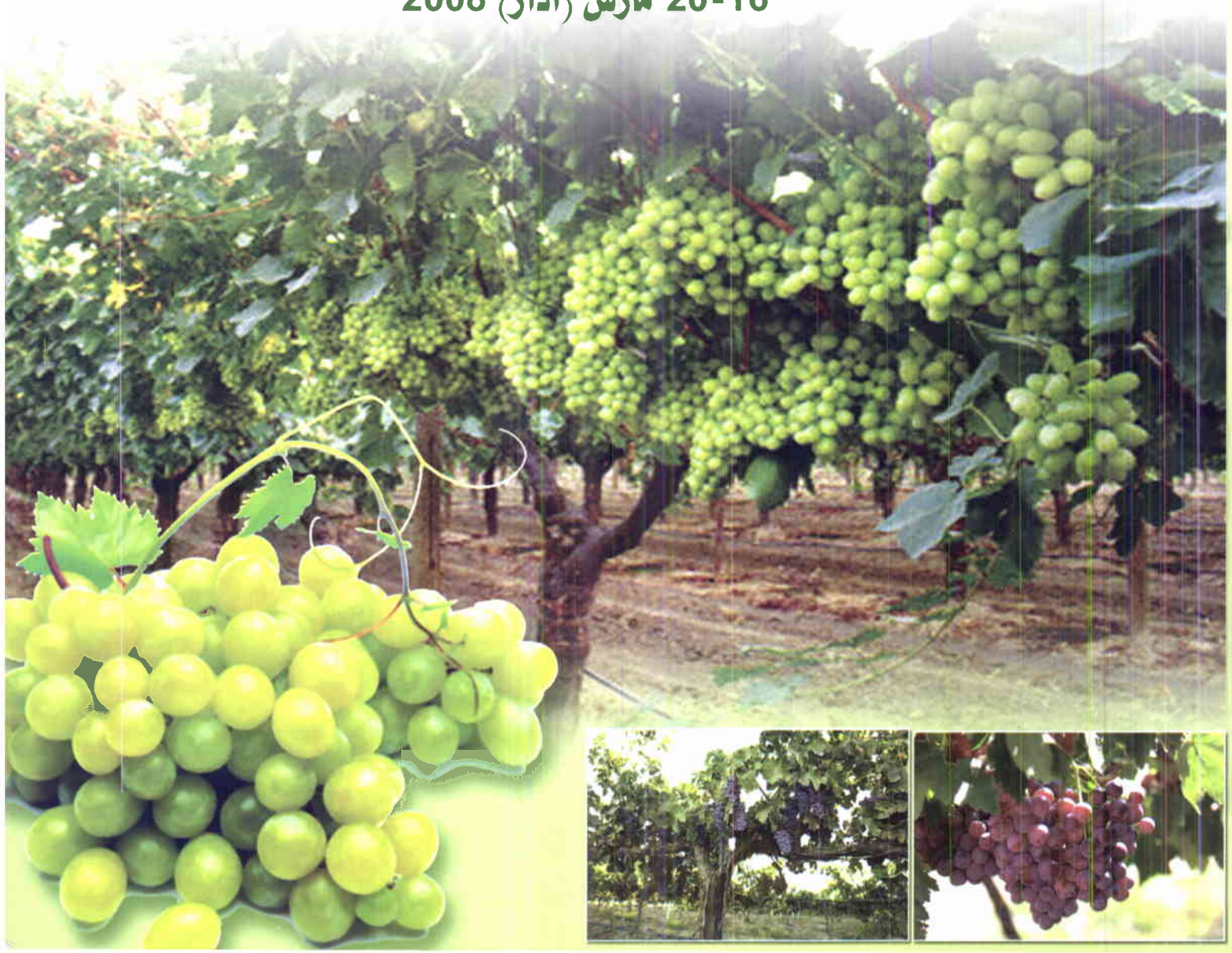
المنظمة العربية للتنمية الزراعية

الدورة التدريبية القومية
في مجال
تقانات إنتاج أشتال العنب الخالية من الأمراض الفيروسية

عمان - المملكة الأردنية الهاشمية



16-20 مارس (آذار) 2008

AC634.8042
aoad

المنظمة العربية للتنمية الزراعية

الدورة التدريبية القومية
في مجال
تقانات إنتاج أشتال العنب الخالية من الأمراض الفيروسية

عمان/ المملكة الأردنية الهاشمية 16 – 20 مارس (آذار) 2008

الخرطوم سبتمبر (كانون أول)2008

المنظمة العربية للتنمية الزراعية
وحدة المكتبة

فهرسة المكتبة الوطنية – السودان

634.82 المنظمة العربية للتنمية الزراعية

م ع. د

الدورة التدريبية القومية في مجال تقانات إنتاج أشتال العنب الخالية من الأمراض الفيروسية-عمان/المملكة الأردنية الهاشمية 16-20/مارس(آذار) 2008م/ المنظمة العربية للتنمية الزراعية. – الخرطوم:المنظمة العربية للتنمية الزراعية،2008.

153ص ؛ إيض؛ 24 سم .

ردمك : 978-99942-0-118-1

1.العنب – أنسجة نباتية – زراعة.

2.الفيروسات النباتية – تشخيص.

3.الفواكه – أمراض.

أ. العنوان.

المنظمة العربية للتنمية الزراعية
12 DEC 2000
الرقم: 51088

التقديـــــم

المنظمة العربية للتنمية الزراعية
وحدة المكتبة

تقـــديـــم

يعتبر العنب من أكثر محاصيل الفاكهة انتشاراً في العالم، ومن أهمها من الناحية الغذائية والطبية، حيث يعد من محاصيل الفاكهة القديمة جداً وقد جاء ذكره في القرآن الكريم في أحد عشر موضعاً كما ذكر كذلك في كتاب الطب النبوي على أنه أحد الفواكه الثلاث التي تعتبر من ملوك الفاكهة (الرطب والتين والعنب)، وقد كان من أحب الفواكه الرطبة إلى الرسول – صلى الله عليه وسلم.

تتميز شجيرات العنب بأنها تتحمل رداءة التهوية وملوحة التربة بدرجة أكبر من بعض أنواع الفاكهة الأخرى لذلك يمكن زراعة العنب في أنواع مختلفة من الأراضي حيث أنه يتحمل كثيراً من الظروف غير الملائمة.

يلعب العنب دوراً اقتصادياً مهماً على مستوى العالم حيث يحتل مرتبة متقدمة من حيث الإنتاج مقارنة بأصناف الفاكهة الأخرى، وتعتبر إيطاليا، فرنسا، أسبانيا وأمريكا من أهم الدول المنتجة للعنب على مستوى العالم، أما على مستوى الوطن العربي فتحتل مصر المرتبة الأولى في إنتاج العنب، تليها العراق فالمغرب والجزائر ثم سوريا فلبنان.

ونظراً لأهمية الموضوع فقد أدرجت المنظمة العربية للتنمية الزراعية في الإستراتيجية العربية للتنمية الزراعية المستدامة للعقدين القادمين(2005-2025)، التي أعدتها المنظمة بتكليف من القمة العربية في الجزائر عام 2005 وأقرتها القمة العربية في الرياض في عام 2007 برنامجاً رئيسياً للتطوير التقني الزراعي ومن أحد مكوناته عقد هذه الدورة التدريبية حول تقانات إنتاج أشتال العنب الخالية من الأمراض الفيروسية.

هذا وقد اشتملت الدورة التدريبية على محاضرات نظرية في التعريف العام بالفيروسات وأهم الأمراض الفيروسية التي تصيب العنب، الأصول المستخدمة في إنتاج أشتال العنب، طرق التطعيم المستخدمة في إنتاج أشتال العنب، الحشرات والنيماتودا الناقلة للأمراض الفيروسية،وإكثار العنب بطريقة زراعة الأنسجة وبرامج الإكثار المتبعة عالمياً لإنتاج أشتال عنب خالية من الأمراض والآفات.

كما اشتملت الدورة التدريبية أيضاً على تطبيقات عملية أجريت بمختبرات المركز الوطني للبحث والإرشاد الزراعي بالمملكة الأردنية الهاشمية، وذلك للتعرف على الطرق

الحديثة المستخدمة في تشخيص الأمراض الفيروسية وشبه الفيروسية باستخدام تقنيتي ELSIA وPCR ، إضافة إلى طريقة زراعة الأنسجة المستخدمة في إنتاج أشتال العنب.

وقد استفاد من هذه الدورة (28) متدرباً من (18) دولة عربية، من العاملين في الإنتاج البستاني بوزارات الزراعة بشكل عام وإنتاج شتلات العنب الخالية من الفيروسات بشكل خاص.

والمنظمة إذ تصدر هذه الوثيقة، ترجو أن يجد فيها صانعو القرار وواضعو السياسات التسويقية ما يساعد في تحسين كفاءة التجارة الزراعية العربية، بشكل عام وفتح أسواق جديدة لقطاع العنب بشكل خاص.

الدكتور سالم اللوزي

المدير العام

المحتويـــــــات

المحتويـــــــــات	صـــفحة
التقديـــم	أ
المحتويــات..	ج
التقرير الختامي	د
المحاضرات :	
1-جهود المنظمة العربية ورؤيتها لتبني التقانات الحيوية في تطـوير القطـــاع الزراعي	1
2-الأصـــــــــــول المســـــــــتخدمة فـــــــــــــي إنتــــــــاج العنب..	7
3-طرق التطعيم المستخدمة في إنتاج أشتال العنب	11
4-تعريف عام بالفيروسات والفيروودات و آثارها الاقتصادية وأهــم الأمــراض الفيروسية التي تصيب العنب	21
5. Insect Vectors of Grapevine Viral Diseases	29
6-النيماتودا الناقلة للأمراض الفيروسية	44
7-الطـــرق الحديثة المستخدمة في تشـــخيص الأمـــراض الفيروســـية وشـــبه الفيروسية	56
8-الاختبارات السيرولوجية Serological Test المستخدمة في الكشف عـــن فيروسات النبات	80
9- Production of Certified Material of Grapevine Varieties and Rootstocks	101
10- Production of Virus Free Plants by Plant Tissue Culture	121
11- Molecular Markers	127
12- Molecular Markers as Tool for Studying the Characters Differences among Organisms Based on Polymerase Chain Reaction (PCR) Machine	146
كلمة الإفتتاح :	
- كلمة معالي الدكتور/ سالم اللوزي ـــ مدير عام المنظمة العربية للتنمية الزراعية	150
أسماء المشـــاركين	153

التقرير الختامي

تقريـــر حول

أعمال
الدورة التدريبية القوميـــة
في مجال
تقانات إنتاج شتلات العنب الخالية من الأمراض الفيروسية
عمان/ المملكة الأردنية الهاشمية 16 – 20 مارس (آذار) 2005

عقدت المنظمة العربية للتنمية الزراعية هـذه الدورة بالمركز الوطني للبحث والإرشاد الزراعي بعمان/ المملكة الأردنية الهاشمية وذلك ضمن خطة عمل المنظمة لعام 2008، وقد شارك في هذه الدورة (28) متدرباً من (18) دولة عربية.

خاطب حفل الإفتتاح نائب رئيس المركز الوطني للبحث والإرشاد الزراعي بوزارة الزراعة، حيث رحب بالسادة المشاركين في فعاليات هذه الدورة، وأشاد بجهود المنظمة وتعاونها الصادق في خدمة قضايا الزراعية في الوطن العربي وتمنى لممثلي الدول الاستفادة من فعاليات هذا النشاط الذي يصب في مصلحة تعزيز القدرات العربية في مجال تطوير وتحديث تقانات إنتاج شتلات العنب الخالية من الأمراض الفيروسية، لرفع المستوى الاقتصادي والاجتماعي في البلدان العربية.

هذا وقد خاطبت المنظمة الحفل بكلمة لمعالي الدكتور سالم اللوزي/ المدير العام للمنظمة، تلاها الدكتور زياد فضة/ المشرف الفني على هذا النشاط.

- **مبررات الدورة :**

1- إسهامات إنتاج شتلات العنب الخالية من الأمراض الفيروسية في الوطن العربي ما زالت محدودة رغم توفر مقوماته في كثير من الدول العربية.

2- تقليدية النظم والتقانات المستهدفة في إنتاج شتلات العنب في معظم الأقطار العربية وضعف المردود الاقتصادي.

3- ندرة الكوادر المؤهلة في مجالات إنتاج شتلات العنب في الوطن العربي.

4- الحاجة لتفعيل وتنسيق جهود البحث العلمي والإرشاد ونقل التقانة وبناء القدرات لإحداث التحولات النوعية والكمية في قطاع إنتاج العنب.

- **الأهداف :**
  - تعزيز القدرات العربية في مجال تطوير وتحديث تقانات إنتاج شتلات العنب.
  - تنمية إنتاج العنب لرفع المستوى الاقتصادي والاجتماعي.

- **موضوعات التدريب :**
  - جهود المنظمة العربية للتنمية الزراعية ورؤيتها لتنمية التقانات الحيوية في تطوير القطاع الزراعي .
  - تعريف عام بالفيروسات والفيرودات وآثارها الاقتصادية وأهم الأمراض التي تسببها للعنب.
  - أهم الآفات الحشرية التي تصيب العنب بخاصة الناقلة للأمراض الفيروسية.
  - النيماتودا وعلاقتها بنقل الأمراض الفيروسية.
  - الطرق الوراثية المستخدمة لاستنباط نباتات متحملة الأمراض الفيروسية.
  - الأصول المستخدمة من إنتاج شتلات العنب.
  - مزارع أمهات العنب.
  - الطرق الحديثة المستخدمة في تشخيص الأمراض الفيروسية وشبه الفيروسية.
  - استخدام زراعة الأنسجة في إنتاج أشتال خالية من الفيروسات.
  - تطبيقات عملية ومخبرية.
  - زيارات ميدانية لأحد المشاتل والمزارع المتميزة بإنتاج شتلات العنب.

- **الجهات المستفيدة :**
  - الكوادر الفنية العاملة في مجال إنتاج أشتال العنب ووقاية النبات والبستنة الشجرية في كافة الدول العربية المشاركة.

- **الجهات المنظمة للدورة :**
  - المنظمة العربية للتنمية الزراعية بالتعاون مع المركز الوطني للبحث والإرشاد الزراعي بوزارة الزراعة بالمملكة الأردنية الهاشمية .

- **المشاركون بالدورة :**

الرقم	الاسم	الدولة
.1	م.علي يوسف علي صقر	الأمارات
.2	م.عيسى غانم أحمد محمد	البحرين
.3	م.محمد خليفة أقرن	تونس
.4	م. نسيمة عيطر	الجزائر
.5	م.رانيا محمد ميرغني عبد الماجد	السودان
.6	م.عواطف أحمد عبد الله بابكر	السودان
.7	م. علي محمد نعمان الداحوري	سوريا
.8	م.بدر أحمد إسماعيل الحامدي	فلسطين
.9	م.فضل عبد الفتاح المحاريق	فلسطين
.10	م.إبراهيم عيسى ثاني الحداد	قطر
.11	م. عماد محمد نحال	لبنان
.12	د. سحر عبد العزيز يوسف	مصر
.13	م.زين العابدين اليازمي	المغرب
.14	م.محمد الأمين ولد محمد يل	موريتانيا
.15	م. ابراهيم علي أحمد السميري	اليمن
.16	م.سعيد بن سالم بن محمد الجامودي	سلطنة عمان
.17	م.مراد جمعة الفرحاني	ليبيا
.18	م.مروان أحمد كافي	العراق
.19	م.حاتم كريم عباس	العراق
.20	م.ريم أحمد الهزيم	الكويت
.21	م.خالد عبد الله فاضل الطلافيح	الأردن

.22	م.فيصل طه جميل نمر	الأردن
.23	م.أسامه محمد أحمد التميمي	الأردن
.24	م.عبير محمد عبد الفتاح تيم	الأردن
.25	م.محمد صالح عيد العموش	الأردن
.26	م. عبد الهادي ظاهر الماضي	الأردن
.27	م.رائد لطفي عبد اللطيف أحمد	الأردن
.28	م. أيمن محمد فالح المومني	الأردن

- **المحاضرون :**

الدكتور/ زياد فضة	– المنظمة العربية للتنمية الزراعية
الأستاذ الدكتورة/ عبير أبو شربي	– المركز الوطني للبحث والإرشاد الزراعي
الدكتور/ عادل العبد	– المركز الوطني للبحث والإرشاد الزراعي
الدكتور/ فهمي شتات	– كلية الزراعة/ الجامعة الأردنية
الدكتور/ عبد الجليل حمدان	– كلية الزراعة / جامعة الخليل فلسطين
الدكتور/ نواف فريحات	– المركز الوطني للبحث والإرشاد الزراعي
الدكتور / رضا الخوالدة	– المركز الوطني للبحث والإرشاد الزراعي
الدكتور/ إبراهيم الرواشدة	– المركز الوطني للبحث والإرشاد الزراعي
المهندس/ نضال درادكة	– المركز الوطني للبحث والإرشاد الزراعي
المهندسة/ غيداء جبارة	– المركز الوطني للبحث والإرشاد الزراعي

- **الإشراف الفني والإداري :**

أشرف على فعاليات هذه الدورة :

1- الدكتور/ زياد فضة — المنظمة العربية للتنمية الزراعية

2- الدكتور/ عبد الكريم العبيد — المنظمة العربية للتنمية الزراعية

- **آراء وملاحظات المشاركين في الدورة :**

- يرى المشاركون بضرورة أن تكون مدة الدورة أسبوعين لكي تلبي إحتياجات المتدربين العملية والتطبيقية.
- التركيز على مثل هذه الدورات لكي تساعد الدول على تأمين الكوادر التي تعمل على تدريب كوادر أخرى داخل القطر.

- **تقييم أعمال الدورة :**

تم تقييم أعمال هذه الدورة ، من خلال إستمارات تقييم ، صممت ووزعت على المتدربين، إضافةً إلى إستطلاع آراء المشاركين والمدربين من خلال جلسة نقاشية عامة، شارك فيها الجميع بآرائهم وملاحظاتهم، وقـد كانت النتائج كما يلي :

البيان	النسبة المئوية للإجابات		
	ممتاز	جيد	مقبول
أولاً – الجوانب الفنية :			
1. مدى تغطية البرنامج لموضوع الدورة	15	75	10
2. المستوى العلمي للمحاضرات النظرية وشموليتها وطريقة تقديمها	15	65	20
3. مستوى التطبيقات العملية والزيارات الميدانية والمشاهدات الحقلية وأسلوب عرضها	60	30	10
4. مدى مساهمة الدورة في إضافة معلومات ومهارات وأفكار جديدة	40	50	10
5. مدى تحقيق الدورة لأهدافها	60	40	0
6. الاستفادة من التجارب القطرية المعروضة من قبل المتدربين	50	50	0

ثانياً – الجوانب الإدارية :

1. ترتيبات السفر	35	60	5
2. ترتيبات الإستقبال	40	40	20
3. ترتيبات الإقامة	40	50	10
4. ترتيبات النقل الداخلي	30	60	10
5. مستوى تنظيم وسير الدورة	65	30	5

المحاضرات

جهود المنظمة العربية ورؤيتها لتبني التقانات الحيوية في تطوير القطاع الزراعي

جهود المنظمة العربية ورؤيتها لتبني التقانات الحيوية في تطوير القطاع الزراعي

د. زياد فضة

المنظمة العربية للتنمية الزراعية

المقدمة :

- تعتبر التكنولوجيا الحيوية والهندسة الوراثية الثورة العلمية الثالثة في تاريخ البشرية حيث سبقتها ثورة عصر الآلة البخارية وثورة عصر الذرة.
- الثورة الرابعة وهي ثورة عصر المعلومات وتطور استخدامات الحاسب الآلي، وظهور (Bioinformatics) قد أضاف الكثير إلى استخدامات الهندسة الوراثية، في شتى الكائنات.

تختص الهندسة الوراثية بالتقانات التي يمكن عن طريقها إعادة تشكيل المادة الوراثية، وهو ما يضع أُسُساً جديدة وفاعلة لإمكانية توجيه الحياة، والتحكم في الصفات بصورة تفوق كل ما تم إنجازه حتى وقتنا الحاضر.

تتشابه تقنيات الهندسة الوراثية مع وسائل تربية النبات والحيوان التقليدية من حيث أن كلاً منهما يستهدف التحسين الوراثي لسلالات النبات والحيوان والكائنات الدقيقة، إلا أن الفرق بين الاثنين يكمن في ثلاثة محاور : الأول هو مدى التحسين الوراثي والثاني هو دقة الأداء والمتابعة والثالث هو عنصر الوقت.

ومن تطبيقات التقانات الحيوية والإمكانيات التي تتيحها في الزراعة العربية تمثل التكنولوجيا الحيوية بصفة عامة والهندسة الوراثية بصفة خاصة حجر الزاوية في تطوير الزراعة في الأقطار العربية سواءً بالتوسع الرأسي أو التوسع الأفقي. كما تمثل السلالات التي تبدي مقاومة حيوية ضد الآفات والأمراض أحد أهم أدوات تطوير المحاصيل الزراعية، والتي يمكن اعتبارها إلى حد ما صديقة للبيئة.

وبصفة عامة فإن الإسهامات العلمية والتقدم الحاصل في طرق إنشاء مزارع الخلايا والأنسجة وكذلك دمج الخلايا لها فاعلية كبيرة إذا ما طبقت في مجال الزراعة.

1.2 أهم تطبيقات التقانات الحيوية في الزراعة :

يمكن إيجاز أهم تطبيقات التقانات الحيوية والإمكانيات التي تتيحها في الزراعة العربية فيما يلي :

مزارع الخلايا والأنسجة :

تقدم زراعة الأنسجة الحل الأمثل لإكثار العديد من النباتات التي يصعب إكثارها بالطرق الجنسية. كما تتيح زراعة الأنسجة إنتاج نباتات خالية من الأمراض خاصة الفيروسية منها، وكذلك زراعة المتك (Anther

culture) لإنتاج نباتات أحادية المحتوى الكروموسومي (Haploid)، ومن ثم مضاعفتها لتصبح ذات طراز متماثل (Homozygous) والتي تعتبر ذات أهمية كبيرة في برامج تحسين النبات.

البصمة الوراثية للأصول الوراثية للنبات والحيوان والحشرات والميكروبات والفطريات :

تعتبر البصمة الوراثية أهم وسائل التعريف الجزيئي للأصول الوراثية، حيث تسهم في تحديد علاقات القرابة بين الأصناف والأنواع. وبذلك أصبحت البصمة الوراثية أحد أهم عناصر التقسيم بين الكائنات. كما تستخدم البصمة الوراثية الآن في توثيق الأصول الوراثية في بنوك الجينات فيما يعرف بالمحافظة على الأصول الوراثية بالطرق الجزيئية (Molecular Germplasm conservation).

استخدام الكاشفات (Markers) في تربية النباتات والحيوانات:

الكاشفات هي عبارة عن طرز مظهرية أو وراثية تتوارث مع صفات محددة بشكل مرتبط، ويسهل التعرف عليها واستخدامها لتقييم تلك الصفات المحددة في برامج التربية الوراثية. وتعتبر الكاشفات الجزيئية من أهم أنواع الكاشفات، وهي قطع محددة من الحمض النووي الموجودة في جينوم كائن معين، وهي تتوارث مع صفات بعينها. وتستخدم الكواشف الجزيئية للتعرف على جينومات بعينها في الكائنات المختلفة مما يسهم في رسم برامج التهجين والانتخاب كما أن الكاشفات الجزيئية تعتبر وسيلة دقيقة للتعرف على العوامل الوراثية التي تتحكم بالصفات الاقتصادية الهامة في سلالات النبات والحيوان بما ييسر تتبع هذه الصفات عبر الأجيال المتعاقبة.

عزل الجينات واستنساخها (Gene cloning) :

تتيح البيولوجيا الجزيئية عزل الجينات أو أجزاء منها من المادة الوراثية دنا والتعرف على التتابع الخاص بكل منها (تسلسلها) والربط بين هذه الجينات وصفات مرغوبة بعينها.

نقل الجينات بهدف التحسين الوراثي (Gene transformation) :

أصبح من الممكن استخدام طرق عديدة في النقل الجيني بما يتناسب مع الكائنات المختلفة. وبعض هذه الطرق يعتمد على نوع معين من البكتيريا الزراعية Agrobacterium، والآخر يعتمد على النواقل الحيوية بينما يوجد قسم ثالث من طرق النقل الجيني يعتمد على الوسائل الميكانيكية، مثل استخدام مدفع الجينات أو استخدام الحقنْ الدقيق أو تيسير مرور دنا عبر جدر الخلايا بوضع هذه الخلايا في وسط كهربائي (Electroporation). وبذلك أصبح من اليسير إجراء عملية النقل إلى كل أنواع الكائنات الحية، باستخدام الطريقة التي تناسب كل كائن.

تشخيص الأمراض النباتية والحيوانية باستخدام التقانات الحيوية (Molecular diagnosis) :

يعتبر التشخيص الجزيئي للأمراض التي تصيب الإنسان والحيوان والنبات من أدق الوسائل للتعرف على مسببات الأمراض من ناحية، ومن ناحية أخرى يمكن للكشافات الجزيئية تقييم العوامل الوراثية الموجودة في الكائنات المختلفة، والتعرف على الجينومات التي تحتوي على الجينات التي تقاوم أمراضاً بعينها.

إنتاج اللقاحات والأمصال بواسطة النباتات و الحيوانات :

تختلف الآراء حول مدى الجدوى من الحصول على النواتج الجينية من المستحضرات الدوائية واللقاحات والأمصال في النبات والحيوان فيما يعرف بـ gene farming، يعتقد المؤيدون بأن إنتاج هذه المستحضرات في أجسام الكائنات الراقية سيكون أكثر نقاوة وأقل كلفة. بينما يعتقد المعارضون بأن هذه المنتجات ستفتقد إلى ضبط الجرعة الخاصة بالمادة الفعالة، فضلاً عن احتمال اختلاطها بمركبات أخرى ينتجها الكائن قد يصعب التخلص منها.

نقل الأجنة والإخصاب الصناعي (Embryo transfer and artificial insemination) :

ترتكز التكنولوجيا الحيوية في مجال تحسين سلالات الإنتاج الحيواني على تطبيقات الإخصاب الصناعي ونقل الأجنة، حيث يعتبر المحور الأول نوعاً من التهجين و ذلك باستخدام سائل منوي قد ينتمي إلى سلالات أجنبية في تحسين القطعان. كما أن تقنية نقل الأجنة الحيوانية تسمح باستغلال الأجنة المتعددة الناتجة في الأمهات المتميزة، لتنقل إلى رحم أمهات أقل في صفاتها بما يسمح بإنتاج نسل متميز وتكوين قطعان متميزة وراثياً وذات مردود اقتصادي أفضل.

حفظ الأصول الوراثية النباتية والحيوانية بالتجميد (Cryo preservation) :

تحفظ الأصول الوراثية النباتية في بنوك الجينات على عدة مستويات إما على مستوى البذور أو الأنسجة. وتخزن البذور إما في مجموعات حفظ قصير المدى على درجة حرارة + 5o مئوية، أو مجموعات حفظ متوسط المدى على درجة حرارة -18o مئوية أو مجموعات حفظ طويل المدى على درجة حرارة - 40 درجة مئوية حيث يفترض أن تحفظ هذه المجموعة لمئة عام على الأقل. وتحفظ الأصول الوراثية التي تتكاثر خضرياً على شكل مزارع خلايا وأنسجة تجدد على فترات تختلف من نبات لآخر.

كما تستخدم بنوك الجينات التي تُعنى بحفظ الأصول الوراثية الحيوانية طرق حفظ الجاميطات والأجنة تحت تبريد عميق لحين الحاجة إليها.

إنتاج واستخدام المبيدات الحيوية الآمنة بيئياً (Environmently friendly biopesticides):

تم تطوير تقنية إنتاج المبيدات الحيوية في العقدين الأخيرين بعزل سلالات من البكتريا والفطريات والفيروسات ذات المقدرة على إبادة الآفات الحشرية والفطرية، واستخدمت لإنتاج مبيدات حيوية آمنة بيئياً تغني عن استخدام المبيدات الكيماوية.

التخلص من الملوثات البيئية بواسطة التقانات الحيوية (Bioremediation) :

تعمل الكثير من معامل ومختبرات التكنولوجيا الحيوية والبيولوجيا الجزيئية على تطوير سلالات من البكتريا، تحتوي على جينات تسهم في إنتاج إنزيمات معينة تقوم بتكسير الملوثات البيئية من هيدروكربونات

وغيرها من المواد الكيماوية، وتحويلها إلى مواد غير ضارة مما يسهم في تخليص البيئة من الكثير من ملوثاتها.

معالجة مياه الصرف الصحي من المواد الضارة بغرض إعادة استخدامها في الري (Biotreatment of sewage for irrigation) :

تستخدم سلالات بكتيرية معدلة وراثياً لتخليص هذه المياه من الكثير من ملوثاتها و إعادة استخدامها في الزراعة. وتعتبر المعالجة بالكائنات الحية المعالجة الثانية (secondary treatment) لمياه الصرف والتي تضمن تخليص هذه المياه من الملوثات العضوية وتسبقها عادة معاملة أولية (primary treatment) من أجل التخلص من المواد الصلبة عن طريق ترسيبها. ويعتمد تحديد أنواع النباتات التي يمكن ريها بمياه الصرف المعالجة على درجة المعالجة، حيث يمكن أن تعالج هذه المياه معالجة ثالثة (tertiary treatment) وذلك للتخلص من بعض الملوثات الكيماوية مثل الأمونيوم بالإضافة إلى تعقيم المياه للتخلص من الميكروبات التي يمكن أن تسبب الأمراض للإنسان.

تطبيقات التقانات الحيوية في إنتاج الأغذية ومعالجتها بغرض تحسين الجودة :

تعتبر تكنولوجيا التخمير من أقدم أنواع التكنولوجيا الحيوية المعروفة منذ بدء التاريخ، و قد تطورت هذه التقنيات مع تقدم أدوات التكنولوجيا الحيوية، بحيث أصبحت المخرجات في تطور متلاحق يعكس تطور التقنيات الذي يُعنى بإعداد المدخلات وكذلك تطور المعاملات الوسيطة. ولا شك أن استخدامات تقنيات الهندسة الوراثية قد انعكس على تكنولوجيا إنتاج الغذاء، مما أتاح تطوراً هائلاً في المنتجات الغذائية كماً ونوعاً. ولقد أصبحت معظم خواص الأغذية في طريقها إلى التطور الحاسم بنقل جينات التحكم في معظم خواص الأغذية، سواءً من حيث محتواها من الأحماض الأمينية والفيتامينات أو من حيث خواصها الفيزيائية مثل اللزوجة والقوام وغير ذلك. ومن الأمثلة على ذلك إنتاج صنف من القمح يحتوي على 70% من الأميليز بدلاً من 25% في الأصناف التقليدية في استراليا، حيث يعتبر الأميليز من أنواع النشا المقاوم للهضم وله فوائد صحية مقللة لأمراض التغذية والقلب وسرطان القولون والسكري.

تطبيقات التقانات الحيوية في إنتاج الخرائط الجينية للنباتات والحيوانات الزراعية ومساهمتها في علم الجينوم المقارن :

منذ بدء مشروع الجينوم البشري في نهاية عقد الثمانينات واكتمال خريطة الجينوم التركيبية في السنوات الأخيرة، انطلقت موجة كاسحة من المشروعات البحثية بغية إعداد الخرائط الجينومية لعدد كبير من أصناف النباتات الاقتصادية وحيوانات المزرعة وميكروبات التربة. ولا شك أن اكتمال الخرائط الجينومية التركيبية لعدد من النباتات مثل محصول الأرُز و نبات Arabidopsis، قد فتح الباب على مصراعيه لتحديد مواقع العديد من الجينات التي تتحكم في الصفات الاقتصادية لهذه المحاصيل. ولا شك أن اكتمال الخرائط الجينومية

التركيبية واستكمالها بالخرائط الجينومية الوظيفية لهذه الكائنات، سيكون إعلاناً ببداية عهد جديد في مجال التحسين الوراثي.

استخدامات التقانات الحيوية في إنتاج بدائل متجددة للطاقة الآمنة (الطاقة الحيوية) (Biogas) :

عُرفت مشروعات الطاقة الحيوية مثل الغاز الحيوي biogas منذ عقد السبعينات، إلا أن هذا المجال شهد انكساراً حاداً في الثمانينات لندرة المواد الخام في كثير من الأقطار، أو للاحتياج إليها في أغراض أخرى مثل علف الحيوان. غير أن تطبيقات التكنولوجيا الحيوية والبيولوجيا الجزيئية قد فتحت الباب على مصراعيه لاستخدام مواد خام غير تقليدية في هذا المجال، حيث أجريت تجارب جادة لاستخدام الأعشاب البحرية التي تتراكم بكثرة على الشواطئ غير المأهولة في إنتاج الغاز الحيوي، وهي الأعشاب التي تسمى تبن البحر نظراً لغزارة الكميات التي يمكن جمعها من على الشواطئ.

استخدامات التقانات الحيوية في الصناعة لإنتاج الخشب والورق والألياف للمحافظة على الغابات وتحسين جودة مواد الصناعة :

لم تعد مخلفات المزارع عبئاً على البيئة أو يقتصر استخدامها في مجالات تقليدية، بل أصبحت مورداً لا ينضب لصناعة الأخشاب والورق. فمن المعروف أن المعالجة البيولوجية التي تعتمد على التكنولوجيا الحيوية تؤمن تحويل مخلفات تقليم أشجار النخيل إلى أحد أجود أنواع الخشب، كما أن تطور صناعة الخشب المصنع (الحبيبي) بإدخال تقنيات حيوية جديدة على مسارات التصنيع، باستخدام أنزيمات الهضم بيتا-جلوكوسيديز (beta-Glucosidase) لتحطيم الروابط البنائية لمادة اللجنيين، أسهمت في تطور استخدام هذه الأنواع من الأخشاب الصناعية وهو الأمر الذي يخفف الضغط عن الغابات ويقلل من التدهور البيئي نتيجة للاستخدام الجائر لأشجار الغابات في إنتاج الخشب والورق.

استخدام تفاعلات التخمير في إنتاج مركبات حيوية بروتينية إنزيمية ذات خواص صيدلانية أو صناعية :

دخلت صناعة الأدوية والمستحضرات الصيدلانية مثل الأجسام المضادة (Antibodies) عهداً جديداً باستخدام الكائنات الحية كمخمرات حيوية (Biofermenters) بدلاً من المخمرات التقليدية المعروفة، وذلك بنقل جينات معينة تسمح بإنتاج المواد الأولية في الصناعات الصيدلانية داخل أجسام الكائنات الراقية من نبات وحيوان، وأيضاً في خلايا الكائنات الدقيقة. ولا شك أن إنتاج هذه المواد الهامة في صناعات الأدوية سيوفر النقاوة و خفض التكاليف.

تحفيز إنتاج النواتج الثانوية النباتية والحيوانية (Secondary metabolites) :

وفي سياق إنتاج المركبات الهامة صناعياً داخل النباتات والحيوانات عن طريق التحوير الوراثي يدخل إنتاج المركبات الوسيطة ونواتج التمثيل الغذائي كأحد أهم مسارات التكنولوجيا الحيوية الصناعية. حيث تؤمن هذه الطرق إنتاج مركبات صناعية هامة ذات نقاوة عالية وأيضاً اختصار عدد من الخطوات الصناعية فضلاً

عن قلة التكلفة. ومن الأمثلة على ذلك تحفيز إنتاج صبغة الأنثوسايانين البنفسجية من زراعة الخلايا المعلقة من أصناف محددة من البطاطا، وتستخدم هذه الصبغة كمادة ملونة طبيعية في العديد من الصناعات الغذائية.

نتيجة لما تقدم تتضح الأهمية البالغة لتطبيقات البيوتكنولوجيا في شتى نواحي الحياة ولما لهذه التطبيقات من أهمية بالغة في تطوير قطاع الزراعة فإن المنظمة العربية للتنمية الزراعية قد أولت هذا الموضوع اهتماماً بالغاً حيث تم إدراجه في استراتيجية الزراعة العربية للعقدين القادمين كما نفذت المنظمة العديد من المشاريع والدورات التدريبية في هذا المجال نذكر منها على سبيل المثال لا الحصر:

- دورات تدريبية في مجال تشخيص الأمراض النباتية والحيوانية وذلك :
  1- باستخدام التقانات الحيوية.
  2- مشاريع تطبيقية في مجال تحديد البصمة الوراثية للزيتون.
  3- مشاريع تطبيقية في مجال مرض البيوض وتحديد عزلات الفطر المسببة للمرض.

الأصـــول المستخدمة فـــي إنتاج العنب

الأصول المستخدمة في إنتاج العنب

د. فهمي شتات
أستاذ البستنة الشجرية وفسيولوجيا ما بعد الحصاد
كلية الزراعة-الجامعة الأردنية

مقدمة :

طرق إكثار العنب التي كانت متبعة في الماضي :

1- العقل.

2- الترقيد.

في النصف الثاني من القرن التاسع عشر (سنة 1862م) ظهرت حشرة الفايلوكسرا في أوروبا وأدت إلى القضاء على مساحات واسعة من العنب، وكان مصدر العدوى أشتالاً مجذرة تم توريدها من أمريكا الشمالية، حيث كان الحل لهذه المشكلة باللجوء إلى تطعيم الأصناف التجارية على أصول أمريكية، وبذلك تم تبني طريقة جديدة لإكثار العنب وهي التطعيم.

أنواع العنب :

1- العنب الأوروبي *Vitis vinifera* European grapes

2- العنب الأمريكي *Vitis labrusca* American grapes

3- أعناب ناتجة عن التهجين بين العنب الأوروبي والأمريكي Hybrids between European and American grapes

4- أعناب موسكادينا *Vitis rotundifolia* Muscadine grapes

أهم مجموعات الأصول المستعملة في تطعيم العنب :

1- V. berlandiere x V. vinifera
Fercal
41-B

2- Riparia x Rupestris
3309

3- Rupestris x Riparia
SO4
5 BB Kober

4- Berlandiere x Rupestris
99R, 110R, 1103P, 140 Rugg.

المشاكل التي يمكن معالجتها باستخدام الأصول :

1- آفات التربة: فايلوكسرا، نيماتودا.

2- التحكم بقوة الصنف التجاري المطعم على الأصل.

3- خواص التربة الفيزيائية والكيماوية: جفاف، رطوبة زائدة، ملوحة، كربونات الكالسيوم.

حتى الآن لم يتم تطوير أصل قادر على توفير حلول للمشاكل المذكورة أعلاه كلها أو حتى معظمها.

آفة الفايلوكسرا:

- حشرة صغيرة جداً تشبه المن ولونها يميل إلى الاصفرار وتظهر في مرحلتين (طورين):

1- طور يصيب الأوراق (بخاصة الأعناب الأمريكية) ويؤدي إلى تكوين تدرنات على السطح السفلي للورقة وتعيش الحشرة بداخلها.

2- طور يصيب الجذور ويؤدي إلى تكوين تدرنات عليها مما يضعف الغراس ويسهل حدوث الإصابات الفطرية والبكتيرية على الجذور.

الوقاية من الفايلوكسرا عند الزراعة:

1- معاملة الاشتال بالماء الحار:

5 دقائق درجة حرارة 43.3°م لرفع حرارة الجذور

5 دقائق درجة حرارة 51.6°م لقتل الفايلوكسرا

2- رش الاشتال بمبيدات حشرية مثل:Malathion 5 EC

المواصفات الواجب توفرها في الأصل:

أ- مواصفات أساسية:

1- القدرة على مقاومة آفات التربة: فايلوكسرا، نيماتودا.

2- قوة نمو تناسب الموقع والصنف.

3- سهولة الاكثار.

4- سهولة التطعيم (التوافق).

5- الخلو من مسببات المرض.

ب. مواصفات ثانوية:

1- تحمل وجود الكلس في التربة.

2- تحمل الجفاف.

3- تحمل الرطوبة الزائدة في التربة.

4- تحمل ملوحة التربة أو مياه الري.

5- تحمل الصقيع .

