ندى كثيف. كذلك يفيد تشغيل نظام الرى بالرش – إن وجد – على فترات متقطعة لمدة ٢–٣ أيام بعد العدوى – فى توفير رطوبة حرة لإنبات الجراثيم (عن Dhingra & Sinclair ١٩٨٥).

وقد وجد Inglis وآخرون (١٩٨٨) أن استعمال اللقاح الجاف لحقن الفاصوليا بأى من الفطرين: *Colletotrichum lindemuthianum* المسبب للأنثراكنوز، أو *Phaeoisariopsis griseola* المسبب لتبقع الأوراق الزاوى كان مناسبًا لاختبارات التقييم تحت ظروف الحقل، بدلاً من الرش بجراثيم الفطر، الذى يتطلب تحضير المعلق الفطرى قبل وقت قصير من إجراء العدوى الصناعية، ويستلزم كميات كبيرة منه لعدوى المساحات الحقلية الكبيرة. وقد استعمل الباحثون إما أوراقًا جافة لنباتات سبق عدواها بالفطر فى الصوبة، وإما مزارع مجففة للفطر على بيئة خاصة هى: Perlite- cornmeal V-8 juice agar. عُفِّرَت النباتات فى الحقل بأى من مصدرى العدوى، وكان كلاهما بنفس كفاءة العدوى بمعلق جراثيم الفطر فيما يتعلق باختبارات المقاومة الحقلية.

وتتميز أمراض الجذور والحزم الوعائية بإمكان عدوى الحقل بالمسبب المرضى مرة واحدة، ثم تكرار زراعته بنفس العائل سنويًا لإجراء اختبارات التقييم فيه أثناء برنامج التربية. فمثلا .. قام Wallace & Wilkinson (١٩٦٥) بإجراء اختبارات التقييم للفطر *Fusarium solani* f. *phaseoli* – المسبب لمرض عفن الجذور الجاف فى الفاصوليا – فى حقل كان قد سبقت عدواه بالفطر فى عام ١٩١٨، وزرع بالفاصوليا سنويا منذ ذلك الحين.

هذا .. ويمكن الاستفادة من عديد من طرق الحقن (العدوى الصناعية) التى يأتى ذكرها فى الجزء التالى، فى نشر الإصابة المرضية تحت ظروف الحقل لأغراض تقييم مقاومة الأمراض.

طرق الحقن (العدوى الصناعية) لتقييم المقاومة فى البيوت المحمية (الصوبات)

تختلف طرق العدوى الصناعية التى تتبع لأغراض التقييم لمقاومة الأمراض تحت ظروف البيوت المحمية – حسب المرض – كما يلى:

عدوى النموات الورقية

تحقن النموات الخضرية بمسببات الأمراض بعديد من الطرق؛ منها: الرش، والتجريح، والتعفير، والحك، واستخدام فرشاة ملوثة بالمسبب المرضى مع استعمال معلق جراثيم فطرية، أو جراثيم جافة، أو معلق بكتيرى، أو مستخلصات لنباتات مصابة بالفيرس فى حالة اختبارات المقاومة للفيروسات.

لا تتطلب معظم مسببات الأمراض التى تصيب الأوراق جروحًا لكى تُحدث الإصابة؛ إذا إن معظمها يخترق الأوراق عن طريق الثغور، أو مباشرة من خلال خلايا البشرة، أو عند أماكن التصاق خلايا البشرة المتجاورة. وعندما تحدث الإصابة من خلال الثغور تجب إضافة اللقاح إلى السطح الورقى الذى توجد به أقصى كثافة للثغور، مع تحضين النباتات فى ظروف تسمح ببقاء الثغور مفتوحة، وبإنبات الجراثيم أو الخلايا البكتيرية.

ونذكر – فيما يلى – طرق الحقن المتبعة فى هذا الشأن سواء أكانت طرقًا عامة، أم خاصة بمسببات مرضية معينة.

عدوى الأوراق الفلقية

تتم أحيانا عدوى الأوراق الفلقية بالمسببات المرضية بهدف الانتهاء من اختبار التقييم فى أيام قليلة بعد الإنبات مباشرة، وبذا .. يمكن تقييم أعداد كبيرة من النباتات فى وقت قصير، وفى مساحة صغيرة. وتجب فى هذه الحالة مقارنة النتائج المتحصل عليها من اختبار عدوى الأوراق الفلقية بنتائج اختبار آخر تحقن فيه النباتات بطريقة تماثل الإصابة بالطريق الطبيعى، حتى لا تكون نتائج الاختبار مضللة.

وأهم ما يعيب العدوى بهذه الطريقة أن الأوراق الفلقية ربما لا تحتوى على المنافذ الطبيعية للإصابة بالمسبب المرضى، ويترتب على ذلك تصنيف بعض النباتات أو الأصناف على أنها مقاومة، بينما هى قابلة للإصابة، أو العكس.

