



جامعة دمشق
كلية الزراعة
قسم علوم البستنة

دراسة مقارنة بين الطرائق المختلفة لإنتاج بذار البطاطا الخالي من الفيروس PVY مخبرياً

رسالة أعدت لنيل درجة الماجستير في الهندسة الزراعية
(قسم علوم البستنة)

إعداد:

ريما رياض مصا

إجازة في العلوم الزراعية (علوم البستنة) من كلية الزراعة في جامعة دمشق عام 2007

بإشراف:

المشرف

أ.د. خليل المعري

(أستاذ في قسم علوم البستنة - كلية الزراعة - جامعة دمشق)

المشرف المشارك

د. فهد البيسكي

(الهيئة العامة للتقانة الحيوية)

2011 م / 1432 هـ

قُدمت هذه الرسالة استكمالاً لمتطلبات نيل درجة الماجستير في علوم
البستنة من كلية الزراعة في جامعة دمشق

This thesis has been submitted as a partial fulfillment of the
requirement for the degree of master in Horticulture Science at the
Faculty of Agriculture, Damascus University

تصريح

أُصرّح بأنّ هذا البحث "دراسة مقارنة بين الطرائق المختلفة لإنتاج بذار البطاطا الخالي من الفيروس PVY مخبرياً" لم يسبق أن قُبِل للحصول على شهادة، ولا هو مُقدّم حالياً للحصول على شهادة أخرى.

اسم المرشحة

ريما مصا

تاريخ: / / 2011

DECLARATION

This is to declare that, this work "**A Comparative Study Between Different Methods To Produce In vitro Virus Y-free Potato seeds**" has not been submitted for any other degree.

Candidate name

Rima Massa

Date: / / 2011

شهادة

نشهد بأن العمل المقدم في هذه الرسالة هو نتيجة بحث علمي قامت به المرشحة ريماء رياض مصا بإشراف الدكتور خليل المعري (المشرف الرئيسي) الأستاذ في قسم علوم البستنة/ كلية الزراعة/ جامعة دمشق، و الدكتور فهد البيسكي (المشرف المشارك) (الهيئة العامة للتقانة الحيوية، دمشق، سوريا)، وإن أية مراجع أخرى ذكرت في هذا العمل موقعة في نص هذه الرسالة.

المشرف الرئيسي

المشرف المشارك

المرشحة

أ.د. خليل المعري

د. فهد البيسكي

ريماء رياض مصا

تاريخ: 28/ 11 / 2011

CERTIFICATION

We witness that the described work in this thesis is the result of scientific research conducted by the candidate Rima Riad Massa, under supervision of Prof. Dr. Khalil Al Maarri (Main Supervisor) at the department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Damascus University, and Dr. Fahed AL-Biski (Co-Supervisor) at the National Commission of Biotechnology, Damascus, Syria. and any reference of other researchers work has been duly acknowledged in the text.

Candidate

Co-supervisor

Advisor

Rima Massa

Dr. Fahed AL-Biski

Prof. Dr. Khalil Al Maari

Date: / / 2011

تنويه

قدمت هذه الرسالة استكمالاً لمتطلبات نيل درجة الماجستير في الهندسة الزراعية / اختصاص علوم البستنة من كلية الزراعة – جامعة دمشق.

This thesis has been submitted as partial fulfillment of the requirement for the degree of Master in Horticulture at the faculty of Agriculture, Damascus University.

نوقشت وأجيزت في ٨/٨/ 2011

أمام لجنة الحكم

أ.د. خليل المعري

الأستاذ في قسم علوم البستنة / كلية الزراعة – جامعة دمشق

أ.د. سهيل حداد

الأستاذ في قسم علوم البستنة / كلية الزراعة – جامعة دمشق

أ.د. هدى قواص

الأستاذة في قسم وقاية النبات / كلية الزراعة – جامعة دمشق

كلمة شكر

Acknowledgment

إلى كل يدٍ خيرة وفكرة نيّرة تغار على هذا الوطن وتضعه في شغاف القلب.....

إلى أساتذتي الأفاضل الذين لم ييخلوا بأي جهد.....

الأستاذ الدكتور **خليل المعري** والدكتور **فهد البيسكي**.

المثل العلمي الكريم ونبع الخلق القويم... الذين أفادوني بتوجيهاتهم ورعايتهم الفاضلة، فكانوا القدوة الحسنة و مؤئل الفضل المشهود له..

مني لكم فائق الشكر والاحترام والتقدير....

كما أقدم بجزيل الشكر والأمتنان لأعضاء لجنة الحكم: الأستاذ الدكتور **خليل المعري**، والأستاذ الدكتور **سهيل حداد**، والأستاذة الدكتورة **هدى قواص**. ولجميع أعضاء الهيئة التدريسية، لتلك الأيادي التي تنتشر النور والمعرفة.

عطاء من الله أن أمنح أصدقاء رائعين.... ساندوني وكانوا رجائي في شدتي... لكم مني كل الحب والتقدير... (م. سومر العلي ، م. ياسين النعسان، م. نور قباني).

فهرس المحتويات

المحتويات	رقم الصفحة
الملخص	
1 - المقدمة	2
1-1 الزراعة والإكثار	4
2-1 طرائق إكثار البطاطا	4
3-1 الأمراض الفيروسية على البطاطا	5
2-1 مبررات البحث وأهدافه	7
2 - الدراسات المرجعية	9
2 - 1 إكثار البطاطا مخبرياً.	9
2-1-1 مراحل الإكثار النسيجي.	9
2-1-2 نعقيم الخزع النباتية.	10
2 - 2 الطرائق المتبعة في الحصول على نباتات سليمة خالية من الأمراض الفيروسية باستخدام تقانات زراعة الأنسجة النباتية	10
3 - مواد و طرائق البحث	18
3 - 1 مكان تنفيذ البحث	18
3 - 2 المادة النباتية المستخدمة ووصفها	18
3 - 3 طرائق تنفيذ البحث	18
3 - 3 - 1 زراعة النهايات الوردية لدرنات البطاطا	18
3-3-2 اختبار العينات النباتية	19
3-3-3 مرحلة الزراعة الأولية	21
3-3-4 استئصال القمم الميرستيمية.	25
3-3-5 المعالجة الحرارية مع استئصال القمم الميرستيمية.	25
3-3-6 المعالجة الكيميائية مع استئصال القمم الميرستيمية.	26
3 - 3 - 7 المعالجة الكهربائية مع استئصال القمم الميرستيمية.	26
3 - 3 - 8 مرحلة الإكثار.	27
3-3-9 - إجراء اختبار الإدمصاص المناعي المرتبط بالأنزيم (اليزا).	27
3-3-10 التحليل الإحصائي للبيانات	27
4- النتائج والمناقشة.	30
4 - 1 مرحلة الزراعة الأولية.	30

31	2-4 زراعة القمم الميرستيمية.
36	3-4 المعالجة الحرارية مع استئصال القمم الميرستيمية.
40	4-4 المعالجة الكيميائية مع استئصال القمم الميرستيمية.
44	5-4 المعالجة الكهربائية مع استئصال القمم الميرستيمية.
49	6-4 - مرحلة الإكثار.
53	5- الاستنتاجات.
54	6- المقترحات والتوصيات.
56	7- المراجع.

فهرس الجداول

رقم الصفحة	محتوى الجدول	رقم الجدول
3	تطور المساحات المزروعة وإنتاج البطاطا والغلة في سورية.	1
28	الأوساط المغذية المستخدمة في تجارب البحث.	2
34	تأثير طول القمة الميرستيمية في نمو واستطالة نبيتات البطاطا بعد 60 يوماً من الزراعة المخبرية.	3
38	تأثير المعالجة الحرارية وطول الميرستيم في نمو واستطالة نبيتات البطاطا بعد 60 يوماً من الزراعة المخبرية في الصنفين بورين و بينيلا.	4
42	تأثير المعالجة الكيميائية وطول الميرستيم في نمو واستطالة نبيتات البطاطا بعد 60 يوماً من الزراعة المخبرية في الصنفين بورين و بينيلا.	5
46	تأثير المعالجة الكهربائية وطول الميرستيم في نمو واستطالة نبيتات البطاطا بعد 60 يوماً من الزراعة المخبرية في الصنفين بورين و بينيلا.	6
49	اختلافات نسب الإصابة بالفيروس PVY باختلاف المعاملات وأطوال القمم الميرستيمية.	7
50	تأثير الصنف على استطالة نباتات البطاطا.	8
51	تأثير المعاملات المختلفة على استطالة نبيتات البطاطا الناتجة.	9

فهرس المخططات والأشكال

رقم الشكل	الموضوع	رقم الصفحة
1	زراعة النهايات الوردية لدنرات الأصناف المدروسة.	19
2	تعقيم العينات النباتية.	22
3	نمو العينات النباتية بعد الزراعة.	23
4	مخطط لكامل تجارب البحث .	24
5	نتائج اختبارات الإليزا للنموات الناتجة عن زراعة النهايات الوردية لدنرات البطاطا.	30
6	مراحل نمو القمم الميرستيمية لنباتات البطاطا المزروعة بطول 300 ميكرومتر(الصنف بورين).	32
7	نسب الإصابة في الصنفين المدروسين بعد زراعة القمم الميرستيمية.	35
8	نتائج اختبار الإليزا على نموات البطاطا الناتجة عن زراعة القمم الميرستيمية.	35
9	مراحل نمو القمم الميرستيمية لنباتات البطاطا المزروعة بطول 200 ميكرومتر(الصنف بينيلا).	36
10	نسب الإصابة في الصنفين المدروسين بعد المعالجة الحرارية.	39
11	نتائج اختبار الإليزا على نموات البطاطا الناتجة عن زراعة القمم الميرستيمية بعد المعالجة الحرارية.	39
12	اصفرار و بطء نمو العينات النباتية عند زراعتها في الوسط المضاف له مادة الريبافيرين بتركيز 30 ملغ /ل.	40

43	نسب الإصابة في الصنف بورين بعد المعالجة الكيميائية.	13
43	نسب الإصابة في الصنف بينيلا بعد المعالجة الكيميائية.	14
44	نتائج اختبار الإليزا بعد إضافة الريبافيرين بتركيز 20 ملغ / ل.	15
	مراحل نمو القمم الميرستيمية لنباتات البطاطا المزروعة بطول 100	
45	ميكرومتر(الصنف بورين).	16
47	نسب الإصابة في الصنف بورين بعد المعالجة الكهربائية .	17
47	نسب الإصابة في الصنف بينيلا بعد المعالجة الكهربائية.	18
48	نتائج اختبار الإليزا بعد المعالجة الكهربائية 15 ميلي أمبير/10 دقائق.	19
50	نموات البطاطا الناتجة عن زراعة القمم الميرستيمية في وسط الإكثار.	20

المختصرات العلمية الواردة في الأطروحة

Abbreviations

MS – Murashige & Skoog (1962)	المحلول المعدني لموراشيج وسكوغ
KIN - 6- furfuryl aminopurine	كينيتين
GA3 - Gebberellic acid	حمض الجبريلين
B1 - Thiamine	تيامين
B3 – Nicotinic acid	حمض النيكوتينيك
C – Ascorbic acid	حمض الأسكوربيك
B6 – Pyridoxine	بيرودوكسين
ELISA –Enzyme Link Immuno Sorbent Assay	إليزا
Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay	DAS- ELISA
Potato virus Y – Potyvirus	PVY
Potato leaf roll virus – Polerovirus	PLRV
Potato virus S – Carlavirus	PVS
Potato virus M – Carlavirus	PVM
Potato virus A – potyvirus	PVA
Potato virus X – potexvirus	PVX

الملخص:

أجريت هذه الدراسة لإنتاج نباتات خالية من الفيروس PVY من صنف البطاطا (بورين و بينيلا) مصابين بهذا الفيروس، وذلك باستخدام تقنية زراعة الميرستيم المترافقة مع المعالجة الحرارية و الكيميائية و الكهربائية. أخذت القمم الميرستيمية من النباتات المصابة بثلاث أطوال (100, 200, 300 ميكرومتر) وزرعت في وسط مغذٍ يحتوي المحلول المعدني لمورايش وسكوغ (MS) والمضاف له الفيتامينات (5 ملغ/ل حمض الأسكوربيك ، 5 ملغ/ل حمض النيكوتينك، 5 ملغ/ل بيرووكسين، 5 ملغ/ل ثيامين، 200 ملغ/ل إينوزيتول) والهرمونات (2 ملغ/ل GA3، 0.2 ملغ/ل Kin) و 30 غ /ل سكروز.

اختبرت النباتات الناتجة باختبار Dac-Elisa وأظهرت النتائج أنّ زراعة القمم الميرستيمية ذات الطول 100 ميكرومتر أعطى النسبة الأعلى من النباتات الخالية من الفيروس PVY . بعد المعالجة الحرارية ($37 \pm 2^\circ \text{C}$) لمدة 40 يوماً ، تحققت النسبة الأعلى من النباتات الخالية من الفيروس عند زراعة القمم الميرستيمية بطول (100 ميكرومتر) (75 %) في Binella و (69 %) في Burren وأشارت هذه النتائج إلى أن المعالجة الحرارية كانت ذات كفاءة معتدلة للتخلص من PVY. كما أوضحت النتائج بأن المعالجة الكيميائية بإضافة الريبافيرين بتركيز 20 ملغ/ل للوسط والمترافقة مع زراعة القمم الميرستيمية بطول (100 ميكرومتر) أعطت أعلى نسبة من النباتات الخالية من الفيروس Y (87% Binella و 82 % في Burren) وبيّنت هذه النتائج أن هناك تأثيرات سلبية على نمو النباتات خاصة عندما أضفنا الريبافيرين بتركيز (30 mg /L) إلى وسط الزراعة. أخيراً ، تم الحصول على أعلى نسبة من العينات الخالية من الفيروس PVY (93 % في Binella و 87 % في Burren) عند زراعة القمم الميرستيمية بطول 100 ميكرومتر بعد المعالجة الكهربائية بتيار شدته 15 mA لمدة 10 دقائق، وبهذا أشارت النتائج إلى أنّ المعالجة الكهربائية كانت الأكثر كفاءة في التخلص من الفيروس

الفصل الأول:

المقدمة

INTRODUCTION

1- مقدمة عامة : General Introduction

تتنمي البطاطا *Solanum tuberosum* إلى جنس *Solanum* ، وتتبع الفصيلة الباذنجانية Solanaceae، التي تضم نحو 90 جنساً و 2000 نوعاً تقريباً وتكون أنواع البطاطا سلسلة متصلة من التراكيب الصبغية المتضاعفة، فهناك الأنواع الثنائية $2n=2x=24$ والثلاثية $2n=3x=36$ والرابعة $2n=4x=48$ والخماسية $2n=5x=60$ والسداسية $2n=6x=72$ (مسعود، 1981؛ بوراس، 1989).

وتُعد البطاطا أحد أهم المحاصيل الزراعية في العالم، وغذاءً أساسياً في البلدان النامية، وذلك لوفرة غلتها، ورخص إنتاجها، وتنوع الظروف البيئية التي تنمو فيها، وبالإضافة لكونها غذاءً للإنسان، فإنها تُقدم أيضاً كعلف للحيوانات، ولها استعمالات عديدة في مجال الصناعة، حيث يستخرج منها النشاء، وتستعمل في صناعة الورق والمنسوجات، وصناعة المواد اللاصقة، و في صناعة التخمير واستخراج الكحول مثل الإيثانول والبيوتانول وبعض الأحماض مثل الستريك و اللاكتيك (بوراس، 1989).

تعرف البطاطا في اللغة الإنكليزية باسم Irish potato نسبة إلى أيرلندا التي انتشرت فيها زراعتها بعد إحضارها من أمريكا الجنوبية بواسطة مكتشفي أمريكا الأوائل من الإسبان خلال القرن السادس عشر حيث عرفت الأهمية الغذائية لها (Singh et al, 2008)، ولكنها لم تزرع كمحصول غذائي حتى أواخر القرن السابع عشر، وقد تطورت زراعة هذا المحصول لدى الدول المتقدمة تطوراً سريعاً من حيث الإنتاج والتنوعية بفضل الأبحاث العلمية المكثفة في كل من مجال تحسين أصناف البطاطا و القضاء على آفات الزراعة وتكنولوجيا الإنتاج من إعداد الأرض حتى جني المحصول وتسويقه.

البطاطا واسعة الانتشار فهي موزعة في جميع دول العالم تقريباً، من المحيط المتجمد الشمالي حتى خط العرض 46 جنوباً، والمناطق الرئيسة للانتشار هي: الإتحاد السوفيتي ، بولندا ، ألمانيا ، الصين ، الولايات المتحدة الأمريكية ثم هولندا. (www.Fao.org).

ويستأثر محصول البطاطا باهتمام عالمي كبير كونه أحد أكثر المحاصيل الغذائية غنى بالطاقة، فكما هو الأرز بالنسبة لدول شرق آسيا، والخبز لدول شرق البحر الأبيض المتوسط، فإن محصول البطاطا يعتبر الغذاء الرئيسي بالنسبة لدول أوروبا والأمريكيتين وحتى دول أفريقيا. إذ يحتوي كل 100 غ من درنات البطاطا المقشرة على 79.8 غ ماء، 0.1 غ دهون، 17.1 غ كربوهيدرات، 0.5 غ ألياف، 0.9 غ كالسيوم، 53 ملغ فوسفور، 0.6 ملغ حديد، 3 ملغ صوديوم، 4.7 ملغ مغنيزيوم، 0.1 ملغ ثيامين، 0.4 ملغ ريبوفلافين، 1.5 ملغ نياسين، 20 ملغ حامض الإسكوريك (Watt and Merril, 1963).

أدخلت زراعة البطاطا إلى سورية منذ خمسين سنة تقريباً، وتطورت تطوراً سريعاً لتوفر الظروف المناسبة لها، كما شهدت زراعة البطاطا وتسويقها خلال السنوات العشر الأخيرة إنجازاً كبيراً. ويبين والجدول (1) مساحة وإنتاج وغلة محصول البطاطا في السنوات الخمس الأخيرة في سورية (المجموعة الإحصائية، 2010).

