جامعة الدول العربية
المنظمة العربية للتنمية الزراعية
League of Arab States
Arab Organization For Agricultural Development

تقرير فنى
حول
واقع الإرشاد الزراعى وسبل تطويره
في دولة قطر

الخرطوم

ديسمبر (كانون أول) 1995

جمهورية السودان - الخرطوم - العمارات شارع 7 Sr. No. 7 - Al - Amarat - Sudan - Khartoum - الرمز البريدي : 11111 Postal Code: 11111 - ص.ب : 474 P. O. Box : 474
تلكس : 22554 AOAD SD Telex - برقياً : أوابد الخرطوم Cable: AOAD Khartoum - فاكس : 471402 (249-11-) Fax : (249-11-) 472183 - 472176 Telephones: (249-11-)

جامعة الدول العربية
المنظمة العربية للتنمية الزراعية
League of Arab States
Arab Organization For Agricultural Development

تقرير فنى
حول إعداد برنامج
لإنتاج شتلات الحمضيات خالية من الفيروسات
بدولة الأمارات العربية المتحدة

الخرطوم

أغسطس (آب) 1995

جمهورية السودان - الخرطوم - العمارات شارع 7 .No .St _Amarat _Al - Sudan - Khartoum ص.ب: 474 :P.O.Box - تلكس: 22554 AOAD SD :Telex
برقياً : أواد الخرطوم Cable: AOAD Khartoum - فاكس: 471402 (249-11-) :Fax تلفونات : 472183 - 472176 (249 -11-) :Telephones

تقديم

بناءاً على طلب وزارة الزراعة والثروة السمكية بدولة الأمارات العربية المتحدة قامت المنظمة العربية للتنمية الزراعية بإيفاد احد خبرائها المتخصصين المهندس فؤاد الوغليضى وذلك لتقديم المشورة الفنية فى مجال إنتاج الأشتال الخالية من الأمراض الفيروسية بواسطة التطعيم القمى فى دولة الأمارات العربية المتحدة .

ولقد إستغرقت المهمة التى قام بها الخبير مدة شهر تمكن اثنائها من زيارة بعض المحطات التجريبية التابعة لوزارة الزراعة والمختبر المركزى بالعين وعدد من المزارع الخاصة وذلك للإطلاع عن الحالة الصحية للحمضيات والتعرف على الإمكانيات المادية (التجهيزات والمختبرات) كما قام الخبير بتركيب الأجهزة الخاصة بكشف وتنقية الفيروسات وكذلك قام بإلقاء محاضرات حول اعراض وخطورة الأمراض الفيروسية والميكوبلاسمية والبكتيرية الأكثر خطورة على الحمضيات وتدريب بعض الكوادر الوطنية على بعض طرق الكشف السريع للفيروسات ، كما اجرى اتصالات مع مسؤولى الحجر الزراعى وقام بزيارات لبعض المحطات الحجرية وذلك لوضع استراتيجية لتحسين المراقبة الصحية للواردات ، ولقد قام بإعداد هذا التقرير العلمى الذى يحتوى على الأمراض الفيروسية والميكوبلاسمية التى تصيب الخضروات والحمضيات وطريقة التطعيم القمى وطريقة انتاج شتلات الحمضيات الخالية من الفيروسات وتضمن التقرير القيام ببعض المقترحات ، كما ابدى الخبير استعداده التام فى الإستمرار للمساهمة من أجل تنفيذ البرنامج لإنتاج الشتلات المرخصة ووضع استراتيجية للحجر الزراعى فى دولة الأمارات .

وفى الختام اتقدم بشكرى لمعالى وزير الزراعة والثروة السمكية بدولة الأمارات العربية المتحدة والمسئولين فى الوزارة على توفيرهم لكافة المعلومات التى ساعدت على إنجاز مهمة الخبير بكفاءة يستحق عليها الإشادة والثناء .

المدير العام

الدكتور يحيى بكور

المحتويات

الصفحة

تقديم ..... أ

مقدمة 1

زيارة المحطات والمزارع الخاصة 1

مختبر العين 5

تدريب الكوادر الزراعية 6

إلقاء المحاضرات 10

واقع الحجر الزراعى 10

الخلاصة 11

الإشكال والصور..... 12

المقدمة

بطلب من وزارة الزراعة والثروة السمكية بدولة الأمارات العربية المتحدة وبتمويل من المنظمة العربية للتنمية الزراعية قام أحد خبراء المنظمة بزيارة لدولة الأمارات العربية المتحدة وذلك من أجل إرساء قواعد برنامج لإنتاج شتلات الحمضيات الخالية من الفيروسات .

برنامج الزيارة التى استغرقت شهراً واحداً كان مقسماً كما يلى :

1- زيارة بعض المحطات التجريبية التابعة لوزارة الزراعة والثروة السمكية ، والمختبر المركزى بالعين وكذلك عدد من المزارع الخاصة .
2- تركيب الأجهزة الخاصة بكشف وتنقية الفيروسات بمختبر العين .
3- تدريب الكوادر الوطنية على بعض الطرق المعملية للكشف ولتنقية الفيروسات .
4- إلقاء محاضرات لفنيى وزارة الزراعة والثروة السمكية حول أعراض وخطورة الأمراض الفيروسية والميكوبلاسمية والبكتيرية الأكثر خطورة على الحمضيات ، وكذلك اعراض الفيروسات المهمة على الخضروات واللوزيات .
5- إتصالات مع مسؤولى الحجر الزراعى على الصعيدين المركزى والجهوى والقيام بزيارات لبعض المحطات الحجرية لجمع المعلومات وذلك من أجل وضع استراتيجية لتحسين المراقبة الصحية للواردات .