ويبين الجدولان 1 ، 2 خواص مجموعة من أصول العنب الهامة:

جدول رقم 1

RootStock	Scion vigor	phylloxera	Drought	Groom Gall	phytophthora	Acid Soil	Water Logging
A X R #1	3	2	2				
Borber	5	5	2			2	2
Castel 196-17	2	3	3			4	
Dogridge	3	2	2				
Freedom		2	2				
Harmony		2	2				
Ripana Glorie	2	5	1			2	
Rupestries St. George	4	4	2		1	2	2
Salt Creek		2	2				
SO4	**3**	**4**	**1**	**2**	**1**	**2**	**3**
5 BB	**3**	**4**	**1**	**4**			
5C	3	4	1				
41B	**3**	**4**	**3**				
44-53 M	3	4	4				
99R	**4**	**4**	**3**	**1**	**1**	**3**	**1**
110 R	**4**	**4**	**4**	**1**	**2**	**3**	**2**
101-14 Mgt	2	4	3	5	2	1	4
125 AA	3	4	2				
140 Ru	**4**	**4**	**1**	**1**	**2**	**4**	**2**
161-49C	4	4	2				
333 EM	1	2	2	2			
420 A	4	4	2		1		2
1103 P	**3**	**4**	**3**	**2**	**1**	**2**	**3**
1202 C	3	2	2	2			
1613 C	3	2	2				
1616 C	2	3	1				
3306 C	3	4	1		1	2	
3309 C	2	4	2	4	1	2	3
5 very resistant , 1 very susceptible							

جدول رقم 2

	Tolerance For				Adabtablitv To			
RootStock	Free lime	Salt (g/lit)	Vig or	Effect on Maturitv	Dry Shallow	Deep Silt or dence Clav	Deep , Drv	Sand v Soil
A X R #1	13	0.8	3			33	2	
Borber	20		3	+	2	4	3	3
Castel 196-17	6		3		2	1	2	3
Doaridae	hiah	hiah	4		2	1	2	4
Freedom			3			1	1	3
Harmonv			3			1	2	3
Ripana Glorie	6	0.7	2	+	3	1	2	2
Rupestries St. Georae	15		4		1	2	3	1
Salt Creek			4		2	1	3	4
SO4	17	0.6	3	+	3	2	2	1
5 BB	20		3	+	3	2	2	1
5C	17		2	+		3	3	1
41B	40	Very sensitive	2	+	1	1	1	1
44-53 M	10		3	+	3	2	3	2
99R	17		4		1	2	4	2
110 R	9		2	+	3	2	2	1
101-14 Mat	17		3		3	4	3	3
125 AA			3			3	1	1
140 Ru	20		4		2	3	3	4
161-49C	25		3			1	2	2
333 EM	40	Very sensitive	1	+	1	1	1	1
420 A	20		2	+	2	3	2	2
1103 P	17	0.6	3		3	3	3	3
1202 C	13	0.8	3			3	3	2
1613 C	Low		3		2	2	2	3
1616 C	11	0.8	3		2	1	2	2
3306 C	11	0.4	3	+	3	1	2	2
3309 C	11	0.4	2	+	3	2	2	2

4 high , 1 Low ,
4 good , 1 Poor
+ Advance , - Delay

طرق التطعيم المستخدمة في إنتاج أشتال العنب

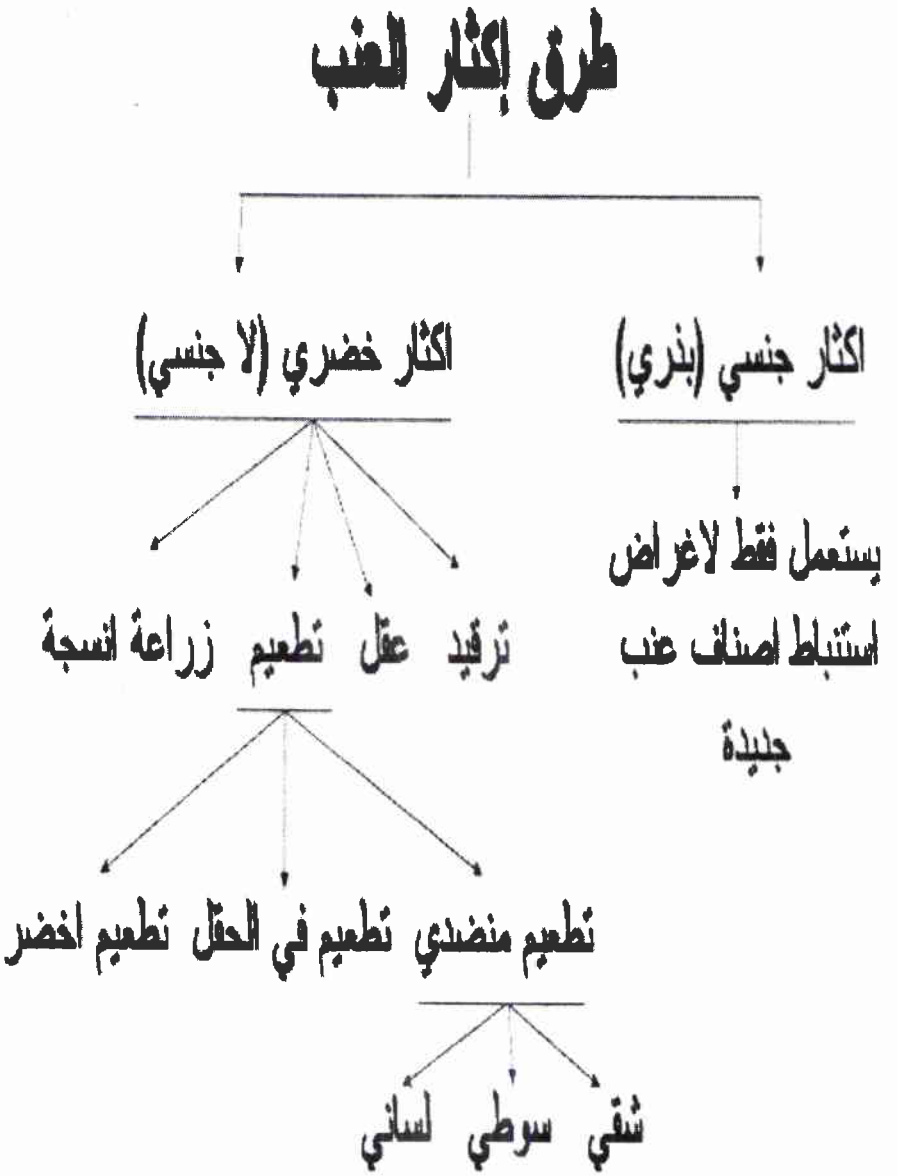
طرق التطعيم المستخدمة في إنتاج أشتال العنب

إعداد

الدكتور فهمي شتات

أستاذ البستنة الشجرية وفسيولوجيا ما بعد الحصاد

كلية الزراعة-الجامعة الأردنية



لماذا التطعيم في العنب:

1- مواجهة آفات وأمراض التربة (فايلوكسرا، نيماتودا، تدرن تاجي، ... الخ).

2- مواجهة الخواص الفيزيائية والكيماوية للتربة (ملوحة، جفاف، كربونات الكالسيوم، ارتفاع مستوى الرطوبة)

3- تغيير صنف إلى آخر (في الحقل).

مكونات غراس العنب المطعمة:

1- الطعم (الصنف) ويمثل الجزء العلوي للغرسة.

2- الأصل ويمثل المجموعة الجذرية وجزء من ساق الغرسة.

أهم الشروط الواجب توفرها في كل من الأصل والطعم لضمان نجاح عملية التطعيم:

- الخلو من الأمراض والآفات الزراعية (فايروسات، نيماتودا، فايلوكسرا).
- أخذ مادة الاكثار من أمهات موثقة ومن مصادر موثوقة.
- التوافق.

أنواع التطعيم في العنب:

1- تطعيم منضدي: Bench grafting

2- تطعيم في الحقل: Field grafting

3- تطعيم أخضر: Green grafting

4- تطعيم دقيق: Micro grafting (يستعمل بشكل خاص لأغراض التعرف على الإصابات الفيروسية في مادة الإكثار).

1. تطعيم منضدي: Bench grafting

مواد التطعيم اللازمة:

- عقل من الأصل بطول 25-30سم لكل عقلة.
- أقلام قصيرة من الصنف التجاري تحمل عين واحدة وبطول بضع سنتيمترات.

أدوات التطعيم:

- سكين تطعيم عادية أو آلة تطعيم.
- مقص تقليم.
- (شمع تطعيم).

- (مواد لربط مكان التطعيم).
- صناديق خشبية أو بلاستيكية.

موعد التطعيم: أثناء فترة السكون (شهر كانون ثاني – شباط).

1-خطوات التطعيم المنضدي:

- جمع مواد التطعيم (عقل + أقلام) أثناء فترة السكون والاحتفاظ بها في مكان رطب وبارد لحين التطعيم.
- تحضير كل من الأصل (العقلة) والطعم (القلم) بالشكل المناسب.
- الجمع بين الأصل والطعم بإتباع طريقة التطعيم اللساني أو السوطي أو الشقي.
- تغطيس منطقة التطعيم التي تجمع بين قاعدة القلم وقمة الأصل في شمع التطعيم السائل ثم تغطيسها بالماء البارد.
- وضع العقل المطعمة عمودياً في صناديق خشبية أو بلاستيكية عمقها لا يقل عن 45سم وقعرها مغطى بنشارة الخشب أو البيرلايت الرطب.
- تغطية العقل المطعمة بنشارة الخشب الرطبة أو البيرلايت الرطب مع المحافظة على نقطة التطعيم على ارتفاع 10-15سم فوق مستوى نشارة الخشب أو البيرلايت.
- تغطية الصندوق كاملاً وبإحكام بغطاء من البولي اثيلين الشفاف للحفاظ على الرطوبة.
- المحافظة على درجة الحرارة داخل الصندوق عند مستوى 27°م. ويمكن تحقيق ذلك بوضع إنارة فوق الصندوق.
- بعد 3-4 أسابيع تظهر أغصان من الطعم بطول 2-3سم ويتكون الكالوس عند قاعدة العقلة وفي منطقة التطعيم.
- يتم إخراج العقل المطعمة من الصندوق ويتم تقصير الأغصان الطويلة إلى عقدتين فقط وتزال جميع الأوراق كبيرة الحجم.
- يتم غمس قمة العقل المطعمة مجدداً في شمع التطعيم السائل وفي الماء البارد مباشرة بعد ذلك.
- ثم تزرع العقل المطعمة في الحقل مباشرة في خطوط المشتل بواقع 10-15سم بين العقلة والأخرى. يمكن أن تتم الزراعة في الأرض المكشوفة أو المغطاة بالملش الأسود.
- العناية بالأشتال من حيث الري والتسميد أثناء موسم النمو.
- تبقى الأشتال في المشتل لمدة عام وتخلع أثناء فترة السكون ليتم نقلها إلى الحقل الدائم.

2. تطعيم في الحقل: Field grafting

مواد التطعيم اللازمة:

- عقل مجذرة

- أقلام قصيرة من الصنف التجاري تحمل عيناً واحدةً يتم جمعها أثناء فترة السكون.

أدوات التطعيم:

- سكين تطعيم عادية.
- مقص تقليم.
- شمع تطعيم.
- مواد لربط مكان التطعيم.

موعد التطعيم: أثناء الربيع

خطوات التطعيم في الحقل:

- تزرع العقل المجذرة في الحقل عند بداية الربيع وتترك لتنمو لمدة عام.
- تجمع المطاعيم أثناء فترة السكون (كانون ثاني، شباط) ونثبت عليها Label وتوضع في حزم، ثم تلف بالخيش الرطب وتوضع داخل كيس ويغلق بإحكام وتحفظ في غرفة مبردة أو ثلاجة (درجة حرارة 1-2°م).
- في الربيع يتم الجمع بين كل من الأصل والطعم بإتباع أما طريقة التطعيم الشقي أو التطعيم اللساني أو السوطي.
- بعد التطعيم يتم ربط مكان التطعيم بشريط من البلاستيك أو الرافيا.
- تغطية مكان التطعيم وقمة القلم بشمع التطعيم بشكل جيد.
- العناية بالأشتال المطعمة من حيث الري والتسميد والوقاية.
- خلال موسم النمو تنمو الأغصان من القلم وعندما يصل طولها 20- 30سم تربط إلى دعامة.

3-تطعيم أخضر: Green grafting

مواد التطعيم اللازمة:

- عقل خضراء (غير مكتملة النضج) من الأصل بطول 25سم كحد أدنى وتحمل كل عقلة ورقة واحدة.
- أقلام خضراء تحمل ورقة لكل قلم من الصنف التجاري ويشترط وجود برعم جيد على كل قلم.

- **أدوات التطعيم:**
- سكين تطعيم.
- (مقص تقليم).
- شمع تطعيم.
- مواد لربط مكان التطعيم.

موعد التطعيم: أثناء موسم النمو (عندما تنضج النموات الخضرية على الغراس بشكل جزئي).

خطوات التطعيم الأخضر:

- يتم الجمع بين كل من الأصل والقلم بطريقة التطعيم الشقي أما يدوياً أو باستعمال آلة التطعيم ويتم تقليص حجم الورقة الموجودة على كل من الأصل والقلم إلى النصف.
- تغطى منطقة التطعيم بشمع التطعيم أو تربط بشريط من البلاستيك المناسب.
- تزرع العقل المطعمة بعد ذلك في وسط من البيرلايت أو الصوف الصخري داخل بيت زجاجي مع توفر الاضاءة المتوسطة والرطوبة العالية (ري ضبابي) والتهوية الجيدة والتدفئة السفلية bottom heat.
- بعد 2-4 أسابيع يلتحم مكان التطعيم وتتكون الجذور عند قاعدة الأصل وينمو البرعم الموجود على القلم.
- ثم تخضع الغراس لفترة تقسية في بيت زجاجي لمدة شهر أو أكثر بعد ذلك تكون الأشتال جاهزة للزراعة في الحقل حيث تحتاج إلى عناية كبيرة من حيث الري.

فالفترة اللازمة من التطعيم حتى نقل الغراس إلى الحقل تستغرق حوالي 10 أسابيع لذا تعتبر هذه الطريقة من طرق إكثار العنب السريعة.

طرق التطعيم:

1- التطعيم اللساني: Tongue graft (صورة رقم 1)

يشترط أن يكون قطر كل من الأصل والقلم متساويين (1-1.5سم)

تحضير الأصل:

الأصل أما أن يكون: مزروعاً في الأرض أو في كيس زراعي أو عقلة مجذرة أو غير مجذرة

- يتم قص الأصل عند الارتفاع (الطول) المطلوب.
- عمل قطع عكسي مائل عند قمة الأصل بطول 2-4سم.
- عمل قطع معاكس (لسان) لاتجاه القطع الأول وعلى سطحه بعمق 1.5-2سم.

تحضير القلم:

- يتم أخذ قصبة من الصنف التجاري ونحدد البرعم الذي سيتم فصله لأغراض التطعيم.
- توضع السكين على بعد 2-4سم أسفل ذلك البرعم ويتم عمل قطع مائل بطول 2.5-4سم باتجاه الأسفل لفصل القلم الذي يحمل برعماً واحداً.
- عمل قطع معاكس (لسان) لاتجاه القطع الأول وعلى سطحه بعمق 1.5-2سم.

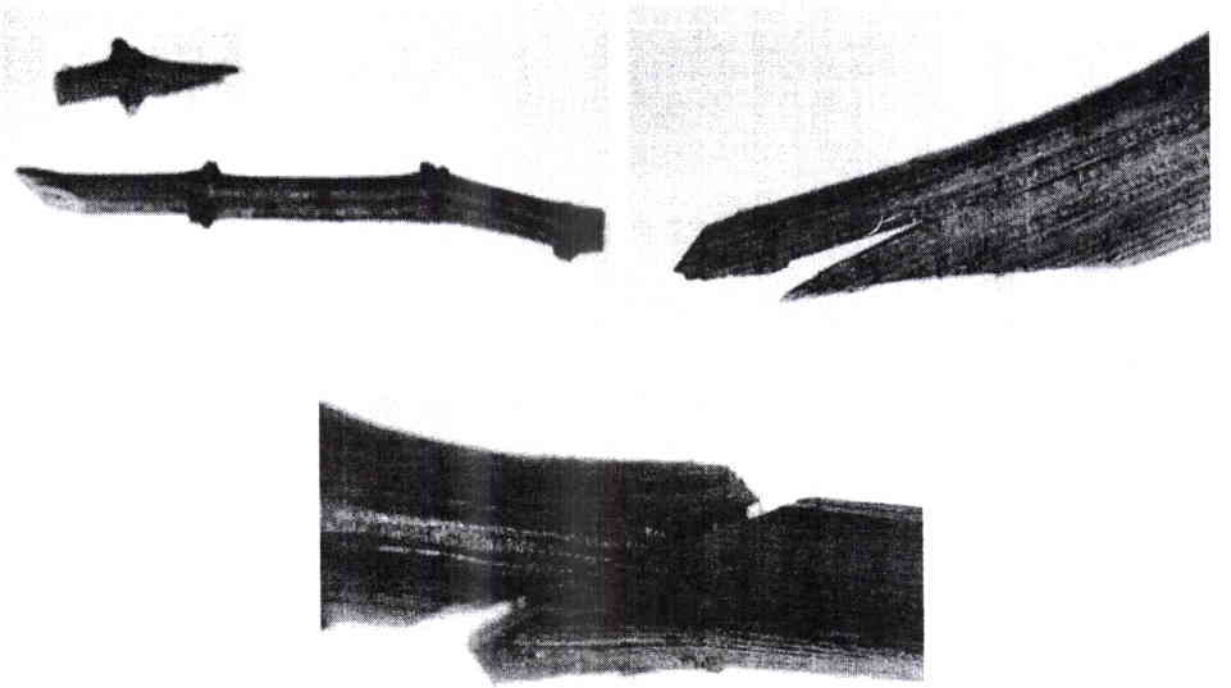
الجمع بين الأصل والقلم:

- يوضع سطح القلم المائل فوق سطح الأصل المائل ويتم تحريكهما بحيث يتداخل اللسانان معاً ويتلامس لحاء كل من الأصل والقلم.
- يربط مكان التطعيم بشريط من البلاستيك أو المطاط أو الرافيا.
- تشميع مكان التطعيم وقمة القلم.

الموعد المناسب لإجراء التطعيم اللساني:

- أثناء فترة السكون (كانون ثاني، شباط).
- أثناء فصل الربيع (في الحقل).

في كلتا الحالتين تجمع المطاعيم أثناء فترة السكون وتحفظ في مكان بارد ورطب تستعمل هذه الطريقة لأغراض التطعيم المنضدي، التطعيم الأخضر أو التطعيم في الحقل.

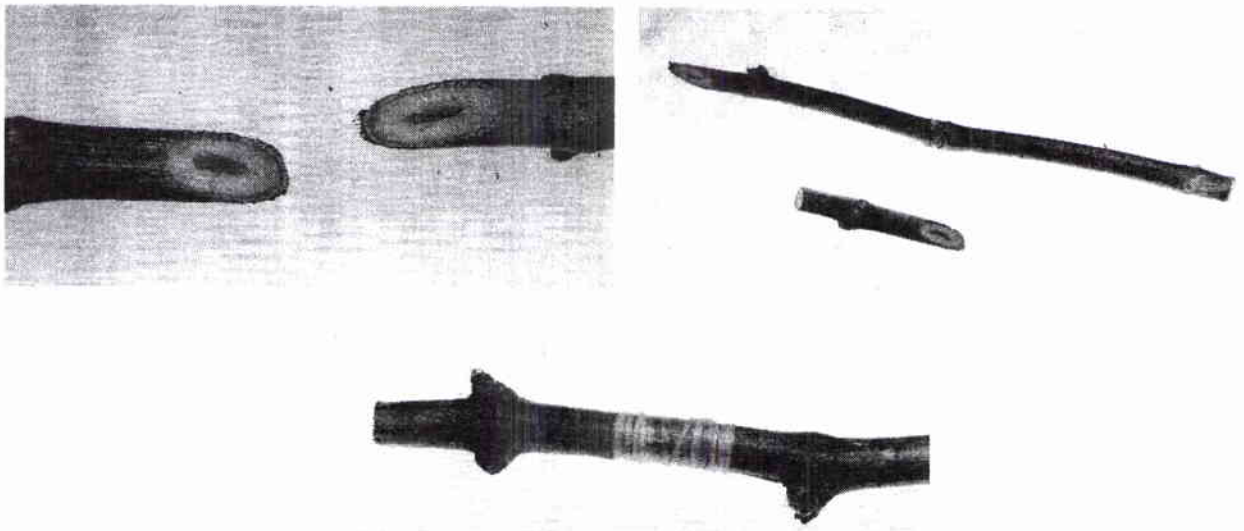


صورة رقم 1 التطعيم اللساني

2- التطعيم السوطي: Whip graft (صورة رقم 2)

- يشترط أن يكون قطر الأصل مساوياً لقطر القلم (1- 1.5سم).
- يتم تحضير كل من الأصل والقلم كما في التطعيم اللساني وبفارق واحد وهو عدم عمل لسان على كل من الأصل والق يتم تحضير كل من الأصل والقلم كما في التطعيم اللساني وبفارق واحد وهو عدم عمل لسان لم ويتم الاكتفاء بعمل القطع المائل في قمة الأصل وقطع مائل مشابه في قاعدة القلم ثم جمعهما معاً بواسطة مادة تربيط.

يستعمل لأغراض التطعيم المنضدي أو التطعيم في الحقل



صورة رقم 2 التطعيم السوطي

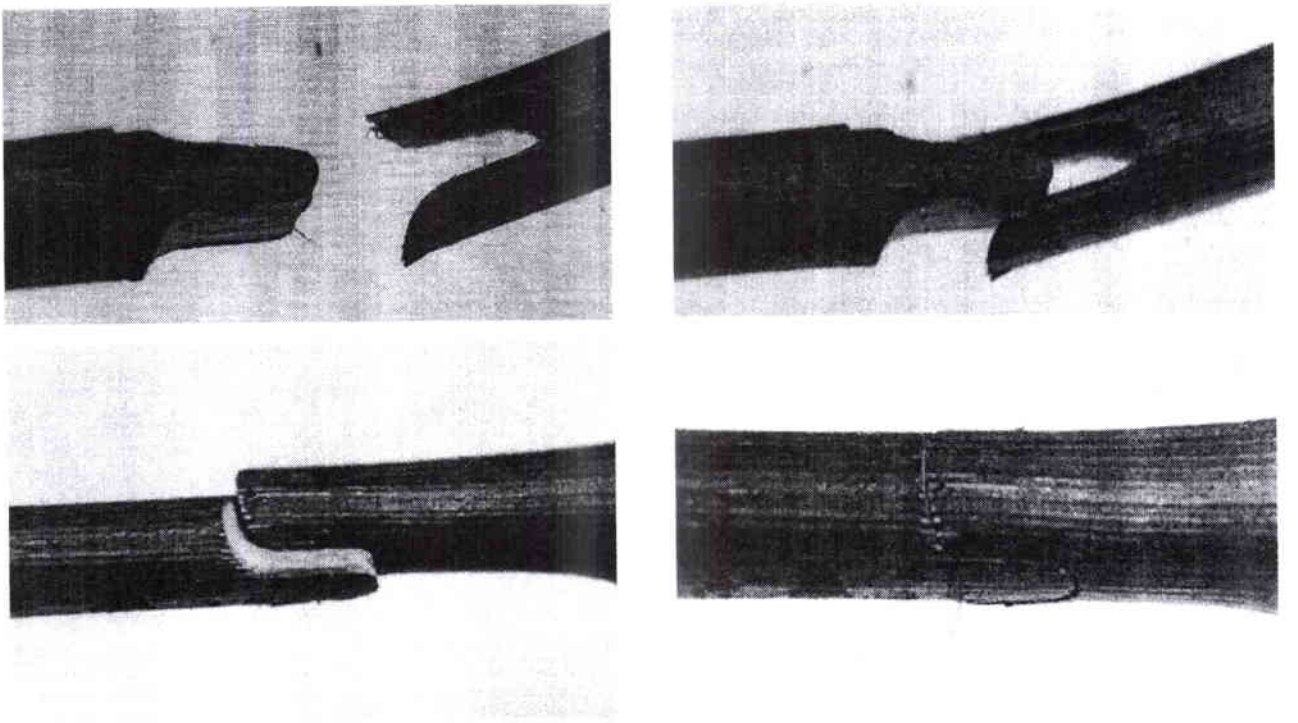
3- التطعيم الشقي:Cleft graft(صورة رقم 3)

تحضير الأصل:

- يتم تقصير الأصل إلى الارتفاع (الطول) المناسب
- شق قمة الأصل عند وسط سطح القطع الأفقي باتجاه الأسفل بواسطة سكين التطعيم وبعمق 2-3سم
- **تحضير القلم:**
- يتم اختيار قلم يحمل برعماً واحداً وبطول بضعة سنتيمترات
- تحضر قاعدة القلم بعمل قطعين مائلين من الأعلى إلى الأسفل بحيث تبدو قاعدة القلم كقاعدة الأزميل.

الجمع بين الأصل والقلم:

- يتم إدخال قاعدة القلم ازميلية الشكل في الشق الموجود عند قمة الأصل.
- ربط مكان التطعيم برباط مناسب.
- طلاء مكان التطعيم وقمة القلم بشمع التطعيم.



صورة رقم 3 التطعيم الشقي

تطعيم Chip budding (صورة رقم 4)

مواد التطعيم اللازمة:

- عقل من الأصل أو أصول مزروعة في الحقل أو في أكياس.
- أقلام قصيرة من الصنف التجاري تحمل عدة براعم (تجمع الأقلام أثناء فترة السكون).
- تخزن الأقلام في مكان بارد (غرفة تبريد، ثلاجة، عند درجة 2°م لحين الاستعمال).

موعد التطعيم: أثناء موسم النمو (بداية الربيع، أثناء الصيف).

ادوات التطعيم: سكين تطعيم.

مقص تقليم.

مواد تربيط.

خطوات التطعيم بطريقة Chip:

تحضير الأصل:

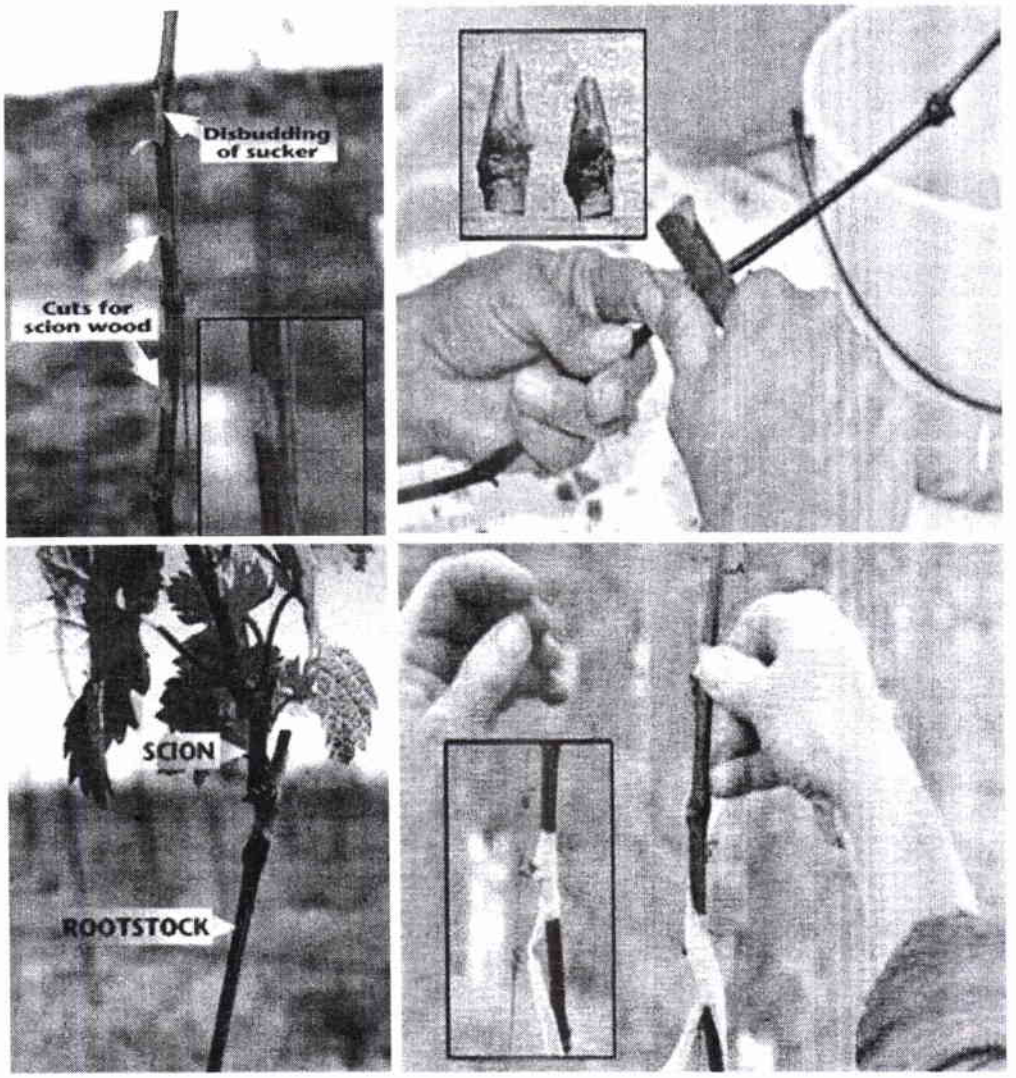
- اختيار مكان مناسب على سلامية عند قمة العقلة أو الأصل المزروع في الحقل أو في أكياس.
- عمل قطع بزاوية 30° في المكان الذي تم اختياره.
- عمل قطع آخر فوق القطع الأول وعلى بعد حوالي 1.5-2سم وتحريك السكين إلى أسفل حتى يلتقي القطع الثاني مع الأول.
- تتم إزالة قطعة الخشب التي تم فصلها بواسطة القطعين.

تحضير القلم:

- يتم إخراج المطاعيم (الأقلام) من أكياس التخزين وتنقع في الماء لمدة 1-2 يوم.
- يتم فصل (Chip) قطعة من الخشب من القلم وعليها عين واحدة وذلك بعمل قطع بزاوية 30° وعلى بعد حوالي 5-10ملم أسفل العين على القلم ثم عمل قطع آخر على القلم فوق العين بحوالي 10ملم.
- تمرير السكين من القطع العلوي أسفل العين وباتجاه القطع السفلي حتى يلتقي القطعان وبذلك يسهل فصل العين من القلم ومعها جزء من الخشب.

الجمع بين الأصل والعين:

- توضع العين في التجويف الذي تم تحضيره على الأصل.
- ربط مكان التطعيم بشكل جيد.



صورة رقم 4 Chip budding

5. تطعيم دقيق: Micro grafting

يستعمل لأغراض التعرف على الإصابات الفيروسية في أمهات أصناف وأصول العنب أو في مادة الإكثار.

تعريف عام بالفيروسات والفيرودات وآثارها الاقتصادية وأهم الأمراض الفيروسية التي تصيب العنب

تعريف عام بالفيروسات والفيرودات و آثارها الاقتصادية و أهم الأمراض الفيروسية التي تصيب العنب

د. عبير أبو شربي
المركز الوطني للبحث و الإرشاد الزراعي

Definition :

Viruses: Obligative parasitic pathogen with a dimensions of less than 200 nm (متطفل إجباري)

Essential features of plant viruses :

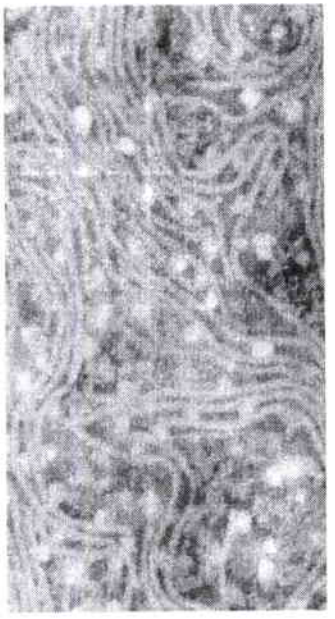
- Viruses contain one or more pieces of a single type of nucleic acid (RNA) or (DNA).(حمض نووي)
- The nucleic acid is coated with one or more layer of protein molecules.(مغلف ببروتين)
- Viruses rely on living host cells for most enzymes necessary for their replication.

Why are viruses and viroids important?

Viruses cause many important plant diseases
Viruses and viroids are responsible for huge losses
in crop production and quality.

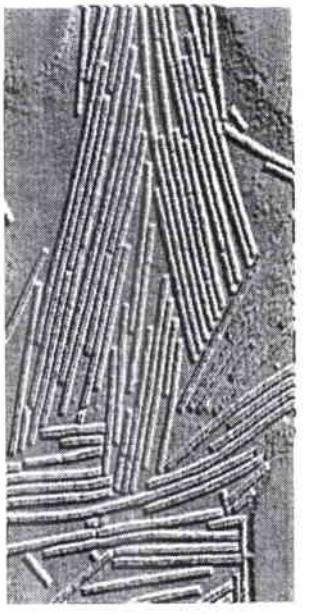
Shapes of viruses :

Flexuous rod



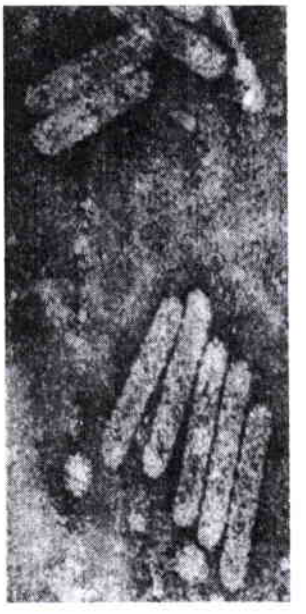
ASG

Rigid rod



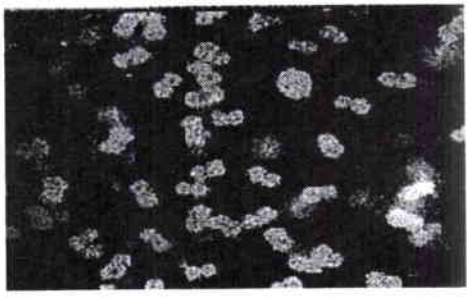
TMV

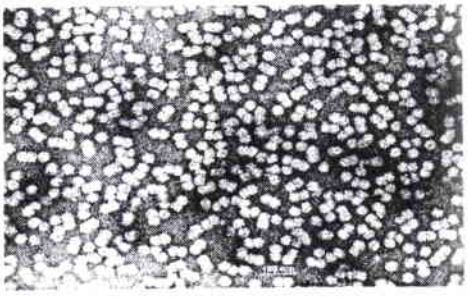
Bacilliform



Cocoa swollen shoot virus

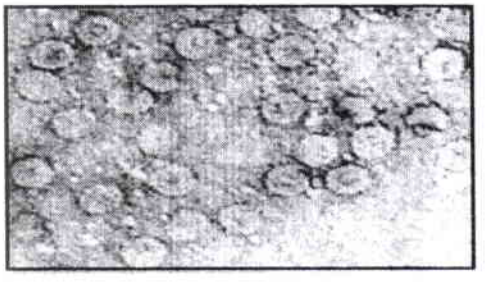
Gemini viruses

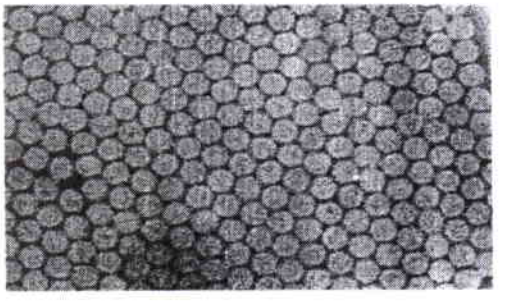




Bean golden mosaic virus

Spherical viruses





CMV

Viroids :

- Smaller than viruses
- Lack protein coat
- Circular RNA molecules capable of autonomous replication and induction of disease.
- Sizes range from 250-450 nucleotides
- No coding capacity - do not program their own polymerase.
- Use host-encoded polymerase for replication.
- Mechanically transmitted; often seed transmitted

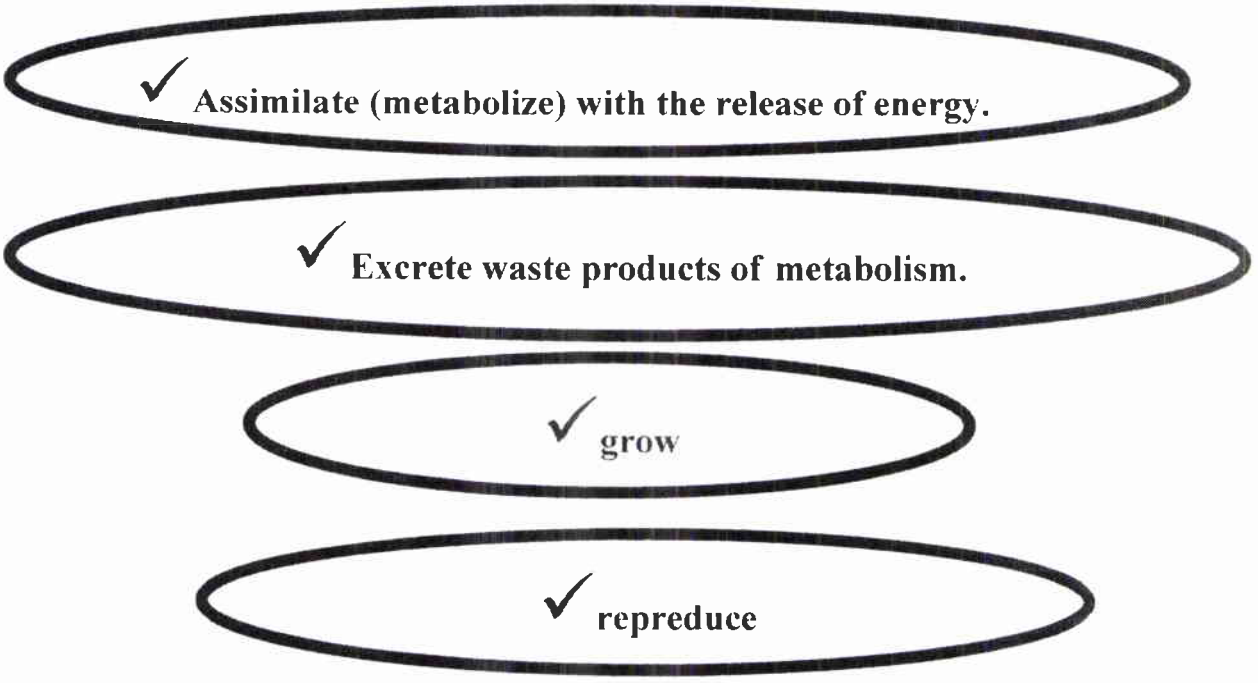
Are viruses and viroids organisms?

The characteristic features of life that distinguish living from non-living matter are the ability of :

✓ Assimilate (metabolize) with the release of energy.

✓ Excrete waste products of metabolism.

✓ grow



✓ repreduce

Viruses and viroids are Not Organisms

Grape vine viruses

Grape fanleaf virus :

GFLV is the most important virus affecting grapevine. All cultivars and hybrids can be hosts for GFLV.

High economical losses. result in yield reductions up to 80%.

Transmission:

The virus is transmitted by the nematodes *Xiphinema index* and *Xiphinema italiae*. grapevine fanleaf virus can be acquired in 5 to 15 minutes, persists up to 9 months when nematode not feeding.

Severely malformed leaves and bushy vegetation in a vine infected by a distorting GFLV strain

Abnormal branching in a shoot of a fanleaf-infected vine

Infected vines have shortened and more irregular internodes. Lateral sprout development, double nodes, and stem fasciations cause a bushy appearance.

Bunches are reduced in size and number, the grapes remain small and may fall before ripening.

(Irregular ripening)

Prevention and Control :

- Control of nematode vectors through chemical treatments or soil fumigants.
- Planting of virus-free nursery material in nematode free soils.
- Hot air treatment of rootstocks.
- Diseased vines should be removed and destroyed
- Planting resistant rootstocks.

Grape leaf roll virus :

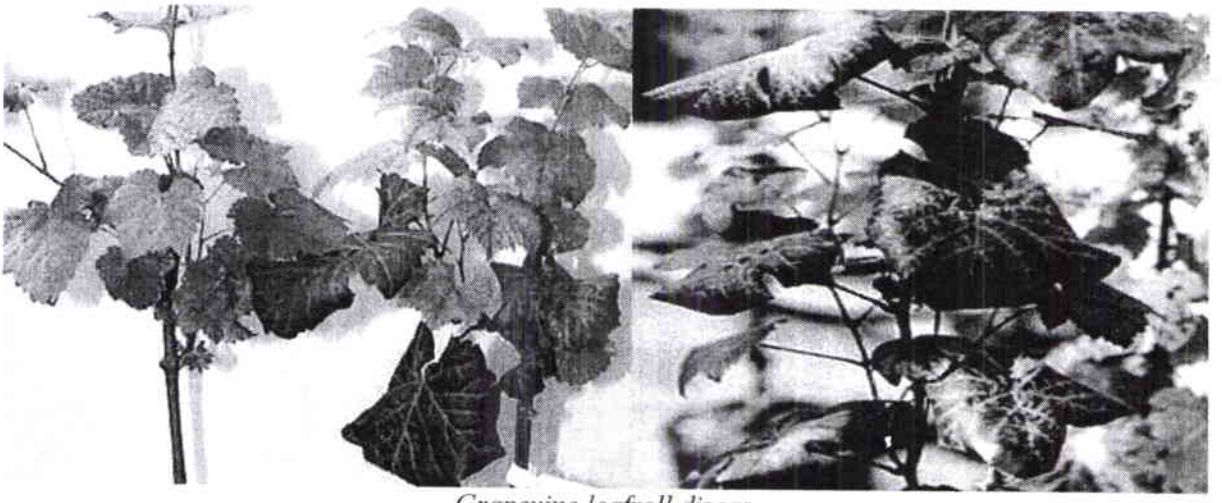
Several phloem-limited clostero viruses with particle length ranging from1800 to 2200nm, called "grapevine leafroll-associated viruses" (GLRaVs), are thought to be causal agents. Other viruses could be **involved.**

Cause substantial reduction in yield, while poor fruit quality, poor color development, reduced sugar content, and non-uniform maturation of fruit. A yield loss of approximately 20-70%

Transmission:

The virus is transmitted by the mealybug (GLRV III). *Pseudococcus longispinus*

Within-field spread by mealybug is very slow



Grapevine leafroll diseas.

Leaves become yellow or reddish purple as the season progresses; the main veins remain green. By late summer, the leaves start rolling downward, beginning at the base of the shoot.

Shoot tip dieback, marginal necrosis and interveinal chlorosis are some symptoms expressed on grapevine infected with leafroll virus.

rolling of the leaf and the leaf area turns reddish with a small, green line along major veins. Leaves roll characteristically.

Poor fruit quality and poor color development

Prevention and Control :

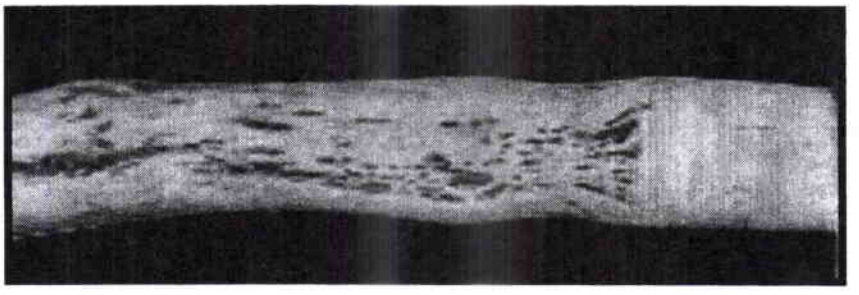
- To reduce the spread of the infection, removal of infected plants.
- Control of the vector.
- Heat-treatment or meristem culture
- Planting disease free material obtained from a certification scheme.

Rugose wood complex (Corky bark, stem pitting and grooving) :

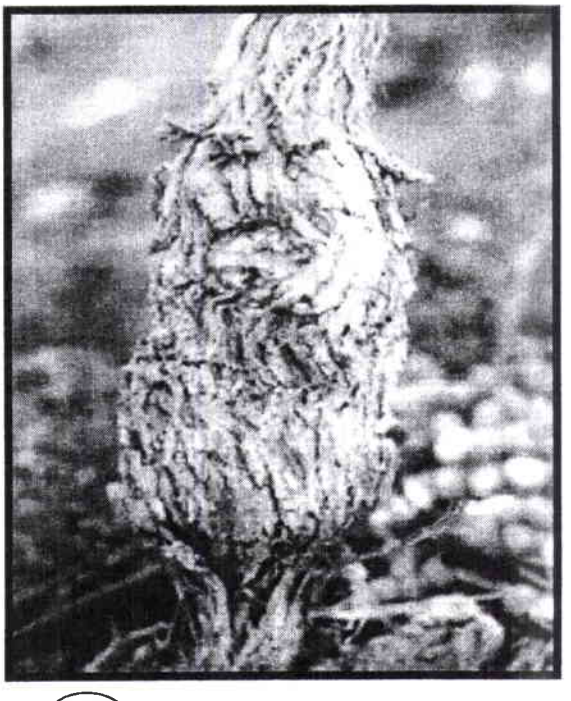
Virus particle flexuous rod, length about 800nm
Virus transmitted by grafting and by mechanical inoculation.
Transmitted by an insect; Pseudococcidae.
Pseudococcus longispinus, P. ficus and *Planococcus citri*
NOT by contact, NOT by seeds and NOT by pollen.