الجدول 1 : تطور المساحات المزروعة وإنتاج البطاطا و الغلة في سورية

الأعوام						البطاطا في سورية
2010	2009	2008	2007	2006	2005	
35	35	36	31	28	30	المساحات المزروعة /ألف هكتار
675	706	721	570	603	608	الإنتاج /ألف طن
20	20.2	19.9	18.3	21.7	20.6	الغلة طن/هكتار

* (المجموعة الإحصائية، 2010)

يستورد القطر العربي السوري بذار البطاطا من أوروبا لزراعة المساحات المخصصة، وينحصر استيراد الكميات اللازمة بالمؤسسة العامة لإكثار البذار التابعة لوزارة الزراعة والإصلاح الزراعي، حيث يتم سنوياً شراء عدة آلاف من الأطنان من مرتبة الإيليت Elite التي تزرع هذه الكميات في حقول المزارعين بواسطة عقود ناظمة لعملية الإكثار من النواحي الفنية منذ الزرع وحتى القلع، ثم تستلم المؤسسة ما ينتج من هذه الحقول حسب مواصفات محددة وهو ما يطلق عليه المرحلة Class A، ويبيع للمزارعين كي ينتجوا بطاطا الطعام وتعاد عملية الاستيراد والزراعة بعقود سنوياً. وتشكل هذه العملية عبئاً مالياً على الدولة، حيث تدفع قيمة البذار المستورد بالقطع الأجنبي

ويضاف إليها بعض المحاذير الصحية لاحتمال إدخال بعض الأمراض والحشرات مع البذار. وقد بلغت كميات البذار المستورد عام 2011 حوالي 1200 طناً. (www.Sana.sy)

1-1- الزراعة والإكثار:

تزرع البطاطا في سورية في ثلاث عروات نظراً لتنوع المناخ فيها:

a - عروة ربيعية: ابتداءً من منتصف كانون الثاني حتى منتصف شباط، حيث تزرع البطاطا في المنطقة الساحلية في كانون الثاني، أما في المناطق الداخلية (إدلب، حماه، حلب، حمص) فتزرع في منتصف شباط.

b - عروة صيفية: ابتداءً من منتصف آذار حتى منتصف نيسان، وهذا يلائم المناطق الباردة (بلودان، النبك، سعسع، بيت سابر، بيت جن).

c - عروة خريفية: ابتداءً من منتصف تموز حتى منتصف آب، وهذا يلائم المناطق الداخلية (إدلب، حماه، حلب، حمص).

وطريقة الزراعة الأكثر شيوعاً في سورية هي طريقة الزراعة نصف الآلية، وهناك الزراعة اليدوية وبشكل قليل الزراعة الآلية، وأهم أصناف البطاطا المزروعة في سورية هي:

ليزيتا - بنيلا - دراجا - مارفونا - بورين - سبونتا - أجريا - أطلس - أرنوبا - سولاني - أريندا. (منظمة الأغذية و الزراعة للأمم المتحدة و مكتب الكومنولث الزراعي، 1991)

1-2- طرائق إكثار البطاطا:

a. الإكثار الجنسي (Sexual):

تستخدم هذه الطريقة للأغراض البحثية و أغراض التربية لإنتاج هجن و أصناف جديدة. أما تسويقياً فالدرينات الناتجة صغيرة الحجم، غير قابلة للتسويق، وبالتالي إكثارها لهذا الغرض غير اقتصادي (Wiersema,1982 ; International potato center,1983).

b. الإكثار اللاجنسي (Asexual):

❖ **بالدرينات:** وهي الطريقة الرئيسة المتبعة للإكثار وذلك بزراعة الدرينات الكاملة أو قطع منها، وتحافظ هذه الطريقة أنها تحافظ على نقاوة الصفات الوراثية للصنف ولكن من مساوئها أنها تسبب التدهور الفزيولوجي لبذار البطاطا نتيجة زراعته عدة مواسم متتالية،

إضافة لانتقال الأمراض إلى الأجيال التالية ولا سيما الأمراض الفيروسية ويستمر انتقال الإصابة بهذه الأمراض مما يؤدي إلى خفض في الإنتاج يتراوح بين 30-50% (De bokx and Van der want, 1987).

❖ الإكثار بطرائق زراعة الأنسجة النباتية *In vitro Micropropagation*:

إن استخدام التقنيات الحيوية المخبرية لإنتاج شتول البطاطا الخالية من الأمراض الفيروسية باستخدام طرق الإكثار المخبري الدقيق هي الأكثر شيوعاً وجزءاً متكاملًا لنظم إنتاج بذار البطاطا في بلدان عديدة (CIP, Lima International Potato Center, Peru).

1-3- الأمراض الفيروسية على البطاطا:

تعتبر الأمراض الفيروسية التي تصيب البطاطا من أهم الأمراض الجهازية التي تنتقل ضمن بذار البطاطا والتي تؤدي إلى انخفاض معدل الإنتاج و الإكثار وارتفاع معدل التدهور بسبب الإصابة بالفيروسات الممرضة وبالتالي فإن استخدام المواد النباتية الخالية من الفيروسات من أجل الإنتاج النباتي تعتبر الأكثر أهمية في برامج إنتاج بذار البطاطا عالمياً، وتختلف أعراض هذه الأمراض باختلاف الفيروسات المسببة لها وسلالات الفيروس الواحد. وأهم هذه الفيروسات: PLRV , PVA , PVM , PVS , PVY , PVX، وفيما يلي استعراض لأهم الفيروسات وأعراض الإصابة بها وتأثيراتها في نوعية وإنتاج البذار .

a. فيروس التفاف أوراق البطاطا، *Potato leaf roll polero virus (PLRV)*:

يعد من أول فيروسات البطاطا التي تم التعرف عليها و أهمها، إذ يؤدي إلى انخفاض الإنتاجية لأكثر من 50% (Ellis et al, 1992; Holland, 1996).

b. فيروس البطاطا Y، *Potato Y potyvirus (PVY)*:

يتبع جنس *Potyvirus*، وفصيلة *Potyviridae* ، ويعتبر فيروس البطاطا Y من أخطر الفيروسات التي تصيب البطاطا وذلك بسبب: سهولة انتقاله و تأثيره الكبير على كمية الإنتاج. يعد التبرقش والتجعد من الأعراض الأكثر شيوعاً، أما الساق المخططة فهو أقل شيوعاً، وتترافق أعراض التجعد والساق المخططة مع نقص في الإنتاج يقدر بـ 70 %، أما أعراض التبرقش فتترافق مع نقص مقداره أكثر من 30 % - 50%. ومن أهم

السلالات : فيروس Y^c ، Y^N ، Y^o ، Y^{ntn} ، تنتقل سلالات الفيروس Y في الحقل بالعديد من أنواع المن بالطريقة غير المثابرة، والعامل الناقل الأكثر كفاءة هو من الدراق الأخضر *Myzus persicae* (Holland, 1996).

c. فيروس الموزاييك الخفيف A، *Potato A potyvirus* (PVA)

يعتبر من الأمراض القليلة ، وتأثيره في كمية الإنتاج ضئيل. (Ellis et al; 1992)

d. فيروس موزاييك والتفاف أوراق البطاطا M، *Potato M carlavirus* (PVM)

يعتبر من الأمراض قليلة الأهمية، تظهر أعراضه على شكل موزاييك خفي على الأوراق بين العروق وتشوه والتفاف للأوراق القمية.(Ellis et al, 1992; Holland, 1996).

e. فيروس S، *Potato S carlavirus* (PVS)

يمكن أن تسبب الإصابة بهذا الفيروس نقصاً في المحصول يصل إلى 10%. (Ellis et al; 1992).

f. فيروس X، *Potato X potexvirus* (PVX)

تتداخل أعراضه مع أعراض الفيروسات الأخرى مثل PVY ، PVA والتي تسبب خسائر أكثر من الفيروس نفسه .(Ellis et al, 1992; Holland, 1996).

1-2- مبررات البحث وأهدافه:

تقوم وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي - المؤسسة العامة لإكثار البذار حالياً- باستخدام طريقة زراعة الأنسجة في إكثار بعض أصناف البطاطا المفتوحة في محاولة للحصول على مادة خالية من الإصابات الفيروسية وعلى الرغم من ذلك لا تزال هناك حاجة ماسة لطريقة أو طرائق إكثار بديلة أو مرادفة لتذليل بعض الصعوبات التي تعترض إنتاج نباتات بطاطا خالية من الفيروسات.

دعت الحاجة الوطنية لإنتاج وإكثار بذار البطاطا محلياً، بهدف الاستغناء عن الاستيراد، وتوفيراً في العملة الأجنبية، والحد من دخول الآفات الزراعية المرافقة لوحداث الإكثار (الدرنات)، كما تُشير العديد من الدراسات المحلية الموثقة مرجعياً إلى إصابة محصول البطاطا بشكل رئيسي بفيروس البطاطا Y، وقد تم التعرف على سلالاته المنتشرة محلياً، وعلى نسب انتقاله في درنات البطاطا حقلياً و مخبرياً؛ إضافة إلى انتشار الفيروس على العديد من المحاصيل الأخرى والأعشاب البرية في سورية (قواص و حمد، 2007)، لذا يعتبر العمل على هذا الفيروس من الأولويات إضافة إلى أن صنفى البطاطا بورين و بينيلا من الأصناف الهامة لزراع البطاطا و مستهلكيها في القطر، ولم يجر أي بحث عليهما في مجال زراعة الميرستيم للتخلص من الفيروسات. لذلك فقد هدف هذا البحث إلى:

- 1- إنتاج مادة إكثار نباتية خالية من فيروس PVY من درنات بطاطا مصابة به من أصناف البطاطا بورين و بينيلا والعمل على إكثارها مخبرياً.
- 2- دراسة مدى كفاءة الطرائق المختلفة (الحرارية، الكيميائية، الكهربائية) المترافقة مع زراعة القمم الميرستيمية في الحصول على نباتات بطاطا خالية من الفيروس PVY في الأصناف المدروسة والمقارنة بينها لاختيار الطريقة "الأفضل".

الفصل الثاني:

الدراسة المرجعية

LITERATURE REVIEW

1- الدراسة المرجعية Literature Review

2-1 إكثار البطاطا مخبرياً:

تقدم زراعة الأنسجة *in vitro* tissue culture تقنية ممتازة للإكثار السريع للبطاطا *Rapid propagation* (Sawyer,1992). وتعتمد الطرائق المستخدمة على استعمال بيئة نمو تركيبية (صناعية)، تحت البراعم الجانبية على النمو (Tovar and Dodds 1986)، ثم الحصول على أعداد كبيرة من النبيتات (Plantlets) في مدة زمنية قصيرة (Tovar and Dodds, 1986) وقد بين Firman (1984) إمكانية الحصول على 500 نبات من عقدة واحدة (Single node) في مدة لا تتجاوز أربعة أشهر.

و يعد استخدام تقانات زراعة الأنسجة والخلايا النباتية الأكثر بروزاً في نبات البطاطا (*Solanum tuberosum*) مقارنة مع أنواع المحاصيل الأخرى. حيث تطورت عمليات استنباط أصناف البطاطا بطرائق التحسين الوراثي المختلفة (التقليدية والحديثة) ويتم تطبيق التقنيات الحيوية في إنتاج بذار البطاطا من خلال طرائق الإكثار الخضري الدقيق وإزالة العامل أو المسبب المرضي وخاصة الفيروسي (Bajaj, 1987).

2-1-1 مراحل الإكثار النسيجي:

إن الإكثار الخضري الدقيق بواسطة زراعة الأنسجة النباتية يعتبر عملية مهمة واقتصادية في الأنواع صعبة الإكثار، أو الأنواع محدودة الإكثار بالطرائق التقليدية، كما تسمح بالحصول على معدل إكثار عالٍ من النباتات ذات توازن فيزيولوجي جيد. وتشمل عملية الإكثار الخضري الدقيق المراحل التالية:

a. مرحلة الزراعة الأولية Initial Culture:

تعد مرحلة الزراعة الأولية أو ما يسمى الزراعة التأسيسية أول مرحلة في الزراعة النسيجية، حيث تهدف إلى الحصول على عينات نباتية خالية من التلوث وقادرة على النمو والبدء بزراعة الميرستيم القمي (AlMaarri et al; 1986)

b. الإكثار والاستطالة Multiplication:

يتم الحصول من خلالها على نموات جديدة من البراعم الجانبية للنموات الناتجة عن مرحلة الزراعة الأولية (Bajaj, 1987).

c. التجذير Rooting:

تهدف إلى تكوين جذور للنباتات الناتجة عن المرحلة السابقة. (AlMaarri et al; 1986)

d. التقسية (الأقلمة) Acclimatization:

وهي عملية أقلمة تدريجية للنباتات الناتجة كي تتأقلم مع الوسط الخارجي وتصبح قادرة على النمو والإنتاج في الشروط الطبيعية (Bajaj, 1987).

2-1-2 تعقيم الخزع النباتية:

يتم تعقيم الخزع النباتية Explants في البطاطا باستخدام بعض المواد الكيميائية مثل هيبوكلوريت الصوديوم Sodium hypochlorite NaOCl (Love et al, 1987)، هيبوكلوريت الكالسيوم Calcium hypochlorite Ca (OCl)₂ (Jona et al, 1987) أو كلوريد الزئبق (Mercuric bichloride HgCl₂) (Pierik, 1987) والذي كثيراً ما يوصى بعدم استخدامه بسبب سميته الشديدة وخطورته على الإنسان (Pierik, 1987; Lizarrage et al, 1991).

وأشار Lizarrage وزملاؤه (1991) إلى أنه يمكن تعقيم سطح المادة النباتية باستخدام مزيج من المبيدات الفطرية Fungicides والبكتيرية Bactericides، وذلك عندما يكون التلوث (Contamination) شديداً. وهناك دراسات كثيرة عن استخدام المضادات الحيوية (Antibiotics) لمنع تلوث الزراعات المخبرية، عندما تكون الخزعات النباتية ملوثة داخلياً (Internal infection) بالكائنات الدقيقة التي غالباً ما تكون من نوع البكتريا العصوية (Pierik, 1987). وتضاف المضادات الحيوية المعقمة بالفلتر إلى الوسط إما مفردة أو مركبة (Lizarrage et al, 1991).

2-2 الطرائق المتبعة في الحصول على نباتات سليمة خالية من الأمراض الفيروسية باستخدام تقانات زراعة الأنسجة النباتية:

ذكر Hooker (1982) أن محصول البطاطا يصاب عالمياً بأكثر من 25 فيروساً، إضافة إلى مرض واحد يتسبب عن الفيروس (فيروئيد الدرنة المغزلية في البطاطا Potato spindle tuber viroid) وستة أمراض ميكوبلازمية (Mycoplasma diseases). كما ذكر Salazar (1996) فهناك أكثر من 38 فيروساً ممرضاً لمحصول البطاطا، وتعتبر الفيروسات PVA, PVM, PLVR, PVY, PVX, PVS الأهم والأخطر.

والفيروس عامل ممرض لا يمكن مشاهدته إلا باستخدام المجهر الإلكتروني. وتتألف جزيئة الفيروس من حمض نووي محاط بمعطف بروتيني ، وتكون فيروسات البطاطا إما كروية (Isometric) : مثل فيروس التفاف أوراق البطاطا PLRV، أو عصوية (Rod) أو خيطية (Filamentous): مثل فيروسات PVA, PVM, PVS, PVX, PVY.

ويمكن التمييز بين الفيروسات المختلفة بالاعتماد على شكل وأبعاد جزيئاتها، (Holland, 1996). وتعتبر الحشرات الناقل الأساسي للأمراض الفيروسية وخاصة حشرة المنّ التي يُعزى لها الدور الأكبر في انتشار تلك الأمراض، فهي من العوامل الأساسية المحددة لزراعة البطاطا. أظهرت كثير من البحوث وجود عدة طرائق للحصول على نباتات خالية من الفيروسات أو للتخلص منها وهي:

(1) اختبار النبات:

ليس من الضروري أن تكون النباتات كلها مصابة بالفيروس فبعضها أو أكثرها خال منه ويتم البحث عن هذه النباتات السليمة، ثم تختبر للتأكد من سلامتها وخلوها من الفيروسات (Walkey, 1985)، وتعتمد كمادة إكثار، وتعتبر الاختبارات المصلية Serological test من أكثر طرائق الفحص استخداماً في هذا المجال (Walkey, 1985; Bajaj, 1987).

(2) زراعة الميرستيم (Meristem culture):

تتألف القمة النامية من القمة الميرستيمية وهي عبارة عن خلايا جنينية حقيقية تُحاط ببدايات ورقية Leaf primodia (Wareh et al, 1989). يتوزع الفيروس بشكل غير منتظم في النبات فكثير من الفيروسات لا تستطيع غزو المناطق القمية النامية، وإن استطاعت بعض الفيروسات أن تغزو المناطق القمية فإنها لا تصل إلى الخلايا الجنينية الميرستيمية الحقيقية (Bajaj, 1987)، وفي هذه الحالة يجب فصل هذه الخلايا بدقة متناهية بحيث لا يزيد طول القمة الميرستيمية عن 100 ميكرومتر ولكن فرصة استمرار نمو القمة النامية Dome دون أوراق أولية ضعيف جداً (Bajaj, 1987). وقد تمكن Limasset & Cornuet (1949) من الحصول على نباتات خالية من الفيروسات عندما أثبتنا أن النباتات المصابة بالأمراض الفيروسية يتناقص محتواها من الفيروسات كلما اقتربنا من منطقة القمة، وقد استخدمت الأساليب المختلفة للحصول على نباتات بطاطا خالية من الأمراض الفيروسية (Thermotherapy, chemotherapy, Meristem culture) ولكنها أخفقت في إنتاج كميات كافية من المادة النباتية الخالية من الفيروسات ، لذلك

تستخدم المعالجة الكهربائية مع استئصال الميرستيم كتقنية جديدة في إنتاج نباتات خالية من الأمراض الفيروسية بنسبة عالية (Black,1971).

وكان Morel و Martin (1955) أول من حصل على أصول خالية من الفيروس لنباتات الأضاليا و البطاطا بفصل المناطق القمية وتمييزها على بيئة صناعية (تركيبية) معقمة (Espinoza et al,1992). كما أشار Bajaj (1987) إلى إمكانية التخلص من فيروسات البطاطا PVY و PVA عن طريق فصل القمة النامية بطول 300 ميكرومتر وزراعتها دون اللجوء إلى المعالجة الحرارية للنبات المصاب، ويجب أن تكون القمم النامية المراد فصلها وزراعتها في حالة نشطة، لذلك يوصى بزراعتها في فصل الربيع (Bajaj,1987; Pierik,1987).

