنبات صائد للكشف عن بعض فايروسات الجنس *Nepovirus* ، فيما يستعمل نبات الخيار للكشف عن فايروسات اللوزيات وخاصة الجنس *Ilarvirus*. يفضل تلقيح النباتات الكاشفة عندما تكون في أعلى حالة الحساسية للفايروس المختبر، حيث تلقح النباتات البقولية في مرحلة الورقتين الفلقيتين ، والنباتات القرعية في مرحلة الورقتين الأوليتين ، أما بقية النباتات التي تعود لعوائل أخرى فتلقح في مرحلة نمو 3–4 أوراق.

1.3.1. مواصفات النباتات الكاشفة

1. سهلة الإكثار والتربية وسريعة النمو، ويفضل أن تكون من النباتات الحولية أو ثنائية الحول؛
2. تنقل إليها الفايروسات بسهولة عن طريق التلقيح الميكانيكي؛
3. ذات أوراق كبيرة وعريضة لتسهيل عملية التلقيح ووصف الأعراض؛
4. خالية من المواد المثبطة للفايروسات.

2.3.1. مواصفات نباتات حفظ وإكثار الفايروسات

1. أن تكون نباتات سهلة التربية سريعة النمو؛
2. تصاب جهازيا بالفايروس ويكون تركيز الفايروس فيها عاليا و خالية من المواد المثبطة؛

3. يفضل أن تكون نباتات معمرة أو ثنائية الحول.

3.3.1. استعمالات النباتات الكاشفة والحافظة للفايروسات

1. حفظ وإكثار الفايروسات لفترة زمنية طويلة؛
2. تشخيص الفايروسات بالاعتماد على الأعراض التي تظهرها عند تلقيحها بالفايروس المختبر؛
4. إظهار الإصابات الكامنة وفصل الفايروسات في الإصابات المختلطة؛
5. إجراء الدراسات الكمية على الفايروس المعني ، والتي تستوجب أن تكون استجابة النبات الكاشف استجابة موضعية لكي يمكن حساب أعداد البقع الموضعية وتحويل الاستجابة الى معيار كمي؛
6. تقييم نجاح العديد من الاختبارات الفايروسية الهامة ومنها خطوات عملية تنقية الفايروسات.

4.3.1. طرق إكثار وحفظ وزراعة النباتات الكاشفة

إن أفضل طريقة لإكثارها هي بالبذور وتجنب إكثارها خضريا قدر الإمكان، ويجب الحصول على هذه البذور من مصادر موثوقة كشركات إنتاج البذور، كما أن هناك مصادر عالمية أخرى موثوقة لإنتاج البذور ومنها مختبر مصادر الأصول الوراثية التابع لمركز البحوث الزراعية الأمريكي

Germplasm Resources Laboratory, Agricultural Research Center
Beltsville , MD.20705, U.S.A.

مختبر الاصول الوراثية، مركز البحوث الزراعية. مدينة بيلتسفيل 20705 – الولايات المتحدة الامريكية

ГНУ ВИТИН РОССЕЛЬХОЗАКАДЕМИЯ 350072 Г. КРАСНОДАР
УЛ. МОСКОВСКАЯ 42 ФАКС 8(861)2520882 (العنوان باللغة الروسية)

GNU VIITIN Agricultural Academy 350072 KRASNODAR, Str. Moscow 42
Fax 8(861)2520882

المعهد العلمي للتبوغ في عموم روسيا– الاكاديمية الزراعية 350072، مدينة كراسندار، شارع مسكوفسكيا 42 ، فاكس 8(861)2520882 . روسيا الاتحادية.

أو أن يتم الحصول عليها من قبل الباحث شخصيا من نباتات ضمن عدم إصابتها بالفايروس. يجب أن تحفظ بذور النباتات الكاشفة في عبوات زجاجية محكمة الغلق ويكتب عليها الاسم العربي والانكليزي والعلمي للنبات وتاريخ الحصول عليها ومصدرها، وتحفظ في حاضنة مبردة عند حرارة 10مْ. من الضروري معرفة نسب إنبات البذور المحفوظة بإجراء اختبار الإنبات عليها في فترات دورية يختارها الباحث لغرض تجديد خزين البذور كلما دعت الحاجة لذلك.

ولغرض زراعة بذور النباتات الكاشفة تتبع الخطوات الآتية :

الطريقة (11) : كيفية زراعة مستنبتات (دايات) بذور النباتات الكاشفة

1. تهيأ أصص بلاستيكية أو فخارية جديدة بأحجام مناسبة يختارها الباحث، أما إذا اضطر إلى استعمال الأصص المستعملة فيجب أولا غسلها جيدا بالماء لإزالة التربة القديمة العالقة بها تماما ثم تعقيمها بغمرها بمحلول هايبوكلورايت الصوديوم 30% لمدة ثلاث ساعات ثم غسلها بالماء لإزالة اثر المادة المعقمة؛

2. تملأ الأصص بتربة مزيجية معقمة ناعمة منخولة مخلوطة مع البتموس بنسبة ثلاثة أجزاء تربة الى جزء واحد بتموس، مع مراعاة تسوية سطح التربة ورصه جيدا في الأصيص، ثم تسقى قليلا بالماء؛

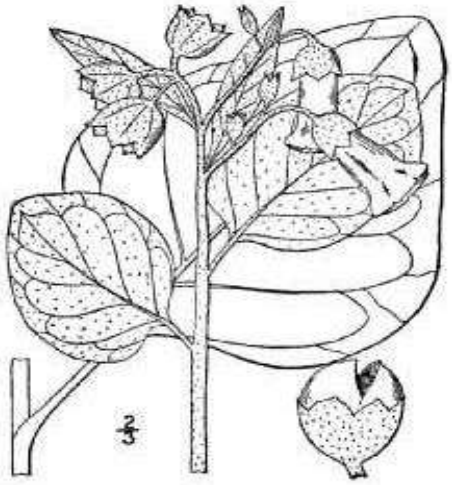
3. تزرع البذور نثرا باليد وبشكل كثيف ومتجانس إذا كانت صغيرة الحجم مثل بذور التبغ والبصل، في كل أصيص ثم تنثر فوقها طبقة من التراب الناعم لتغطيتها بحيث لا يزيد سمك التربة المنثورة فوق البذور عن حجم البذرة؛

4. توضع فوق الأصيص ورقة عادية مثقبة وتسقى بالماء بهدوء وترفع الورقة مباشرة بعد إنبات البذور؛

5. يمكن الحصول على الشتلات المطلوبة بعد بلوغها مرحلة نمو 3– 5 أوراق من الأصيص والتي يتم شتلها بواقع نبات واحد لكل أصيص؛

6. لغرض زراعة البذور الكبيرة الحجم كبذور الباقلاء وبذور النباتات غير القابلة للشتل مثل نباتات العائلة القرعية، تزرع في كل أصيص 3 بذور مع مراعاة خف النباتات إلى نبات واحد لكل أصيص بعد الإنبات.

تنويه : (1) تتم الزراعة حتما داخل البيت الزجاجي أو البلاستيكي ولا يسمح نهائيا بزراعتها في الأرض المفتوحة لتجنب إصابتها بالحشرات التي قد تنقل إليها الفايروسات غير المرغوب فيها (2) رعاية تلك النباتات بالسقي المنتظم والتسميد والمكافحة الوقائية الدورية لمنع الإصابة بالحشرات والفطريات خصوصا تلك المسببة لتعفن الجذور والتعفن الطري وسقوط البادرات وغيرها من الطفيليات والآفات وذلك باستعمال المبيدات المناسبة (3) يجب الالتزام بجدول زمني لزراعة وإكثار النباتات الكاشفة بحيث يتوفر في البيت الزجاجي وباستمرار أعدادا كافية من النباتات الكاشفة الجاهزة للتلقيح بالفايروس المراد تشخيصه أو إكثاره.



Nicotiana rustica

N. tabacum

التـــــــــــــبغ

Datura stramonium

الداتورة

Chenopodium album

الرغيلة

Gomphrena globosa

ورد الجومفرينا (المحلّدة الكروية)

Zinnia elegans

ورد الزينيا

الشكل (1-8): عدد من أنواع النباتات الكاشفة المستعملة في تشخيص الفايروسات.

المصادر

Noordam, D. 1973. Identification of plant viruses: Methods and experiments. Center for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, Holland. 207 pp.

Matthews, R. E. F. 1981. Plant virology. Academic Press, New York. 778 pp.

Sridhar Rao P.N (www.microrao.com)

Scholthof, K-B. G., Shaw, J.G., and Zaitlin, M. 1999. Tobacco Mosaic Virus. One Hundred Years of Contributions to Virology. APS Press, St. Paul, MN.

الفصل الثاني
النقل التجريبي لفايروسات النبات

توجد العديد من طرق النقل التجريبي التي يمكن توظيفها في التجارب الفايروسية بهدف نقل الفايروسات النباتية من النباتات المصابة (مصدر الإصابة) إلى نباتات الاختبار السليمة وذلك لانجاز الدراسات التشخيصية وحفظ العزلات الفايروسية وفي الدراسات الأخرى. وفيما يلي وصفا لهذه الطرق .

1.2.نقل الفايروسات بطريقة التلقيح الميكانيكي

هي عملية نقل "العصير النباتي الخام Crude sap "للنبات المصاب إلى النبات السليم بعد فتح جروح دقيقة غير مميتة في بشرة الأوراق أو بكسر شعيرات أوراق النبات السليم. ويطلق على هذا العصير المستعمل مصطلح "اللقاح Inoculum "لأنه يحوي على الجسيمات الفايروسية. تزداد احتمالية نجاح التلقيح الميكانيكي كلما زاد تركيز الجسيمات الفايروسية في العصير، لذلك يفضل استعمال النباتات المصابة التي يكون فيها تركيز الفايروس عاليا جدا لتحضير اللقاح. إن طريقة النقل بالتلقيح الميكانيكي هي طريقة ناجحة مع الفايروسات التي تنقل ميكانيكيا عن طريق العصارة النباتية وخاصة "الفايروسات الثابتة Stable viruses "التي تتحمل الظروف البيئية وتحديدا الحرارة والضوء خارج النبات ، ومنها فايروسي موزائيك التبغ ((TMV والبطاطا أكس (PVX)، فضلا عن الفايروسات التي تتطفل على أنسجة البشرة والقشرة والتي تسبب أعراض الموزائيك والتبرقش ، إلا أنها طريقة نقل غير ناجحة مع الفايروسات التي تصيب اللحاء أو أنسجة الخشب أو مع الفايروسات "غير الثابتة Unstable viruses "سريعة التلف في العصير الخام إلا إذا تم إجراء تحوير لطريقة التلقيح المستعملة وكما سيرد ذكره لاحقا.

الطريقة رقم (12) : نقل الفايروسات بطريقة التلقيح الميكانيكي

.1يحضّر اللقاح الفايروسي بقطع الأوراق الحديثة الغضة المختارة التي تظهر أعراضا شديدة واضحة مثل أعراض الموزائيك وبعدد يتوافق مع كمية اللقاح التي يحتاجها الباحث.

.2تقطع أنصال الأوراق إلى قطع صغيرة في هاون خزفي بعد إزالة العرق الوسطي إن كان كبيرا (كما في أوراق الخس مثلا) لأن تركيز الفايروس فيه منخفض جدا مما يسبب تخفيف الفايروس في العصير الخام ، ويجب أيضا إزالة عنق الورقة .

.3تضاف كمية من المحلول المنظم الفوسفاتي KH2 PO4 , Phosphate buffer إلى الهاون بتركيز 0,01مولر ودرجة أس هيدروجيني 7,6 (pH) بمقدار ضعف وزن قطع الأوراق المستعملة (حجم : وزن) ، أي إذا كان وزن قطع الأوراق 10غم ، يضاف 20 مل من المحلول المنظم ، (أنظر الفقرة 2.3.1.2). في حالة عدم توفر المحلول المنظم يمكن استعمال ماء الحنفية العادي أو الماء المقطر .

.4تسحق قطع الأوراق جيدا وبشدة بواسطة مقبض الهاون لحين الحصول على مستخلص متجانس حيث تسمح هذه العملية بإخراج الجسيمات الفايروسية من الخلايا إلى المستخلص. يمكن سحق الأوراق في "خلاط كهربائي Blender "للحصول على المستخلص النباتي المتجانس ، ولكن يجب عدم إطالة استعماله لأكثر من دقيقة بسبب الحرارة التي يولدها وتأثيرها السلبي على فاعلية الفايروس ، كما يمكن استعمال ماكينة فرم اللحوم أو العصّارات اليدوية أو القاطعات الميكانيكية ، (الشكل 7) أو أية آلة تضمن الحصول على العصير وذلك بدلا من الهاون الخزفي إذا كانت هناك حاجة لكميات كبيرة من العصير .

.5توضع قطعة مزدوجة من قماش الشاش أو الموسلين فوق بيكر ويضاف إليها المستخلص ويرشح خلالها ويعصر جيدا للحصول على أكبر كمية ممكنة من العصير الصافي.

.6تهيأ نباتات الاختبار السليمة المراد تلقيحها وهي بمرحلة نمو 2 – 4 أوراق والتي يجب أن يتأكد الباحث من خلوها تماما من أية أعراض غير طبيعية إذ يستبعد من

التلقيح أي نبات من هذا النوع. وتوضع النباتات الجاهزة للتلقيح على طاولة العمل بالعدد المطلوب.

.7يعفّر السطح العلوي لكافة أوراق النباتات بكمية مناسبة من مسحوق المادة المخدشة وهي إما الكاربورندم أو السيلايت المعبأ في مملحة عادية أو باستعمال المعفرة اليدوية البلاستيكية المبينة في الشكل (7). يمكن خلط مسحوق السيلايت مع العصير مباشرة بكمية قليلة بدل رشه على الأوراق ، ولا ينصح بخلط الكاربورندم معه لأنه ثقيل ويترسب في قاع الإناء.

.8يغمر إصبع السبابة في اللقاح ثم تسند الورقة المراد تلقيحها بكف اليد الأخرى بجعل النصل يستلقي على راحة الكف ويتم مسحه باللقاح لمرة واحدة وباتجاه واحد وبقوة ضغط مناسبة لفتح جروح دقيقة غير مميتة وتجنب قشط النسيج النباتي. يلقح جميع النصل وهذا قد يتطلب إعادة غمس الإصبع في اللقاح لأكثر من مرة إذا كان النصل كبيرا ، كما يجب تلقيح كل أوراق النبات دون استثناء ، يمكن استعمال قطعة صغيرة مطوية من قماش الشاش للتلقيح بدل الإصبع بغمرها في العصير ثم مسح النصل بها ، إن الطريقة المذكورة أعلاه مناسبة لتلقيح الأوراق العريضة. أما الأوراق رفيعة النصل كالنجيليات فيتم تلقيحها بغمر إصبعي السبابة والإبهام في العصير وتمسك قاعدة النصل باليد الأخرى ثم تمسح الورقة بالعصير بحصرها بين الأصبعين ومسحها بضغط مناسب إلى أعلى النصل.

.9تغسل كافة الأوراق الملقحة فورا بتيار ماء قوي بواسطة قنينة غسل بلاستيكية لمدة عشر ثواني لإزالة اثر اللقاح والمادة المخدشة لان الأول قد يحوي مواد مثبطة نباتية تؤثر على الفايروس ، فيما يسبب تراكم مسحوق المادة الخادشة طبقة قد تخفي الأعراض الموضعية التي قد تظهر على الأوراق الملقحة.

.10تحفظ النباتات الملقحة في البيت الزجاجي بدرجة حرارة تتباين25±2مْ وإضاءة مناسبة لحين ظهور الأعراض والتي قد تحتاج بين 5- 15 يوما بالنسبة للنباتات الحولية

وحسب نوع الأعراض حيث أن الأعراض الموضعية هي الأسرع ظهورا ، وقد تحتاج لعدة أشهر أحيانا في النباتات المعمرة كأشجار الفاكهة والغابات.

يبين الشكل (8) طريقة التلقيح الميكانيكي بالأصبع وتحضير العصير باستعمال الهاون الخزفي.

الطريقة رقم (13) : استعمال كيس الاستخلاص لتحضير العصير الخام

إذا أريد الحصول على كمية قليلة من العصير الخام فيمكن استعمال طريقة كيس الاستخلاص والذي يستعمل بديلا عن الهاون الخزفي ويتم ذلك بالخطوات التالية :

.1يوضع نصل الورقة المصابة (أو أكثر من نصل إن تطلبت الحاجة) داخل كيس من البولي ايثيلين مزود بسحاب قافل ، وتتوفر حاليا أكياس جاهزة خاصة لهذا الغرض مبطنة بقماش الشاش.

.2تضاف كمية من المحلول المنظم الفوسفاتي KH_2PO_4 إلى الهاون بتركيز 0,01مولر ودرجة أس هيدروجيني 7,6 (pH) بمقدار ضعف وزن قطع الأوراق المستعملة (حجم : وزن).

.3يوضع الكيس بعد قفله جيدا على سطح مستوي صلب ويضغط عليه بأي آلة مناسبة تضمن سحق النسيج النباتي داخله مثل ذراع الهاون الخزفي وكما مبين في الشكل) 9 .(

.4يؤخذ العصير المتجمع في الكيس بعد ضغطه باليد ويسكب في بيكر معقم ويصبح جاهزا للاستعمال .

تنويه : تتوفر حاليا أجهزة سحق ميكانيكي خاصة لسحق النسيج النباتي تعمل آليا بعد وضع الكيس داخلها ومزودة بمؤقت حيث تتوقف مدة السحق على طراوة النسيج النبات.

(أ) (ب)

الشكل (7) :أ)المعفرة البلاستيكية المستعملة في رش المادة المخدشة ب) قاطعة ميكانيكية مصنوعة من الستنلس ستيل لفرم الأجزاء النباتية الغضة.

الشكل مقتبس من.Noordam (1973)

الشكل (8) : تلقيح النبات بطريقة التلقيح الميكانيكي بالأصبع بعصير الخام للنبات المصاب المحضر باستعمال الهاون الخزفي (يسار الصورة) بعد رش الأوراق بالكاربورندم الموضوع في المملحة ، ويبدوا في أسفل الشكل قنينة الغسل البلاستيكية التي ستستعمل لغسل الأوراق الملقحة.

الشكل (9) : طريقة تحضير العصير الخام بكيس الاستخلاص.

.1.1.2تحويرات التلقيح الميكانيكي

اقترحت الكثير من التحويرات على الطريقة التقليدية المذكورة للتلقيح وهي طريقة التلقيح بالأصبع وذلك لزيادة كفاءتها ولتسهيل العمل أو لجعلها مناسبة للفايروسات التي يصعب نقلها ميكانيكيا ، وفيما يلي وصفا لهذه التحويرات .

.1.1.1.2التلقيح باستعمال مسدس الرش

تنفذ هذه الطريقة بواسطة مسدس الرش (البخّاخ) Spray gun المستعمل في صبغ المعادن عندما يراد تلقيح عدد كبير من النباتات في وقت واحد ، وهي طريقة ناجحة جدا مع عدد من الفايروسات الثابتة ومنها فايروسي موزائيك التبغ (TMV) ، والبطاطا أكس ((PVX ، ويتم ذلك وفق الخطوات التالية:

الطريقة (14) : تلقيح النباتات بمسدس الرش

.1يخلط مسحوق المادة المخدشة (يستعمل الكاربورندم عادة) بنسبة 5% مع العصير النباتي (وزن : حجم) بعد تصفيته جيدا لأكثر من مرة بطبقة مزدوجة من قماش الشاش ثم يوضع في خزان مسدس الرش.

.2 تضاف مع العصير في الخزان ثلاث كرات زجاجية صغيرة لتسهيل عملية مزجه وتجانسه أثناء الرش.

.3 ترش الأوراق لمدة 4 ثواني/ ورقة نباتية من على بعد 10سم تقريبا بضغط يتراوح بين 4,2 – 5,6 كغم/سم2 والذي يضبط بمعايرة مسدس الرش .

يبين الشكل (10) طريقة استعمال مسدس الرش في تلقيح مجموعة كبيرة من النباتات.

الشكل (10) : جهاز مسدس الرش المستعمل للتلقيح الميكانيكي لعدد كبير من النباتات.

الشكل مقتبس من Gibbs و.(1981) Harrison

.2.1.1.2التلقيح بالورقة النباتية الملفوفة

هي طريقة مبتكرة لإجراء التلقيح الميكانيكي للفايروسات غير الثابتة التي تفقد فاعليتها فور خروجها من النبات لذلك لا يمكن تحضير عصير الأوراق المصابة بالطريقة التقليدية المذكورة آنفا ويستعاض عنها بالطريقة االتالية :

الطريقة (15) : تلقيح النباتات بالورقة النباتية الملفوفة

.1تؤخذ الورقة المصابة وتلف أنبوبيا بشكل لفافة ، وتوضع على سطح صلب ونظيف وتقطع من حافتها الأمامية بواسطة مشرط حاد ومعقم.

.2يمسح النصل المراد تلقيحه بالجزء المقطوع من الورقة بعد مسكه وعصره قليلا بين السبابة والإبهام وذلك بعد رش النصل بمسحوق المادة الخادشة.

.3يعاد قطع لفافة الورقة لأكثر من مرة لاستكمال تلقيح كامل النصل أو بقية أنصال الأوراق المراد تلقيحها.

.4تغسل كافة الأوراق الملقحة فورا بتيار ماء قوي بواسطة قنينة غسل بلاستيكية لمدة عشر ثواني لإزالة اثر المادة المخدشة لان تراكمها قد يخفي الأعراض الموضعية التي تظهر على الأوراق الملقحة.

تنويه : إن هذه الطريقة تسمح بخروج العصير مباشرة من الورقة المصابة إلى السليمة من دون التعرض طويلا للظروف البيئية.

3.1.1.2.التلقيح بحقن العصير في الأنسجة النباتية الغضة

تستعمل هذه الطريقة مع الفايروسات التي يصعب نقلها ميكانيكيا ومنها بعض الفايروسات التي تصيب اللحاء ، وهي ذات نسبة نجاح منخفضة عادة لذلك يجب زيادة عدد النباتات الملقحة ، وتتم العملية وفق الطريقة التالية:

الطريقة (16) : التلقيح بحقن العصير في ساق الشتلة

1.يحضّر عصير النبات المصاب بالطريقة المبينة في الخطوات 1-5 في الطريقة رقم (12).

2.يرشح العصير بطبقة مزدوجة من الشاش ثم عبر طبقتين من ورق الترشيح كي لا تقفل القطع النباتية الكبيرة مجرى الحقنة.

3.تملأ إبرة حقن دقيقة بالعصير المرشح.

4.يحقن مللتر واحد من العصير بهدوء شديد في النسيج الغض لساق شتلة نبات الاختبار تجنبا لتمزيق الأنسجة النباتية ، بغرز الإبرة في النسيج النباتي بشكل مائل بزاوية 45 درجة ، (الشكل 11). تنويه : يمكن حقن العصير في العرق الوسطي للأوراق الناضجة أو في عنق الورقة .

الشكل (11) : طريقة حقن العصير في ساق الشتلة

4.1.1.2.التلقيح بالطعن المتكرر بالإبرة

تستعمل هذه الطريقة عند عدم توفر المواد المخدشة وهي غير مضمونة النجاح مقارنة بطريقة التلقيح الميكانيكي التقليدية ويتم ذلك وفق الطريقة التالية :

الطريقة رقم (17) : تلقيح النبات بالطعن المتكرر بالإبرة

.1يحضّر عصير الأوراق المصابة بالطريقة المذكورة في الفقرات 1–5 في الطريقة رقم)12(.

.2تسكب كمية منه على سطح النصل المراد تلقيحه تكفي لتغطيته وتلويثه.

.3يتم فورا عمل طعنات سريعة ودقيقة بواسطة إبرة في نصل الورقة النباتية والذي يسند بوسادة مناسبة من القماش.

.4تغسل كافة الأوراق الملقحة فورا بتيار ماء قوي بواسطة قنينة غسل بلاستيكية لمدة عشر ثواني لإزالة اثر اللقاح الذي قد يحوي مواد مثبطة نباتية تؤثر على الفايروس .

2.1.2ملاحظات هامة عند إجراء التلقيح الميكانيكي

(1)ليس بالضرورة أن يتم تحضير اللقاح من الأوراق المصابة وإن كانت هي الأكثر استعمالا ، بل يمكن تحضيره من الجذور أو الثمار أو أي جزء نباتي يكون فيه تركيز الفايروس المطلوب عاليا.

(2)عند تلقيح النباتات ميكانيكيا فانه يجب تلقيح عددا من أفراد نفس أنواع النباتات الكاشفة المستعملة بالماء المقطر أو المحلول المنظم المستعمل في تخفيف اللقاح الفايروسي لغرض المقارنة.