Symptoms :

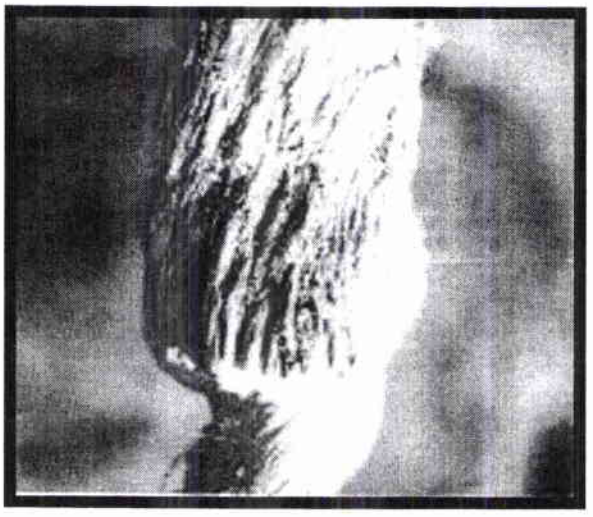
Leaves: No yellow or red color leaves.
Cause pits and grooves in trunk,
Fruit: Berries are immature and sugars are reduced. Reduced yields.
Canes and Wood: The virus causes a severe disruption of the xylem. Pitting and groove formation can be seen when the bark is peeled back. Swelling of the trunk above the bud union often times displays thick rough bark with a spongy texture. Both scion and rootstock occasionally display pits and grooves.



Symptoms of rupestris stem pitting on St. George. Showing a line of small pits developing basipetally from the point of inoculation.



Rugose wood-corky appearance of the bark above the graft union.



Deep grooving in the wood of chardonnay scion on AXR 1 rootstock with corky bark, exposed when the bark is removed from the trunk.

Tomato ringspot virus :

TomRSV has relatively unstable, isometric particles with angular outlines, about 28 nm in diameter, sedimenting as three components and containing single-stranded RNA.

Transmission :

Long-range dispersal in trade is in host plants and parts of plants, including seeds; accompanying soil may harbour infective seeds and the nematode vector. Cause losses up to 80%

Symptoms :

Symptoms include chlorotic leaves
Berries of unequal size and reduced vine vigor
Oak leaf pattern

Grape viroid diseases:

- No vector is known.
- Natural dissemination takes place by
- mechanical. inoculation through surface contaminated cutting tools during management operations (pruning and propagation); by
- graft transmission: and by distribution of infected propagating material.

- None of the grapevine viroids is known to be seed transmitted.
- mechanically transmissible to cucumber cv. Suyo, which it infects without symptoms

Yellow speckle viroid:

Symptoms :

Scattered yellow spots in a European grape leaf, typical of yellow speckle infection these spots will developed into intense yellow speckling then to Strong yellow speckle symptoms with speckles tending to gather along the main veins>

Pierce's disease :

Cause:

Xylella fastidiosa, a xylem-restricted gram-negative bacterium

Transmission:

Transmitted by grafting and by a wide range of xylem feeding insects glassy-winged sharpshooter

Symptoms :

Dark green tissues along the major veins against a chlorotic background
Shriveling grapes and dying leaves are signals of Pierce's disease.
Burning from the margin toward the point of attachment to the petiole of leaf with pierce;s disease
chlorosis and stunting, and dying of the vine.

Insect Vectors of Grapevine Viral Diseases

Insect Vectors of Grapevine Viral Diseases

By:
Dr. Abdul-Jalil Hamdan
Assistant Professor, Entomology
Hebron University, Palestine

Introduction :
Diseases induced by intracellular infectious agents (viruses, viroids, phytoplasmas) represent a major threat to fruit trees, and may constitute a limiting factor to their growing.

The wide geographical distribution of these disorders derives both from the inefficacy against viruses of the methods commonly used for controlling plant pathogens and from dispersal operated by vectors and propagative material.

Man itself is the major responsiblegative material. Man itself is the major responsible for the long distance dissemination of infectious diseases, through the uncontrolled propagation and trading of infected stocks.

It is not by chance that the species with the worst sanitary conditions are those object of extensive manipulations in the nurseries.

Surveys carried out in several Mediterranean countries have shown how deteriorated is the health condition of fruit trees in the area, and how difficult is to find plants of acceptable sanitary status in the field.

No sanitary improvement of fruit tree crops would therefore be possible without a strict prevention policy.

VIRUS AND VIRUS-LIKE DISEASES AFFECTING GRAPEVINE

Little was written on disease problems of grapes until the second half of the 19th century.

Several diseases induced by viruses, viroids, phytoplasmas and other unknown graft-transmissible agents are more reported to affect grapevine.

The probability that a virus was the cause of a disease in grapevine was recognized just before the turn of the century.

Nowadays, many intracellular infectious agents (viruses, viroids and phytoplasmas) have been discovered in grapevines.

VIRUS DISEASES

Some of 44 different viruses have been found in grapevines; 31of which are mechanically transmissible and have been more or less characterized.

This high number of viral agents reported in grapevine is due to the variety of conditions and environments under which the grapevine is grown, to the occurrence of natural vectors and to vegetative propagation.

List of virus and virus-like diseases of grapevine occurring in the EPPO region:

1. Grapevine degeneration complex, caused by grapevine fanleaf nepovirus and other European nepoviruses
2. Grapevine leafroll complex
3. Grapevine rugose wood complex (corky bark, rupestris stem pitting, Kober stem grooving, LN 33 stem grooving)
4. Grapevine fleck disease
5. Grapevine enation disease
6. Grapevine diseases associated with closteroviruses (material found to contain closteroviruses is not admitted for certification)
7. Grapevine diseases caused by MLOs (visual inspection only - material visibly affected by MLOs is not admitted for certification)

Other graft-transmissible diseases known to occur in the EPPO region are tolerated for the moment, but every effort should be made to eliminate them, especially grapevine vein mosaic disease and grapevine vein necrosis disease.

Soil-borne (nematode) and aerial vectors of grapevine diseases recorded in EPPO countries1:

Vector	Pathogen	Geographical distribution
Xiphinema index	Grapevine fanleaf nepovirus	Worldwide associated with grapevine
Xiphinema italiae	? 1	Mediterranean region
Xiphinema diversicaudatum	Arabis mosaic nepovirus Strawberry latent ringspot nepovirus	Throughout Europe and the Middle East
Longidorus attenuatus	Tomato black ring nepovirus	Patchy distribution throughout Europe, but more concentrated in north-central, i.e. PL, DE, NL, BE, GB (England)
Longidorus elongatus		Mainly northern Europe but also rarely in ES, IT, BG and south FR
Longidorus macrosoma	Raspberry ringspot nepovirus	Western Europe
Xiphinema vuittenezi	? 2	Mainly central and southern Europe
Planococcus ficus	Grapevine closterovirus A Grapevine leafroll-associated closterovirus III	Mediterranean region
Planococcus citri	Grapevine closterovirus A	Mediterranean region
Pseudococcus longispinus	Grapevine closterovirus A Grapevine leafroll-associated closterovirus III	Mediterranean region
Scaphoides titanus	Grapevine flavescence dorée MLO	Introduced to SW Europe from N. America. Spreading eastwards

1 *Xiphinema italiae*, although reported in the literature as a vector of grapevine fanleaf nepovirus, does not seem to have any vectoring efficiency in the field.

2 *Xiphinema vuittenezi has not been proved experimentally to transmit any virus. However, it has been found associated with the spread of certain nepoviruses (e.g. grapevine chrome mosaic nepovirus) in the field. For this reason, it should be regarded as a potentially dangerous nematode.*

Notes on viral disease of grapevines transmitted by insect vector:

- Grapevine leafroll virus is the most significant viral disease of grapevines
- Black & red fruited varieties exhibit reddening of leaves in late summer, light green to yellowish in white varieties, often a downward curling of leaf margins.
- Most apparent between harvests and abscission Virus causes degeneration of phloem elements in leaves, shoots, petioles, rachis.
- Several related closteroviruse- Grapevine Leafroll-Associated Viruses 1-8

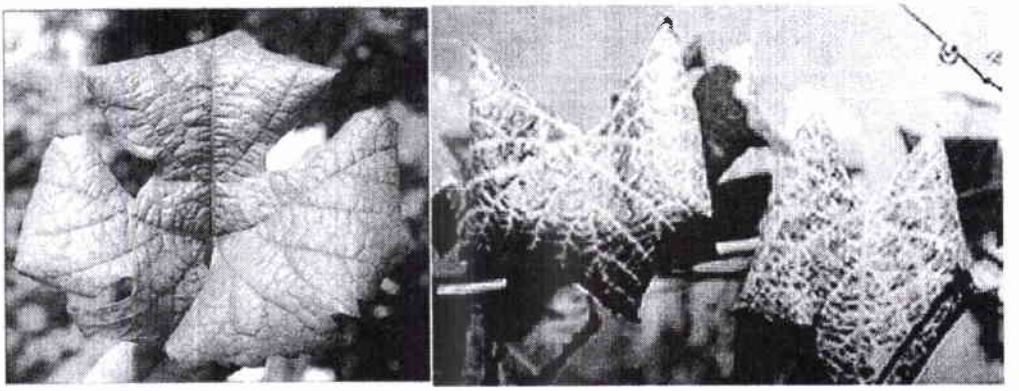


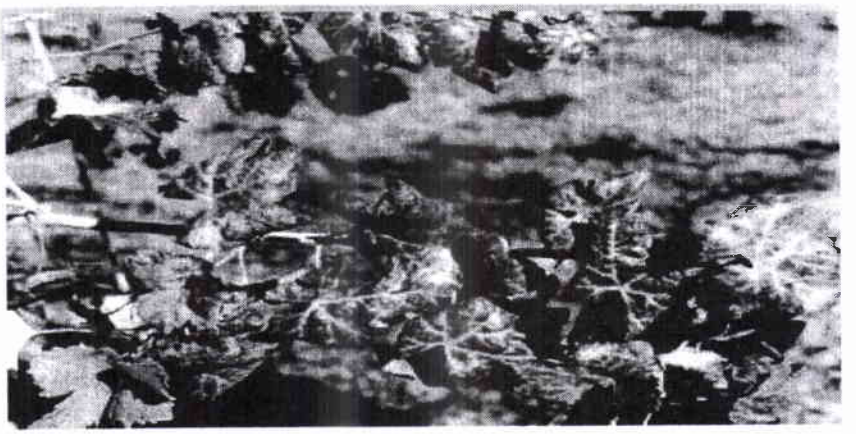
Figure 1. Grape leafroll virus symptoms in grape foliage

GLRaV-3 is the most severe

- Transmitted by propagation techniques
  - Some cvv asymptomatic,
  but if grafted onto susc rootstock, will kill rootstock
  - Severity varies with variety
  - GLRaV-3 Can be transmitted

by mealy bugs:

1. Grape mealy bugs, *Pseudococcus maritimus*
2. Obscure mealy bugs, *Pseudococcus viburni*
3. Long tailed mealy bugs, *Pseudococcus longispinus*
4. Vine mealybug, *Plannococcus ficus*



The most obvious symptom of grapevine leafroll disease, which is common in grape-growing regions worldwide, is reddening and curling of leaves in the fall on dark-fruited varieties.

Grapevine flavescence dorée MLO :

Etiology:

- FD is caused by a phytoplasma that thrives in the phloem of infected vines.
- This disease, which belongs to yellows diseases, is highly epidemic in some vineyards.

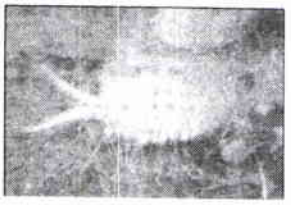
Symptomatology:

- Reduced in growth, short internodes, and downward roll of blades are the first symptoms of FD, and they increase in summer time.
- On white varieties, yellow areas appear on the leaves, often along the primary or secondary veins; while on red varieties leaves become reddish.
- Canes mature irregularly, or not at all, loosing their rigidity, and the bark splits longitudinally.
- The bunches dry up, sometimes before flowering, in early infection, but if the infection symptoms appear later, the berries wither and drop.
- Rootstocks can be infected showing little or no symptoms, and so be a dangerous source of contamination.

Transmission and distribution:

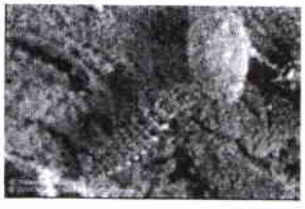
- FD can be transmitted by vegetative propagation, but
- the main vector is the leafhopper *Scaphoideus titanus* (*S. littoralis*) Ball.,
- that has five apterous nymphal stages before the adult alate stage, which is mostly responsible for the disease's dissemination

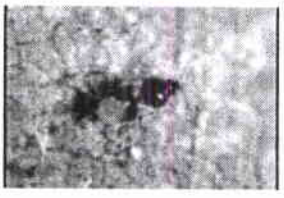
General characteristics of mealybugs:

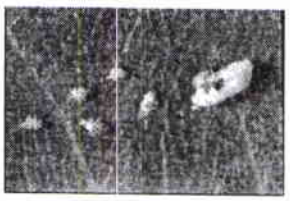


- Sucking insects, feed on phloem
- Produce large amounts of honeydew
- Give rise to sooty mold, marred fruit
- Eggs in ovisac (most species)
- Crawlers, Nymphs, Adult female, Adult male
- Males very different from females
- Common insects, but normally under BC

Lacewings, pirate bugs, lady beetles, parasitic wasps, etc.

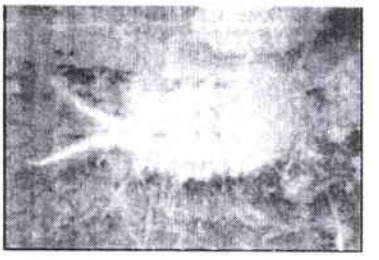






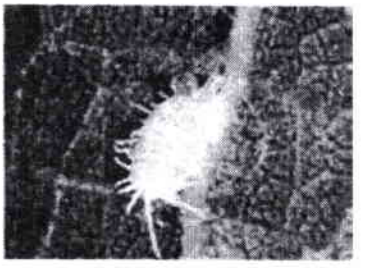
Mealybug species:

1. **Grape mealybug:** ***Pseudococcus maritimus:***

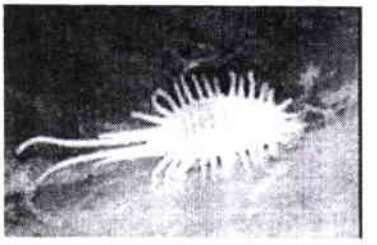


- Two generations: Overwintering and Summer
- Eggs overwinter in ovisac under bark of trunk or cordon
- In late winter, hatch, and around bud break, immatures move to spurs
- After bud break, some move to shoots
- Adult females produce eggs in late May-June 100-300 eggs hatch in 7-14d
- Summer nymphs move to shoots, leaves and cluseters
- Primarily where touching old wood
- Adult females produce new eggs in late summer-fall
- Some in clusters, most return to old wood
- Diapause synchronizes

2. **Obscure mealybug:** ***Pseudococcus viburni:***



- Narrower tolerance to cold temperatures
- Lack of diapause leads to overlap of generations.
- All stages may be present all year (unlike GMB)
- 2-3 overlapping generations



3. **Longtailed mealybug: Pseudococcus longispinus**

4. **Vine mealybug, Plannococcus ficus**

- Native to Mediterranean Europe, Africa, Middle East
- Does not diapause
- Overwinter in all stages, mostly near graft

Table 1: Distinguishing characteristics of grape, obscure and vine mealybugs.

	Mealybugs		
	Grape *Pseudococcus maritimus*	Obscure *Pseudococcus viburni*	Vine *Planococcus ficus*
Body shape	Rectangular	Rectangular	Oval
Filaments surrounding body	Thin, non-uniform	Thin, non-uniform	Thick, uniform
Filaments posterior end	Thin, long	Thin, long	Thick, short
Defensive fluid	Reddish, orange	Clear	Clear
Diapause (dormant period)	Yes	No	No
Generations	2	2 to 3	4 to 7
Synchronized generations?	Yes	No	No
Stages overlap throughout year?	No	Yes	Yes
Overwinters under the bark primarily in:	Upper trunk, cordons, spurs	Trunk, cordons, spurs	Graft union, pruning wounds on trunk, base of spurs, (roots in light soils)
In summer lays eggs	Under bark on old wood, bunches	Under bark on old wood, bunches	Under bark on old wood, bunches, throughout the canopy above the fruit zone
Honeydew production	Moderate	Moderate to high	High

MANAGEMENT OF VINE MEALYBUG INFESTATIONS:

Cultural control is very important in slowing the spread of vine mealy bug.

The following tactics should be used for vine mealy bug infested vineyards:

1. Crews (e.g., irrigators, pruners, pickers, etc.):
   - Crews may be allowed to shower and change clothes before entering an uninfested vineyard.
   - The showering and the change in clothing are necessary because all life stages of vine mealy bug (crawlers, in particular) can be carried on the workers skin, clothing and hair.
   - The mealy bugs can survive for eight to 24 hours (temperature dependent) on the workers or their clothing if the cleaning protocol is not followed.

2. The prunings from an infested vineyard should be treated in one of the following ways:
   - Take the prunings out of the vineyard and burn them within a few days of cane removal.
   - Shred and mulch the prunings in the middle of the row away from the root zone of the vine. Shredding makes very small pieces out of the prunings.
   - Vine mealybug can survive on pieces of cane about one to two inches in length.
   - Allow the shreddings to decompose for two to three weeks then disk them under. If the weather does not look like it will cooperate, disk shortly after pruning. Remember to keep the prunings away from the root zone of the vine.
   - Bag the prunings, seal the bag and take them to a landfill very shortly after pruning.
   - Use heavy-duty construction disposal bags.
   - Push the prunings out of the vineyard and let them rot or compost away from the root zone of the vines.
   - Bag the prunings, seal the bags, and allow them to rot in the bags in the vineyard.
   - Use heavy-duty construction disposal bags.
   - In circumstances where the weather has warmed quickly or the winter chill barely happened and the vines are beginning to break bud, leave the prunings in the middle of the row and treat them with Lorsban® when the vines are treated.
   - This is an untested strategy that is not recommended at this time and should be used when there are no other alternatives.

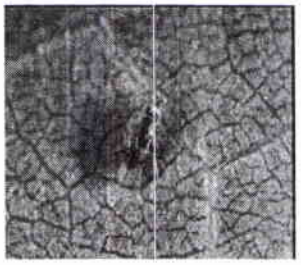
3. Steam clean any equipment that has contact with the infested vineyard. Be sure to remove all plant material.

4. Grapes from infested vineyards should be hand harvested. Mechanical harvesters spread vine mealybug.
5. For table grapes, once grapes are bagged and boxed, the truck bed on which the boxes are loaded should be cleaned of any plant debris before leaving the vineyard. The truck should go directly to the storage facility to unload. The truck should then be steam cleaned at the storage facility before returning to any vineyard.
6. For wine grapes and other grapes transported in gondolas, the gondolas should be covered with a plastic tarp to avoid infested plant material from being blown out of the gondola during transport. If the grapes are for wine production, the infested grapes should be crushed as soon as they arrive at the winery to avoid further spread of vine mealybug. All gondolas and tarps should be steam cleaned before picking up more grapes.

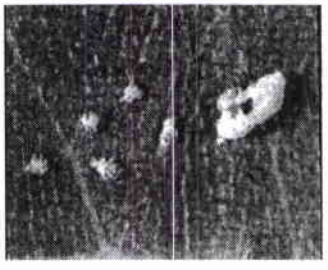
Biological Control of Mealybug:

- Best controlled in crawler stage
- Most effective between late dormancy and bud break
- Keep map of parts of vineyard with infested fruit
- Can treat summer crawlers also
- Don't treat postharvest
- If common, make summer application
- Can return with dormant application
- Leave a portion of vineyard unsprayed as refuge for parasites
- Treat if 20% of spurs are infested (4% for table grapes)

Green lacewing



Pseudaphycus angelicus



Acerophagus notativentris

Chemical Control of mealybugs:

The following management program using insecticides has been developed:

- In spring:
  - prior to bud break in late March, an application of Lorsban® (chlorpyrifos) should be applied.
  - Cover the vine and contact the base of the plant.
  - This treatment is more effective if applied on a warm day (22oC).
  - This is a contact insecticide that targets crawlers that are actively moving about the vine.

- **During bloom (May):**
  - an Admire® (imidacloprid) application should be made.
  - This is a systemic insecticide and works best when put through the drip system.
  - The Admire® can also be applied in flood-irrigated vineyards. but it is not nearly as effective as when applied through the drip system as the drip system concentrates the insecticide in the root zone.

1. two applications can be made.
2. The first application should be made during bloom, and
3. the second approximately eight to 10 weeks later, depending upon the pre-harvest interval.

- **At harvest:**

if a vineyard is heavily infested, the vines should be treated with Provado® (imidachloprid) prior to harvest.

This treatment will give short-term kill of the above ground life stages and reduce the possibility of accidentally spreading vine mealybug to other areas.

Provado® will not give long term residual required to kill newly hatching eggs later in the fall.

Integrating Chemical and Biological Control of Mealybugs

- Rely on biological control if possible
- Do not apply pesticides preventatively
- Avoid pesticides toxic to natural enemies
- Cultural control:

Prune to avoid clusters contacting wood; Ground cover effects? Vetch and ants

To ensure maximum protection of nursery stock,

- Its recommended to implement greater isolation of registered plants from any potential virus source plants and

- control of mealybug populations in these plantings by combining these practices with regular monitoring of registered vines and the new laboratory tests,
- it will be possible to produce a high-quality grapevine stock free of target viruses.
- ensuring that planting material is free of the mealybugs, or
- separated from adjacent sources of mealybugs and infected vines is also important to prevent the rapid infection of new plantings.

	Pred Mites	Insect Preds	Parasites
Admire	-	L	L
Applaud	L	H	L
Assail	M	L/M	M
Danitol	H	H	H
Imidan	M	M	M
Intrepid	L	L	L
Lannate	H	H	H
Provado	L	L/M	H
Sevin	M/H	H	H
SpinTor	L	M	L/M
sulfur	L/H	L	H

REGULATORY CONSIDERATION TO CONTROL MOVEMENT OF VINE MEALYBUG HOST MATERIAL:

- The detection of vine mealybug in Production nurseries or producing vineyards is complicated:
  - All stages of the insect (eggs, crawlers, nymphs and adults) may be found on various parts of the plant, including leaves, berry clusters, canes, under the bark, as well as on roots.
  - The presence of vine mealybug can escape detection during visual inspections when they are present in the cracks of the bark, under the bark, or below soil surface on the roots.
- Male pheromone traps can be used to detect potential infestations in an area; the population must be confirmed visually.
- Each individual plant cannot be inspected when pulled from the growing grounds for shipment.
- If vine mealybug is on the roots of a few plants it will be missed.

Regulation/Certification - as free form vine mealybug:

1. Inter and Intra-county movement.

To prevent artificial movement within a governorate, the a governorate agricultural departement may issue a hold order on an infested property and require the owner to sign a compliance agreement to follow certain procedures to prevent/reduce the artificial spread of vine mealybug.

An un-infested governorate may protect its growers from vine mealybug by:

• Inspection of arriving shipments from infested a governorate. Rejection is possible only if the insect is found.

• Adoption of regulations requiring certain procedures or treatments be made to the

commodity at origin and certified by the county.

- These regulations are possible only after confirming that the insect is not present, and how vine mealybug will be eradicated if found, etc.
- If approved, the regulations have legal authority. then shipments from vine mealybug infested a governorate can be made to the un-infested a governorate using a Certificate of Quarantine Compliance.

2. Chemical Treatment –

- the county (governorate) agricultural commissioner in an infested county (governorate) could certify that an approved commodity treatment has been performed.

• Foliar applications can be effective if properly applied.

• Systemic applications may prove to be effective against vine mealybug.

At this point in time there are no reliable techniques or technology available to a governorate agricultural commissioner to certify a commodity as being free from vine mealybug.

PHYTOSANITARY MEASURES to control Grapevine flavescence dorée MLO

1. Grapevine nurseries should be established in, and propagating material should be collected from, areas where flavescence dorée does not occur.

2. Alternatively, mother plants should be inspected during the growing season and be particularly well protected against the vector (Leaf hoppers, *Scaphoides titanus*).

3. Control of the vector is achieved by:

(i) eliminating eggs through burning pruning wood and treating before bud burst with parathion-activated oils;

(ii) one or two chemical applications against instars 30 and 45 days after first hatching,

(iii) followed by another treatment against adults.

4. Phytoplasmas may be eliminated from infected wood by treating dormant canes with hot water treatment at 45°C for 3 h or 50°C for 40-60 min.

APPENDIX : Guidelines on sanitation procedures:

Heat treatment:

- All known graft-transmissible infectious agents of grapevine, except viroids, can be eliminated from parts of infected plants with varying levels of efficiency by heat therapy.
- Heat treatment can be performed in several ways but, regardless of the procedure used, testing of the treated material for assessment of its health status should follow.
- A sufficient interval between sanitation of the material and the conclusion of virus testing is necessary in order to avoid false negatives.

- Hot-water treatment:
  - Hot water is used for eliminating intracellular prokaryotes like the MLO agent of flavescence dorée,

- From infected grapevine cuttings, collect dormant cuttings and immerse in water according to the method of Caudwell *et al.* (1991).

Advances in Hot Water Treatment for Rootstocks, Rootlings and Grafted Vines:

- Short duration hot water treatment of vine cuttings at 540C for 5 minutes and
- Long duration hot water treatment at 500C for 30 minutes (HWT) are widely used by Australian vine nurseries to satisfy *Phylloxera* quarantine regulations for the movement of vine cuttings or rootlings between regions.
- Long duration HWT is routinely used as a disinfestation treatment for the control of;
  - crown gall (*Agrobacterium vitis),*
  - *Phomopsis,*
  - *Phytophthora,*
  - nematodes and
  - a range of other fungal pathogens.
- Hot water treatment in California is used principally for the disinfestation of mealy bug

- Hot-air treatment:

(a) Place pot-grown vegetative vines (e.g. rooted cuttings 2-year-old or older) of each variety or rootstock type to be taken into the scheme into a heat cabinet and hold at constant temperature of 38±1°C and 16-18 h artificial illumination.

- Collect tips 0.5-1 cm long from vegetative shoots after 4 weeks or more (up to 300 days if the vines survive) from the beginning of the treatment, and root in a heated (25°C) sand bench under mist or, after surface sterilization, in agarized nutrient medium under sterile conditions.

- Pot rooted explants and let them grow in a glasshouse until ready for testing.

(b) Graft a bud from the candidate vine to be heat-treated into the main shoot of a pot-grown, 2-year-old healthy LN 33 indicator.

- Transfer budded LN 33 to the heat cabinet 12-15 days after grafting and expose for 60 days to 37±1°C.

- Move treated vines out of the cabinet.

- Cut LN 33 shoot above grafted bud, allow the bud to develop into a shoot and check for health status.

APPENDIX : *Shoot (meristem) tip culture in vitro:*

- Collect shoot tips or axillary buds from vines grown at 36-38°C. surface-sterilize by dipping explants for 20 min in a 5% solution of commercial sodium hypochlorite and 0.1% Tween 20.
- Rinse thoroughly with 2-3 changes (10 min each) of sterile distilled water.
- Dissect 0.4-0.6 mm-long explants comprising the meristematic dome and the first pair of leaf primordia and transfer to sterile test tubes in agarized Murashige and Skoog medium supplemented with 0.5 ppm benzylaminopurine. Allow explants to grow for 45 days at 25°C in a cabinet with 16 h artificial illumination (about 4000 lux).
- Separate actively growing shoots and transfer individually to a medium containing 1 ppm benzylaminopurine for 45-50 days for elongation. Transfer elongated shoots (3 nodes long or more) individually to a medium containing 0.5-1 ppm indolbutyric acid for root production.
- Transfer rooted explants to small pots containing vermiculite under saturated humidity conditions, then to pots with soil compost and protect plantlets with a polyethylene bag for as long as necessary (usually 2-3 weeks).
- Grow plantlets in a glasshouse until ready for testing.

- **References:**

1. CURRENT STATUS OF THE VINE MEALYBUG, *PLANOCOCCUS FICUS*, IN CALIFORNIA, A Report from the Division of Plant Health and Pest Prevention Services, March 25, 2003.

2. . Djerbi M. Control of virus and virus-like diseases of fruit crops UNDP-FAO-RAB/88/025: Present situation and future prospects of the grapevine, citrus and stonefruit networks

3. Grapevine flavescence dorée phytoplasma. Data Sheets on Quarantine Pests. CABI and EPPO for the EU under Contract 90/399003

3. Petersen C.L. and J.C. Charles , 1997. Transmission of grapevine leafroll-associated closteroviruses by *Pseudococcus longispinus* and *P. calceolariae* . *Plant Pathology* 46, 509-515

النيماتودا الناقلة للأمراض الفيروسية

النيماتودا الناقلة للأمراض الفيروسية

د. عادل العيد

النيماتودا :

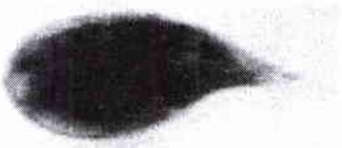
1 – كائن حي، خيطية أو أسطوانية الشكل (صورة رقم 1) ومنها كروية منتفخة (صورة رقم 2).

2 – تعيش في التربة ومنها ما يتطفل على الإنسان و الحشرات والحيوانات والنبات.

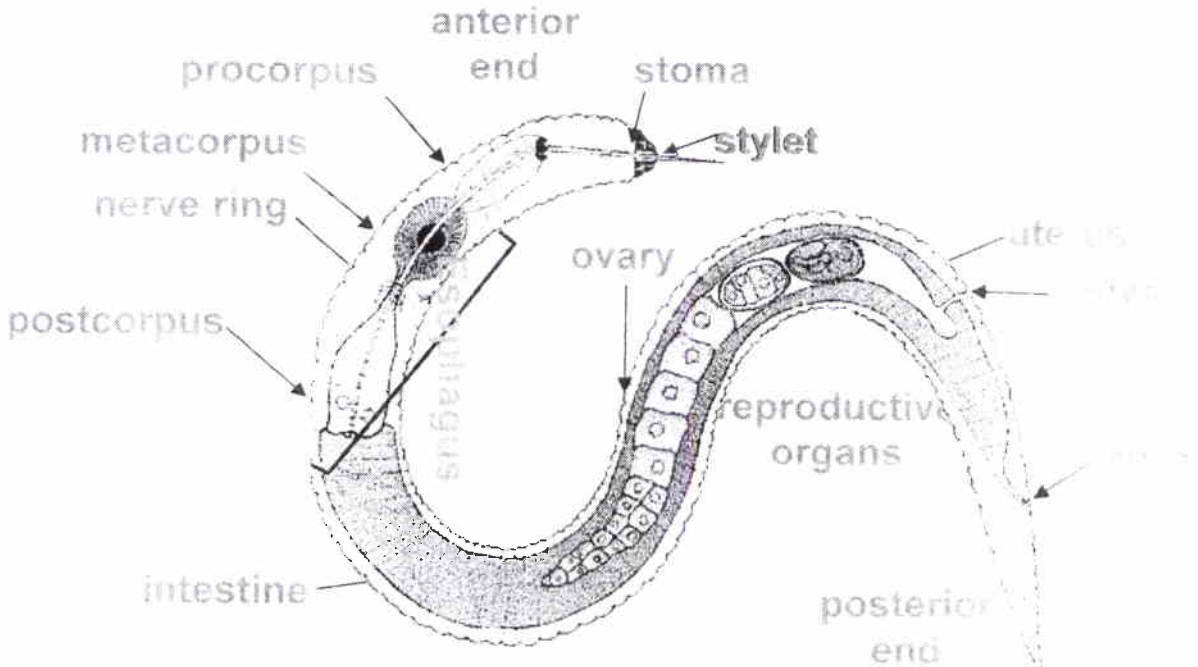
3– جسمها يتكون من جهاز هضمي و عصبي و إخراجي و تناسلي ولا يوجد بـــه جهـــاز دوري أو تنفســـي (صورة رقم 3).

4 – تحتاج إلى طبقة من الماء للحياة

صورة رقم 1 توضح شكل النيماتودا الخيطية



صورة رقم 2 توضح شكل النيماتودا الكروية المنتفخة



صورة رقم 3 توضح تركيب جسم النيماتودا

النيماتودا المتطفلة على النبات :

1 – وجود (الرمح) في مقدمة الرأس و الذي يتم به اختراق الجدار الخلوي للنبات و امتصاص المواد الغذائية.

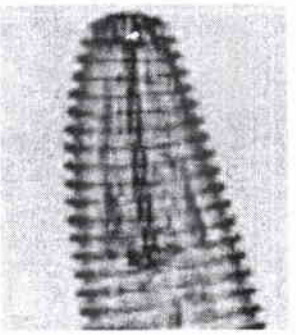
2 – صغيرة الحجم لا ترى بالعين المجردة حيث يبلغ طولها من 0.03 ملم إلى 5 ملم وعرضها يتراوح مـــن 0.015 إلى 0.05 ملم.

3 – تعيش تحت الظروف المناخية المختلفة من حرارة أو رطوبة.

4 – موجودة في جميع أنواع التربة الرملية منها أو الطينية.

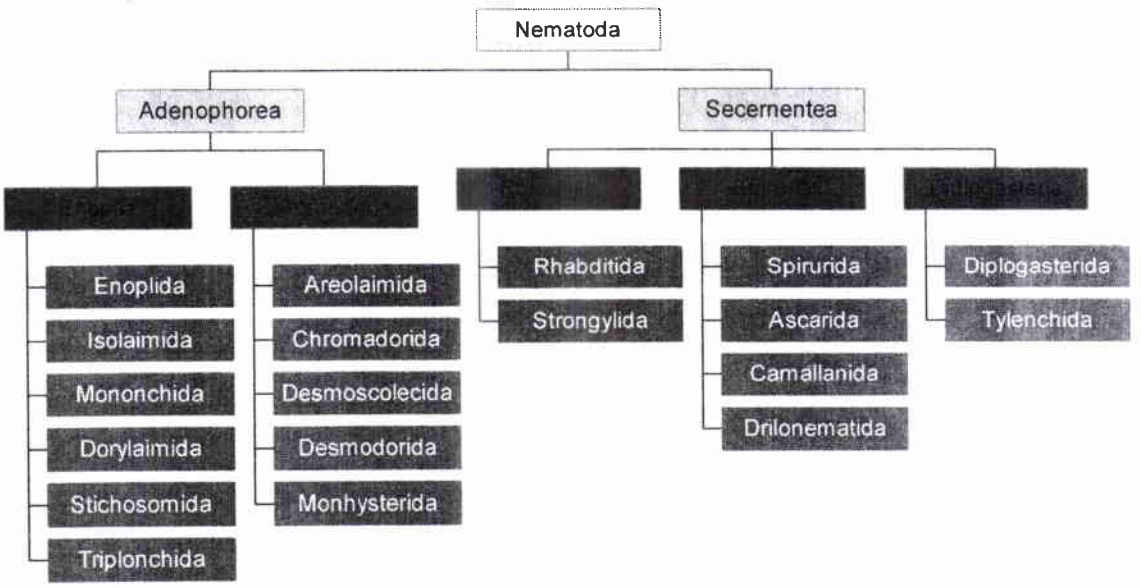
5– منها ما يتطفل على نباتات محددة ومنها ما يتطفل على عدد كبير من النباتات ومنها مـــا يتطفـــل علـــى الجذور أو الأوراق أو الأزهار.

6– جسم النيماتودا غير مقطع رغم وجود خطوط طولية وعرضية على الجسم الخارجي (صورة 4 رقم) .



صورة رقم 4 خطوط طولية وعرضية على الجدار الخارجي لجسم النيماتودا

Classification of Nematodes



أعراض الإصابة بالنيماتودا :

تتشابه مع أعراض الإصابة بالأمراض الأخرى و خاصة نقص العناصر الغذائية.

1 – تكون العقد الجذرية، التبقعات، عفن الجذور.

2 – ذبول النبات في منتصف النهار.

3 – اصفرار الأوراق، تساقطها ، تكور الأوراق.

4 – وجود مواقع في الحقل النمو فيها ضعيف.

5 – عدم فاعلية مكافحة آفات أخرى غير النيماتودا.

6 – نضج الثمار قبل موعدها و تكون صغيرة الحجم.

7 – تدني في الإنتاج من ناحية الكمية و النوعية.

الأضرار التي تسببها النيماتودا للنبات :

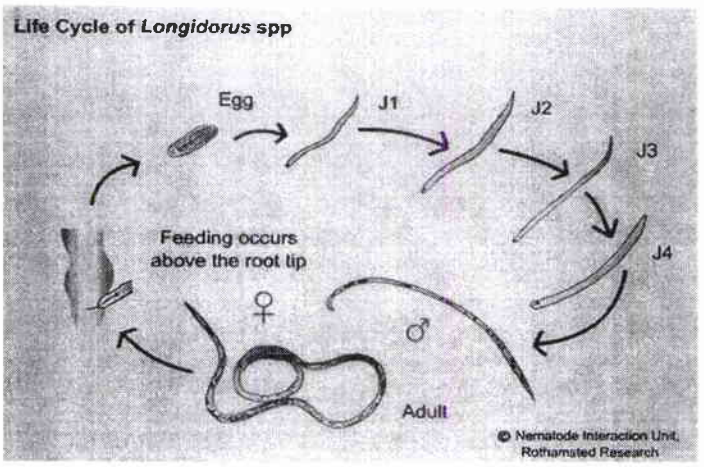
1 – إحداث جروح في خلايا النبات مما يسهل دخول مسببات الأمراض البكتيرية والفطرية.

2 – الخسارة الاقتصادية تقدر بحوالي 12 % من قيمة الإنتاج العالمي.

3– نقل الأمراض الفيروسية (23 مرضاً فيروسياً).

دورة حياة النيماتودا :

الطور البالغ — بويضة بداخلها طور اليرقة الأول – تفقس – انسلاخ أول – طور اليرقة الثاني – انسلاخ ثاني – طور اليرقة الثالث – انسلاخ ثالث – طور اليرقة الرابع – انسلاخ رابع – الطور البالغ (صورة رقم 5) وتختلف مدة دورة الحياة باختلاف درجات الحرارة و اختلاف نوع النيماتودا و توفر العائل.



صورة رقم 5 دورة حياة النيماتودا

انتقال و حركة النيماتودا من موقع إلى آخر:

تنتشر النيماتودا من موقع إلى آخر داخل المزرعة أو من مزرعة إلى أخرى أو من بلد إلى آخر بواسطة :

1 – المعدات الزراعية.

2 – مياه الري.

3 – البذور و الأبصال والأشتال.

4 – بقايا المحاصيل المصابة.

طرق التطفل على النباتات :

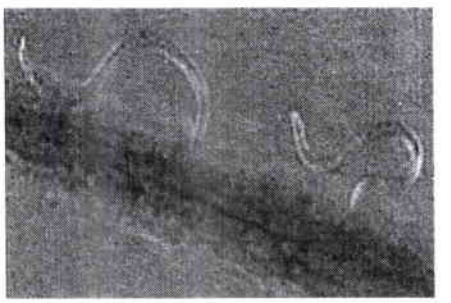
1 – تطفل خارجي (Ectoparasitic) :

1 – النيماتودا تبقى خارج النبات في التربة (صورة رقم 6).

2 – تتغذى عن طريق الشوكة وهي طويلة نسبياً.

3– جميع الأطوار المتحركة متطفلة وتتطفل على عدد كبير من النباتات.

النيماتودا الخنجرية *Xiphinema sp.*، النيماتودا الابرية *Longidorus sp.*



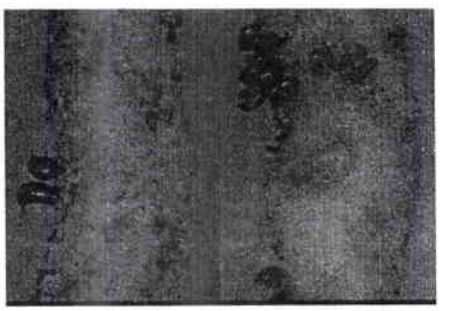
صورة رقم 6 النيماتودا المتطفلة خارجياً

2– تطفل شبه داخلي (Semi-Endoparasitic) :

1 – تدخل الجزء الأمامي من جسمها في خلايا النبات ثم تبدأ بالتغذية.

2 – تبقى ساكنة لا تتحرك و تتحول إلى الشكل البيضاوي (صورة رقم 7).

نيماتودا الحمضيات *Tylenchulus semi penetrans*، النيماتودا الكلوية *Rotylenchulus sp.*

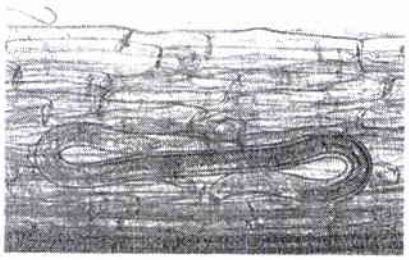


صورة رقم 7 النيماتودا المتطفلة تطفل شبه داخلي

3 – تطفل داخلي متحرك Migratory endoparsite :

تتطفل على الخلايا في موقع معين ثم تخرج و تدخل في موقع آخر مما يؤدي إلى تكون جروح متعددة في الجذر وجميع المراحل المتحركة من النيماتودا تعتبر متطفلة (صورة رقم 8).

النيماتودا الزنبركية (Helicotylenchus sp.) و نيماتودا التقرح (Pratylenchus sp.)

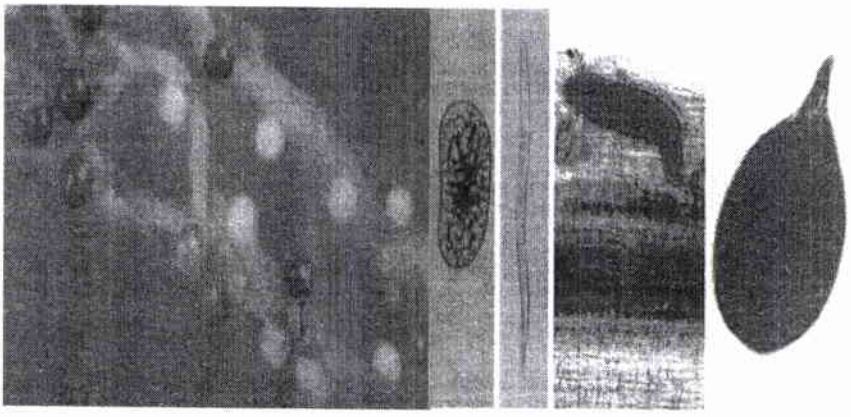


صورة رقم 8 النيماتودا المتطفلة تطفل داخلي متحرك

4– تطفل داخلي ثابت (Sedentary Endoparasitic)

هو الأكثر تدميراً للنبات بحيث تدخل اليرقة الثانية داخل خلايا الجذر و تبقى في نفس الموقع حتى تنتهي دورة حياتها (صورة رقم 9).

نيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne sp.*، النيماتودا المتحوصلة (cyst) *Heterodera, Globodera*

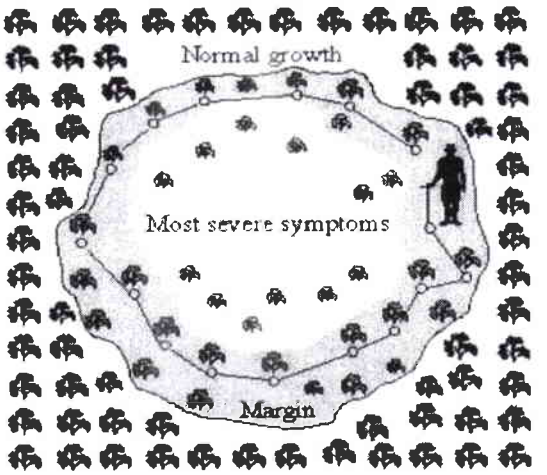


صورة رقم 9 النيماتودا المتطفلة تطفل داخلي ثابت.

طرق أخذ العينات

1 – عينات التشخيص (Diagnostic Sample)

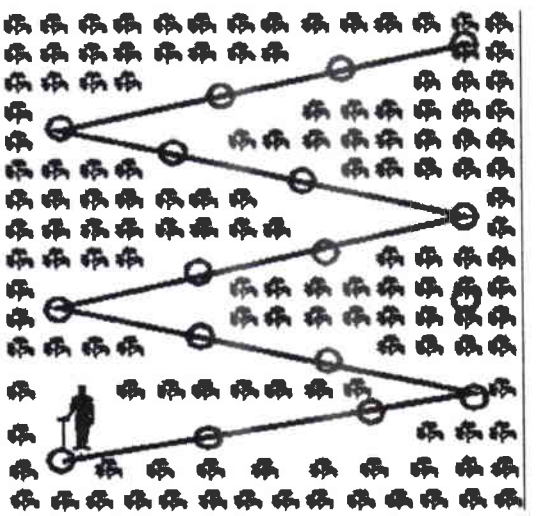
تأخذ خلال الموسم الزراعي من المنطقة بين النباتات السليمة والنباتات المصابة (صورة رقم 9).



صورة رقم 9 طريقة أخذ عينات التشخيص

2– عينات النوع و العدد (Quantitative Sample)

تأخذ قبل الزراعة أو بعد الحصاد لمعرفة أنواع وعدد النيماتودا الموجودة في الحقل (صورة رقم 10).



صورة رقم 10 طريقة اخذ عينات النوع والعدد

إن إمكانية انتشار بعض الفيروسات النباتية في التربة وإصابة النباتات عن طريق جذورها يعود إلى العالم Mayer عام 1886 ، حيث وجد أن هناك بعض الفيروسات يمكنها البقاء في التربة لمدة طويلة دون عائل أو ناقل معروف وأن هذه الفيروسات لا تنقل بواسطة الملامسة المباشرة للجذور، وهذا ما ساعد العلماء

في توضيح الدور الذي تلعبه النيماتودا كناقلات لفيروسات التربة إضافة إلى أنها ناقلة للمسببات المرضية الأخرى كالفطريات والبكتيريا من النباتات المصابة إلى النباتات السليمة.

بعد مجموعة من التجارب والبحوث تم الوصول إلى التقرير الأول للفيروس والمنقول بالنيماتودا المتطفلة على النبات من قبل العالم W.B.Hewitt وزملائه عام 1958 عندما أثبتوا انتقال مرض فيروس الورق المروحي للعنب عن طريق النيماتودا الخنجرية *Xiphinema index*.

تنقل الأجناس التالية من النيماتودا والتابعة لرتبة Dorylaimida العديد من الأمراض الفيروسية:

1 - *Longidorus*.spp

2 - *Xiphinema*.spp

3 - *Paralongidorus*.spp

4 - *Paratrichodorus*.spp

5 - *Trichodorus*.spp

دورة حياة هذه الأجناس تتراوح من 2 – 5 سنوات.

الأجناس التالية من النيماتودا تنقل العديد من الفيروسيات :

11 spp of *Xiphinema* transmit 13 NEPO viruses.
11 spp of *Longidorus* transmit 10 NEPO viruses.
14 spp of *Trichodorus* transmit various strains of two TOBRA viruses: tobacco rattle and pea early browning.

العلاقة بين النيماتودا والفيروسات النباتية :

أ - تأثير الفيروسات النباتية على النيماتودا :

إصابة يرقات نيماتودا تعقد الجذور بالفيروسات حيث تبدي اليرقات المصابة أعراض الشلل ثم تموت النيماتودا وينتقل مسبب المرض من النيماتودا المصابة إلى النيماتودا السليمة. وينطبق ذلك على أنواع النيماتودا الحرة الأخرى الموجودة في التربة حيث تتأثر بشكل كبير بالفيروسات مما يؤدي إلى الشلل ثم الموت.

ب -علاقة متبادلة نوعية بين أنواع النيماتودا خارجية التطفل وبعض الفيروسات التي تنقلها:

مثل الأجناس الخمسة سابقة الذكر الناقلة للفيروسات ويتعلق نقل الفيروسات من قبل النيماتودا بشكل الرمح وبنيته.

العلاقة بين الناقل والفيروس:

أولاً – كفاءة النقل :

تقوم الأطوار اليرقية للنيماتودا الناقلة بنقل الفيروس بنفس الكفاءة من النبات المصاب إلى السليم.

ثانيا – فترة الاكتساب والتلقيح :

إن انتقال الفيروس من النبات المصاب إلى النبات السليم تتم باكتساب النيماتودا الناقلة لجزيئات الفيروس من النبات المصاب أثناء تغذيتها عليه والاحتفاظ بها ثم تحريرها إلى النبات السليم حيث وجد أن زمناً قدره من 15 دقيقة إلى ساعة يكون كافياً (حسب نوع النيماتودا).

ثالثا – آلية النقل :

بعد ابتلاع النيماتودا لغذائها المحمل بالفيروسات تمتص جزيئات الفيروس على طبقة الكيوتكل الداخلية المبطنة لتجويف الفم أو تجويف المرىء ثم يحدث انسياباً عكسياً (إقياء) للمواد يتمثل باللعاب الذي تحقنه النيماتودا في خلايا عائلها النباتي.

علاقة الفيروس بالنيماتودا :

1 – لا يتم نقل الفيروسات عن طريق البويضة.

2 – لا تستنسخ الفيروسات داخل النيماتودا.

3 – لا يحتفظ بالفيروسات خلال مراحل الانسلاخ اليرقي.

Longidorus : غلاف الرمح و الحلقة الموجهة تتغير خلال الانسلاخ.

Xiphinema ,*Trichodorus* : غلاف المرىء لا يتغير خلال الانسلاخ ولكن يحدث تغيير في مكوناته، فينتقل الفيروس إلى الأمعاء.

أجناس وأنواع النيماتودا الناقلة للفيروس :

أولاً ــ جنس النيماتودا الإبرية Longidorus :

1 – متطفلة خارجياً طويلة نسبياً تتراوح من 1.5 إلى 13 مم وعرض الجسم (6– 15) مايكرون.

2 – الرمح طويل نوعاً ما (100– 250) مايكرون يشبه الإبرة لذلك سميت النيماتودا الإبرية.

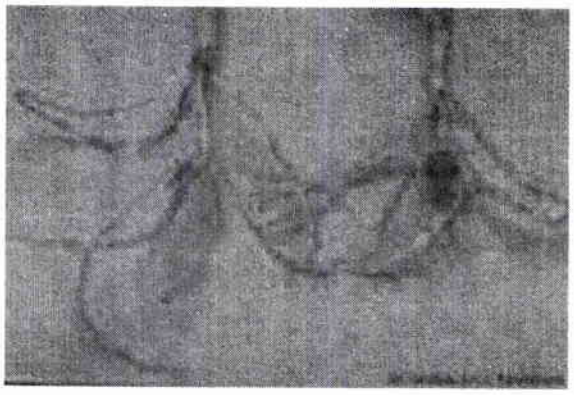
3 – الجهاز التناسلي يتألف من مبيضين وهي تتكاثر بكرياً .

4– مكان الاحتفاظ بالفيروسات على سطح الكيوتكل المبطن لامتداد الرمح وعلى السطح الداخلي للحلقة الموجهة للرمح.

أعراض الإصابة:

تصيب النيماتودا الإبرية جذور الخضروات و الثمار والأعشاب و تهاجم فقط نهايات الجذور التي يتغير شكلها إلى كرات طرفية (صورة رقم 11) .

تدوم دورة حياتها أكثر من سنة والطور البالغ يعيش أكثر من سنة، وقد لوحظ أن بعض أنواع النيماتودا الإبرية تسبب تشكيل خلايا متعددة النواة في نهاية الجذور.



صورة رقم 11 أعراض الإصابة بالنيماتودا الإبرية على الجذور

العوائل النباتية:

تسبب النيماتودا الإبرية أضراراً كبيرةً لكثير من النباتات كالعنب والأشجار المتساقطة الأوراق والمحاصيل العلفية والنجيليات والذرة والخضراوات والبطاطا والخس والجزر والملفوف والفراولة وتنقل العديد من الفيروسات ومثال ذلك:

L. elongatus , *L. attenuatus* واللتان تنقلان raspberry ring spot virus و Tomato black ring virus.

ثانياً : جنس النيماتودا الخنجرية :Xiphinema

1 - أسطوانية طويلة يصل طولها من 1.5-4.5 مم وعرضها 20 مايكروناً وتصبح ذات شكل لولبي عندما تموت.

2 - الرمح طويل يشبه الخنجر لذلك سميت بالخنجرية .

3 - الجهاز التناسلي يتألف من مبيض ثنائي أو مبيض واحد.

4 - إن نوع *X. index* تستغرق دورة حياتها حوالي ثلاث سنوات والأنثى تضع بيوضها في الصيف.

5 - مكان الاحتفاظ بالفيروسات على سطح الكيوتكل المبطن لامتداد الرمح وعلى السطح الداخلي للحلقة الموجهة للرمح وسطح الكوتيكل المبطن للمرىء.

العوائل النباتية:

تتطفل النيماتودا الخنجرية على العوائل التالية :

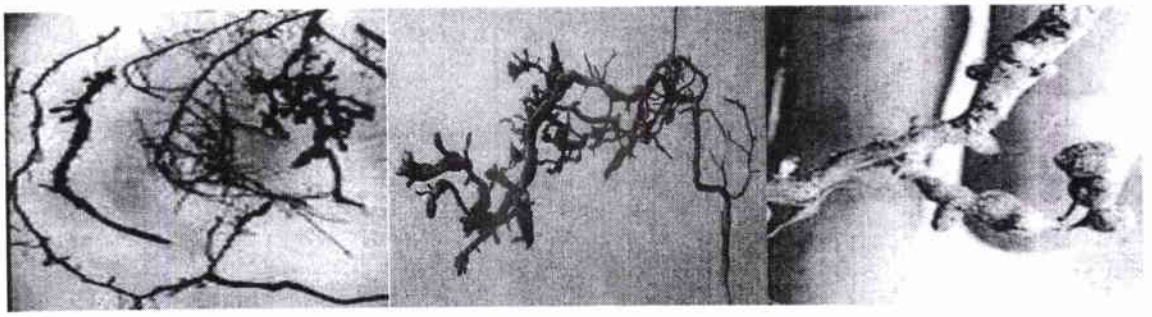
عنب – حمضيات – تين – مشمش – دراق – لوز – زيتون قمح – فراولة – مراعٍ وغابات – جزر – ملفوف – زهور — قطن .ذرة – أجاص

أعراض الإصابة :

1 – التدهور المفاجئ في نمو الجذور.

2 – تورم قممها بشكل منحني في بعض العوائل النباتية.

3 – موت القمم النامية للجذور المغذية.



صورة رقم 11 أعراض الإصابة بالنيماتودا الخنجرية على الجذور

تنقل النيماتودا الخنجرية العديد من الأمراض الفيروسية ومثال ذلك:

X.Americanum والتي تنقل الأمراض الفيروسية التالية:

1 – tobacco ringspot and tomato ringspot

تكتسب النيماتودا الفيروس خلال 24 ساعة من بداية التغذية على النبات المصاب.

الاعراض :

1 – المسافة بين العقد تكون قصيرة.

2 – مساحة الورقة تصبح أقل من الطبيعي.

3 – الثمار تكون صغيرة.

4 – موت بطئ للنبات.

2– Peach rosette mosaic virus

الأعراض :

1 – تجعد الأوراق.

2 – التواء وانحناء الأغصان.

3 – النبات غير مقاوم للظروف الخارجية.

: X. Diversicaudatum

تنقل Arabis mosaic virus على عدة محاصيل والفيروس يبقى في جسم النيماتودا لمدة 8 شهور.

X. Index and X. italiae

تنقل مرض الورقة المروحية على العنب GFLV. تكتسب النيماتودا الفيروس خلال 15 دقيقة من التغذية ويبقى داخلها لمدة 8 شهور حتى في غياب العائل.

الأعراض :

1 – تشوه العروق الرئيسية للأوراق بما يشبه المروحة المفتوحة.

2 – اصفرار الأوراق وخاصة العروق.

3 – تدني في الإنتاج و التوعية حتى 80%.

4 – يكون نمو النباتات غير طبيعي و أقل حجماً من باقي النباتات.

ثالثاً : جنس نيماتودا تقصف الجذور Trichodorus :

1 – ويتراوح طولها مابين 0.5 إلى 1.5 مم وفي العرض 30–50 ميكروناً.

2 – شكل الجسم لكلا الجنسين (ذكر وأنثى) يكون شبه أسطواني وسمين نوعاً ما ولها ذيل مستدير غير حاد والكيوتكل لديها سميك.

3 – مكان الاحتفاظ بالفيروسات الرمح و سطح الكيوتكل المبطن للمرىء.

أعراض الإصابة:

أ -الأجزاء الهوائية :

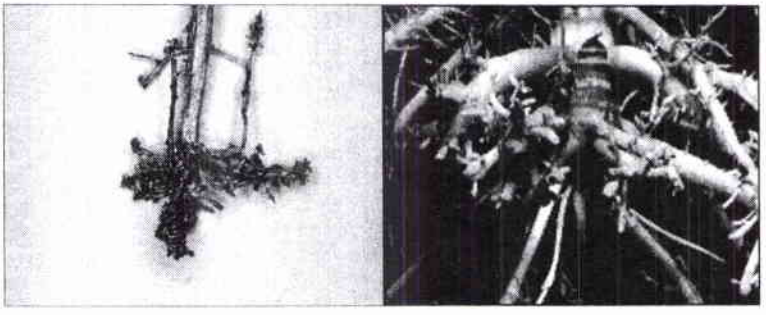
1 – اصفرار كامل النبات ونقص وسوء نوعية الإنتاج.

2 – انخفاض عدد الأوراق والأغصان وصغر حجمها عما كانت عليه في النباتات السليمة.

ب - المجموع الجذري:

1 – نمو غير طبيعي للجذور الجانبية والنهايات الجذرية تكون أدكن من لونها الطبيعي.

2 – توقف نشاط القمم الميرستيمية الجذرية وتوقف نمو الجذور مما يؤدي إلى نشوء جذور قصيرة ومتقصفة.



صورة رقم 11 أعراض الإصابة بالنيماتودا الخنجرية على الجذور

العوائل النباتية:

تهاجم هذه النيماتودا أنواع واسعة من النباتات: الملفوف – البرسيم – الذرة – اللوبياء – العنب – الخوخ – المراعي والغابات – البطاطا – التبغ –القطن – التفاح – القمح – الفراولة – الدراق – الإجاص — الشعير.

وينقل جنس نيماتودا تقصف الجذور العديد من الأمراض الفيروسية ومثال ذلك:

-*Trichodorus viruliferous* والتي تنقل Tobacco rattle and pea early browning virus

-*T.similis* والتي تنقل Tobacco rattle virus

مكافحة النيماتودا الناقلة للفيروسات:

1 - الحجر الزراعي.

2 – مكافحة الأعشاب.

3 – زراعة الاشتال السليمة .

4 – الأعمال الزراعية .

5 – الدورة الزراعية : خاصة للفيروس الورقة المروحية على العنب لمدة 3- 5 سنوات.

6 – النباتات المقاومة : تم التعرف على صنف من نبات العنب من أفضل مصادر المقاومة لنيماتودا *X.* index هو الصنف النباتي *V. candicans.cv* وهذا يستخدم في برامج التربية في شمال أمريكا وأوروبا.

الطرق الحديثة المستخدمة في تشخيص الأمراض الفيروسية وشبه الفيروسية

الطرق الحديثة المستخدمة في تشخيص الأمراض الفيروسية وشبه الفيروسية

د. عبير أبو شربي
المركز الوطني للبحث والإرشاد الزراعي

Immunosorbent electron microscopy (ISEM)

The principle of immunosorbent electron microscopy (ISEM) is the selective trapping of plant viruses on to electron microscope grids precoated with a specific antiserum. ISEM may be combined with antibody coating (often referred to as "decoration"), a procedure whereby virus particles trapped on the microscope grid are exposed to the homologous antiserum, thus becoming visibly covered with antibody molecules.

The consensus is that ISEM is highly reliable (there are virtually no false positives), as sensitive as ELISA, fast (results can often be obtained within one or two hours) and operationally simple (it requires tools and reagents readily available in most laboratories).

Unfortunately, ISEM requires an electron microscope and accordingly is not suitable for large-scale routine testing. Specimens for ISEM, however, can readily be prepared in laboratories with no electron microscope facilities and can then be shipped for observation (even over long distances) to properly equipped institutions.

Basic TOOLS AND REAGENTS

the followings are required:

porcelain mortars 6 cm in diameter or smaller, or glass microscope slides and glass rods

- carborundum powder (600 mesh) or quartz sand.
- bench centrifuge with appropriate glass or plastic conical tubes.
- fine straight-point tweezers
- Petri dishes 9 cm in diameter
- bars of dental wax, silicone-treated paper, or parafiim
- Pasteur pipettes
- electron microscope grids (400 mesh) covered with carbon film
- protestants:

2.5 to 5 percent aqueous solution of nicotine

2 percent aqueous polyvinylpyrrolidone (PVP)

1 percent aqueous polyethylene glycol (PEG), MW 6 000 to 7 500

- phosphate buffer 0. 1 M, pH 7.0, made from the following stock solution (1 M):

136.09 g of KH2PO4 in distilled water to 1 litre (solution A) 268.077 g of Na2HPO4 in distilled water to 1 litre (solution B)

Mix 3.86 ml of solution A with 6.14 ml of solution B and dilute tenfold

- distilled water

- staining solutions:

1 to 2 percent uranyl acetate in distilled water, pHnot adjusted

2 percent sodium or potassium phosphotungstate in distilled water, adjusted to pH 7 with NaOH or KOH

- appropriate antiserum

PREPARATION OF TISSUE EXTRACTS

Extracts may be prepared from tissues of different organs of field- or greenhousegrown plants (leaves, roots, bark, dormant or breaking buds) or vectors (insects, nematodes). Plant tissues (usually 100 to 200 ma) are ground in a mortar in the presence of carborundum powder or quartz sand and 0.3 to 0.5 ml of phosphate buffer or, especially with grapevine and stone fruits, one of the above protectants (nicotine, PVP, PEG). When a smooth paste is obtained, 0.3 to 0.5 ml of buffer are added and the sample is ground again. The slurry is transferred to a centrifuge tube and centrifuged at 1 500 to 2 000 g. The supernatant fluid is collected and used If a centrifuge is not available, tissue extracts can be further diluted with phosphate buffer to 1:15 to 1:20 with respect to tissue weight, and used as such.

Insect and nematode vectors are crushed with a glass rod on a glass slide in a droplet of buffer or protectant. A droplet of buffer is then added and the extract is ready to be used.

ANTISERUM DILUTIONS

The purpose of using an antiserum is twofold: to coat EM grids for trapping virus particles and to "decorate" virus particles by attachment of antibody molecules to the antigenic sites of the particles. Crude antisera are perfectly

suitable for both uses, provided that they are properly diluted. For coating of grids, dilute antiserum to near or above its end point (usually 1:1000 to 1:5 000) with buffer. For decorating virus, dilute antiserum to 1:10 to 1:100 with buffer. Use of freshly diluted antisera is advisable.

PRECOATING OF EM GRIDS

In certain cases, precoating of EM grids with protein A, a bacterial wall protein that binds specifically to the basal part (Fc portion) of antibody molecules, can be advantageous. For instance, protein A allows trapping of more virus particles because of the richer antibody layer on the grid. It also allows the use of undiluted,

low titre (1:8 to 1:16) antisera which would not be suitable after high dilution as required by ordinary ISEM.

Protein A is diluted in phosphate buffer at a final concentration of 10 to 100 ?g per ml, a drop is placed on the grid for five minutes at room temperature and the excess is rinsed off before exposure to antiserum.

ANTISERUM COATING OF EM GRIDS

Drops of diluted antiserum (1:1 000 to 1 :5 000) are placed on dental wax or other hydrophobic supports (parafilm strips, silicone-treated paper) in a plastic Petri dish containing moist filter paper (moist chamber). A freshly prepared carbon-coated grid is gently placed, film-down, on top of each antiserum drop and floated for 5 to 10 minutes at room temperature. Grids are then removed with tweezers and rinsed.

RINSING THE EM GRIDS

Throughout the ISEM procedure, grids must be carefully

rinsed to obtain clean preparations. Buffer rinse (Figure 286) is used after protein A precoating, antiserum coating and incubation of the grid with tissue extract. Distilled water rinse is used after second antibody coating (decoration of virus particles), before negative staining for uranyl acetate precipitates in the presence of phosphate ions, or at neutral pH.

Two rinsing procedures can be utilized:

Grids are floated on drops of buffer or distilled water, as appropriate for 5 to 10 minutes.

Grids are retained in tweezers, held vertically and rinsed with 25 to 30 drops of buffer or water from a Pasteur pipette held close to the grid.

NEGATIVE STAINING

Negative stain can be applied with either system used for rinsing, i.e. floating grids on small drops of the staining solution for 30 seconds to one minute, or applying the stain dropwise (five drops) with a Pasteur pipette.

SUMMARY OF THE PROCEDURE

Prepare tissue extracts; place drops of extract in a moist chamberon a hydrophobic support .

Float antiserum-coated grids film-down, one on each drop of extract

Incubate at room temperature or in the cold (4°C) for 6 to 8 hours.

Rinse with 25 to 30 drops of phosphate buffer from a Pasteur pipette

Drain with filter paper.

Place drops of antiserum at dilution of 1: 10 to 1: 100 in the moist chamber on a hydrophobic support .

Float grids on antiserum drops for 10 to 15 minutes at room temperature

Rinse with 25 to 30 drops of distilled water from a Pasteur pipette

Apply negative stain dropwise (five drops) from a Pasteur

Remove excess with filter paper.

Grids are ready for observation.

Observe with the electron microscope and read the results.

Adavanteges:

- Highly reliable (there are virtually no false positives)
- As sensitive as ELISA
- Fast (results can often be obtained within one or two hours)
- Simple (it requires tools and reagents readily available in most laboratories).

Disadvantages:

- ISEM requires an electron microscope and accordingly is not suitable for large-scale routine testing.
- Specimens for ISEM, can readily be prepared in laboratories with no electron microscope facilities and can then be shipped for observation (even over long distances) to properly equipped institutions.
- Observe with the electron microscope and read the results.

Molecular hybridization

PRINCIPLE

A viral particle is composed of nucleic acids [ribonucleic acid (RNA) or deoxyribonucleic acid (DNA)] and a capsid made up of several dozen to a thousand copies of coat protein subunit. In some cases, the virus possesses an envelope composed of viral proteins integrated in membranes deriving from the host cell. Serological techniques detect the virus by specific recognition of the coat protein by specific antibodies developed in animals against this protein. Molecular hybridization techniques detect viral nucleic acids by specific recognition of their nucleotide sequence.

Nucleic acids are long, linear polymers of nucleotide molecules. Each nucleotide is in turn composed of several elements: a nitrogencontaining base linked to a phosphate group and a sugar molecule (ribose for RNA and deoxyribose for DNA). DNA contains four different bases: adenine (A), guanine (G), cytosine (C) and thymine (T). In the case of RNA, thymine is replaced by uracil (U), the three other bases being the same.

DNA is usually found in a double-stranded configuration, i.e. two chains of DNA associate through specific base pairing (A pairs with T and C pairs with G). Base pairing is extremely specific and creates non-covalent hydrogen bonds that unite the molecules associated in this way. RNA is most commonly found in a single stranded configuration but, like DNA, it possesses the capacity to form double-stranded structures through A-U and G-C pairing.

The specific pairing of the bases composing nucleic acids constitutes the basis for the formation of hybrids (double-stranded structure) between complementary molecules and thus for the use of molecular hybridization as a diagnostic technique.

Nucleic acid molecules differ from one another in the order and sequence of alignment of their nucleotides (= nucleotide sequence). Two molecules of complementary sequences will form double-

stranded hybrids under suitable conditions. For example, TCGGCGTAT will pair with AGCCGCATA to make a DNA-DNA hybrid.

A probe used for virus detection in molecular hybridization experiments is a singlestranded nucleic acid molecule prepared from a viral nucleic acid, with a nucleotide sequence complementary to that of the target viral RNA molecule.

Thus a DNA probe with the sequence TCGGCGTAT will specifically detect RNA and DAN molecules with the respective sequence AGCCGCAUA and AGCCGCATA. An RNA probe with the same specificity would be UCGGCGUAU.

The molecular hybridization detection system presented here is based on a solid support hybridization, the sample being permanently immobilized on a nitrocellulose membrane. We describe the technique using the two most frequently used types of probe:

Complementary DNA probes cloned in plasmid vector; invetro transcribed complementary RNA probes prepared from complementary DNA cloned into special purpose transcription plasmid vectors.

The probes can be labelled either radioactively or by incorporation of a non radioactive marker such as biotin. The techniques for the determination of probe specific activity are described following the experimental protocol.

BUFFERS

See Table 9 for commercial sources of chemicals.

Grinding buffer for viroids (GPS): 200 mN glycine 100 mM Na2HP04 600 mM NaCI 1 percent SDS (sodium dodecyl sulphate)

Adjust pH to 9.5, autoclave 20 minutes at 120°C, then add:

0.1 percent DIECA (sodium diethyldithiocarbamate) 0.1 mM DTT (dithiothreitol)

Grinding buffer for viruses: 50 mM sodium citrate, pH X.3 2 percent PVP (polyvinylpyrrolidone) Autoclave 20 minutes at 120°C, then add:

1 mM EDTA 20 mM DIECA

Phenol/chloroform mixture: 1 volume water-saturated phenol

1 volume chloroform/pentanol (24 /1)

20X SSC buffer: 3 M NaCI

0.3 M sodium citrate Adjust pH to 7.0.

Formaldehyde denaturation buffer: 5X SSC

25 mN Na2HP04

5X Denhart [0.1 percent each of bovine serurn albumin (BSA), Ficolland PVP

360] 50 percent deionized formamide 200 mg per ml of denatured calf thymus DNA

DNA probes hybridization buffer:

4 volumes DNA probes prehybridization buffer 1 volume 50 percent dextran

sulphate

RNA probes pre-hybridization and hybridization buffer: 50 percent formamide

50 mM phosphate buffer pH 6.5

5X SSC

0.1 percent SDS

1 mM EDTA

0.05 percent Ficoll

0.05 percent PVP 360

200 mg per ml of denatured salmon

sperm DNA

Washing buffers: Washing buffes A: 2X SSC 0.1 percent SDS Washing buffer B.: 0.2X SSC 0.1 percent SDS Washing buffer C: 0.1 X SSC 0.1 percent SDS

Development buffers for biotinylated probes: Buffer 1:

100 mM Tris-HCI pH 7.5 100 mM NaCI

2 mM MgCI

0.05 percent Triton X 100 Buffer 2:

Buffer 1 plus 3 percent BSA Buffer 3:

100 mM Tris-HCI pH 9.5 100 mM NaCI

EXPERIMENTAL SET-UP

Schematically the technique can be divided into five steps:

Probe labelling. This is achieved by incorporation of a labelled (radioactive or biotinylated) nucleotide triphosphate precursor during in vitro reactions (nick translation for DNA probes or transcription for RNA probes). Sample preparation. The nucleic acids present in the plant extract are immobilized on a nitrocellulose membrane by baking it for two hours at 80°C under vacuum.

Hybridization. The labelled probe will form double-stranded structures under suitable conditions with the target nucleic acid immobilized on the membrane. Washing(s). Non-hybridized probe molecules are removed by successive washings of the membrane under stringent conditions. Hybrid detection. For radioactive probes,

this is achieved by contact of an Xray film with the membrane (autoradiography), usually for 24 hours. In the case of biotinylated probes, three additional steps are required:

1. incubation in the presence of streptavidin, which reacts specifically with the biotin molecules fixed on the probe;

2. incubation in the presence of a biotinylated enzyme, which will be trapped by the streptavidin already retained on the membrane;

3. an enzymatic reaction that results in the formation of a coloured product at the fixing point of the complex probe biotin-streptavidin-biotinylated enzyme.

EXPERIMENTAL PROTOCOL

Probe labeling

DNA probes. Purified recombinant plasmid DNA is labelled (by incorporation of either 32p sCTP, biotinylated dUTP or dCTP) by the technique of nick translation, using one of the several commercially available kits (e.g. BRL, Amersham).

RNA probes. After linearization of the purified recombinant plasmid downstream of the viral cDNA with a suitable restriction endonuclease, labelled RNA is produced by in vitro transcription using one of several commercially available kits (e.g. Promega, Biotec, Boehringer). Either 32p or biotin-labelled CTP is usually incorporated.

Sample preparation

Many different plant samples can be used, consisting of leaves, stems, tubers, barks or fruits . There is no standard protocol; each protocol should be optimized for a given host/virus combination. We present here a technique for the detection of plum pox virus, with additional advice on detection of other pathogens when appropriate.

Sample grinding

One gram of plant sample is ground in 4 ml of grinding buffer using a pestle and mortar (or other apparatus such as an electric press or Polytron homogenizer when available). It is extremely important to use a buffer that will optimize the signal-tonoise ratio. The extract is then clarified by centrifugation for 10 minutes at 10 000 rpm . The samples can, if necessary, be deproteinized by including one volume of a 1:1 mixture of water-saturated phenol and chloroform during the grinding. This step is optional for the use of radioactive probes but necessary when using biotinylated probes.

Sample denaturation.

The nucleic acids contained in the supernatant are then denatured if necessary, to ensure good binding of the nitrocellulose and availability of the sequences for hybridization . This step is important for the detection of viroids but of no utility for most viruses. In a small microcentrifuge tube, 50 pl of sample are added to 50 pl of formaldehyde denaturation buffer. The mixture is then incubated for 60 minutes at 60°C (the length of this incubation should be reduced for viruses). At this point, samples are ready for spotting on the membrane. They can also be stored for up to several months at -20°C. We have found that concentration of the nucleic acids present in the extract by ethanol precipitation is detrimental since it usually increases the non-specific background reactions; it is therefore not recommended.

Nitrocellulose membrane preparation.

Soaking of the membrane in a high-salt solution is required for proper binding of nucleic acids in the samples. The membrane is first soaked for 2 minutes in pure distilled water and then equilibrated for 10 minutes in 20X SSC buffer.

Sample application and fixation. Next, 20 pl of sample are applied to the

nitrocellulose membrane using a BRL "Hybri-dot" apparatus .

Alternatively, 3 to 5 pl of sample can be applied directly (using a micropipette) to nitrocellulose that has been airdried after soaking in 20X SSC. The membrane is then dried at room temperature (Figure 331) and baked for a further 2 hours at 80°C under vacuum to ensure stable binding of the nucleic acids to the nitrocellulose membrane (Figures 332 and 333). This can conveniently be achieved by using an electrophoresis slab gel drier or a vacuum oven. At this point, the membranes can be directly processed or sealed in a plastic bag and stored (at 4°C or 20°C) for up to several months.

Hybridization reaction

Pre-hybridization. In order to prevent nonspecific binding of the probe to the membranes, they are pre-incubated in the hybridization mixture (pre-hybridization). The membranes are sealed in a plastic bag in the presence of 1 ml of hybridization buffer for each 10 cm2 of membrane, taking care to avoid trapping any air bubbles . The bag is then incubated for 2 to 4 hours in a water bath at 42°C .

Probe denaturation. This step is included to remove any secondary structure of the probe and is especially important for DNA probes which are essentially doublestranded after the labelling reaction. A suitable quantity of probe is placed in a small disposable tube and incubated for 10 minutes (DNA probe) or 3 minutes (RNA probe) at 100°C in a bath of boiling water and then quickly chilled by placing the tube in an ice-bucket.

Hybridization. The pre-hybridization buffer is discarded and replaced by the hybridization buffer to which the denatured probe has been added. Use approximately 1 ml of buffer containing radioactive probe of 1 to 2 x 106 cpm per ml or 200 mg per ml of biotinylated probe per 15 cm2 of membrane (See techniques for determination of probe-specific activity, below). The plastic bag is then resealed and incubated in a water-bath overnight at 50°C .

Washing. After hybridization is completed, the membrane is removed from the plastic bag and washed in a small plastic tray (Figure 341).

After washing, the nitrocellulose membranes should be airdried at room temperature.

DNA probes. Wash at room temperature for 5 minutes in three changes of washing buffer A, then proceed with two 15-minutes washes at 50°C in washing buffer B.

RNA probes. Carry out four 20-minute washes at 60°C in washing buffer C. Hybrid detection

Radioactive probes. An X-ray film (Kodak XAR or equivalent) is exposed to the membrane for 24 hours at -70°C using intensifying screens . After autoradiography, the film is developed using Kodak LX 24 developer and Ilford Hypam fixer . Within the limits of linearity of the response of the film, the intensity of the spots is proportional to the concentration of viral RNA present on the membrane. No nonspecific signal should be obtained with healthy plant controls.

Biotinylated probes. Several commercially available kits can be used for the detection of biotinylated probes (e.g. BRL). The composition of the buffers is given above.

The membranes are first soaked for 1 minute at room temperature in buffer 1, then for 20 minutes at 42°C in buffer 2 to saturate the protein-fixing sites on the membrane. They are then dried and baked for 10 to 20 minutes at 80°C under vacuum.

Following the treatment, the membranes are rehydrated for 10 minutes in buffer 2 and then incubated on a Petri dish in the streptavidin solution: 6 ?I of a 1-mg per ml streptavidin solution diluted in 3 ml of buffer 1. Incubate for 10 minutes at room temperature, shaking occasionally.

The membranes are then washed well with at least three changes of buffer for 3 minutes each time. Incubate on a Petri dish with 3 ml of buffer 1 containing a solution of biotinylated polymers of alkaline

phosphatase (polyAP) at 1 mg per ml. Incubate for 10 minutes at room temperature with occasional shaking.

Wash abundantly with two changes of buffer 1 and then with two changes of buffer 3. The developing solution should be prepared at the last moment in the following way: add 33 ?I of the nitro-blue tetrazolium solution to 7.5 ml of buffer 3. Mix thoroughly, then add 25 ?I of the 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) solution mix. Incubate the membrane in this solution in a sealed plastic bag protected from light.

Maximum colour development is usually achieved within 4 hours. To stop the development, simply wash the membrane in 20 mM Tris-HCI pH 7.5, 5 mM EDTA. The dried membranes can then be stored for several months in the dark to preserve the colour.

DETERMINATION OF THE PROBESPECIFIC ACTIVITY

Following the labelling reaction, the radioactive DNA probe (1 pl is precipitated with ethanol, freed from the unincorporated labelled nucleotides by several 70 percent ethanol washes, dried and finally taken up in 100 ml of sterilized distilled water. Then 2 pg. of the probe are mixed with 3 ml of a 10 percent trichloroacetic acid (TCA) solution along with 10 ml of 3 mg per ml calf thymus DNA used as a carrier. The mixture is left for 30 minutes at 0°C and then filtered through a Whatman GF/C fibreglass filter. The filter is rinsed with 20 ml of a 5 percent TCA solution and then with 5 ml of ethanol before being dried. The radioactivity retained on the filter is then determined by liquid scintillation counting. The specific activity, in cpm per pg, is given by cpm x 100/2.

Besides determining the specific activity of the probe, this technique can also help to calculate how much of the probe should be added to the hybridization reaction. Radioactive RNA probes can be counted in the same way.

For biotinylated probes, the result of the labelling reaction can be estimated by spotting dilutions of the probe on a membrane and

comparing with a standard of known activity provided in the labelling kit.

GEL ELECTROPHORESIS

POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS (PAGE)

Optimum resolution of viroid RNA is obtained by a sequential gel electrophoresis procedure (Figure 302) involving migration of the sample into a standard gel (5 percent PAGE) (Figure 304), followed by excision of a piece of the gel, which is then placed in contact with a second, denaturing gel (dPAGE) containing 8 M urea (Figure 305). This procedure exploits the unique properties of the single-stranded closed circular structure of the viroid for the separation of a distinct band. Placement of the excised gel piece in contact with the top (Semancik and Harper, 1984) or the bottom (Schumacher, Randles and Riesner, 1983) of the denaturing gel with migration to the anode will produce similar results.

The discontinuous pH dPAGE (Rivera-Bustamante, Gin and Semancik, 1986) with the gel cast at pH 6.5 (TAE buffer) but migrated in a pH 8.3 running buffer (TBE buffer) enhances the separation between the circular and linear molecular forms of the viroid. In addition, the background of host nucleic acids is reduced, which aids in the recovery of pure viroid preparations for physical characterization and hybridization analysis.

Verification of a suspected viroid can be made by a PAGE analysis sequence involving:

non-denaturing 5 percent PAGE, with excision of a strip of the gel in the

- "viroid zone" as defined by citrus exocortis
- viroid (CEV) and avocado sun blotch viroid (ASV, ASBV);
- dPAGE (pH 6.5), with excision of any slowly migrating band suspected of being a viroid circular form;

- dPAGE (pH 8.3), with resolution of two distinct bands containing the viroid circular form and the linear molecular form' generated from circles during electrophoresis.

Staining with ethidium bromide to visualize nucleic acid bands is necessary when gels are to be subjected to a second electrophoresis and/or when biologically active viroid is to be recovered. Sensitivity of detection can be increased with silver nitrate staining. However, this procedure renders the viroid inactivated and immobilized in the gel.

Materials

- Electrophoresis chamber and casting apparatus: glass plates, spacers, clamps, sample-well comb (apparatus of various sizes are available through commercial sources or can easily be custom fabricated).
- Powersupply (100mA, 1 000 volt or greater capacity)
- Ultraviolet transilluminator
- Polaroid camera
- Stock solutions for 5 percent gels:

Stock A:

Acrylamide, 30 g

Bisacrylamide, 0.75 g

Dissolve in distilled water, bring to 100 ml and filter.

Stock B:

Bring 2 ml tetramethylethylenediamine (TEMED) to 100 ml with distilled water.

Stock C:

Tris 120 mM

Sodium acetate $3H_2O$, 60mM

SodiumEDTA,3m

Dissolved in distilled water, adjust to pH 7.2 with glacial acetic acid.

Note: this solution is equal to 0.3X stock d, therefore it can also be made by diluting 30 ml of stock D to 100 ml with distilled water.

Stock D:

TAE buffer, pH 7.2, 10X

Tris, 400mM

Sodium acetate $3H_2O$, 200m

Sodium EDTA, 10 mM

Dissolve in distilled water, adjust to pH 7.2 with glacial acetic acid.

Note: Since Stock D is a 10X concentration, it should be diluted before use as

a running buffer.

Stock E:

Dissolve 2.5 g ammonium persulphate (10 percent) in 25 ml H20. Prepare

fresh weekly.

Stock F.:

TAE buffer, pH 6.5 Tris, 120mM

Sodium acetate 3H20, 60 mM Sodium EDTA, 3 mM

Dissolve in distilled water, adjust to pH 6.5 with glacial acetic acid.

Stock G.

Denaturing gel buffer (TBE, pH 8.3, 10X) Tris, 225 mM

Boric acid, 225 mM

Sodium EDTA, 5 mM

Dissolve in distilled water. No adjustment of pH should be necessary. Dilute

tenfold for use as a running buffer (TBE, pH 8.3, IX).

- Urea
- Glycerol (60 percent)
- Migration tracking dyes:
- Bromophenol blue, 0.3 percent in 60 percent glycerol
- Xylene cyanol, 0.3 percent in 60 percent glycerol
- Ethidium bromide stock staining solution (5 mg per ml) (30µl per 200 ml H2O for staining gels)
- Silver staining solutions: Ethanol (50 percent) + acetic acid (10 percent) Ethanol (10 percent) + acetic acid (1 percent) Silver nitrate (12 mM) Potassium hydroxide (0.75 M) + formaldehyde (0.28 percent) Sodium carbonate (0.07 M)

Native 5 percent PAGE

1. Assemble glass form to receive polymerization solution.

2. Mix contents of two beakers containing the following solutions in the indicated amounts or similar proportions:

Beaker 1

120 ml distilled water

10 ml stock c

2.4 ml stock B

Beaker 2

0.5 ml stock A

0.48 ml ammonium persulphate

3. fill form, place sample-well comb and let stand for 30 minutes.

4. Withdraw sample-well comp and lower spacer. Attach to chamber and fill electrode reservoirs with 1/10 dilution of stock D.

5. Mix samples with about 1/4 volume of glycerol and load into wells with fine-tip Pasteur pipettes. Load outermost wells with mixture of tracking dyes.

6. Apply constant current, 54 mA, at 4°C for 2.5 to 3 hours or until bromophenol blue dye has migrated about 8 cm and xylene cyanol has reached about 4 cm.

7. Remove gel from the chamber and form. Soak with gentle agitation in the ethidium bromide staining solution for 10 minutes.

8. View the gel directly over a UV transillumination source. Cut horizontal strip as defined by "viroid zone" (CEV-ASV) or smaller, depending upon viroid, and transfer to denaturing gel.