وبعد الحصول على هذه النبيتات فإن من الضروري اختبار خلوها من الفيروسات ، وإن نباتاً واحداً سليماً كافٍ لإنتاج سلالة خضرية Clone خالية من الفيروس (Bajaj,1987; Pierik,1987). كما تم الحصول على نباتات خالية من الأمراض الفيروسية في كل من الأصناف Draga, Boro, Bison وذلك بدءاً من زراعة الميرستيم (المعري وزملاؤه، 2008).

3) تأثير المعالجة الحرارية في الحد من الإصابة الفيروسية:

تعتبر من الطرق الفعالة في إيقاف نشاط بعض الفيروسات (فضول و زملاؤه، 1986؛ Rolando et al., 1985)، فهناك دلائل تشير إلى أن بعض الفيروسات تغزو المناطق القمية، رغم أن انقسام القمم النامية أسرع من تضاعف الفيروس (Bajaj, 1987; Lizarrage et al; 1991)، وفي هذه الحالة فإن بعض المعاملات الأخرى مثل الحرارة تساعد على إنتاج نباتات خالية من الفيروسات (Bajaj, 1987; Pierik, 1987). لهذا يجب اختيار درجة الحرارة الملائمة والزمن المناسب بما يسمح بنمو النباتات من جهة ويوقف كفاءة تضاعف الفيروس من جهة ثانية (Lizarrage et al; 1991). فعلى سبيل المثال: المعالجة الحرارية على الدرجة 37°م لبضعة أسابيع (4-12 أسبوعاً) تعيق أو تثبط إنتاج بعض فيروسات البطاطا خاصة فيروس البطاطا Y (حسن، 1981، Austin and Cassells, 1993)، فمثلاً فيروس النفاق الأوراق PLRV حساس جداً للحرارة، ويمكن التخلص منه ومن معظم سلالاته بتعريض كامل الدرنه للمعالجة الحرارية (علام، 1993; Bajaj,1987).

وقد أشار علام (1993) إلى أن فيروسات البطاطا PVX و PVS تحتاج إلى إطالة فترة المعالجة بالحرارة، كما تبين عند اختبار النبات وجود الفيروس PVS بعد 4-6 أسابيع من معالجته حرارياً،

لأن قدرة سلالته على تحمل الحرارة كبيرة وتبقى حية حتى بعد عشرة أسابيع من المعالجة وإن المعالجة الحرارية الطويلة ما هي إلا محاولة للحد من تضاعف الفيروس PVS ونشاطه.

حصل Faccioli (1982) على بعض نباتات بطاطا خالية من الفيروسات PVS و PVY باستخدام المعالجة الحرارية على الدرجة 35 °م لمدة 27 يوماً والمترافقة مع زراعة القمة الميرستيمية على الأصناف Jara و Rajka ، واستخدم Luciana (1993) المعالجة الحرارية للتخلص من الفيروسات PVS, PVX, PLRV, التي تصيب البطاطا حيث تم تعريض العينات النباتية بعد زراعتها في وسط MS إلى حرارة 37 °م لمدة 30-40 يوم فتم الحصول على نسبة 20 - 37,5 % من النباتات الخالية من الفيروسات من الصنف Liseta، وقام Lozoya (1996) بإنتاج نباتات بطاطا خالية من فيروس PVX من الصنف Norchip وذلك بتعرض النباتات إلى الظلام مع رفع رجات الحرارة من 37 - 40 °م لمدة أسبوعين تلاها زراعة القمة الميرستيمية لهذه النباتات على الوسط المغذي ، درس Nasir وزملاؤه (2010) تأثير زراعة القمم الميرستيمية مع أو بدون المعالجة الحرارية على نباتات البطاطا المصابة بالفيروس PVY فوجد أن زراعة القمم الميرستيمية منفردة أعطت 36.2% نباتات خالية من الفيروس PVY ، بينما ارتفعت هذه النسبة إلى 64.3 % عندما ترافقت مع المعالجة الحرارية بدرجة حرارة 36-40 °م لمدة 40 يوماً.

(4) تأثير المعالجة الكيميائية في الحد من الإصابة الفيروسية:

من الممكن في بعض الأحيان إيقاف تضاعف الفيروس باستخدام بعض المركبات الكيميائية، وهي مرتفعة الثمن نسبياً مثل الريبافيرين Ribavirin أو الفيرازول (1,2,4-Triazole-) Virazole (3-Carboxamide syn) (Bajaj, 1987; Lizarrage et al,1991).

وقد تمكن Klein and Livingston (1983) من التخلص من فيروسي البطاطا PVX و PVS بمعاملة أطراف النموات الخضرية Shoot-tip مخبرياً في بيئة سائلة تحتوي على الفيرازول بتركيز 20 ملغ/ل ، رغم أن الفيروس PVS من الفيروسات التي يصعب التخلص منها بشكل عام.

كما أشار Bajaj (1987) إلى أنه يمكن التخلص من الفيروسات PVS, PVY, PVM باستخدام الفيرازول في البيئات المخبرية، لكن من جهة أخرى ينصح بعدم استخدامه لاحتمال إصابة الأجزاء النباتية بالمعالجة بالطفرات. كما استخدم Gudmestad (1985) المعالجة الكيميائية لإنتاج نباتات بطاطا خالية من الأمراض الفيروسية وذلك على الصنفين Norchip و Desiree

باستعمال مادة Ribavirin بتركيز مختلفة (20,30,50) ملغ/ل فحص على 89% من نباتات الصنف Norchip الخالية من فيروس PVY و 90% منها خالية من PVS، أما في الصنف Desiree كان 86% من النباتات خالية من PVY و 93% منها خالية من PVS وذلك عند استخدام التركيز 20 ملغ/ل من مادة الريبافيرين. كما قام Luciana (1993) باستخدام المعالجة الكيميائية للتخلص من الفيروسات PVS, PVX, PLRV التي تصيب البطاطا، وذلك باستخدام مادتي 3-Deazauridine(DZD) و Ribavirin(RBV) حيث كان (RBV) أكثر كفاءة في التخلص من الفيروسات، ثم تم التوصل لنتيجة أن المعالجة الحرارية المترافقة مع المعالجة الكيميائية كانت الأكثر كفاءة في الحصول على مادة نباتية خالية من الفيروسات من الصنف Liseta، واستخدمت المعالجة الكيميائية في التخلص من الفيروسات PVY, PVS, PVX (Faccioli & Zoffali, 1998). وقد حصل Gianni (2002) على نباتات بطاطا خالية من الفيروسات خاصة فيروسي PLRV و PVY وذلك باستخدام المعالجة الكيميائية بمادة DHT (2,4-Dioxohexahydro-1,3,5-Triazine) بتركيز 100 ملغ/ل و RBV 50 ملغ/ل فتيين أن أفضل النتائج تم الحصول عليها بعد 8 أسابيع من المعالجة للأصناف Desiree، Kennebec، و Monnalisa حيث كان 43-50% منها خالية من PVY و 39-42% منها خالية من PLRV، بينما في الأصناف Spunta، Primura، و Liseta كانت النتائج 14-21% منها خالية من PVY و 15-27% منها خالية من PLRV. وحصل Jung-Yoon Yi وزملاؤه (2003) على نباتات بطاطا خالية من الفيروس PVX عند إضافة الريبافيرين 20 ملغ/ل إلى الوسط المغذي. أما الباحث Schenk (2008) حصل على نباتات بطاطا من الصنف Monnalisa خالية من الفيروس PVX وذلك بإضافة مادة (DHT) بتركيز 200 و 300 ملغ/ل إلى الوسط المغذي الذي زرعت فيه القمم الميرستيمية. كما درس Nasir وزملاؤه (2010) تأثير زراعة القمم الميرستيمية مع أو بدون المعالجة الكيميائية على نباتات البطاطا المصابة بالفيروس PVY فوجد أن زراعة القمم الميرستيمية منفردة أعطت نسبة 36.2% نباتات خالية من الفيروس PVY، بينما وصلت نسبة النباتات الخالية من الفيروس PVY إلى 90.8% عند زراعة القمم الميرستيمية في وسط أضيفت مادة الريبافيرين بتركيز 50 ملغ/ل.

(5) تأثير المعالجة الكهربائية في الحد من الإصابة الفيروسية:

وذلك بتعريض النبات لتيار كهربائي شدته من 10 - 15 mA ولمدة زمنية معينة، ثم تتم زراعة الميرستيم القمي. تمكن Garcia وزملاؤه (1996) باستخدام المعالجة الكهربائية من إنتاج نباتات بطاطا من الصنف Jara خالية من الفيروسات وخاصة PVX وذلك باستخدام تيار كهربائي شدته mA (5، 10، 15) لمدة 5 و 10 دقائق وبعد معاملة النباتات تمت زراعة القمة الميرستيمية مباشرة فتيين أن المعالجة بتيار 15 mA مدة 5 دقائق كان الأكثر كفاءة بالحصول على 60% إلى 100% من نباتات البطاطا الخالية من فيروس PVX.

ودرس Pazhouhandeh (2001) تأثيرات المعالجة الكهربائية المترافقة مع زراعة الميرستيم في إنتاج نباتات بطاطا خالية من الفيروسات، واستنتج أن المعالجة بتيار كهربائي شدته 15 mA لمدة 10 دقائق أعطت أعلى نسبة من النباتات الخالية من الفيروس PVY (86%) و (77%) PLRV، بينما كان يعتقد أن المعالجة الكهربائية ناجحة فقط في التخلص من PVX (Lozoya, 1996).

ومقارنة بالطرق التقليدية الأخرى المتبعة في إنتاج نباتات خالية من الفيروسات تفوقت المعالجة الكهربائية وكانت الأكثر كفاءة والأقل كلفة اقتصادية إضافة لكونها ذات تأثير إيجابي في معدلات نمو النباتات واستطالتها (Pazhouhandeh et al; 2002).

حصل Jung-Yoon Yi وزملاؤه (2003) على أعلى نسبة من نباتات عدة أصناف من البطاطا الخالية من الفيروس PVY من وذلك عند معاملتها بتيار كهربائي شدته 10 mA لمدة 5 دقائق حيث تراوحت هذه النسب بين (65% - 80%). وقام Pazhouhandeh وزملاؤه (2004) باستخدام المعالجة الكهربائية بشدات مختلفة من التيار الكهربائي والمعالجة الكيميائية بعدة تراكيز من مادة الريبافيرين للحصول على نباتات بطاطا خالية من الفيروس PVS فتوصل إلى أن المعالجة بتيار كهربائي شدته 15 mA لمدة 10 دقائق كانت الأفضل في التخلص من هذا الفيروس، كما أدى استخدام مادة الريبافيرين بتركيز 20 ملغ/ل أعلى نسبة من النباتات الخالية من الفيروس PVS (56%).

واستخدم Sharma وزملاؤه (2008) المعالجة الكهربائية والكيميائية لإنتاج نباتات بطاطا من الصنف Desiree خالية من الفيروسات PVY & PLRV وذلك بتعريض القمم الميرستيمية لتيار كهربائي 10 mA لمدة 5 دقائق أو تيار 15 mA لمدة 10 دقائق حيث تبين أن المعالجة بتيار

10 mA لمدة 5 دقائق كان أكثر كفاءة في إزالة الفيروس PLRV (46,7%) و PVY (40%) وبعد المعالجة الكهربائية أضيف (RBV) إلى وسط الزراعة بتركيز 20 ملغ/ل ف لوحظ انخفاض تركيز الفيروس إلى حد كبير.

وقام الباحث Emami وزملاؤه (2011) باستخدام المعالجة الكهربائية بتيار شدته 15 mA، (25، 35) لمدة 10 ، 20 دقيقة وذلك للتخلص من الفيروسات PVA، PVY في ستة أصناف من البطاطا هي Olimpya ، Lady Roseta ، Agria، Desirea، Banaba و Clone69 ووجد أن استخدام التيار ذو الشدة 35 mA لمدة 20 دقيقة أعطى النسبة الأعلى من النباتات الخالية من الفيروسات وكانت (66,6% ، 70,8% ، 54% ، 58% ، 60% ، 65%) على التوالي.

يمكن الكشف عن الفيروسات باستخدام الاختبارات المصلية (طريقة اختبار إليزا) والموصوفة من قبل Clark and Adams (1977) وهي طريقة فعالة ومعتمدة في معظم بلدان العالم (Khurana,1990; Zhang *et al.*, 1990).

وهو اختبار يمتاز بسهولة إجرائه و حساسيته العالية وفعاليته في الكشف عن العديد من الأمراض الفيروسية النباتية (Khurana,1990;Salazar, 1996).

الفصل الثالث:
مواد البحث وطرائقه
MATERIALS
AND
METHODS

3- مواد البحث وطرائقه Materials and methods:

3-1- مكان تنفيذ البحث:

تم إنجاز هذا البحث في مخبر التقانات النباتية في الهيئة العامة للتقانة الحيوية وفي كلية الزراعة بجامعة دمشق، خلال العامين 2009-2010.

3-2- المادة النباتية المستخدمة ووصفها :

تم استخدام صنفين من أصناف البطاطا (بورين و بينيلا) بمعدل 100 درنة من كل صنف.

أ- الصنف Burren : يتميز بما يلي:

النبات متوسط إلى طويل، مبكر إلى متوسط التبكير، شكل الدرنات بيضوي متطاوّل العيون سطحية، فترة السكون طويلة، الإنتاجية عالية، متوسط الحساسية للإصابة بفيروسات البطاطا PVY، PLRV والجرب الشائع والساق السوداء و حساس جداً للإصابة بالنيماتودا المتحصلة و جيد التحمل للجفاف (International Potato Center,1993).

ب- الصنف Binella: يتميز بما يلي:

النبات قصير إلى متوسط الطول، نصف قائم إلى زاحف، مبكر، الدرنات بيضوية، العيون سطحية التوضع، فترة السكون متوسطة، الإنتاجية جيدة إلى عالية، متحمل للإصابة بفيروسات البطاطا X، Y بشكل جيد. متحمل للإصابة بالنيماتودا RO1 و حساس للإصابة بالجرب و اللفحة الورقية وفيرس النفاق الأوراق (International Potato Center,1993).

ويعتبر هذان الصنفان من أهم الأصناف التجارية المعتمدة في سورية والمرغوبة لدى المزارعين والتي تدخل في برامج إنتاج بذار البطاطا.

3-3- طرائق تنفيذ البحث Methods:

3-3-1- زراعة النهايات الوردية لدرنات البطاطا:

جمعت الدرنات المختارة من الصنفين المدروسين وفحصت بحيث تكون خالية شكلياً وظاهرياً من الأمراض البكتيرية والفطرية، وتم اختيار الدرنات السليمة والخالية من العيوب والتشوهات. وقبل زراعتها للإنبات تم اتباع الخطوات التالية:

- غسلت الدرنات بالماء الجاري لإزالة كل الشوائب إن وجدت، ثم غُومت بحمض الجبرلين (4 ppm) لمدة ربع ساعة وذلك لكسر طور السكون (Dormancy period).

- استئصلت النهايات الوردية (نهاية الستولون وهي نقطة التقاء الدرنه بالستولون، والنهاية الوردية هي الجهة المقابلة لنهاية الستولون على الدرنه عموماً وتتركز فيها عدة عيون) وزرعت في أصص تحوي على مادة البيتموس (الشكل 1).



الشكل 1 : زراعة النهايات الوردية لدرنات الأصناف المدروسة.

3-2-3- اختبار العينات النباتية:

اختُبرت النوات الناتجة عن زراعة النهايات الوردية بعد 45 يوماً باستخدام اختبار /ELISA - DAS/ الذي يعد من الطرق الأساسية في الكشف عن فيروس PVY ويشمل المراحل التالية :

a. عينة الاختبار: تم فيها طحن العينات المراد اختبارها لاستخلاص العصير النباتي منها باستخدام محلول الاستخلاص Extraction buffer بنسبة 1 غ عينة لكل 10 مل من المحلول المنظم (Salazar,1983)، آلياً بواسطة جهاز عصر العينات.

b. الأمصال المضادة للفيروسات: وتم فيها تجهيز الأجسام المضادة Antibodies والأجسام المرتبطة بالأنزيم للفيروس المراد اختباره PVY.

c. المواد المستعملة في الاختبار:

(1) أطباق الاختبار **Microtiter plate**: الطبق يتألف من 96 حفرة سعة كل منها 250 µL.

(2) المحاليل المنظمة (Buffers): حسب الشركة المصنعة.

♦ محلول التغطية **Coating buffer**: يحضر بإذابة 1.59 غ من كربونات

الصوديوم Na₂CO₃، و 2.93 غ من بيكربونات الصوديوم NaHCO₃، و 0.2 غ

من آزاييد الصوديوم NaN_3 ، في ليتر من الماء المقطر، وتكون درجة الحموضة (pH) 9.6 .

♦ **محلول الغسيل Washing buffer**: يذاب 8 غ من كلوريد الصوديوم NaCl و 1.15 غ من فوسفات ثنائية الصوديوم اللامائية Na_2HPO_4 و 0.20 غ من KH_2PO_4 و 0.2 غ من كلور البوتاسيوم KCl و 50 غ من مادة توين 20 (Tween-20) و 0.2 غ من آزاييد الصوديوم NaN_3 ، وتكون درجة الحموضة (pH) 7.4 .

♦ **محلول الربط الأنزيمي Conjugate buffer**: يذاب 8 غ من NaCl و 20 غ من $\text{Polyvinylpyrrolidone (PVP)}$ ، 2.00 غ من $\text{Bovine serum albumin}$ ، 0.20 غ من $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ، 0.20 غ KCl و 0.20 غ NaN_3 وتكون درجة الحموضة (pH) 7.4 .

♦ **محلول مادة التفاعل Substrate buffer**: يحضر بإضافة 97 مل من Diethanolamine مع 800 مل من الماء المقطر، ويذاب فيها 0.2 غ من آزاييد الصوديوم NaN_3 ، ثم يكمل الحجم إلى ليتر واحد من الماء المقطر، وتكون درجة الحموضة (pH) 9.8 .