(1) زيارة المحطات والمزارع الخاصة

كان الهدف من هذه الزيارات أخذ فكرة عن الحالة الصحية للحمضيات والإطلاع على الإمكانيات المادية (التجهيزات فى المختبرات والمحطات وخصوصا فى محطة " دبا ") التى يمكن تسخيرها من أجل وضع برنامج متكامل لإنتاج شتلات حمضيات خالية من الفيروسات وذلك بإستعمال طريقتى الكشف البيولوجى على النباتات الكشافة والتطعيم القمى .

1-1 مدى خلو الحمضيات من الأمراض :

بالنسبة لحالة الحمضيات تشير التشخيصات الأولية بأن حالة أشجار الحمضيات وخاصة الليمون والسنترة وبعض اصناف البرتقال غير مرضية على وجه العموم حيث تنتشر الأمراض الخطيرة وخصوصا الفيروسية والميكوبلاسمية وبعض المسببات الأخرى التى تستوجب دراستها علميا .

وعلى الخصوص لاحظ الخبير اعراض مكنسة الساحرة ولفحة الحمضيات (بلايت الحمضيات) والجرب الصمغى . كما لاحظ بعض الأعراض التى تتلخص فى تساقط كل اوراق الشجرة والموت المفاجىء لها فى وقت وجيز ، تاركة الثمار معلقة مما يؤدى الى جفافها فى النهاية .

إن ما يزيد الوضع تعقيدا هو أن الحقول المصابة تعتبر من المصادر الرئيسية للشتلات التى يتم إكثارها وتوزيعها على المزارعين

أ- مكنسة الساحرة Witches Broom:

المسبب لهذا المرض هو من فصيلة " الفيتوبلاسما " ، اكتشف اخيراً بشبه الجزيرة العربية

وخاصة بسلطنة عمان ودولة الأمارات العربية المتحدة .

إضافة الى نقل المرض عن طريق التطعيم ، هناك حشرة الزيز من نوع " هيشومونوس فيزيتوس " التى تساهم فى إنتشار المرض .

أما أعراض هذا المرض فيمكن تلخيصها كما يلي:

- تقلص المسافة بين البراعم مما يعطى للشجرة نمواً مكثفاً .
- تقزم الأوراق بحيث تكون اصغر بكثير من الحجم العادى وفى بعض الحالات تأخذ شكلا خيطياً .
- جفاف الفروع المصابة .

ب – لفحة الحمضيات (Citrus blight) :

لقد اكتشف هذا المرض لأول مرة بالولايات المتحدة الأمريكية سنة 1975 . وإلى الآن لم يتم الحسم فى المسبب ولا فى طريقة انتقاله . ويمكن حصر الأعراض الخاصة لهذا الداء كما يلى :

- تجفف الأغصان فى جهة معينة من الشجرة .
- تلف الأوعية الخشبية للجذع .
- موت الشجرة عند تقدم الإصابة .

ج – الجرب الصمغى (Psorosis):

ينتشر هذا المرض الفيروسى فى معظم مناطق العالم المنتجة للحمضيات . يعرف له شكلان أ و ب ، ويعتبر النموذج أ الأكثر انتشارا والمعروف بالجرب الصمغى ذو القشور . أما الأعراض المميزة لهذا الداء فهى كالتالى :

- تشقق القشرة .
- تصمغ بنى إلى أحمر فى الخشب .
- موت الشجرة عند تقدم الإصابة .

إن وجود اعراض مميزة لبعض الأمراض لا يعنى أن امراضاً اخرى منعدمة وخصوصا أنه يتم استيراد كميات لا بأس بها من الشتلات من بلدان مختلفة تنتشر فيها امراض اكثر خطورة " كالتريستيزا " (Tristeza) و (الكرينينك) (Greening) ولهذا فالتشخيص فى المختبر والبيوت المغطاة يبقى أمراً ضرورياً .

2-1 مدى خلو الخضروات من الأمراض :

من خلال زيارة الخبير لبعض المزارع الخاصة فى مناطق مختلفة اكتشف وجود أعراض كثيرة على محاصيل الخضر والجت . وبعد التحليلات المعملية بمختبر العين على عينات لوحظ إنتشار بعض الأمراض الفيروسية " كفيروس موزاييك الطماطم " (ToMV) على الطماطم والكوسة والشمام و " الألفا الفا موزاييك فيروس " (AMV) على الجت . كما تم ايضا الكشف على " فيروس موزاييك الخيار " (CMV) على أوراق فلفل مصطحبة لفلفل مستورد من إيران .