(3)يساعد حفظ نباتات الاختبار في الظلام لمدة 24ساعة قبل تلقيحها على زيادة حساسيتها وتقبلها للإصابة بالفايروس وبالتالي زيادة احتمال نجاح التلقيح الميكانيكي ، ويمكن الحصول على النتيجة ذاتها بحفظ النباتات في درجة 36مْ لعدة ساعات قبل التلقيح .

(4)يجب استعمال الشتلات الصغيرة العمر لغرض التلقيح الميكانيكي لأنها الأكثر حساسية للإصابة.

(5)يفضل تلقيح النباتات البقولية بمرحلة الأوراق الفلقية ، والنباتات القرعية في مرحلة الأوراق الأولية لأنها في هذه المرحلة تكون أكثر حساسية للإصابة بالفايروس.

(6)يجب أن تكون الزجاجيات وكافة المواد والمعدات المستعملة في التلقيح الميكانيكي معقمة لمنع حدوث تلوث بأي من الفايروسات الملوثة.

(7)يجب الابتعاد قدر الإمكان عن تحضير اللقاح من نباتات تحوي أوراقها على مثبطات نباتية للفايروسات ومنها نباتات البنجر السكري والفلفل والداتورة وأشجار اللوزيات لان المواد المثبطة ستثبط فاعلية الفايروس وبالتالي عملية التلقيح الميكانيكي ، ولكن إذا أضطر الباحث لاستعمال هذه النباتات مصدرا للقاح وتوقع أن تكون كمية المثبطات النباتية عالية فيه ، عندها يفضل إضافة 100 ملغم من "الفحم المنشّط Activated charcoal" لكل مللتر من اللقاح ، أو تخفيف اللقاح بنسبة 10:1 مع المحلول المنظم المستعمل أو بالماء المقطر إن لم يتوفر الأول.

(8)لغرض تسهيل استخلاص الجسيمات الفايروسية من الخلايا النباتية المصابة وخصوصا الأوراق الخشنة ذات الطبيعة الجافة مثل أوراق بعض أنواع النجيليات فانه يفضل وضع تلك الأوراق في مجمدة على درجة 18مْ تحت الصفر لمدة 12 – 24 ساعة إذ يساعد ذلك على تحطيم الخلايا وتحرير الجسيمات الفايروسية وذلك قبل عملية سحق الأوراق عند تحضير العصير.

(9)عند توقع الباحث بان النباتات الكاشفة الملقحة بالفايروس المعني ستستجيب موضعيا لذلك الفايروس فانه يفضل قرط القمة النامية للنباتات مباشرة بعد التلقيح لضمان ظهور الأعراض الموضعية. كذلك يجب إزالة كافة الأوراق التي لم يتم تلقيحها وذلك لتجنب أي إرباك في النتائج.

(10)تستعمل المحاليل المنظمة (المحاليل الدارئة) للحفاظ على الأس الهيدروجيني ضمن المدى المتعادل تقريبا بين قيمتي 7,5 – 7,8 وهو المدى غير المؤثر على فعالية فايروسات النبات حيث أن عصير أوراق بعض أنواع النباتات مثل العنب هو حامضي التفاعل وقد تصل قيمة الأس الهيدروجيني للعصير إلى حدود 5 وهي قيمة متلفة للفايروسات ، وهناك نباتات ذات عصير أوراق قاعدي التفاعل ومنها القرعيات. كما أن استعمال المحاليل المنظمة يقلل من تأثير المثبطات النباتية إن وجدت في اللقاح. يمكن

خفض كمية المحلول المنظم المستعمل في تحضير العصير بالكمية الموصى بها عند استعمال الأوراق العصيرية المصابة وذلك تجنبا لتخفيف الجسيمات الفايروسية في العصير، والعكس صحيح مع الأوراق قليلة الرطوبة مثل أوراق النجيليات.

(11)تستعمل المواد المخدشة في التلقيح الميكانيكي لغرض فتح جروح غير مميتة في خلايا بشرة الأوراق الملقحة لضمان دخول الفايروس من خلال زيادة مواقع دخول الفايروس إلى النبات مما يزيد من كفاءة النقل ، وأكثرها إستعمالا هما مادتي السيلايت والكاربورندم (يمكن خلط مادة السيلايت مع اللقاح بدلا من رشها على الأوراق بكمية قليلة ولا ينصح بخلط الكاربورندم لأنه ثقيل ويترسب في القاع).

(12)عند إجراء التلقيح الميكانيكي يتم اختيار الأوراق الغضة التي تظهر عليها أعراض شديدة واضحة لتحضير العصير ، إلا انه في حالة "الإصابة الكامنة Latent " infection أو "الإصابة المختفية Masked infection "فان عدم ظهور الأعراض لا يعني عدم وجود الفايروس بتركيز مقبول في الأوراق أو في النبات ، لذلك يجب مراعاة ذلك عند التعامل مع هذه الإصابات .

(13)يتم أحيانا حفظ الفايروسات في أوراق مجففة (أنظر الفصل الثالث) وفي حالة تحضير اللقاح الفايروسي منها هذه ، كما في حالة أوراق التبغ الجافة المصابة بفايروس موزائيك التبغ ((TMV ، عندها يجب نقع الأوراق في ماء معقم لمدة 2 – 3 ساعات قبل سحقها ، ثم تتبع الخطوات ذاتها المبينة في طريقة التلقيح الميكانيكي ، (الطريقة 12.).

3.1.2.المواد المساعدة في إجراءات التلقيح الميكانيكي

1.3.1.2.المواد المخدّشة

"المواد المخدّشة Abrasives "هي مساحيق لحبيبات بلورية تُعفّر الأوراق بها أو تخلط مع اللقاح قبل إجراء التلقيح الميكانيكي لتزيد من كفاءته إذ تزيد من أعداد نقاط دخول الفايروس إلى النبات الملقح من خلال إحداثها جروح غير مميتة دقيقة في بشرة النبات بإزالتها للجدار الخلوي عند مسحه مع اللقاح ومن أهم المواد المخدشة المستعملة:

***الكاربورندم : Carborundum هو مسحوق "كاربيد السليكون Silicon carbide " الأسود اللون والأكثر استعمالا في التلقيح الميكانيكي ، وأنسب حجم لحبيبات هذه المادة لغرض التلقيح الميكانيكي هو 400 – 600 مش .(Mesh) ويفضل تعفير الأوراق به وعدم إضافته إلى اللقاح لأنه يترسب ، وعند الاضطرار يضاف إلى اللقاح بتركيز 0,5– 1 ملغم /مل من اللقاح.**

***السيلايت : Celite وهو مسحوق ابيض اللون لمتحجرات نباتات بحرية دقيقة تسمى "الدياتوم Diatoms "وهي طحالب بحرية أحادية الخلية مشبعة جدرانها بالسليكا. ويوجد بعدة أنواع وتحت تسميات تجارية عديدة وأفضل أنواعها هي التي تحمل الاسم التجاري Hyflo-supper-cellويستعمل إما بنثره على الأوراق مباشرة أو خلطه مع اللقاح بتركيز 1% وهو لا يترسب لأنه خفيف الوزن .**

***الالومينا Alumina هو عبارة عن مسحوق أكسيد الألمنيوم .**

***مسحوق سليكات المغنيسيوم .Magnesium silicate**

إن المادتين الأخيرتين هما أقل كفاءة من الكاربورندم والسيلايت لذلك فهما غير شائعي الاستعمال في التلقيح الميكانيكي.

2.3.1.2.المحاليل المنظمة (المحاليل الدارئة)

"المحلول المنظم Buffer solution "هو محلول لقاعدة ضعيفة أو ملحها ، أو محلول لحامض ضعيف أو ملحه والذي يتفكك بسهولة في المحلول الذي يضاف إليه لتعديل أسه الهيدروجيني وجعله ضمن حدود التعادل وذلك بسحب أو ضخ ايونات الهيدروجين في المحلول المضاف إليه. ويفضل عند تحضير اللقاح الفايروسي أن يسحق النسيج النباتي في محلول منظم مناسب لضبط الأس الهيدروجيني عند حدود التعادل المائل قليلا باتجاه القاعدية (7,5 – 7,8) وذلك لان فايروسات النبات تتأثر سلبا بالقاعدية والحامضية العالية اللتان تتلفان البروتين والحامض النووي الفايروسي.

هناك العديد من أنواع المحاليل المنظمة الشائع استعمالها في التلقيح الميكانيكي ، (الجدول 6) ، وأكثرها استعمالا هو "المحلول المنظم الفوسفاتي Phosphate "

buffer والذي استعمل لأول مرة من قبل "ثورنبري (Thornberry) "سنة 1935 عندما اختبر تأثيره على زيادة كفاءة التلقيح الميكانيكي لنباتات الفاصوليا المصاب بفايروس موزائيك التبغ .((TMVيستعمل هذا المنظم عادة بتركيز 0,01 – 0,1مولر وبدرجة أس هيدروجيني بين 7,5–7,8 ويتكون كيميائيا إما من المحلول المائي لفوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين , Potassium dihydrogen orthophosphate KH2PO4 ، أو لفوسفات الصوديوم الهيدروجينية Na2HPO4 , Sodium hydrogen orthophosphate أو لمزيجهما ، أو من فوسفات الامونيوم أحادية الهيدروجين .(NH4)2HPO4 ويفسر تأثيره في زيادة كفاءة عملية التلقيح الميكانيكي إلى ضبطه لقيم الأس الهيدروجيني للعصير النباتي ضمن المدى المتعادل الذي يناسب الفايروس ويبقيه فعالا ، كما انه قد يساعد في التئام الجروح الدقيقة بعد عملية التلقيح ويساعد أيضا في نشر الجسيمات الفايروسية بشكل متوازن في العصير ومنع تكتلها وترسيبها فيه وهذا يزيد من كفاءة التلقيح ، وكذلك يوقف تأثير المواد المثبطة النباتية الموجودة في عصير بعض النباتات والتي تثبط الفايروس .

الجدول (6) : عدد من أنواع المحاليل المنظمة المستعملة في الاختبارات الفايروسية ومديات الأس الهيدروجيني التي توفرها.

اسم المحلول المنظم	الاسم الانكليزي
الهيدروجيني*	مدى درجة الأس
كلايسين حامض الهيدروكلوريك وحامض الستريك	Glycine, Hcl
& citric acid	2,2–3,6
فوسفات ثنائي الصوديوم الحامضي	Disodium
hydrogen phosphate	2,2 – 8
سترات الصوديوم	Sodium citrate
	3 – 6,6

خلات الصوديوم	Sodium
acetate	3,6– 5,8
حامض الخليك	Acetic acid
	3,6– 5,8
فوسفات الصوديوم الأحادية أو الثنائية الهيدروجين	Mono and
disodium hydrogen phosphate	5,8- 8
فوسفات البوتاسيوم الأحادية أو الثنائية الهيدروجين	Mono and
dipotasium hydrogen phosphate	5,8- 8
محلول ترس هيدروكسي مثيل أمين الميثان وحامض الهيدروكلوريك	Tris-
hydeoxymethyl amine methane, Hcl	7,2– 9,1
حامض البوريك – البوراكس	Boric acid-
borax	6,8– 9,2
كلايسين – هيدروكسيد الصوديوم	Glycine-
sodium hydroxide	8,6–10,6
بوراكس – هيدروكسيد الصوديوم	Borax-
sodium hydroxide	8,6– 10,6

*مديات قيم الأس الهيدروجيني تمثل المدى الذي يحافظ عليه المحلول المنظم المستعمل في المحلول.

الطريقة رقم (18) : تحضير المحلول المنظم الفوسفاتي

لتحضير لتر من المحلول المنظم الفوسفاتي المكوّن من مزيج فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH_2PO_4 وفوسفات الصوديوم الهيدروجينية Na_2HPO_4 وبتركيز 0,1مولر وأس هيدروجيني 7,5 تتبع الخطوات التالية:

1. يوزن 13,62 غم من مادة فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين (KH_2PO_4) وتذاب في لتر من الماء المقطر (استعمل هذا الوزن لان الوزن الجزيئي للمادة هو136,2 حيث يحول الوزن الجزيئي إلى وزن غرامي عند تحضير المحلول ، ولان

المحلول المراد تحضيره بتركيز 0,1مولر لذلك يؤخذ 13,62 غم من المادة ولو كان التركيز المراد تحضيره هو 0,01 عندها يوزن 1,362 غم من المادة ، وهكذا مع أي تركيز مطلوب .(

.2يوزن 17,81غم من مادة فوسفات الصوديوم الهيدروجينية Na2HPO4 (وزنها الجزيئي178,1) وتذاب في لتر من الماء.

.3يخلط 490 مل من المحلول المحضر في الخطوة الأولى مع 510 مل من المحلول المحضر في الخطوة الثانية للحصول على لتر من المحلول المنظم الفوسفاتي تركيزه 0,1 مولر.

.4تعدّل حموضة أو قاعدية المحلول باستعمال "جهاز قياس الأس الهيدروجيني pH " meterإلى درجة 7,5 وذلك بإضافة قطرات متتابعة مع الرج من محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH لحين الوصول إلى درجة الأس الهيدروجيني المطلوبة وذلك إذا كان المحلول المنظم المحضر حامضيا. أما إذا كان المحلول قاعديا أصلا فانه يعدل إلى نفس درجة الأس الهيدروجيني أعلاه بإضافة قطرات من حامض الهيدروكلوريك المركز لحين الوصول إلى الدرجة المطلوبة. يمكن السيطرة على درجة الأس الهيدروجيني المطلوبة من دون الحاجة إلى الطريقة أعلاه بل استبدالها بالتحكم في مقدار كميتي المحلولين المكونين للمحلول المنظم الفوسفاتي وكما هو مبين في الجدول (27) في الملحق) 1.(

.5يوضع المحلول في دوارق زجاجية محكمة الإغلاق وتحفظ في الثلاجة مع كتابة المعلومات المطلوبة عليها والتي تشمل تاريخ التحضير وتركيز المحلول ودرجة الأس الهيدروجيني.

تنويه : (1) إذا أريد تحضير المحلول المنظم بتركيز 0,001مولر مثلا ، فانه يتم إذابة 1,362 غم من KH2PO4 و 1,781غم منNa2HPO4 ، وهكذا يحضر أي تركيز مطلوب (2) يمكن معرفة كمية المادة المطلوبة لتحضير أي محلول منظم وبالتركيز المطلوب باستعمال المعادلة التالية :

تركيز المحلول المنظم (بالمولر) = التركيز المراد تحضيره × الوزن الجزيئي للمركب × كمية المحلول باللتر، فإذا ما طبقت المعادلة على مثالنا أعلاه أي المحلول المنظم الفوسفاتي بتركيز 0,01 مولر فستكون المعادلة كما يلي:

1 × 136,2 ×1 0,0لتر = 1,362 من مادة KH2PO4

1 ×178,1 ×0,01لتر = 1,781 من مادةNa2HPO4

(3)يمكن تحضير المحلول المنظم الفوسفاتي باستعمال مادة KH2PO4 فقط وهو شائع الاستعمال في الدراسات الفايروسية والتلقيح.

4.1.2.إزالة تأثير المواد المثبطة النباتية

تحتوي العديد من أنواع النباتات على مركبات مثبطة لفعالية الفايروسات مما يعيق التلقيح الميكانيكي ويسبب فشل الإصابة بسبب تأثيرها التثبيطي للفايروس بعد تحررها في العصير النباتي ، ويظهر ذلك واضحا عند نقل الفايروسات ميكانيكيا من النبات الحاوي على المواد المثبطة إلى نوع نباتي آخر، ولكن لوحظ أن لا تأثير للمواد المثبطة على التلقيح عند نقل الفايروسات بين أفراد النوع النباتي ذاته الحاوي على المادة المثبطة. وهذه المواد هي مركبات عديدة ومتنوعة التركيب وأغلبها مواد فينولية وأخرى بروتينية. وتعد "التنينات Tannins "إحدى أخطر المواد تأثيرا على الفايروسات. واهم النباتات التي تحوي أوراقها على مواد مثبطة هي الشليك (الفراولة) والقرنفل والخيار والفاصوليا والفلفل و الداتورة والسلق والبنجر والفلفل لذلك يفضل قدر الإمكان عدم استعمال هذه النباتات كمصدر للقاح الفايروسي ، وإذا ما اضطر إلى ذلك فانه يجب تخفيف اللقاح بمحلول منظم مناسب أو بالماء المقطر بنسبة 1:1 (حجم : حجم) ، إلا أن الإجراء الأفضل هو معاملة اللقاح بإضافة مواد تقلل من تأثير تلك المواد المثبطة وتعزز ثباتية الفايروس في اللقاح ويطلق على هذه المواد عموما مصطلح "المضافات المثبتة " Stabilizing additivesوالتي يبينها الجدول) 7.(

الجدول (7) : أهم المضافات المثبتة المستعملة لتقليل أو إزالة تأثير المواد المثبطة في عصير النبات .

اسم المركب*	الاسم الانكليزي التركيز المستعمل (مولر)
ملح الايثيلين ثنائي الأمين رباعي الخلات ثلاثي الصوديوم	Ethylene
diamine tetra acetate trisodium salt (EDTA)	000,5– 0,1
حامض الثايوكلايكولك	Thioglycollic
acid (TGA)	0,01- 0,1
-2ميركابتوايثانول	-2
mercaptoethanol	0,015– 0,15
ثنائي ايثيل ثنائي كاربامايت الصوديوم	Sodium
diethyldithio carbamate (DIECA)	0,01- 0,1
حامض الاسكوربك) فيتامين(C	Ascorbic acid
(vitamin C)	0,02– 0,17
كبريتيت الصوديوم	Sodium
sulphite	0,02– 0,05
ألبومين مصل الثيران	Bovine serum
albumin	0,01%

*يتوقف اختيار نوع المادة المضافة وتركيزها على نوع النبات المحضر منه اللقاح.

5.1.2.مراقبة الأعراض على النباتات الكاشفة ووصفها

تستعمل النباتات الكاشفة غالبا لغرض تشخيص الفايروسات التي تظهر على مختلف أنواع النباتات وخاصة تلك التي يسهل نقلها ميكانيكيا ، ولتحقيق ذلك فانه يتوجب على الباحث مراقبة النباتات الكاشفة بعد تلقيحها مراقبة دقيقة ويومية وتسجيل وقت ظهور الأعراض ووصفها بدقة وبشكل تفصيلي وطبيعة تطورها لحين اكتمال ظهورها على كافة أجزاء النباتات الخضرية ليتسنى مقارنتها مع ما تم ذكره في البحوث السابقة في وصف استجابة تلك النباتات للفايروس تحت الدراسة. إن الأعراض التي تظهر على النباتات الكاشفة هي : (1) الأعراض الموضعيةLocal symptoms والتي تظهر على الأوراق

الملقحة ذاتها ولا تظهر على الأوراق الجديدة النامية بعد التلقيح وخلال مدة لا تتجاوز خمسة أيام من التلقيح وتكون بهيأة "بقع موضعية ميتة Necrotic local lesions " NLL ,أو "بقع موضعية مصفرة Chlorotic local lesions , ChLL "أو "بقع حلقية ميتة Necrotic ring" spots،)الشكل 12.(

الشكل (12) : الأعراض الموضعية التي تسببها بعض أنواع الفايروسات على عوائلها النباتية. (أ) البقع الموضعية الميتة التي يسببها فايروس موزائيك التبغ (TMV) على أوراق التبغ (ب) البقع الموضعية المصفرة والبقع الحلقية الميتة التي يسببها فايروس التبقع الحلقي للتبغ ((TRSV على أوراق التبغ.
صور الأعراض مقتبسة من.(2009) Hull

(2)الأعراض الجهازية Systemic symptoms والتي تظهر على الأوراق الحديثة غير الملقحة وقد يستغرق ظهورها بين 7–15يوما في النباتات العشبية ، ولكنها قد تحتاج إلى عدة أشهر أحيانا للظهور في النباتات الخشبية ، ويبين الشكل (13) عدد من أنواع الإصابات الجهازية التي تسببها الفايروسات على النباتات.

(1)أعراض مرض الرايزومانيا((Rhizomania على جذر البنجر السكري وهي تفرع شديد للجذور
الطرفية يسببها فايروس التماوت الأصفر لعروق البنجر .((BNYVVتبين الصورة على اليمين جسم الفطر الناقل للفايروس داخل خلايا الجذر .

(2)اعراض الموزائيك التخططي على أوراق الشعير (3) أعراض بقع مصفرة وبقع حلقية على اوراق
المتسببة عن فايروس الموزائيك التخططي للشعير التبغ المصابة بفايروس التبقع الحلقي للتبغ
(TRSV) BSMV))

(4)اعراض التشوه الشديد لأوراق الطماطة "ظاهرة الورقة السرخسية Fern leaf " والتي يسببها فايروس موزائيك الخيار((CMV

(5)اعراض تشوه الاوراق والموزائيك وتحزم العروق التي يسببها فايروس موزائيك القرنابيط(CaMV)

(6)التخطط الأصفر مع بقع متطاولة ميتةعلى ورقة (7) تخطط اصفر على ورقة الذرة الصفراء المصابة

موز مصابة بفايروس تخطط الموز (BSV) بفايروس تخطط الذرة (MSV)

(8)أعراض تدهور وذبول اشجار الحمضيات والتعرق الاصفر للأوراق التي يسببها فايروس ترستيزا الحمضيات(CTV)

(9)اعراض اصفرار بين العروق (الصورة اليمنى) ، وشفافية العروق (الصورة اليسرى)على ورقتي بنجر مصابتين بفايرس اصفرار البنجر.(BYV)

(10)اصفرار بين العروق وتجعد شديد لأوراق الطماطة (11) موزائيك شديد وتشوه لورقة نبات الكاسافا المتسبب عن فايروس تجعد واصفرار اوراق الطماطة المتسبب عن فايروس موزائيك الكاسافا الافريقي
(ACMV).
(TYLCV).

(12)اصفرار أوراق الشعير المتسبب عن فايروس (13) موزائيك اصفر يسببه فايروس موزائيك الابيطلون
اصفرار وتقزم الشعير.((AbMV (BYDV-PAV).

(14)تشوه شديد لثمرة قرع مصابة (15) تشوه ثمرة طماطة مع تبقع ميت وبقع حلقية
بفايروس موزائيك الخيار (CMV)يسببها فايروس الذبول المبقع للطماطة (TSWV).

(16)اعراض التفاف الاوراق المتسبب عن فايروس التفاف اوراق البطاطا .(PLRV) الشبكي لنبات الجعَضيض (SYNV)

(17) تجعد الاوراق المتسبب عن فايروس الإصفرار

(18)بقع حلقية على الدرنة يسببها فايروس البطاطا واي (PVY) المتسبب عن فايروس الموزائيك الاصفر للشلغم((TYMV

(19) موزائيك ووضوح العروق على اللهانة الصينية

(20) بقع حلقية على الثمار وتشوه وموزائيك على الاوراق يسببها فايروس التبقع الحلقي للبابايا موزائيك الطماطة (ToMV)

(21) أعراض تشوه الثمار وتغير اللون مع خطوط فلينية يسببها فايروس (PRSV)

الشكل (13) : أنواع من الأعراض الجهازية التي تسببها بعض أنواع الفايروسات على عوائلها النباتية.

صور الأعراض مقتبسة من.(2009) Hull

الفصل الثالث

دراسة الخواص الفيزيائية للفايروسات وتقدير تركيزها في النباتات المصابة

1.3. دراسة الخواص الفيزيائية للفايروسات

هي ثلاثة اختبارات فيزيائية تجرى على الفايروسات الموجودة في عصير النبات المصاب الخام (خارج النسيج الحي *in vitro*)، لمعرفة قدرة الفايروسات على تحمل الحرارة والتخفيف والمدة الزمنية التي تبقى خلالها فعالة قادرة على العدوى، وهي اختبارات مفيدة في تشخيص الفايروسات المنقولة ميكانيكيا اعتمادا على اختلافها في درجة تحملها لتلك الظروف ولمعرفة تحملية الفايروس للظروف البيئية خارج النسيج النباتي وذلك لان نتائج هذه الاختبارات تظهر على النباتات الكاشفة التي تلقح بعصير النبات المصاب المعرض لهذه الاختبارات. وكان الباحث جونسون Johnson هو أول من استعمل هذه الاختبارات سنة 1927 كاختبارات مساعدة لتشخيص الفايروسات. وهذه الاختبارات هي :

1.1.3. درجة الحرارة المتلفة للفايروس

درجة الحرارة المتلفة للفايروس Thermal inactivation point , TIP هي درجة الحرارة التي تتلف الفايروس وتنهي قدرته على العدوى وذلك عند تعريض عصير النبات المصاب بذلك الفايروس لتلك الدرجة لمدة عشر دقائق في حمام مائي.