♦ **محلول الاستخلاص Extraction buffer**: 20 غ من PVP ، 8 غ من $\text{Polyvinylpyrrolidone}$ ، 0.20 غ من NaCl ، 0.20 غ من KCl ، 0.50 غ (Tween-20) و 0.20 غ من NaN_3 وتكون درجة الحموضة (pH) 7.4 .

(3) الكشف عن الفيروسات باختبار الإدمصاص المناعي المرتبط بالأنزيم إليزا

(ELISA): حيث تم اتباع الخطوات التالية (Vetten et al, 1994)

- ✓ تغطي كل حفرة من طبق الإليزا بـ 200 ميكروليتر من الغلوبولينات المناعية للفيروس طراز (IgG) بتركيز 3 ميكروليتر لكل 1 مل من محلول التغطية Coating buffer .
- ✓ تحضن الأطباق في درجة حرارة 37 °م لمدة 3 ساعات.
- ✓ تغسل الأطباق ثلاث مرات بمحلول الغسيل Washing buffer وذلك بفواصل زمني 5 دقائق بين الغسلة والأخرى.

- ✓ يضاف لكل حفرة 200 ميكروليتر من العصارة النباتية التي سبق استخلاصها.
- ✓ تحضن الأطباق لمدة 16 ساعة في درجة حرارة 4 °م.
- ✓ تغسل الأطباق كما ذكر سابقاً.
- ✓ يضاف إلى كل حفرة 200 ميكروليتر من الأجسام المضادة (غلوبولينات الطراز G المناعية) المرتبطة بأنزيم الفوسفاتاز القلوي (Alkaline Phosphatase) والمخفضة بنسبة 1.3 ميكروليتر لكل 1 مل من محلول الربط Conjugate buffer.
- ✓ تحضن الأطباق لمدة 3 ساعات في درجة حرارة 37 °م.
- ✓ تغسل الأطباق كما ذكر سابقاً.
- ✓ يضاف 200 ميكروليتر لكل حفرة من مادة نيتروفينيل الفوسفات P- Nitrophenyl Phosphate، والتي تستعمل بتركيز 5 ملغ لكل 10 مل من محلول مادة فعل الأنزيم، وتمتاز هذه المادة بأنها تتحول إلى اللون الأصفر بفعل أنزيم الفوسفاتاز القلوي (Alkaline Phosphatase).
- ✓ تترك الأطباق في درجة حرارة الغرفة لمدة تتراوح بين ساعة و 16 ساعة (حسب تطور التفاعل اللوني)، تقدر شدة التفاعل بقياس درجة امتصاص الضوء عند الموجة 405 نانومتر (خاصة بالأنزيم Alkaline Phosphatase) باستعمال قارئ الإليزا.
- ✓ تم الاعتماد على الطريقة التالية لأخذ النتائج وتحديد وجود أو عدم وجود الإصابة بالفيروس: تعتبر العينة مصابة إذا تجاوز امتصاص العصير للضوء على طول موجة 405 نانومتر متوسط امتصاص عينات الشاهد السليم، مضافاً إليه ثلاثة أمثال الانحراف المعياري (SD) Standard Deviation (Savigny and Voller, 1980).

3-3-3- مرحلة الزراعة الأولية Initial culture:

تعقيم العينات النباتية وزراعتها:

قبل إدخال العينات الناتجة من زراعة النهايات الوردية مخبرياً تم إجراء عملية التطهير

السطحي لها (Surface disinfection) باتباع الخطوات التالية:

أ- قص النموات بطول 10-15 سم و غسلها بالماء الجاري.

ب- الغمر بالكحول تركيز 70% مدة 1 دقيقة.

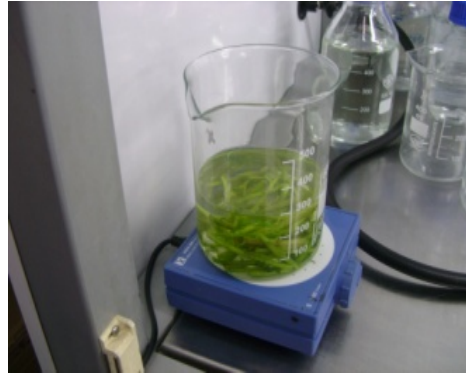
ت- الغمر بمحلول التطهير الحاوي على هيبوكلوريت الصوديوم (NaOCl) بتركيز (1.5 - 2 %) لمدة 15 دقيقة وبتركيز (3 - 4 %) لمدة 10 دقائق.

ث- غسل العينات النباتية بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات بفاصل زمني 5 دقائق.

تمت جميع عمليات التطهير السطحي والزراعة الأولية في ظروف معقمة في غرفة الزراعة تحت

جهاز العزل الجرثومي Laminar air flow Hood وبشروط معقمة واستخدام أدوات معقمة

واستخدام أدوات معقمة من مشارط ومقصات وأطباق بتري.(الشكل 2).



الشكل 2 : تعقيم العينات النباتية

زرعت العينات النباتية بعد تعقيمها في وسط MS (Murashige & Skooge,1962) مع إضافة 30 غ/ل سكروز و 7 غ/ل آجار ودرجة حموضة الوسط (pH= 5.8). تم توزيع الوسط في أنابيب اختبار بحجم 2.5 × 20 سم بمعدل 12 مل من الوسط المغذي في كل أنبوب و عقت في جهاز التعقيم الرطب Autoclave على حرارة 121 °م و ضغط 1.04 كغ/سم² لمدة 20 دقيقة، ثم زرعت العقل البرعمية بشكل عمودي على سطح الوسط بطول 1- 1.5 سم والحاوية على ورقة بإبطها برعم كما هو موضح بالشكل(3) ، وتم تحضين العينات النباتية المزروعة في غرفة النمو على درجة حرارة 22 °م و فترة إضاءة (8:16) و شدة ضوئية 3000 لوكس لمدة 45 يوماً ، وتتراوح مدة التحضين للحصول على نبتة كاملة (Plantlets) بين 4-5 أسابيع،

بعدها تمت إعادة الزراعة (Subculture) مرة كل شهر تقريباً حيث تم إكثارها ثلاث مرات للحصول على العدد الكافي من النباتات اللازمة لبدء التجارب البحثية.



الشكل 3 : نمو العينات النباتية بعد الزراعة.

In vitro culture

الإدخال مخبرياً



اختبار الإليزا
الإصابة 100 % PVY



المعاملة الكيميائية
(ريبافيرين) 30-20-10
ملغ/ل

المعاملة الكهربائية
15 mA/5min- 15

المعاملة الحرارية
36.5 م - 40 يوماً

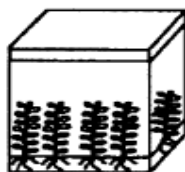
Meristem excision

0.1 - 0.2 - 0.3 mm



تنبيت الدرنات
وزراعة النهايات
الوردية

In vitro culture



إكثارها ووضعها في غرف
النمو



اختبار الإليزا ELISA

الشكل 4 : مخطط لكامل تجارب البحث

3-3-4- استئصال القمة الميرستيمية: Meristem excision

أخذت القمة الميرستيمية من النموات بعد فصل الأوراق المحيطة بمنطقة النمو وهي البدائات الورقية الأولية للحصول على القمة الميرستيمية فقط (Meristemic-dome) بثلاثة أطوال مختلفة (100-200-300) ميكرومتر تحت المكبرة بمعدل 16 أنبوب لكل طول لكلا الصنفين، وبهذا بلغ عدد الأنابيب المزروعة لمعاملة الشاهد:

$$2 \text{ صنف} \times 3 \text{ أطوال} \times 16 \text{ أنبوب} = 96 \text{ أنبوباً (ميرستيم).}$$

كررت كل تجربة مرتين بحيث احتوى كل مكرر على 16 عينة نباتية (أنبوب) وسجلت النسب المئوية للنمو و متوسط استطالة النموات بعد 60 يوماً من الزراعة، حيث تم حساب متوسط تجربتين:

$$96 \times 2 = 192 \text{ عينة نباتية.}$$

تمت الزراعة ضمن أنابيب صغيرة قياس 10×100 ملم بمعدل قمة ميرستيمية/أنبوب واحتوى الوسط الخاص بالميرستيم على محلول MS المعدني المضاف إليه الفيتامينات (إنيزيتول 200 ملغ/ل، التيامين 5 ملغ/ل، حمض النيكوتين 5 ملغ/ل، البيروكسين 5 ملغ/ل و حمض الأسكوربيك 5 ملغ/ل)، الحمض الأميني (غلايسين 2 ملغ/ل)، والهرمونات (GA3 2 ملغ/ل، Kin 0.2 ملغ/ل)، إضافة إلى السكروز 30 غ/ل والآغار 7 غ/ل. وعدلت حموضة الوسط (pH) إلى 5.8 قبل التعقيم بالأوتوغلاف Autoclave .

تم تحضين الأنابيب المزروعة بغرفة النمو (Growth Room) بنفس شروط الزراعة الأولية آنفة الذكر. نقلت العينات السليمة والتي بدأت في النمو مرة كل 20 يوماً إلى نفس وسط زراعة الميرستيم بهدف الإكثار و زيادة عدد النموات المتكونة ليصار إلى تأمين المادة الأولية اللازمة لاختبار الاليزا .

3-3-5- المعالجة الحرارية مع استئصال القمم الميرستيمية:

وضعت النباتات المصابة بالفيروس PVY والمزروعة في أنابيب اختبار تحوي وسط (MS) في الحاضنة على درجة حرارة 36,5/°م مع فترة إضاءة (8:16) وتم تركها في الحاضنة لمدة 6/ أسابيع وذلك تحت مستوى عالي من الكثافة الضوئية (Lux 5000)(Nascimento et al; 2003)، وبعد المعالجة الحرارية عزلت القمم الميرستيمية منها بأطوال (100 - 200 - 300)

ميكرومتر بمعدل 16 أنبوباً لكل طول من كل صنف، وزرعت على الوسط الخاص بالميرستيم مع مراعاة نقل النموات المتكونة مرة كل 20 يوماً إلى نفس وسط الميرستيم.

بلغ عدد الأنابيب المزروعة للمعاملة الحرارية:

$$2 \text{ صنف} \times 3 \text{ أطوال} \times 16 \text{ ميرستيم} = 96 \text{ أنبوباً (ميرستيم).}$$

كررت كل تجربة مرتين بحيث احتوى كل مكرر على 16 عينة نباتية (أنبوب) ، وسجلت النسب المئوية للنمو و متوسط استطالة النموات بعد 60 يوماً من الزراعة، حيث تم حساب متوسط تجربتين: $2 \times 96 = 192$ عينة نباتية.

3-3-6- المعالجة الكيميائية مع استئصال القمم الميرستيمية:

أضيفت مادة Ribavirin إلى الوسط المغذي الخاص بالميرستيم بتركيز مختلفة (10، 20، 30 ملغ/ل)، ثم أخذت القمم الميرستيمية ذات الأطوال (100- 200 - 300 ميكرومتر) من النباتات المصابة بالفيروس وزرعت في نفس الوسط المستخدم في المعالجة الحرارية وذلك بمعدل 16 أنبوباً لكل طول ولكل تركيز من الريبافيرين لكل صنف، حيث نقلت العينات السليمة إلى نفس الوسط المغذي المضاف له مادة الريبافيرين مرة كل 20 يوماً، وقد بلغ عدد الأنابيب المزروعة للمعاملة الكيميائية:

$$2 \text{ صنف} \times 3 \text{ أطوال} \times 16 \text{ ميرستيم} \times 3 \text{ تراكيز} = 288 \text{ أنبوباً (ميرستيم).}$$

وكررت كل تجربة مرتين بحيث احتوى كل مكرر على 16 عينة نباتية (أنبوب) وسجلت النسب المئوية للنمو و متوسط استطالة النموات بعد 60 يوماً من الزراعة، حيث تم حساب متوسط تجربتين:

$$2 \times 288 = 576 \text{ عينة نباتية.}$$

3-3-7- المعالجة الكهربائية مع استئصال القمم الميرستيمية:

تم اختيار أقوى النباتات المصابة المزروعة في الأنابيب ثم قسمت إلى أجزاء بحيث يحوي كل منها على خمسة براعم وبعدها تم تعريضها لتيار كهربائي شدته 15 mA لمدة (5 ، 10) دقائق وذلك بعد وضعها في محلول NaCl (1N) (Mahmoud et al; 2009)، ثم أخذت القمم الميرستيمية بثلاثة أطوال مختلفة (100-200-300 ميكرومتر) وتمت زراعتها في الوسط المستخدم في المعالجة الحرارية،

وبهذا كان عدد الأنابيب المزروعة:

$$2 \text{ صنف} \times 3 \text{ أطوال} \times 2 \text{ زمن} \times 16 \text{ أنبوب} = 192 \text{ أنبوباً.}$$

كررت كل تجربة مرتين و سجلت المئوية للنمو و متوسط استطالة النموات بعد 60 يوماً من الزراعة، حيث تم حساب متوسط تجربتين : $192 \times 2 = 384$ عينة نباتية.

3-3-8- مرحلة الإكثار Multiplication phase:

يهدف طور الإكثار إلى الحصول على أكثر عدد من النموات الخضرية جيدة النمو و لهذه الغاية تم نقل النموات الخضرية الغضة (Shoots) من المرحلة السابقة التي تتضمن كافة التجارب السابقة في وسط زراعة الميرستيم إلى وسط الإكثار و هو وسط MS مضافاً إليه 30 غ/ل سكروز و 7 غ/ل آجار ودرجة حموضة الوسط (pH= 5,8) قبل التعقيم بالأوتوغلاف ضمن أنابيب زجاجية 25×200 ملم، تحوي 12 مل بيئة، وتمت إعادة الزراعة (Subculture) مرتين وذلك للحصول على العدد الكافي من العينات النباتية اللازمة لإجراء اختبار الإليزا.

3-3-9- إجراء اختبار الإدمصاص المناعي المرتبط بالأنزيم (إليزا ELISA):

تم اختبار العينات النباتية الناتجة عن مرحلة الإكثار بعمر 45 يوماً تقريباً (حيث يفضل أن تكون النباتات المختبرة بعمر أكثر من 30 يوم لضمان زيادة تركيز الفيروس إن وجد) باستخدام اختبار الإدمصاص المناعي المرتبط بالأنزيم (إليزا ELISA) وذلك حسب التقنية الموصوفة من قبل Clark and Adams (1977) والتي تم شرحها بشكل مفصل مسبقاً.

3-3-10- التحليل الإحصائي للبيانات Statistical analysis of data:

استخدم تصميم القطاعات العشوائية الكاملة (Completely Randomized Block Design) لتصميم التجربة، واستخدم برنامج التحليل الإحصائي SPSS. 17 لمقارنة المتوسطات وحساب أقل فرق معنوي (LSD) على مستوى معنوية 0.01.

الجدول (2) : الأوساط المغذية المستخدمة في تجارب البحث المختلفة.

زراعة الميرستيم	طور الزراعة الأولية وطور الإكثار	مكونات الوسط المغذي
MS	MS	الوسط المعدني
30	30	السكروز (غ/ل)
7	7	الآجار (غ/ل)
5	1	ثيامين (ملغ/ل)
200	100	ميواينوزيتول (ملغ/ل)
5	–	حمض النيكوتين (ملغ/ل)
5	–	البيرودوكسين (ملغ/ل)
5	–	حمض الأسكوربيك (ملغ/ل)
0.2	–	KIN (ملغ/ل)
2	–	GA3 (ملغ/ل)
2	–	غلايسين (ملغ/ل)

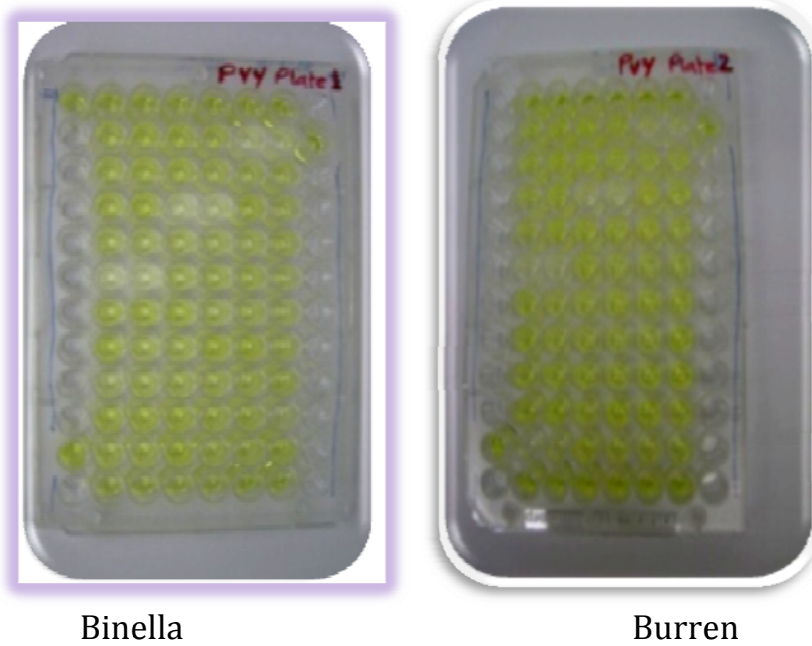
الفصل الرابع:

النتائج والمناقشة

**RESULTS AND
DISCUSSION**

4-النتائج والمناقشة RESULTS AND DISCUSSION

- نتائج اختبار الإليزا على العينات الناتجة عن زراعة النهايات الوريدية:
بينت نتائج اختبار /ELISA - DAS/ أن النموات الناتجة بعد 45 يوماً من زراعة النهايات الوريدية مصابة بالفيروس PVY بنسبة 100% . (الشكل 5)



الشكل 5 : نتائج اختبار الإليزا على النموات الناتجة من زراعة النهايات الوريدية (يشير اللون الأصفر إلى العينات المصابة بالفيروس Y)

4-1 الزراعة الأولية Initial culture

التطهير السطحي والزراعة التأسيسية Disinfection & culture Establishment:

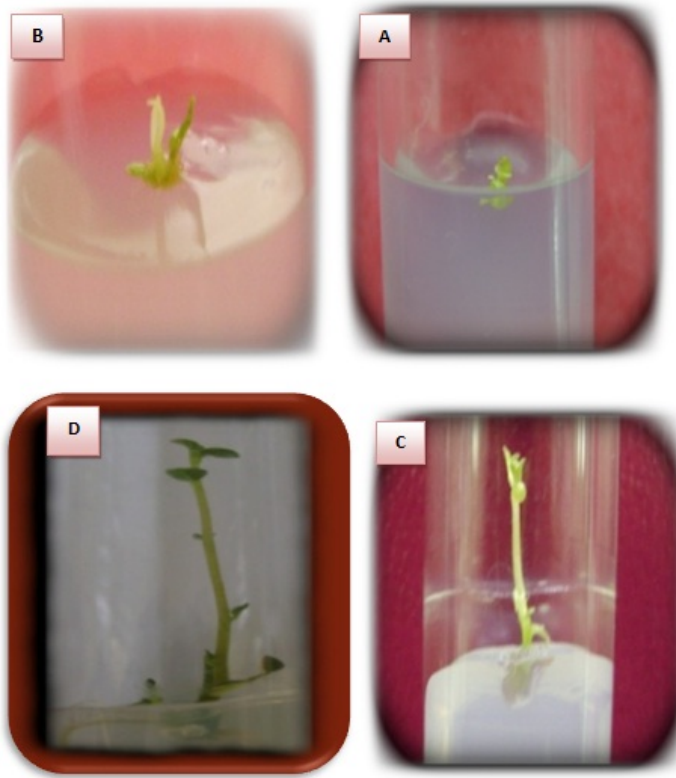
تحققت أفضل نتائج التعقيم عند استخدام هيبوكلوريت الصوديوم (NaOCl) بتركيز 3% لمدة 10 دقائق وللصنفين المدروسين، حيث بلغت نسبة العينات السليمة من التلوث 82% وبلغت نسبة العينات الميتة 12% وبالتالي بلغت نسبة العينات التي أبدت استجابة للنمو 70%، بينما أدى استخدام التراكيز المنخفضة من هيبوكلوريت الصوديوم (1.5 و 2 %) لمدة 15 دقيقة إلى خفض نسبة العينات السليمة إلى 34% - 67% على التوالي ، كما انخفضت النسبة المئوية للعينات النامية إلى 29% - 57%.