وقد اتبعت هذه الطريقة فى تقييم السبانخ لمقاومة فيرس الخيار رقم ١ Cucumber Virus 1 (Webb ١٩٥٥)؛ والطماطم لمقاومة البكتيريا *Corynebacterium michiganense*

المسببة لمرض التقرح البكتيرى (Hassan وآخرون ١٩٦٨)، والبرسيم الحجازى لمقاومة البكتيريا *C. insidiosum* المسببة للذبول (Kreitlow ١٩٦٣).

عدوى الأوراق بالفطريات

بالنسبة للأمراض الفطرية التى تصيب الأجزاء الهوائية للنبات فإن العدوى الصناعية قد تجرى بالرش بجراثيم أو هيفات الفطر، وهى معلقة فى الماء، أو فى زيت معدنى. فتستخدم معلقات الفطر فى الماء فى حالة الفطريات الطحلبية، ولكن الماء يكون ضارًا لفطريات أخرى مثل فطريات البياض الدقيقى والأصداء، ولذا .. فإنها تعلق فى الزيوت المعدنية.

كما يمكن تعفير النباتات بالجراثيم الجافة للفطريات، وقد تستخدم لذلك فرشاة طلاء، أو أجهزة خاصة تُحمل فيها الجراثيم مع تيار من الهواء لتتوزع بتجانس على النباتات التى يُراد اختبارها وغالبا ما تخلط الجراثيم ببودرة التلك لتأمين تجانس توزيعها.

ويلزم فى كثير من الحالات إبقاء النباتات فى رطوبة نسبية عالية تقترب من ١٠٠٪ لمدة ١٢–٢٤ ساعة بعد العدوى لتحفيز الإصابة والتجرثم. ويتحقق ذلك – تحت ظروف الحقل – إما عن طريق الرى بالرش، وإما بتنكيس نواقيس زجاجية على النباتات المعاملة، التى يُستفاد منها بعد ذلك فى انتشار الإصابة فى الحقل.

وقد أوضح Tu & Poysa (١٩٩٠) أن عدوى أوراق نباتات الطماطم التى يراد اختبارها لمقاومة مرض تبقع الأوراق السبتورى بفرشاة سبق غمسها فى معلق لجراثيم الفطر *Septoria lycopersici* كان أفضل من غمس الأوراق فى المعلق أو رشها به مباشرة. استخدم فى العدوى معلق لجراثيم الفطر بتركيز مليون جرثومة بكل ملليلتر.

وقد استخدمت فرشاة من شعر الجمل فى عدوى الأوراق من السطحين. وأعقب ذلك وضع الأصص المحتوية على النباتات المحقونة فى صوان بها طبقة رقيقة من الماء. وتغطية النباتات بشريحة بلاستيكية. ثم تركها فى صوبة على حرارة ٢٤±٢°م لمدة يومين. وقد ظهرت الاختلافات – فى شدة الإصابة – بين التراكيب الوراثية بعد ذلك بستة أيام

أخرى، وكانت الإصابة متجانسة بدرجة أفضل مما كانت عليه الحال فى أى من طريقتى غمس، أو رش الأوراق فى معلق جراثيم الفطر.

عدوى الأوراق بالبكتيريا

يجب دائمًا التمييز بين الأعراض الطبيعية typical، وغير الطبيعية atypical عند عدوى الأنواع النباتية بمسببات الأمراض – خاصة البكتيرية منها – سواء أكانت الدراسة بهدف تحديد مدى العوائل، أو التقييم للمقاومة.

إن الأعراض غير الطبيعية تظهر – غالبًا – نتيجة لما يبديه النبات من مقاومة لهذه المسببات المرضية التى أدخلت فيه بوسائل صناعية خاطئة، أو نتيجة لاستعمال تركيزات عالية، وهى أعراض لا تظهر أبدًا فى الظروف الطبيعية. ولذا .. فإن اختيار طريقة العدوى وتركيز البكتيريا المناسبين أمران فى غاية الأهمية لتمييز النباتات المقاومة عن تلك القابلة للإصابة.

ويقدر أفضل تركيز للعدوى الصناعية، بالبكتيريا المسببة للأمراض بنحو ٥ × ١٠^{٦} خلية بكتيرية أو أكثر من ذلك/ مل من المعلق البكتيرى؛ فعند استعمال هذا التركيز تكون كل خلايا أنسجة النبات المحقونة على اتصال بالطفيل.