الطريقة (41) : تحديد درجة الحرارة المتلفة لفايروس موزائيك التبغ (TMV)

1. تقطع عدد من أوراق التبغ الغضة المصابة بالفايروس من النباتات الحاملة للعزلة النقية للفايروس، وتسحق جيدا في هاون خزفي للحصول على العصير الخام وذلك بعد إزالة العرق الوسطي وعنق الورقة لأن تركيز الفايروس فيهما منخفض جدا مما يسبب تخفيف الفايروس في العصير الخام؛
2. تضاف كمية من المحلول المنظم الفوسفاتي Phosphate buffer , $KH_2 PO_4$ إلى الهاون بتركيز 0,01مولر ودالة حامضية (pH) 7,6 وبمقدار ضعف وزن قطع الأوراق المستعملة (حجم : وزن)؛
3. يرشّح العصير خلال طبقتين من قماش الموسلين المعقم ويحتفظ بالراشح؛
4. تهيأ 13 أنبوبة اختبار زجاجية معقمة متماثلة السمك وتوضع في حامل أنابيب الاختبار، ويوضع في كل أنبوبة 5 مل من راشح العصير الخام؛
5. توضع الأنبوبة الأولى في الحمام المائي الذي رفعت درجة حرارته إلى 45 مْ وتثبت بشكل عمودي فيه بحيث يغطس أكثر من نصفها في الماء وتعرّض لتلك الحرارة لمدة عشر دقائق. تضبط حرارة الحمام

المائي خلال مدة تعريض الأنبوبة باستعمال محرار غاطس في الماء بحيث تكون بصلته مجاورة لموقع العصير في أنبوبة الاختبار؛

6. ترفع الأنبوبة فور انتهاء وقت التعريض وتبرّد بماء الحنفية من الخارج وتعاد إلى حامل الأنابيب وتسجل عليها الدرجة الحرارية التي تعرضت لها؛

7. توضع الأنبوبة الثانية في الحمام المائي بعد رفع درجة حرارته إلى 50 مْ وتعرّض لهذه الدرجة لمدة عشر دقائق ثم ترفع وتبرّد كما في الخطوة الخامسة؛

8. تعرّض الأنابيب الثالثة والرابعة وإلى الأنبوبة الثانية عشر إلى الدرجات الحرارية التالية :55 و60 و 65 و 70 و75 و 80 و 85 و 90 و 95 و 100مْ على التوالي في الحمام المائي وبالطريقة المبينة في الخطوة الرابعة؛

9. يوضع في الأنبوبة الثالثة عشر، خمسة مل من راشح العصير الخام وتوضع الأنبوبة في حامل الأنابيب من دون معاملة حرارية والتي تمثل معاملة المقارنة؛

10. يجرى الاختبار الحيوي للعصير الموجود في كافة الأنابيب بتهيئة 39 شتلة تبغ بري *Nicotiana glutinosa* بمرحلة نمو خمسة أوراق حيث تخصص ثلاث شتلات لكل أنبوبة، وتعفر أوراقها بمسحوق الكاربورندم؛

11. يبدأ التلقيح الميكانيكي بالعصير المعرّض لدرجة 100مْ بتلقيح كافة أوراق النباتات الثلاثة المخصصة لهذه الأنبوبة، ثم يليه التلقيح بالعصير المعرّض لدرجة 95مْ للنباتات الثلاثة الأخرى المخصصة لهذه، وهكذا يستمر التلقيح لبقية النباتات نزولا إلى العصير المعرّض للدرجة الحرارية الأدنى (45مْ)، ثم أخيرا التلقيح بالعصير الخام غير المعرض للحرارة؛

12. تنقل النباتات إلى البيت الزجاجي وتراقب لملاحظة ظهور الأعراض الموضعية على الأوراق الملقحة حيث تحسب أعداد البقع الموضعية الميتة المتكونة على الأوراق ويرسم منحنى يفسر تأثير درجات الحرارة التصاعدية في إتلاف الفايروس وإيقاف فاعليته حيث أن العلاقة عكسية بين تصاعد درجات الحرارة وعدد البقع الموضعية الميتة التي يسببها الفايروس على نباتات التبغ البري، (الجدول 3–1 والشكل 3–1)؛

13. يعبّر عن درجة الحرارة المتلفة (TIP) لهذا الفايروس بدلالة رقمين وهما 95 –100مْ حيث يشير الأول إلى آخر درجة حرارية تعرّض لها الفايروس وبقي محتفظا بقدرته المعدية، فيما يشير الثاني إلى الدرجة الحرارية اللاحقة التي فقد الفايروس فيها تماما قدرته المعدية؛

14. يرسم المنحنى بدلالة عدد البقع الموضعية التي تظهر على نباتات التبغ البري الملقحة بعصير الفايروس المعرّض للدرجات الحرارية المستخدمة، ولغرض التوضيح فقد وضعنا قيما افتراضية لمعدلات عدد البقع الموضعية لكل درجة حرارية فضلا عن المقارنة وكما مبين في الجدول (3-1).

الجدول (3-1) : القيم الافتراضية لمعدلات أعداد البقع الموضعية على أوراق النباتات الكاشفة الملقحة بالعصير الخام المعامل حراريا اللازمة لرسم منحنى درجة الحرارة المتلفة لفايروس موزائيك التبغ (TMV)

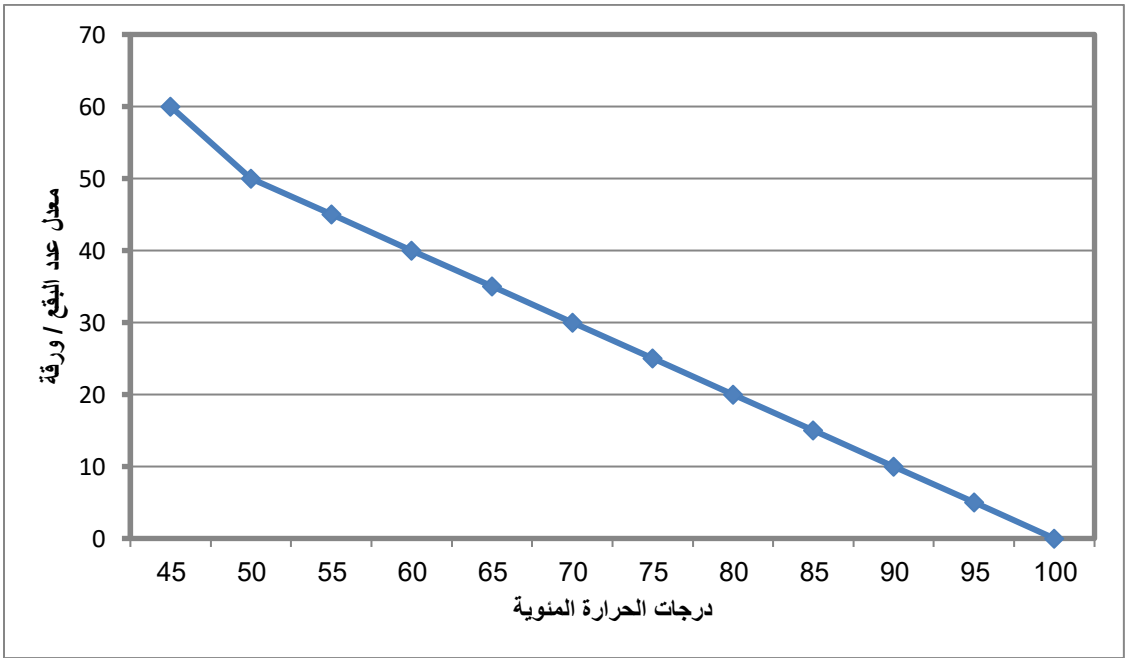
الدرجات الحرارية المئوية المعرض لها العصير الخام	معدل عدد البقع /ورقة على النباتات الملقحة بالعصير الخام المعامل حراريا *
45	60
50	50
55	45
60	40
65	35
70	30
75	25
80	20
85	15
90	10
95	5
100	0

*كل قيمة تمثل معدل عدد البقع في أوراق ثلاثة نباتات على الأقل حيث تمثل كل ورقة مكررا واحدا عند إجراء التحليل الإحصائي.

ولغرض رسم المنحنى يتم إسقاط قيم معدلات عدد البقع/ورقة على المحور الصادي، ودرجات الحرارة على المحور السيني، وكما مبين في الشكل (3-1).

تنويه : (1) إن درجات الحرارة المختارة في هذه الطريقة تناسب فايروس موزائيك التبغ (TMV)، ويمكن للباحث اختيار أي مدى حراري يراه مناسبا للفايروس المراد اختباره إلا أنه يجب أن يبدأ بدرجة 40 أو 45مْ ويوقف التعريض عند 70 أو 80مْ مثلا وذلك لان أغلب فايروسات النبات لا تتحمل درجات الحرارة

العالية باستثناء الفايروسات الثابتة ومنها فايروس موزائيك التبغ، فمثلا تتراوح الدرجات الحرارية المقترحة لفايروس البطاطا واي (PVY) بين 40 إلى 80مْ، وهكذا يحدد الباحث المدى الحراري المناسب للفايروس المختبر ويمكنه الاستعانة بالبحوث السابقة لهذا الغرض (2) يجب أن تكون المديات الحرارية المختارة بفاصلة منتظمة وهي خمس درجات مئوية كما في التجربة أعلاه، ولكن إذا رغب الباحث أن تكون نتائجه أكثر دقة فيمكن وضع المديات عند كل درجتين مئويتين أو كل ثلاثة أي يبدأ بدرجة 45 ثم 47 ثم 49مْ وهكذا (3) في حالة عدم توفر نباتات كاشفة تستجيب موضعيا للفايروس تحت الدراسة أي تعطي بقعا موضعية ميتة أو مصفرة (نباتات إختبار كمي)، عند ذلك يمكن الاستعاضة عنها بنباتات كاشفة تستجيب جهازيا ولكن يصعب في هذه الحالة حساب النتائج كميا كما هو الحال مع نباتات الإختبار الكمي.



الشكل (1-3) : منحنى درجة الحرارة المتلفة لفايروس موزائيك التبغ (TMV)

2.1.3. درجة التخفيف المنهية لفعالية الفايروس

درجة التخفيف المنهية لفعالية الفايروس Dilution End Point , DEP هي أعلى درجة تخفيف لعصير النبات المصاب بالماء المقطر والتي يفقد عندها الفايروس قدرته المعدية. وتجرى وفق الخطوات التالية :

الطريقة (42) : تحديد درجة التخفيف المنهية لفعالية فايروس موزائيك التبغ (TMV)

1. يحضر العصير الخام بالطريقة ذاتها المبينة في الخطوات 1 –3 كما في الطريقة السابقة؛

2. تهيأ سبعة أنابيب اختبار زجاجية نظيفة ومعقمة ومتماثلة في الحجم وتوضع في حامل أنابيب الاختبار، حيث تخصص ستة منها لإعداد التخافيف والسابعة لمعاملة المقارنة؛

3. تملأ كل الأنابيب عدا أنبوبة المقارنة بتسعة مللترات من الماء المقطر لكل منها؛

4. يضاف مللتر واحد من العصير الخام بواسطة ماصة معقمة إلى الأنبوبة الأولى التي ترج جيدا عدة مرات بقلبها رأسا على عقب بعد غلق فوهتها بالإبهام، وبذلك نحصل على التخفيف 10^{-1}، توضع الأنبوبة في حامل الأنابيب ويوضع عليه لاصق يبين مقدار التخفيف؛

5. يؤخذ مللتر واحد من الأنبوبة أعلاه بماصة جديدة معقمة، ويضاف إلى الأنبوبة الثانية وترج كما في أعلاه فنحصل على التخفيف 10^{-2}؛

6. تكرر الخطوة الخامسة مع الأنبوبة الثالثة بأخذ مللتر واحد من الأنبوبة الثانية بواسطة ماصة جديدة ويضاف إليها وبذلك نحصل على التخفيف 10^{-3}؛

7. تكرر الخطوة أعلاه وبالطريقة ذاتها مع أنابيب الاختبار الرابعة والخامسة والسادسة، فنحصل على التخافيف 10^{-4} و10^{-5} و 10^{-6}على التوالي، وبذلك يتم الحصول على تخافيف متتالية Serial dilutions والمعبّر عنها لوغارتميا؛

8. يوضع خمسة مللترات من العصير الخام غير المخفف في الأنبوبة السابعة (أنبوبة المقارنة)؛

9. يجرى الاختبار الحيوي بتهيئة 21 شتلة تبغ بري *N. glutinosa* بمرحلة نمو خمسة أوراق حيث تخصص ثلاث شتلات لكل أنبوبة، تعفر أوراقها بمسحوق الكاربورندم؛

10. يبدأ التلقيح الميكانيكي بالتخفيف الأعلى (10^{-6}) بتلقيح كافة أوراق النباتات الثلاثة المخصصة لتلك الأنبوبة بذلك التخفيف، ثم يليه التلقيح بالتخفيف التالي (10^{-5}) للنباتات الثلاثة الأخرى المخصصة له، وهكذا لغاية التخفيف الأدنى (10^{-1})، ثم أخيرا التلقيح بالعصير الخام غير المخفف؛

11. تنقل النباتات إلى البيت الزجاجي وتراقب لملاحظة ظهور الأعراض الموضعية حيث تحسب أعداد البقع الموضعية الميتة المتكونة على الأوراق ويرسم منحنى التخفيف الذي يفسر النتائج ويظهر العلاقة العكسية بين معدلات عدد البقع /ورقة وتصاعد تخافيف العصير، إذ كلما زاد التخفيف انخفضت فعالية الفايروس لحين توقفها. ويعبر عن النتيجة بالقيمتين المحصورتين بين آخر تخفيف أعطى بقعا موضعية على النبات الكاشف والتخفيف الذي يليه والذي لم يسبب ظهور أية بقعة، وبذلك يعبّر عن درجة DEP

لفايروس موزائيك التبغ أنها تقع بين 10^{-5} – 10^{-6}، ولا يجوز التعبير عن تلك الدرجة بتخفيف واحد فقط؛

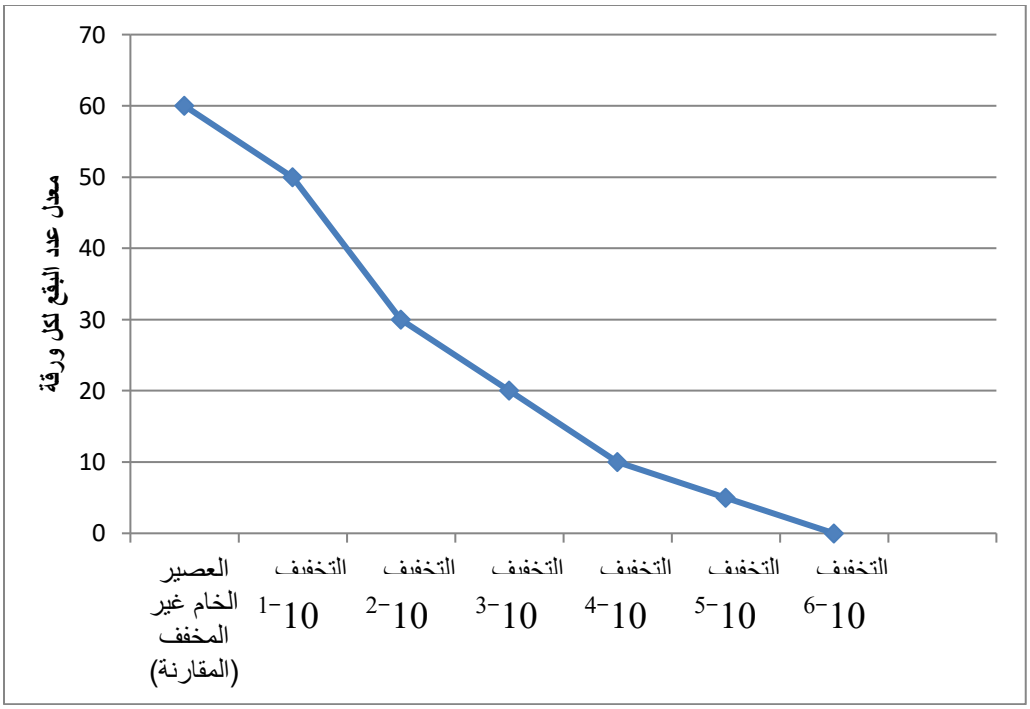
12. يرسم المنحنى بدلالة عدد البقع الموضعية التي ظهرت على نباتات التبغ البري الملقحة بتخافيف عصير الفايروس والمبين في الشكل (3–2)، ولغرض التوضيح فقد وضعنا قيما افتراضية لمعدلات عدد البقع الموضعية لكل تخفيف وكما مبين في الجدول (3–2).

الجدول (3–2) : القيم الافتراضية لمعدلات أعداد البقع الموضعية على أوراق النباتات الكاشفة الملقحة بتخافيف العصير الخام اللازمة لرسم منحنى درجة التخفيف المنهية لفعالية فايروس موزائيك التبغ (TMV).

درجات التخفيف للعصير الخام	معدل عدد البقع /ورقة على النباتات الملقحة بالعصير الخام المخفف*
العصير الخام غير المخفف (المقارنة)	60
التخفيف 10^{-1}	50
التخفيف 10^{-2}	30
التخفيف 10^{-3}	20
التخفيف 10^{-4}	10
التخفيف 10^{-5}	5
التخفيف 10^{-6}	0

*كل قيمة تمثل معدل عدد البقع في أوراق ثلاثة نباتات على الأقل حيث تمثل كل ورقة مكررا واحدا عند إجراء التحليل الإحصائي.

ولغرض رسم المنحنى يتم إسقاط قيم معدلات عدد البقع على المحور الصادي، والتخافيف على المحور السيني، وكما مبين الشكل (3–2).



الشكل (3-2) : منحنى التخفيف لفايروس موزائيك التبغ (TMV).

تنويه : (1) إن درجات التخفيف المختارة في هذه التجربة تناسب فايروس موزائيك التبغ، ويمكن للباحث اختيار أي درجات تخفيف يراها مناسبة للفايروس المراد اختباره حيث يمكنه أن ينهي الاختبار عند التخفيف 10^{-4} مثلا وذلك لان أغلب فايروسات النبات لا تتحمل درجات التخفيف العالية باستثناء الفايروسات الثابتة ومنها فايروس موزائيك التبغ (2) في حالة عدم توفر نباتات كاشفة تستجيب موضعيا للفايروس تحت الدراسة أي تعطي بقعا موضعية ميتة أو مصفرة، يمكن الاستعاضة عنها بنباتات كاشفة تستجيب جهازيا ولكن يصعب في هذه الحالة حساب النتائج كميا.

3.1.3. مدة تعمير الفايروس في العصير الخام

مدة تعمير الفايروس في العصير الخام LIV , Longevity *in vitro* هي المدة الزمنية بالساعات أو بالأيام أو الأسابيع وأحيانا بالسنوات، التي يبقى فيها الفايروس محتفظا بقدرته المعدية في العصير الخام للنبات المصاب المحفوظ في درجة حرارة المختبر (20-22 مْ). تتم هذه الدراسة وفق الخطوات التالية :

الطريقة (43) : تحديد مدة تعمير فايروس موزائيك التبغ (TMV) في العصير الخام

1. يحضر العصير الخام بالطريقة ذاتها المبينة في الخطوات 1 –3 كما في الطريقة (41)، ويضاف إليه المضاد الحيوي الستربتومايسين Streptomycin أو الأيوروميسين Aureomycin بتركيز 0,01 % لمنع حدوث أي تلوث بكتيري له خلال فترة الخزن؛

2. تهيأ قناني زجاجية معتمة بحجم 10 مل محكمة الإغلاق مزودة بأغطية معدنية مبطنة بحلقات مطاطية، وبعدد الفترات الزمنية التي سيخزن خلالها العصير، ويوضع في كل منها خمسة ملليترات من العصير المحضر بواسطة ماصة معقمة وتقفل القناني جيدا وتحفظ في درجة حرارة المختبر ويكتب على كل قنينة المدة الزمنية المقررة لها والمبينة في الخطوة اللاحقة؛

3. تحدد الفترات الزمنية التي سيخزن عندها العصير كالآتي : الفترة صفر(معاملة المقارنة)، 24 ساعة، 48 ساعة، أسبوع، أسبوعين، شهر، شهرين، سنة (يقصد بالفترة صفر هي لحظة وضع العصير في القناني وتحسب كل الفترات اللاحقة بدءا من هذا الوقت)؛

4. يجرى الاختبار الحيوي بتهيئة ثلاث شتلات تبغ بري *N. glutinosa* بمرحلة نمو خمسة أوراق، تعفر أوراقها بمسحوق الكاربورندم وتلقح فورا بالعصير المعرض للتخزين للفترة صفر؛

5. تنقل النباتات إلى البيت الزجاجي وتراقب لملاحظة ظهور الأعراض الموضعية حيث تحسب أعداد البقع الموضعية الميتة المتكونة على الأوراق؛

6. تلقح نباتات التبغ البري المخصصة للقنينة الثانية بعد 24ساعة من تلقيح مجموعة النباتات الأولى وكما في الخطوة أعلاه؛

7. تهيأ وتلقح نباتات تبغ بري بالعصير المحفوظ في كل قنينة في الموعد المحدد وبالطريقة المذكورة في الخطوة الرابعة؛

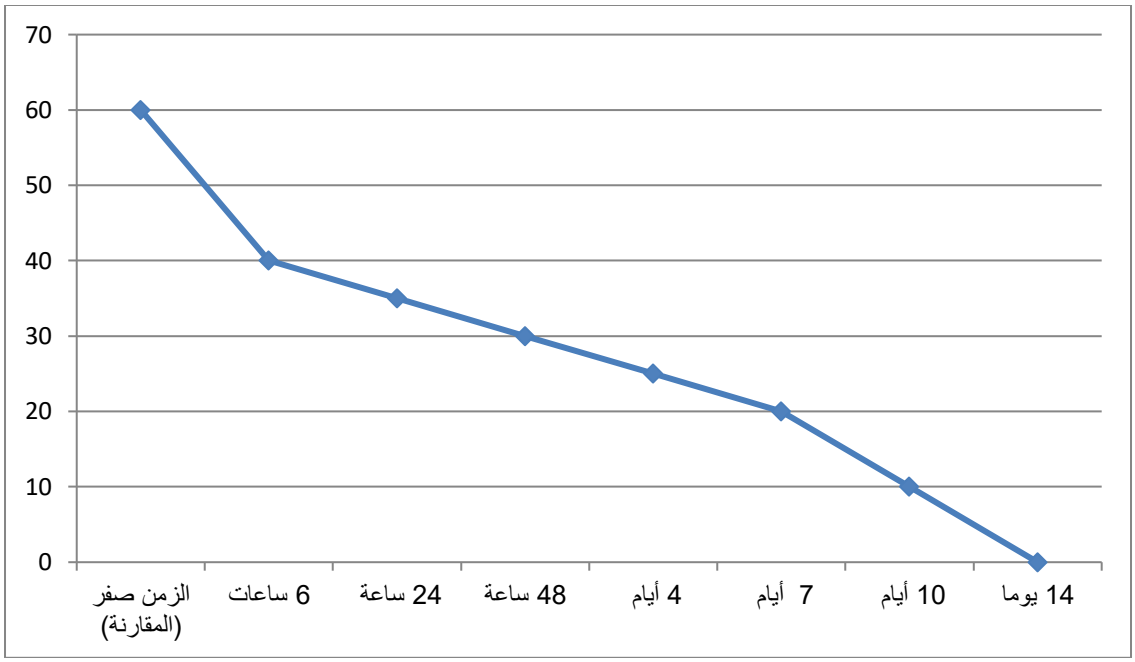
8. يعبّر عن النتيجة برقمين يمثل الأول آخر فترة زمنية حفظ فيها الفايروس وبقي محتفظا بقدرته المعدية أي أعطى بقعا موضعية على أوراق التبغ البري، والثاني يمثل الفترة الزمنية اللاحقة التي انتهت فيها فعالية الفايروس تماما ولم تظهر أية بقعة موضعية على أوراق النبات الملقح؛

9. يرسم منحنى التعمير للفايرس حيث يمثل المحور الصادي معدل عدد البقع لكل ورقة والمحور السيني الفترات الزمنية المحددة في الاختبار، ويبين المنحنى العلاقة العكسية بين مدة الخزن وفعالية الفايروس المختبر، (الشكل 3–3)، ولغرض التوضيح فقد وضعنا قيما افتراضية لمعدلات عدد البقع الموضعية على أوراق نبات كاشف لفايروس موزائيك التبغ (TMV) حفظت أوراقه بالتجميد عند الصفر المئوي ثم حضر منها العصير الذي عرّض لفترات الخزن المبينة في الجدول (3–3) وذلك لبيان كيفية عمل منحنى التعمير لهذا الفايروس.