3-1 محطة دبا :

فيما يخص التجهيزات بمحطة " دبا " لإنتاج الشتلات الخالية من الفيروسات بطريقتى الكشف البيولوجى على النباتات الكشافة والتطعيم القمى فيمكن القول بتوفر البيوت المغطاة المبردة التى تفى بالقيام بهذا الغرض مع بعض الإضافات الضرورية والتى تتمثل بضبط الحرارة والإضاءة ونظام الرى . تتكون هذه البيوت من ثلاثة غرف بمساحة 200 م2 لكل واحدة ومستقلة عن بعضها مع مراقبة دورية لدرجة الحرارة وذلك لكل غرفة على حدة .

1-3-1 البيوت المغطاة المبردة :

الغرفة الأولى (أ) سوف تخصص للكشف البيولوجى للأمراض الفيروسية التى تتطلب حرارة منخفضة 18 م° كالتريستيزا والبسوروزيس .

أما الغرفة الثانية (ب) فسوف تخصص للكشف على الأمراض التى تسببها سواء الفيروسات " كالكاشيكسيا " (Cachexia) والبكتيريا " كالكريننك " والفرويد " كالإكزوكورتيس " (Exocortis) والميكربلاسما " كالاستبورن أو العنيد " (Stubborn)، والتى تتطلب حرارة مرتفعة 28-32 م° .

أما الغرفة الثالثة (ج) فسوف تخصص لإكثار النباتات الكشافة والتى تتطلب حرارة متوسطة 25 م° .

وأخيراً لقد تم اختيار البيت (ج) لحفظ الأشجار الأمهات بالنسبة للإصول والأصناف .

2-3-1 لائحة النباتات الكشافة حسب المرض :

التريستيزا : نبتة بذرية من صنف " اللايم المكسيكى " .
البسوروزيس : نبتة بذرية من صنف " مدام فينوس " .
الكاشيكسيا : صنف " الماندرين بيرسون سبيسيال " المطعم على " راف ليمون " .
الستيبورن : نبتة بذرية من صنف " اورلاندو طانجيلو " .

3-3-1 طريقة التطعيم :

أحسن طريقة هى طريقة التطعيم المزدوج للنبات الكشاف بطعمين من الشجرة المراد تشخيصها وذلك بمعدل ثلاثة نباتات كشافة لكل شجرة خاضعة للفحص كما يجب أيضا استعمال نباتات مرافقة كشواهد .

4-3-1 الأعراض على النباتات الكشافة ووقت ظهورها فى بعض الحالات :

فيما يلى لائحة الأمراض الأكثر خطورة على الحمضيات والتى يجب تفاديها فى برنامج إنتاج شتلات حمضيات خالية من الفيروسات :

التريستيزا :

- نقص فى نمو الشجرة
- إصفرار على شكل خيوض صغيرة على إمتداد العوق الورقية بعد شهرين .

- تجوفات على خشب الجدع .

البسوروزيس :

- ظهور بقع صفراء باهتة بين العروق الورقية بعد ثلاثة أشهر .

الكشيكسيا :

- افراز صمغ عند نقطة التطعيم وذلك فى حدود سنة .

الإكزوكورتيس :

- تلفف الأوراق الى الأسفل فى مدة تتراوح بين شهرين إلى ثلاثة اشهر .

الكرينينك :

- تبقع حاد على الأوراق بعد أربعة أشهر .
- إصفرار العروق الورقية .

1-3-5 طريقة إنتاج شتلات حمضيات خالية من الفيروسات (الشتلات المرخصة) :

- **الأشجار الأمهات :** نظراً لحالة أشجار الحمضيات وما يصيبها من أمراض ، فإنه ينصح بإقتناء شجيرات مرخصة من الخارج (5 أشجار لكل صنف) لتستعمل كأشجار أمهات ووضعها فى أصص كبيرة ممتلئة بتربة زراعية فى البيت " د " .

- **النباتات الكشافة :** إكثار هذه النباتات فى البيت " ج " وتوزيعها على البيوت " أ " و " ب " حسب الفيروس المعنى بالتشخيص .

- إخضاع عينات (من افضل الأوراق) للفحص بطريقة " اليزا " بالنسبة لفيروس " التريستيزا " .

- تطعيم جزء من القشرة أو البرعم من الشجرة الأم على النبات الكشاف الملائم لكل مرض وذلك بمعدل 4 نباتات كشافة لكل مرض ولكل شجرة أم .

- **معاينة الأغراض :** فى حالة عدم ظهور اعراض على النباتات الكشافة حسب الوصف المذكور سابقاً ، يسمح أخذ طعوم من الأشجار الأمهات من أجل إنشاء مشتل للإكثار ، وأخيرا توزيع شتلات نظيفة على المزارعين .

أما فى حالة ثبوت وجود فيروس فى الشجرة فيتحتم تنقيتها بطريقة التطعيم القمى فى المختبر وتكثيرها فى البيت المخصص لزراعة الأنسجة وأخيراً وضعها فى البيت " ج " المخصص للأشجار الأمهات . بعد هذه العملية يسمح أخذ طعوم من هذه الأشجار لأجل إكثارها فى المشتل وتوزيعها على المزارعين .