وقد تم استخدام مادة هيبوكلوريت الصوديوم NaOCl نظراً لفعاليتها في عمليات التطهير السطحي في العديد من النباتات المزروعة مخبرياً (Pevalék and Jelaska, 1987) حيث

تتميز هذه المادة بكفاءة عالية في تطهير الخزعات النباتية قليلة التلوث السطحي خاصة إذا استخدمت بالتراكيز المناسبة بالمقارنة مع مواد أخرى مثل هيبوكلوريت الكالسيوم .
أما بالنسبة لمعدلات التلوث في الزراعات الثانوية فقد كانت منخفضة جداً ولم تتجاوز 2% ،
وتعود نسب التلوث هذه إما لعدم كفاية تعقيم الأدوات المستخدمة بالحرارة أثناء الزراعة أو لخطأ في العمل أو لتلوث عرضي أثناء إجراء عمليات الزراعة . علماً أن الزراعات الملوثة كانت تستبعد ولم تدخل مطلقاً في القراءات والإحصاءات.

2-4 زراعة القمم الميرستيمية : Meristem Culture

نقلت العينات النباتية من مرحلة الزراعة الأولية إلى وسط الإكثار بهدف زيادة عدد النموات المتكونة الناتجة عن زراعة النهايات الوردية لدرنات صنفى البطاطا بورين وبينلا التي تم التأكد من إصابتها بالفيروس PVY بنسبة 100% بعد إجراء اختبار الإليزا عليها ، وبعد الحصول على العدد الكافي من العينات النباتية اللازمة لبدء التجارب البحثية وذلك بإعادة زراعتها (Subculture) ثلاث مرات، تم استئصال القمم الميرستيمية بثلاثة أطوال (100 - 200 - 300) ميكرومتر وزراعتها على الوسط الخاص بالميرستيم، بدأت النموات السليمة بالتطور والنمو بعد الأسبوع الثالث من بدء زراعة القمم الميرستيمية (الشكل 6) ، وقد تم نقلها مرة كل 20 يوم على نفس وسط زراعة الميرستيم، و ذلك للمحافظة على وسط مغذ جديد، متماثل من ناحية التركيب الكيميائية. فمن المعروف بعد فترة من الزمن تطراً بعض التغيرات على تركيب الوسط ، حيث يتم تفكك بعض مكوناته مثل الفيتامينات، واستهلاك العناصر المعدنية بالإضافة إلى تغيرات في درجة الحموضة (pH).



الشكل 6 : مراحل نمو القمم الميرستيمية لعينات البطاطا المزروعة بطول 300 ميكرومتر (الصنف بورين)

A : بعمر شهر ، B : بعمر 60 يوماً ، C : بعمر 75 يوماً ، D : بعمر 90 يوماً

وتعد عملية استئصال الميرستيم الناجح هي الأساس في الحصول على أصناف خالية من الفيروسات ، وتعتمد نسبة نجاح زراعته بشكل رئيسي على مهارة القائم بالزراعة ، فكلما زاد عدد الورقات الأولية المحيطة بالميرستيم كلما زادت نسبة نجاح زراعته ، ولكن تزداد نسبة احتوائه على الأمراض الفيروسية بنسبة 10-15% من الميرستيمات المزروعة (; Kassanis, 1957 Kassanis & Varma, 1967)، والعكس صحيح ، أي كلما أزلنا الورقات الأولية بشكل أكبر ، تضاعلت نسبة نمو وتطور القمم الميرستيمية من جهة، كما تزداد نسبة العينات الخالية من الأمراض الفيروسية (Ermishin, 1994) .

ويلاحظ من الجدول (3) ارتفاع نسب النمو ومتوسط الاستطالة مع ازدياد طول القمة الميرستيمية وهذا يتوافق مع ما أشار إليه Visessuwan وزملاؤه (1999) حيث تزداد سرعة النمو والاستطالة مع زيادة طول القمم الميرستيمية ، وقد لوحظ أن أعلى متوسط استطالة كان 9.60، 9.90 سم في الصنفين بورين و بينيلا على التوالي، وتحققت بعد 60 يوماً من زراعة

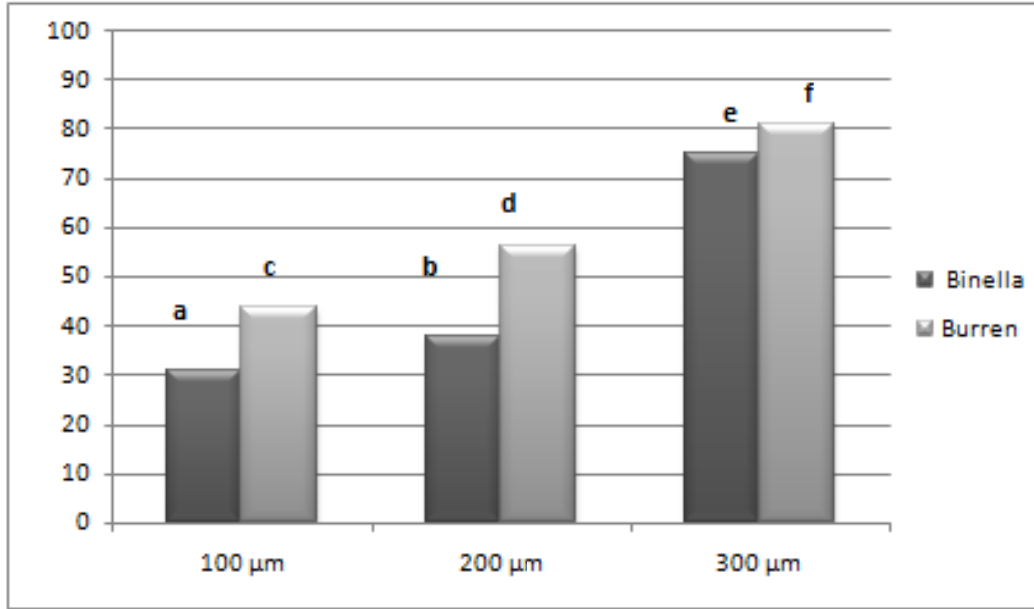
القمم الميرستيمية بطول 300 ميكرومتر، بينما انخفض متوسط الاستطالة إلى 5.4 ، 4.90 سم في الصنفين بورين و بينيلا على التوالي عند زراعة القمم الميرستيمية بطول 100 ميكرومتر، أما النسبة المئوية للنمو بلغت 100% في الصنفين بينيلا و بورين على التوالي عند زراعة القمم الميرستيمية بطول 300 ميكرومتر بينما انخفضت النسبة إلى 88% ، 86% عند الطول 100 ميكرومتر للقمم الميرستيمية. كما يوضح الجدول (3) ارتفاع نسب الإصابة بالفيروس PVY مع زيادة طول القمم الميرستيمية وفي كلا الصنفين حيث بلغت أعلى نسبة إصابة في الصنف بورين و بينيلا 81% ، 75% على التوالي عند زراعة الطول 300 ميكرومتر للقمم الميرستيمية بينما انخفضت نسب الإصابة إلى 44% ، 31% عند زراعة القمم الميرستيمية بطول 100 ميكرومتر (الشكلان 7 و 8) ، وهذا يتفق مع ما توصل إليه Long و Cassell (1984) من أنه كلما كان حجم القمة الميرستيمية أصغر كلما زادت نسبة خلوها من الإصابة الفيروسية . كما يتوافق مع ما أشار له علام (1993) من أن الفيروسات لاتصل إلى الخلايا الجنينية الميرستيمية الحقيقية وفي هذه الحالة يجب فصل الخلايا بدقة متناهية بحيث لا يزيد طول القمة الميرستيمية عن 100 ميكرومتر ولكن فرصة استمرار نمو القمة النامية Dome دون ورقة أولية ضعيف. كما تتوافق النتائج مع نتائج Wang و Hu (1980) التي أكدت أنه بزراعة القمة الميرستيمية يمكن الحصول على نباتات خالية من الأمراض الفيروسية ويعزى ذلك إلى أن القمم الميرستيمية تتميز بأنها ذات نشاط انقسامي عالٍ وأعلى من سرعة انقسام الفيروس مما يجعل الفيروسات غير قادرة على السيطرة على المضيف، إضافة إلى قلة النسج الوعائية في القمم النامية، حيث أن الفيروسات تنتشر بسرعة كبيرة خلال النظام الوعائي، كما تحوي القمم النامية على تراكيز عالية من الأوكسينات والمنتجات الاستقلابية التي تمنع انتشار الفيروسات وتتميز النباتات التي يتم الحصول عليها بهذه الطريقة ليس بخلوها من الفيروسات فقط، وإنما بثباتها جينياً ومطابقتها للنبات الأم.

(Lizarrage et al,1991)

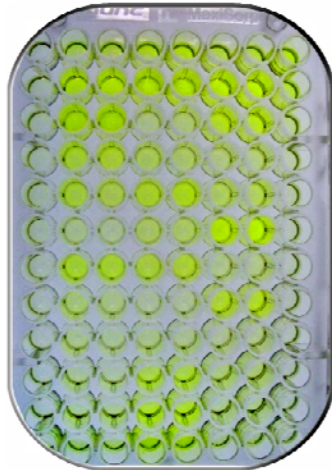
الجدول (3) تأثير طول القمة الميرستيمية في نمو واستطالة نبيتات البطاطا بعد 60 يوماً من الزراعة المخبرية.

حجم القمة الميرستيمية بالميكرومتر		نسبة العينات النامية %		متوسط طول النموات المتكونة بعد 60 يوماً من الزراعة (سم)		نسب الإصابة %	
		بورين	بينيلا	بورين	بينيلا	بورين	بينيلا
100		88 ^c	86 ^d	5.40 ^c	4.90 ^c	44 ^c	31 ^a
200		100 ^a	94 ^b	7.70 ^b	6.60 ^{bc}	56 ^d	38 ^b
300		100 ^a	100 ^a	9.90 ^a	9.60 ^a	81 ^f	75 ^e
LSD		1.59		1,41		2.044	

- تشير الأحرف المتشابهة إلى عدم وجود فرق معنوي بين المعاملات (تحليل ANOVA باستخدام برنامج SPSS على مستوى معنوية 0.01).



الشكل 7 : نسب الإصابة في الصنفين المدروسين بعد زراعة القمم الميرستيمية.



b. Burren



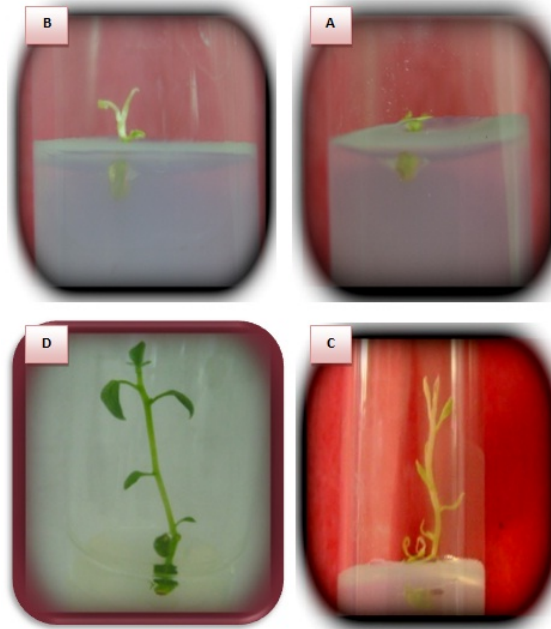
a. Binella

الشكل 8 : نتائج اختبار الإليزا على نموات البطاطا الناتجة عن زراعة القمم الميرستيمية (يشير اللون الأصفر إلى العينات المصابة بالفيروس Y)

4-3 المعالجة الحرارية مع استئصال القمم الميرستيمية:

وضعت العينات المصابة بالفيروس PVY المزروعة في وسط الإكثار والتي بلغ متوسط طولها 8 سم في كلا الصنفين في الحاضنة على درجة حرارة 36,5/م مع فترة إضاءة (8:16) وتم تركها في الحاضنة لمدة 6 / أسابيع وذلك تحت مستوى عالي من الكثافة الضوئية (5000Lux) ، ولوحظ بعد انتهاء فترة المعالجة الحرارية زيادة في متوسط استطالة العينات النباتية حيث بلغ متوسط طولها في الصنف بورين 12.5 سم و 10 سم في الصنف بينيلا ، كما لوحظ وجود اصفرار بسيط فيها . تم عزل القمم الميرستيمية من هذه العينات بثلاث أطوال مختلفة وزرعت في وسط الزراعة الخاص بالميرستيم (الجدول.2).

بيّنت النتائج التي تم الحصول عليها في هذه المعالجة في الجدول (4) ارتفاع نسب النمو ومتوسط الاستطالة مع ازدياد حجم القمة الميرستيمية حيث بلغ أعلى متوسط لاستطالة العينات النباتية بعد 60 يوماً من الزراعة 10.4 ، 9.8 سم في الصنفين بورين و بينيلا على التوالي عند زراعة القمم الميرستيمية بطول 300 ميكرومتر بينما انخفض متوسط الاستطالة عند زراعتها بطول 100 ميكرومتر إلى 5.6 ، 5.2 سم (الشكل 9)، أما أعلى نسبة النمو فتحققت عند الطول 300 ميكرومتر للقمم الميرستيمية (100%) في كلا الصنفين (بورين ، بينيلا).



الشكل 9 : مراحل نمو القمم الميرستيمية لعينات البطاطا المزروعة بطول 200 ميكرومتر (الصنف بينيلا)

A : بعمر شهر ، B : بعمر 60 يوماً ، C : بعمر 75 يوماً ، D : بعمر 90 يوماً

ولوحظ أن درجة الحرارة المرتفعة وطول الفترة التي عرضت إليها نباتات البطاطا لم يؤثر إيجابياً في نمو واستطالة النموات وهذا يتناقض مع ما توصل إليه Kartha و Gamborg (1975) عندما لاحظا زيادة في نمو نباتات الكاسافا المكاثرة بالنسج عندما عرضت لدرجة حرارة 35 °م.

كما بينت نتائج اختبار الإليزا الموضحة في الجدول (4) أن النسبة الأقل من النباتات المصابة بالفيروس PVY تحققت عندما زرعت القمم الميرستيمية بطول 100 ميكرومتر بعد المعالجة الحرارية (25% في صنف Burren و 19% في صنف Binella) بينما النسبة الأعلى للإصابة كانت عند زراعة القمم الميرستيمية بطول 300 ميكرومتر (44% في Burren و 31% في Binella)، الشكلان (10 و 11).

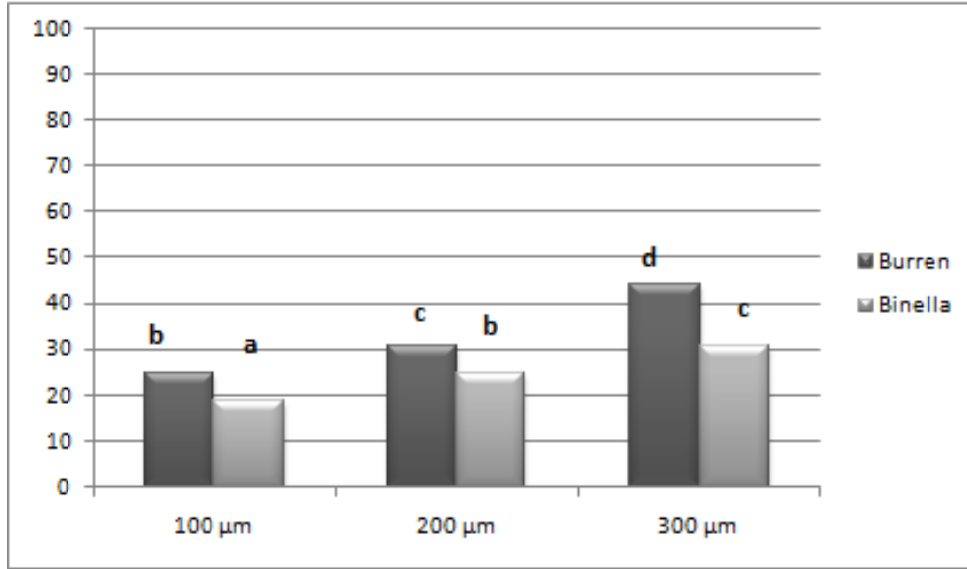
تتوافق النتائج التي تم الحصول عليها بعد 40 يوم من المعالجة الحرارية مع ما حصل عليه Luciana (1993) عندما عرض نباتات البطاطا المصابة لمدة 40 يوماً إلى درجة الحرارة 37 ± 2 °م، وتتعارض مع النتائج التي حصل عليها Faccioli and Rubies-Autonell (1982) حيث تمكنا من التخلص من الفيروس PVY من نباتات البطاطا مخبرياً بمعاملتها حرارياً بدرجة حرارة 35 °م لفترات تتراوح من 16 إلى 27 يوماً، لذا فإن مدة المعالجة الحرارية يجب أن تختار بتعقل، لأن التعرض المفرط لدرجة الحرارة العالية قد يؤثر سلباً في نمو أنسجة النبات.