الجدول (3-3) : القيم الافتراضية لمعدلات أعداد البقع الموضعية على أوراق النباتات الكاشفة الملقحة بالعصير الخام لنبات مصاب بفايروس موزائيك التبغ (TMV) والمخزن بفترات خزن متتابعة.

المدة الزمنية لخزن العصير الخام	معدل عدد البقع /ورقة على النباتات الملقحة بالعصير الخام المخزن*
الزمن صفر (المقارنة)	60
6 ساعات	40
24 ساعة	35
48 ساعة	30
4 أيام	25
7 أيام	20
10 أيام	10
14 يوما	0

*كل قيمة تمثل معدل عدد البقع في أوراق ثلاثة نباتات على الأقل حيث يتمثل كل ورقة مكررا واحدا عند إجراء التحليل الإحصائي.



الشكل (3-3) : منحنى التعمير لفايروس موزائيك التبغ (TMV)

تنويه : (1) اختيرت الفترات الزمنية في هذه التجربة بافتراض أن العصير الخام حضّر من أوراق مصابة بفايروس موزائيك التبغ سبق تخزينها في المجمدة وهذا هو الإجراء المتبع عادة من قبل الباحثين للحصول على العصير، ولكن إذا ارتأى الباحث تحضير العصير من أوراق طازجة فان الفترات المذكورة أعلاه ستتغير ويمكن إطالة فترة الخزن لتصبح بالأسابيع أو حتى الأشهر (2) إن الفترات الزمنية المختارة في هذه التجربة تناسب فايروس موزائيك التبغ لأنه يتحمل فترة خزن طويلة خارج النسيج النباتي، ولكن يمكن للباحث اختيار أية فترات مناسبة حسب نوع الفايروس المختبر والتي قد تكون بالساعات، (مثلا كل 12 أو 24 ساعة ولغاية أربعة أيام) وذلك مع الفايروسات التي لا تتحمل البقاء خارج النسيج النباتي. ويبين الجدول (3-4) قيم خزن حقيقية يمكن للباحث تنفيذها لقياس مدة التعمير لبعض الفايروسات علما بان هذه الفترات اختيرت لخزن عصير الأوراق المصابة التي سبق تجميدها في المجمدة الحوضية ثم حضّر منها العصير (3) يمكن تخزين العصير في ظروف خزن خاصة كالتجميد في مجمدة أو بالتجفيد (التجفيف بالتجميد) Lyophilization أو تجميد الأوراق المصابة بدل العصير أو تجفيفها، وإذا ما اختار الباحث أيا من طرق الخزن هذه فيجب أن يشير إليها في بداية التجربة أما إذا لم يشر لذلك فسيفهم أن التجربة أجريت تحت الظروف القياسية وهي إستعمال العصير الخام المحفوظ في القناني في

درجة حرارة المختبر (4) يمكن أجراء اختبار التعمير تحت ظروف حرارية أخرى مثل الصفر المئوي أو عند أي درجة حرارية أخرى دون الدرجة القياسية (درجة حرارة المختبر).

الجدول (3-4) : فترات الخزن المقترحة لقياس درجة تعمير عدد من أنواع فايروسات النبات

أسم الفايروس ومختصره	مدة الخزن	درجة تخفيف العصير مع الماء	نوع المادة المختبرة
موزائيك الفاصوليا العادي Bean common mosaic virus (BCMV)	0، 2، 4، 8، 16، 24 ، 48 ساعة	1:1	عصير خام مجمد
التبقع الحلقي للقرنفل Carnation ring spot virus (CRSV)	0، 6 ساعات، يوم، يومان ، 4، 7، 10،14 يوما	1:1	عصير خام مجمد
فايروس موزائيك الخيار Cucumber mosaic virus (CMV)	0 ، 2، 4، 8، 24، 48، 72، 96 ساعة	1:1	أوراق مجمدة
فايروس البطاطا أكس Potato virus X (PVX)	0، 6، 24، 48 ساعة ، 7، 10، 14 يوم	1:1	عصير خام مجمد
فايروس البطاطا واي Potato virus Y (PVY)	0 ، 2، 4، 8، 16، 24، 32، 48	1:1	أوراق مجمدة

	ساعة		
فايروس موزائيك التبغ Tobacco mosaic virus (TMV)	0، 6، 24، 48ساعة، 4، 7، 14 يوم	1: 100	عصير خام مجمد
فايروس موت التبغ Tobacco necrosis virus (TNV)	0، 6، 24، 48ساعة، 4، 7، 10، 14 يوم	1: 100	عصير خام مجمد
فايروس خشخشة التبغ Tobacco rattle virus (TRV)	0، 6، 24، 48 ساعة ، 10، 14 يوم	1: 100	عصير خام مجمد
فايروس الذبول المبقع للطماطة Tomato spotted wilt virus (TSWV)	0، 1، 2، 3، 4، 5، 6، 7 ساعات	1: 1	أوراق مجمدة

2.3. تقدير تركيز الفايروسات في الأنسجة النباتية المصابة

يقدّر تركيز الفايروسات في الأنسجة الحية المصابة من خلال إجراءات تقديره في العصير الخام المستخلص من تلك الأنسجة، وبالتالي فان معرفة تركيز الفايروس في العصير الخام سيكون دالة لتركيزه في النسيج النباتي، ويعد هذا إجراء مهما في الدراسات الفايروسية لغرض اختيار أفضل أنواع النباتات لإكثار الفايروسات وحفظ العزلات عليها والتي يجب أن تمتاز بوجود الفايروسات فيها بتركيز عالي، كذلك فان معرفة التركيز تعد مهمة لإنجاز عمليات تنقية الفايروسات النباتية إذ يجب أن تكون النباتات المختارة للحصول على العصير النباتي المستعمل في التنقية حاوية على تركيز عالي من الفايروس المراد تنقيته. وفيم يلي وصفا لأهم الطرق المستعملة لتقدير تركيز الفايروسات في النباتات.

1.2.3. الطريقة الحيوية بدراسة درجة التخفيف المنهية لفعالية الفايروس

تعتمد هذه الطريقة استعمال نباتات كاشفة تستجيب موضعيا للفايروسات المراد تقدير تركيزها في أنسجة النباتات المصابة المختبرة، لذلك تسمى أيضا طريقة الأعراض الموضعية Local lesion method

وهي تعطي معلومات مقبولة عن تركيز الفايروس في النبات بالافتراض نظريا أن كل بقعة موضعية يسببها الفايروس المختبر على النبات الكاشف الذي لقح به ميكانيكيا إنما تمثل جسيمة فايروسية واحدة، وبالتالي فان أعداد البقع ستعطي مؤشرا لتركيز ذلك الفايروس في النبات الحافظ لعزلته وتكون دالة له، فكلما زادت أعداد البقع على أوراق النبات الكاشف كلما دل ذلك على زيادة تركيز الفايروس في ذلك النبات. إن الاختبار المعتمد هو ذاته المستعمل لقياس درجة التخفيف المنهية لفعالية الفايروس DEP والمبين في الطريقة (42)، حيث يمكن بواسطة هذا الاختبار إثبات العلاقة الطردية بين تركيز الفايروس في النبات وعدد البقع الموضعية التي يكونها على النبات الكاشف الكمي، وذلك بعد رسم منحنى التخفيف Dilution curve لذلك الفايروس، إلا أن هذا الإختبار يعطي دلالة عامة عن تركيز الفايروس المختبر في النبات ولا يعطي مقدار التركيز الدقيق للفايروس المقاس بالميكروغرام فايروس/مللتر عصير نباتي، لذا يمكن إجراء تعديلا لهذا الاختبار تجعله قادرا على بيان التركيز بهذا المقياس وذلك باستعمال المحلول الفايروسي النقي للفايروس المختبر (انظر الفصل الخامس– التنقية) والمعلوم التركيز وكما مبين في الخطوات التالية :

الطريقة (44) : تقدير تركيز فايروس موزائيك التبغ (TMV) بدلالة المحلول الفايروسي النقي وباستعمال نبات التبغ البري *N. glutinosa*

1. تحضّر ذات التخافيف الستة المبينة في الطريقة (42) للمحلول الفايروسي النقي والذي بتركيز 100ميكروغرام فايروس/ مل؛

2. تحضّر تخافيف أخرى مماثلة للعصير الخام للنبات المختبر بنفس الطريقة؛

3. تلقح أنصاف أوراق مجموعة النباتات الكاشفة الأولى المخصصة للتخفيف 10^{-1} من المحلول الفايروسي النقي، وتلقح الأنصاف الثانية لنفس الأوراق بالتخفيف 10^{-1} للعصير الخام المختبر المراد معرفة تركيز الفايروس فيه؛

4. يكرر ذلك مع بقية التخافيف الخمسة المتبقية؛

5. تتم مراقبة النباتات لحين ظهور البقع الموضعية وسيتم معرفة التركيز بدلالة المحلول القياسي النقي وذلك بعد رسم منحنى التخفيف لكل من المحلول القياسي والعصير المختبر وبالطريقة ذاتها المبينة في الطريقة (42) حيث يعطي هذا المنحنى دلالة واضحة على تركيز الفايروس في النبات الذي أخذ منه الفايروس، فمثلا لو كان معدل عدد البقع على أنصاف الأوراق الملقحة بالتخفيف 10^{-1} للعصير المختبر هو 20 بقعة، وكان هذا العدد يساوي أو قريب جدا من عدد البقع التي سببها التخفيف 10^{-1} للمحلول القياسي النقي عندها فان تركيز الفايروس في التخفيف المذكور للعصير هو واحد ميكروغرام/ مل

باعتبار أن المحلول القياسي غير المخفف هو بتركيز 10ميكروغرام فايروس/ مل، وعند التخفيف 10^{-2} يصبح تركيز الفايروس واحد ميكروغرام / مل، وهكذا لغاية آخر تخفيف. إلا أن مشكلة هذا الإختبار هي صعوبة الحصول على المحلول القياسي معروف التركيز للفايروس المختبر لذلك يضطر الباحث إلى الاعتماد على طريقة القياس العام للتركيز المذكورة سابقا.

الطريقة (45) : تقدير تركيز فايروس موزائيك التبغ (TMV) بدلالة المحلول الفايروسي النقي وباستعمال الأوراق المفصولة لنبات التبغ البري *N. glutinosa*

يجرى هذا الاختبار لبيان تركيز الفايروس باستعمال الأوراق المفصولة عن النباتات بدلا من استعمال النبات الحي بكامله وذلك لتسهيل العملية. تجرى هذه الطريقة في المختبر حيث تبقى أوراق النباتات الكاشفة حية بعد فصلها عن النباتات لعدة أيام وهي مدة تكفي لظهور الأعراض الموضعية عليها وذلك إن حفظت هذه الأوراق في مكان رطب مع إنارة مستمرة. وتتم هذه الطريقة وفق الخطوات التالية :

1. تحضّر ذات التخافيف الستة المبينة في الطريقة (42) للمحلول الفايروسي النقي والذي بتركيز 100ميكروغرام فايروس/ مل؛
2. تحضّر تخافيف أخرى مماثلة للعصير الخام للنبات المختبر بنفس الطريقة؛
3. يهيأ حوضين من البلاستك (أو الزجاج) مفتوحين من الأعلى وبقياس 45×25×5سم (طول وعرض وارتفاع) ويوضع في كل منهما ورقة ترشيح كبيرة بمساحة قاع الحوض وذلك بعد تخطيطها بالقلم الرصاص عرضيا إلى سبعة صفوف بمسافات متساوية بعدد تخافيف العصير، بافتراض أن التخافيف المقترحة هي 10^{-1} ولغاية 10^{-6} فضلا عن معاملة المقارنة بدون تخفيف، يخصص الحوض الأول لتخافيف عصير النبات المختبر فيما يخصص الحوض الثاني لتخافيف المحلول الفايروسي النقي القياسي؛
4. تبلل ورقتي الترشيح قليلا بالماء المقطر؛
5. تفصل أوراق نباتات التبغ البري *N. glutinosa* الناضجة مكتملة النمو بعدد يكفي لانجاز الطريقة ثم تقطع كل ورقة من منتصفها الطولي تماما أي على طول عرقها الوسطي بمقص معقم؛
6. توزع الأنصاف الأولى في مواقعها على الصفوف المخططة على ورقة الترشيح في الحوض الأول بحيث يضم كل صف ثلاث أنصاف أوراق (ثلاثة مكررات)، وتوزع الأنصاف الثانية في المواقع المماثلة في الحوض الثاني وهكذا ستكون الأنصاف الأولى في الحوض الأول وأنصافها الثانية في الحوض الثاني لنفس التخفيف المستعمل، ويتخذ هذا الإجراء لتقليل الخطأ التجريبي الناتج عن إختلاف أوراق النبات عند إجراء التحليل الإحصائي لنتائج التجربة؛

7. تعفّر كافة أنصاف الأوراق في الحوضين بالكاربورندم؛

8. تلقح أنصاف الأوراق الثلاثة الموضوعة في الصف الأول في الحوض الأول ميكانيكيا بالتخفيف 10^{-1} لعصير النبات المختبر، ثم تلقح أنصاف الأوراق الثلاثة الموضوعة في الصف الأول في الحوض الثاني بالتخفيف المماثل للمحلول الفايروسي النقي القياسي؛

9. تلقح أنصاف الأوراق الثلاثة الموضوعة في الصف الثاني في الحوض الأول ميكانيكيا بالتخفيف 10^{-2} لعصير النبات المختبر، ثم تلقح أنصاف الأوراق الثلاثة الموضوعة في الصف الثاني في الحوض الثاني بالتخفيف المماثل للمحلول الفايروسي النقي القياسي؛

10. تكرر عملية التلقيح بالطريقة ذاتها مع بقية تخافيف عصير النبات المختبر والمحلول الفايروسي النقي القياسي لغاية الإنتهاء من كافة التخافيف الستة والمقارنة (عصير النبات المختبر والمحلول الفايروسي النقي القياسي غير المخففين)؛

11. يوضع الحوضين في المختبر تحت إنارة مستمرة ويفضل الضوء الأبيض (الفلوريسنت) وبدرجة 25–28مْ حيث تظهر البقع الموضعية خلال 4–7 أيام من التلقيح؛

12. يرسم منحنى التخفيف لكل من تخافيف عصير النبات المختبر والمحلول الفايروسي القياسي لغرض المقارنة.

تنويه : (1) يمكن إجراء مقارنة لتركيز الفايروس المختبر بين نوعين نباتيين مختلفين عائلين له وبنفس إجراءات التجربة أعلاه وذلك بدل استعمال المحلول الفايروسي القياسي (2) قد يتطلب الأمر أحيانا معرفة العمر الأفضل للنبات الذي يكون فيه تركيز الفايروس المختبر في أعلى حالاته، لذلك يمكن تنفيذ التجربة بإجراء لمقارنة تركيز الفايروس في أعمار مختلفة للنبات.

2.2.3. تقدير تركيز الفايروس مصليا

يمكن اللجوء إلى الاختبار المصلي لتقدير تركيز الفايروسات في الأنسجة النباتية المصابة وهي طريقة تناسب كل الفايروسات وخاصة تلك التي لا تنقل ميكانيكيا التي لا تناسبها الطريقة السابقة، ولعل إحدى أفضل الطرق المصلية المستعملة لهذا الغرض هي طريقة الترسيب الدقيق في أطباق بتري Micro precipitin test in Petri dishes (أنظر تفاصيل هذا الاختبار في الفصل السابع)، حيث تجرى باستعمال تخافيف معينة يختارها الباحث للمحلول الفايروسي النقي القياسي، ثم يحدد أعلى تخفيف لا زال يعطي تفاعلا مصليا، ثم تكرر هذا الإجراء وبنفس التخافيف ولكن لعصير النبات المراد اختبار تركيز الفايروس فيه ويحدد أيضا أعلى تخفيف لا زال يعطي تفاعلا مصليا، ثم وبالمقارنة بين تخافيف

المحلول الفايروسي النقي القياسي وتخافيف عصير النبات المختبر سيتم معرفة تركيز الفايروس في العصير، فإذا فرضنا أن المحلول النقي القياسي المختار لفايروس هو100ميكروغرام فايروس/ مل وحضّر منه التخافيف 10^{-1} و 10^{-2}و 10^{-3} و 10^{-4} لإجراء اختبار الترسيب الدقيق وأعطى التخفيف 10^{-3} آخر تفاعل مصلي فيما فشل التخفيف 10^{-4} في تحقيق تفاعل موجب، ثم حضّرت تخافيف مماثلة من العصير الخام للنبات المختبر وأيضا فشل التخفيف 10^{-4} (أو أي تخفيف آخر) منه في تحقيق تفاعل موجب عندها يستنتج بان تركيز الفايروس في العينة المختبرة مقارب جدا لتركيزه في المحلول النقي القياسي المختار والمعروف التركيز.

3.2.3. تقدير تركيز الفايروسات بالاختبار الطيفي باستعمال قيمة معامل انطفاء الفايروس.

هي طريقة سهلة وشائعة الاستعمال لتقدير تركيز الفايروسات في النباتات المصابة وبدقة إلا أنها طريقة لا تستعمل إلا مع المحلول الفايروسي النقي أي بعد نجاح تنقية الفايروس المختبر ولا يمكن إجراؤها مع العصير الخام للنبات المصاب، وتعتمد على معرفة معامل الانطفاء للفايروس المراد تقدير تركيزه في النبات. يعرّف معامل إنطفاء الفايروس $E^{1cm\,/\,260\ nm}$, Extinction coefficient بأنه قيمة امتصاص الأشعة فوق البنفسجية عند الطول ألموجي 260 نانومتر لمحلول فايروسي نقي تماما مذاب 0,1 غم من مسحوقه الجاف في 100مل من المحلول المنظم بتركيز 0,1% والذي قرأت امتصاصيته باستعمال أنبوبة جهاز المطياف Cuvette عرض ضلعها الذي يخترقه الشعاع هو سنتمتر واحد، وهي قيمة ثابتة لكل فايروس. تتم هذه الطريقة وفق الخطوات التالية :

الطريقة (46) : تقدير تركيز فايروس موزائيك التبغ (TMV) بالاختبار الطيفي باستعمال قيمة معامل انطفاء الفايروس.

1. تتم قراءة قيمة الامتصاصية Absorbency , A للمحلول الفايروسي النقي للفايروس وذلك بواسطة جهاز المطياف Spectrophotometer عند الطول الموجي 260 نانومتر وذلك بعد تصفير الجهاز بقراءة امتصاصية المذيب الذي أذيب فيه المحلول الفايروسي وهو إما المحلول المنظم الفوسفاتي أو الماء المقطر (حسب نوع المذيب) وبذلك تكون هذه القيمة قد طرحت من قيمة امتصاص للمحلول الفايروسي النقي؛
2. تستخرج قيمة معامل انطفاء فايروس موزائيك التبغ من المصادر العلمية السابقة التي تناولت خصائص هذا الفايروس، وقيمتها لهذا الفايروس هي 2,7؛
3. تتم قسمة قيمة امتصاص المحلول الفايروسي النقي للأشعة فوق البنفسجية عند الطول الموجي 260 نانومتر، على معامل انطفاء الفايروس وكما موضح في المعادلة الآتية :

تركيز الفايروس بالملغم/مل عصير نباتي = قيمة الامتصاص عند 260 نانومتر للمحلول الفايروسي النقي المختبر / قيمة معامل انطفاء فايروس موزائيك التبغ (2,7)؛

4. ولنفرض أن قيمة الامتصاص عند 260 نانومتر للمحلول الفايروسي النقي المختبر هي 3,5 عليه فان تركيز الفايروس بتطبيق هذه المعادلة هو 1,3 ملغم فايروس/مل من عصير النبات.

الفصل الرابع

فصل الأنواع والسلالات الفايروسية في الإصابات الخليطة وحفظ العزلات.

من الشائع إصابة النباتات بأكثر من نوع فايروسي في وقت متزامن ويسبب ذلك إظهار أعراض أكثر شدة على النبات المصاب بسبب وجود أكثر من فايروس فيه، وتسمى هذه الحالة الإصابة الخليطة Mixed infection ومثال ذلك إصابة نباتات البطاطا بفايروسي البطاطا واي (PVY) والبطاطا أكس (PVX)، ويختلف تأثير هذه الاصابات المختلطة تبعاً لعوامل عديدة أهمها علاقة الفايروسات ببعضها في الاصابات المختلطة والظروف البيئية ونوع النبات المصاب. والمشكلة التي يعانيها الباحثون في هذه الحالة هي فصل الفايروسات الموجودة في النبات الواحد عن بعضها وذلك عندما يراد تشخيص الفايروسات المسببة وحفظ عزلاتها وهي عملية ليست سهلة غالبا إلا أنه تتوفر العديد من الطرق لفصل الفايروسات في الإصابات الخليطة، وفيما يأتي وصفا لهذه الطرق.

1.4. فصل الأنواع الفايروسية في الإصابات الخليطة

1.1.4. الفصل باستعمال النباتات الكاشفة

يتم الفصل تبعا لتباين استجابة نباتات كاشفة معينة للفايروسين الخليطين يختارها الباحث، ومثال ذلك استجابة نبات كاشف معين لأحد الفايروسين جهازيا واستجابته للفايروس الثاني موضعيا، أو يكون النبات حساسا للفايروس الأول ومنيعا للثاني. إن هذه الطريقة تناسب الفايروسات المنقولة ميكانيكيا.

الطريقة (47) : فصل فايروسي موزائيك التبغ (TMV) وموزائيك الخيار (CMV) في الإصابة الخليطة باستعمال نبات التبغ البري الكاشف *N glutinosa*.

يفترض في هذه الطريقة وجود نبات مصاب بكلا الفايروسين بإصابة خليطة، ويمكن تحقيق هذه الحالة تجريبيا في البيت الزجاجي بتلقيح شتلات فلفل ميكانيكيا بعزلة فايروس موزائيك التبغ (TMV) ثم تلقيح نفس النباتات بعد أسبوعين بعزلة فايروس موزائيك الخيار (CMV) وتحفظ النباتات في البيت الزجاجي لمدة شهر لظهور الإعراض، وتستعمل في هذه الطريقة نبات التبغ البري الكاشف الذي يستجيب موضعيا للفايروس الأول وجهازيا للفايروس الثاني. وفيما يلي طريقة فصل الفايروسين

1. تؤخذ أوراق الفلفل المصابة جهازيا بكلا الفايروسين وتسحق في هاون خزفي لتحضير العصير النباتي الخام وبالطريقة المذكورة في الخطوات 1 و2 و3 في الطريقة (12)؛
2. تهيأ 10 شتلات تبغ بري *N. glutinosa* بمرحلة نمو 4–5 أوراق، أو أي عدد من النباتات حسب اختيار الباحث، وتعفّر أوراقها بالكاربورندم؛
3. تلقح كافة أوراق نباتات التبغ ميكانيكيا كما في الفقرات 6 و7 و8 في الطريقة (12)؛

4. ستظهر أعراض البقع الموضعية الميتة على الأوراق الملقحة بعد 5–7 أيام من التلقيح وهي الإعراض التي يسببها فايروس موزائيك التبغ (TMV) فقط، فيما ستظهر الإعراض الجهازية بشكل موزائيك بعد 6–10 أيام من التلقيح على الأوراق الجديدة غير الملقحة وهي الإعراض التي يسببها فايروس موزائيك الخيار (CMV) على نباتات التبغ البري؛

5. تقطع أوراق النباتات التي ظهرت عليها البقع الموضعية ثم تفصل أنسجة البقع من النصل بواسطة ثاقبة فلين صغيرة القطر بحيث يتم الحصول على كل البقع الموضعية التي تكونت على الأوراق؛

6. تسحق أنسجة البقع كافة في هاون خزفي ويحضّر عصيرها؛

7. تلقح شتلات تبغ *N. tabaccum* سليمة (وان لم يتوفر يمكن استعمال شتلات فلفل)، وتحفظ النباتات في البيت الزجاجي لحين ظهور الإعراض الجهازية على النباتات الملقحة بشكل موزائيك، وعند ذلك يكون قد تم فصل فايروس موزائيك التبغ (TMV) منفردا على هذه النباتات؛

8. يحضّر عصير أوراق التبغ البري التي ظهرت عليها الإصابات الجهازية؛

9. تلقح به أوراق شتلات خيار (أو الفلفل أو أي نوع من الخضراوات القرعية) أعلاه لحين ظهور الأعراض الجهازية على النباتات الملقحة بشكل موزائيك، وعند ذلك يكون قد تم فصل فايروس موزائيك الخيار (CMV) عن الفايروس الآخر.