1-3-6 مختبر التطعيم القمى :

فيما يتعلق بإنشاء مختبر للتطعيم القمى من أجل تفادى الأمراض الفيروسية على الأصناف المصابة من جهة وتكثيرها من جهة اخرى ، فتبين وجود مبنى متكامل

يصلح لهذا الغرض مع بعض التحسينات التي اقترحت على المعنيين بالأمر وكذلك توفر بعض الأجهزة التى سيتم التنسيق مع مختبر العين لنقلها كصندوق التعقيم ، الرفوف لبيت زراعة الأنسجة والآصدة (أوتوكلاف) . بالإضافة الى بعض الأجهزة والأدوات والكيماويات الضرورية التى يتطلب توفرها وهى كالآتى :

أ – الأجهزة والأدوات :

- ميزان دقيق
- آلة تقطير الماء
- حوض لتسخين الآجار
- زجاجيات
- ملاقط
- اطباق بيترى
- مخلط ميغناطيسى
- فرن التعقيم
- مجهر
- آلة قياس الرقم الهيدروجينى (PH meter)
- مشارط
- مشعل بانسن

ب – الكيماويات :

- Murashige and Skoog Macro-and Microelements
- Bactoager
- Saccharose
- Inositol
- Nicotinic acid
- Pyridoxin
- Thiamine Hcl

(2) مختبر العين

بعد أن تم تركيب وتشغيل معظم الأجهزة الضرورية للفيروسات يمكن القول أن هذا المختبر تتوفر فيه معظم الاجهزة الحديثة والأدوات والكيماويات التى تساعد فى الكشف المصلى للفيروسات ولتنقيتها وتحضير المضادات الحيوية الخاصة بها وكذلك للقيام ببعض الدراسات الأخرى التى تخدم مجال الفيروسات فنذكر على سبيل المثال التجهيزات التالية : الحضانات ، المعقم ، البراد ، المجمد ، آلة قياس الرقم الهيدروجينى ، الة تقطير الماء ، الخلاط ، المصاصات الميكروئية ، الميزان المدقق ، آلة الطرد المركزى ذات السرعة المتوسطة ، آلة الطرد المركزى ذات السرعة الفائقة ، آلة الطرد المركزى ذات السرعة العالية جهاز إليزا الأوتوماتيكى .

(3) تدريب الكوادر الوطنية

تم تدريب الكوادر الوطنية (خمسة مهندسين من مختلف المناطق الزراعية) على بعض طرق الكشف السريع للفيروسات وإعطاء فكرة موجزة على طريقة تنقية الفيروسات وإنتاج المضادات الحيوية لها .

1-3 الطرق المصلية :

أ- طريقة إليزا "ELISA"

طبقت هذه الطريقة لأول مرة على فيروسات النبات سنة 1977 من طرف كلارك وأدامس ببريطانيا . تعتمد هذه الطريقة على تفاعل بين مضاد الجينات والمضاد الحيوى . تنجز فى أطباق بوليئيتيلين خاصة ذات 96 حفرا وتحتوى على المراحل الآتية :

- إدمصاص المضادات الحيوية ، المخففة فى محلول الإدمصاص ، فى جوانب الحفر (200 مكل فى كل حفر) .
- حضن الأطباق فى 37 م° لمدة 4 ساعات .
- غسل الأطباق بمحلول الغسيل ثلاثة مرات مع ترك المحلول داخل الحفر لمدة ثلاثة دقائق لكل مرة .
- إضافة العينات المخففة فى محلول الإستخلاص (200 مكل فى كل حفر).
- حضن الأطباق فى 4 م° لمدة 16 ساعة .
- غسل الأطباق كما سبق .
- إضافة المضادات الحيوية المقرونة بالإنزيم الفوسفاتاز القاعدى والمخففة فى المحلول المخصص لذلك (200 مكل فى كل حفر) .
- حضن الأطباق فى 37 م° لمدة 4 ساعات .
- غسل الأطباق كما سبق .
- إضافة مادة البرانيترو فينيل فوسفات (P-NITROPHENYL PHOSPHATE) المخففة فى المحلول المخصص لذلك بمعدل 1 ملغ لكل 1 ملل (200 مكل فى كل حفر) .
- القيام بقراءة النتائج بعد مدة تتراوح بين 15 دقيقة و 2 ساعة حسب العلامات التالية :

* إن ظهور اللون الأصفر فى الحفر يشير لوجود الفيروس فى العينة المفحوصة .
* إن شدة الإصفرار تدل على كثافة أشد للفيروس فى العينة والتى يمكن تقييمها بإستعمال جهاز قياس الطيف الضوئى تحت موجة ضوئية طولها 405 نانومتر .

ب- المحاليل الخاصة بطريقة إليزا لمقدار ليتر واحد :

- محلول الإدمصاص :pH9.6

1.59 g Na 2 CO3
2.93 g Na H CO3
0.2 g Na N 3

- محلول الأساس : pH 7.4

8.0 g Na CL
0.2 g KH2 PO4
2.9 g Na2 HPO4. 12 H2O
0.2 g KCL
0.2 g NaN3

- محلول الغسيل : pH 7.4
1 ليتر من محلول الأساس + 0.5 ملل من مادة توين 20 (Tween 20)

- محلول الإستخلاص pH 7.4
2٪ من مادة Polyvinylpyrolidon فى لتر من محلول الأساس .