إنّ المبدأ الأساسي للتخلص من الفيروسات باستخدام المعالجة الحرارية يعود إلى أنه في درجات الحرارة الأعلى من درجة الحرارة الطبيعية في النسيج النباتي العديد من الفيروسات تعطل جزئياً أو بالكامل مع أو بدون حدوث أذى في أنسجة المضيف (Baker, 1962)، كما أن درجات الحرارة المرتفعة تعيق تكوين الحمض الريبسي النووي وحيد السلسلة (Single-stranded RNA) و ssRNA والحمض الريبسي النووي مزدوج السلسلة (dsRNA (Double-stranded RNA) الفيروسية إضافة إلى قدرتها على تخريب المعطف البروتيني للفيروس (Mink et al, 1998).

الجدول 4 : تأثير المعالجة الحرارية وطول الميرستيم في نمو واستطالة نبيتات البطاطا بعد 60 يوماً من الزراعة
المخبرية في الصنفين بورين و بينيلا.

نسب الإصابة %		متوسط استطالة النموات بعد 60 يوماً (سم)		نسب العينات النامية %		طول الميرستيم (ميكرومتر)	المعالجة
Burren	Binella	Burren	Binella	Burren	Binella		
25 ^b	19 ^a	5.60 ^{cd}	5.20 ^{cd}	88 ^c	88 ^c	100	الحرارية
31 ^c	25 ^b	8.00 ^b	7.70 ^b	94 ^b	94 ^b	200	
44 ^e	31 ^c	10.40 ^a	9.80 ^a	100 ^a	100 ^a	300	
44 ^e	31 ^c	5.40 ^{cd}	4.90 ^d	88 ^c	86 ^d	100	الشاهد
56 ^f	38 ^d	7.70 ^b	6.60 ^{bc}	100 ^a	94 ^b	200	
81 ^h	75 ^g	9.90 ^a	9.60 ^a	100 ^a	100 ^a	300	
2.044		1,41		1.59		LSD	

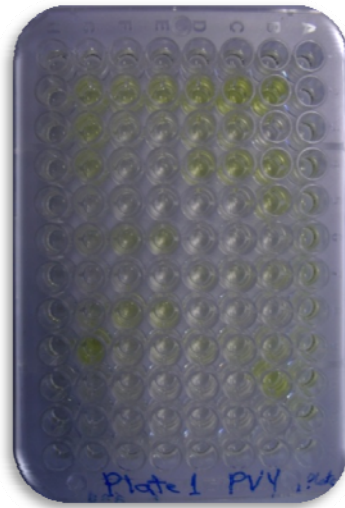
- تشير الأحرف المتشابهة إلى عدم وجود فرق معنوي بين المعاملات (تحليل ANOVA باستخدام برنامج SPSS على مستوى معنوية 0.01).



الشكل 10 : نسب الإصابة في الصنفين المدروسين بعد المعالجة الحرارية



a. Binella



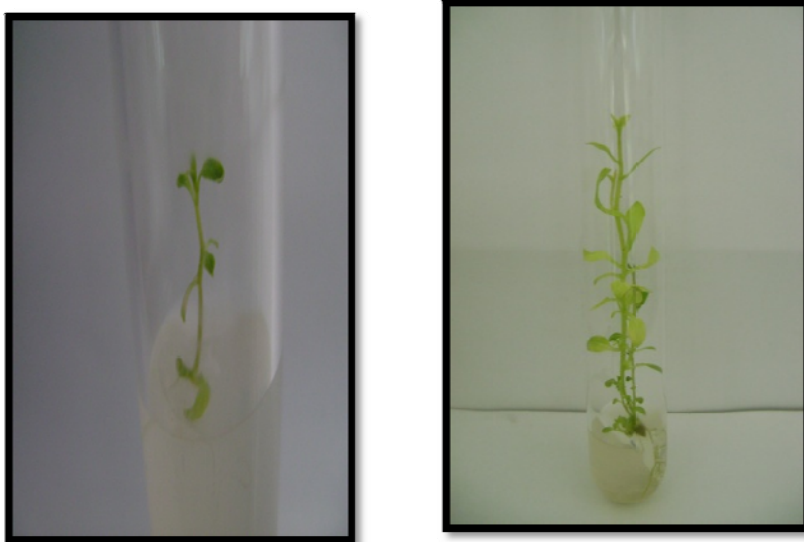
b. Burren

الشكل 11 : نتائج اختبار الإليزا على نموات البطاطا الناتجة عن زراعة القمم الميرستيمية بعد المعالجة

الحرارية (يشير اللون الأصفر إلى العينات المصابة بالفيروس Y)

4-4 المعالجة الكيميائية مع استئصال القمم الميرستيمية:

أدت إضافة مادة الريبافيرين بتركيز مختلفة (10، 20، 30) ملغ/ل إلى الوسط الخاص بالميرستيم تأثيراً عكسياً ، حيث لوحظ أن زيادة تركيزها أدت إلى انخفاض نسب النمو والاستطالة في جميع الأطوال المستخدمة للقمم الميرستيمية وفي كلا الصنفين حيث يوضح الجدول (5) انخفاض نسبة العينات النامية إلى 75% ، 82% في الصنفين بينيلا وبورين على التوالي وذلك عند زراعة القمم الميرستيمية ذات الطول 100 ميكرومتر في الوسط الذي أضيفت له مادة الريبافيرين بتركيز 30 ملغ/ل ، بينما ارتفعت إلى 87% ، 88% عند زراعتها بنفس الطول في وسط أضيف له الريبافيرين بتركيز 10 ملغ/ل ، كما يبين الجدول (5) انخفاض متوسط الاستطالة إلى 1.9 ، 1.5 سم في الصنفين بورين و بينيلا على التوالي عند زراعة القمم الميرستيمية بطول 300 ميكرومتر في وسط أضيفت له الريبافيرين بتركيز 30 ملغ/ل، وبالمقابل ارتفع المتوسط إلى 7.8 ، 6.5 سم في الصنفين بورين و بينيلا على التوالي عند زراعتها بنفس الطول في وسط أضيفت له هذه المادة بتركيز 10 ملغ/ل ، كما لوحظ أن النباتات التي نمت في وسط أضيف إليه الريبافيرين بتركيز 30 ملغ/ل أبدت اصفراراً وضعفاً في النمو (الشكل 12)، إلا أن هذا الأثر زال عند نقلها إلى وسط الإكثار (MS) الخالي من هذه المادة، وهذا يتوافق مع ما أشار إليه Faccioli (2001) حيث أشار إلى أن التراكيز المرتفعة لمادة الريبافيرين تسبب موت القمم الميرستيمية أو تبطئ العمليات الاستقلابية الخلوية.



الشكل 12 : اصفرار وبطء نمو العينات المزروعة في الوسط المضاف له مادة الريبافيرين بتركيز 30 ملغ/ل

ويوضح الجدول (5) أن أقل نسبة من العينات المصابة بالفيروس PVY تحققت عند زراعة القمم الميرستيمية بطول 100 ميكرومتر في الوسط المضاف له الريبافيرين بتركيز 30 ملغ/ل (18% في Burren و 13% في Binella) ، كما حصلنا على نتائج مماثلة عند إضافة الريبافيرين بتركيز 20 ملغ/ل للوسط (19% في Burren و 13% في Binella) الأشكال (13 و 14 و 15).

بينما أدت إضافة الريبافيرين بتركيز 10 ملغ/ل إلى الوسط للحصول على أعلى نسبة من العينات المصابة وذلك عند زراعة القمم الميرستيمية بطول 300 ميكرومتر في هذا الوسط (50% في Burren و 44% في Binella) ، هذه النتائج تتعارض مع ما توصل إليه العالم Gianni (2002) حيث حصل على أعلى نسبة من النباتات الخالية من الفيروسات عندما أضاف مادة الريبافيرين بتركيز 50 ملغ/ل، لكن Gudmestad (1985) حصل على نتائج مماثلة عندما أضاف ribavirin إلى وسط الميرستيم بتركيز 20 ملغ/ل .

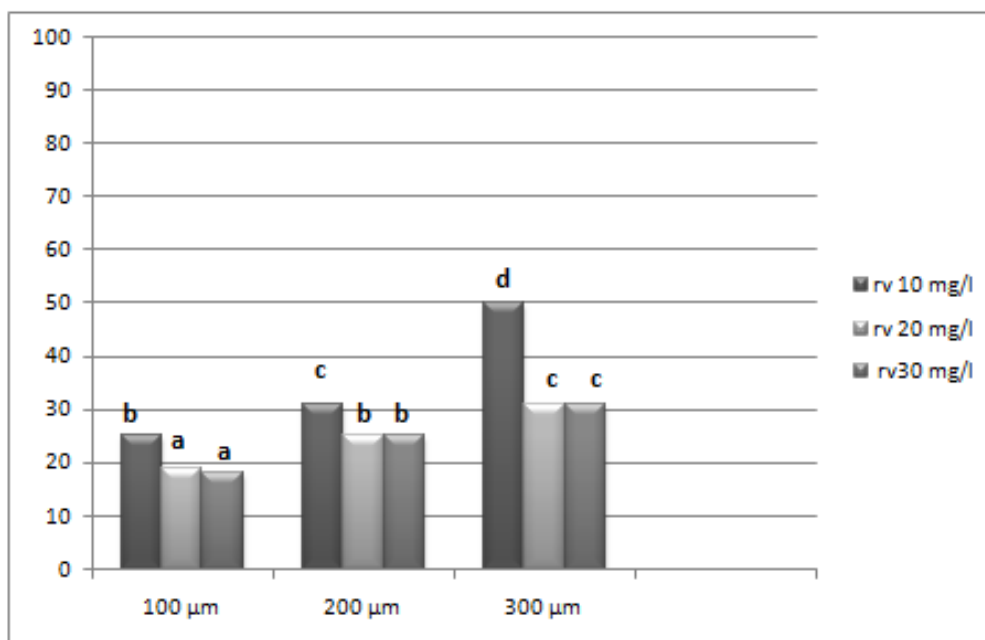
لمادة الريبافيرين طيف واسع من العمل ضد DNA أو RNA الفيروسات التي تصيب الإنسان و الحيوان (Sidwell *et al*, 1972) والنباتات (Dawson, 1984) ، وقد استعملت هذه المادة بنجاح في تجارب التخلص من الفيروسات PVS, PVM, PLRV , PVY , PVX (Kleinhempel *et al*, 1990) حيث تعمل هذه المادة على إعاقه عمل أنزيم RNA-capping enzyme من القيام بوظيفته بشكل جيد في ترجمة (Messenger-RNA) mRNA .

وعلى الرغم من أننا حصلنا على نتائج متماثلة عند إضافة الريبافيرين للوسط بتركيز 30 ملغ/ل و 20 ملغ/ل إلا أن التركيز المرتفع من الريبافيرين كان له أثراً سلبياً مما انعكس سلباً على نمو العينات النباتية وهذا يتوافق مع ما أشار إليه Faccioli (2001) من أن تركيز العديد من المواد الكيميائية المضادة للفيروسات التي تستخدم في العلاج الكيماوي للنباتات المصابة تكون قريبة جداً من التراكيز السامة للنباتات.

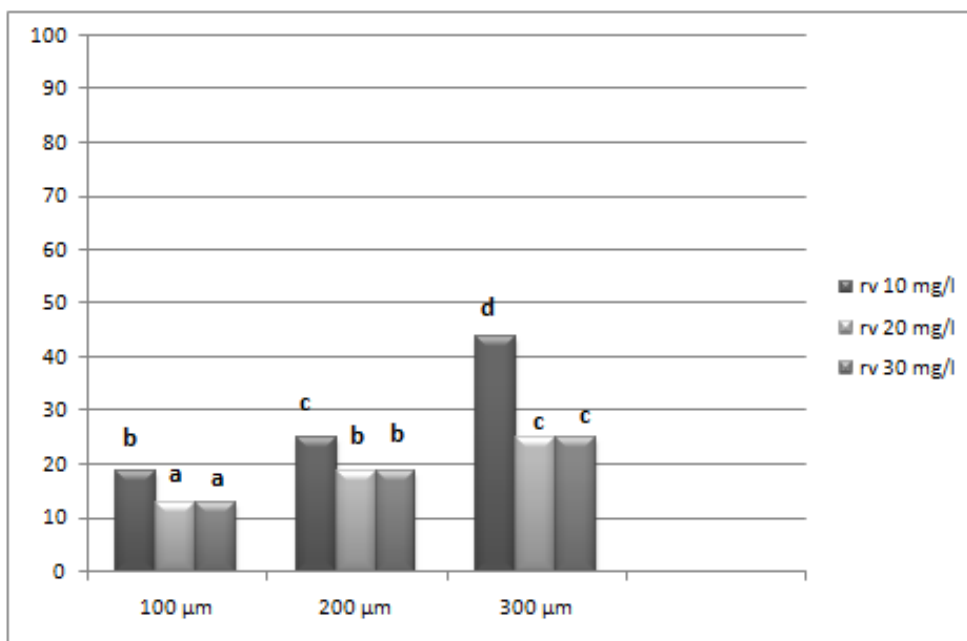
الجدول (5) تأثير المعالجة الكيميائية وطول الميرستيم في نمو واستطالة نبيتات البطاطا بعد 60 يوماً من الزراعة المخبرية في الصنفين بورين و بينيلا.

نسب الإصابة %		متوسط استطالة النموات بعد 60 يوماً (سم)		نسب العينات النامية %		طول الميرستيم (ميكرومتر)	المعالجة
Burren	Binella	Burren	Binella	Burren	Binella		
25 ^c	19 ^b	4.85 ^g	4.33 ^g	88 ^e	87 ^e	100	ريبافيرين 10 ملغ / ل
31 ^d	25 ^c	7.30 ^{bc}	5.50 ^{defg}	100 ^a	94 ^c	200	
50 ^g	44 ^f	7.80 ^b	6.50 ^{bcd}	100 ^a	100 ^a	300	
19 ^b	13 ^a	2.33 ^h	2.10 ^h	88 ^e	93 ^c	100	ريبافيرين 20 ملغ / ل
25 ^c	19 ^b	5.57 ^{defg}	5.07 ^{efg}	94 ^c	96 ^b	200	
30 ^d	25 ^c	7.67 ^{bc}	6.43 ^{bcde}	94 ^c	96 ^b	300	
19 ^b	13 ^a	1.90 ^h	1.50 ^h	82 ^g	75 ^h	100	ريبافيرين 30 ملغ / ل
25 ^c	18 ^b	4.93 ^{fg}	4.23 ^g	88 ^e	91 ^d	200	
30 ^d	25 ^c	7.40 ^{bc}	6.30 ^{cdef}	93 ^c	97 ^b	300	
31 ^d	44 ^f	5.40 ^{defg}	4.90 ^{fg}	88 ^e	86 ^f	100	الشاهد
56 ^h	38 ^e	7.70 ^{bc}	6.60 ^{bcd}	100 ^a	94 ^c	200	
81 ^j	75 ⁱ	9.90 ^a	9.60 ^a	100 ^a	100 ^a	300	
2.044		1.41		1.59		LSD	

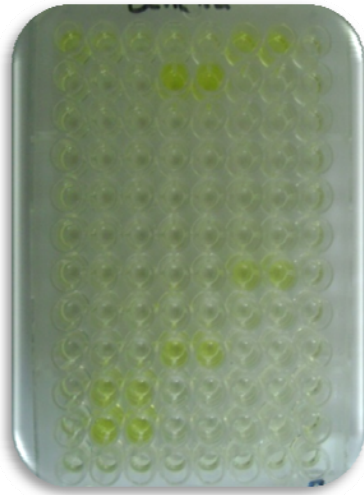
- تشير الأحرف المتشابهة إلى عدم وجود فرق معنوي بين المعاملات (تحليل ANOVA باستخدام برنامج SPSS على مستوى معنوية 0.01).



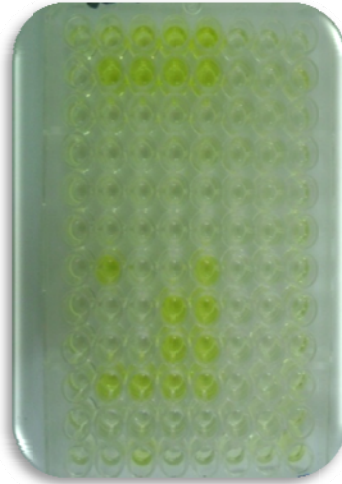
الشكل 13: نسب الإصابة في الصنف بورين بعد المعالجة الكيميائية.