تنويه : يمكن للباحث التعامل مع أي إصابة خليطه بفايروسين مختلفين أو أكثر بذات الطريقة المذكورة أعلاه باستعمال النباتات الكاشفة الخاصة بكل فايروس والتي تستجيب جهازيا لأحدهما وموضعيا للثاني وهذا يتم بمراجعة البحوث السابقة المتعلقة بتلك الفايروسات وكذلك من وصفيات الفايروسات Description of viruses وخاصة تلك التي تصدرها اللجنة الدولية لتصنيف الفايروسات International Committee on Taxonomy of Viruses , ICTV.

الطريقة (48) : فصل فايروسي البطاطا واي (PVY) والبطاطا أكس (PVX) بواسطة نبات منيع لأحدهما.

تهدف الطريقة فصل أحد الفايروسين فقط عن الآخر باستعمال نبات حساس للأول ومنيع للثاني أي الحصول على فايروس واحد فقط وهو الذي يظهر أعراضه على النبات الكاشف الحساس له، أما الفايروس الآخر سيبقى في النبات المصاب بالإصابة الخليطة ولن يمكن فصله بهذا النبات إلا باللجوء إلى الحالة المعاكسة وهي إستعمال نبات منيع للأول وحساس للثاني.

يفترض في هذه الطريقة الحصول على نبات بطاطا مصاب بكلا الفايروسين، ويمكن تحقيق هذه الحالة تجريبيا في البيت الزجاجي بتلقيح شتلات بطاطا ميكانيكيا بعزلة فايروس البطاطا واي (PVY)، ثم

تلقيح نفس النباتات بعد أسبوعين بعزلة فايروس البطاطا أكس (PVX) وتحفظ النباتات لمدة شهر للتأكد من لظهور الأعراض، ثم تنفذ الطريقة وفق الخطوات التالية :

1. تسحق أوراق البطاطا المصابة جهازيا بكلا الفايروسين في هاون خزفي لتحضير العصير النباتي الخام وبالطريقة المذكورة في الخطوات 1 و2و3 في الطريقة (12)؛

2. تهيأ عشر شتلات من نبات الداتورة *D. stramonium* بمرحلة نمو 4–5 أوراق (أو أي عدد من النباتات يختاره الباحث) وتعفّر أوراقها بالكاربورندم؛

3. تلقح كافة أوراق نباتات الداتورة ميكانيكيا كما في الفقرات 6 و7و8 في الطريقة رقم (12)؛

4. ستظهر أعراض البقع الموضعية الميتة أولا على الأوراق الملقحة بعد 5–7 أيام من التلقيح ثم تعقبها الأعراض الجهازية بشكل موزائيك على الأوراق الحديثة الناشئة بعد التلقيح، وهي الأعراض التي يسببها الفايروس البطاطا أكس (PVX) على نبات الداتورة وبذلك سيتم فصله عن فايروس البطاطا واي (PVY) الذي لا يصيب الداتورة المنيع للإصابة بهذا الفايروس؛

5. تكرر ذات الإجراءات ولكن مع نبات منيع لفايروس البطاطا أكس (PVX) وحساس لفايروس البطاطا واي (PVY).

2.1.4. الفصل باستعمال الناقلات

إن علاقة الفايروسات المنقولة بالناقلات Vectors هي علاقة متخصصة، كما توجد العديد من الفايروسات لا تنقل بناقل، لذا فانه في حالة وجود إصابة خليطة بفايروسين أو أكثر على النبات وكانت تلك الفايروسات مختلفة في نواقلها أو أن أحدها لا ينقل بناقل، عندها يمكن استعمال هذه الطريقة لفصل الفايروسات.

الطريقة (49) : فصل فايروسي موزائيك الخيار (CMV) وموزائيك الطماطة (ToMV) بواسطة حشرة مَنّ الباقلاء الأسود *Aphis fabae*

يفترض في هذه التجربة وجود نبات فلفل أو طماطة مصاب بالفايروسين في البيت الزجاجي. تنفذ الطريقة وفق الخطوات التالية :

1. تنقل 50 حشرة منّ الباقلاء الأسود بواسطة فرشاة رسم ناعمة مبللة شعيراتها قليلا بالماء من مزرعة المن إلى طبق بتري فيه ورقة ترشيح مبللة قليلا بالماء لغرض التجويع لمدة ساعة؛

2. تنقل الحشرات فور انتهاء مدة التجويع بالفرشاة إلى النبات المصاب بالإصابة وتترك على أوراقه لمدة خمس دقائق لتتغذى تغذية الاكتساب؛

3. تنقل الحشرات فورا بواسطة الفرشاة إلى عشرة شتلات فلفل سليمة أو طماطة بواقع خمس حشرات لكل نبات وتترك لمدة خمس دقائق أيضا لتتغذى تغذية التلقيح، ثم تقتل الحشرات؛

4. تراقب النباتات لحين ظهور الأعراض الجهازية التي يسببها فايروس موزائيك الخيار (CMV) على الأوراق الحديثة والتي قد تستغرق 7–10 أيام، وفي حالة ظهورها فان هذا يعني فصل هذا الفايروس لأنه منقول بالمن عن فايروس موزائيك الطماطة (ToMV) الذي لاينقل بالمن.

تنويه : في هذا النوع من التجارب يتم الحصول فقط على الفايروس المنقول بناقل مفصولا عن الفايروس الآخر الذي يمكن فصله بعد ذلك مستقلا بطريقة النبات الكاشف الحساس له.

الطريقة (50) : فصل فايروسي أسبرمي الطماطة (TAV) والذبول المبقع للطماطة (TSWV) بواسطة حشرتي منّ الخوخ الأخضر *Myzus persicae* والثربس *Frankiniella* sp..

يفترض في هذه التجربة وجود نبات فلفل أو طماطة مصاب بالفايروسين في البيت الزجاجي وتعتمد عملية فصل الفايروسين على اختلاف نوع الناقل لكل منهما، وتنفذ الطريقة وفق الخطوات التالية :

1. تنقل 25 حشرة منّ الخوخ الأخضر بواسطة فرشاة رسم ناعمة مبللة شعيراتها قليلا بالماء من مزرعة المن إلى طبق بتري فيه ورقة ترشيح مبللة قليلا بالماء لغرض التجويع لمدة ساعة؛

2. تنقل بعد إنتهاء مدة التجويع إلى النبات المصاب بالإصابة الخليطة لتتغذى تغذية الاكتساب بتركها على النبات لمدة خمس دقائق؛

3. تنقل 25 حورية ثربس من مزرعة الثربس بواسطة الفرشاة وتوضع في طبق بتري يحوي ورقة ترشيح مبللة قليلا بالماء، ثم تنقل مباشرة وبدون تجويع إلى ورقة النبات المصاب بالإصابة الخليطة لتتغذى تغذية الاكتساب بتركها على النبات لمدة ثلاث ساعات وهو نفس النبات الذي سبق نقل حشرات المن إليه؛

4. تنقل حشرات المن إلى خمس شتلات طماطة بواقع خمسة حشرات /نبات وتترك لمدة خمس دقائق لتتغذى تغذية التلقيح، ثم تقتل الحشرات؛

5. تنقل حشرات ثربس إلى خمس شتلات طماطة أخرى بواقع خمسة حشرات /نبات وتترك لتتغذى تغذية التلقيح، ثم تقتل الحشرات؛

6. تراقب النباتات لحين ظهور الأعراض الجهازية على الأوراق الحديثة والتي قد تستغرق 7–10 أيام على مجموعة النباتات الملقحة بالمنّ وهي تحمل فايروس أسبرمي الطماطة (TAV) المنقول بالمن وغير المنقول بالثربس، وعلى مجموعة النباتات الملقحة بالثربس وهي تحمل فايروس الذبول المبقع للطماطة (TSWV) المنقول بالثربس وغير المنقول بالمن.

3.1.4. الفصل بواسطة نبات الحامول

يمكن استعمال نبات الحامول لفصل الفايروسات في الإصابات الخليطة وذلك عند وجود أحد الفايروسين منقولا بالمن والآخر غير منقول به. ومن ذلك مثلا إصابة نبات اللوبيا بفايروسي موزائيك اللوبيا المنقول بالمن (CABMV) وموزائيك الخيار (CMV) حيث لا ينقل الأول بنبات الحامول فيما ينقل الثاني بكفاءة بعدة أنواع منه. ولغرض تنفيذ طريقة لفصل الفايروسات فانه يمكن إتباع ذات الإجراءات المتبعة في الطريقة (39) حيث تثبت أفرع الحامول على نبات اللوبيا المصاب إصابة خليطه بالفايروسين أعلاه وبعد اكتمال تطفله تنقل أفرعه إلى شتلات لوبيا سليمة وبعد ظهور الإصابة الجهازية عليها تكون تلك الإصابة لفايروس موزائيك الخيار والذي فصل بواسطة الحامول عن الفايروس الثاني. أما فايروس موزائيك اللوبيا المنقول بالمن فيفصل بواسطة النباتات الكاشفة أو الناقلات كما سبق ذكره.

4.1.4. الفصل بواسطة الانتباذ بمحاليل متدرجة الكثافة

يمكن توظيف طريقة تنقية الفايروسات بمحاليل متدرجة الكثافة ومنها محلول السكروز (انظر الفقرة 3.3.3.5 في الفصل الخامس) لفصل الفايروسات في الإصابات الخليطة وذلك بعد تحضير المحلول النقي للنبات المصاب إصابة خليطة ويتم ذلك بإحدى طرق التنقية المبينة في الفصل الخامس، وبذلك فان المحلول النقي سيحوي الفايروسين المسببين للإصابة الخليطة، واستنادا على تباين الفايروسين بالكثافة فانه يتم فصلهما بإضافتهما إلى أنابيب الانتباذ الحاوية على محلول السكروز متدرج الكثافة وبذلك سينفصل احدهما عن الآخر بعد التعرض للانتباذ العالي وسيستقر كل منهما في الطبقة التي تلاءم كثافته من طبقات محلول السكروز والتي سيتم فصل كل منها على انفراد بعد انتهاء الانتباذ ليتم التعرف على الطبقة التي يوجد فيها كل فايروس باخضاعه لاختبارات النقاوة (أنظر الفقرة 6.5. في الفصل الخامس) والتي ستظهر الصفات الخاصة لكل فايروس من الفايروسات المشتركة في الإصابة الخليطة.

2.4. فصل السلالات الفايروسية بواسطة البقعة الموضعية المنفردة

من المعروف أن لمعظم فايروسات النبات سلالات عديدة، فقد سجل لفايروس موزائيك التبغ (TMV) مثلا ما يقرب من 50 سلالة، وقد يصاب النبات الفرد بأكثر من سلالة لنفس الفايروس فتكون الإصابة خليطة كما هو الحال مع الإصابة الخليطة بأكثر من نوع فايروسي. ولغرض فصل السلالات التي تعود لنوع فايروسي معين والموجودة في النبات معا، فان الطريقة الأكثر استعمالا لفصلها هي طريقة البقعة الموضعية المنفردة والتي تقوم على حقيقة أن كل بقعة موضعية مصفرة أو ميتة تظهر على أوراق النبات الكاشف الموضعي الإستجابة الملقح إنما تمثل سلالة مستقلة حيث لا يمكن أن تشترك سلالتين في بقعة

واحدة، وبذلك ستنفصل السلالات الموجودة في النبات الواحد كل منها في بقعة منفردة، وعادة ما يستدل على إصابة النبات طبيعيا بأكثر من سلالة عند ظهور بقع مصفرة أو ميتة أحيانا مصاحبة للإصابة الجهازية العادية كالموزائيك معا على أوراق النباتات المصابة في الحقول.

الطريقة (51) : فصل سلالات فايروس موزائيك التبغ (TMV) بواسطة البقعة الموضعية المنفردة.

1. يتم الحصول على نبات تبغ مصاب بأكثر من سلالة أي تظهر على أوراقه أعراض موزائيك وبقع مصفرة ويحضر من هذه الأوراق العصير الخام وبالطريقة المبينة في الخطوات 1 و2 و3 في الطريقة (12)؛
2. تهيأ خمسة نباتات تبغ بري *N. glutinosa* أو صنف التبغ *N. tabacum* cv. xanthi بمرحلة نمو أربعة أوراق وتعفر أوراقها بالكاربورندم؛
3. تلقح الأوراق ميكانيكيا بالعصير الخام الذي يحوي خليط السلالات وبالطريقة المبينة في الخطوات 5 و6 و7من التجربة 12؛
4. بعد ظهور الأعراض الموضعية على الأوراق الملقحة يتم فصل بقعة موضعية واحدة من كل ورقة بواسطة ثاقبة فلين بقطر مناسب وتسحق في هاون خزفي لتحضير العصير الخام ثم تلقح به أوراق نبات تبغ سليم واحد من الصنف White burley وهو الذي يستجيب جهازيا للفايروس؛
5. يكرر تلقيح نبات ثاني من البقعة الأخرى وهكذا لغاية عشر نباتات مثلا أو حسب ما يرتأيه الباحث؛
6. تراقب نباتات التبغ الملقحة والمحفوظة في البيت الزجاجي لغاية ظهور الإعراض الجهازية، ويتم التعرف على كل سلالة وكشفها من خلال تباين الأعراض الجهازية التي تظهر على كل نبات من الصنف المذكور أعلاه إذ أن لكل سلالة أعراضها التي تميزها عن الأخرى. وبذلك يكون كل نبات من النباتات الملقحة حاملا لسلالة نقية.

تنويه : (1) يمكن في بعض الحالات الخاصة التي تتباين فيها استجابات بعض أنواع النباتات الكاشفة لسلالات الفايروس، استعمال طريقة الفصل بالنباتات الكاشفة ومثال ذلك هو الفصل بين سلالتي فايروس موزائيك الرقي (WMV) عند وجودهما معا في نفس النبات باستعمال نبات الليف حيث يصاب جهازيا بشكل موزائيك مع السلالة WMV-1 ، بينما هو منيع للإصابة بالسلالة WMV-2 (2) يمكن في بعض الحالات الخاصة التي تتباين فيها سلالات الفايروس في نوع الناقل حيث تنقل كل سلالة بنوع يختلف عن ناقل السلالة الأخرى، استعمال طريقة الفصل بالناقلات، ومثال ذلك تباين سلالات فايروس التقزم الأصفر للشعير (BYDV) في نقلها بأنواع المن حيث تنقل كل سلالة بنوع مختلف من المن وبدرجة عالية من التخصصية.

3.4. دراسة ظاهرة المقاومة المتبادلة بين السلالات الفايروسية

من الظواهر الشائعة في الإصابات الخليطة بأكثر من سلالة هي ظاهرة المقاومة المتبادلة Cross protection حيث تسبب السلالة التي تصيب النبات مسبقا، توهينا للسلالة التي تصيب النبات لاحقا. عليه فان إثبات حصول هذه الظاهرة يدل على أن هناك سلالتين للفايروس في النبات وليس فايروسين مختلفين، وتوضح الطريقة التالية كيفية توظيف هذه الظاهرة للكشف عن سلالات فايروس معين.

الطريقة (52) : دراسة المقاومة المتبادلة بين سلالتين لفايروس موزائيك الخيار (CMV)

يفترض في هذه التجربة وجود مجموعتي نباتات خيار محفوظة في البيت الزجاجي مصابة إحداها بالسلالة العادية لفايروس موزائيك الخيار Common strain of CMV ، فيما تحمل الثانية السلالة الصفراء للفايروس Yellow strain of CMV. تجرى الطريقة وفق الخطوات التالية :

1. تهيأ عشرة شتلات تبغ بري *N. glutinosa* بمرحلة نمو 4– 5 أوراق وتلقح أوراق خمس نباتات منها ميكانيكيا (كما في الطريقة 12) بواسطة عصير محضر من نبات خيار مصاب بالسلالة العادية لفايروس موزائيك الخيار وهي السلالة الضعيفة، وتبقى النباتات الخمسة الأخرى دون تلقيح؛
2. بعد عشرة أيام من تلقيح النباتات الخمسة أعلاه وظهور الأعراض الجهازية للسلالة العادية، تلقح ذات النباتات ثانية ميكانيكيا بعصير محضر من نبات خيار مصاب بالسلالة الصفراء لفايروس موزائيك الخيار وهي السلالة الشديدة التي تسبب موزائيك أصفر شديد للنبات؛
3. تلقح النباتات الخمسة الثانية المؤجلة في الخطوة الأولى بالسلالة الصفراء فقط؛
4. تراقب النباتات العشرة الملقحة لمدة 10–15 يوما بعد آخر تلقيح حيث يلاحظ أن أعراض السلالة الصفراء على النباتات الخمسة الملقحة مسبقا بالسلالة العادية ستكون أعراضا ضعيفة بسبب توهينها من قبل السلالة العادية التي أصابت النبات مسبقا، وذلك مقارنة بشدة أعراض السلالة الصفراء لوحدها عند إصابتها منفردة لنباتات التبغ الملقحة.

4.4. طرق حفظ عزلات الفايروسات النباتية

يجب أن تحفظ العزلات الفايروسية النقية بعد تشخيصها كي يتم استعمالها لاحقا تجنبا لفقدها، وهناك عدة طرق معتمدة لحفظ العزلات الفايروسية إلا أنه يجب أن تكون طريقة الحفظ المختارة مناسبة للفايروس المعني وأن لا تسبب أي احتمال لحدوث تغيرات في الصفات الحيوية للفايروس أو لاحتمال حصول تلوث بفايروسات أخرى. ويجب أن تحافظ طريقة الحفظ المختارة على فاعلية الفايروس خلال مدة حفظه خارج النسيج النباتي الحي.

1.4.4. حفظ العزلات الفايروسية في النباتات الحية

يمكن حفظ عزلات كل الفايروسات وخاصة المنقولة ميكانيكيا بهذه الطريقة باختيار نباتات تصاب جهازيا بتلك الفايروسات ويكون تركيزها فيها عاليا وأن تكون تلك النباتات خالية من المثبطات. ويتم ذلك ببساطة بنقل عزلة الفايروس المعني إلى عدد من أفراد نبات الحفظ بطريقة التلقيح الميكانيكي باتخاذ نفس الخطوات المبينة في الطريقة (12) وتحفظ هذه النباتات في البيت الزجاجي حيث يبقى الفايروس فيها ما دامت حية، وتستعمل لهذا الغرض عادة نباتات حولية لحفظ معظم الفايروسات لذلك يتوجب باستمرار تجديد العزلة بتلقيح نباتات جديدة من نفس نوع وصنف النباتات المحفوظة فيها العزلة بلقاح محضر منها كلما اقتربت هذه النباتات من نهاية العمر. كما يمكن أيضا الاحتفاظ بعزلات الفايروسات غير المنقولة ميكانيكيا وخاصة تلك التي تصيب الشجيرات والأشجار بنقلها بطرق الإكثار الخضري (أنظر الطرق من رقم19 الى 25) ويمكن في مثل هذه الحالة الاحتفاظ بالعزلة لعدة سنوات لانها محفوظة في نباتات معمرة. إن طريقة الحفظ في نباتات حية هي طريقة جيدة ولكن من سلبياتها صعوبة الحفاظ على تلك النباتات في البيت الزجاجي محمية من أي إصابة حشرية قد تنقل إليها فايروسات ملوثة تفسد العزلة، كذلك فان هذه النباتات معرضة للإصابات بالفطريات أو غيرها من المسببات المرضية الأخرى التي قد تسبب موتها وبالتالي خسارة العزلة لذلك فان إدامة هذه النباتات يتطلب الرش الوقائي المستمر بالمبيدات وكذلك اتخاذ الإجراءات الصارمة لمنع دخول الحشرات إلى البيت وهي إجراءات تتطلب المتابعة الدقيقة مع جهد بشري مكثف.

2.4.4. حفظ العزلات الفايروسية بالتجميد

1.2.4.4. تجميد عصير النبات المصاب

يمكن حفظ عزلات العديد من الفايروسات بطريقة التجميد عند −18مْ في مجمدة وذلك بتحضير العصير الخام من النبات المصاب بالطريقة المبينة في الخطوات 1 و2 و3 من الطريقة (12)، ثم يوضع العصير في أكياس من البولي إيثيلين أو قناني بلاستيكية وتحفظ في المجمدة عند الدرجة المذكورة. يفضّل إضافة مواد حافظة للعصير قبل التجميد تزيد من فترة بقاء الفايروس وهي الكليسرول أو اللاكتوز أو الكلوكوز أو الببتون بحجم مماثل لحجم المحلول الفايروسي، ويمكن بطريقة الحفظ هذه الاحتفاظ بالفايروسات فعالة لعدة أشهر وحسب نوعها، وهناك فايروسات لا تتحمل الخزن بهذه الطريقة لأكثر من عدة أسابيع أو ربما أيام.

2.2.4.4. تجميد الجزء النباتي المصاب

يمكن استعمال هذه الطريقة لحفظ العزلات الفايروسية وذلك بوضع الجزء النباتي المصاب (عادة الأوراق) في أكياس من البولي إيثيلين وخزنها في مجمدة حوضية عند −18مْ وهي كالطريقة أعلاه تمكننا من

حفظ الفايروسات بين عدة أسابيع إلى عدة أشهر وحسب نوع الفايروس، وقد تتفوق على الطريقة السابقة لأن الفايروس موجود في محيطه الطبيعي داخل الخلايا المصابة لذا سيتحمل الخزن لفترة أطول مقارنة بوجوده في العصير الخام.

تنويه: يمكن استعمال النتروجين السائل Liquid nitrogen الذي يمتاز بدرجة حرارة 190 مْ تحت الصفر في حفظ الانسجة النباتية المصابه بالفايروسات، وكما مبين في الشكل (4-1) حيث تعامل الانسجة بالنتروجين السائل لمدة خمسة دقائق وتطمر مباشرة في داخل المجمدة حوضية عند -18مْ. يجب الانتباه عند التعامل مع النتروجين السائل لأنه يسبب ضرر لبشرة اليدين لذلك ينصح بأستعمال الملقط أو القفازات اثناء الاجراء.

الشكل (4-1): تجميد العينات بالنتروجين السائل على درجة -190م°

3.4.4. حفظ العزلات الفايروسية بالتجفيف

1.3.4.4. التجفيف الطبيعي للأوراق

يمكن حفظ عزلات بعض أنواع الفايروسات وخصوصا الثابتة (Stable viruses) بتجفيف الأوراق المصابة تجفيفا طبيعيا وذلك بقطعها من النباتات ثم فرشها على أوراق غير صقيلة (أوراق الجرائد مثلا) دون تكديس وفي مكان ظليل جيد التهوية تكون معدلات درجة الحرارة فيه 25-30مْ مع التقليب المستمر لحين اكتمال جفافها تماما، بعدها تحفظ في أكياس ورقية في مكان بارد وجاف. يمكن بهذه الطريقة حفظ فايروس موزائيك التبغ (TMV) لعدة سنوات وفايروس البطاطا أكس (PVX) لمدة تصل إلى 250 يوما، إلا أنها غير مفضلة مع أغلب الفايروسات لسرعة تلفها في الأوراق المجففة.

2.3.4.4. التجفيف السريع بكلوريد الكالسيوم اللامائي

هي طريقة أكثر كفاءة في حفظ العزلات الفايروسية من الطريقة السابقة وتتم وفق الخطوات التالية :

الطريقة (53) : حفظ الفايروسات بالتجفيف السريع بكلوريد الكالسيوم اللامائي

1. تقطع أوراق النباتات المصابة ويزال العرق الوسطي إن كان كبيرا كما في أوراق الخس بواسطة مقص معقم ثم يقطع النصل إلى قطع صغيرة بحدود 2سم^2 وتوزن؛

2. يهيأ إناء التجفيف Desiccator بحجم مناسب أو أي إناء زجاجي محكم الإغلاق، وتوضع فيه كمية من أحجار كلوريد الكالسيوم اللامائي $CaCl_2$, Anhydrous calcium chloride تساوي ضعف وزن الأوراق المراد تجفيفها وتوزع بشكل متجانس في قعر الإناء؛

3. توضع ورقة الترشيح فوق أحجار كلوريد الكالسيوم اللامائي وتوزع عليها قطع الأوراق دون تكديس ويقفل غطاء إناء التجفيف بإحكام، وفي حالة استعمال إناء زجاجي عادي فانه يجب إقفال جوانبه بشريط لاصق لمنع دخول الهواء؛

4. يوضع الإناء في الثلاجة عند 4مْ لمدة أسبوعين وهي فترة كافية لتجفيف قطع الأوراق؛

5. ترفع القطع النباتية من الإناء وتوضع في أكياس ورقية مقفلة وتخزن عند 4مْ في مكان جاف.