Denaturing PAGE (pH 6.5)

1. Assemble glass form for polymerization solution.

2. Prepare two beakers with the following contents:

Beaker 1

14.4 g urea

7.0 ml H2O

3.0 ml Stock F (TAE, pH 6.5) 5.0 ml Stock A

Beaker 2

2.5 ml Stock B

0.5 ml ammonium persulphate

Dissolve the contents of Beaker 1 over low heat. After the urea is dissolved, rapidly mix the contents of the two beakers.

3. Immediately fill form, leaving a flat surface with sufficient space for the excised native gel piece. Allow to stand for a minimum of 1 hour.

4. Remove lower spacer and attach to chamber. Do not add buffer or any liquid to the gel surface until immediately prior to use.

5. After section has been removed from native gel, fill electrode reservoirs and cover

6. after section has been removed from native gel, fill electrode reservoir and cover top surface of gel with stock G diluted 10 folds (TBE buffer, pH 8.3, 1X).

7. add a few drops of xylem cyanol-glycerol mix next to the outer edges of the gel strip.

8. apply constant current. 15 mA at 24C for about 4 hours until the xylene cyanol tracking has migrated to within 0.5 cm of the bottom of the gel.

9. remove from form and stain either with ethedium bromide fro additional dPAGE (pH 8.3 gel) to confirm circular or linear forms or for elusion of viroid bands for infectivity or for use as templates for cDNA probes; or with silver nitrate for maximum sensitivity of detection.

Denaturing PAGE (pH 8.3)

1. Follow the same set-up and running procedure as presented above.

2. Mix rapidly the contents of two beakers containing:

Beaker 1

14.4 g urea

7.0 ml H20

3.0 ml Stock G (TBE buffer, pH 8.3, 10X)

5.0 ml Stock A

dissolved on low heat

Beaker 2

2.5 ml Stock B

0.5 ml ammonium persulphate

3. Stain completed gel as before with either ethidium bromide or silver nitrate.

Silver staining

1. Gel can be stained with silver directly or following ethidium bromide staining without additional treatment.

2. Soak gel at room temperature in solution of 50 percent ethanol + 10 percent acetic acid for at least 1 hour with gentle shaking. Overnight soaking can sometimes improve the background.

3. Soak gel at room temperature in solution of 10 percent ethanol + 1 percent acetic acid for 1 hour with gentle shaking.

4. Soak in solution of 12 mM AgN03 for 1 hour with gentle shaking.
5. Rinse thoroughly (three times) with distilled water.
6. Rinse rapidly with small volume of developer solution (0.75 M KOH + 0.28 percent HCHO) and discard solution.
7. Add fresh developer solution (100 to 200 ml) and observe until bands appear, usually within 20 minutes.
8. Add excess distilled water and allow gel to expand. This process reduces the background and improves the quality of photographs.
9. Developing reaction can be stopped with 0.07 M Na2C03.

10. Photograph gel over a light-box using Polaroid film.

INFECTIVITY OF NUCLEIC ACID FRACTIONS AND VIROID MOLECULES

The infectivity of a viroid-containing sample can be influenced by the quality of the preparation. In many cases, viroid transmission by highly purified preparations can be more difficult than by a more complex, less purified preparation, perhaps in part because the presence of host nucleic acids may protect the viroid molecule from inactivation. Therefore, a sample such as a 2 M LiCI-soluble fraction may be valuable to demonstrate the transmission properties and host range of suspected viroidcontaining preparations.

Nevertheless, an essential proof for the detection of a viroid is the transmissibility of the putative viroid-like molecule. This can be provided by the recovery of the unique, transmissible viroid structure, the single stranded circular RNA molecule, in highly purified form followed by transmission to a host plant.

Electro-elution of the circular forms of viroids, as detected in denaturing PAGE by ethidium bromide staining, has proved to be a highly efficient procedure for the recovery of biologically active, pure viroid.

Materials

PAGE gel piece containing the viroid

Electro-elution buffer (EB) (1/50 dilution of Stock D in PAGE procedure):

8.0 mM Tris

4.0 mM sodium acetate

0.2 mM EDTA

adjusted to pH 7.2 with acetic acid

Electro-elution apparatus: A chamber can be constructed to accommodate a piece of dialysis tubing filled with EB into which the gel piece has been introduced. When placed in an electrical field the viroid will migrate from the gel but be retained in the liquid phase inside the tubing. Alternatively, a commercial apparatus (Unidirectional Electroelutor Model UEA) that does not Power supply (25 mA, 250 V)

3 M sodium acetate, pH 5.5

Ethanol

Electro-elution

1. prepare gel piece to be eluted within dialysis tubing or according to 1B1 instructions.

2. apply about 125V constant voltage for 30 minute at room temperature.

3. withdraw buffer sample containing eluted viroid, add 1/10 of 3M sodium acetate, pH 5.5, plus at least three volume of ethanol and holed at -20C for 30 minute or longer.

Note: the gel piece can be checked for incomplete elusion of viroid by restaining with ethidium bromide and viewing over a UV transilluminator. If viroid still remains in the gel piece, the elusion procedure can be repeated.

4. Centrifuge sample at 12 OOOg for 20 minutes. Pellets may be extremely small or invisible. Nevertheless, sufficient viroid to be detected by PAGE and silver staining or infectivity can be recovered many times.

5. Dry decanted centrifuge tubes in vacuo and resuspend pellets in appropriate volume of TKM buffer (RM) or desired medium.

الاختبارات السيرولوجية Serological Test المستخدمة في الكشف عن فيروسات النبات

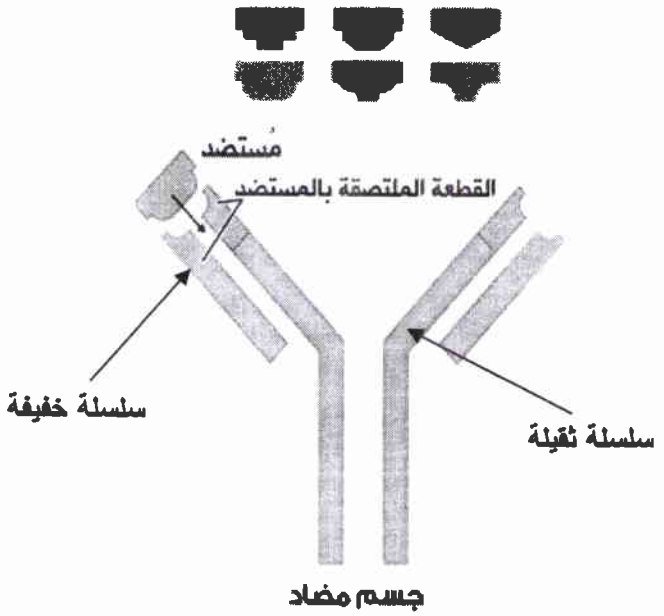
الاختبارات السيرولوجية Serological Test المستخدمة في الكشف عن فيروسات النبات

م. غيداء جبارة

يوجد علم خاص يسمى Serology وهو عبارة عن العلم الذي يدرس سيرم الدم Serum، ومن الأسس المهمة لدراسة هذا العمل الأنتيجين (مولدات الضد أو المستضادات Antigen والأجسام المضادة Antibodies).

يعرف الأنتيجين بأنه مركب أو مادة أو جزء يحقن في أنسجة حيوان ينشط تكوين أجسام مضادة في دم هذا الحيوان. وهو عادة يكون بروتيناً وقد يكون مركباً عديد التسكر أو دهوناً معقدة أو مركبات أخرى مرتبطة بالبروتين. ويتميز الأنتيجين بميزة أخرى هامة وهي أنه لابد أن يكون غريباً عن جسم الحيوان والإنسان كما يتميز أيضاً بأن وزنه الجزيئي كبير نسبياً أكبر من 10000 دالتون. ومن هنا يمكن القول أن الفيروسات هي أنتيجينات كاملة لها القدرة على استحثاث الجهاز المناعي في تكوين أجسام مضادة خاصة بها.

يعرف الجسم المضاد بأنه عبارة عن بروتين الجلوبيولين Globulin على شكل حرف Y يتكون من نوعين من سلاسل البروتين القريبة من بعضها وتوصف أحدها بالخفيفة والأخرى بالثقيلة (صورة رقم 1)، والذي ينتج نتيجة لحقن الأنتيجين في جسم الحيوان والذي يمكن أن يتفاعل مع الأنتيجينات أي أن لها صفة التخصص Specificity الشديدة.



صورة رقم 1 جسم مضاد

ومعنى ذلك أن الأجسام المضادة الخاصة بفيروس موازييك الدخان لا تتفاعل مع الأنتيجينات البكترية ولا حتى الفيروسية الأخرى حيث أنها تتفاعل فقط مع فيروس موازييك الدخان. ويمكن أيضاً أن تتفاعل مع السلالات القريبة من الأنتيجين الخاص به فإذا وجدت سلالات مشابهة لسلالات فيروس الدخان فإنها تتفاعل معها ولكن بدرجة أقل ولذلك يمكن أن نستخدم درجة التفاعل بين الأجسام المضادة والأنتيجين في تقدير درجة القرابة بين السلالات المختلفة.

يسمى سيرم الدم المحتوي على الأجسام المضادة باسم السيرم المضاد Antiserum، ويمكن الحصول على السيرم المضاد وذلك بحقن الأنتيجين (بعد تنقية الفيروس) في أحد حيوانات التجارب مثل الفئران البيضاء أو الأرانب، وبعد عدة أسابيع يتم سحب الدم من الحيوان المحقون ثم يترك الدم لفترة في أنابيب اختبار أو ما شابهها فيحدث ترسيب لكرات الدم الحمراء ويبقى على السطح سائل شفاف هو عبارة عن سيرم الدم والذي يحتوي على أجسام مضادة.

لكي تحدث التفاعلات العديدة بين الأنتيجين والجسم المضاد فلابد أن يرتبطا ببعضهما أولاً ويكون ذلك في مواقع ارتباط محددة على كل من الأنتيجين والجسم المضاد. عادة تكون مواقع الارتباط على الجسم المضاد اثنين وتكون عديدة على الأنتيجين وكلما كبر حجم الأنتيجين كلما زاد عدد مواقع الارتباط. بعد حدوث الارتباط تحدث إحدى الحالات الآتية ويتوقف ذلك على طبيعة كل من الأنتيجين والجسم المضاد وهذه التفاعلات هي: الترسيب Precipitation والتجمع أو التلبد Agglutination والتحلل ومعادلة السموم وتسهيل مهاجمة وقتل الخلايا الغريبة. واستخدمت اختبارات سميت الاختبارات السيرولوجية للكشف عن هذه التفاعلات والتي استعملت في أوجه عديدة.

- استعمالات سيرولوجي الفيروسات النباتية:

1- تعريف الفيروسات: يمكن بواسطة الطرق السيرولوجية التعرف بسهولة وسرعة على الفيروس في فترة وجيزة بعكس الطرق البيولوجية التي تحتاج إلى وقت طويل ومجهود كبير وأدوات خاصة. ولهذا تنتشر طريقة التشخيص السيرولوجي انتشاراً كبيراً كما يمكن بواسطتها الكشف عن الإصابات الكامنة.

2- تقسيم الفيروسات إلى مجاميع سيرولوجية: باستخدام الطرق السيرولوجية يمكن تقدير درجة القرابة بين الفيروسات التي تعطي أعراضاً مختلفةً على النباتات وحتى بين الفيروسات التي تشترك مع بضعها في عائل نباتي واحد. وبالتالي أمكن وضع الفيروسات القريبة سيرولوجياً في مجاميع منفصلة.

3- تقدير درجة العلاقة بين سلالات الفيروس.

4- دراسة انتشار المرض داخل النبات وتقدير تركيز الفيروس.

5- تنقية الفيروسات وكذلك في الكشف عن مدى نقاوة التحضير الفيروسي، والكشف عن الفيروسات في الحشرات.

6- معرفة أماكن وجود الفيروس في الخلية.

- الاختبارات السيرولوجية للكشف عن الفيروسات:

أولاً: اختبار الترسيب Precipitation:

في حالة الترسيب يحدث تكون راسب يمكن رؤيته بالعين المجردة وذلك عند خلط الأنتيجين بالسيرم المضاد Antiserum المحتوي على الأجسام المضادة. يمكن ملاحظة الراسب بعدة طرق:

1- الترسيب في أنابيب Precipitation in Tubes:

بوضع 0.5-1 سم^3 من التحضير الفيروسي في أنابيب اختبار ثم يضاف إليها نفس الحجم من المصل المضاد ويخلطان جيداً، وتترك الأنابيب في حمام مائي على درجة 37-50م.

2- اختبار الترسيب الحلقي Ring Precipitation:

يجرى هذا الاختبار في أنابيب صغيرة ذات قطر 2-3 ملم ويوضع بها 0.1-0.2 سم^3 من المصل المضاد المركز بدون تخفيف أو بتخفيف لا يزيد على 2:1. يضاف للمصل المضاد نفس الحجم من التحضير الفيروسي بتخفيفات مختلفة وذلك بحذر شديد حتى لا يختلط الفيروس بالمصل المضاد. بالقرب من سطح تلامس المحلولين فإن الأجسام المضادة تنتشر خلال التحضير الفيروسي وكذلك فإن الجزيئات الفيروسية تنتشر أيضاً خلال طبقة المصل المضاد في مكان ما داخل حدود تلك المنطقة الضيقة فإن نسب مكونات الخليط سوف تكون ملائمة لتكون راسباً في تلك الحالة على السطح الفاصل بين التحضير الفيروسي والمصل المضاد أو بالقرب منه تظهر حلقة أو قرصاً من الراسب. يجري هذا التفاعل عادة تحت ظروف درجة حرارة مرتفعة.

3- اختبار الترسيب الدقيقي Microprecipitation:

يستخدم في هذا الاختبار أطباق بتري جافة تغطى قاعها بمادة غير محبة للماء وهي غالباً تكون مركب أو مادة Formvar وذلك عن طريق وضع كمية منها في قاع الطبق. ثم تفرغ تاركة طبقة رقيقة تترك لتجف عدة ساعات فتكون غشاءً في قاع الطبق. توضع أطباق بتري على ورقة مربعات 8×8 سم ثم توضع نقطة من المصل المضاد في كل مربع من المربعات ويضاف إليها نقطة مماثلة من التحضير الفيروسي. طبقة الفورمفار تعمل على منع انتشار النقطة الموجودة بمربع إلى مربع آخر. بعد وضع نقطة من التحضير الفيروسي على نقط المصل وخلطهم يصب زيت البرافين في الطبق بحيث يغطي جميع النقط يلاحظ تكون الراسب الممكن مشاهدته بواسطة عدسة يدوية أو تحت القوى الصغرى للميكروسكوب الضوئي.

4- اختبار الترسيب في آجار (اختبار أُكترلوني) Immunodiffusion Occhterlony Test:

توجد عدة طرق للانتشار أو الترسيب في الآجار نذكر منها الانتشار الثنائي بطريقة أُوكترلوني Agar Double Diffusion. تضاف كمية من الآجار بنسبة 0.7-1% إلى محلول منظم ثم تسخن لدرجة 92م

في حمام مائي، بعد أن يبرد يصب الآجار في أطباق بتري بسمك 2-3سم و بعد أن يتجمد تعمل فيه ثقوب بواسطة ثاقبات الفلين يحدد عددها حسب الاختبارات المطلوبة. يوضع في الثقوب الوسطية المصل المضاد للفيروس. أما في الثقوب المحيطة فيوضع التحضير الفيروسي. ينتشر الفيروس والأجسام المضادة خلال طبقة الآجار في اتجاهين متضادين. في منطقة التقابل والتي يكون فيها نسبة كل منها إلى الآخر ملائمة يتكون شريط الترسيب. إذا كان أحد التحضيرات الفيروسية لا يحتوي على الفيروس أو يحتوي على فيروس مختلف عن الفيروس الذي حضر له المصل المضاد فإن شريط الترسيب في المنطقة الفاصلة والمقابلة لذلك الثقب الذي لا يحتوي على الفيروس المختلف لن يظهر. تظهر أشرطة الترسيب عادة بعد 2-6 أيام على درجة 20م.

تتميز هذه الطريقة بالخواص الآتية:

1- لعمل الفصل الطبيعي لمخاليط جزيئات الأنتيجينات وكذلك الأجسام المضادة، وذلك باستغلال معدل انتشارها في الآجار أو معدل تحركها في وجود وسط كهربائي أو الاثنين معاً.

2- مقارنة الأنتيجينات المختلفة ببعضها البعض تحت ظروف واحدة.

ثانياً- التلبد أو التجمع Agglutination:

يحدث في هذا الاختبار للأنتيجين في مجاميع، فإذا ما أخذت نقطة من عصير نباتي يحتوي على الفيروس وخلطت مع المصل المضاد له على شريحة زجاجية فإنه دائماً ما يلاحظ تجمع للجزيئات الصغيرة النباتية والتي يحتويها العصير. يمكن وضع مرآة أسفل الشريحة وعندئذ يمكن رؤية التلبد واضحاً. وقد تستخدم مواد كبيرة الحجم ترتبط إما بالجسم المضاد أو بالفيروس قبل التفاعل بينهما ليكون التفاعل أكثر وضوحاً.

اختبار اللاتكس Latex Test:

تستخلص عصارة الجزء النباتي مثل الأوراق ثم تخفف بمحلول منظم Tri-Buffer، ثم يستعمل طبق بتري بلاستيكي تخطط قاعدته إلى مربعات وينقط في الطبق نقطة من العصير النباتي في كل مربع ثم تستخدم حقنة لوضع نقطة من محلول اللاتكس على كل نقطة عصير. يتكون اللاتكس من كرات Polystyrene في بداية التحضير يتم خلط اللاتكس بالأجسام المضادة لفيروس معين، ولذلك فإن اللاتكس المضاف يوجد على حبيباته الأجسام المضادة. يتم تغطية الطبق بغطاء ويوضع على هزاز لمدة ساعة. وفي حالة التفاعل الإيجابي توجد تجمعات لجزيئات اللاتكس يمكن رؤيتها بالعين المجردة.

ثالثاً- اختبار ELISA اختصاراً للجملة Enzyme Linked ImmunoSorbent Assy:

اكتشفت في أواخر السبعينات واستعملت على نطاق واسع من قبل اختصاصي أمراض النبات لدراسة واكتشاف فيروسات النبات. وهو فحص سيرولوجي كغيره من الفحوص السيرولوجية الذي يعتمد على علاقة الأجسام المضادة بالفيروس وقدرة الفيروسات على إنتاج أجسام مضادة خاصة بها عند حقنها بحيوانات فقارية وذلك بعد تنقية الفيروسات.

إضافة لذلك فإن فحص ELISA يعتمد على قدرة الإنزيمات على الارتباط بالأجسام المضادة لتكون مركباً ذا نشاط إنزيمي وله مقدرة على الارتباط بالأنتيجين. وتمتاز الإنزيمات بسهولة الكشف عنها وإن كانت بتراكيز قليلة عند تفاعلها مع مادة كاشفة (Substrate)، وعادة تستخدم المادة الكاشفة التي تعمل على تغير اللون عند تفاعلها من الإنزيم الخاص بها. وتكون سرعة ودرجة التلون مؤشراً على كمية الأجسام المضادة الموجودة وبالتالي على تركيز الفيروس. وتمتاز الإنزيمات كذلك بحساسيتها وقلة تكاليف استخدامها وعدم حاجتها إلى أجهزة ومواد كثيرة.

كذلك يعتمد فحص ELISA على قدرة البروتينات (الأجسام المضادة أو غطاء الفيروس Protein Coat) على الإدمصاص Adsorption بقوة على أسطح بلاستيكية مثل بولسترين Polystrene أو بوليفنيل كلورايد، أو الارتباط بنترات السيللليلوز Nitrocellulose Membranes وهذه المواد تعرف بـ(Immunosorbents Material) أو (Solid Phase).

إن فوائد اختبارات ELISA تكمن في:

1- حساسيتها الفائقة فيمكن أن تكشف عن وجود الفيروس بتراكيز منخفضة.
2- يمكن اختبار عينات كثيرة في وقت واحد.
3- تستعمل عند وجود كمية قليلة من السيرم المضاد المطلوب.
4- نتائجها كمية.
5- هذا الإجراء يمكن أن يكون نصف أتوماتيكي وهو اقتصادي.
6- يمكن أن تجري هذه الاختبارات بغض النظر عن حجم وتركيز الفيروس.

وبسبب هذه الفوائد فإن ELISA حلت بسرعة محل جميع طرق التشخيص السيرولوجية الأخرى.

هناك أنواع مختلفة من ELISA تستعمل الآن:

*** ELISA الجسم المضاد المزدوج المباشر (Direct Double Antibody Sandwich ELISA :(DAS-ELISA)**

يستخدم في هذه الطريقة Microtiter plates (ELISA Plates) فيها عديد من الـ Wells (التجاويف) عادة يستخدم طبق ذي 96 تجويف.

1- يتم تغطية سطح التجاويف بالجسم المضاد وهو عبارة عن Gamma globulin IgG متخصص لفيروس معين تخفف بمحلول منظم يسمى Coating Buffer يترك الطبق بعد تغطيته في الحاضنة لمدة 1-4 ساعات على درجة حرارة 37م، ثم يغسل الطبق بمحلول منظم للغسيل (PBST) فالغسيل يسبب إزالة الزائد غير المدمص من الأجسام المضادة (يوجد لكل فيروس جسم مضاد خاص). الغسيل يكون ثلاث مرات كل مرة خمس دقائق.
2- تضاف العينة المراد فحصها والتي تحتوي على الفيروس على الطبق وذلك بعد طحنها بمحلول منظم Extraction Buffer عادة بنسبة 10:1 وتترك في الثلاجة لليلة، ليتم التفاعل بين الفيروس والأجسام

المضادة الثابتة في الطبق وفي حالة وجود علاقة بين الفيروس والجسم المضاد سيلتصق الفيروس به وإذا لم توجد علاقة سيتم غسل الفيروس.

3- توضع أجسام مضادة مرتبطة بإنزيم Enzyme Linked Antibody للتفاعل مع الفيروس تخفف هذه الأجسام المضادة بمحلول منظم يسمى Conjugate Buffer يترك الطبق بعد تغطيته في الحاضنة لمدة 2-4 ساعات على درجة حرارة 37م، ثم يغسل الطبق للتخلص من الكمية الزائدة وغير المرتبطة بالفيروس.

4- توضع المادة الكاشفة Substrate حيث يقوم الإنزيم بتحليلها وينتج عن ذلك تغير في اللون، تختلف المادة الكاشفة المستخدمة حسب الإنزيم المستخدم ففي حالة أن يكون الإنزيم Alkaline Phosphatase وهو عادة ما يستخدم في أغلب المختبرات تكون المادة الكاشفة هي p-nitrophenyl phosohate والتي تتغير للون الأصفر نتيجة تفاعلها، وتكون سرعة ودرجة التلون مؤشراً على كمية الأجسام المضادة الموجودة وبالتالي على تركيز الفيروس. حيث يمكن ملاحظة التغير باللون بوضوح بالعين المجردة ويمكن استخدام أجهزة ELISA Reader لقراءة المقياس اللوني (الطيف الضوئي) للون الأصفر على 405 نانوميتر في هذه الطريقة يمكن الكشف عن الفيروسات في الفحص الروتيني عند عدم وجود مشكلة بالنسبة لسلالات الفيروس وتركيزه.

*** ELISA غير المباشرة Indirect ELISA:**

في هذه الطريقة يكون الإنزيم المستخدم مرتبطاً بأجسام مضادة ليست ضد الفيروس ولكنها في الواقع أجسام مضادة ضد بروتينات الجسم المضاد في الحيوان الذي أنتج منه الجسم المضاد للفيروس وهذا يعني أنها مضادة للأجسام المضادة في الأرنب وتكون منتجة في حيوان آخر مثل الماعز Goat Anti-Rabbit (GAR) or Rabbit Anti-Mouse (RMA).

1- يتم تغطية سطح التجاويف بالعينة المراد فحصها والتي تحتوي على الفيروس وتترك ليتم ادمصاص الفيروس في الطبق ثم يغسل الطبق فالغسيل يسبب إزالة الزائد غير المدمص من البروتينات.

2- يتم إضافة مادة بروتينية لتغطية الأجزاء الفارغة من الطبق مثل إضافة حليب قليل الدسم أو بروتين البيض، ثم يغسل الطبق.

3- تضاف بعد ذلك أجسام خاصة بالفيروس المراد فحصه وتترك للتفاعل مع الفيروس ثم يغسل الطبق للتخلص من الكمية الزائدة وغير المرتبطة بالفيروس.

4- ثم توضع أجسام مضادة ضد دم الأرنب أو الفأر حسب الجسم المضاد الأول المستخدم وتكون هذه الأجسام مرتبطة بإنزيم ثم يغسل الطبق.

5- توضع المادة الكاشفة Substrate كما في الطريقة المباشرة.

هذه الطريقة بسيطة ولا تحتاج إلى تنقية عالية للأمصال ولا تحتاج إلى ارتباط الإنزيم بأجسام مضادة خاصة لكل فيروس، فهي تستخدم لعدد كبير من الفيروسات المختلفة وهي حساسة أيضاً حيث يمكن الكشف عن الفيروسات المرتبطة سيرولوجياً.

* هنا طرق أخرى منها:

TAS-ELISA- Triple Antibody Sandwich ELISA-

1- يتم تغطية سطح التجاويف بالجسم المضاد وهو عبارة عن Gamma globulin IgG متخصص لفيروس معين.

2- تضاف العينة المراد فحصها والتي تحتوي على الفيروس.

3- يتم إضافة مادة بروتينية لتغطية الأجزاء الفارغة من الطبق.

4- تضاف بعد ذلك أجسام مضادة ضد دم الأرنب أو الفأر.

5- توضع المادة الكاشفة Substrate.

- بصمة النسيج النباتي المناعية Tissue Blot Immuno Assay (TBIA) on Niltrocellulose Memmbrance

في هذه الطريقة يستخدم غشاء نترات السيليلوز Nitrocellulose Membranes لادمصاص الفيروسات، وهو مشابه للطريقة المسمية Dot-Blot Immunobinding Assay والتي تستخدم أيضاً في الكشف عن الفيروسات وتختلفان فيما بينهما بطريقة تحضير العينة، ففي اختبار TBIA يكفي تقطيع أي جزء من أجزاء النبات (الورقة، الساق، الجذور...) بواسطة شفرة ومن ثم عمل بصمة لهذه القطع بطبعه على غشاء النيتروسيليلوز، بينما في الاختبار الآخر فيجب طحن العينات لاستخلاص الفيروس بمحلول استخلاصي منظم، لذلك يمتاز TBIA بتوفير الوقت والجهد فلا حاجة لعمليات الطحن خاصة إذا كان عدد العينات كبير وهو ما يعتبر من سلبيات فحص الإليزا، إضافة إلى أن TBIA فحص سريع وسهل يكفي ثلاث ساعات للحصول على النتيجة وهو قليل التكلفة ويمكن إعادة استخدام الأجسام المضادة أكثر من مرة وذلك بتجمعها بعد فترة الحضانة قبل غسيل الأطباق. ويمكن طبع العينات في الحقل والاحتفاظ بها في أي وقت وفي أي مكان فيمكن إرسالها إلى المختبر لإتمام عملية الفحص، وتتلخص الطريقة بـ:

1- قطع الجزء النباتي المراد فحصه بشفرة حادة، والضغط عليه بقليل من القوة (عمل بصمة) على غشاء النيتروسيليلوز. يوضع الغشاء في طبق صغير ثم يغسل ثلاث مرات كل مرة خمس دقائق.

2- يتم إضافة مادة بروتينية لتغطية الأجزاء الفارغة من الغشاء، وتترك لمدة ساعة عند استخدام الحليب خالي الدسم مع بروتين البيض أو لمدة دقيقة عند استخدام PVA (Polyvinyl Alcohol) على درجة حرارة الغرفة، ثم يغسل الطبق الذي يحتوي على الغشاء.

3- تضاف بعد ذلك أجسام مضادة خاصة بالفيروس المراد فحصه، وتترك لمدة ساعة على درجة حرارة الغرفة، ثم يغسل الطبق.

4- ثم توضع أجسام مضادة ضد دم الأرنب أو الفأر، وتترك لمدة ساعة على درجة حرارة الغرفة، ثم يغسل الطبق.

5- توضع المادة الكاشفة.

تختلف المادة الكاشفة المستخدمة في هذا الفحص نظراً لكونها مادة مترسبة وليست ذائبة كما في فحص الإليزا، فيستخدم(p-Nitro blue & BCIP (5-Bromo-4-choro-3- indolyl phosphate tetrazolium) NBT) حيث يظهر اللون البنفسجي في العينة المصابة.

المشاكل التي يمكن أن تتعرض لها أثناء عمل ELISA:

1- عدم تغير اللون أو التفاعل البطيء قد يكون نتيجة:

1- نسيان خطوة من خطوات الفحص.
2- عدم استخدام المحلول المنظم المناسب.
3- عدم صلاحية الأجسام المضادة أو الإنزيم.
4- المادة الكاشفة غير صالحة.
5- خطأ في الحساب لعمل التخفيفات اللازمة.

ينصح بفحص الأجسام المضادة المرتبطة بالإنزيم مع المادة الكاشفة بوضعهما في أنبوب اختبار وإن كانت النتيجة سلبية يفحص كل مكون لوحده لمعرفة مصدر الخطأ، إن كان سلبياً يجب التأكد من المحاليل المستخدمة ومقدار التخفيف المستخدم لكل مادة.

2- تغير اللون في أماكن غير صحيحة، مثل تغير اللون في الطبق بما فيها العينة السليمة أو في أطراف الطبق أو في التجاويف التي تحتوي على محلول منظم، وهذا يكون بسبب:

1- غسيل الطبق غير كامل خاصة بعد إضافة الأجسام المضادة المرتبطة بإنزيم، أو عدم استخدام Tween 20 في محلول الغسيل.
2- التغطية أو البلوك غير كافية، وارتباط الأجسام المضادة المرتبطة بإنزيم في أماكن إضافية غير صحيحة.
3- تلوث الإنزيم المستخدم.

ينصح بالتأكد من تركيز الأجسام المضادة المستخدمة، والتأكد من غسيل الأطباق جيداً.

3- تلون سريع لكامل الطبق بما فيها العينة السليمة، وذلك يكون نتيجة استخدام تركيز زائد من الأجسام المضادة المرتبطة بإنزيم.

ينصح بإجراء تخفيف مناسب ليكون فرق واضح بين قراءة العينة السليمة والمصابة بالفيروس - ve & +ve control.

4- اختلافات في تلون الطبقة، نتيجة:

1- استخدام أطباق غير سليمة.
2- إهمال في إحدى الخطوات الخاصة غسيل الطبق.
3- تلوث بين الحفر.
4- عدم خلط كامل بين المحاليل المنظمة والأجسام المضادة أو للمادة الكاشفة.

ينصح بالتحقق من مصدر الأطباق المستخدمة والحرص أكثر أثناء العمل.

للمزيد من المعلومات حول فحص **ELIZA** يرجى الإطلاع على المعلومات التالية وهي بتصرف عن:

Graft-transmissible diseases of grapevines: Handbook for detection and diagnosis, **S.M. Garnsey and M. Cambra, 1993, FAO.**

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

The enzyme label may be attached directly to the antibody used to detect the antigen in question (the detecting antibody). This is called a direct assay, of which the highly popular double antibody sandwich technique illustrated in Figure la is a good example. The label may also be used indirectly. In this case, the label is attached not to the detecting antibody, but rather to a second antibody specific to the detecting antibody. Antibodies of one species are antigenic when injected into an animal of a second species. For example, rabbit immunoglobulins can be injected into another animal such as a goat to create a goat anti-rabbit antiserum. These goat anti-rabbit antibodies are useful to detect antibodies from rabbits that were originally prepared to detect another antigen.

Indirect assays are more sensitive and also avoid the need to prepare a conjugate to each antibody used. Several forms of indirect assay are described in the following section and are also illustrated in Figure 1 (b and d). The relative advantages of direct and indirect systems are discussed in the following section.

Several other molecular interactions are frequently used in conjunction with ELISA, either to purify immunoglobulins or to amplify reactions and increase sensitivity. Protein A is a cell wall component of the bacterium Staphylococcus aureus and has the unique characteristic of binding to the immunoglobulin protein of many mammalian species. The binding site is on the Fc region of the immunoglobulin and not on the antigen binding site. Protein A is frequently used to purify antibodies by affinity chromatography. It can also be conjugated with enzymes and used in assays to detect immunoglobulins.

A second important system is the biotin/avidin system. Biotin, a small vitamin, has a very high affinity for avidin, a 68 000 molecular weight glycoprotein. Antibodies and enzymes can be conjugated with several molecules of biotin to form a "biotinylated" molecule. Each avidin molecule has four binding sites for biotin. This multiplying interaction has been exploited in several ways to amplify the number of enzyme molecules associated with each antigen-bound antibody and thereby increase sensitivity. One example is illustrated in Figure 1c.

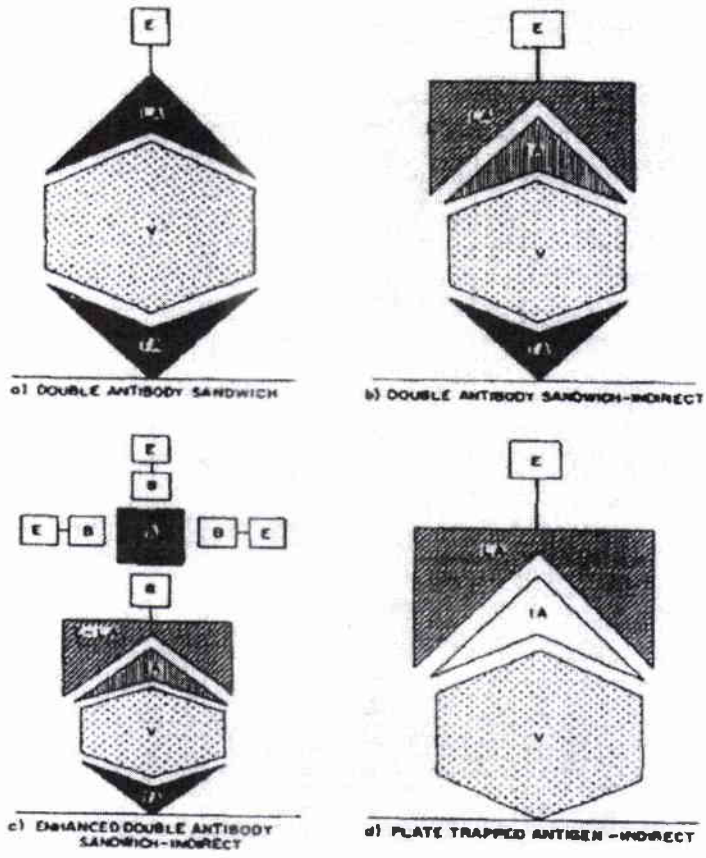


Figure1:

a) Double antibody sandwich ELISA (DAS). The most widely used form of ELISA for plant pathogens. The wells of the ELISA plate (the solid phase or immunosorbent surface) are coated with an unlabelled antibody specific to the pathogen, which becomes the trapping antibody (TA). The antigen (V) is captured by the trapping antibody and detected by the enzyme-labeled antibodies (LA), which are normally from the same polyclonal antiserum used for trapping and detection;

b) Double antibody sandwich indirect ELISA (DAS-I). The intermediate antibody (IA) is unlabelled and must be from a different animal species than the coating antibody. The LA is an antibody specific for the IA. It the F(ab')2 antibody component is used for coating, the whole unlabelled antibody from the same animal can be used as the IA and is detected with protein A conjugated to an enzyme;

c) Enhanced DAS-I. This is similar to DAS-I, but the enzyme concentration on the LA is amplified by an additional treatment to increase sensitivity. Frequently, the LA is biotinylated to react to avidin enzyme conjugates; d) Plate-trapped antigen indirect ELISA. The antigen (V) is trapped directly on the plate surface and detected by using an unlabelled antibody specific to the antigen (IA) plus an enzyme-labeled antibody (LA) specific to the IA. Enhancement as shown for DAS-I is also possible.

ELISA PROCEDURES

Numerous variations of the ELISA procedure can be devised (Clark, Lister and Bar-Joseph, 1988; Engvall and Pesce, 1978; Jones and Torrance, 1986; Koenigand Paul, 1982; Maggio, 1980). The selection depends on the sensitivity, specificity and convenience required; the presence of interfering factors; and the type and activities of the antisera available. The basic steps for four commonly used variations of ELISA are outlined here and illustrated in Figure 1. In three of the variations, a, b and c, the solid-phase (ELISA plate) is coated with antibody to the antigen to be detected. This antibody, identified as trapping antibody (TA in the figure), then traps its corresponding antigen (identified as V) from suspension or solution. In the fourth variation (Figure 1d), the antigen (V) is trapped directly on the solid phase and detected with its specific antibody.

Double antibody sandwich

The inexperienced user should start with the double antibody sandwich (DAS) where possible. This has been the most commonly used form of ELISA for plant virus detection since its description by Clark and Adams (1977). The immunosorbent surface is a plastic microtitre plate with wells designed for ELISA. A dilute solution of unlabelled antibody is added to the wells of the plate, and the antibody adsorbed on the plastic becomes the trapping antibody (TA). After washing to remove any excess antibody, the sample (antigen) is added. Antigens (V) in Figure 1 specific to the bound trapping antibody attach themselves to it, but other proteins remain in solution and are removed by washing. The antigen attached to the trapping antibody is detected by adding a labeled antibody (LA in Figure 1a) specific to the antigen. The label is the enzyme (E) previously conjugated to the antibody. When substrate specific to the enzyme is added in the final step, a color develops as a result of enzyme action. The amount of color and its rate of development are correlated to the amount of labeled antibody bound to the antigen which had been trapped by the antibody attached to the plate.

DAS can be done with a single good quality polyclonal antiserum. The immunoglobulins present are partially purified, and one portion is saved for use as trapping antibody while another is conjugated to an enzyme. Alkaline phosphatase is commonly used as the enzyme and the conjugation can be done in the presence of dilute glutaraldehyde (Clark, Lister and Bar-Joseph, 1988). The antibodies for coating and detection do not have to come from the same source, e.g. monoclonal antibodies could be used for coating and a polyclonal antiserum could be used to prepare the enzyme-labeled antibody.

Double antibody sandwich indirect

DAS can be converted to an indirect procedure (DAS-I), which is illustrated in Figure 1b. The first two steps are the same as in DAS. However, the antigen bound to the trapping antibody is detected by an unlabelled intermediate antibody (IA) which is specific to the same antigen but is from an animal species different from the one used to prepare the trapping antibody. For example, if the trapping antibody was prepared in rabbits, the detecting or intermediate antibody could be from a mouse or a chicken. The unlabelled IA which attaches to the antigen is detected by an enzyme-labeled antibody (LA) specific to the IA. Because the IA is from a different species than the TA, the LA binds only to the IA and no non-specific binding of the LA to the TA occurs. The amount of LA is measured by adding substrate and measuring color change as in DAS.

DAS-I ELISA involves an additional step (Figure 1b) but is more sensitive and also allows use of

a commercially prepared enzymelabeled antibody to the IA. A single LA can also be used for multiple virus detection systems. In addition, the intermediate antibody does not have to be purified and is needed in only a limited quantity. If the intermediate antibody is highly specific, e.g. most monoclonals, then a highly specific antiserum is not required for coating. The major problem is that antibodies to the same antigen must be prepared in two different animals. If the trapping and the intermediate antibodies are from the same species, the labeled antibody used to detect the intermediate antibody will also bind to the trapping antibody and result in a nonspecific response.

A system has been devised to carry out DAS-I using a single antiserum (Adams and Barbara, 1982; Clark, Lister and Bar-Joseph, 1988). To do this, the antibodies are treated with the enzyme pepsin to remove the Fe portion of the molecule. The remaining F(ab'), fragment still has the antigen binding sites and will bind to the immunosorbent, but will not bind to protein A. The F(ab'), fragments are used as trapping "antibody" and the whole antibody is used as the intermediate antibody. Enzyme-conjugated protein A is then used instead of a labeled antibody to detect the intermediate antibody. It does not react to the trapping "antibody" because the Fe region has been removed.

The DAS-I procedure can be further modified to amplify the reaction achieved. This is commonly done using a biotin-avidin interaction in which the labelled antibody is biotinylated to react with avidin molecules conjugated to multiple enzyme molecules, as illustrated in Figure 1c. Different types of amplification are possible and special kits may be purchased to perform them. Users should be aware of the possibility of employing amplification when additional sensitivity is needed, but regular procedures should be tested before amplification is attempted.

Plate-trapped antigen

Another basic approach to ELISA is the platetrapped antigen procedure (Figure 1d). The approach is to trap the antigen (V) on the plastic surface, then react the trapped antigen with an unlabelled intermediate antibody (IA) specific to it. The IA is then detected as in DAS-I using an enzyme-labelled antibody (LA) specific to the IA. This procedure, called plate-trapped antigen indirect (PTA-I) ELISA, is relatively simple and involves no advance purification of antisera or conjugate preparation if a commercially prepared enzyme-labelled antibody to the unlabelled IA is used. The PTA-I procedure is usually less sensitive than DAS or DAS-I for use with crude plant extracts and may not be effective when antigen concentration in the sample is low. Since binding to the plate is non-specific, the target antigen and other proteins present in the extract compete for the available binding sites on the plate. Platetrapped antigen tests can be conducted as a direct assay using an enzymelabelled antibody to the antigen, but sensitivity is even lower than for the indirect method, and the conjugate must still be prepared. Amplification procedures as described for DAS-I can also be used for the PTA-I procedure to increase sensitivity.

The specific steps and schedules for these types of ELISA are described in Schedules 1 to 3.

SAMPLING

Selection of appropriate samples for testing is critical. Although ELISA is a sensitive procedure, reliable results may not be obtained if poor samples are tested. Virus titre in grapevine tissue often varies markedly, and thousandfold difference in antigen concentration can occur over a relatively short period. Virus concentrations are generally highest in young, expanding flush tissues. They decrease rapidly as tissues mature under hot-weather conditions and more slowly under cool conditions. Avoid sampling old, mature tissue during the summer months in hot climates unless preliminary testing indicates that reliable samples can be taken. If the virus or pathogen is phloem-limited (e.g. the grapevine pathogens leafroll, rugose woodassociated

closteroviruses and fleckassociated isometric virus), then the tissue sample collected must contain phloem tissue. Older bark tissue can be sampled if the cambium is active, but generally it is less reliable than young shoot flush, bark or young leaf midribs. Young root tips may be useful under some conditions.

A composite sample from several sites on the vine should be collected; normally three to five locations per vine are sampled. Increase sampling if the pathogen is irregularly distributed or when trying to monitor a recent infection.