- محلول المضادات الحيوية المقرونة بالإنزيم :
0.2٪ من مادة Ovalbumin فى لتر واحد من محلول الإستخلاص .

- محلول البرانيتر وفينيل فوسفات : pH 9.8

97 ml diethanolamin
800 ml dest. H20

قبل إضافة الماء المعقم للحصول على ليتر واحد من هذا المحلول يتحتم ضبط الرقم الهيدروجينى بمادة حامض الهيدروكلوريد المركز .

ج – الطريقة المناعية النفادية : (Immuno diffusion test)

تنجز هذه الطريقة فى أطباق بيترى على النحو الآتى :

- وضع طبقة رقيقة (2-3 مم) من الآجار بتركيز 2٪ فى طبق بيترى .
- قطع دائرة مركزية صغيرة فى وسط الآجار ودوائر اخرى مماثلة محاطة بالدائرة الأولى .
- وضع قطرة من المصل فى الدائرة الوسطى .
- وضع قطرة من عصير العينات فى كل دائرة جانبية على حدة .
- ترك الطابقة لبضع ساعات فى درجة الحرارة العادية .

د – قراءة النتيجة :

إن ظهور خط الترسيب بين الدائرة المركزية وإحدى الدوائر الجانبية دليل على وجود فيروس بالعينة المفحوصة مطابق للمصل المستعمل .

2-3 طريقة النقل الميكانيكى للفيروسات :

تعتبر هذه الطريقة من أهم الطرق للكشف عن عدد مهم من الفيروسات التي تنقل ميكانيكيا كمجموعة " الإيلارفيروس " و " النيبوفيروس " و " البوتيفيروس " .

أ- النباتات العشبية الكشافة الأكثر إستعمالا :

* الخيار : Cucumis sativus: تستعمل الأوراق الفلقية .
* التبغ : Nicotiana tabacum : تستعمل الأربعة اوراق الأولية .
* اللحلاح : Chenopodium sp : تستعمل الأربعة اوراق الأولية .
* الكوسة : Cucurbita sp : تستعمل الأوراق الفلقية .

ب- طريقة العدوى بالفيروس:

سحق العينة فى مهراز مع إضافة محلول فوسفات الصوديوم 0.05 مول و pH7.5 بمقدار 1 غرام من العينة لكل 5 ملل من المحلول .

* تحفير أوراق النباتات الكشافة بمسحوق " الكاربورانـدوم " (Carborundum) وذلك من أجل تسهيل عملية إدخال الفيروس فى النبات .
* غسل الأوراق بالماء العادى .
* وضع النباتات الكشافة فى بيت مغطى ومبرد (25 م° ، 16 ساعة إنارة ورطوبة نسبية 70٪) .

ج- قراة النتيجة :

هناك نوعان من الأعراض التى يجب معاينتها :

- الأعراض الموضعية : تنحصر هذه الأعراض فى ظهور بقع صفراء صغيرة وبقع نخرية على الأوراق الملوثة وذلك بعد إسبوع تقريبا من العدوى .
- الأعراض الجهازية : تأخذ هذه الأعراض صورا متعددة وتظهر على الأوراق الأولية بعد مضى اسبوعين تقريبا على العدوى و نذكر اهمها على سبيل المثال: التقزم الموزاييك ، التبقع والتجعد.

3.3 طريقة تنقية الفيروسات:

بعد تكاثر الفيروس على نبات كشاف عشبى ملائم ، يتم أخذ 100 غرام من الأوراق المصابة وسحقها فى 200 ملل من المحلول الآتى :

0.5M K2H2PO4 +0.02M Na2SO3+0.01M D.I.E.C.A + 0.005 MEDTA, pH 8.5.

- إضافة 10٪ من مادة الكلوروفورم على العصارة المستخلصة ورجها بالرجاج المغناطيسى .
- وضع الخليط فى الطاردة المركزية لمدة 20 دقيقة بمعدل 8000 دورة فى الدقيقة .
- إضافة 1٪ من مادة Triton X - 100 على الطبقة الطافية ورجها فى 4 م° ولمدة 20 دقيقة.
- وضع الخليط فى الطاردة المركزية ذات السرعة العالية لمدة 3 ساعات بمعدل 20.000 دورة فى الدقيقة .
- أخذ الطبقة المترسبة وخلطها فى 1 ملل من محلول فوسفات الكالسيوم ذو 0.20 مـــول و pH 7.4
- وضع الخليط فى الطاردة المركزية لمدة 5 دقائق بمعدل 5000 دورة فى الدقيقة .
- أخذ الطبقة الطافية وإضافة 4 غ من مادة كلوريد السيزيوم لكل ملل ووضع الخليط فى

الطاردة المركزية ذات السرعة الفائقة بإستعمال جهاز دوران زاوى لمدة 12 ساعة بمعدل 35000 فى الدقيقة .