تنويه : يمكن بهذه الطريقة خزن عزلات العديد من الفايروسات لعدة أشهر أو سنوات ومنها فايروسي موزائيك الخيار (CMV) والبطاطا واي (PVY) التي تصل مدة خزنها فعالة بهذه الطريقة إلى سبع سنوات.

4.4.4. حفظ العزلات الفايروسية بالتجفيد

يقصد بعملية التجفيد Lyophilazation , Freeze-drying تجفيف المادة مباشرة وبسرعة بعد تجميدها إلى درجات منخفضة جدا وتحت ظروف التفريغ الهوائي، وتتم هذه الطريقة وفق الخطوات التالية :

الطريقة (54) : حفظ العزلات الفايروسية بالتجفيد

1. تقطع الأوراق النباتية المصابة بالعزلة الفايروسية المراد حفظها إلى قطع صغيرة (بحدود 1 سم^2) ويتم تجميدها سريعا بغمرها في النتروجين المسال الذي يخفض درجة حرارتها إلى درجة – 190مْ؛

2. تنقل القطع فورا الى جهاز التجفيد Lyophilizer وتجفف فيه تحت ظروف التفريغ بين درجتي – 30 – 40مْ حيث سيتحول الماء المجمد داخل الأنسجة النباتية عند هذه الحرارة المنخفضة مباشرة إلى بخار من دون حدوث أي تمزيق للخلايا النباتية أو انكماش فيها ويبقى النسيج متماسكا مما يزيد من احتمالية بقاء الفايروس فعالا في الأنسجة المجفدة مقارنة بطريقة التجميد العادية التي تسبب تحطيم وتمزق الخلايا النباتية؛

3. تنقل القطع النباتية فور انتهاء التجفيد وتوضع في قناني زجاجية محكمة القفل وتحفظ في مكان بارد وجاف.

تنويه : إن طرق التجفيف والتجميد والتجفيد التي ذكرت تناسب تحديدا الفايروسات المنقولة ميكانيكيا وذلك لسهولة استرداد العزلة المحفوظة بعمل عصير منها وتلقيح نباتات الاختبار بها ميكانيكيا.

يبين الجدول (4-1) طرق مقترحة أثبتت كفاءتها في حفظ عزلات عدد من أنواع الفايروسات في الأوراق المصابة.

الجدول (4-1) : طرق حفظ العزلات الفايروسية في الأوراق المصابة لعدد من أنواع فايروسات النبات.

نوع الفايروس	نبات حفظ العزلة	الحفظ بتجميد الأوراق عند الصفر المئوي	الحفظ بتجميد الأوراق عند-20م	الحفظ بتجفيد الأوراق	الحفظ بتجفيف الأوراق ثم الخزن عند 4م
BCMV	الفاصوليا	–	+	*	+
BYMV	الباقلاء	–	+	_	+
CarMV	القرنفل	+	+	+	*
CRSV	اللوبيا	*	+	+	*
CMV	التبغ البري	–	–	+	+
TSWV	ورد الدكمة	–	–	–	*
PLRV	المنطاد	-	–	–	*
PVX	البطاطا والتبغ البري	+	+	+	+

PVY	البطاطا والمنطاد	−	+	+	+
TMV	التبغ	+	+	+	+
TNV	التبغ	+	+	+	+
TRV	التبغ	+	+	+	*

+ = بقي الفايروس فعالا لستة أشهر على الأقل.

− = إنتهت فعالية الفايروس فورا أو بعد فترة قصيرة جدا.

* = لا توجد معلومات

الفصل الخامس
تنقية الفايروسات النباتية

1.5. أهداف التنقية

تجرى عملية تنقية الفايروسات النباتية لتحقيق الأهداف التالية :

1. إنتاج المصول المضادة للفايروسات والتي لا يمكن إنتاجها إلا باستعمال محاليل فايروسية نقية تماما خالية من أية ملوثات نباتية.
2. إجراء التحليلات الكيماوية للفايروسات والتي تشمل نوع الأحماض النووية الفايروسية وتتابع النيوكليوتايدات فيها ونوع البروتينات الفايروسية وتتابع الأحماض الامينية فيها، والمركبات الأخرى الداخلة في تركيب الفايروسات.
3. دراسة الأشكال الفايروسية وتركيبها المظهري وطبوغرافيتها باستعمال المجهر الالكتروني حيث تكون هذه الدراسات أكثر دقة عندما تجرى على المحاليل الفايروسية النقية.
4. فصل الأنواع الفايروسية المختلفة عند وجودها في الإصابات الخليطة وكما سبق ذكره في الفصل الرابع.

2.5. أساسيات عامة تراعى عند تنقية الفايروسات

توجد جملة أساسيات يجب الالتزام بها قبل إجراء التنقية وهي :

1. انتخاب نباتات إكثار مناسبة Propagative hosts للفايروسات المراد تنقيتها والتي يكون تركيز الفايروسات فيها عاليا (انظر الفصل الثاني)، ويجب أن لا تحتوي على مواد مثبطة تؤثر على فعالية الفايروسات وخاصة المواد الفينولية والأحماض العضوية والمواد الصمغية إذ أن وجود مثل هذه المواد تعقد عملية التنقية، لذا نجد صعوبة في تنقية فايروسات أشجار اللوزيات وأفراد العائلة الوردية لاحتواء أوراقها على تركيز عالي من التانينات، لذلك فعند تنقية فايروسات هذه النباتات يجب نقلها إلى أنواع نباتية عشبية خارج هاتين العائلتين ما أمكن ذلك. وإذا أضطر الباحث لاستعمال نباتات تحوي تركيزا عاليا من المثبطات، عندها يجب استعمال النموات الحديثة لتحضير العصير حيث تنخفض فيها المواد المثبطة مقارنة بالنموات الكبيرة العمر.
2. معرفة العمر المناسب للنباتات التي سيتم الحصول على الفايروسات منها بحيث يكون تركيزها فيها في أعلى مستوياته ويتحقق ذلك في معظم النباتات وخاصة العشبية بعد عدة أيام الى عدة أسابيع من

إصابتها ثم يتناقص تركيز الفايروس فيها تدريجيا. كما يجب معرفة العضو النباتي الذي يكون فيه تركيز الفايروسات عاليا وهي عادة الأوراق، إلا أن بعض الفايروسات قد تكون أعلى تركيزا في أعضاء أخرى من النبات مثل الجذور كما هو الحال مع فايروس موت التبغ (TNV). ويمكن تقدير تركيز الفايروس في النبات باتباع الطرق التي ذكرت في الفصل الثالث، وعادة فان الحد الأدنى المقبول لتركيز الفايروسات في نباتات الإكثار هو 5– 10 ملغم فايروس/كغم من الأوراق الطازجة.

3. يفضل معرفة الخواص الفيزياوية للفايروس المزمع تنقيته بجمع معلومات عنه من البحوث السابقة وذلك لمعرفة تحمله للظروف الخارجية واتخاذ الإجراءات المناسبة لحمايته من التلف أثناء مراحل التنقية.

3.5. طرق تنقية فايروسات النبات

عند تنقية أي فايروس نباتي وبغض النظر عن طريقة التنقية المستعملة، فان عملية التنقية تمر بالمراحل الثلاث المتتابعة التالية :

1.3.5. مرحلة استخلاص العصير النباتي

هي عملية الحصول على العصير النباتي من النباتات التي تم إكثار عزلة الفايروس فيها وذلك للحصول على اكبر كمية ممكنة من الجسيمات الفايروسية، ويمكن إتباع الطريقة التي ذكرت لتحضير العصير الخام في الخطوات 1 و 2 و 3 من الطريقة (12) ولكن يفضل استعمال وسائل سحق ميكانيكية كفوءة غير الهاون الخزفي مثل ماكينات سحق الخضراوات أو الخلاطات الكهربائية وذلك لحاجة عملية التنقية لكمية كبيرة من العصير الخام قد تصل إلى نصف لتر أو أكثر. يجب الحذر عند استعمال الخلاط الكهربائي من زيادة مدة السحق لان ذلك يسبب ارتفاعا في درجة حرارة العصير مما يؤثر سلبا على فعالية الفايروسات خاصة تلك غير الثابتة، لذا يجب اختصار مدة السحق قدر الإمكان وتبريد العصير بإضافة عدة مكعبات من الثلج المحضرة من الماء المقطر المعقم بحيث تكون درجة حرارة العصير قريبة من درجة 4مْ، كما أن التبريد يوقف فاعلية الإنزيمات المحللة النباتية المؤثرة سلبا على الفايروسات في العصير.

تضاف إلى العصير في نهاية هذه المرحلة العديد من المضافات التي تقلل تأثير العوامل المتلفة للفايروسات، وهذه المضافات هي :

***المواد المانعة للتأكسد** : وهي مواد تمنع تأكسد الفايروسات بسبب تعرضها إلى الأوكسجين الجوي وكذلك تقلل من التأثير الضار للمواد الفينولية النباتية والتنينات على الفايروسات حيث ترتبط بها وتسحبها من العصير، وأكثر هذه المركبات استعمالا هي كبريتيت الصوديوم Sodium sulphite

وثايوجلايكوليت الصوديوم Sodium thioglycolate والميركابتوايثانول Mercaptoethanol و هيدروكلوريد السستين Cystine hydrochloride، والتي تضاف إلى العصير بتركيز يعتمد على نوع المركب المستعمل وطريقة التنقية.

* **مواد موقفة (مثبطة) لعمل إنزيمات أكسدة الفينولات** : وتشمل مواد النيكوتين بتركيز 0,02% أو الحليب المقشود المزال منه الدهن، أو ثنائي الاثيل ثنائي ثايوالكارباميت Diethyldithiocarbamate أو زانثات أثيل البوتاسيوم Potassium ethyl xanthate هي مركبات توقف أو تثبط فعل إنزيمات أكسدة الفينولات التي تحول الفينولات النباتية إلى تانينات والتي هي أكثر إتلافا للفايروسات من الفينولات البسيطة حيث يعمل المركبين الأخيرين على تعطيل عمل الإنزيمات بإزالتها لأيون النحاس الضروري لعمل هذه الإنزيمات.

* **مواد موقفة لفعل الفينولات** : من أهم المواد المستعملة هي ألبومين البيض وبعض البولمرات ومنها مادة بوليفينيل البايرولدون Polyvinyl pyrrolidone , PVP وذلك للتخلص من الفينولات والتنينات من العصير.

***البنتونايت المغنسيومي Magnesium bentonite** : والذي يعمل على إدمصاص الإنزيمات النباتية المحللة وخاصة تلك المحللة للأحماض النووية من العصير ويفضل إضافته عند دالة حامضية 6، كما يعمل على ادمصاص الرايبوسومات والبروتين النباتي 18S وبقايا الكلوروبلاستات، ولكن يجب الحذر من إضافته بكمية كبيرة لأنه قد يدمص الجسيمات الفايروسية ويرسبها في العصير كما يسبب تلوث العصير بالجزيئات الدقيقة للبنتونايت التي تربك الخطوات التالية للتنقية.

* **المواد المخلبية Chelating agents** : وأهمها مركب الأثيلين ثنائي الأمين رباعي الخلات Ethylene diamine tetra acetate , EDTA بتركيز 0,01 مولر ودالة حامضية 7,4 لإزالة أيوني الكالسيوم والمغنيسيوم من العصير وذلك لان وجودهما في العصير بتركيز عالي يسبب ترسب بعض الفايروسات فيه وبالتالي فقدها أثناء الاستخلاص.

* **الفحم Charcoal** : والذي يضاف إلى العصير لادمصاص الإنزيمات النباتية والصبغات النباتية، ثم يتم التخلص منه بتمرير العصير عبر ورقة ترشيح، ولكن من سلبيات استعماله هي ادمصاص جسيمات الفايروسات على حبيباته وفقدها من العصير.

* **المنظفات Detergents** : وأهمها مركبات الترايتون أكس 100، Triton X-100 والتوين 80 Tween-80 والايجيبون Igepon وكبريتات دوديسيل الصوديوم Sodium dodecyl (lauryl)

SDS , sulphate والتي تضاف إلى العصير لنشر الجسيمات الفايروسية بشكل متجانس فيه ومنع تكتلها وبالتالي فقدها منه.

* **اليوريا Urea** : والتي تضاف كمادة ناشرة للجسيمات الفايروسية بتركيز 0,5 مولر وذلك بسبب تأثيرها في إضعاف الأواصر الكاره للماء والأواصر الهيدروجينية التي تعمل على ربط تلك الجسيمات وبالتالي تمنع ترسيبها في العصير.

* **الإنزيمات المحللة للجدر الخلوية** : وخاصة إنزيمي البكتينيز Pectinase والسليليز Cellulase وهي تستعمل في بعض الحالات الخاصة لتسهيل تحرير الجسيمات الفايروسية من الخلايا كما هو الحال فايروس التفاف أوراق البطاطا (PLRV) من أوراق البطاطا.

* **الإنزيمات المحللة للبروتين** : وخاصة إنزيمي التربسين Trypsin والكيموتربسين Chymotrypsin لهضم المركبات النباتية المعقدة المكونة من ارتباط البروتينات مع الصبغات والجسيمات الفايروسية حيث تعمل هذه الإنزيمات على تحريرها من هذا المعقد.

تنويه : (1) إن الإنزيمات المذكورة في النقطتين أعلاه هي غالية الثمن لذلك لا تستعمل عادة إلا في حالات خاصة عندما يصعب جدا استخلاص الجسيمات بالطرق العادية (2) إن كل المركبات التي ذكرت أعلاه يجب إضافتها بالتركيز الموصى به بدقة وحسب طريقة تنقية كل فايروس (3) كل هذه المضافات يتم التخلص منها في العصير غالبا في مرحلة التصفية أو في بواسطة عملية الديلزة Dialysis حيث لا يجوز بقائها في المحلول الفايروسي النقي.

2.3.5. مرحلة تصفية العصير

هي تعقب عملية الاستخلاص مباشرة ويتم فيها التخلص من المواد النباتية الكبيرة الحجم نسبيا والتي تشمل المايتوكوندريا والبلاستيدات والأغشية والجدر الخلوية وأجزائها، وتتم بإحدى الطرق التالية :

1.2.3.5. التصفية بالانتباذ الواطئ

يعرّض العصير إلى إنتباذ واطئ حيث ينقل إلى أنابيب الانتباذ وباستعمال الدوّار ثابت الزاوية، (الشكل 5-6، ب) وعند سرعة إنتباذ 1000-10000 Xg لمدة 10-15 دقيقة ويرمى الراسب الكتلة الراسبة Pellet الذي يحوي المواد النباتية المذكورة أعلاه، أما الرائق Supernatant وهو الجزء المائي في الأنبوبة فهو الذي يؤخذ لأنه يحوي الجسيمات الفايروسية والمواد النباتية الصغيرة والقريبة الحجم من الفايروس أو الأصغر منه. يمكن تحسين عملية الترسيب بإضافة مادة مرسبة إلى العصير قبل الانتباذ وأكثرها شيوعا هي كبريتات الامونيوم Ammonium sulphate بتركيز 15% في العصير.

2.2.3.5. التصفية بالمذيبات العضوية

تستعمل العديد من أنواع المذيبات العضوية الآتية لتصفية العصير النباتي وإزالة المواد الدهنية (الليبيدية) النباتية، وهذه المذيبات هي : الإيثانول و الأسيتون و الايثر و البيوتانول و الكلوروفورم و الكربون رباعي الكلورايد و المذيبات من مجموعة الفلوروكربونات Fluorocarbons ومنها المذيب فرونليز Fronliz، إلا أن أكثرها استعمالا مع الفايروسات العصوية هي الكلوروفورم أو الكربون رباعي الكلورايد. تضاف هذه المذيبات إلى العصير وتمزج معه بنسبة لا تزيد 20% ويفضل أن يتم المزج بسرعة في خلاط كهربائي لعدة دقائق عند السرعة المتوسطة للخلاط، ثم يعرّض المزيج فورا إلى إنتباذ واطئ بقوة 5000–10000 Xg لمدة 10–20 دقيقة باستعمال الدوار ثابت الزاوية وبعد نهاية الانتباذ ستتكون في أنابيب الانتباذ طبقتين سائلتين، السفلية هي الطبقة الدهنية والتي تحوي المذيب العضوي مع المواد التي أذيبت فيه وهي الأغشية الخلوية والمواد الشمعية والكلوروفيلات، والتي ترمى، أما الطبقة العلوية فهي الطبقة المائية والتي تحوي الجسيمات الفايروسية والتي تسكب بحذر في بيكر معقم. يجب اختيار المذيب المناسب لكل نوع فايروسي مع الإلتزام بدقة بالتركيز الموصى به لان زيادة تركيزه سيتلف الجسيمات الفايروسية، ولا ينصح باستعمالها نهائيا مع الفايروسات المغلفة Enveloped viruses لإنها تذيب الغلاف الخارجي الليبيدي للفايروس وتتلفه.

3.2.3.5. التصفية بالمرشحات الدقيقة

تستعمل أنواع من المرشحات التي تسمح فقط بمرور الفايروسات والأجسام النباتية القريبة الحجم أو الأصغر منها ويطلق مصطلح الترشيح الفائق على هذا النوع من الترشيح. توجد العديد من أنواع المرشحات الجاهزة التي تستعمل في التصفية ومنها مرشح زايتز Seitz filter المصنوع من الاسبست، ومرشح بيركفيلد Berkefeild filter المصنوع من رمل الدياتوم Diatomaceous earth، ومرشح شامبرلان Chamberlin filter المصنوع من الخزف، كما تستعمل أنواع من الأغشية الجزيئية Membranous filters ومنها مرشح النتروسليلوز Nitrocellulose filter المكون من عجينة نترات وخلات السليلوز، ويفضل قبل تمرير العصير عبر هذه المرشحات أن يرشح عبر طبقة من ورق الترشيح كي لا تقفل ثقوب هذه المرشحات لدقتها بالكتل الكبيرة نسبيا للعصير. ومن أهم المرشحات المستعملة مرشح السيلايت الذي ابتكره كوربيت (Corbett) سنة 1961 والذي يتم تحضيره وإستعماله بالطريقة التالية :

الطريقة (55) : تصفية العصير النباتي بواسطة مرشح السيلايت

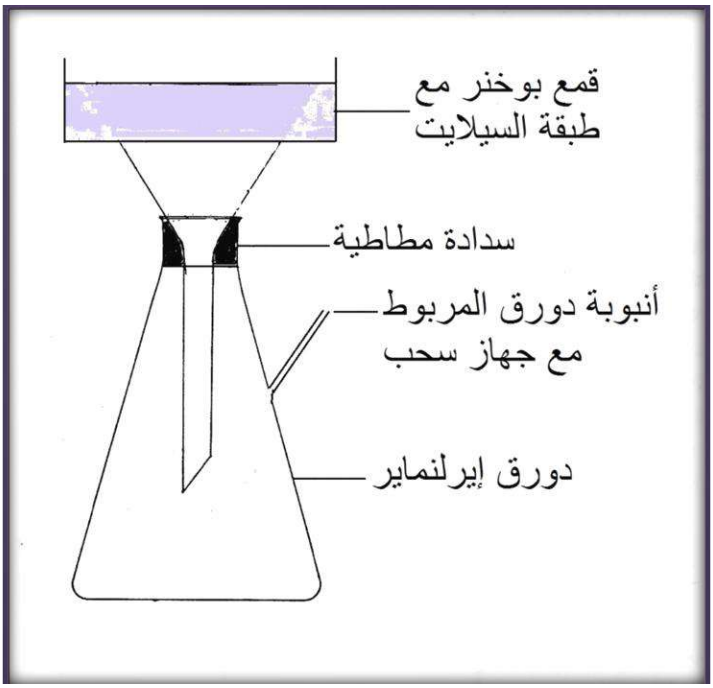
1. يمزج 50 غم من مسحوق السيلايت مع 250 مل من الماء المقطر المعقم في بيكر معقم؛

2. يثبت قمع بوخنر Buchner funnel بإحكام بعد وضع ورقة ترشيح فيه، على فوهة دورق إيرلنماير بحجم 500 مل بواسطة سدادة مطاطية؛

3 . يضاف المزيج إلى قمع بوخنر وتربط الأنبوبة الجانبية للدورق بجهاز تفريغ الهواء ويتم سحب الماء من مزيج السيلايت الذي سيتحول إلى طبقة شبه جافة بسمك 0,5 سم في قمع بوخنر، (الشكل 5-1)، وبذلك نحصل على المرشح الذي يجب استعماله فورا، والذي لا ينصح باستعماله ثانية بسبب انسداد ثقوبه بالمواد النباتية؛

4. يسكب العصير النباتي الناتج من مرحلة الاستخلاص فوق مرشح السيلايت تدريجيا وبهدوء مع تشغيل جهاز خلخلة الضغط لغرض سحب الراشح النقي الذي يترشح إلى الدورق والذي يحوي الجسيمات الفايروسية والمواد النباتية القريبة الحجم منه فيما تحجز كافة الملوثات في طبقة السيلايت.

تنويه : (1) من سلبيات هذا المرشح هي ادمصاصه لبعض أنواع الفايروسات ولتجنب ذلك يفضل استعمال محلول منظم مناسب بدالة حامضية معينة تناسب كل فايروس تمنع ادمصاص جسيماته على جزيئات السيلايت ومثال ذلك استعمال محلول منظم بدالة حامضية 5 عند ترشيح عصير النبات الحاوي على فايروس موزائيك التبغ (TMV)، كما ان بعض الفايروسات قد تدمص على ورق الترشيح كما هو الحال مع فايروس البطاطا واي (PVY)، (2) في حالة الحاجة إلى إعادة استعمال مادة السيلايت فانه يتم سكبها بعد انتهاء الترشيح في بيكر وغسلها لعدة مرات بالماء وذلك لإزالة المواد النباتية العالقة بها ثم تجفيفها هوائيا وإعادة إستعمالها، إلا أنه يفضل إستعمال مسحوق سيلايت جديد عند كل ترشيح.



الشكل (5–1) : مخطط مرشح السيلايت

4.2.3.5. التصفية بالتجميد والتسخين

هما طريقتين غير شائعتي الاستعمال وتقتصران على بعض الفايروسات الثابتة ومنها فايروس موزائيك التبغ (TMV) إذ يتم تجميد العصير إلى درجة الصفر المئوي فتتكون كتلة ثلجية صافية تحوي الجسيمات الفايروسية فيما لا تتجمد الملوثات النباتية في العصير وتبقى سائلة وبالتالي يسهل فصلها. أما التصفية بالتسخين فتتم بتسخين العصير في حمام مائي عند 50–60مْ لمدة عشر دقائق كما في الشكل (5–2)، حيث يسبب ذلك ترسيب البروتينات النباتية التي تتكتل وتترسب أسفل العصير وبالتالي يمكن فصلها.

الشكل(5-2): طريقة التصفية بالتسخين

3.3.5. مرحلة التنقية النهائية للفايروس

يتم فيها فصل الجسيمات الفايروسية نقية تماما في محلولها الخالي تماما من أية ملوثات نباتية، وتتم بإحدى الطرق التالية :

1.3.3.5. التنقية بالانتباذ ألتناوبي

تعد طريقة الانتباذ Centrifugation إحدى أهم طرق تنقية فايروسات النبات وأكثرها شيوعا وخصوصا طريقة الانتباذ ألتناوبي Differential centrifugation الذي يعتمد استعمال دورات متتالية من الانتباذ واطئ السرعة ثم عالي السرعة باستعمال جهاز انتباذ عالي السرعة ومبرّد يوفر درجة حرارة تصل إلى 4مْ في حجرة الدوار وذلك لمنع تأثير إرتفاع درجة الحرارة في الحجرة بسبب الدوران الشديد للدوار على فعالية الفايروس. تتم التنقية بتعريض العصير المصفى إلى انتباذ واطئ أولا بسرعة 10000 دورة/دقيقة لمدة نصف ساعة ويهمل الراسب الذي يحوي الملوثات النباتية الكبيرة الحجم نسبيا، ويؤخذ الرائق الذي يعرض فورا إلى انتباذ عالي يصل إلى 40000 دورة/دقيقة (تتغير هذه السرعة بتباين الفايروسات) لمدة 2-3 ساعات وحسب نوع الفايروس حيث تترسب الجسيمات الفايروسية عند قوة الانتباذ العالية هذه وتفصل عن الرائق الذي يسكب، ثم يذاب الراسب الفايروسي بإضافة قطرات من محلول منظم مناسب وبذلك يتم الحصول على محلول فايروسي نقي. يمكن تكرار دورة الانتباذ الواطئ والعالي ثانية على راسب وراشح الدورة الانتباذية الأولى بعد مزجهما معا لاحتمال وجود جسيمات

فايروسية فيهما فشلت الدورة الأولى في تنقيتهما. يبين الجدول (5–1) سرعة الانتباذ المستعملة لفصل المواد النباتية وتنقية بعض أنواع فايروسات النبات.