الشكل 14 : نسب الإصابة في الصنف بينيلا بعد المعالجة الكيميائية.



a. Binella



b. Burren

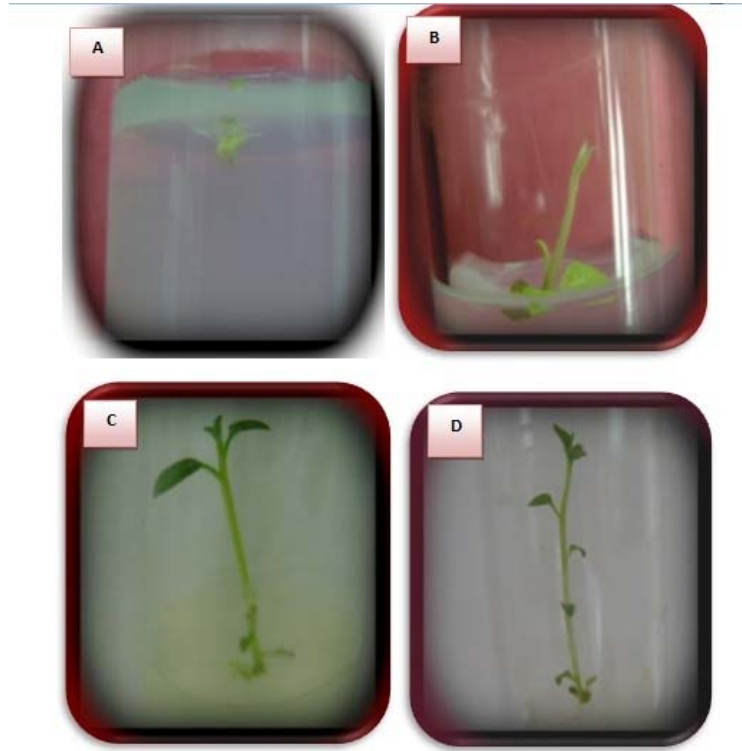
الشكل 15 : نتائج اختبار الإليزا بعد إضافة مادة الريبافيرين بتركيز 20 ملغ/ل

(يشير اللون الأصفر إلى العينات المصابة بالفيروس Y)

4-5 المعالجة الكهربائية مع استئصال القمم الميرستيمية :

عرضت العينات النباتية المصابة بالفيروس PVY في هذه التجربة إلى تيار كهربائي شدته 15 ميلي أمبير لمديتين زمنيتين مختلفتين (5 ، 10) دقائق ثم استئصلت القمم الميرستيمية بأطوال (100 – 200 – 300) ميكرومتر وزرعت على الوسط الخاص بالميرستيم.

لوحظ ارتفاع بسيط في معدل نمو العينات النباتية الناتجة عند زراعة القمم الميرستيمية المترافقة مع المعالجة الكهربائية، حيث يبين الجدول (6) تحقق أعلى متوسط للاستطالة في الصنفين بورين و بينيلا 10.6 ، 10.2 سم على التوالي وذلك بعد 60 يوماً من زراعة القمم الميرستيمية بطول 300 ميكرومتر والمعالجة بتيار شدته 15 ميلي أمبير لمدة 10 دقائق، أما أقل متوسط للاستطالة تحقق عند زراعة القمم الميرستيمية بطول 100 ميكرومتر بعد المعالجة بتيار شدته 15ميلي أمبير لمدة 5دقائق 5.50 ، 5.10 سم على التوالي في الصنفين بورين و بينيلا (الشكل 16).



الشكل 16 : مراحل نمو القمم الميرستيمية لعينات البطاطا المزروعة بطول 100 ميكرومتر (الصنف بورين)

A : بعمر شهر ، B : بعمر 60 يوماً ، C : بعمر 75 يوماً ، D : بعمر 90 يوماً

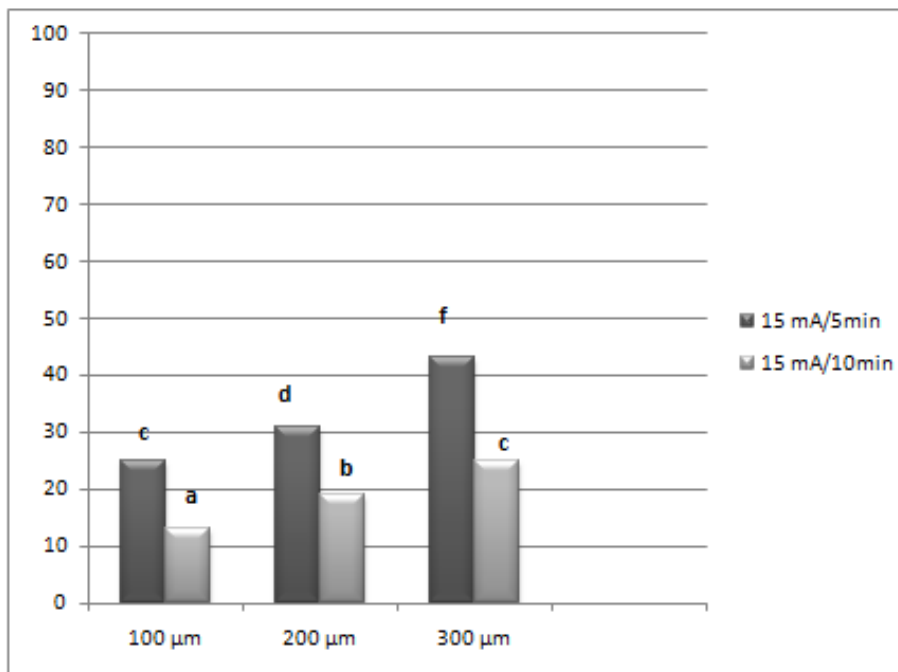
وتبين النتائج في الجدول (6) أن المعالجة بتيار كهربائي شدته 15 ميلي أمبير لمدة 10 دقائق والمترافقة مع زراعة القمة الميرستيمية بطول (100) ميكرومتر أعطت أقل نسبة من النباتات المصابة بالفيروس PVY في كلا الصنفين المدروسين حيث بلغت النسبة في الصنف بينيلا 7% وارتفعت إلى 13% في الصنف بورين ، الأشكال (17 و18 و19) ، وهذا يخالف ما توصل إليه Garcia وزملاؤه (1996) حيث حصل على نسبة أكبر من نباتات البطاطا الخالية من الفيروس PVX من الصنف Jara عند المعالجة بتيار شدته 15 ميلي أمبير لمدة 5 دقائق، ويتوافق مع ما توصل إليه Mahmoud وزملاؤه (2009) حيث أعطت المعالجة بتيار شدته 15 ميلي أمبير لمدة 10 دقائق أعلى نسبة من نباتات البطاطا الخالية من الفيروس PVY من الصنف Diamond. وتعود فاعلية المعالجة الكهربائية إلى تأثيرها على البروتين النووي الفيروسي حيث تعمل على رفع درجة حرارة النسيج النباتي من (4 إلى 10) °م (Garcia et al, 1996)، وتحت تأثير درجات الحرارة العالية يتخرب البروتين الذي يحمي الحمض النووي الفيروسي الأمر الذي يؤدي إلى تعطيل الفيروس وموته وانخفاض تركيزه

(Kassanis,1957)، كما أشار بعض العلماء إلى أن pH النسيج النباتي يتغير بعد المعالجة الكهربائية الأمر الذي يمنع حركة و تكاثر الفيروسات ; (Retivin and Opritov, 1992 ; Helliot *et al*, 2007).

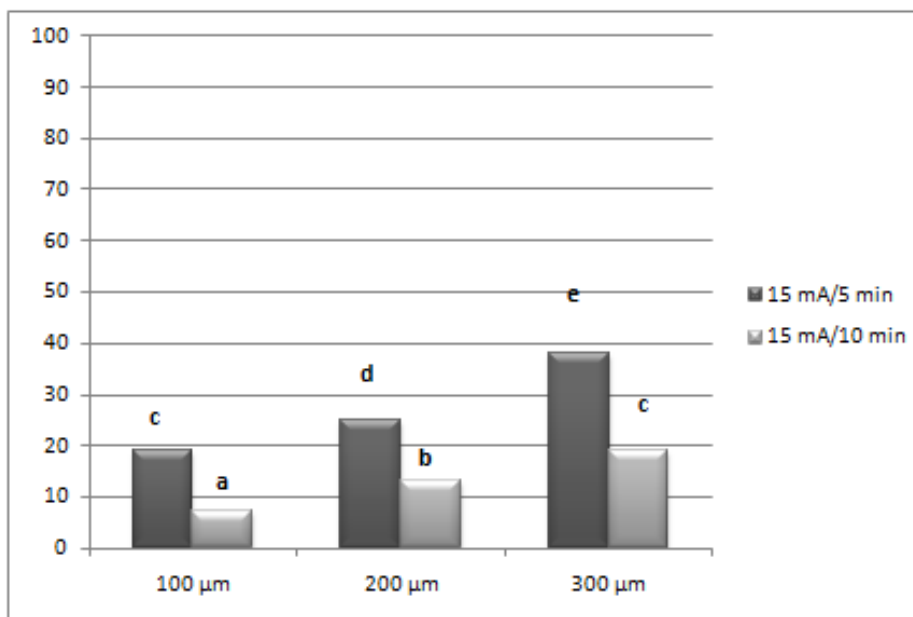
الجدول (6) تأثير المعالجة الكهربائية وطول الميرستيم في نمو واستطالة نبيتات البطاطا بعد 60 يوماً من الزراعة المخبرية في الصنفين بورين و بينيلا.

نسب الإصابة %		متوسط استطالة النموات بعد 60 يوماً(سم)		نسب العينات النامية %		طول الميرستيم (ميكرومتر)	المعالجة
Burren	Binella	Burren	Binella	Burren	Binella		
23 ^d	18 ^c	5.50 ^{def}	5.10 ^f	82 ^e	86 ^d	100	المعالجة الكهربائية 15 mA/5min
29 ^e	25 ^d	6.90 ^{bcd}	6.20 ^{cdef}	88 ^c	88 ^c	200	
43 ^g	38 ^f	10.43 ^a	10.10 ^a	94 ^b	88 ^c	300	
13 ^b	7 ^a	5.80 ^{def}	5.50 ^{def}	75 ^f	75 ^f	100	المعالجة الكهربائية 15 mA/10 min
17 ^c	13 ^b	7.45 ^{bc}	7.30 ^{bc}	88 ^c	86 ^d	200	
24 ^d	19 ^c	10.60 ^a	10.20 ^a	100 ^a	94 ^b	300	
31 ^e	44 ^g	5.40 ^{ef}	4.90 ^f	88 ^c	86 ^d	100	الشاهد
56 ^h	38 ^f	7.70 ^b	6.60 ^{bcde}	100 ^a	94 ^b	200	
81 ^j	75 ⁱ	9.90 ^a	9.60 ^a	100 ^a	100 ^a	300	
2.044		1.41		1.59		LSD	

- تشير الأحرف المتشابهة إلى عدم وجود فرق معنوي بين المعاملات (تحليل ANOVA باستخدام برنامج SPSS على مستوى معنوية 0.01).



الشكل 17 : نسب الإصابة في الصنف بورين بعد المعالجة الكهربائية



الشكل 18 : نسب الإصابة في الصنف بينيلا بعد المعالجة الكهربائية.



a.Burren



b.Binella

الشكل 19 : نتائج اختبار الإليزا بعد المعالجة الكهربائية (15 mA/10 min)

(يشير اللون الأصفر إلى العينات المصابة بالفيروس Y)

يشير الجدول (7) وبدلالة إحصائية واضحة إلى وجود فروق معنوية في نسب الإصابة بين المعاملات والأطوال المختلفة للقمم الميرستيمية ، حيث تفوقت المعالجة الكهربائية بتيار شدته 15 mA لمدة 10 دقائق والمترافقة مع زراعة الطول 100 ميكرومتر في الصنف بينيلا عل بقية المعاملات في تحقيق أعلى نسبة من العينات الخالية من الفيروس Y بينما حققت النسبة الأقل من العينات الخالية من الفيروس Y عند زراعة القمم الميرستيمية بطول 300 ميكرومتر وبدون أي معاملة (الشاهد) في الصنف بورين.

الجدول (7) اختلافات نسب الإصابة بالفيروس PVY باختلاف المعاملات و أطوال القمم الميرستيمية

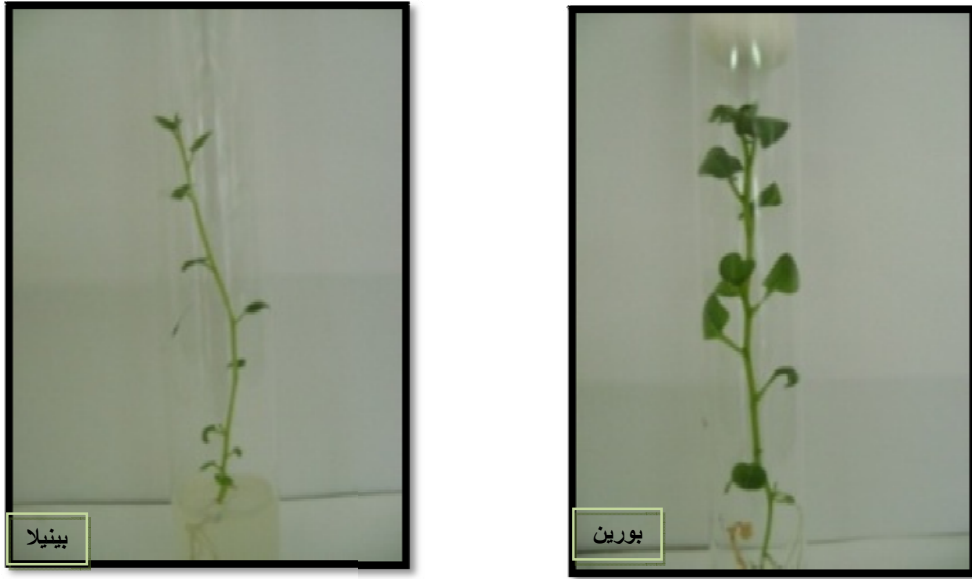
100 ميكرومتر		200 ميكرومتر		300 ميكرومتر		طول الميرستيم
Burren	Binella	Burren	Binella	Burren	Binella	المعالجة
44.00 bi	31.00 ag	56.00 bk	38.00 ah	81.00 bm	75.00 al	الشاهد
25.00 bf	19.00 ae	31.00 bg	25.00 af	50.00 bj	44.00 ai	ريفافيرين 10 ملغ/ل
19.00 be	13.00 ad	25.00 bf	19.00 ae	30.00 bg	25.00 af	ريفافيرين 20 ملغ/ل
25.00 bf	19.00 ae	31.00 bg	25.00 af	44.00 bi	31.00 ag	الحرارية
23.00 bf	18.00 ae	29.00 bg	25.00 af	43.00 bi	38.00 ah	الكهربائية 15mA/5min
13.00 bd	7.00 ac	17.00 be	13.00 ad	24.00 bf	19.00 ae	الكهربائية 15mA/10min
LSD= 2.044						

* تشير الأحرف (a و b) إلى وجود فروق معنوية بين الأصناف.

** تشير الأحرف (c, d, e, f.....etc) إلى وجود فروق معنوية بين التفاعل : الصنف * المعاملة * طول الميرستيم عند مستوى معنوية 0.01 .

4-6 مرحلة الإكثار: Multiplication phase

لوحظ في مرحلة الإكثار والاستطالة أن هناك تفاوت في قوة النمو بين الأصناف المدروسة، حيث أعطى الصنف بورين نمواً خضرياً أقوى وأوراق أكبر من الصنف بينيلا، كما لوحظ أيضاً تباين بأطوال النموات الخضرية للأصناف المدروسة في هذه المرحلة، حيث وصلت بعد شهر من الزراعة إلى طول حوالي 10 سم في الصنف بورين بينما وصلت في الصنف بينيلا إلى 8 سم. (الشكل 20).



الشكل 20 : نموات البطاطا الناتجة عن زراعة القمم الميرستيمية في وسط الإكثار

كما يشير الجدول (8) إلى تفوق الصنف بورين على الصنف بينبلا في تأثيره على استطالة النموات الناتجة عن زراعة القمم الميرستيمية وفي جميع المعاملات وهذا يتفق مع ما أشار إليه المركز الدولي للبطاطا (International Potato Center) عام 1993.

الجدول (8) تأثير الصنف في استطالة نبيتات البطاطا .

متوسط استطالة العينات النباتية (سم)	الصنف
a 7.254	بورين
b 6.356	بينبلا
LSD = 0.31	

* تشير الأحرف المختلفة لوجود فروق معنوية عند مستوى معنوية 0.01

وبين الجدول (9) تفوق تأثير المعالجة الكهربائية بتيار شدته 15 mA لمدة 10 دقائق على بقية المعاملات على استطالة نبيتات البطاطا يليها المعالجة بنفس التيار لمدة 5 دقائق ثم المعالجة الحرارية ويعود ذلك إلى أنه خلال تعريض النباتات لمستوى غير مميت من درجات الحرارة المرتفعة يتم تصنيع العديد من البروتينات نتيجة التعبير الوراثي للعديد من المورثات التي تستجيب للحرارة العالية . وتعمل هذه البروتينات على تحسين قدرة النبات على تحمل الإجهاد الحراري. تسمى البروتينات

المصنّعة استجابة للتحريض الحراري بروتينات الصدمة الحرارية Heat Shock Proteins ، والتي تعد بمنزلة وسائل دفاعية يستخدمها النبات لضمان سلامة مكوناته الخلوية الأكثر حساسية للحرارة العالية. وتبقى هذه البروتينات محتفظة بقدرتها الدفاعية لفترة زمنية بعد انتهاء التحريض، وتلعب بروتينات الصدمة الحرارية في العديد من الأنواع النباتية دوراً حيوياً في حماية الخلية النباتية، وإبقاء الخلايا النباتية حية، وبالتالي ضمان قدرتها على استعادة النمو بشكل جيد إذا ما زال العامل المطبق عليها والمتمثل بارتفاع درجة الحرارة عن المعدل المناسب (Vierling,1991).