- معاينة الشريط المكون من المستحلب العالق وسفطه بعناية .
- وضع الأشرطة المسفطة فى الطاردة المركزية ذات السرعة الفائقة لمدة 4 ساعات بمعدل 40000 دورة فى الدقيقة .
- أخذ الطبقة المترسبة وخلطها ب 0.5 ملل من محلول فوسفات الكالسيوم ذو 0,02 مول و pH 7.4 .
- معاينة نقاوة الفيروسات بالمجهر الإلكترونى : فى حالة وجود جزئيات إضافية على الفيروس ، يجب إعادة مرحلة الطرد المركزى بإستعمال مادة كلوريد السيزيوم أما فى حالة ثبوت نقاوة المحلول ننتقل الى المرحلة الموالية .
- تمنيع ارنب بحقن من الفيروس النقى والمستحلب بشكل كامل مع حجم مساوى من مادة "Freuds Complete Adjuvant" . يتم حقن الأرنب فى العضلة ثلاثة مرات بمعدل حقنة واحدة فى الإسبوع .
- بعد مرور ثلاثة إلى أربعة أسابيع على اخر حقنة يتم إنزاف الأرنب من وريد الأذن ويؤخذ الدم
- وضع الدم فى الطاردة المركزية ل 10 دقائق على 5000 دورة فى الدقيقة .
- أخذ الطبقة الطافية التى تكون المصل والذى يحتوى على المضادات الحيوية للفيروس المحقن للأرنب .

4-3 طريقة تقنية المضادات الحيوية (Immunoglobulin =IgG) :

- 1 ملل من المصل + 9 ملل من الماء المقطر
- إضافة 10 ملل "Sulfate of ammonia" المشبع .
- ترك الخليط لمدة ساعة فى الحرارة العادية .
- وضع الخليط فى الطاردة المركزية لمدة 20 دقيقة على 6000 دورة فى الدقيقة .
- أخذ الطبقة المترسبة وإضافة 1 ملل من محلول الأساس (راجع صفحة 16) نصف مركز .
- ميز غشائى (ديلزة) للخليط فى محلول الأساس نصف المركز يجرى على ثلاثة مراحل لمدة ساعة فى المرحلة الأولى والأخيرة ولمدة 12 ساعة فى المرحلة الثانية مع إستبدال المحلول فى نهاية كل مرحلة.
- تمرير الخليط المديلز عبر عمود من "DEAE Cellulose" وإضافة محلول الأساس نصف المركز .
- جلب ما يقارب تسعة أجزاء بمقدار 2 ملل لكل جزء .
- قياس الكثافة البصرية للأجزاء (Optic Density) تحت موجة ضوئية طولها 280 نانومتر مع مراعاة معدل 1,4 للكثافة البصرية وهو المقياس المناسب لإجراء إختبار إليزا .

5-3 قرن المضادات الحيوية بإنزيم الفوسفات القاعدى :

- بواسطة غشاء يتم ديلزة 70 مكل من الإنزيم فى محلول القرن (100 ملل فى محلول الأساس نصف المركز + 240 مكل ألدهيد كلوتار) وذلك لمدة ساعة .

- إضافة 1 ملل من المضادات الحيوية على الإنزيم والديلزة فى نفس المحلول لمدة ساعة .
- أخذ الغشاء وإخضاعه للديلزة لمدة 12 ساعة فى محلول الأساس المركز .
- إستبدال المحلول بمحلول جديد والديلزة لمدة ساعة .
- أخذ محتوى الغشاء وإضافة 5 مكل من مادة NaN3 وتقريبا 5 مكغ من مادة Bovine Serum Albumin. وتشكل هذه المادة النهائية المضادات الحيوية المقرونة بالإنزيم (IgG-E).

(4) إلقاء المحاضرات

زيادة على العروض المستمرة للمتدربين خلال فترة التدريب فى مختبر العين والتى ضمت على الخصوص طرقاً اخرى للكشف على الفيروسات كطريقة الفصل الكهربائى فى هلام البولى اكريل اميد (PAGE) والإيليكتروبلوط(Electroblot) ، فلقد تم إلقاء ثلاثة محاضرات فى المناطق الشمالية ، السوطى والغربية حيث تم تقديم عروض مستفيضة لكوادر هذه المناطق عن الأمراض الفيروسية والبكتيرية الميكوبلاسمية الأكثر خطورة على الحمضيات ، اللوزيات والخضروات كما تم ايضا شرح طرق الفحص المختلفة وشملت الفحص المصلى والبيولوجى وكيفية استخدام المجهر الإلكترونى وطريقة تقدير الوزن الجزئى ، كما تم عرض صور لمختلف الأعراض التى تسببها هذه الأمراض فى الحقول وكذلك على النباتات الكشافة داخل البيوت المغطاة المبردة .

(5) واقع الحجر الزراعى

إنطلاقا من مبدأ " الوقاية خير من العلاج " وإنطلاقا كذلك من ضرورة التنسيق المتكامل بين برنامج إنتاج شتلات خالية من الفيروسات ووحدات الحجر الزراعى المكلفة بالمراقبة الصحية للنباتات عند الإستيراد وإستجابة لرغبة المسؤولين فى وزارة الزراعة والثروة السمكية قام الخبير بزيارات تقنية لبعض المحطات الحجرية (ميناء الحميرة ومطار دبى) للإطلاع على نظام العمل فى المحاجر وإقتناء بعض المعطيات التي ستساهم فى وضع استراتيجية مستقبلية للحجر الزراعى .