Fresh tissue can normally be stored for at least seven to ten days at 4°C when kept in a plastic bag or sealed container.

Samples can also be stored frozen at -20°C or below for extended periods. Unprocessed fresh tissue should be used; or tissue can be diced, placed in extraction buffer and frozen in the grinding tube (Figure 273). The sample should not be ground prior to freezing because fresh extracts often lose much activity when frozen. Frozen samples should not be stored in an automatically defrosting freezer. Extracts can be stored for long periods when freeze-dried; this is a good way to store a source of consistent reference (control) samples. Always test a storage method with the specific pathogen under study in order to prove its effectiveness.

EXTRACTION

Numerous buffers and different additives have been used for extraction of tissue samples with different virus-host systems (Bar-Joseph and Garnsey,1981; Clark, 1981; Clark and Bar-Joseph, 1984; Clark, Lister and Bar-Joseph, 1988; McLaughlin et al., 1981). Phosphatebuffered saline (PBS) or 0.05 M Tris, pH 7.5 to 8.0, without any additives usually give good results for sandwich assays. Additives such as polyvinylpyrrolidone (PVP), EDTA and DIECA are generally unnecessary for citrus, but with grapevine tissues 2.5 percent nicotine or 2 percent PVP may be useful (see chapter on grapevine degeneration - fanleaf). Test the effect of additives before using them routinely. For plate-trapped antigen procedures, try extraction of the sample in carbonate coating buffer, pH 9.6, or in 0.05 M Tris, pH 8.0. Do nor use Tween 20 in the extraction buffer for samples to be plate-trapped.

Normally, the ratio of buffer to sample tissue should be at least 1: 10. Higher concentrations of tissue may actually reduce reaction rates and make sample preparation more difficult.

There are many ways to grind samples. Pestle and mortar are fine for small numbers of tender samples. Addition of an abrasive, such as fine sand or carborundum, to the sample or powdering the tissue in liquid nitrogen makes grinding easier. A dispersion homogenizer equipped with a 10 to 25 mm diameter shaft is a good choice when large numbers of samples are to be processed. A 2 to 10 ml sample can be rapidly ground in a test-tube or centrifuge tube of suitable diameter and length with this type of homogenizer. Fibrous tissue, such as bark and leaf midribs, should be cut into short pieces (2 to 5 mm) prior to grinding or the shaft will become clogged with fiber and need to be cleaned between samples. Two rinses of the grinder shaft in 500 to 1 000 ml clean water are usually adequate. Run the homogenizer briefly in each rinse solution.

Chill samples prior to grinding to offset heating during the grinding process. It is normally not necessary to keep the sample on ice during grinding, unless unusually long grinding is required and the sample becomes warm to the touch. Frequent users of dispersion homogenizers should wear earplugs to protect their hearing, and homogenizers should be isolated.

If necessary, samples can be prepared with very minimal equipment. When virus concentration is high, extensive disruption of the sample tissue is usually unnecessary. One method is simply to

place a small piece of tender tissue directly in buffer in the well of an ELISA plate with forceps and then squeeze it to release the cell contents. Tissue can also be crushed in a small plastic bag using a mallet or smooth stone and the extract moved by pipette into the test plate.

Samples containing a lot of debris after extraction can be difficult to pipette. Remedies include centrifugation of the sample to pellet the debris or filtering the sample through a coarse filter such as cheesecloth or glass wool (Figure 276). Cutting off a portion of the tapered tip of a plastic pipette creates a wider orifice and is often quick and effective. It is frequently quicker to rinse a repeating pipette between samples than to change tips, so only a limited number of tips need be modified.

WASHING

Proper washing of the plates between steps is important. The standard procedure is to wash the plate three times between each step with phosphatebuffered saline (PBS) containing 0.5 percent Tween 20 (PBST). Sodium azide is frequently included in PBST solutions as a preservative. However, it is highly poisonous and may form an explosive complex with some metals. Sodium azide is unnecessary in ELISA wash solutions and should be omitted. The two most critical wash steps are after sample incubation when cross-contamination must be avoided between wells containing different samples (omit the first wash immediately if carryover between wells occurs) and after the conjugate incubation step. If even a minor residue of unattached conjugate remains, high background readings may occur. (Add another wash at this point when in doubt.) Various plate washers are available which can promote consistent washing operations, but a plastic squeeze bottle will work well for small volumes of plates. Solutions in the plate wells can be removed by aspiration to avoid contamination, but usually the plate is inverted rapidly with a quick shake of the hand and tapped firmly on clean blotting paper or paper towels.

TEST CONDITIONS

A wide variety of reactant concentrations and incubation times and conditions have been reported for ELISA (Clark and Bar-Joseph, 1984; Clark, Lister and Barloseph, 1988; McLaughlin et al., 1981). The choice of conditions depends to some extent on the basic goals. With high concentrations of reactants, short incubation times can be used, and if necessary the entire ELISA procedure can be completed within two hours. Increasing the incubation time while decreasing concentration (especially of the conjugate) will conserve reactants. Reactions occur most rapidly at 30 to 37°C, but room temperature (20 to 28°C) will give satisfactory results. Gentle shaking during incubation may improve efficiency. Many workers find it convenient to do the sample incubation step overnight and often do this at 4 to 6°C.

Some experimentation will be necessary to determine optimum conditions for each situation. Schedules 1 to 3 give examples which should provide a good starting point. Moderate changes in times and conditions are unlikely to cause a test failure, and changes can often be made to render the schedule more convenient for the user with no loss of information. New users should certainly experiment with different schedules to find the optimum for their purpose.

One of the major variables in ELISA to be evaluated is the concentration of conjugate to use. Commercially prepared enzyme-labelled antibodies normally have a recommended working dilution (frequently between 1/1 000 and 1/2 000). Conjugates that are prepared experimentally may differ markedly, and published values for other systems are of little help. Optimum dilutions of 1/100 to 1/20 000 of the stock preparation (approximately 1 mg per ml) have been reported. The effective dilution will depend on the basic affinity of the antibody, the titer of specific and nonspecific (host) antibodies, the source and activity of the enzyme used and the effectiveness of the conjugation procedure. When starting with a new or unknown batch of conjugate, test three

tenfold dilutions starting at a 1/100 dilution to determine the approximate activity. Using these results, make a second test in the appropriate dilution range indicated. Normally, the objective is to obtain a strong positive reaction to a good positive sample within 20 to 60 minutes and little or no reaction to healthy extracts. If the conjugate concentration is so high that a reaction is instantly visible, a background reaction is often also observed with healthy extracts (and even with buffer controls). Reduce conjugate concentration and, if a nonspecific reaction persists, adsorb the antiserum against a concentrated extract of healthy plant tissue to remove antibodies against healthy antigens.

If possible, do this before purifying the IgG. Adding healthy tissue extract to the buffer used to dilute the conjugate may also reduce nonspecific reactions (Clark, Lister and Bar-Joseph, 1988).

The use of appropriate controls is essential. Each plate should have at least one healthy and one known positive sample as controls. A buffer control is also useful to determine the level of background reaction to healthy extracts. Frequently, a slightly higher reading will be observed for the buffer control than for the healthy extract because proteins in the extract block exposed protein binding sites on the plastic, which may later non-specifically bind conjugate molecules. Each sample should be tested in at least two wells. A random loading pattern can be used, but paired wells are normally used for routine work. Special applications may require additional replication and randomization.

Edge effects in the plates were frequently noted when ELISA first became popular and outer wells were avoided. Plates have steadily improved and normally all **wells can be used. Uniformity in new lots of plates can be checked by loading a uniform sample in all wells.**

RECORDS

One of the major tasks of any indexing procedure is to identify samples properly during the testing process and to record results in a usable format.

The identity of the sample must be maintained through the multiple steps of collection, processing, extraction and testing. It is usually convenient to give each sample a code number at the time of collection and to use this code during the test process. If samples are collected directly in the grinding vessel (usually a glass or plastic tube), labeling steps can be reduced. If the sample is collected in a container other than the grinding vessel, a transferable label is often convenient. Many ELISA plates have a coding system on the plate margins to identify individual wells, but there is no space to mark individual wells on the plate. Most workers develop a data sheet similar to the one shown as Figure 2, which is used to record the loading sequence of test samples and other pertinent data such as reactant concentration and incubation conditions. Each plate and data sheet should have a corresponding number recorded in a logbook to facilitate retrieval of information.

It is important to mark the loading pattern for each plate prior to loading samples and to arrange the samples to be loaded in the appropriate sequence. Note changes or errors that may occur during loading, and store tubes and samples under refrigeration until the testing process is complete.

Visual readings of the plate can be recorded directly on the plate data sheet. Printouts from a plate reader can also be attached to the original data form. Use of computers to store and analyze data is increasing rapidly. Computers are convenient for long-term storage of large amounts of data. Data from the reader may also be converted into another format for further analysis and spreadsheet presentation on the computer. Permanent visual records of important tests can also be obtained by photographing individual plates on a light box or over a white background. A 35-mm transparency film is economical, and

a standard exposure can be obtained if a constant light source is used.

Conjugates are stable for long periods at 4°C. Freezing or freeze-drying are not recommended unless preliminary testing indicates it is possible. If freezing is necessary, add 50 percent glycerol.

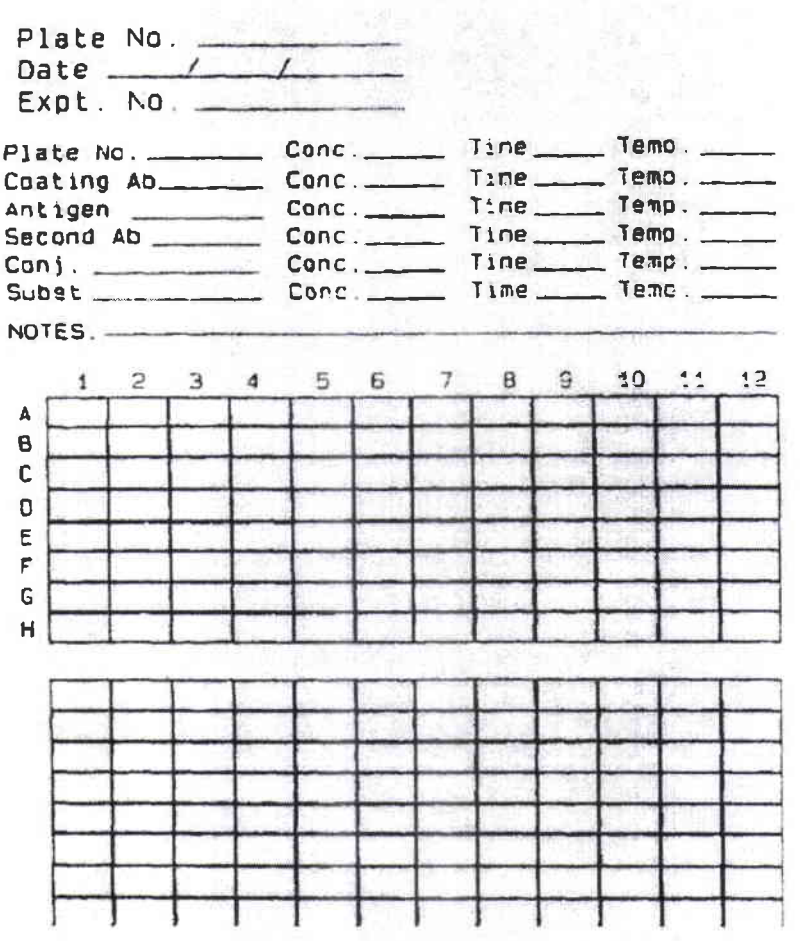


Figure2 Data sheet for recording ELISA results

ELISA BUFFERS AND SOLUTIONS

A limited number of chemicals are required to make the buffers and solutions needed for ELISA, and these are shown in Table 1. Many of these should be readily available in most biological laboratories.

TABLE 1 List of chemicals for ELISA

1. Alkaline phosphatase type	
2. Bovine serum albumen	BSA
3. Diethanolamine	NH $(CH_2CH_2OH)_2$
4. Hydrochloric acid	HCl
5. Ovalbumen	
6. P-Nitrophenyl phosphate	
7. Polyvinyl pyrrolidone MW 40 000	
8. Potassium chloride	KCl
9. Potassium phosphate	KH_2PO_4
10. Sodium azide	NaN_3
11. Sodium bicarbonate	$NaHCO_3$
12. Sodium carbonate	Na_2CO_3
13. Sodium chloride	NaCl
14. Sodium hydroxide	NaOH
15. Sodium phosphate (dibasic)	Na_2HPO_4
16. Tris(hydroxymethyl)aminomethane HCl	Tris-HCl
17. Tween 20	

Larger quantities of the wash buffer (PBST) than of other solutions are used. The dry salts needed for PBS can be weighed in advance in units to make a convenient volume, mixed dry and stored in sealed plastic bags until needed. A new supply of PBS can be obtained rapidly, as needed, by adding the required volume of distilled wafer to the weighed salts.

Use standard buffer solutions with pH values near 7.0 and 10.0 to calibrate pH meters. Store buffers (except PBST) at 4°C if possible.

TABLE 2 ELISA buffers and solutions

1. Coating butter
1.59 g Na_2CO_3
2.93 g NaHC03
0.2 g NaN3
(pH should be 9.6)[1]

2. Phosphate buffered saline (PBS) 8 g
NaCI
0.2 g KH2PO4
2.9 g Na2HP0412 H20
(1.15 g anhydrous) 0.2 g KCI
(pH should be 7.2 to 7.4)'

3. Washing buffer (PEIST) 1,0 1.0 liter PBS
0.5 ml Tween 20

4. Extraction buffer
1.0 liter PBST
20 9 polyvinyl pyrrolidone, MW 40 0002
(Option: 15.7 9 Tris-HCI, adjusted to pH 7.8 with NaOH)

5. Conjugate buffer
1.0 liter PBST
20 g polyvinyl pyrrolidone, MW 40 0002 2.0 g ovalbumen
0.2 g NaN3

6. Substrate buffer
97 ml diethanolamine 0.2 g NaN3
(adjust pH to 9.8 by adding HCI)

7. Reaction stopping solution 120 g
NaOH

[1]pH should be close to value, adjust slightly if necessary.
[2]Poly vinyl pyrrolidone is not essential for extraction or conjugate buffers.

Normally, 200 pl of solution are added per well, but smaller volumes can be used. If NaOH is used to stop the reaction, 50 ml are added to the wells already containing substrate.

Schedule 1
Double antibody sandwich ELISA

1. Coat ELISA plates with antibodies (IgG) diluted to 1 to 2 mg per ml in carbonate coating buffer. Incubate for 1 to 4 hours at 25 to 30°C and wash three times with PBST.

2. Add sample extracts prepared at a 1/10 to 1/20 dilution in extraction buffer in duplicate or triplicate wells. Incubate for 2 to 4 hours at 30 to 37°C or overnight at 4 to 6°C. Wash thoroughly three times with PBST. Avoid cross-contamination of samples when washing.

3. Add enzyme-antibody conjugate diluted in conjugate buffer to an optimum concentration (normally between 1/500 and 1/5 000). Incubate 2 to 4 hours at 37°C. Wash at least three times with PBST to remove unbound conjugate from the wells.

4. Add substrate freshly prepared at a concentration of 0.6 to 1 mg per ml in substrate buffer (10 percent diethanolamine, pH 9.8). Incubate until strong color change develops in positive controls (normally 30 to 60 minutes) and read plates. Plates may be read at several intervals without stopping the reaction, to calculate reaction rate, or the reaction can be stopped at an appropriate time by addition of 3 M NaOH and a single reading can be made. If plates are read visually, score the estimated relative strength of reaction. If read on a spectrophotometer or with a plate reader, record the OD 405 values.

Schedule 2
Double antibody sandwich indirect ELISA

1. Coat ELISA plates with antibodies (IgG) specific to the antigen to be tested. The IgG concentration should be 1 to 2 mg per ml in carbonate coating buffer. Incubate for 1 to 4 hours at 25 to 30°C and wash three times with PBST.

2. Add sample extracts prepared at a 1 /10 to 1 /20 dilution in extraction buffer. Load duplicate or triplicate wells with each sample. Incubate for 2 to 4 hours at 30 to 37°C or overnight at 4 to 6°C. Wash thoroughly three times with PBST, avoiding cross-contamination of samples.

3. Add unlabelled intermediate antibody at an appropriate dilution, normally 0.25 mg per ml or less. Incubate for 30 to 60 minutes at 30 to 37°C, and wash plate three times with PBST.

4. Add enzyme-labeled antibody specific to the intermediate antibody, diluted according to the instructions supplied. Incubate 1 to 2 hours at 30 to 37°C and wash plate carefully at least three times with PBST.

5. Add substrate freshly prepared at 0.6 to 1 mg per ml concentration in substrate buffer (10 percent diethanolamine, pH 9.8). Incubate until strong color change develops in positive controls (normally 30 to 60 minutes) and read plates. Plates may be read at several intervals without stopping the reaction so rate of reaction can be calculated, or the reaction can be stopped at an appropriate time by addition of 3 M NaOH and a single reading can be made. If plates are read visually, score estimated relative strength of reaction. If read on a spectrophotometer or plate reader, record the OD 405 values.

Schedule 3
Plate-trapped indirect ELISA

1. Add antigen extracts to uncoated ELISA plates and incubate 1 to 4 hours at 25 to 30°C or overnight at 4 to 6°C. (Note that samples prepared for PTA should not have Tween 20 in the extraction buffer.) Wash plates three times with PBST and avoid contamination while washing.

2. Add unlabelled antibody specific to the antigen at an appropriate dilution (normally 1 g per ml or less). Unpurified polyclonal antisera or ascites fluid can be used. Incubate 1 to 2 hours at 30 to 37°C and wash three times with PBST.

3. Add enzyme-labeled antibody specific to the unlabelled antibody, at the specified dilution (normally about 1/1 000), and incubate 1 to 2 hours at 30 to 37°C. Wash carefully at least three times with PBST.

4. Add substrate prepared at a concentration of 0.6 to 1 mg per ml in substrate buffer (10 percent diethanolamine, pH 9.8). Incubate until a strong colour change develops in positive controls (normally 30 to 60 minutes) and read plates. Plates may be read at several intervals without stopping the reaction so rate of reaction can be calculated, or the reaction can be stopped at an appropriate time by addition of 3 M NaOH and a single reading can be made. If plates are read visually, score estimated relative strength of reaction. If read on a spectrophotometer or plate reader, record the OD405 values.

REFERENCES

Hundreds of references are available on the ELISA technique and its application to numerous plant viruses.

Adams, A.N. & **Barbara, D.J.** 1982. The use of F(ab'),-based ELISA to detect serological relationships among carlaviruses. Ann. Appl. Biol., 101: 495-500.

Bar-Joseph, M. & **Garnsey,** S.M. 1981. Enzymelinked immunosorbent assay (ELISA): principles and application for diagnosis of plant viruses. In K. Maramorosch & K.F. Harris, eds, Plant diseases and vectars: ecology and epidemiology, p. 35-59. New York, Academic Press.

Bar-Joseph, M., Garnsey, S.M., Gonsalves, D., Moscovitz, M., Purcifull, D.E., Clark, M.F. & **Loebenstein,** G. 1979. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of citrus tristeza virus. Phytopathology, 69: 190194.

Clark, M.F. 1981. Immunosorbent assays in plant pathology. Annu. Rev. Phytopathol., 19: 83-106.

Clark, M.F. & **Adams,** A.N. 1977. Characteristics of the micro-plate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. 1. Gen. Virol., 34: 475-483.

Clark, M.F. & **Bar-Joseph,** M. 1984. Enzyme immunosorbent assays in plant virology. Methods Virol., 7: 51-85.

Clark, M.F., Lister, R.M. & **Bar-Joseph,** M. 1988. ELISA techniques. In A. Weisbach & H. Weisbach, eds, Methods for plant molecular biology, p. 507530. New York, Academic Press.

Engelbrecht, D.). 1980. Indexing grapevines for grapevine fanleaf virus by enzyme-linked immunosorbent assay. Proc. 7th Meet. ICVG, Niagara Falls, NY, USA, 1980, p. 277-282.

Engvall, E. & **Pesce, A.J.** 1978. Quantitative enzyme immunoassay. London, Blackwell Scientific Publications. 129 pp.

Gonsalves, D. 1979. Detection of tomato ringspot virus in grapevines: a comparison of Chenopodium quinoa and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Plant Dis. Rep., 63: 962-965.

Hampton, R., Ball, E. & **De Boer, S., eds.** 1990. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A laboratory manual. St Paul, MN, USA, Am. Phytopathol. Soc. Press. 389 pp.

Huss, B., Muller, S., Sommermeyer, G., Walter, B. & Van Regenmortel, M.H.V. 1987. Grapevine fanleaf virus detection in various grapevine organs using polyclonal and monoclonal antibodies. Vitis, 25: /78-188.

Jones, R.A.C. & **Torrance, L.** 1986. Developments and applications in virus testing. Wellesbourne, War., UK, AAB. 300 pp.

Koenig, R. & **Paul, H.L.** 1982. Variants of ELISA in plant virus diagnosis. J. Virol. Methods, 5: 113-125.

Kolber, M., Beczner, L., Pacsa, S. & **Lehoczky, J.** 1985. Detection of grapevine chrome mosaic virus in field-grown vines by ELISA. Phytopathol. Mediterr., 24: 135140.

Maggie, E.T. 1980. Enzyme-immunoassay. Boca Raton, Florida, USA, CRC Press. 295 pp.

McLaughlin, M.R., Barnett, O.W., Burrows, P.M. & **Baum, R.H.** 1981. Improved ELISA conditions for detection of plant viruses. J. Virol. Methods, 3: 1325.

Permar, T.A., Garnsey, S.M., Gumpf, D.3. & **Lee, R.F.** 1988. A monoclonal antibody which discriminates strains of citrus tristeza virus. Phytopathology, 78: 1559.

Sanchez-Vizcaino, J.M. & **Cambra Alvarez,** M. 1987. Enzyme immunoassay techniques, ELISA, in animal and plant diseases. Tech. Ser. No. 7, 2nd ed. Paris, Office international des epizooties. 54 pp. (Available in English, French and Spanish)

Tanne, E. 1980. The use of ELISA for the detection of some nepoviruses in grapevines. Proc. 7th Meet. ICVG, Niagara Falls, NY, USA, 1980, p. 293-296.

Van Regenmortel, M.H.V. 1982. Serology used immunochemistry of plant viruses. New York, Academic Press. 302 pp.

Vela, C., Cambra, M., Cortes, E., Moreno, P., Miguet, S.G., Perez de San Roman, C. & **Sanz, A.** 1986. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for citrus tristeza virus and their use in diagnosis. 1. Gen. Virol., 67: 91-96.

Walter, B. & **Etienne, L.** 1987. Detection of the grapevine fanleaf virus away from the period of vegetation. 1. Phytopathol., 120: 355-364.

Walter, B., Vuittenez, A. Kuszala, A., Stocky, G., Buckard, 3. & Van Regenmortel, M. H. V. 1984. Detection serologique du virus du courtnoue dans la vigne par Ie test ELISA. Agronomie, 4: 527-534

PRODUCTION OF CERTIFIED MATERIAL OF GRAPEVINE VARIETIES AND ROOTSTOCKS

PRODUCTION OF CERTIFIED MATERIAL OF GRAPEVINE VARIETIES AND ROOTSTOCKS

By:
Dr. Abdul-Jalil Hamdan
Assistant Professor, Entomology
Hebron University, Palestine

Background:

Fruit crop sanitation programs have been established during the last few decades in developed countries and have provided the basis for flourishing fruit crop industries.

The need for fruit crop sanitation and improvement was lately recognized by various governments in Mediterranean and Near East countries with initiatives taken in some Institutions and Universities.

In response to the request of FAO expert consultation (September 1985) and to the 18th FAO Regional Conference for the Near East (Istanbul, March 1986), UNDP and FAO accepted the respective roles in funding and technically supporting a Regional Project on the control of virus and virus-like diseases.

It was also agreed by the Project member countries to fund their national program on sanitation of fruit crops of particular interest and to assign basic staff and requirement for starting national activities.

The project major objective is institution building through networking in order to develop national capabilities for production, maintenance, and distribution of virus-free planting materials of vegetatively propagated crops.

The short-term objectives of the project can therefore be summarized as follows:

- development of a regional system of networks on fruit crop improvement through the control of virus and virus-like diseases;
- strengthening capabilities of participating countries in undertaking programs of production and maintenance of healthy (virus-free) planting material;

- e transfer of technology to participating countries;
- creation of awareness about the threat of devastating fruit crop virus and virus-like diseases currently of limited distribution in the region.

Establishment and activities of the network:

- A regional network has been set up for each group (the grapevine network based in Tunis, the citrus network in *Cairo and the stone* fruit network in Rabat).
- The grapevine network was set up and based in Tunis and coordination is already well established among the member countries' institutions and the specialized institutions of the developed countries in the Mediterranean region.

The grapevine network including Algeria, Morocco, Syria and Tunisia, has laid the bases for cooperation among its member countries as well as with specialized institutions of developed countries in the Mediterranean basin.

The network activities focus on:

- *clonal and sanitary selection with two phases;*
  - *the first concerns a pomological and sanitary* selection of wine grape varieties.
  - The second phase consists of specific clonal and sanitary selection.

The scheme of certification was adopted by all member countries;

- *establishment of mother vine stands of American rootstocks selected in Tunisia;*
- improvement of Tunisian varieties through the varietal and sanitary control of wine and table varieties;
- standardization of selection and indexing methods.

European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) had approved several standard certification schemes for production of various crops including :

1. PM 4/7(2) Nursery requirements - recommended requirements for establishments participating in certification of fruit or ornamental crops
2. PM 4/8(1) Pathogen-tested material of grapevine varieties and rootstocks

Scientific institutions in the region for the study of Viruses and Virus Diseases of the Mediterranean Crops, and the Mediterranean Agronomic Institutes have undertaken an extensive program for the pomological and sanitary improvement of the regional fruit tree industry.

Only registered selections free from the infectious agents included in national protocols are eligible for certification.

Thus, when required, selected stocks undergo sanitation treatments which, according to the plant species, consist of heat therapy, meristem tip culture, or micrografting.

Controls for the assessment of the sanitary status, either before or after sanitation treatments, are based on different types of assays:
(i) biological (indexing on woody indicators for all species except for olive, and mechanical transmission
to herbaceous hosts);
(ii) serological (ELISA, using polyclonal antisera and/or monoclonal antibodies);
(iii) molecular (radioactive or cold probes, PCR);
(iv) electrophoretic (for viroids and dsRNAs).

EPPO Standards: PM 4/7(2):

Nursery requirements - recommended requirements for establishments participating in certification of fruit or ornamental crops

The following general conditions are recommended as requirements for establishments (including micropropagation establishments) intending to propagate fruit or ornamental crops for certification:
1. Establishments participating in certification schemes should be officially registered (this will normally be with the official authority of the country where the nursery is situated, but may be with the official authority of another country) as capable of satisfying the technical and isolation requirements for the category of stock concerned and, as appropriate, of respecting the hygiene guidelines for certification schemes.

2. Establishments applying for registration should supply the following information:

- name under which trade is conducted,
- postal address,

- telephone and fax numbers,
- e-mail address,
- address(es) of premises on which propagation is to be done (if different from above).

3. Establishments should declare each year in advance the species and the type of plants to be entered for certification.

4. Establishments should designate one member of staff to have overall responsibility for certification and to be the first point of contact on all certification matters.

This person's name should be stated and any subsequent changes notified to the certifying authority.

5. Establishments should conform with the certification regulations in force, permit official access to all types of crops on the premises and facilitate inspections and sampling at any reasonable time.

6. Establishments should keep records for the crops covered by certification schemes, which should include:

- an up-to-date inventory of the fruit or ornamental crops, as appropriate, on the premises.

- details of plants brought onto the premises and their origin.

- details of all sales or disposals, including quantity and destination of the material.

- information on all tests and inspections performed as required by the certification scheme, including, for example, date and method of sampling, date of test, test method, result.

This concerns any tests performed by the nursery staff and those performed by specialized laboratories on their behalf.

- details of applications of plant protection products.

- occurrence of pests and diseases and any action taken.

7. Establishments should either be capable of carrying out prescribed tests on plant material or should subcontract the tests to a competent laboratory.

- In either case, the certification authority should approve the testing facilities
- Records of tests and inspections performed by the official authority are normally held by the authority.

- Nurseries may sometimes require this information, for example to be provided to authorities of other countries to which they export.

EPPO Standards: PM 4/8(1)
Pathogen-tested material of grapevine varieties and rootstocks

Definition of propagation categories:

1. Propagative material: includes cuttings of both rootstock and scion wood.

2. Bundle: a lot of either root stock, scion wood or grafted plants.

3. Source Block: the block containing Mother Plants.

4. Mother plants: the plants from which rootstock and scion wood cuttings are taken.

5. Propagation stock.
   - Propagating materials or plants (for grapevine, commonly known as plants of basic category) directly derived from nuclear stock plants and grown in propagation blocks.
   - They have the same health status as the original source and can only be delivered to nurseries that have the necessary qualifications.

6. Nursery Block: the field nursery site in which newly grafted grapevines are grown in the nursery prior to sale.

7. Block: For virus testing purposes a "block" is a discrete, continuous, and clearly defined area within a vineyard from which ampelographically checked rootstock or scion wood material is being collected for grafting. While it may contain different varieties, it does not include untested rows or untested material.

8. Certified stock.

- Propagating materials or plants derived from mother vines established in commercial nurseries from propagation stock and delivered to the growers.
- The production of new mother vines from certified mother vines is forbidden.
- To do so, the nurseryman must obtain new propagation stock.
- Trueness to type should be monitored and maintained for all categories. Propagation stock and certified stock categories assure, in addition, health status, as declared for individual scion variety, clone or rootstock type.

9. Acceptable Quality Level:

- Because it is not possible to absolutely guarantee that no virus infected plants are present, the Acceptable Quality Level (AQL) is the largest percentage of defectives in a certain sample size that can make the lot definitely acceptable.
- In this Standard the AQL for "virus testing" is 0.1% (i.e. 1 on 1,000 grafted grapevines) and for "end of process testing" the AQL is 1.0%.

Outline of the grapevine certification schemes in EPPO :

For the production of certified grapevine varieties and rootstocks, the following successive steps should be taken:

1. Selection for pomological and health quality of individual plants of each scion variety or rootstock type to be taken into the scheme.

2. Assessment of health status of visually selected plants by testing, or production of healthy plants (nuclear stock) by heat treatment and/or meristem-tip (shoot-tip) culture followed by testing.

3. Maintenance of the nuclear stock (including the plants resulting from selective testing) under conditions ensuring freedom from re-infection by aerial or soil vectors, with retesting as appropriate.

4. Multiplication of the nuclear stock in one phase (propagation stock), under conditions ensuring freedom from re-infection, with retesting as appropriate.

5. Distribution of propagation stock to nurseries.

6. Production of certified (virus-tested) stock by nurseries under strict official control, with random tests on virus status by the official organization as appropriate.
Certified grapevine material for export should in any case satisfy the phytosanitary regulations of importing countries, especially with respect to any of the pathogens covered by the scheme which are also quarantine pests.

1st Step: Selection for pomological and health quality:

- Select vines of each variety or rootstock according to procedures which ensure trueness to type and high pomological quality.
- An effort should be made to select vines with no apparent symptoms of, or the least affected by, infectious graft-transmissible diseases.
- However, according to world experience, freedom from viruses, virus-like agents and viroids is a very rare condition.
- Thus, selection for health status should generally be complemented by procedures for eliminating disease.

2nd Step: Maintenance of the candidate material:

- Collect cuttings from the selected vines and cold-store (e.g. at 2-4°C) until use.
- If conditions are favorable (e.g. sandy soils, with AQL), force cuttings of scion varieties or rootstocks to root in a glasshouse and transplant rooted cuttings as such in the field.
- Alternatively, for scion varieties, graft buds or bud sticks from selected vines onto vegetatively propagated certified rootstocks or seedling rootstocks.
- Prior to use, rootstocks should be tested for freedom from the harmful diseases and pathogens specified in Tables 12.
- However, seedlings are considered to be free from all viruses occurring in EPPO countries, virus-like agents, viroids and prokaryotes.
- The soil should be free from nematode vectors (Table 3) and vines should be carefully protected from aerial vectors (the mealybugs and leafhoppers listed in Table 3) in areas where these may occur.
- For the repository, a safety distance from commercial vineyards or mother-vine plots is not strictly necessary. Contiguity between repository and other grapevine stands should, however, be avoided.

Table 1. Virus and virus-like diseases of grapevine occurring in the EPPO region and covered by the scheme

A. Grapevine degeneration complex, caused by grapevine fanleaf nepovirus and other European nepoviruses
B. Grapevine leafroll complex
C. Grapevine rugose wood complex (corky bark, rupestris stem pitting, Kober stem grooving, LN 33 stem grooving)
D. Grapevine fleck disease
E. Grapevine enation disease
F. Grapevine diseases caused by MLOs (visual inspection only - material visibly affected by MLOs is not admitted for certification)
G. Grapevine diseases associated with closteroviruses (material found to contain closteroviruses is not admitted for certification)

Other graft-transmissible diseases known to occur in the EPPO region are tolerated for the moment, but every effort should be made to eliminate them, especially grapevine vein mosaic disease and grapevine vein necrosis disease.

Table 2. Pathogens, transmissibility, geographical distribution and vectors for the diseases cited in Table 1

	Virus	Geographical distribution	Vector
A. *Grapevine degeneration complex* (all mechanically transmissible):			
1.	Artichoke Italian latent nepovirus (AILV)	Bulgaria	*Longidorus apulus* *Longidorus fasciatus*
2.	Arabis mosaic nepovirus (ArMV)	Europe (Switzerland, Germany, Hungary, Yugoslavia, Bulgaria, France, Italy), Japan	*Xiphinema diversicaudatum*
3.	Grapevine Bulgarian latent nepovirus (GBLV)	Bulgaria, Hungary, Portugal, Yugoslavia	Unknown
4.	Grapevine chrome mosaic nepovirus (GCMV)	Hungary, Yugoslavia	Unknown
5.	Grapevine fanleaf nepovirus (GFLV)	Worldwide	*Xiphinema index* *Xiphinema italiae*
6.	Grapevine Tunisian ringspot nepovirus (GTRV)	Tunisia	Unknown
7.	Raspberry ringspot nepovirus (RRV)	Germany	*Longidorus macrosoma* *Longidorus elongatus*
8.	Strawberry latent ringspot nepovirus (SLRV)	Germany, Italy, Turkey	*Xiphinema diversicaudatum*
9.	Tomato black ring nepovirus (TBRV)	Germany, Israel, Canada (Ontario), Hungary	*Longidorus attenuatus* *Longidorus elongatus*

B. *Grapevine leafroll complex* (only grapevine closterovirus A mechanically transmissible)

10.	Grapevine closterovirus A	Europe, Mediterranean	*Planococcus ficus* *Planococcus citri* *Pseudococcus longispinus*
11.	Grapevine leafroll- associated closterovirus I	Europe, USA Mediterranean	Unknown
12.	Grapevine leafroll- associated closterovirus II	Europe, Mediterranean	Unknown
13.	Grapevine leafroll- associated closterovirus III	Europe, USA Mediterranean	*Planococcus ficus* *Pseudococcus longispinus*
14.	Grapevine leafroll- associated closterovirus IV	Mediterranean, USA	Unknown
15.	Grapevine leafroll- associated closterovirus V	France	Unknown

C. *Grapevine rugose wood complex* (not mechanically transmissible)

Occurs worldwide, with no known vector. The diseases known as corky bark, rupestris stem pitting, Kober stem grooving and LN 33 stem grooving belong to this complex. No pathogen associated with this virus-like disease has yet been characterized, but a closterovirus serologically unrelated to the leafroll-associated closterovirus has been reported to be associated with corky bark.

D. *Grapevine fleck disease* (not mechanically transmissible)

16.	Grapevine phloem-limited isometric virus (GPLIV)	Europe, Mediterranean	Unknown

E. *Grapevine enation disease* (not mechanically transmissible)

Occurs in Europe, North America (USA), South America (Venezuela), South Africa, New Zealand, Australia, with no known vector. No pathogen associated with this virus-like disease has not yet been identified.

F. *Grapevine diseases caused by MLOs*

17.	Grapevine flavescence dorée MLO	France, Italy	*Scaphoideus titanus*
18.	Grapevine bois noir and other yellows MLOs	Europe (France, Germany, Italy, Switzerland, Greece, Romania, Bulgaria), Chile, Israel, New Zealand	Unknown (probably leafhoppers)

Table 3. Soil-borne (nematode) and aerial vectors of grapevine diseases recorded in EPPO countries1

Vector	Pathogen	Geographical distribution
Xiphinema index	Grapevine fanleaf nepovirus	Worldwide associated with grapevine
Xiphinema italiae	? 1	Mediterranean region
Xiphinema diversicaudatum	Arabis mosaic nepovirus Strawberry latent ringspot nepovirus	Throughout Europe and the Middle East
Longidorus attenuatus	Tomato black ring nepovirus	Patchy distribution throughout Europe, but more concentrated in north-central, i.e. PL, DE, NL, BE, GB (England)
Longidorus elongatus		Mainly northern Europe but also rarely in ES, IT, BG and south FR
Longidorus macrosoma	Raspberry ringspot nepovirus	Western Europe
Xiphinema vuittenezi	? 2	Mainly central and southern Europe
Planococcus ficus	Grapevine closterovirus A Grapevine leafroll-associated closterovirus III	Mediterranean region
Planococcus citri	Grapevine closterovirus A	Mediterranean region
Pseudococcus longispinus	Grapevine closterovirus A Grapevine leafroll-associated closterovirus III	Mediterranean region
Scaphoides titanus	Grapevine flavescence dorée MLO	Introduced to SW Europe from N. America. Spreading eastwards

1 *Xiphinema italiae*, although reported in the literature as a vector of grapevine fanleaf nepovirus, does not seem to have any vectoring efficiency in the field.

2 *Xiphinema vuittenezi* has not been proved experimentally to transmit any virus. However, it has been found associated with the spread of certain nepoviruses (e.g. grapevine chrome mosaic nepovirus) in the field. For this reason, it should be regarded as a potentially dangerous nematode.

3rd Step: Production of nuclear stock plants:

To become nuclear stock plants:

- Selected vines should undergo testing for the harmful diseases and pathogens occurring in the EPPO region specified in Tables 1-2 and/or
- Sanitation according to the procedures of Appendices.
- Material imported from outside the EPPO region should also be tested by EPPO-recommended methods for all other viruses or virus-like pathogens occurring naturally in *Vitis* in the region of origin.
- Testing on the woody indicators is essential for material to be classified as nuclear stock, but
- The other procedures given in the disease-detection summaries of Appendix may be useful for preliminary screening or for retesting.
- Regardless of the type of treatment used, sanitized vines should be retested.
- Plant rooted explants from heat chamber or tissue culture into separate pots, and grow them in a glasshouse or screen house to ensure freedom from aerial vectors.
- If vigorous growth is obtained, serological tests and testing on woody indicators can be performed within a year after transplanting.
- If candidate nuclear stock plants of a given variety or rootstock give negative results in all tests, it can be promoted to a nuclear stock plant and moved to the nuclear stock repository.
- If, for a given variety or rootstock, 100% virus infection can be expected, it is advisable not to waste time with the first testing, but to proceed directly with sanitation.

Mother vine plots should meet as many of the following criteria as possible:

- be located on grounds reasonably close to the research unit in charge of indexing;
- be established on good quality, well-drained and clean soil, preferably with no grapevine history or at least free of grapevines for at least l5 years;
- be separated by at least 20 m from other vineyards to minimize contaminations from adjacent plots by irrigation water, flooding and cultivation;
- be large enough to accommodate other optional indicators in addition to those used routinely.

- Before planting, the land must be carefully surveyed for the presence of nematodes, paying attention to virus vector species. Soils infested with virus vectors, especially *Xiphinema index*, are unsuitable for growing indicator vines even after nematicide treatment.
- Chemical control with any suitable nematicide product is recommended before planting and before each replanting.

4th Step: Maintenance of nuclear stock;

Pot individually a limited number (2-5) of stock plants of each source (clone) of each variety or rootstock type taken into the scheme, and grow them under conditions ensuring freedom from re-infection by aerial or soil vectors.

For this purpose;

- double-door entry,
- insect-proof screenhouses
- with gravel floor,
- heavy plastic or tarpaulin or any other material preventing contact of the roots with soil are suitable.

Nuclear stock plants;

- should be kept under continuous surveillance and
- be sprayed regularly with appropriate pesticides,
- to control the normal quality pests of grapevine.

In vitro storage of a duplicate set of each nuclear stock plant can be envisaged when reliable procedures for *in vitro* maintenance of *Vitis* germplasm become available.

Vines in the repository should be checked each year for virus symptoms and other pathogenic disorders.

Retesting is advisable if new and better detection techniques, antisera or indicators become available, or whenever visual inspections suggest tests should be carried out.

5th Step: Propagation stock:

- Propagation blocks are outdoor plantings that constitute the source of propagation stock.

- Propagation blocks are established with material propagated directly from nuclear stock.
  - These blocks should be established, preferably,
    - in soils with no grapevine history, or
    - soils that have not hosted grapevines for at least 6 years and,
    - in any case, are found free from virus-transmitting nematodes (Table 3).

  - The blocks should have a safety distance of 15-20 m from any vineyard made up of material of lower category (certified), but

  - this may be reduced if the soil in the adjacent fields (vineyards or orchards) has been found to be free from virus-transmitting nematodes.
- (a) *Rootstocks*.
  - Place cuttings from each rootstock type in the nuclear block in a glasshouse for rooting, and
  - plant rooted cuttings directly in the field,
  - each source in a separate plot, or row, and labeled so as to be readily distinguished from one another.

- (b) *Varieties*.
  - Graft each variety taken into the scheme onto rootstocks of the same certification level or
  - onto seedling rootstocks, and
  - transplant the grafted vines into the field.

- Check stocks visually each year for symptoms of graft-transmissible diseases and
- retest vines if suggested by visual inspections.

6th Step: Distribution of propagation stock and production of certified stock:

(a) *Varieties:*

- For the production of mother-vine plants from which certified propagative material is to be derived,
  - propagation stock scion material should be grafted by the nurseries onto rootstocks of the propagation stock category only.
  - Nurseries should declare their production of certified stock every year to the official organization concerned,

- Recording the number of plants for each variety/rootstock combination and
- Substantiating the origin of certified scions and rootstocks by certificates, bills or delivery notes with appropriate remarks.
- Distribute scion material from propagation blocks to nurseries under strict official control.
- If possible, an official or officially authorized organization should perform the distribution.