الجدول (9) تأثير المعاملات المختلفة في استطالة نبيتات البطاطا الناتجة

المعالجة	متوسط استطالة النموات (سم)
الكهربائية 15mA/10min	a 8.4167
الكهربائية 15mA/5 min	a 8.0556
الحرارية	a 7.8889
الشاهد	a 7.6556
ريبافيرين 10 ملغ/ل	b 6.2794
ريبافيرين 20 ملغ/ل	c 4.8611
ريبافيرين 30 ملغ/ل	c 4.4778
LSD = 0.8142	

* تشير الأحرف المختلفة إلى وجود فروق معنوية عند مستوى معنوية 0.01

الفصل الخامس:

الاستنتاجات والمقترحات

CONCLUSION AND RECOMENDATION

5-الاستنتاجات

- (1) تم الحصول على نباتات خالية من الفيروس PVY بدءاً من نباتات مصابة به.
- (2) تزداد نسبة الإصابة بالفيروس مع زيادة طول القمة الميرستيمية سواءً زرعت منفردة أو مترافقة مع المعاملات (الحرارية، الكيميائية، الكهربائية).
- (3) خفضت نسبة الإصابة بالفيروس PVY بشكل واضح في كافة الطرائق المستخدمة (الحرارية، الكيميائية، الكهربائية) المترافقة مع زراعة القمم الميرستيمية.
- (4) إن المعالجة الكهربائية بتيار شدته 15mA لمدة 10 دقائق أعطت أقل نسبة إصابة بالمقارنة مع المعاملات الأخرى.

6-المقترحات والتوصيات

- 1) نقترح تطبيق المعاملات المختلفة على نباتات البطاطا المصابة بالفيروس PVY وخاصة المعالجة الكهربائية بتيار شدته 15mA لمدة 10 دقائق المترافقة مع زراعة القمم الميرستيمية بطول 100µm لإنتاج نباتات خالية من الفيروس PVY.
- 2) إجراء المزيد من التجارب حول استخدام المعالجة الكهربائية والكيميائية والحرارية مع استئصال القمم الميرستيمية في عملية إنتاج نباتات خالية من الفيروسات، وتطبيق هذه التقنية على الأصناف الأخرى المنتشرة في سوريا.
- 3) تطبيق المعاملات المختلفة وخاصة الكهربائية على نباتات البطاطا المصابة بالفيروسات الأخرى لإنتاج بذار خالي من الأمراض الفيروسية.

الفصل السادس: المراجع

REFERENCES

المراجع العربية:

- (1) المجموعة الإحصائية الزراعية السنوية. 2010. الجمهورية العربية السورية، وزارة الزراعة ، مديرية الاقتصاد الزراعي ، قسم الإحصاء.
- (2) المعري، خليل ؛ الطويل، خالد؛ عبد القادر، أحمد. 2008. تكوين درينات دقيقة في بعض أصناف البطاطا بواسطة زراعة الأنسجة. الندوة العلمية . واقع زراعة البطاطا في سورية - معوقاتها وآفاق تطويرها. جامعة دمشق - سورية.
- (3) بوراس، متيادي. 1989. إنتاج الخضار. منشورات جامعة دمشق، كلية الزراعة. ص 438 - 460 .
- (4) حسن، محمود. 1981. أمراض النبات الخاص. الجزء العملي والنظري. منشورات جامعة تشرين، كلية الزراعة. ص 214.
- (5) علام ، عصمت خالد. 1993. فزيولوجيا أساسيات. منشورات جامعة عين شم كلية الزراعة. ص 595.
- (6) فضول، جودة توفيق؛ الشعبي، صلاح ؛ ديبية، علي نصر. 1986. الأمراض البكتيرية والفيروسية وغير الطفيلية. منشورات جامعة دمشق، كلية الزراعة. ص 361.
- (7) قواص، هدى؛ حمد، ابتسام. 2007. علم الفيروسات. منشورات جامعة دمشق. ص 520 .
- (8) مسعود، كاسر. 1981. أساسيات تربية النبات. منشورات جامعة حلب، كلية الزراعة مديرية الكتب والمطبوعات الجامعية. 350 صفحة.
- (9) منظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة ومكتب الكومنولث الزراعي . 1991. المرشد الوجيز في أمراض النبات. إصدار الجمعية العربية لوقاية النبات، 600 صفحة.

References:

1. **AlMaarri, K; Arnaud, E. T. E. and Miginiac, E. 1986.** Micropropagation in vitro du poirier cv "Williams" par culture des meristemes. 26th – Science week, auditorium. The University of Teshrine, latakia, Syria. 1 – 7 November.
2. **Austin, S; A.C. Cassells.1993.** Variation between plant regenerated from individual calli production from separated potato stem callus. *Plant Science Letter*. 31:107-114.
3. **Bajaj, Y. P. S. 1987.** Biotechnology in agriculture and forestry. Vol.3 potato. 500P.
4. **Baker, R. 1962.** Thermotherapy of planting material, *Phytopathology*, 52:1244-1255.
5. **Black, J. D.1971.** Electrical stimulation and its effect on growth and ion accumulation in tomato plants. *Canadian Journal Botanical*. 49:1805-1815.
6. **Clark, M.F and Adams, A. N. 1977.** Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen.Virol*.34:475-483.
7. **Dawson, W. O. 1984.** Effects of animal antiviral chemicals on plant viruses. *Phytopathology*, 74: 211-213.
8. **De Bokx, J.A and Van der Want, J. P. H.1987.** Viruses of potatoes and seed-potato production. Pu. doc., wageningen, Netherlands, 259 pages 405-421.
9. **Ellis, P. J. and Wieczorek, A. 1992.** Production of monoclonal antibodies to beet western yellow virus and PLRV and their use in luteovirus detection. *Plant disease*, 76:75-78.
10. **Emami Meybodi, D; Mozafar, J; Babaeiyan, N and H. Rahimian. 2011.** Application of Electrotherapy for the Elimination of Potato Potyviruses. *Journal of agriculture science*. Vol.13: 921-927.
11. **Ermishin, A. P. 1994.** On production of microtubers of virusless Potato clones. *Selektsiya-l- semenovodestvo*. No.4: 47-49.

12. **Espinoza, N; Lizarrage, R; Siguenas, C; Buitron,F; Bryan,J.E; J.H.Dodds.1992.** Tissue culture: Micropropagation conservation and export of potato germplasm. International Potato Center (CIP). Research guide 1. 19P.
13. **Faccioli, G. 1982.** PVX and PVY Distribution in Potato Meristem Tips and their Eradication by the Use of Thermotherapy and Meristem-tip Culture. *Journal of Phytopathology*, 103(1).
14. **Faccioli, G and Rubies-Autonell, C. 1982.** PVX and PVY distribution in potato meristem tips and their eradication by the use of thermotherapy and meristem-tip culture. *Phytopathol. Zeitchrift*. 103: 66-76.
15. **Faccioli, G and Zoffoli, R. 1998.** Fast Eradication of Potato Virus X and Potato Virus S from Virus Infected Potato Stem Cutting by Chemotherapy. *Phytopath. Medit*. 37: 9-12.
16. **Faccioli, G. 2001.** Control of Potato Viruses using Meristem and Stem-cutting Cultures, Thermotherapy and Chemotherapy Scientific Information, 2(3): 191-197.
17. **Firman, D. M. 1984.** Gibberellic acid as a media additive for *in vitro* propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of agriculture science*. 103:703-704.
18. **Garcia,R.G; Lozoya-Saldana,H and Abello, J. F. 1996.** Electrotherapy and shoot tip culture eliminate potato virus X in potatoes. Vol. 73.
19. **Gianni, F. 2002.** Eradication of Potato virus Y and Potato leaf roll virus by chemotherapy of infected potato stem cuttings. vol.41: 76-78.
20. **Gudmestad, C. 1985.** Eradication of potato virus Y and S from potato by chemotherapy of cultured auxiliary bud tips. Vol. 62:667-67.
21. **Helliot,B;Panis, B; Hernandez, R; Swennen. R; Lepoivre, P. and Frison, E. 2007.** Development of *in vitro* techniques for the elimination of cucumber mosaic virus from banana (*Musa* spp.) *European Journal of Histochemistry*. 51: 153-158.
22. **Holland. 1996.** Potato Diseases, pest and defects. Casparie, Den Haag. 2ed.180pp.

23. **Hooker, W. j.1982.** Virus diseases of potato Tech. Infor. Bulletin 19.LimA .Peru. CIP.
24. **International Potato Center (CIP). 1983.** True potato seed. An alternative for production .Lima 12 P.
25. **International Potato Center (CIP). 1993.** Basic techniques in plant. Lima, Peru.
26. **Jona, R and Menini, U. G.** Tissue culture of selected tropical fruit plants. FAO & Agriculture Organization United Nation, 79. 124p.
27. **Jung-Yoon Yi; Hyo-Won Seo; Young-Mee Choi and Young- Eun Park. 2003.** Ribavirin, Electric Current, and Shoot-tip Culture to Eliminate Several Potato Viruses. *Journal of Plant Biotechnology*, Vol.5:101-105.
28. **Kartha, K.K and Gamborg,O.L. 1975.** Elimination of cassava mosaic disease by meristem culture. *Phytopathology*. 65:826-828.
29. **Kassanis, B. 1957.** The use of tissue culture to produce virus-free clones from infected potato varieties *Ann. Appl. Boil.* 45:422– 427.
30. **Kassanis, B. and Varma, A.1967.** The production of virus-free clones of some British potato varieties. *Ann. Appl. Boil.* 59:447-450.
31. **Khurana S.M.** 1990. Detection potato virus and viroid in India Report of the planning conference, LimA. Peru. CIP. 61-64.
32. **Kleinhempel, D; Schenk, G; Bittner, H; Gase, G and Kurzinger, B. 1990.** Determination of virus resistance under *in vitro* conditions. *Eur. Assoc. Potato Res.* 5: 341- 342.
33. **Klein, R.E. and Livingston, C. H. 1983.** Eradication of potato viruses X & S from potato shoot-tip culture with Ribavirin *Phytopathology*. 73:1049-1050.
34. **Limasset, P and Cornuet, P.1949.** Recherche du virus de la mosaïque du tabacco (Marmor tabaci Holmes) dans les Meristems des plantes infectees. *C. R. Acad Sci. Paris* 228:1971-1972.

35. **Lizarrage, R; Panta, A; Jayasinghe, U. and Dodds, J. H., 1991.** Tissue culture for elimination of pathogens. International Potato Center (CIP). Research Guide, 3:21 P.
36. **Long, R. D and Cassells, A. C. 1984.** Elimination of virus from tissue cultures in the presence of antiviral chemicals, in plant tissue culture and its agricultural applications, Butterworths, UK: 239-248.
37. **Love, S. L; Rhodes, B. B. and Moyer, J. W. 1987.** Meristem-tip culture and virus indexing of sweet potato. International Board Genetic Recourse. (IBPGR). Rome. 46 P.
38. **Luciana, N. 1993.** Stock indexing and Potato virus Y elimination from potato plants cultivated *in vitro* .vol. 60:525-530.
39. **Mahmoud, S. Y. M; Hosseny, M. H. and Abdel-Ghaffar, M. H. 2009.** Evaluation of some therapies to eliminate potato Y potyvirus from potato plants. Int. J. Virol., 5: 64-76.
40. **Mink, G.I; Wample, R and Howell, W. E. 1998.** Heat treatment of perennial plants to eliminate phytoplasmas, viruses and viroids while maintaining plant survival. *Plant Virus Disease Control*. p. 332-345.
41. **Morel, G. and Martin, C. 1955.** Guerison de pommes de terre atteintes de maladies a virus . C. R. Séance Acad. Agric. Fr.41:472-475.
42. **Murashige, T. and Skoog, F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*.15:473-497.
43. **Nascimento, L. C; Pio-Riberio, G, Willadino, L. and Andrade, G. P. 2003.** Stock indexing and potato virus Y elimination from potato plants cultivated *in vitro*. *Scientia Agricola*, 60: 525-530.
44. **Nasir Idrees Ahmad; Tabassum Bushra; Latif Zakia; Aslam Javed, M; Saleem Haider, M; Arshad Javed, M and Tayyab Husnain. 2010.** Strategies to control potato virus Y under *in vitro* conditions. Pak. J. Phytopathol. Vol. 22(1): 63-70.

45. **Pazhouhandeh, M. 2001.** Establishment of *in vitro* Gene-bank for Virus-free Potato Germplasm. MSc Thesis, Tarbiat Modarres University. Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
46. **Pazhohandeh, M; Mozafari, J and Alizadeh, A. 2002.** Electrotherapy a New Technique for Virus Eradication from Plants. In: Proceedings of the 15th Iranian Plant Protection Congress. Razi University of Kermanshah, Iran: 189-190.
47. **Pazhouhandeh, M; Mozafari, J and Shirzad Akbar. 2004.** Efficiency of different virus elimination methods in potato *in vitro* plantlets. 12th EAPR Virology. Section Meeting Rennes, France.
48. **Pevalek, K.B and Jelaska, S. 1987.** Microclonal propagation of *Prunus avium*. Acta Hort.212:599-601.
49. **Pierik, R.L.M. 1987.** *In vitro* culture of higher plants. 344P.
50. **Retivin, V.G and Opritov, V.A. 1992.** Estimation of cold resistance of higher plants from electrophysiological analysis of their excitability. Sov. Plant Physiol.39: 821-825.
51. **Rolando, A.K; Tovar, P and Dodds, J. H. 1985.** Induction of *In vitro* tubers in abroad range of potato genotype .Plant Cell. Tissue and organ culture 7:3-10.
52. **Salazar, L. F. 1983.** Virus Detection in potato seed production. Tech. Infor Bulletin18. Lima. Peru. CIP.
53. **Savigny, D. de and Voller. 1980.** The communication of ELISA data from laboratory to clinician. *J. Immunoassay* 1:105-128.
54. **Sawyer, R. L. 1992.** Biotechnology and biosafety developments at the International Agriculture Research Center. International Potato Center (CIP). Lima. Proceedings of the royal society of Edinburgh 99B. 314:165-172.
55. **Schenk, G. 2008.** Chemotherapeutical Elimination of Potato Virus X from Potato Stem Cuttings. Vol.120: 90 – 92.
56. **Sharma, P; Buddhi; Shambhu; Dhital, P. and Hak Tae Lim. 2008.** Electrotherapy and Chemotherapy for Eliminating Double-Infected Potato Virus (PLRV and PVY) from *In vitro* Plantlets of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Vol.49:52-57.

57. **Singh, R. P; Valkonen, J. P. T. and Gray, S.M. 2008.** The naming of Potato virus Y strains infecting potato. Archives of Virology.
58. **Sidwell, R. W; Huffman, J. H; Khare, G. P; Allen, L. B; Witkowski, J. T and R. K. Robins. 1972.** Broad spectrum antiviral activity of virazole 1- β -D-ribofuranosyl- 1,2,4-triazole-3- carboxiamide. *Science*, 177: 705-706.
59. **Tovar, P. and Dodds, J. H .1986.** Tissue culture propagation of potato. International Potato Center (CIP). Slide training series, 1-5:12P.
60. **Vetten, H. J; Naidu. R. A. and Makkouk, K. M. 1994.** Diagnosis of plant viruses course schedule Syria-Aleppo-ICARDA. 75P.
61. **Vierling, E. 1991.** The role of heat-shock proteins in plants. *Ann. Rev. Plant Physiology Plant Mol. Bio.* vol.32:370-377.
62. **Visessuwan, R; Chiemsombat, P; Naritoom, K. and Surijachaijakorn, M. 1999.** Role of growth regulators in meristem culture and production of virus-free plants. Vol. 1: 82-88.
63. **Walkey, D. G. A. 1985.** Applied plant virology.329P.
64. **Wang, P. J. and Hu, N. Y.1980.** Regeneration of virus-free plants through *in vitro* culture. In: A. Fiechter (Editor), Advances in Biochemical Engineering: plant cell culture, II. springer-verlag, Berlin,pp.61-99.
65. **Wareh, H; Trolinder, N. L; Goodin, J. R. 1989.** *In vitro* flowering of potato. Hortscience. 24 (4):680-682.
66. **Watt, G. W. and Merrill, A. L. 1963.** Composition of foods .U. S. Dept .Agr. Handbook No.8.190p.
67. **Wiersema, S. G. 1982.** Evaluation of technology for production of seed tubers from true potato seed. International Potato Center (CIP). Technology Evaluation Series NO.1:14 P.
68. **Zhang, H; Salazar, I. F. and Bo Fu, S. 1990.** The advances of virus testing in China report of the III planning conference Lima. Peru. CIP. PP. 73-81.

Web Sites: <http://www.Sana.sy> , <http://www.Fao.org>

Abstract:

This study was conducted to obtain a virus-free propagation material from two cultivars of potato (Burren and Binella) infected with potato virus Y (PVY), by using the meristem culture technique with three different therapies, thermo-, chemo- and electrotherapies. The Meristem (lengths were 0.1, 0.2, 0.3 μm) were excised from infected plants, solidified MS medium containing 30 g/l sucrose, and supplemented with Vitamins (5 mg/l Ascorbic acid, 5 mg/l Pyridoxine, 5 mg/l Nicotinic acid, 5 mg/l Thiamine, 200 mg/l Inositol) and Hormones (2 mg/l GA3 , 0.2 mg/l kinetin) was used. Virus status of in vitro plantlets was determined by double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay (DAS-ELISA). Results showed that the usage of the size 0.1 μm gives the highest rate of virus-free plants. After treatment of thermotherapy at approximately $37\pm 2^\circ\text{C}$ during 40 days, the highest rate of PVY elimination achieved when the meristem in length of (100 μm) were excised (75%) in Binella and (69%) in Burren. These results indicated that thermotherapy is moderately efficient for PVY elimination. Chemotherapy was undertaken with (10-20-30) mg L-1 ribavirin (RBV) , The highest numbers of virus free plantlets 87% in Binella and 82% in Burren were obtained from the ribavirin's concentration (20 mg/ l) combined with meristem-tips in length (100 μm). This study indicated that PVY was not completely eliminated by the treatment of ribavirin alone and showed severe growth abnormalities specially when we added the ribavirin (30 mg/l) to the meristem's medium . Finally, the highest rates of PVY (93% in Binella and 87% in Burren) free plantlets were obtained from meristem-tips in length 100 μm excised after electric treatments (15 mA /10 min). so our study indicated that electric shock had higher efficiency for PVY elimination.

**Damascus University
Faculty of Agriculture
Department of Horticulture**



**A Comparative Study Between Different Methods To
Produce In vitro Virus Y-free Potato seeds**

**Thesis Submitted in partial fulfillment of requirement for
Master of agriculture (Horticulture Dep.)**

**Presented by
Rima Riad Massa**

**Co-Supervisor
Dr. Fahed AL-Biski**
National Commission of Biotechnology

**Supervisor
Prof. Dr. Khalil Al Maari**
Faculty of Agriculture, Damascus, Syria

2011