وبعد نقاش عميق مع مسؤول الحجر الزراعى على صعيد الوزارة والتقنيين المكلفون بالمراقبة فى نقط الدخول يمكن تلخيص ذلك فى المحاور الأساسية التالية :

- من الناحية التشريعية هناك مرسوم يحدد قائمة الآفات الحجرية فى دولة الأمارات والتى يجب مراجعتها وتكميلها .
- طريقة المراقبة المتبعة حاليا والتى ترتكز اساسا على المراقبة بالعين المجردة غير كافية ولابد من تعزيزها بتحليلات فى المختبر لبعض الآفات التى يجب حصرها حسب نوعية النبات والبلد الأصل .
- إنطلاقا من كون المراقبة الصحية للنباتات تتم على عينات محدودة فلابد من بلورة استراتيجية

" الحجر بعد الدخول " وذلك بالتنسيق مع مختبر العين ومحطات التجارب الجهوية .

- يجب تركيز المراقبة فى المحاجر على النباتات والبذور الموجهة للإكثار .
- من أجل توجيه المراقب ورفع مستوى المراقبة سعيا وراء فعالية أكثـــر لابد من تحضير مرشد للمراقب يضم الآفات والنباتات العوائل التي يجب مراقبتها .

(6) الخلاصة

من أجل مواكبة مسيرة التطور العلمى والعملى فى ميدان إنتاج شتلات حمضيات خالية من الفيروسات ينبغى مراعاة ما يلى :

1- التركيز على الكوادر الوطنية الفنية من حيث الدورات التدريبية .

2- استكمال اقتناء بعض المعدات والأدوات والكيماويات لمختبر الفيروسات بالعين .

3- إدخال التصليحات على البيوت المغطاة المبردة بمحطة دبا وذلك من أجل ضبط الحرارة والإنارة .

4- إستكمال التصليحات والتجهيزات الضرورية لمختبر التطعيم القمى بدبا .

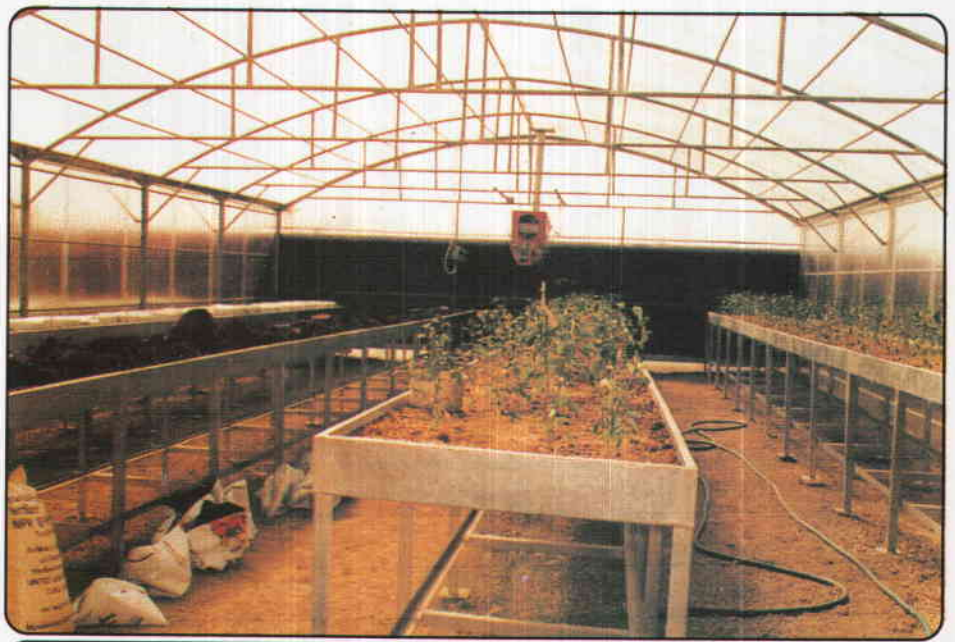
5- الى حين إنتاج الأمصال محليا لابد من توفير هذه المواد البيولوجية من أجل عمل مسح للفيروسات الأكثر خطورة بدولة الأمارات .

6- توفير أشجار امهات سليمة ونباتات كشافة لفيروسات الحمضيات .

7- التنسيق المتكامل بين برنامج إنتاج الشتلات الخالية من الفيروسات والحجر الزراعى .

صورة رقم (1)
جهاز إليزا الأوتوماتيكى بمختبر الفيروسات " بالعين " (الى اليمين)

صورة رقم (2) رفوف مختبر التطعيم القمى



صورة رقم (3) نظرة عامة لأحد البيوت المغطاة المبردة بمحطة "دبا"

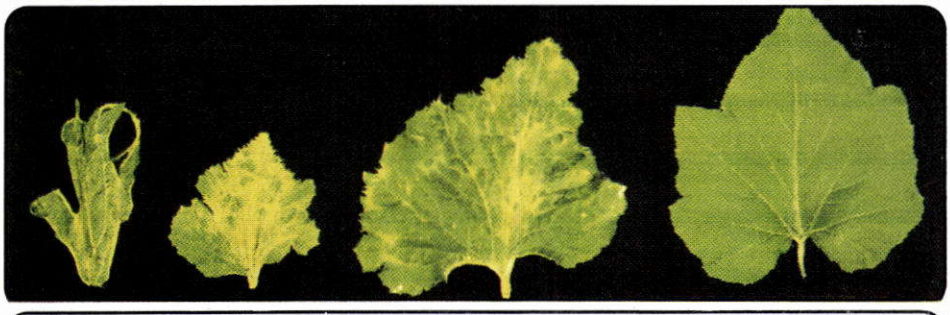
صورة رقم (4) مسجل الحرارة والرطوبة النسبية
الضرورى تواجده فى البيوت المغطاة المبردة