6th Step:

(b) *Rootstocks:*

- Mother vines for the production of certified stock bud sticks of scion varieties, rooted cuttings of rootstocks, grafted vines, should be established in plots at a minimum distance of 8-10 m from other vineyards or orchards and in soils free from virus-transmitting nematodes.
- To this effect, the nurseries should produce a certificate of nematological analysis issued by an official, or officially authorized, organization.
- The production of certified rootstocks should be announced by the nurseries to the official organization concerned.
- Nurseries should record the number of mother plants and substantiate the origin of certified material by official certificates or delivery notes with appropriate remarks.
- Distribute rooted cuttings destined for the establishment of mother-vine plants for the production of certified cuttings or rooted cuttings to nurseries under strict official control.
- If possible, an official or officially authorized organization should perform the distribution.

7th Step: Control on the use and status of certified material :

- The use of propagation material in nurseries to produce certified stock should be checked by an official, or officially authorized, organization which controls the health,
- Origin and amount of certified plants on the basis of field inspections and of the records and documents presented by the nursery.
- During production of certified stock in nurseries, some random tests on virus status should also be performed using available short-time testing methods (e.g. ELISA test, green grafting).

8th Step: Certification and labeling:

- The certifying authority issues nurseries with certificates on the basis of points 4, 5 and 6 and supplies the appropriate labels in the required numbers.

- Grafted rooted cuttings and rootstock rooted cuttings are graded by the nursery and labeled in bundles.
- The authority inspects and checks on correct labeling before delivery.

APPENDIX 1: Guidelines on testing procedures:

1. Testing on Vitis indicators

- The use of *Vitis* indicators is still a compulsory step in any grapevine certification program.
- It cannot be excluded because there are several diseases, some of major importance, which cannot be identified except on woody differential hosts.
- Testing is performed by grafting on the indicators listed in Table 4.
- Since at least three replicates of any variety or rootstock type taken into the scheme are grafted on each indicator,
- a total of 12-18 grafts is required for each candidate vine.

Various grafting techniques can be used:

(a) *Whip or cleft grafting in the field*

(b) *Chip-bud grafting.* This technique is recommended for detection of rupestris stem pitting because the pits induced by the disease develop on the indicator stem below the grafted chip and extend basipetally in a band or stripe.

(c) *Machine grafting*

(d) *Green grafting*

It is recognized that green grafting has distinct advantages over other techniques. Therefore, an effort should be made to encourage its use.

Table 4. Main indicators for virus and virus-like diseases of grapevine1

Indicator	Disease identified
1. *Vitis rupestris* St George	Degeneration2, fleck, rupestris stem pitting
2. *Vitis vinifera* Cabernet franc, Pinot noir and other red-berried cultivars	Leafroll3
3. Kober 5BB (*Vitis berlandieri* × *Vitis riparia*)	Kober stem grooving

4. LN 33 (Couderc 1613 × *Vitis berlandieri*)	Corky bark, enation, LN33 stem grooving
5. *Vitis riparia* Gloire de Montpellier	Vein mosaic4
6.110 R (*Vitis rupestris* × *V. berlandieri*)	Vein necrosis4

1 Appendix I provides full details of the conditions for the tests and suggests some alternative indicators.
2 In countries where degeneration is also caused by nepoviruses other than grapevine fanleaf nepovirus, Siegfriedrebe (FS4 201/39) may be used as an indicator.
3 The choice of the most suitable indicator for leafroll depends on climatic conditions of the region where the testing is done.
4 As noted in Table 1, these are optional for the moment but strongly recommended.

2. Inoculation to herbaceous hosts

- The use of herbaceous indicators allows detection of mechanically transmissible viruses (Table 2), including some which are of minor or negligible importance.
- Whereas an effort should be made to obtain nuclear and propagation stock free from all these viruses, inoculation to herbaceous hosts is regarded as a complement to, but not as a substitute for, other diagnostic procedures.
- It may be useful, for example, for preliminary screening or for random testing.

3. ELISA testing

- The use of ELISA is recommended for grapevine fanleaf nepovirus and other European nepoviruses where they occur, and for closteroviruses for which antisera are available.
- It can also be applied to detection of grapevine phloem-limited isometric virus.
- Sources of antigens for ELISA tests can be grapevine buds, roots, leaves and wood shavings.

Wood shavings, however, are advantageous because:

(i) they can be used throughout the year without apparent loss of efficiency due to the seasonable variation of antigen titre in vegetative organs;
(ii) give low and consistent background readings;

(iii) are much more reliable for identification of closteroviruses in American rootstocks, especially *Vitis rupestris* and its hybrids.

Use of ELISA testing is regarded as a complement to, but not as a substitute for, other diagnostic procedures. It may be useful, for example, for preliminary screening or for random testing.

4. Detection of individual diseases

Virus Testing required in 1st, 2nd, and subsequent years:

Year 1: In the first year of drawing propagative materials from a new site, or in the first year in which certification of product is sought by the nursery, 100 percent of all mother vines for both rootstock and scion shall be Elisa tested for GLRaV-3 and any testing positive for GLRaV-3 excluded from the harvest population. Samples may be composited up to a maximum of 6 vines per test.

Year 2: Blocks with a testing history from the previous year that recorded positive virus scores that were at or below the agreed AQL for source blocks of 0.1%, will require testing in the second year at 20% or 200 vines, whichever is the larger number.

Samples taken for testing that are less than 100% must be randomly selected from within each variety present in the designated block.

Subsequent Years: If a block that is tested at less than 100% in any year shows any new infections in the subsequent year, the block must be re-tested at 100% before use.

APPENDIX 2: Guidelines on sanitation procedures:

Heat treatment:

- All known graft-transmissible infectious agents of grapevine, except viroids, can be eliminated from parts of infected plants with varying levels of efficiency by heat therapy.
- Heat treatment can be performed in several ways but, regardless of the procedure used, testing of the treated material for assessment of its health status should follow.
- A sufficient interval between sanitation of the material and the conclusion of virus testing is necessary in order to avoid false negatives.

- Hot-water treatment:
  - Hot water is used for eliminating intracellular prokaryotes like the MLO agent of flavescence dorée,
  - From infected grapevine cuttings, collect dormant cuttings and immerse in water according to the method of Caudwell *et al.* (1991).

Advances in Hot Water Treatment for Rootstocks, Rootlings and Grafted Vines:

- Short duration hot water treatment of vine cuttings at 540C for 5 minutes and
- Long duration hot water treatment at 500C for 30 minutes (HWT) are widely used by Australian vine nurseries to satisfy *Phylloxera* quarantine regulations for the movement of vine cuttings or rootlings between regions.
- Long duration HWT is routinely used as a disinfestation treatment for the control of;
  - crown gall (*Agrobacterium vitis),*
  - *Phomopsis,*
  - *Phytophthora,*
  - nematodes and
  - a range of other fungal pathogens.
- Hot water treatment in California is used principally for the disinfestation of mealy bug

- Hot-air treatment:

(a) Place pot-grown vegetative vines (e.g. rooted cuttings 2-year-old or older) of each variety or rootstock type to be taken into the scheme into a heat cabinet and hold at constant temperature of 38±1°C and 16-18 h artificial illumination.

- Collect tips 0.5-1 cm long from vegetative shoots after 4 weeks or more (up to 300 days if the vines survive) from the beginning of the treatment, and root in a heated (25°C) sand bench under mist or, after surface sterilization, in agarized nutrient medium under sterile conditions.
- Pot rooted explants and let them grow in a glasshouse until ready for testing.

(b) Graft a bud from the candidate vine to be heat-treated into the main shoot of a pot-grown, 2-year-old healthy LN 33 indicator.

- Transfer budded LN 33 to the heat cabinet 12-15 days after grafting and expose for 60 days to 37±1°C.

- Move treated vines out of the cabinet,

- Cut LN 33 shoot above grafted bud, allow the bud to develop into a shoot and check for health status.

Shoot (meristem) tip culture in vitro:

- Collect shoot tips or axillary buds from vines grown at 36-38°C, surface-sterilize by dipping explants for 20 min in a 5% solution of commercial sodium hypochlorite and 0.1% Tween 20.

- Rinse thoroughly with 2-3 changes (10 min each) of sterile distilled water.

- Dissect 0.4-0.6 mm-long explants comprising the meristematic dome and the first pair of leaf primordia and transfer to sterile test tubes in agarized Murashige and Skoog medium supplemented with 0.5 ppm benzylaminopurine.

- Allow explants to grow for 45 days at 25°C in a cabinet with 16 h artificial illumination (about 4000 lux).
- Separate actively growing shoots and transfer individually to a medium containing 1 ppm benzylaminopurine for 45-50 days for elongation.
- Transfer elongated shoots (3 nodes long or more) individually to a medium containing 0.5-1 ppm indolbutyric acid for root production.
- Transfer rooted explants to small pots containing vermiculite under saturated humidity conditions, then to pots with soil compost and protect plantlets with a polyethylene bag for as long as necessary (usually 2-3 weeks).
- Grow plantlets in a glasshouse until ready for testing.

References:

EPPO Standards on phytosanitary measures:

1. PM 4/7(2): Nursery requirements - recommended requirements for establishments participating in certification of fruit or ornamental crops

2. PM 4/8(1): Pathogen-tested material of grapevine varieties and rootstocks

3. SavinoV., B. Di Terlizzi, A.M. D'Onghia Terlizzi, A.M. D'Onghia, M. Digiaro, O. Murolo, L. Catalano4 and G.P. Martelli. (1998). PRODUCTION OF SANITARILY IMPROVED MATERIAL AND IMPLEMENTATION OF CERTIFICATION PROGRAMMES IN APULIA (SOUTHERN ITALY). World Conference on Horticultural Researche, 17-20 June, 1998. Rome, Italy

Outline of the EEC grapevine certification scheme:

In order to certify grapevine varieties and rootstocks the actions below have to befollowed:

1. Identification of candidate clones through selection for authentity and health quality of individual grapes.
2. Establishment of candidate clone repositories in soil without nematode vectors. Grape selections can either be grown on their own-roots or can be grafted on virus-free rootstocks.
3. Re-testing for health assessment of visually selected candidate clones.
4. Establishment of performance plots in which virus-tested candidate clones are evaluated for ultimate selection and identification of clones.
5. Application to governmental authorities for official recognition and registration of clones.
6. Maintenance of registered clones (nuclear stock, pre-basic genebank) under conditions ensuring freedom from re-infection by soil or aerial vectors (e.g. *in vitro* cultivation and acclimatization in insect- proof screen or greenhouse). The nuclear (pre-basic I) genebank had to be re-tested for virus diseases each year.
7. Multiplication of nuclear (pre-basic I) stock in outdoor plantings (propagation blocks) under conditions which minimize the possibilities for re-infection (such as nematode-free sandy soils, safety distance from vineyards planted with "certified material " etc.).

Propagation blocks are the source of "basic material". The propagation blocks should be both checked visually every year for virus symptoms and re-tested by ELISA every 3 to 5 years period.

8. Distribution of basic material to qualified nurseries under official control.
9. Establishment of commercial stands for production of "certified material" for delivery to growers (certified blocks). These are planted with budwood coming directly from propagation blocks in soils in which virus-transmitting nematodes are not detected.
10. Certification and identification labelling. Labels: pre-basic material-white with a purple band, basic-white, certifiedblue. Labels have to be supplied by the certifying authority (government institution or officially recognised private organisation).

Production of Virus Free Plants by Plant Tissue Culture

Production of Virus Free Plants by Plant Tissue Culture

Rida A. Shibli

Department of Plant Production
Faculty of Agriculture
Jordan University of Science and Technology
Irbid - Jordan

In Vitro Cultures

- Tissue cultures are started from pieces of whole plants; called explants.
- Such plants and explants are growing in the external environment are contaminated with microorganisms.

Production of disease-free Plants

- To survive and grow properly, in vitro plant cultures need to be free of fungal and most bacterial infections.
- Explants contaminated with some bacteria, viruses, viroids, and certain mycoplasmas and rickettsias organisms, if grown in vitro, may transfer such diseases to their progeny.
- Surface contaminations can be easily discarded or eliminated by surface sterilization:
  - Removes soil residuals and other macro-particles.
  - Eliminates superficial fungal contamination with regular fungicides.

Virus Diseases Elimination

- Virus-free is used to mean free from those viruses which have been identified and whose presence is discernable with a virus assay.
- Viruses can result in the loss of plant production, and also be the cause of a poor quality product;
- so it is extremely important to use virus-free starting material when propagating vegetatively.

If it is suspected that a plant may be virus infected:

1. The virus or viruses must be identified.
2. An attempt should be made to eliminate (all) virus(es).
3. The plants obtained should be assayed to see if they are virus-free.
4. Lastly any further re-infection should be prevented.

Re-infection

1. Plants should be grown in free of infection and vectors greenhouses.
2. Carriers of diseases should be controlled.
3. Strict hygiene is necessary.
4. Germ free pots and substrates.
5. It is recommended that disease-free plant material is maintained in vitro.
6. To carry out continuous selection, visually and by assays.

Methods of eliminating viruses

1. Heat treatment;
2. Meristem culture;
3. Heat treatment followed by meristem culture;
4. Adventitious shoot formation followed by meristem culture;
5. Virus-free plants produced from callus and protoplasts;
6. Micro-grafting: grafting of meristems on virus-free (seedling) root stocks.

Heat treatment

1. Only effective against isometric viruses and against diseases resulting from mycoplasmas.
2. A temperature and treatment time should be chosen which allow the plant (shoot, branch) to just survive, while the virus is inactivated.

Meristem culture

- In early work on virus multiplication in vitro, it was discovered that virus infection was not always maintained when the root tip of an infected tomato root was subcultured;
- This was the first work to establish the theory of using meristem culture to eliminate virus pathogens.
- Meristem culture is a technique in which a dome-shaped portion of the meristematic region of the shoot tip is dissected and inoculated on nutrient medium in vitro.
- In meristem culture the apical dome and a few leaf primordia located in the subapical region is included.
- The chance of a meristem surviving without leaf primordia is very small.

- Isolation of larger meristems makes the chance of obtaining virus-free plants very small.

- Number of theories explain the virus-free phenomenon of meristem culture:
  1. High concentrations of auxin and cytokinin in dividing meristematic cells would hinder the penetration of virus particles or that the virus particles would be inactivated by them.
  2. Enzymes needed for virus multiplication were absent in meristematic tissue.
  3. Presence of naturally occurring inhibitors; this explains why sexually produced seeds are virus-free.

- Non of the theories above is proven 100%. Thus the definite explanation of the production of virus-free plants by meristem culture is therefore still not yet possible.

- Meristems are usually grown in fluorescent light:
  □Day length of 14-16 h
  □Irradiance about 8-12 W m^{-2}

- Sometimes fluorescent light is supplemented with a little red light.

- Sometimes a lower irradiance has to be used for the first few days after isolation.
- Sometimes a meristem produces a nice shoot which will not root.

Heat treatment & meristem culture

- To increase the chances of obtaining virus-free plants in difficult cases; especially when more than one virus is present, heat treatment is often given at the beginning of the meristem culture.
- By this means the virus concentration is lowered and/or the virus –free zone enlarged.
- The length of the heat treatment (35-38°C) varies from 5-10 weeks.

Adventitious shoot formation & meristem culture

- This method is used in different ways to obtain virus-free plants.
- In some plants it appears that particular areas of the leaf are virus-free, while the plant as a whole is infected with the virus.
- If the adventitious shoot method is used for chimeric plants such as variegated Pelargonium, then the variegated form is lost, as adventitious shoot formation usually takes place from one cell (layer) only.

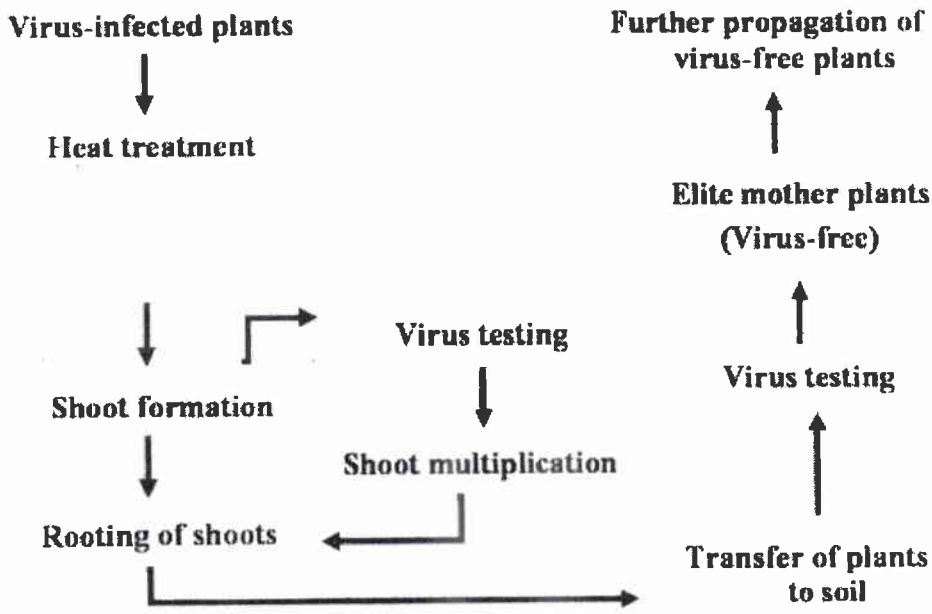
Virus-free & Callus & Protoplasts

- Apparently callus tissues can escape virus infection after a few subcultures.
- Mori et al. (1982) isolated protoplasts from tobacco leaves which were infected with TMV; from these protoplasts they regenerated virus-free plants.
- It is however not realistic to assume that the production of virus-free plants via callus and protoplasts will have practical importance, since with this type of culture mutations are very common.

Micro-grafting

- If it is possible to induce a meristem to grow, or a shoot obtained from meristem culture will not form roots, then it is possible to graft the meristem onto virus-free (seedling) root stock, which is grown or propagated in vitro.
- Micro-grafting is extremely important with woody species since with this group meristem culture is often impossible.

Production of virus-free plants



Virus identification

- There are many latent virus infections making it difficult to visually determine if a plant is virus-free.
- The potential virus-free plant must therefore be assayed, which can be carried out as follows:

1. Test plants:

   The sap from one of the plants to be assayed is smeared onto the leaf of a test plant, which has already been treated with carborundum powder; if virus is present in the sap then after a few days the test plant begins to show characteristics symptoms. Disadvantage of this type of assay are the length of time needed and the requirement for extensive growth facilities.

2. Electron microscopy:

   Little use is made of this expensive method in practice, since few laboratories possess the specialized equipment and trained personnel to carry out procedures.

3. Serology:
If a rabbit is inoculated with proteinaceious receptors, such as a plant virus, then specific antibodies are formed. If a drop of centrifuged plant sap is added to a drop of anti-serum from the blood of rabbit, then if the virus is present precipitation occurs. One of these is the ELISA Enzyme-linked immunosorbent assay) test.

4. Molecular biology.

Bacteria- and fungal-free plants & meristem culture

- Bacteria- and fungal-free plants are also obtained by the use of meristem culture.
- The most important genera of bacteria to be eliminated are:

  - ☐ ***Erwinia***
  - ☐ ***Pseudomonas***
  - ☐ ***Xanthomonas***
  - ☐ ***Bacillus***

- **The most important genera of Fungi to be eliminated are:**
  - ☐ ***Fusarium***
  - ☐ ***Verticillium***
  - ☐ ***Phialophora***
  - ☐ ***Rhizoctonia***

- **A rich nutrient medium, in which peptone, tryptone or yeast extract are added, is sometimes used to quickly determine wither a plant is bacteria- or fungal-free.**

Molecular Markers

Molecular Markers

By
Dr.HUSSEIN MIGDADI
Hussmigd@yahoo.com
National Center for Agricultural Research and Extension (NCARE)

Molecular Markers for genetic variability Studies

Polymorphism in the marker can be detected at three levels: phenotype (morphological), differences in proteins (biochemical), or differences in the nucleotide sequence of DNA (molecular).

Morphological Markers

Morphological markers generally correspond to the qualitative traits that can be scored visually.

They have been found in nature or as the result of mutagenesis experiments. Morphological markers are usually dominant or recessive.

They are highly influenced by the environment. The morphology/phenotype is the result of genetic constitution and its interaction with environment.

Biochemical Markers

Biochemical markers are proteins produced by gene expression.

These proteins can be isolated and identified by electrophoresis and staining.

Polymorphisms in proteins:

Seed storage proteins and Isozymes and allozymes

Isozymes and allozymes are different molecular forms of an enzyme sharing a catalytic activity.

Allozymes are coded by different alleles at one gene locus. Isozymes are coded by more than one gene locus.

Molecular Markers

A molecular marker is a DNA sequence that is readily detected and whose inheritance can easily be monitored.

A molecular marker should have some desirable properties.

1. **It must be polymorphic as it is the polymorphism that is measured for genetic diversity studies.**
2. **Co-dominant inheritance: The different forms of a marker should be detectable in diploid organisms to allow discrimination of homo and heterozygotes.**
3. **A marker should be evenly and frequently distributed throughout the genome.**
4. **It should be easy, fast, and cheap to detect.**
5. **It should be reproducible.**
6. **High exchange of data between laboratories.**

Unfortunately, *no single molecular marker meets all these requirements*.

Molecular techniques have been grouped into the following categories based on basic strategy,

- ***Non-PCR-based approaches:* Restriction fragment length polymorphism (RFLP).**
- ***PCR-based techniques:* Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), microsatellite or Simple Sequence Repeat Polymorphism (SSRP), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR).**
- ***Targeted PCR and sequencing:* Sequence Tagged Sites (STS), Sequence Characterized Amplified Region (SCARs), Sequence Tagged Microsatellites (STMs), Cleaved Polymorphic Sequences (CAPS), etc.**

NON-PCR-BASED APPROACHES

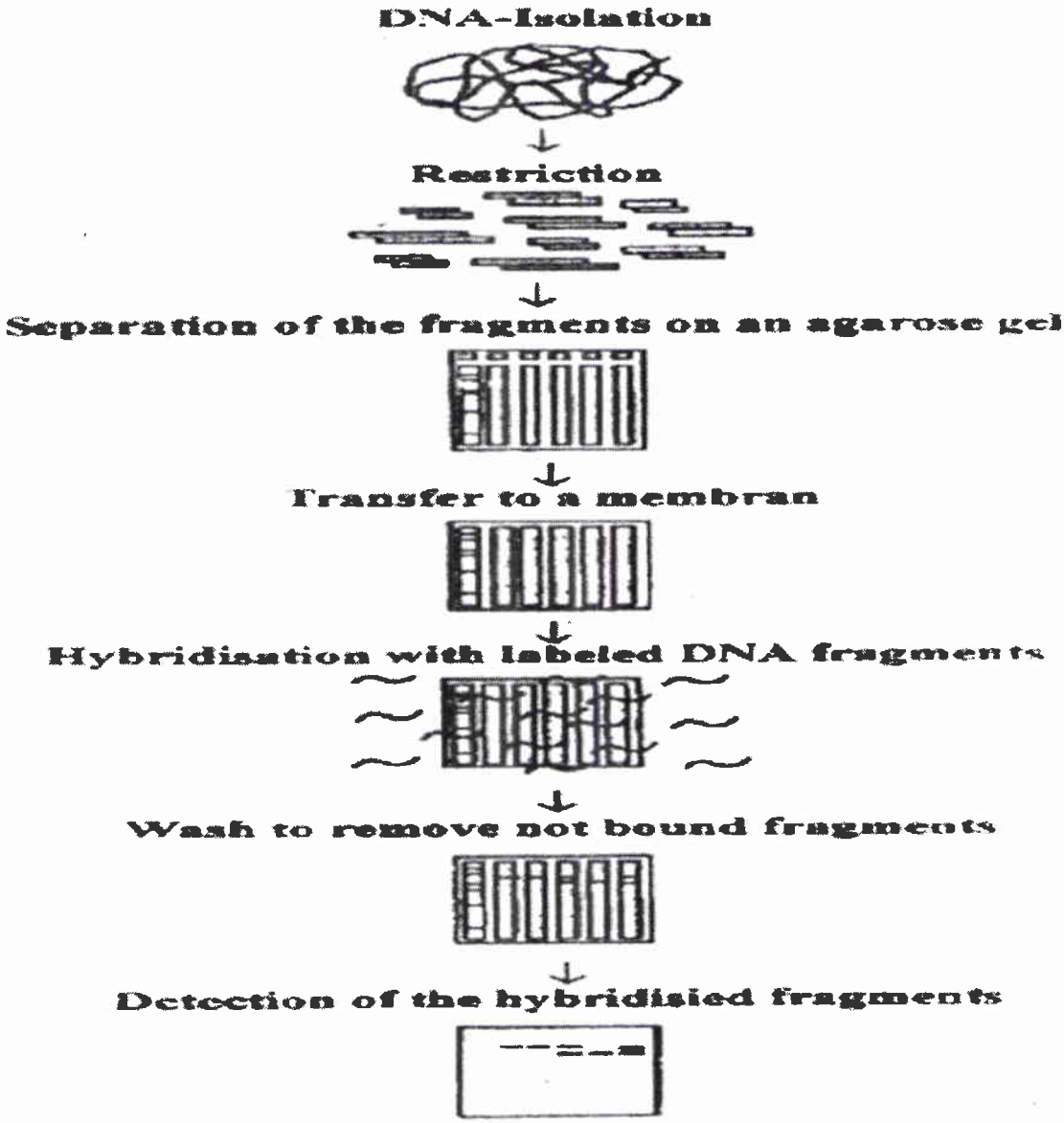
Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

RFLP variability in plants can be caused by

1. **Base sequence changes which add or eliminate restriction sites.**
2. **Rearrangements such as insertions or deletions.**
3. **Unequal crossing over or replication slippage which creates variation in the number of tandem DNA sequence repeats at a minisatellite or microsatellite locus**

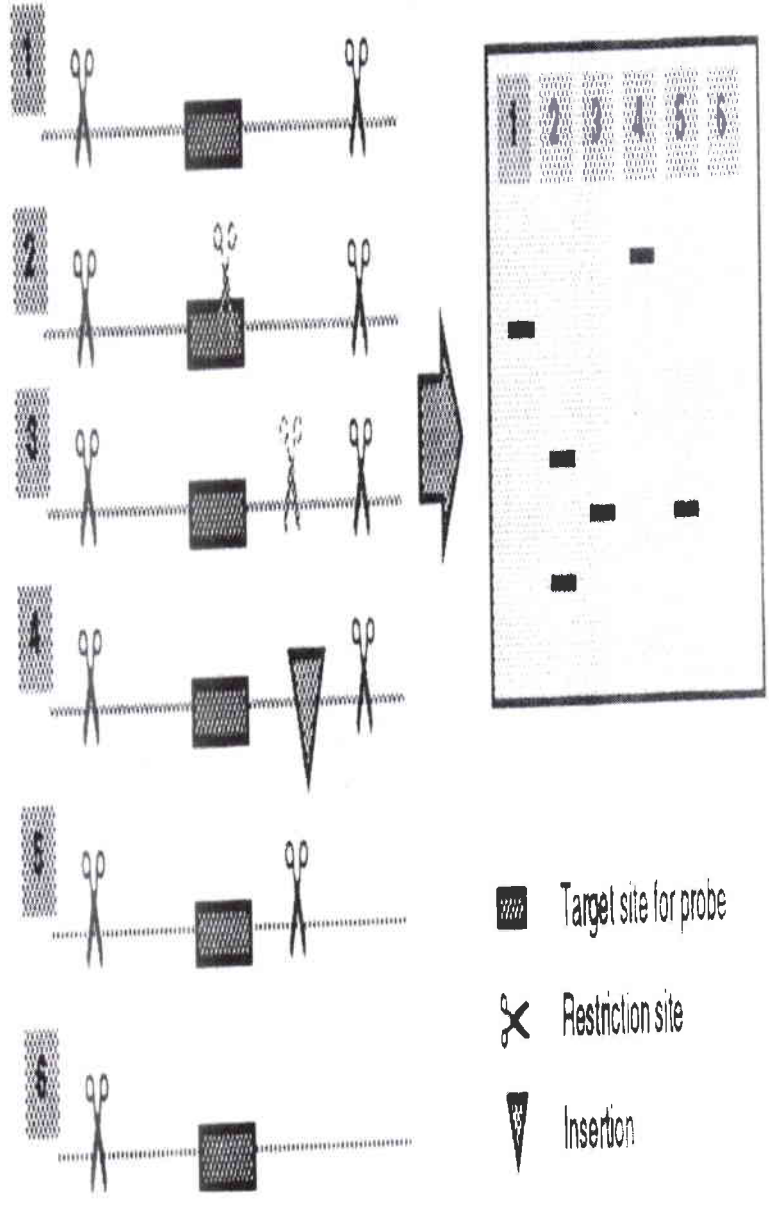
This will result in loss or gain of a recognition site and in turn lead to restriction fragments of different lengths.

Flow chart of RFLP analysis

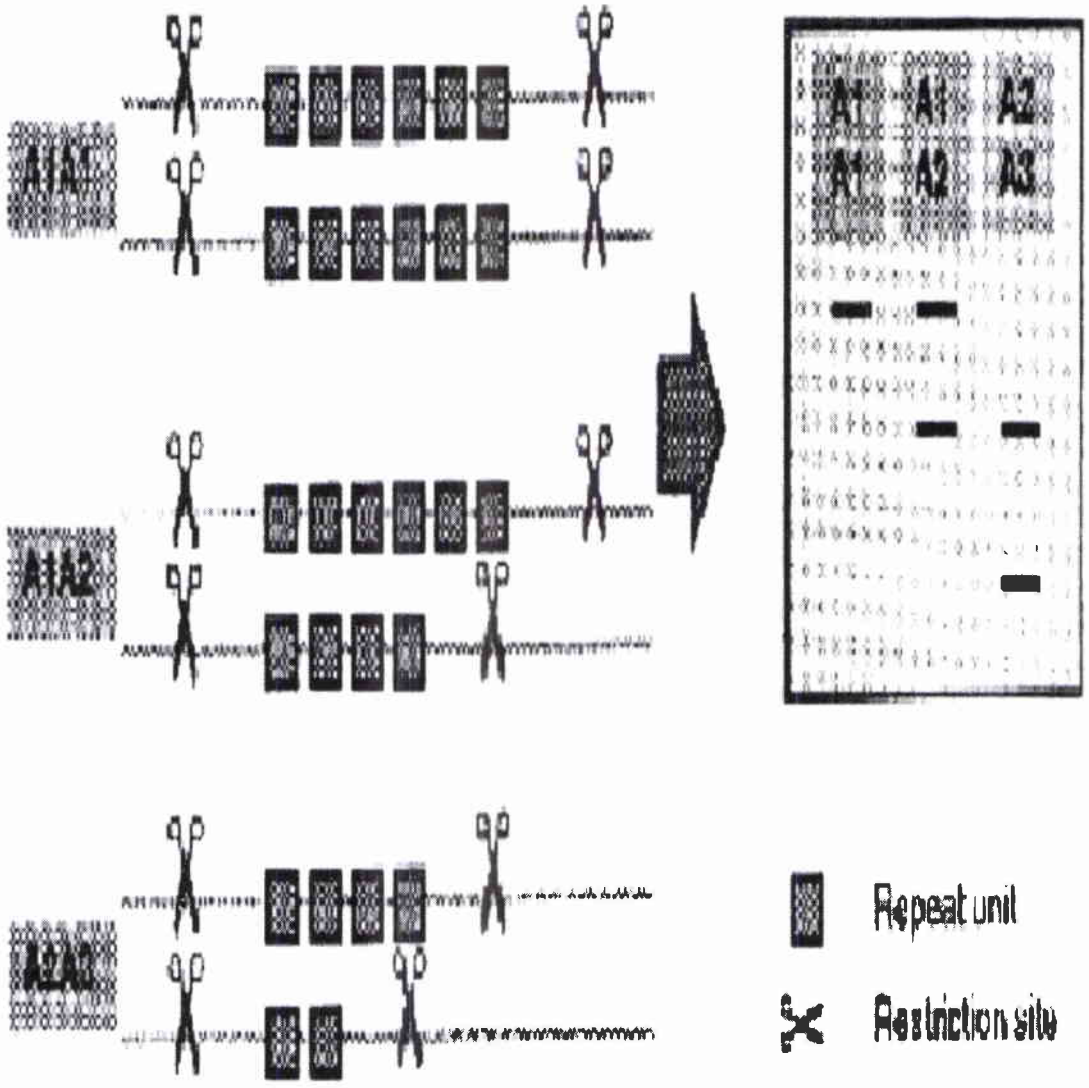


Polymorphisms detected by RFLP analysis

Track 1 - "wild type".
Track 2 - A mutation creating **a new restriction site occurs within the target region. Two smaller bands are therefore detected on autoradiography.**
Track 3 - A mutation creating **a new restriction site occurs between the flanking restriction sites, creating a smaller restriction fragment.**
Track 4 - An insertion of a DNA sequence occurs between the flanking restriction sites, creating a larger restriction fragment.
Track 5 - An deletion of a DNA sequence occurs between the flanking restriction sites, creating a smaller restriction fragment.
Track 6 - One of the flanking restriction sites is lost through mutation or deletion. Consequently, the restriction fragment is lost



Interpretation of results



Uses of RFLP

1. It permits direct **identification of a genotype or cultivar** in any tissue at any developmental stage in an environment independent manner.
2. RFLPs are **co-dominant markers**, enabling heterozygotes to be distinguished from homozygotes.
3. The method is **simple as no sequence-specific information is required.**
4. **Highly Reproducible**

Problems

1. RFLP analysis requires **relatively large amount of highly pure DNA.**
2. **A constant good supply of probes** that can reliably detect variation **are needed**.
3. **It is laborious and expensive to identify suitable marker/ restriction enzyme combinations** from genomic or cDNA libraries where no suitable single-locus probes are known to exist.
4. RFLPs are **time consuming as they are not amenable to automation.**
5. RFLP work is carried out using **radioactively labeled probes** and therefore requires expertise in autoradiography.

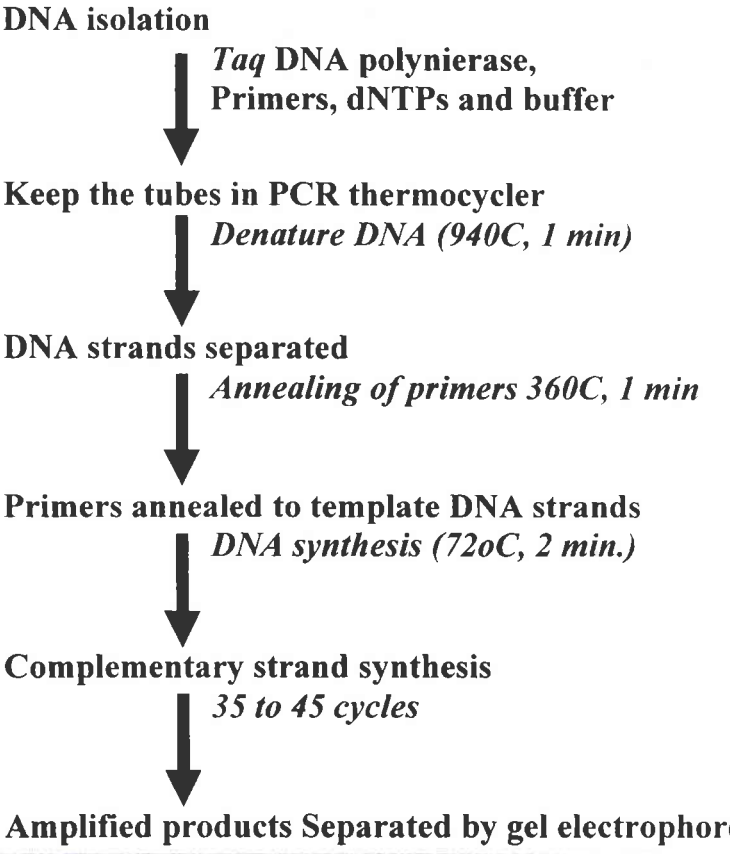
PCR-BASED TECHNIQUES

A single short oligonucleotide primers are arbitrarily selected to amplify a set of DNA segments distributed randomly throughout the genome.

A closely related techniques based on this principle are:

RAPD Randomly Amplified Polymorphic DNA
DAF DNA Amplifying Fingerprinting
AP-PCR Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction

All these techniques refer to **DNA amplification using single random primers**



An outline of RAPD analysis

The following characteristics of RAPD markers(**Advantages)**

1. **Need for a small amount of DNA (15-25 ng)** makes it possible to work with populations.
2. **It involves nonradioactive assays**.
3. **It needs a simple experimental set-up** requiring only a **thermocycler** and an **agarose assembly**.
4. **It does not require species-specific probe libraries**; thus, work can be conducted on a large variety of species where such probe libraries are not available.
5. **It provides a quick and efficient screening for DNA sequence- based polymorphism** at many loci.
6. **It does not involve blotting or hybridization steps**.

Application

RAPD markers have been successfully used for the following applications:

1. **Construction of genetic maps**: maps have been developed in *Arabidopsis,* pine, *Helianthus,* etc.
2. **Mapping of traits**: RAPD markers may also be used for indirect selection in segregating populations during plant breeding programs. This technique has been employed for tagging genes of economic value.
3. **Analysis of the genetic structure of populations**.
4. **Fingerprinting of individuals**.
5. **Targeting markers to specific regions of the genome**.
6. **Useful system for evaluation and characterization of genetic resources.**

Limitations

1. **RAPD polymorphisms are inherited as dominant-recessive characters.** This causes a loss of information relative to markers which show codominance.
2. **RAPD primers are relatively short, a mismatch of even a single nucleotide can often prevent the primer from annealing**; hence, there is loss of band.
3. **The production of nonparental bands in the offspring of known pedigrees warrants its use with caution and extreme care.**
4. **Reproducibility problems**: RAPD is sensitive to changes in PCR conditions, resulting in changes to some of the amplified fragments.
5. **Co-migration problems**

Same Band, Same Fragment?

The presence of a band of identical molecular weight in different individuals is not evidence, per Se, that the **individuals share the same (homologous) DNA fragment.**

One Band, One Fragment?
A single band on a gel can be comprised of different amplification products. **Gel electrophoresis used separate DNA quantitatively** (i.e. according to size), **cannot separate** equal sized fragments **qualitatively** (i.e. according to base sequence).

Amplified Fragment Length Polymorphism AFLP
It is a combination of RFLP and RAPD methods,
it is applicable universally and is highly reproducible.
AFLP involves the following steps:

1. **DNA is cut with restriction enzymes** (generally by two enzymes), **and double-stranded oligonucleotide adapters are ligated** to the ends of the DNA fragments.
2. **Selective amplification** of sets of restriction fragments is usually carried out **with 32P-labeled primers designed** according to the sequence of adaptors **plus 1-3 additional nucleotides.** Only fragments **containing the restriction site sequence plus the additional nucleotides will, be amplified.**

3.Gel analysis of the amplified fragments.
The amplification products are **separated on highly resolving** sequencing gels and **visualized using autoradiography. Fluorescent or silver staining** techniques can be used to **visualize the products in cases where radiolabeled nucleotides are not used in PCR.**

Advantages

1. This technique is **extremely sensitive.**
2. It has **high reproducibility.**
3. It has **wide scale applicability, proving extremely proficient in revealing diversity.**
4. It **discriminates heterozygotes from homozygotes** when a gel scanner is used.
5. It is not only a simple fingerprinting technique, **but can also be used for mapping.**

Disadvantages

1. It is **highly expensive and requires more DNA** than is needed in RAPD (1 mg per reaction).
2. It is **technically more demanding than RAPDs, as it requires experience of sequencing gels.**
3. AFLPs are **expensive to generate as silver staining, fluorescent dye, or radioactivity detect the bands.**

Simple sequence repeats (microsatellites)

1. SSRs, also known as microsatellites, are **present in the genomes of all eukaryotes.**
2. These are **ideal DNA markers for genetic mapping and population studies** because of their **abundance.**

3. These are **tandemly arranged repeats of mono-, di-, tri-, tetra- and penta-nucleotides** with different lengths of repeat motifs (e.g. A, T, AT, GA, AGG, AAAC, etc.).
4. These repeats are **widely distributed throughout plant and animal genomes** that display high **levels of genetic variation based on differences in the number of tandemly repeating units** at a locus.
5. These SSR length polymorphisms at individual loci are **detected by PCR**, using **locus-specific flanking region primers** where the sequence is known.
6. Since the repeat length is highly variable, **this is an effective way of detecting polymorphisms.**

•Usually single locus, multi-allelic
•Co-dominant
•Highly reproducible

7. Requires sequence information for DNA flanking the repeat itself

DNA databases or produce **genomic libraries** enriched in microsatellites, cloning and sequencing the DNA in order to define suitable primers

Advantages

1. This technique is **very simple and easy to use**.
2. **Assay is PCR-based.** It is sufficient to merely separate the amplification products by electrophoresis to observe the results. This reduces the time required considerably to obtain a result comparable to the methods that are based on Southern blotting.
3. **The use of radioisotops can be avoided** because the size polymorphism between alleles is frequently large enough to be seen in agarose gels.
4. Microsatellites segregate as **codominant markers**.
5. Polymorphism generated is **highly reproducible**.
6. They are perfectly suited for **use in map-based cloning** because identification of marker anchored clones is conveniently carried out by PCR.