الجدول (5–1) : سرعة الانتباذ والمدة اللازمة لترسيب المواد النباتية وأنواع من الفايروسات النباتية.

المادة النباتية/الفايروس	سرعة الانتباذ(دورة/دقيقة)	الوقت اللازم للترسيب(دقيقة)
النوى	500	4
الكلوروبلاستيدات	1000	10
المايتوكوندريا	3000	12
الرايبوسومات	30000	150
فايروس موزائيك الخيار Cucumber mosaic virus	30000	90
فايروس التبقع الحلقي للقرنفل Carnation ring spot virus	30000	120
فايروس الموزائيك الأصفر للشلغم Turnip yellow mosaic virus	30000	110
فايروس موت التبغ Tobacco necrosis virus	30000	100
الفايروس التابع لموت التبغ Satellite tobacco necrosis virus	30000	250

فايروس الذبول المبقع للطماطة Tomato spotted wilt virus	30000	250
فايروس التقزم الأصفر للبطاطا Potato yellow dwarf virus	30000	150
فايروس موزائيك التبغ Tobacco mosaic virus	30000	70
فايروس خشخشة التبغ Tobacco rattle virus	30000	45

الطريقة (56) : تنقية فايروس موزائيك الخس(LMV) بطريقة الانتباذ التناوبي والمذيبات العضوية.

1. يؤخذ 200غم من أوراق الخس المصابة ويزال العرق الوسطي منها بمقص معقم وتوضع في خلاط كهربائي بإضافة 300 مل من المحلول المنظم الفوسفاتي KH_2PO_4 بتركيز 0,5 مولر ودالة حامضية 7,5 بمقدار ضعف ونصف وزن الأوراق؛

2. تسحق الأوراق على القوة القصوى في الخلاط الكهربائي لمدة دقيقتين ويؤخذ العصير ويرشح عبر طبقة من قماش الشاش في بيكر معقم ويضاف إليه حامض الثايوجلايكولك Thioglycolic acid أو كبريتيت الصوديوم Sodium sulfite كمادة مانعة للتأكسد بتركيز 0,1 %؛

3. يوضع البيكر في حمام ثلجي ويضاف إليه المذيب العضوي البيوتانول n-butanol بتركيز 8,5% ويمزج لمدة نصف دقيقة بقضيب زجاجي؛

4. يوزع العصير في أنابيب الانتباذ ويعرّض إلى انتباذ واطئ على سرعة 8000 دورة /دقيقة لمدة 30 دقيقة ويؤخذ الرائق من كل الأنابيب ويجمع في بيكر، ويهمل الراسب الذي يضم المواد النباتية؛

5. يوزع المحلول الرائق في أنابيب انتباذ جديدة ويعرّض إلى انتباذ عالي على سرعة 30000 دورة /دقيقة لمدة ساعة وبدرجة حرارة 4م باستعمال الدوار ثابت الزاوية وجهاز انتباذ مبرّد، ويؤخذ الراسب الذي يحوي الجسيمات الفايروسية، ويهمل الرائق؛

6. يذاب الراسب في كل أنبوبة انتباذ بإضافة عدة ملليترات من المحلول المنظم المستعمل وبمساعدة قضيب زجاجي معقم وتجمع المحاليل في بيكر؛

7. يوزع المحلول الذي جمع في الخطوة السابقة، في أنابيب إنتباذ ويعرّض إلى انتباذ واطئ على سرعة 10000 دورة /دقيقة لمدة 30 دقيقة ويؤخذ الرائق من كل الأنابيب ويجمع في بيكر معقم وهو المحلول الفايروسي النقي، ويهمل الراسب إن وجد؛

8. يوضع المحلول النقي في قنينة زجاجية معقمة محكمة القفل وتخزن في المجمدة.

2.3.3.5. التنقية بالانتباذ والمرسبات والديلزة

هي من الطرق الشائعة لتنقية الفايروسات وهي تحوير للطريقة السابقة حيث تضاف المادة المرسبة إلى المحلول الفايروسي بعد انتهاء دورة الانتباذ الواطئ لتسهيل ترسيب الجسيمات الفايروسية في حالة عدم توفر أجهزة انتباذ عالية السرعة، حيث أنه عند استعمال المرسبات فانه يكفي الانتباذ عند سرعة 15 – 20 ألف دورة/دقيقة لمدة ساعة عند درجة حرارة 4مْ. من أهم المرسبات المستعملة هما مركب كبريتات الامونيوم Ammonium sulphate أو مركب الكلايكول متعدد الايثيلين , Polyethylene glycol PEG، وقد شاع إستعمال الأول لترسيب البروتينات بكل أنواعها، ولان الفايروسات النباتية يتكون غالب كتلتها من الغطاء ألبروتيني لذا أصبحت هذه المادة مناسبة لترسيب الفايروسات من محاليلها وهي تضاف إلى المحلول بنسبة تصل إلى 25% أو بمقدار ربع – نصف حد التشبع (حد التشبع هو 53غم من كبريتات الامونيوم في 100مل من المحلول). وتستعمل مادة الكلايكول متعدد الايثيلين بتركيز 4% في المحلول عادة لترسيب الفايروسات في محاليلها وذلك نتيجة امتصاصها للسائل المحيط بجسيمات الفايروس، وقد يتغير التركيز حسب نوع الفايروس، وإذا ما أضيفت بتركيز عالي فإنها تسبب ترسيب المواد النباتية الأصغر حجما من الفايروسات، وعموما فان الفايروسات الصغيرة الحجم تحتاج إلى تركيز عالي نسبيا من هذه المادة. إن استعمال إحدى هاتين المادتين سيؤدي إلى ترسيب الفايروس في قعر أنبوبة الانتباذ الذي تعاد إذابته في كمية قليلة من محلول منظم مناسب بعد سكب الرائق، ويتم التخلص من كبريتات الامونيوم أو الجلايكول متعدد الايثيلين من المحلول الفايروسي بواسطة عملية الديلزة.

(أ). عملية الديلزّة (الفصل الغشائي)

الديلزّة Dialysis والتي يطلق عليها أيضا الانتشار المقيّد، هي طريقة لفصل الجزيئات الكبيرة عن الصغيرة عند وجودهما ممزوجتين معا في المحلول وذلك باستعمال غشاء شبه منفذ Semipermable membrane، وأكثر الأغشية استعمالا هي السليلوز المشمع Viscose cellulose والسيلوفان Cellophane، وعادة ما تصنع الشركات المنتجة هذه الأغشية بشكل لفافة من شريط بعرض 3سم حيث يقص بالطول المناسب حسب رغبة الباحث. وتتم الديلزة بالطريقة التالية

الطريقة (57) : الفصل الغشائي (الديلزة)

1. يغمر كيس الديلزة بعد قصه بطول مناسب (10سم مثلا) في كمية من الماء المقطر لمدة ساعتين للتخلص من آثار المركبات الكبريتية والمواد الأخرى التي علقت به عند التصنيع، أو غليه في الماء المقطر المضاف إليه مركب الإيثيلين ثنائي الأمين رباعي الخلات EDTA بتركيز 1ملمول/لتر مضافا إليه 10غم كربونات الصوديوم لمدة 30 دقيقة ثم يغسل بالماء المقطر؛
2. تعقد إحدى نهايتي الكيس بواسطة خيط بإحكام ويملأ بالمحلول الفايروسي ثم تعقد نهايته الثانية بإحكام بنفس الطريقة؛
3. يغمر الكيس في كمية مناسبة من الماء المقطر (250مل أو أكثر) في بيكر يوضع على سطح جهاز الرجاج المغناطيسي Magnetic stirrer ويشغل لتدوير الكيس في البيكر لمدة 24ساعة في درجة 4مْ ، (الشكل 5-3)؛
4. يستبدل ماء البيكر بآخر جديد بعد 12ساعة من بدء العملية، وبذلك ستعبر الجزيئات النباتية الملوثة للمحلول الفايروسي وكذلك جزيئات مادة الترسيب المنخفضة الوزن الجزيئي عبر الغشاء بسبب صغر حجمها الجزيئي بينما لن تعبر الجسيمات الفايروسية بسبب وزنها الجزيئي العالي نسبيا حيث أن الغشاء منفذ للجزيئات التي يصل وزنها الجزيئي إلى 30000 دالتون أو أدنى من ذلك إذا ديلزت ليوم كامل ولكن قد تعبر جزيئات أكبر إذا طالت مدة الديلزة؛
5. يترك كيس الديلزة معلقا بعد إنتهاء العملية لمدة نصف ساعة في مكان تتوفر تهوية جيدة وبدرجة حرارة المختبر وفي الظل ثم يفرّغ المحلول الفايروسي النقي من الكيس إلى بيكر معقم؛
6. يوضع المحلول النقي في قنينة زجاجية معقمة محكمة القفل وتخزن في المجمدة.

تنويه : (1) يفضل استعمال الغشاء لمرة واحدة فقط وإذا كانت هناك ضرورة لاستعماله ثانية يجفف ويعفّر بالقليل من حامض البنزويك تجنبا لتلوثه بالفطريات أو البكتريا الرمية ثم يخزّن (2) تتم عملية الديلزة عادة بكفاءة عالية عند رفع درجة الحرارة وصولا إلى 30مْ إلا أنه وبسبب تأثر الفايروسات بالحرارة

العالية لذلك تجرى الديلزة عند درجة 4م أو أعلى بقليل مع إطالة فترة الديلزة ويمكن تأمين هذه الدرجة بوضع البيكر الحاوي على كيس الديلزة في حمام ثلجي (ثلج مبروش) ووضعهما معا على سطح الرجّاج المغناطيسي.

الشكل (5-3) : طريقة الفصل الغشائي (الديلزة).

الطريقة (58) : تنقية فايروس موزائيك البنجر(BeMV) بطريقة الانتباذ التناوبي والكلايكول متعدد الايثيلين (PEG).

1. يؤخذ 200غم من أوراق البنجر المصابة ويزال العرق الوسطي منها بمقص معقم وتوضع في خلاط كهربائي بإضافة 300 مل من المحلول المنظم الفوسفاتي KH_2PO_4 بتركيز 0,5 مولر ودالة حامضية 7,5، بمقدار ضعف ونصف وزن الأوراق؛

2. تسحق الأوراق على القوة القصوى في الخلاط الكهربائي لمدة دقيقتين ويؤخذ العصير ويرشح عبر طبقتين من قماش الشاش في بيكر معقم ويضاف إليه حامض الاسكوربيك بتركيز 1% أو السستين Cystein بتركيز 0,01 كمادة مختزلة، وإضافة محلول المركب EDTA المحضر مسبقا بتركيز 0,007مولر وبتركيز نهائي في العصير 1%؛

3. يوزع العصير في أنابيب الانتباذ ويعرّض إلى انتباذ واطئ بسرعة 5000 دورة/دقيقة لمدة 20 دقيقة ويؤخذ الرائق الذي يجمع في بيكر معقم؛

4. يضاف إلى الرائق محلول الكلايكول متعدد الايثيلين المحضر مسبقا بتركيز 40% وبمقدار جزء من هذا المحلول لثلاثة أجزاء من الرائق، ويترك المزيج في حمام ثلجي لمدة نصف ساعة؛

5. يوزع المزيج في أنابيب الانتباذ ويعرّض إلى انتباذ واطئ بسرعة 8000 دورة/دقيقة لمدة 20 دقيقة ويؤخذ الراسب ويهمل الرائق؛

6. يذاب الراسب في كل أنبوبة انتباذ بإضافة عدة ملليترات من المحلول المنظم المستعمل وبمساعدة قضيب زجاجي معقم وتجمع المحاليل في بيكر، وإذا تعسّرت الإذابة يمكن الاستعانة بالرجاج المغناطيسي لرج المزيج لمدة ساعة بوضع البيكر في حمام ثلجي؛

7. يوزع المحلول في أنابيب الانتباذ ويعرّض إلى انتباذ واطئ بسرعة 4000 دورة/دقيقة لمدة 20 دقيقة ويؤخذ الرائق الذي يجمع في بيكر في حمام ثلجي؛

8. يوزع المحلول الرائق في أنابيب الانتباذ ويعرّض إلى انتباذ عالي بسرعة 30000 دورة/دقيقة لمدة 90 دقيقة ويؤخذ الراسب بعد رمي الرائق الذي يذاب كما في الخطوة (6) أعلاه وهو المحلول الفايروسي النقي الذي يوضع في قنينة زجاجية معقمة محكمة القفل وتخزن في المجمدة.

3.3.3.5. التنقية بالانتباذ بمحاليل متدرجة الكثافة

تستعمل تقانة التنقية بالانتباذ بمحاليل متدرجة الكثافة Density gradient centrifugation بشكل واسع لتنقية الفايروسات وخصوصا الفايروسات العصوية التي إذا ما تمت تنقيتها بطريقة الانتباذ التناوبي لوحدها فإنها تكون رواسب كتلية من الصعب إذابتها، لذلك تستعمل محاليل متدرجة الكثافة لفصل جزيئات المحلول الفايروسي حسب كثافتها وبذلك سيتم فصل الجسيمات الفايروسية عن بقية الملوثات النباتية في طبقات المحلول متدرج الكثافة وكما سيوضح ذلك لاحقا. عليه فان هذه الطريقة تعد عادة طريقة مكملة وضرورية لطريقة الانتباذ التناوبي لضمان الحصول على فايروس نقي. تستعمل في هذه التقانة محاليل خاملة غير مؤثرة على فعالية الفايروسات، وأكثرها استعمالا هي محاليل السكروز وكلوريد السيزيوم Cesium chloride ورمزه الكيماوي CsCl وكبريتات السيزيوم ورمزها الكيماوي $CsSO_4$ وبروميد البوتاسيوم Potassium bromide وكلوريد الريبيديوم Rubidium chloride ، وجميع هذه المحاليل باستثناء السكروز هي محاليل لا عضوية تستعمل بتركيز 6–9 مولر.

الطريقة (59) : تنقية الفايروسات بطريقة الانتباذ بمحلول السكروز متدرج الكثافة

(أ). تحضير محلول السكروز متدرج الكثافة.

1. تحضر أربعة تراكيز من السكروز النقي وهي 10 و20 و30 و40 % في المحلول المنظم الفوسفاتي تركيز 0,01 مولر ودالة حامضية 7,5 وبمقدار 10مل لكل تركيز كل منها في بيكر معقم؛

2. يسحب 5 مل من التركيز 40% بواسطة ماصة معقمة وتوضع في أنبوبة الانتباذ؛

3. يسحب 5 مل من التركيز 30% بواسطة الماصة وتضاف بهدوء على حافة أنبوبة الانتباذ فوق التركيز السابق؛

4. يكرر الإجراء ذاته كما في أعلاه مع التركيز 20 ثم 10% ثم يضاف 5 مل من المحلول المنظم الفوسفاتي فوق آخر تركيز، وبذلك ستتكون في الأنبوبة طبقات السكروز متدرجة الكثافة وكما مبين في الشكل (5–4، أ).

تنويه : (1) إذا كانت أنابيب الانتباذ المتاحة صغيرة الحجم يمكن تغيير حجم تراكيز السكروز بما يتناسب مع حجم تلك الأنبوبة ولكن بشرط تماثل حجمها أي يوضع مثلا" مللتر واحد من كل تركيز في الأنبوبة، (2) في حالة استعمال المحاليل الأخرى متدرجة الكثافة المذكورة أعلاه عندها لا داعي لعمل الطبقات متدرجة الكثافة كما في السكروز بل يضاف محلول المادة إلى أنبوبة الانتباذ بالكمية المناسبة ثم يحرك داخل الأنبوبة بواسطة سلك نابضي مصنوع من النيكل ألكرومي Nickel chrome spiral wire بقطر 0,8ملم، (الشكل5–4، ب)، تترك الأنبوبة ليستقر المحلول فيها لمدة ساعة بعدها تتشكل طبقات المحلول ذاتيا حسب تدرجها الكثافي.

(ب). طريقة التنقية.

1. يعرض العصير المصفى إلى انتباذ واطئ بسرعة 10000 دورة/دقيقة لمدة نصف ساعة ويؤخذ الرائق؛

2. يعرض الرائق فورا إلى انتباذ عالي عند 40000 دورة/دقيقة لمدة ساعتين (يمكن تغيير سرعة ومدة الانتباذ حسب نوع الفايروس) حيث تترسب الجسيمات الفايروسية عند قوة الانتباذ العالية هذه وتفصل عن الرائق الذي يسكب ويتخلص منه؛

3. يذاب الراسب الفايروسي بإضافة قطرات من محلول منظم مناسب ليتم الحصول على محلول فايروسي شبه نقي لاحتمال وجود ملوثات نباتية بقدر حجم الجسيمات الفايروسية أو أصغر منها؛

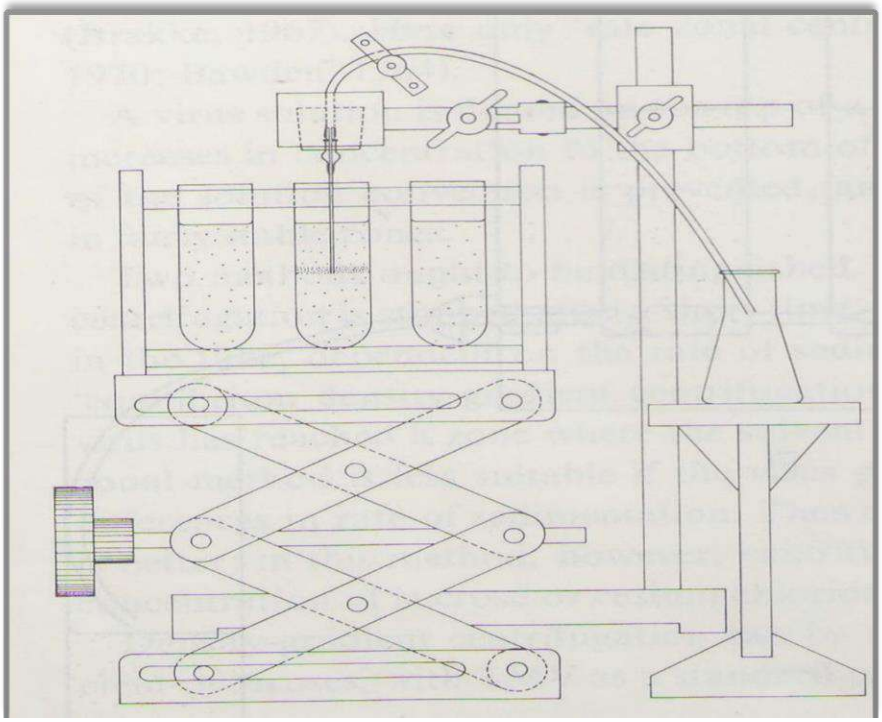
4. يضاف المحلول الفايروسي إلى أنابيب الانتباذ الحاوية على تراكيز السكروز بواسطة ماصة معقمة وبحذر على الجانب الداخلي للأنبوبة وبمقدار يماثل حجم كل تركيز، وينفذ الانتباذ باستعمال الدوار ذو الجيوب المتأرجحة Swing-out rotor، (الشكل 5-6، ب)؛

5. تعرّض الأنابيب إلى انتباذ عالي بقوة انتباذ 70000-170000 Xg لمدة تمتد من 3 ساعات لغاية 24 ساعة وحسب نوع الفايروس؛

6. تخرج الأنابيب بشكل عمودي من الدوار بحذر شديد وتجنب رجها لمنع اختلاط الطبقات وتوضع في حامل الأنابيب، ثم تعرّض كل أنبوبة إلى مصدر ضوئي بوضعها أمام مصباح كهربائي عادي حيث يظهر تلألؤ في إحدى طبقات المحلول مما يدل على وجود الجسيمات الفايروسية فيها وعدم ظهوره في بقية الطبقات التي تحوي الملوثات النباتية التي فصلت عن الفايروس؛

7. تسحب طبقات المحلول كل على إنفراد من أنابيب الانتباذ ويحتفظ فقط بالطبقة التي تحوي الفايروس النقي، ويتم ذلك إما بثقب الأنبوبة إن كانت بلاستيكية بإبرة دقيقة بواسطة جهاز تثقيب خاص حيث يبدأ المحلول بالنزول بقطرات متتابعة ويتم جمعه حسب تسلسل الطبقات بحيث يجمع محلول كل طبقة في بيكر صغير على إنفراد وذلك إعتمادا على الحجم المعروف لكل طبقة والتي سيكون المحلول الفايروسي النقي في إحداها. كما يمكن الحصول على محاليل الطبقات كل على إنفراد من كل أنبوبة إنتباذ بواسطة جهاز السيفون المبين في الشكل (5-5).

الشكل (5-4) : (أ) شكل توضيحي لطبقات السكروز متدرجة الكثافة في انبوبة الإنتباذ
(ب) السلك النابضي المصنوع من النيكل الكرومي المستعمل لمزج المحلول متدرج الكثافة.



الشكل (5–5) : جهاز السيفون لسحب المحاليل متدرجة الكثافة من أنبوبة الانتباذ.

الشكل مقتبس من Noordam (1973).

4.3.3.5. التنقية بواسطة الترشيح الهلامي.

هي طريقة لتنقية الفايروسات اعتمادا على اختلاف حجوم مكونات العصير المصفى وذلك باستعمال أعمدة فصل هلامية تعمل بشكل مناخل جزيئية Molecular sieves تفصل المواد بدءا من الوزن الجزيئي 200 دالتون إلى الوزن الجزيئي العالي 150 مليون دالتون، علما أن فايروسات النبات يكون وزنها الجزيئي قريبا من الحد الأعلى المذكور. وأهم أنواع الهلامات المستعملة في أعمدة الفصل هي الاكاروز Agarose وهو الاكار عالي النقاوة والمسمى أيضا Bio-Gel A والذي يحضر بنسبة تتباين بين 3–15% في المحلول المنظم الفوسفاتي تركيز 0,05مولر ودالة حامضية 7,3 وحسب نوع الفايروس، إذ تتناسب حجم ثقوب هلام الاجاروز عكسيا مع تركيزه فكلما انخفض التركيز زاد حجم الثقوب، وبالتالي يستعمل التركيز الأدنى مع الفايروسات العصوية الأكبر حجما من الفايروسات البلورية والعكس صحيح. من الهلامات المستعملة أيضا مادة السيفادكس Sephadex وتسمى أيضا الدكسترين Dextrin وهي عبارة عن سكريات معقدة تنتجها طبيعيا أنواع من البكتريا وتسمى أيضا Bio-Gel والتي تنتج بإحجام حبيبات متباينة ولكن أكثرها استعمالا لتنقية الفايروسات هي الحبيبات بحجم

(Grade) 150−200مش. يستعمل أيضا هلام الاكريل أمايد المتعدد (Polyacrylamide gel) والمسمى أيضا Bio-Gel P والمتوفر تجاريا بشكل حبيبات.

الطريقة (60) : تنقية فايروس التفاف أوراق الفاصوليا (BLRV) بطريقة الترشيح الهلامي

1. يؤخذ 200غم من أوراق النبات المصاب بالفايروس وتوضع في خلاط كهربائي بإضافة 300 مل من المحلول المنظم الفوسفاتي KH_2PO_4 بتركيز 0,5 مولر ودالة حامضية 7,5، بمقدار ضعف ونصف وزن الأوراق؛

2. تسحق الأوراق على القوة القصوى في الخلاط الكهربائي لمدة دقيقتين ويؤخذ العصير ويرشح عبر طبقتين من قماش الشاش في بيكر معقم ويضاف إليه حامض الاسكوربيك بتركيز 1% أو السستين Cystein بتركيز 0,01 كمادة مختزلة، وإضافة محلول المركب EDTA المحضر مسبقا بتركيز 0,007مولر وبتركيز نهائي في العصير 1%؛

3. يصفّى العصير بواسطة هلام فوسفات الكالسيوم Calcium phosphate gel ورمزه الكيماوي $Ca_5OH(PO_4)_3$ والذي يسمى ايضا Hydroxyapatite بإضافة 0,8مل منه /غم من وزن الأوراق الأصلي ويمزج مع العصير بالاستعانة بالرجّاج المغناطيسي لعدة دقائق؛

4. يوزع المزيج في أنابيب الانتباذ ويعرض إلى انتباذ واطئ بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 20 دقيقة عند 4مْ ويؤخذ الرائق الأصفر اللون؛

5. يضاف الرائق بمقدار 50مل بهدوء إلى الفوهة العليا للعمود بسكبه بهدوء على الحافة الداخلية لعمود زجاجي بطول 60سم وقطر 2,5سم معبأ بمادة السيفادكس Sephadex G 150، مع ضرورة ضبط معدل تدفق المحلول Flow rate من العمود وليكن مثلا 5مل /7دقائق، أو أي معدل دفق يتم ضبطه من قبل الباحث والذي يجب أن لا يتغير خلال مدة الترشيح؛

6. تفتح حنفية العمود ويتم جمع أجزاء الراشح بمقدار 5مل لكل جزء باستعمال سلندر حجم 10مل يوضع تحت حنفية العمود ويسحب حال جمع 5مل من الراشح ثم يستبدل فورا بسلندر آخر لحين انتهاء الراشح؛

7. تنقل محتويات كل سلندر إلى قناني زجاجية معقمة والتي سيكون عددها 10 قناني (لإن كل قنينة تحوي خمس ملليترات من الراشح والكمية الكلية التي رشحت هي 50 مل، وسيكون الفايروس موجود حتما في واحدة أو أثنتين من هذه القناني مفصولا عن بقية الملوثات التي ستتوزع في القناني الأخرى؛

8. تفحص محتويات كل قنينة للتأكد من وجود الفايروس في إحداها وذلك بإخضاع المحلول إلى اختبارات النقاوة التي ستذكر لاحقا.