صورة رقم (5) أعراض لفحة الحمضيات على البرتقال البلدى « تجفف الأغصان »

صورة رقم (6) بقايا اوراق مصابة « بفيروس موازييك الخيار»
ادخلت مع الفلفل المستورد

صورة رقم (7) اعراض موضعية على النبات الكشاف " اللحلاح Chenopodium quinon"

* الى اليمين : ورقة سليمة * الى اليسار : بقع صفراء



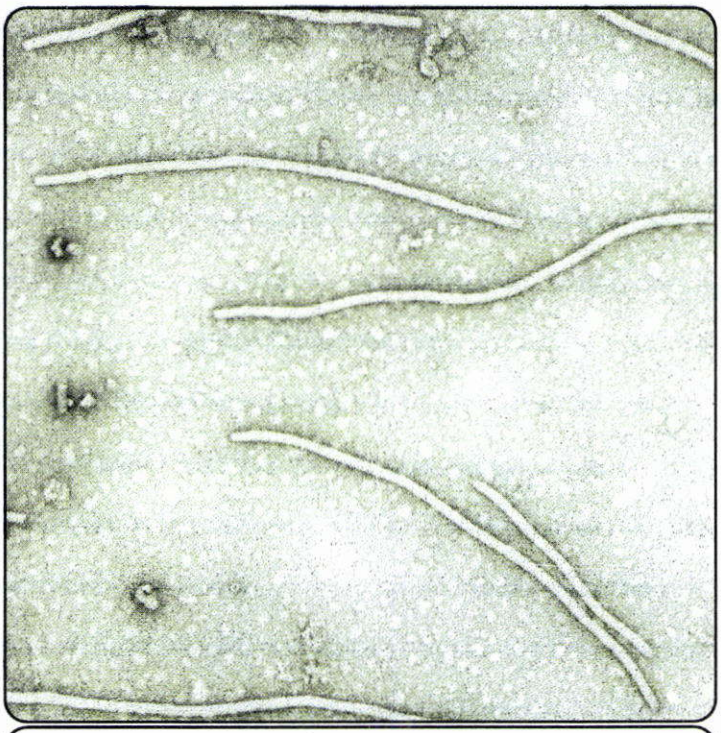
صورة رقم (8) اعراض جهازية على أوراق الكوسة

* الى اليمين : ورقة سليمة * الى اليسار : موزاييك وتجعد الأوراق

صورة رقم (9) اعراض فيروس " التريستيزا " على " اللايم المكسكى "

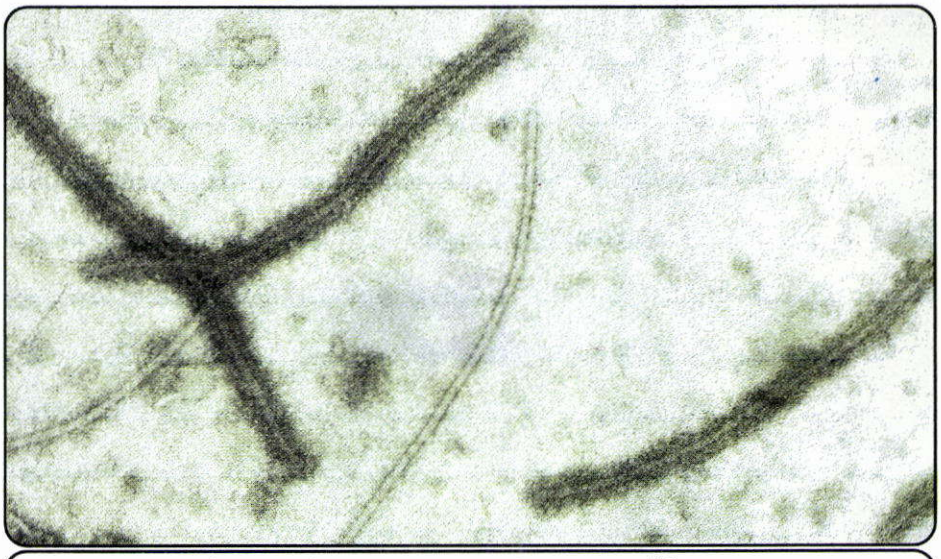
بإستعمال طريقة التطعيم المزدوج : * الى الأعلى : ورقة حمضيات سليمة

* الى الأسفل : خيوط صفراء على إمتداد العروق الورقية



صورة رقم (10)

فيروس من فصيلة البوتيفيروس "Potyvirus" بالمجهر الإليكترونى



صورة رقم (11) طريقة التشخيص بإستعمال الأمصال التفاضلية

للكشف على الفيروس المماثل تحت المجهر الإليكترونى