Disadvantages

The major disadvantage of microsatellites is **the cost of establishing polymorphic primer sites and the investment in synthesizing the oligonucleotides.**

A comparison of properties of restriction fragment length polymorphisms and randomly amplified polymorphic DNAs

Characteristic	RAPD	RFLP	AFLP	Sequence-tagged microsatellite
Principle	DNA amplification	Restriction digestion Southern blotting	DNA amplification	DNA amplification
Detection	DNA staining		DNA staining	DNA staining
DNA required-quantity	Crude	Relatively pure	Relatively pure	Crude
DNA required-quantity	Low	High	Medium	Low
Primer requirement	Yes(random primer)	None	Yes	Yes (selective primer)
Probe requirement	None	Set of specific probes	None	None
Use of radioisotopes	No	Yes	Yes-no	Yes-no
Part of genome surveyed	Whole genome	Generally low copy coding region	Whole genome	Whole genome
Dominant/co-dominat	Co-dominant	Co-dominant	Dominant(co-dominant)	Co-dominant
Polymorphism	Medium	Medium	Medium	High
Automation	Yes	No	Yes	Yes
Reliability	Intermediate	High	High	High
Recurring cost	Low	High	Medium	Low

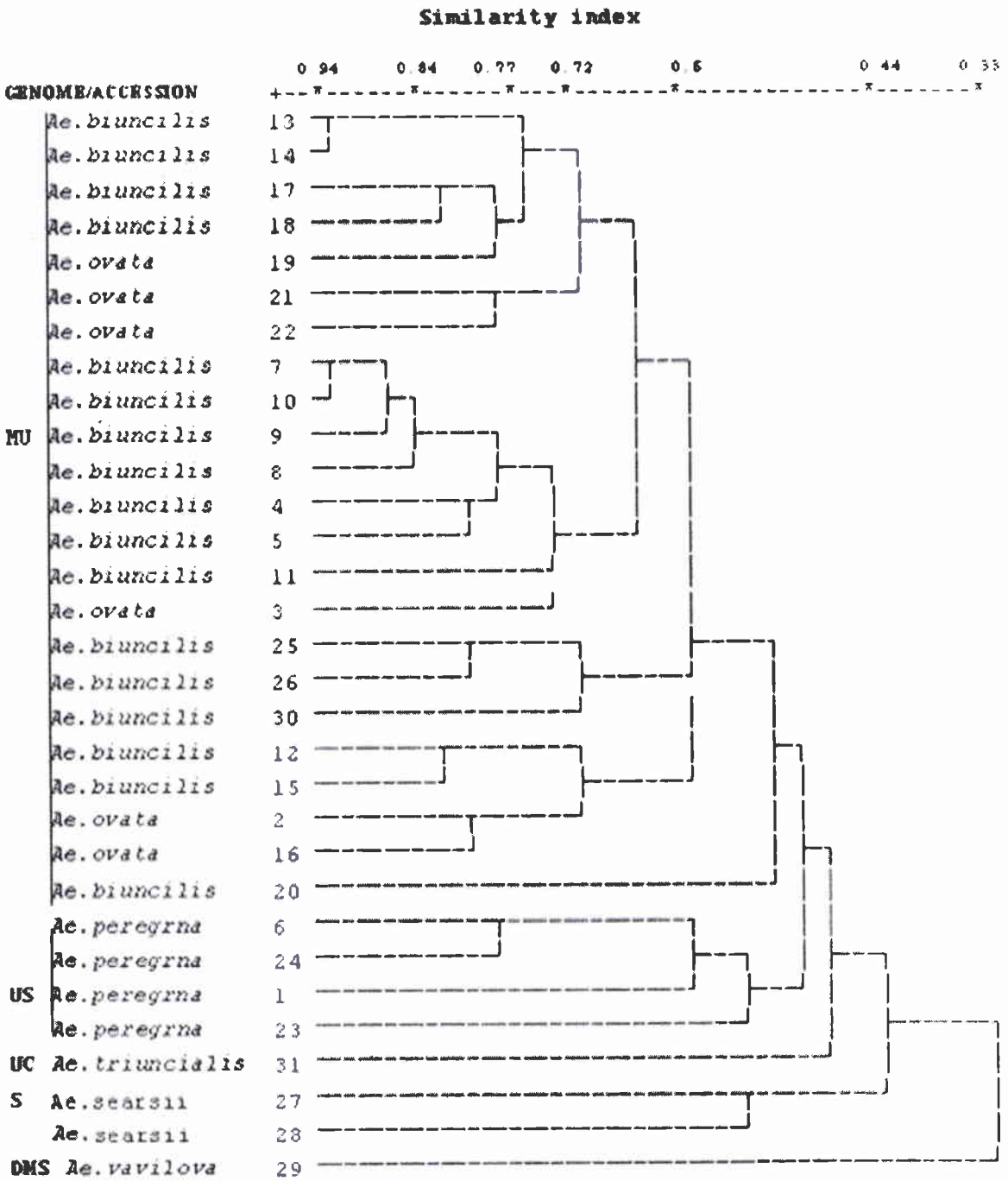
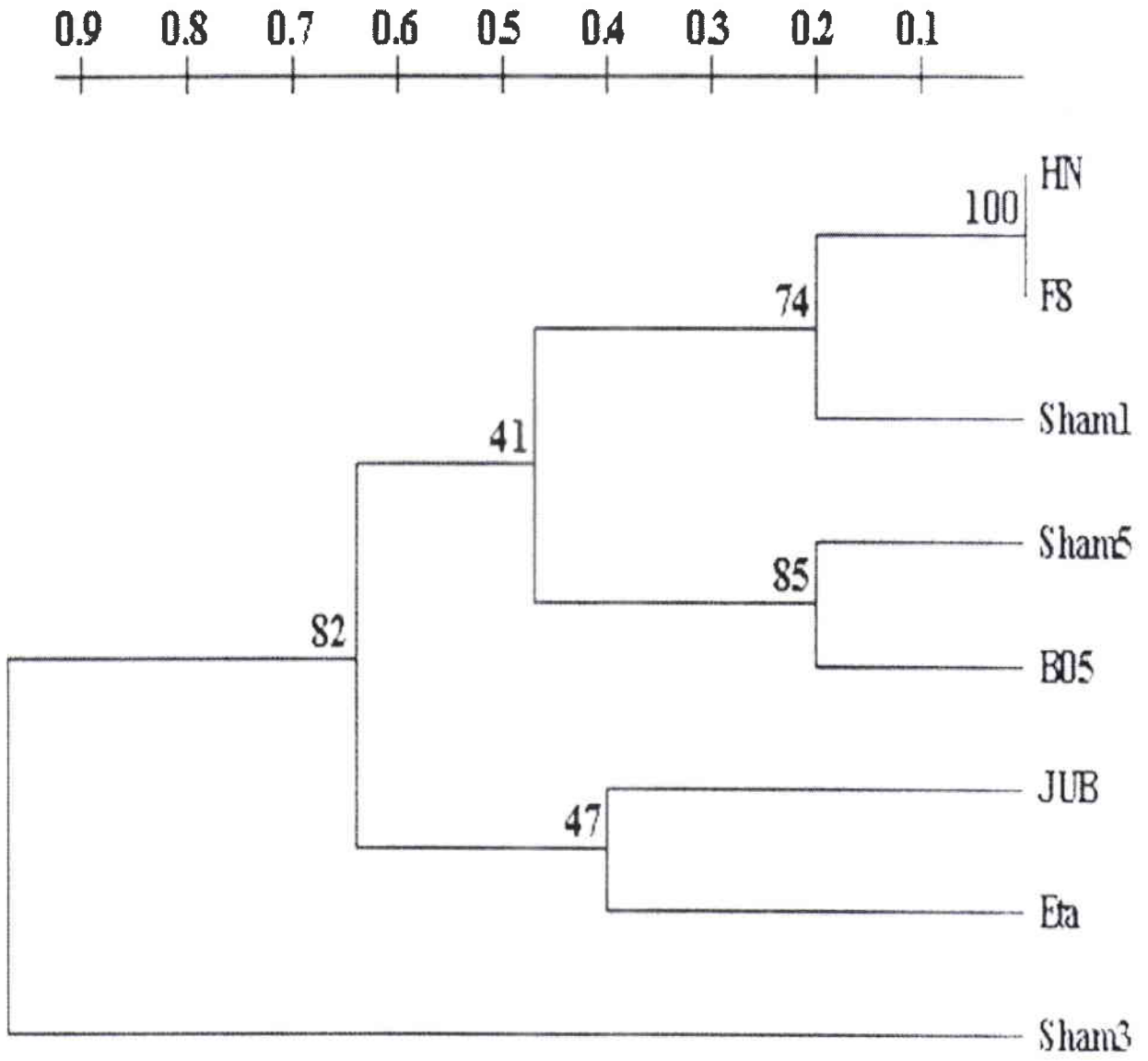
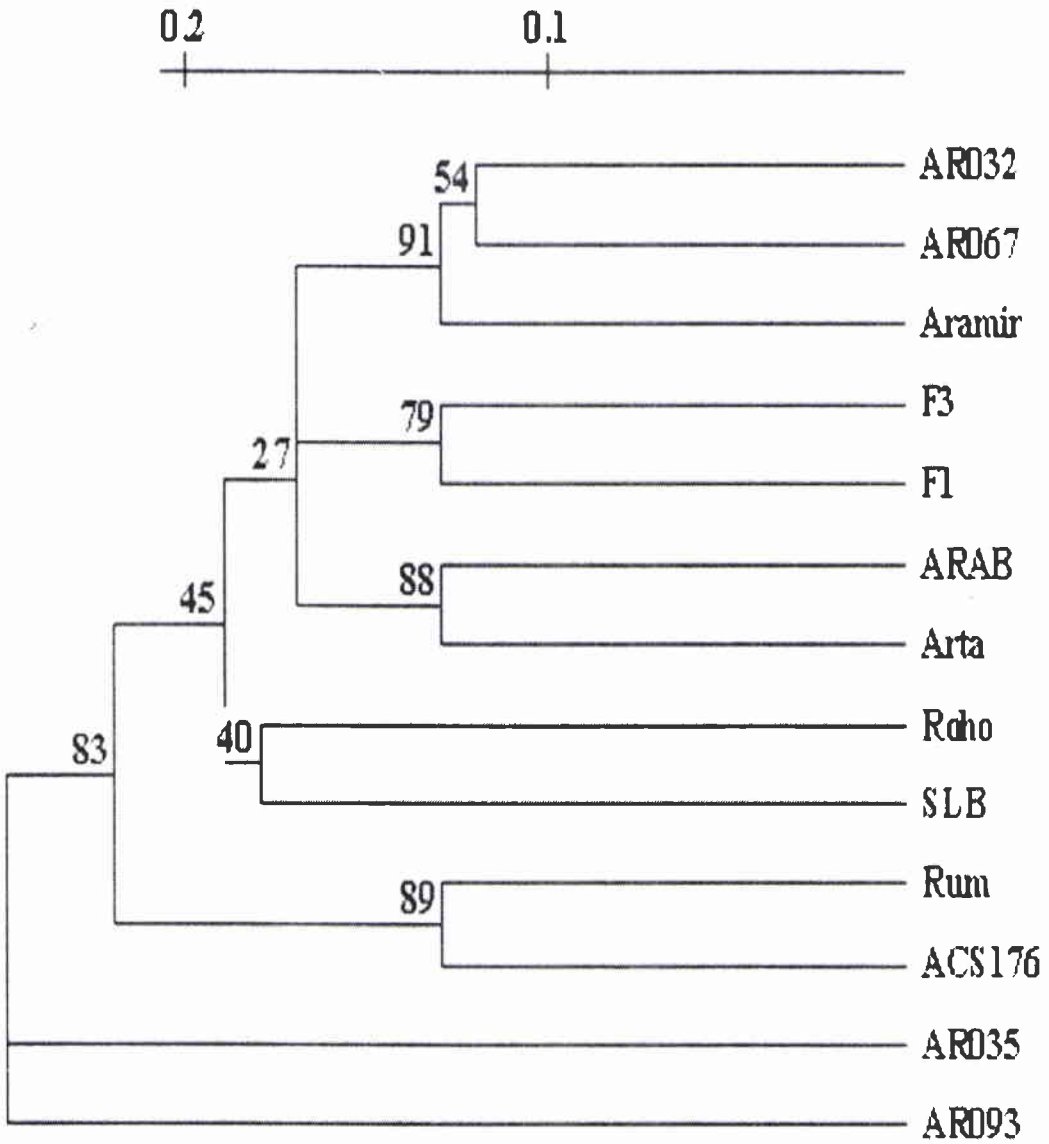


Fig. Dendrogram of 31 Aegilops accessions based on similarity for 52 RAPD markers produced by 5 single primers.

Clustering of 8 wheat genotypes based on SSRs markers obtained with 13 primer-paris. The numbers shown at different nodded represent the bootstrap values



Clustering of 13 barley genotypes based on AFLP markers obtained with eight selective primer-paris. The numbers shown at different nodded represent the bootstrap values



Considerations when choosing a technique

- **What information is required?**
- **At which level is discrimination sought?**
- **How many loci are required?**
- **Reproducibility of results**
- **Cost**
- **Speed**
- **Is the right expertise available?**
- **How much good quality DNA is available?**
- **Is the mode of marker inheritance important?**
- **Number of alleles required at individual loci**

Getting started – practical Considerations

- **Resources**
  - **well equipped laboratory**
  - **money to purchase equipment and consumables**
  - **laboratory skills**
- **Importance of PCR-based techniques**
- **RAPD and microsatellites**
- **AFLP**

استخدام المعلمات الوراثية في دراسة التنوع الوراثي وتشخيص الأمراض في النبات:

ازدادت أهمية دراسة واستخدام المعلمات الوراثية في برامج تربية وتحسين النبات من جهة ودراسات سلوك النبات بشكل عام من جهة أخرى. ويمكن تعريف المعلم الوراثي (Molecular Marker) على أنه موقع على الحامض النووي الرايبوزي المنزوع الأكسجين (DNA) ذا صفة مظهرية تستخدم كمرجع أو مؤشر للدلالة على هذه الصفة أو هو عبارة عن قطعة من (DNA) ذات صفة مورثة يمكن مراقبتها في الأجيال الموروثة. ويمتاز المعلم الوراثي بالسلوك المتعدد الأشكال واستخدامه للتميز بين حالة التشابه والاختلاف الزايجوتي. كما يمتاز بتكراره وتوزيعه المنتظم على طول الحامض النووي (DNA) وكذلك سهولة التعامل معه من حيث الإنتاج والتسويق والتعامل التكنولوجي الآلي. كما أن سهولة تبادل المعلومات بين مختبرات البحث وإمكانية الحصول على نفس النتائج بين المختبرات من أهم خصائص المعلم الوراثي الجيد، إلا أنه لا يمكن توفر هذه الصفات في معلم وراثي واحد.

تستخدم المعلمات الوراثية في مجال دراسة النبات من حيث تعليم بعض الصفات ذات الأهمية الاقتصادية واستخدامها في عملية الانتخاب والتحكم في عملية إكثار البذور والتصنيف النباتي وتشخيص الأمراض والآفات ودراسات البصمة الوراثية للأصناف.

ولدراسة التباين الوراثي أو تشخيص الأمراض أو استخدام المعلم الوراثي في أي مجال في علم الأحياء فإنه لابد من استخلاص المادة الوراثية التي ستستخدم في البحث سواء كان الحامض النووي منزوع الأكسجين الرايبوزي (DNA) أو غير المنزوع الأكسجين الرايبوزي (RNA). وهناك طرق عديدة لاستخلاص المادة الوراثية تختلف باختلاف الجنس والنوع والظروف المخبرية المحيطة. إلا أن من أكثر الطرق شيوعاً في عزل المادة الوراثية من الكائنات الحية ما تسمى CTAB حيث يستخدم بعض المواد الكيميائية في استخلاص المادة الوراثية الكلي من الخلايا. وبعد استخلاص المادة الوراثية لابد من التقدير الكمي والنوعي للمادة المعزولة باستخدام أجهزة وطرق متعددة. ومن الطرق شائعة الاستخدام في مجال البيولوجيا الجزئية استخدام جل الأجروس وجل البولي اكرالميد في فصل وعزل وتفريد الأحماض النووية.

يعتبر استخدام الاجاروس الطريقة المثلى لفصل وتحديد وتنقية الأحماض النووية (DNA and RNA) يتراوح حجم القطعة من مئات النيكليوتيدات إلى 20 كيلو منها ونستطيع تحديد موقع القطعة الجينية عن طريق استخدام الصبغة (Fluorescent Ethidium Bromide Dye) تحت الأشعة فوق البنفسجية.

إن مادة الأجروس عبارة عن مركب متعدد البلمرة يستخرج من الأعشاب البحرية، وعند إذابته باستخدام محاليل خاصة يصب في قوالب ويترك ليشكل شبكة وعبر تعريضها لتيار كهربائي يتم تفريد الحامض النووي بناءً على حجم القطع حيث ينتقل الحامض النووي باتجاه القطب الموجب. وهناك عدد من العوامل التي تتحكم برحيل الحامض النووي؛ منها حجم القطعة حيث يكون رحيل القطعة صغيرة الحجم أسرع من ذات الحجم الأكبر كما يؤثر شدة التيار الكهربائي على الرحيل حيث تتناسب السرعة طردياً مع شدة التيار إلا أن فعالية الفصل تتناسب عكسياً مع شدة التيار وتعتبر الشدة المثالية لترحيل الحامض النووي هي 5 فولتات لكل سم من المسافة بين الأقطاب. ويحدد تركيز الاجروس حجم القطعة الراحلة فهناك تناسب عكسي بين حجم القطع وتركيز الاجروس فللحصول على قطع ذات حجم أكبر فيجب تخفيف التركيز من الاجروس فمثلاً للحصول على قطع تتراوح بين 5–60 كيلوبيسبير فيستخدم 0.3% بينما إذا كان المطلوب قطعاً بحجم أقل من 1 كيلوبيسبير فيستخدم تركيز 2%.

كما يلعب شكل الحامض النووي وتعقيده واتجاه التيار ودرجة الحرارة ووجود الأصباغ دوراً مهماً في الرحيل إذ وجد أن سرعة الرحيل تقل بمقدار 15% عند صبغ الحامض النووي بمادة بروماید

الايثيديوم. كما يلعب التركيب الأيوني للمحلول المستخدم في الترحيل دوراً مهماً في تحديد سرعة الترحيل. فعند غياب الأيونات من المحلول فإن شدة التوصيل الكهربائي تكون متدنية وتكون سرعة الرحيل بطيئة أما في حالة زيادة تركيز المحلول إلى 10 أضعاف فإن درجة التوصيل تكون كبيرة وتتولد طاقة تنتج درجة حرارة عالية تؤدي إلى إذابة الجل وبالتالي فقدان الحامض النووي.

وتستخدم مادة الاكرالمايد بدل الاجروس في ترحيل الحامض النووي بشكل منفرد الجديلة حيث تستخدم هذه المادة في التفريد الكهربائي عند استخدام بعض المعلمات الوراثية حيث يمتاز بأفضلية عن الاجروس في بعض النواحي، فيمتاز بقوة فصل عالية حيث يستطيع فصل قطع الحامض النووي المتباينة الأحجام لغاية 0.2% (نيوكلوتيده واحدة لكل 500 نيوكلوتيدة). كما يستطيع استيعاب كمية من الحامض النووي تصل لغاية 10 ميكرو جرامات في الحيز المخصص (1س×1ملم) مع عدم التأثير على الوضوح.

هناك تقنية أخرى تستخدم في الأحماض النووية هي تقنية التبقع أو التنشيف (Nucleic acid blotting) حيث تستخدم هذه التقنية في نقل الحامض النووي أو البروتين على سطح جاف من الأغشية (نايلون أو نيتروسيللوز) بعد ذلك يتم استخدامها في التهجين مع مجس وراثي. وهناك عدد من التقانات التي تستخدم في هذا المجال مثل:

Southern Blotting method is applied to DNA, Northern Blotting is applied to RNA, Western Blotting is termed analysis refers to the transfer of proteins to membranes and their detection with antibody probes.

وهناك تقنية (Dot blot technique) وفيها يتم إضافة الحامض النووي مباشرة على غشاء النايلون أو السيليلوز وبعدها يتم التهجين مع المجس الوراثي. ولهذه التقنية استخدامات في تحديد السلسلة الوراثية وتقدير السلسلة كمياً من أي نوع في عينة شديدة التعقيد.

هناك العديد من المعلمات الوراثية التي تستخدم في مجال الدراسات منها ما يعتمد على المظهر الخارجي ومنها ما يعتمد على البروتين المخزون إلا أن هذه المعلمات سرعان ما تتأثر بالبيئة ولا يمكن الاعتماد عليها كثيراً كمعلمات وراثية إلا أن هذه المعلمات الوراثية الجزيئية لا تتأثر بالبيئة لأنها تستخدم في دراسة التباين الوراثي للصفة عن طريق النظر مباشرة على المادة الوراثية المكونة للصفة. إن أهم المعلمات الوراثية الجزيئية هي Random Amplified (RAPDs), Restriction Fragment Length Polymorphisms (RELPs), Polymorphic DNA Amplified Fragment Length Polymorphic DNA (AFLP), and Simple Sequance Repeats Microsatellites (SSRS) ولكل معلم وراثي حسناته وسيئاته. فعلى سبيل المثال يمتاز RAPDs أنه يعتبر معلماً وراثياً سائداً لا يستطيع التميز بين الزايجوت المتشابهة والمختلفة وصعوبة تبادل المعلومات بين المختبرات وتكرار النتائج. وتمتاز المعلمات الوراثية Microsatellites بتوزيعها على

طول الحامض النووي DNA وتخصصها للجنس والنوع وسهولة تبادل معلوماتها بين المختبرات وسهولة الحصول على نفس النتائج في حال تكرار التفاعل إلا أن صعوبة وارتفاع تكاليف إنتاجها واحتياجها للوقت الكبير يجعل العمل بها صعب. ومن المعلمات التي أصبحت شائعة الاستخدام تقنية الـAFLP والتي تمتاز بعدم الحاجة إلى المعرفة المسبقة عن تسلسل المادة الوراثية وإمكانية تبادل المعلومات والحصول على نتائج متشابهة في حال التكرار ويغطي مساحة كبيرة من الـ DNA إلا أنه يعتبر مكلفاً من حيث المال والجهد ويحتاج إلى عدد من الخطوات من الصعوبة التحكم فيها. وهناك العديد من المعلمات الوراثية الأخرى لكل منها الحسنات والمعوقات لاستخدامها.

كما وتستخدم هذه التقانات في تشخيص الآفات المختلفة (الأمراض والحشرات) و تطوير معلمات وراثية تستخدم في عمليات الانتخاب الوراثي.

تقسم المعلمات الوراثية إلى ثلاث مجموعات رئيسية: المجموعة الأولى لا تعتمد على جهاز مضاعفة المعلمات الوراثية (Non-PCR-based approaches) مثل RFLP. والمجموعة الثانية التي تعتمد على جهاز مضاعفة المادة الوراثية (techniques PCR-based) مثل (RADP) Microsatellites، والـAFLP. والمجموعة الثالثة التي تعتمد على معرفة السلسلة الوراثية (Targeted PCR and sequencing) مثل Sequence Tagged Sites (STS) و Sequence Characterized Amplified Region (SCARs)، Sequence Tagged Microsatellites (STMs)، Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS).

إن الاستخدامات الكبيرة لجهاز مضاعفة المادة الوراثية يمكن ذكر بعض منها مثل تشخيص الأمراض الوراثية والاستخدامات في الطب الشرعي ودراسة التطور البيولوجي واستخدام المعلمات الوراثية في استحداث سلسلة معينة واستخدامها كمجس وراثي واستحداث مجسات للكشف على جينات كما ويستخدم في إنشاء المكتبات الجينية وتضخيم المادة الوراثية لدراسة التسلسل الوراثي. كما يستخدم في التعرف على الطفرات الوراثية والكشف على الجينات المنقولة إلى الكائنات المختلفة (الكائنات المحورة وراثياً).

إن الفوائد المتحصل عليها من هذا النظام يعود إلى إمكانية إنتاج كم هائل من الحامض النووي (المادة الوراثية) يتم عزلها من خلية بسرعة وببساطة وبحساسية كبيرة. إلا أن الحساسية الكبيرة قد تؤدي إلى مضاعفة مادة وراثية غير المطلوبة نتيجة تلوث مخبري أو بيئي، كما ويجب معرفة على الأقل أطراف المادة المراد إكثارها باستخدام هذا النظام.

وتستخدم المعلمات الوراثية كأداة انتخاب في برامج التربية النباتية والحيوانية حيث يعتمد في هذه الطريقة على الارتباط بين المادة الوراثية والصفة المظهرية مثل مقاومة الأمراض أو الحشرات

والنيماتودا وكذلك التحمل للظروف البيئية القاسية كالجفاف و الملوحة والتباين بين درجات الحرارة بالإضافة إلى الصفات النوعية والكمية الأخرى، وفيها يقوم المربي بالانتخاب بناءً على المعلم الوراثي وليس على الصفة المظهرية.

إن اهتمام مربي النبات والحيوان بالمعلمات الوراثية يتركز في التربة من أجل مقاومة الأمراض والحشرات والآفات الأخرى كما ويستخدم هذه التقنية في تركيز بعض الجينات وتجميعها في نبات ليمتلك المقدرة على مقاومة عدد كبير من الآفات، وكذلك تحسين نوعية المنتجات من حيث التركيب الفيزيائي والكيميائي للمنتج. وتستخدم في دراسة الهجن المتفوقة وإنتاج السلالات العقيمة وتحسين الاستجابة للظروف البيئية من جفاف وحرارة وملوحة.

وتعتبر تقنية الـ RADP التي ابتكرها العالم وليم (1990) من أوائل التقانات التي تعتمد على جهاز مضاعفة المادة الوراثية وتتلخص خطوات هذه التقنية بعد عزل الحامض النووي DNA بإجراء تفاعل السلسلة بوجود إنزيم الـ *Taq Polymerase* والبادئات الوراثية PRIMERS النيوكليتيدات والمحلول الخاص بضبط الحموضة في التفاعل حيث توضع هذه المواد مع الحامض النووي المعزول بكمية قليلة في جهاز PCR ويجري التفاعل بعدد من الخطوات في كل دورة تتكون من تعريض المحلول لدرجة حرارة مرتفعة (94 درجة مئوية لمدة دقيقة) يتم فيها فصل جدائل الحامض النووي وبعدها تتم عملية الارتباط بين البادئات الوراثية والجدائل ويجب تحديد موقعين للارتباط تكون المسافة بينهما لا تتجاوز 3000 نيوكلتيدة بحيث تلتصق البادئات بأماكن على الجدائل المفصولة تكون مكملة لها من حيث الترتيب النيكولوتيدي ويتم ذلك على درجة حرارة 34-36 درجة مئوية لمدة دقيقة. وبعد ذلك يقوم إنزيم *Taq Polymerase* بتصنيع الحامض النووي الجديد وتعتبر درجة الحرارة المثلى لنشاط الإنزيم 72-76 درجة مئوية لمدة 1-2 دقيقة. وتعاد هذه الخطوات لعدد قد يصل إلى 40 دورة يتم خلالها مضاعفة المادة الوراثية لعدد يصل إلى مليون قطعة خلال الـ20 دورة الأولى. وبعد الانتهاء من التفاعل (عادة 4-5 ساعات) يتم تفريد المادة الوراثية باستخدام جل الاجاروس لمعرفة التباين الوراثي للعينات.

وفي عام 1995 قام العالم فوس بابتكار طريقة أخرى لمضاعفة المادة الوراثية ودراسة وتشخيص والتعرف على الحامض النووي سماها AFLP وفيها يتم مضاعفة القطعة المحددة من المادة الوراثية باستخدام إنزيمات قاطعة RESTRECTION ENZYMES واستخدام ضابطات وراثية ADAPTOR معروفة التسلسل الوراثي كما ويستخدم البادئات الوراثية معروفة السلسلة في مضاعفة المادة الوراثية باستخدام جهاز PCR كما في التقنية السابقة. وفي هذه الطريقة يتم إنتاج عدد هائل من القطع يتم تفريدها باستخدام جل البولي اكرالميد. ويتم توثيق النتائج إما باستخدام أصباغ الفضة إذا لم

يتم استخدام المواد المشعة في تعليم البادئات الوراثية أو باستخدام أفلام أشعة أكس إذا تم تعليم البادئات الوراثية بالمواد المشعة (P^{33} أو P^{32}).

إن البدء في العمل بهذا النوع من الأبحاث يتطلب الأخذ بعين الاعتبار الكثير من الأمور: فيجب الإجابة عن الكثير من التساؤلات أهمها ما هي المعلومة المطلوب معرفتها؟ مدى متانة ومستوى التمييز وكم عدد المواقع الوراثية على الكروموسوم ومدى تكرار النتائج والتكاليف والسرعة وتوفر الخبرات ومدى جودة المادة الوراثية المعزولة وطريق توريث المعلم الوراثي وعدد الأليلات المطلوبة للموقع الواحد. وعند البدء بالعمل يجب الأخذ بعين الاعتبار مدى توفر التجهيزات في المختبر والموازنة المالية المرصودة لتوفير المواد المستهلكة والمهارات المخبرية. ويجب البدء بالتقانات البسيطة قبل الخوض بالتقانات الأكثر تعقيداً.

Molecular Markers as Tool for Studying the Characters Differences among Organisms Based on Polymerase Chain Reaction (PCR) Machine

Molecular Markers as Tool for Studying the Characters Differences among Organisms Based on Polymerase Chain Reaction (PCR) Machine

By:
Dr. Ibrahim M. Rawashdeh
Head of Biotechnology Unit NCARE

Introduction:

DNA markers are important tools in such endeavor because they can be made to measure constitution, diversity and evolution of genetic material, serving as suitable indicators of wealth, health and future of life. DNA marker applications from the simple basis of the two major ways in which they are used: 1) as genetic markers for mapping and tagging traits on interest and 2) as indicators of genetic diversity.

Character differences revealed as DNA polymorphism can be used for investigating the organization on genomes and for construction of dense genetic maps. These in tern provide detailed blue-prints for strategies of gene isolation by map-based cloning, marker-assisted selection and introgression and the dissection of complex trait and population using new molecular marker technologies provides a powerful approach to understanding the organization and distribution of genetic resources in managed and natural populations.

In recent years, however, attention increasingly focused on the DNA molecule as a source of information polymorphism, because each individual DNA sequence is unique, this sequence information can be exploited for any study of genetic diversity and relatedness between organisms.

Molecular Techniques

1. Randomly amplified polymorphic DNA **(RAPD)**
1. Amplified fragment length polymorphism **(AFLP)**
1. Simple sequence repeats **(SSR)**
1. Inter simple sequence repeats **(ISSR)**

Importance of Molecular Techniques

1. Studying the genetic diversity of artificial and cultivated populations, It can help in how many different genetic classes are present and genetic similarities among them.
2. Ex situ and in situ conservation of plant species, through studying the genetic relatedness among species, accessions and breeding lines.
3. Genes transfer.
4. Detecting the criminals in the forensic labs.
5. Identification of human diseases.

Molecular Markers

1. Protein marker.
2. DNA sequencing.
3. Restriction fragment length polymorphisms.
4. DNA fingerprinting

Properties of Molecular Markers

1. **Highly polymorphic behavior**.
2. **Co-dominant in heritance** (allow us to discriminate home-and heterozygotic states in diploid organisms).
3. Frequent occurrence in the genome.
4. Easy access (e. g. By purchasing or fast procedures).
5. Easy and fast assay.
6. High reproducibility.
7. Easy exchange of data between labs

DNA:

What is the DNA?

DNA (deoxyribonucleic acid) is a store house, or cellular library that contains the information required to build a cell or organism. DNA consists of two associated polynucleotide strands that wind together through space in a helical fashion which is often described as a double helix.

Nucleotide has 3 parts:

- Phosphate group.
- Pentose (Five-carbon sugar molecule).
- Organic base.

DNA and RNA each consist of four different nucleotides. DNA has A,T,G,C.
-A,G Purines (two rings)
-T,C Pyrimidines (one ring)

What is DNA Fingerprinting?:

DNA fingerprinting is a technique which has only recently been applied to analyzing differences between populations.

- **DNA Fingerprinting is Mainly Obtained by Either of Two Strategies:**

1. Hybridization-based fingerprinting. Involves cutting of genomic DNA with a restriction enzyme.
2. PCR-based fingerprinting (Polymerase Chain Reaction). Involves the in *vitro* amplification of particular DNA sequences with help of primers and a thermo stable DNA polymerase.

Detection of DNA Polymorphism by PCR-Based Fingerprinting

Principle of the PCR:

The PCR is a versatile technique that was invented in the mid-1980s. Since the introduction of thermo stable DNA polymerases in 1988. PCR was used and still in research and clinical laboratories. The method is based on the enzymatic in vitro amplification of DNA. Starting from a very low amount of template DNA (mostly in the nanogram) millions of copies of one or more particular target DNA fragments are produced which can be electrophoresed and visualized by staining.

Characters of PCR:

1. High speed.
2. Selectivity.
3. Sensitivity.

PCR Reaction Mix:

A reaction mix consists of:

1. A buffer, usually containing Tris-HCl, KCl and MgCl2.
2. A thermo stable DNA polymerase which adds nucleotides to the 3' of a primers annealed to single-stranded DNA, Taq polymerase.
3. Four deoxynucleotides (dNTPs, dATP, dCTP, dGTP, dTTP), DNTPS.
4. Primer.
5. Template DNA.
6. Distilled water.

The Principle of the Cycling Reaction:

In atypical PCR, three temperature-controlled steps which are repeated in a series of 25 to 50 cycles. These are :

- Denaturation (94°C)
- Annealing (65-33°C)
- Extension (72°C)

DNA Isolation Protocols:

1. CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide) procedure.
2. DNA mini preparation.
3. Potassium Acetate procedure.
4. DNA preparation via nuclei.
5. Wizard genomic DNA isolation

DNA Isolation Procedure:

1. Plant tissue (50 mg) should be ground with liquid nitrogen in 2ml tube.
2. Warm (65°C) CTAB buffer should be added, and incubate in water bath for 30 minute.
3. Chlorophorm/ isomaly alcohol should be added then centrifuge for 15 min.
4. Isoprobanol placed in anew tube then the upper phase then add to tube and shaking directly at this moment you see the white thread or clotting of nucleic acids, pour the liquid and dried.
5. Cold ethanol adds to wash the pellet, then pour and dried.
6. TE buffer adds and left at 65 °C for half hour.
7. RNase adds to digest the RNA, at 38 °C for one hour

Detecting DNA:

1. Agarose Gel Electrophoresis

Agarose is a linear polymer which extracted from seaweed.

- Characters of Agarose

1. Lower resolving power.
2. Greater range of separation.
3. Separated DNA with molecular weight 200bp-50 kb.
4. It runs in a horizontal configuration in an electric field of constant strength and direction.

Amount of agarose in gel (% [w/v]), there are two a mounts:

1. Agarose (0.7%) which separated a linear DNA molecules with molecular weight 800bp-10kb. This amount used to detect the DNA.
2. Agarose (1.4%) which used to separated PCR product (amplified fragment DNA = bands) with molecular weights 200 bp-3kb.

2. Poly acrylamide:

Polyacrylamide gel is composed of chains of acrylamide monomers cross-linked with methylenebisacrylamide units. The pore size of the gel is dependent on the total concentration of the monomers and the cross-links

Polyacrylamide gel electrophoresis is used for the separation of single-stranded DNA molecule that differ in length by just one nucleotide. Agarose gels cannot be used for this purpose. This is because polyacrylamide gels have smaller sizes than agarose gels and allow precise separation of DNA molecules from 10-1500bp.

Polyacrylamide gel electrophoresis is a wonderful technique for the fine separation of DNA molecules that differ from each other even by 1-3 nucleotides. PAGE is used in DNA sequencing, and for the identification of amplified products of DNA by polymerase chain reaction (PCR).

كلمـــة الافتتاح

كلمة معالي الدكتور سالم اللوزي

مدير عام المنظمة العربية للتنمية الزراعية

كلمة المنظمة العربية للتنمية الزراعية

في حفل افتتاح

الدورة التدريبية القومية
في مجال
تقانات إنتاج أشتال العنب الخالية من الأمراض الفيروسية

عمان/ المملكة الأردنية الهاشمية 16 – 20 مارس (آذار) 2008

سعادة ....

السادة/ المحاضرون ....

السادة/ المشاركون ....

الحضور الكريم ....

السلام عليكم ورحمة الله وبركاته ،،،

نيابة عن معالي الدكتور سالم اللوزي – المدير العام للمنظمة العربية للتنمية الزراعية، يسعدني أن أحي بإسمكم جميعاً المملكة الأردنية الهاشمية ملكاً وحكومةً وشعباً لدعمها المتواصل لمسيرة العمل العربي المشترك.

وبإسمكم جميعاً نتقدم بخالص الشكر والتقدير لوزارة الزراعة بالمملكة الأردنية الهاشمية ممثلة في معالي الوزير الأستاذ/ مزاحم المحيسن، على رعايته الكريمة لأعمال هذه الدورة القومية حول " **تقانات إنتاج أشتال العنب الخالية من الأمراض الفيروسية**" التي تعقدها المنظمة العربية للتنمية الزراعية، بالتعاون مع الوزارة بمقر المركز الوطني للبحث والإرشاد الزراعي، والتي يحضرها ممثلون من وزارات الزراعة في 18 دولة عربية.

السيدات والسادة ،،،

إن اهتمام المنظمة بموضوع هذه الدورة ينضوي في إطار الاهتمام الكبير الذي توليه المنظمة لتنمية وحماية محاصيل وسلع الصادرات العربية، فإستراتيجية التنمية الزراعية العربية

للعقدين القادمين (2005-2025) التي أعدتها المنظمة بتكليف من القمة العربية في الجزائر 2005 وأقرتها قمة الرياض 2007، قد أفردت ضمن برامجها الرئيسة العديد من البرامج الفرعية والمكونات التنموية، التي تستهدف تنمية الصادرات الزراعية ورفع تنافسيتها وحماية أصولها الوراثية، ويأتي تنفيذ هذه الدورة في ذات السياق مكملاً لمكونات مشروع مستمر، نفذت المنظمة في إطاره برنامجاً تدريبياً خلال العام 2007 يختص بتقانات إنتاج أشتال الحمضيات الخالية من الأمراض الفيروسية.

ونظراً للأهمية التي تحظى بها تجارة العنب على المستوى العالمي ــ **لأهميته الغذائية والطبية** ــ وإتساع زراعته في معظم دول المنطقة، وللأهمية النسبية التي تتمتع بها المنطقة العربية في إنتاج أصناف عالية الجودة من العنب، برزت أهمية العناية به كمحصول صادر تغذوي تحتاجه العديد من الأسواق الدولية.

ومن أجل تحسين نوعية هذا المحصول وزيادة إنتاجه، فإنه لابد من الاهتمام بتطوير كل المعاملات الفلاحية المرتبطة بزراعته ورعايته وما يلزم من معاملات ما قبل وبعد الحصاد، لرفع تنافسيته في الأسواق الخارجية.

فكما تعلمون أيها السادة، فإن العنب يلعب دوراً اقتصادياً مهماً على المستوى العالمي، حيث يحتل مرتبة متقدمة من حيث الإنتاج مقارنةً بأصناف الفاكهة الأخرى وتعتبر إيطاليا، فرنسا، أسبانيا وأمريكا من أهم الدول المنتجة للعنب على مستوى العالم، أما على مستوى الوطن العربي فتحتل مصر المرتبة الأولى، تليها العراق فالمغرب والجزائر ثم سوريا فلبنان.

ونظراً لأهمية الموضوع فقد أدرجت المنظمة في خطة عملها السنوية برنامجاً رئيساً للتطوير التقني الزراعي، ومن بين مكونات هذا البرنامج، عقد هذه الدورة التدريبية حول تقانات إنتاج أشتال العنب الخالية من الأمراض الفيروسية.

ولتحقيق الأهداف المرسومة لهذه الدورة، التي تنفذ على مستوى المدربين (T.O.T)، رأت المنظمة أن يشتمل برنامجها الفني على الموضوعات الرئيسة التالية :

- جهود المنظمة العربية للتنمية الزراعية ورؤيتها لتبني التقانات الحيوية في تطوير القطاع الزراعي.
- تعريف عام بالفيروسات والفيرويدات وآثارها الاقتصادية وأهم الأمراض التي تسببها للعنب.
- أهم الآفات الحشرية التي تصيب العنب، بخاصة الناقلة للأمراض الفيروسية.

- النيماتودا وعلاقتها بنقل الأمراض الفيروسية.
- الطرق الوراثية المستخدمة في استنباط نباتات مقاومة للأمراض الفيروسية.
- الأصول المستخدمة في إنتاج أشتال العنب.
- طرق التطعيم المستخدمة في إنتاج أشتال العنب.
- مزارع أمهات العنب.
- الطرق الحديثة المستخدمة في تشخيص الأمراض الفيروسية وشبه الفيروسية.
- استخدام زراعة الأنسجة في إنتاج أشتال عنب خالية من الفيروسات.

ويشتمل البرنامج أيضاً على عددٍ من الزيارات الميدانية وتطبيقات عملية في المختبرات لتحقيق أقصى فائدة مرجوة من هذا التدريب.

السيدات والسادة ،،،

والمنظمة إذ تقدم هذه الحزمة التدريبية المتخصصة، لفائدتكم كمختصين وعاملين في هذا المجال بدولكم، فإنها تأمل أن تكون قد وفقت في تزويدكم بالقدر المطلوب من المعارف النظرية والجوانب التطبيقية المرتبطة بتحسين إنتاج ونوعية محصول العنب، بالاستفادة من التجربة الدولية في هذا المجال والخبرة المتميزة والمتراكمة للخبراء العرب الذين ينفذون هذا البرنامج سواء من خبراء المركز الوطني للبحث والإرشاد الزراعي أو الخبراء المساندين من المنظمة ودول عربية أخرى.

في الختام نكرر الشكر والتقدير لوزارة الزراعة بالمملكة الأردنية الهاشمية على حسن رعايتها لأعمال هذا النشاط، ولإدارة وخبراء المركز الوطني للبحث والإرشاد الزراعي، لتعاونهم الصادق والمثمر في تنفيذ هذا النشاط. كما نجزل الشكر لممثلي الدول المستفيدين من هذا البرنامج التدريبي على حرصهم على حضور هذه الدورة، واستعدادهم لنقل ما ستضيفه الدورة من معارف لمن يعمل معهم في بلدانهم في هذا المجال.

وفقنا الله لما فيه الخير لأمتنا العربية

والسلام عليكم ورحمة الله وبركاته

أسماء المشاركين

أسمـــاء المشــــاركين

	الاسم	الدولة/المملكة
1	السيد/ علي يوسف علي صقر	الأمارات
2	عيسى غانم	البحرين
3	محمد خليفة أقرن	تونس
4	م. نسيمة عيطر	الجزائر
5	السيد/ عبد الله كمهان السميعي	السعودية
6	رانيا محمد ميرغني عبد الماجد	السودان
7	عواطف أحمد عبد الله بابكر	السودان
8	المهندس خالد حوراني	سوريا
9	بدر الحامدي	فلسطين
10	فيصل المحاريق	فلسطين
11	إبراهيم عيسى الحداد	قطر
12	م. عماد النحال	لبنان
13	د. سحر عبد العزيز يوسف	مصر
14	زين الدين اليازمي	المغرب
15	محمد الأمين ولد محمد يل	موريتانيا
16	إبراهيم علي السميري	اليمن
17	سعيد بن سالم بن محمد الجامودي	سلطنة عمان
18	مراد جمعة الفرحاني	ليبيا
19	مروان أحمد كافي	العراق
20	نجم عبد علي ضايف	العراق
21	خالد الطلافيح	الأردن
22	وليد أبو عودة	الأردن
23	الدكتور/ زياد فضة	المنظمة العربية للتنمية الزراعية
24	الدكتور/ عبد الكريم العبيد	المنظمة العربية للتنمية الزراعية

رقم الإيداع: 2008/617