الطريقة (61) : تحضير هلام فوسفات الكالسيوم

1. يضاف لتر من محلول فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين Na_2HPO_4 تركيز 0,1 مولر إلى كغم واحد من مسحوق كلوريد الكالسيوم ويمزجان جيدا لإتمام الإذابة؛

2. يترك المزيج لحين تكون راسب ابيض قطني المظهر بعد 4–6ساعات من الإضافة؛

3. يؤخذ الراسب ويغسل بالماء المقطر لعدة مرات لإزالة الأملاح الذائبة منه؛

4. يعرّض الراسب الممزوج بالماء المقطر بعد آخر غسلة إلى انتباذ واطئ بسرعة 1000دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق فيتكون راسب لين زبدي القوام ابيض عالي المحتوى المائي (97%)؛

5. يحفظ الراسب في قنينة زجاجية معقمة تحوي ماء مقطر معقم يزيد قليلا عن كمية الهلام لمنع جفافه لحين الاستعمال.

الطريقة (62) : تحضير عمود السيفادكس

1. يتم تنشيط حبيبات السيفادكس بغسلها عدة مرات بالماء المقطر؛

2. بعد الغسلة الأخيرة يسكب وهو ممزوج بالماء المقطر بهدوء في أنبوب زجاجي بقطر 2–2,5سم بحيث تكون الإضافة على الجدار الداخلي للأنبوب وذلك بعد وضع قطعة صغيرة من الصوف الزجاجي في قاع العمود لمنع خروج حبيبات السيفادكس؛

3. بعد الانتهاء من سكب المزيج واستقرار الهلام في العمود يغسل ثلاث مرات بالمحلول المنظم الفوسفاتي تركيز 0,5 مولر ودالة حامضية 7,8 وبمقدار يساوي مرة ونصف حجم الهلام الموجود في العمود حيث يسكب المحلول المنظم من الفوهة العليا بهدوء شديد على حافة الجدار الداخلي ويستقبل كاملا من أسفل العمود بفتح صنبور العمود؛

4. بعد انتهاء الغسلة الأخيرة وضبط مقدار معدل التدفق للعمود، يقفل صنبور العمود والذي يملأ بالمحلول المنظم أو بالماء المقطر المعقم بحيث يكون مستوى الماء قليلا فوق سطح الهلام وذلك لمنع جفاف الهلام؛

5. تقفل فوهة العمود العلوية بقطعة من ورق الألمنيوم لحين الاستعمال.

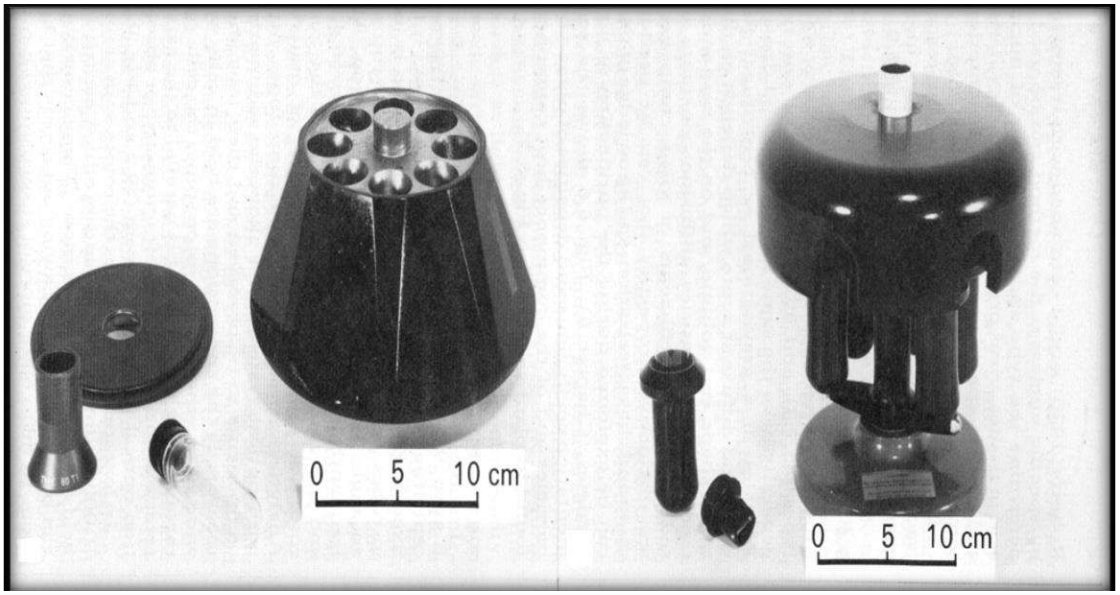
4.5. أنواع أجهزة الانتباذ والرؤوس الدوارة المستعملة.

يوجد نوعين رئيسيين من أجهزة الانتباذ المستعملة في تنقية الفايروسات وعلى تنوع نماذجها حسب الشركات المصنعة وهما : (1) أجهزة الانتباذ الفائق السرعة Ultracentrifuges or High speed centrifuges وهي أجهزة توفر قوة انتباذ عالية السرعة تزيد عن 25 ألف دورة/دقيقة وتصل إلى 40الف دورة/دقيقة أو أكثر، وتزود هذه الأجهزة بنظام تبريد يوفر درجة حرارة بحدود 4مْ في حجرة

الدوران مع نظام تفريغ للهواء فيها وذلك لمنع زيادة درجة الحرارة بسبب احتكاك الدوار مع الهواء الموجود في الحجرة أثناء الدوران السريع مما قد يسبب تلفا للفايروس (2) أجهزة الانتباذ الواطئ Low speed centrifuges وأغلبها منضدية وتصل سرعتها القصوى إلى 10000 دورة/دقيقة ولا تزود عادة بنظام تبريد.

أما الرأس الدوار Rotor فهو الذي توضع فيه أنابيب الانتباذ والذي يصنع من سبيكة خاصة عالية الصلابة هي Dura alumina alloy ، توجد الرؤوس الدوارة على نوعين رئيسيين وهما : (1) الرأس الدوار ثابت الزاوية Fixed angle rotor الشكل (5–6، أ) حيث تصنع جيوب الأنابيب داخل جسم الدوار بشكل فجوات زوجية العدد بزاوية ثابتة مع محور الدوران (2) الدوار ذو الجيوب المتأرجحة Swing bucket rotor or Swing-out rotor الشكل (5–6، ب) حيث تكون جيوب الأنابيب بشكل اسطوانات حرة الحركة معلقة على محور أفقي مرتبط بجسم الدوار وتصبح بزاوية قائمة مع محور الدوران عند عمل الجهاز.

تنويه : من الضروري عند تشغيل جهاز الانتباذ أن تكون كمية المحلول في أنابيب الانتباذ الموضوعة في الرأس الدوار متساوية في الحجم والوزن تماما وأن توضع الأنابيب في الحفر المتقابلة إن لم تستعمل كل حفر الدوار ثابت الزاوية. وتحسبا لوجود الاختلافات الطفيفة في وزن المحاليل في الأنابيب فان الشركات المصنعة تصمم محور الدوران الذي يجلس عليه الرأس الدوار ليكون مرن الحركة Flexible shaft.



الشكل (5–6) : الدوارات المستعملة في أجهزة الانتباذ. (أ). الدوار ثابت الزاوية Fixed angle rotor (الصورة اليمنى) (ب). الدوار ذو الجيوب المتأرجحة Swing-out rotor (الصورة اليسرى).

الشكل مقتبس من Gibbs وHarrison (1981).

5.5. وحدات قياس قوة الانتباذ

يوجد نوعين من وحدات قياس سرعة أو قوة الانتباذ وكلاتهما استعملت في هذا الكتاب، حيث تستعمل الوحدة "دورة /دقيقة" Revolution Per Minute , rpm للدلالة على سرعة الانتباذ، ولكن هذه الوحدة لا تكون دقيقة إلا إذا ذكر معها قطر أو نصف قطر الدوار المستعمل وذلك لأن عدد دورات الدوار تتباين بتباين قطره. أما الوحدة الأخرى والأكثر دقة لقياس سرعة الدوران أو قوة الانتباذ فهي قوة الجاذبية gravity force ورمزها Xg ويصطلح عليها أيضا قوة الانتباذ النسبية Relative centrifugal force RCF .

تستعمل المعادلة التالية لتحويل الوحدة rpm إلى الوحدة Xg

$$Xg = 1.11 \times 10^{-5} \times rpm^2 \times r$$

r= قطر الدوار

فيما تستعمل المعادلة الآتية لتحويل الوحدة Xg إلى الوحدة rpm

$$Xg = Sr^2 / 895000$$

S= دورة/دقيقة ، r = قطر الدوار

6.5. تقييم نقاوة المحلول الفايروسي النقي

لغرض تقييم نتائج تنقية الفايروسات بغض النظر عن طريقة التنقية المستعملة، فانه تجرى على المحلول الفايروسي الناتج من التنقية مجموعة اختبارات للتأكد من نقاوته وفاعليته واجتيازه لمراحل التنقية بنجاح من دون إتلافه، وتشمل هذه الاختبارات ما يأتي :

1.6.5.الاختبار الحيوي

تستعمل نباتات كاشفة حساسة للفايروس ويفضل تلك التي تستجيب موضعيا بهيئة بقع موضعية مصفرة أو ميتة، وذلك بتلقيح أوراقها بجزء من المحلول الفايروسي النقي ثم يحسب معدل عدد البقع /ورقة ويتم مقارنة ذلك مع معدلها في أوراق المقارنة التي تلقح بالعصير الخام غير المنقى للنبات المصاب بالفايروس، فإذا كان معدل عدد البقع على الأوراق الملقحة بالمحلول الفايروسي النقي أعلى من معدلها على الأوراق الملقحة بالعصير الخام غير المنقى فهذا دليل على نجاح التنقية وأن الجسيمات الفايروسية عالية التركيز في المحلول النقي وبكامل فعاليتها، أما إذا كان معدل عدد البقع أقل من المقارنة فيدل ذلك على قلة كفاءة طريقة التنقية المستعملة وأن بعض خطواتها سببت تلفا كبيرا للجسيمات الفايروسية، كما أن عدم ظهور البقع يدل على تلف الفايروس بالكامل خلال التنقية وأن الطريقة المستعملة فاشلة. إن الاختبار الحيوي هو مناسب للفايروسات المنقولة ميكانيكيا حصرا.

2.6.5. الاختبار المصلي

يختبر جزء من المحلول الفايروسي النقي مصليا بأي اختبار مصلي متوفر ويفضل استعمال اختبار الاليزا (أنظر الفقرة 4.2.7.الفصل السابع)، وهو اختبار سريع يدل على وجود الفايروس في المحلول النقي، إلا أنه لا يميز إن كان الفايروس فعالا أو غير فعال فاقدا لقدرته المعدية بسبب تعرضه لإجهاد التنقية وذلك لأن المصل المضاد يتفاعل مصليا حتى مع الجسيمات الفايروسية التالفة.

3.6.5. الاختبار الطيفي (السبكترومتري)

هو أحد أهم اختبارات النقاوة ويجرى باستعمال جهاز المطياف Spectrophotometer حيث يفحص المحلول الفايروسي طيفيا عند مدى من الأطوال الموجية للاشعة فوق البنفسجية يبدأ من 200–300 نانومتر. تعطي نتائج هذا الاختبار دليلا على وجود الفايروس نقيا في المحلول مع بيان مقدار نقاوته وتركيزه في أنسجة النبات، ويتم ذلك كما يأتي :

الطريقة (63) : الاختبار الطيفي لفايروس نباتي واستخراج قيمة نقاوته وتركيزه في النبات

1. يتم تصفير جهاز المطياف بوضع كمية من المحلول المنظم الذي استعمل لإذابة الفايروس في آخر مرحلة من التنقية في زجاجة المطياف المتعامدة Cuvette وقراءة امتصاصيته للاشعة عند الطول الموجي 250 نانومتر وتلغى هذه القراءة من الجهاز؛
2. يوضع المحلول الفايروسي النقي في زجاجة المطياف وتبدأ قراءة امتصاصيته للأشعة بدءا من الطول الموجي 200 لغاية 300 نانومتر بفاصلة 5 أو 10 نانومتر حسب رغبة الباحث؛
3. تسجل قراءات الامتصاصية التي تم الحصول عليها لكل طول موجي ويرسم بدلالتها منحنى الامتصاصية المبين في الشكل (5–7) الذي استعملت فيه قيما إفتراضية لإمتصاصية المحلول عند الأطوال الموجية المستعملة والمبينة في الجدول (5–2)، حيث تسقط قيم الامتصاصية على المحور العمودي (الصادي) وقيم الطول الموجي على المحور السيني.

الجدول (5–2) : القيم الافتراضية لامتصاصية المحلول الفايروسي النقي للأشعة فوق البنفسجية المستعملة لرسم منحنى الامتصاصية في الشكل (5–7).

الطول الموجي (نانومتر)	قيم الامتصاصية	الطول الموجي (نانومتر)	قيم الامتصاصية
200	0,2	260	2,2
210	0,4	270	2,1
220	0,6	280	1,8

1,2	290	0,8	230
0,8	300	1,4	240

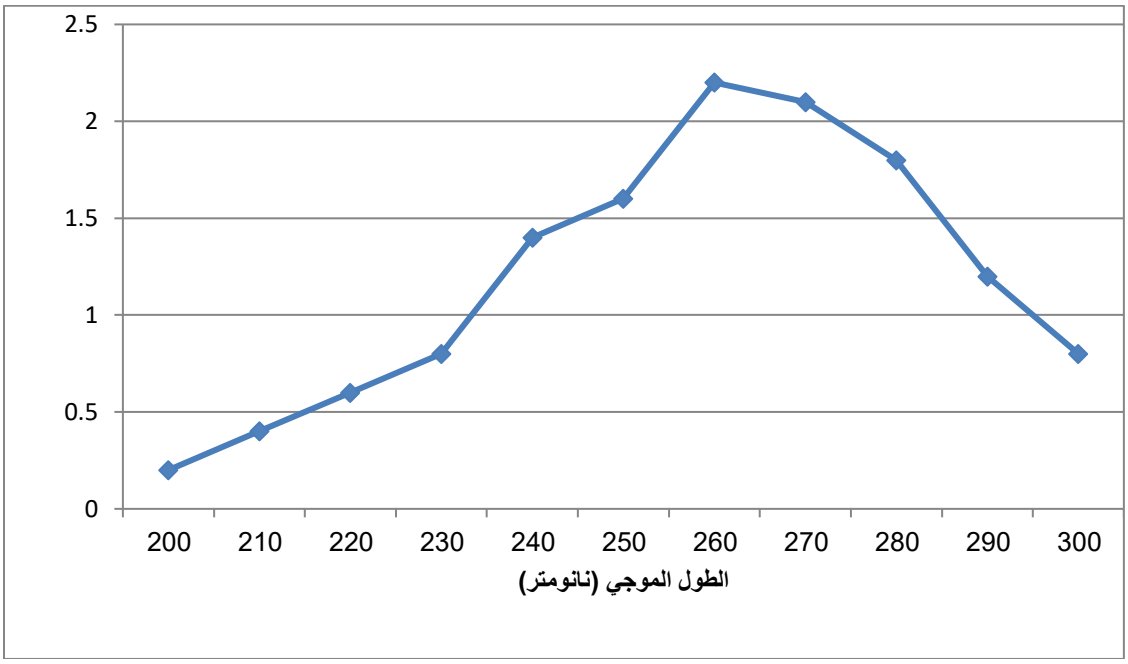
تحسب نقاوة الفايروس وفق المعادلة التالية :

نقاوة الفايروس = قيمة الامتصاص عند الطول الموجي 260 نانومتر للمحلول الفايروسي النقي \ قيمة الامتصاص عند 280 نانومتر.

وستكون تلك القيمة وفق ارقام الإمتصاصية المفترضة هي : 1,6 \ 1,0= 1,6 ، وهذه القيمة هي مجردة لا توجد لها وحدة قياس وتتراوح عادة مع أغلب فايروسات النبات بين 1,8 – 2 وتزداد كلما زادت نسبة الحامض النووي إلى البروتين كما في الفايروسات البلورية.

4. تحسب قيمة تركيز الفايروس في النسيج النباتي بدلالة قيم الامتصاص المستحصلة وذلك وفق الطريقة المبينة في الطريقة (45).

يبين الجدولين (5–3 و 5–4) قيم النقاوة ومعامل الإنطفاء لعدد من أنواع الفايروسات النباتية.



الشكل (5–7) : منحنى الامتصاصية لفايروس نباتي نقي يبين الذروة الامتصاصية للأشعة فوق البنفسجية عند الطول الموجي 260 نانومتر.

الجدول (5–3) : قيم النقاوة لعدد من أنواع فايروسات النبات

نوع الفايروس	نسبة الامتصاصية 260/280 Ratio	شكل الفايروس وأبعاده
فايروس موزائيك البروم Brome mosaic virus	1,7	بلوري ، 25 نانومتر
فايروس موزائيك السوسن الزغبي Iris fulva mosaic virus	1,19	عصوي مرن ، 770 نانومتر
فايروس موزائيك الخيار Cucumber mosaic virus	1,65	بلوري ، 30 نانومتر
فايروس البطاطا أكس Potato virus X	1,2	عصوي ، 515 نانومتر
فايروس التبقع الحلقي للرازبري Raspberry ring spot virus	1,62	بلوري ، 30 نانومتر

الجدول (5–4) : معامل إنطفاء عدد من أنواع فايروسات النبات وعلاقته بالنسبة المئوية لمحتوى الجسيمة من الحامض النووي

نوع الفايروس	قيمة معامل الانطفاء $E^{0.1\%}$	النسبة المئوية لمحتوى الفايروس من الحامض النووي الرايبي (RNA)
فايروس موزائيك التبغ Tobacco mosaic virus	3,1	5
فايروس خشخشة التبغ Tobacco rattle virus	3	5
فايروس البطاطا واي Potato virus Y	2,8	5,4
فايروس البطاطا أكس	2,97	6

Potato virus X		
فايروس موزائيك الخيار Cucumber mosaic virus	5	18
فايروس موت التبغ Tobacco necrosis virus	5,6	18,7
فايروس التبقع الحلقي للقرنفل Carnation ring spot virus	6,46	20,5
فايروس التبقع الحلقي للتبغ Tobacco ring spot virus	12,8	42

4.6.5. الاختبارات الضوئية

هي اختبارات ضوئية بسيطة ولكنها تعطي أدلة على نقاوة المحلول الفايروسي وهي تعتمد اختلاف الصفات الضوئية بينه وبين العصير الخام، وتشمل الاختبارات التالية :

1.4.6.5. اختبار تطاير الضوء

يعتمد هذا الإختبار على تطاير الضوء Light scattering الذي تسببه الجسيمات الفايروسية حيث يظهر المحلول الفايروسي تلألؤا" Opalescence أو تعكرا" Turbidity عند وضعه في أنبوبة اختبار زجاجية نظيفة والنظر إليه بوضع الأنبوبة أمام مصباح كهربائي عادي، فإذا أظهر المحلول تعكرا فهذا دليل على احتوائه على جسيمات فايروسية تزيد أطوالها عن 500 نانومتر.

2.4.6.5. إختبار الومض عند التعرض لضوء مستقطب

عند تعريض أنبوبة الاختبار الحاوية على المحلول الفايروسي النقي إلى مسار ضوء مستقطب فانه يعطي وميضا Shimmer وذلك بسبب تدوير الضوء عند مروره في المحلول، وهي ظاهرة أكثر وضوحا مع الفايروسات العصوية لأنها تصطف بشكل حزم مما يؤدي إلى تدوير الضوء المستقطب.

7.5. قياس الوزن الجاف للفايروسات

هي طريقة عامة تناسب أي فايروس بعد تنقيته حيث يجفف المحلول الفايروسي النقي لغرض حساب الوزن الجاف للفايروس في العينة. ويستعمل المسحوق الفايروسي النقي الجاف لحساب معامل انطفاء الفايروس وللحصول على قراءات دقيقة لقيم الامتصاصية لذلك الفايروس. ولغرض حساب الوزن الجاف لأي فايروس تتبع الطريقة التالية :

الطريقة (64) : حساب الوزن الجاف لفايروس نباتي.

1. يهيأ قدحين صغيرين مصنوعين من النيكل بقطر 2سم، ويوضع كل منهما في دورق زجاجي مفتوح مع مراعاة عدم مسك القدحين باليد أثناء تداولهما بل يستعمل الملقط لهذا الغرض لان مسكهما باليد سيؤدي إلى التصاق إفرازات اليد الدهنية عليهما والتأثير على الوزن الدقيق للفايروس والذي سيتم قياسه؛

2. يوضع الدورقان في فرن كهربائي (Oven) ويعرّضان إلى درجة حرارة 105مْ لمدة 15دقيقة للتخلص من الرطوبة المحتملة على القدحين، ثم يقفل الدورقان فورا بسدادة ويخرجان من الفرن؛

3. يبرّد الدورقين بتركهما في درجة حرارة المختبر لمدة عشر دقائق ثم يرفع القدحين من الدورقين ويوزنان باستعمال ميزان حساس Microbalance يقرأ لغاية ثلاثة أصفار يمين الفارزة، ويسجل وزنيهما؛

4. يوضع 0,2مل من المحلول الفايروسي النقي في القدح الأول بواسطة ماصة معقمة تمسك عموديا عند سكب المحلول في القدح بحيث لا يلمس المحلول جوانب القدح. وتوضع نفس الكمية أعلاه من المحلول المنظم المستعمل في إذابة الفايروس في القدح الثاني ويوضع كل منهما في الدورق المخصص له؛

5. يتم إدخال الدورقين وهما مفتوحين في الفرن الكهربائي عند 105م لمدة ساعتين ويقفلان حال إخراجهما من الفرن ويتركان في درجة حرارة المختبر ليبردان لمدة 20دقيقة؛

6. يحسب الوزن الجاف للفايروس بالملغرام وفق المعادلة التالية :

الوزن الجاف للفايروس = س – ص

حيث س = وزن القدح الحاوي على المحلول الفايروسي النقي بعد التجفيف – وزنه وهو فارغ.

ص = وزن القدح الحاوي على المحلول المنظم – وزنه وهو فارغ.

8.5. حفظ المحلول الفايروسي النقي

قد يحتاج الباحث بعد إنتهاء عملية التنقية إلى حفظ المحلول الفايروسي النقي لفترة زمنية طويلة من دون التأثير على فعالية الفايروس، وتتباين الفايروسات في درجة تحملها للخزن. تتوفر العديد من الطرق الجيدة لحفظ المحاليل الفايروسية النقية وأفضلها هي :

1. الحفظ في ظروف التبريد مع المواد المعقمة ويتم ذلك بوضع المحلول في قناني زجاجية معقّمة محكمة الإغلاق وتحفظ في حاضنة مبردة عند 4م مع إضافة مادة أزايد الصوديوم Sodium azide بتركيز 0,01% أو مادة الثايمول Thymol بنفس التركيز أو المحلول المائي للجليسرول تركيز 10% والذي يضاف بحجم يساوي حجم المحلول الفايروسي وذلك لمنع نمو الفطريات والبكتريا الرمية في المحلول.

2. الحفظ في ظروف التجميد بوضع المحلول في قناني زجاجية معقّمة محكمة الإغلاق وتحفظ في مجمدة عند – 18مْ.

3. تجفيد المحلول الفايروسي النقي (انظر الفقرة 4.4.4 الفصل الرابع).