وتفيد كثيرًا تهيئة الظروف التى تجعل ثغور الأوراق مفتوحة عند الحقن بالبكتريا التى تُحدث بقعًا ورقية؛ ذلك لأن هذه البكتريا تمر إلى المسافات التى توجد بين الخلايا من خلال الثغور المفتوحة. ولأجل هذا .. يمكن وضع النبات فى مكان رطب مظلل؛ كان يوضع فوقه ناقوس زجاجى، أو يترك فى غرفة نمو رطبة لمدة ٢٤ ساعة قبل العدوى الصناعية. ويمكن زيادة الرطوبة النسبية حول النبات بوضع ورق نشاف مبلل بالماء داخل الناقوس الزجاجى أو فى غرفة النمو.

يستخدم فى العدوى الصناعية بالبكتريا مزارع بكتيرية حديثة يتراوح عمرها من ٢٤–٤٨ ساعة. تغسل هذه المزارع بماء معقم، ويعدل تركيز المعلق البكتيرى حسب التركيز المطلوب الذى يتوقف على طريقة الحقن المتبعة. كما يلى:

يمكن زيادة شدة الإصابة ببعض الأنواع البكتيرية المرضة للنباتات، مثل: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* – على الطماطم – بمعاملة الأوراق قبل عدواها بالبكتيريا بمذيبات الشمع، مثل ٠.١٪ إثيربترولى، أو ٠,٠٠١ مولار أيدروكسيد بوتاسيوم أو أيدروكسيد صوديوم.

ويفيد مجرد الضغط على الأوراق بين الأصابع بعد غمسها فى المعلق البكتيرى فى إحداث الإصابة، إلاّ أن الأضرار التى قد تنشأ عن زيادة الضغط تجعل من الصعب تقدير شدة الإصابة كميًّا.

١ – رش المعلق البكتيرى على سطح النبات:

يعتبر رش المعلق على الأوراق النباتية أفضل طريقة للعدوى الصناعية بالبكتيريا المسببة لتبقعات الأوراق؛ لأنها أقرب الطرق للعدوى الطبيعية. ويلزم فى هذه الحالة وضع النباتات فى حجرة نمو رطبة لمدة ٢٤ ساعة قبل إجراء العدوى، أو تعريضها للرش بالرذاذ mist لعدة ساعات قبل العدوى. وتتم العدوى برش السطح السفلى للأوراق – تحت ضغط منخفض – بمعلق بكتيرى يحتوى على أكثر من ٥ × ١٠^{٦} خلية بكتيرية/ مل. ولا يخشى – فى هذه الحالة – من ظهور أعراض مرضية غير طبيعية لأن نسبة قليلة فقط من الخلايا البكتيرية التى توجد فى المعلق هى التى يمكنها المرور إلى المسافات البيئية لخلايا النسيج الوسطى من خلال الثغور.

ونجد فى حالة عدم التوافق بين البكتيريا والنوع النباتى المستخدم أن البكتيريا تظهر نشاطها حول الثغور، حيث تظهر الأعراض غير الطبيعية فى مساحات ميكروسكوبية لا تُرى بالعين المجردة. أما فى حالة التوافق .. فإن الإصابة يمكن أن تنتشر بدرجة كبيرة إلى أن تظهر الأعراض المميزة للمرض.

يمكن رش المعلق البكتيرى تحت ضغط، ولكن يجب أن يؤخذ فى الاعتبار نوع الرشاشة، وشدة الضغط، والمسافة بين الرشاشة والسطح الورقى؛ فمثلاً .. تستخدم الرشاشة الصغيرة جدًّا atomizer أو رشاشة الطلاء تحت ضغط ١,٥كجم/سم^{٢}، مع جعل

الـ atomizer على مسافة ١٠—٢٥سم من سطح الورقة. وبالمقارنة .. تستخدم artist's air brush تحت ضغط ٢,٥–٣,٠ كجم/سم^{٢} مع جعلها على مسافة ٣–٦سم من سطح الورقة.

وإذا ما استعمل ضغط عالٍ فإن تركيز المعلق البكتيرى لا يجب أن يزيد عن ٥×١٠^{٦} خلية/ مل حتى لا تجبر البكتيريا على المرور إلى المسافات البينية لخلايا نسيج الميزوفيل من خلال الثغور، وحتى لا يتولد عن ذلك تكوين أجزاء أو بقع متحللة فى النباتات المقاومة – أو تلك التى لاتعد من عوائل البكتيريا – جراء الأضرار التى يُحدثها اصطدام محول الرش بالورقة تحت ضغط.

وتفيد إضافة المواد المحدثة للجروح abrasives إلى الأوراق قبل رشها باللقاح البكتيرى فى تجنب الحاجة إلى استعمال ضغط عالٍ عند الرش، وخاصة عند عدوى الأوراق المغلفة بطبقة شمعية. ويستخدم لأجل ذلك الكاربورندم (٣٠٠–٦٠٠ مش mesh)، ويلزم – حينئذٍ – حك معلق اللقاح بلطف على سطح الورقة – بعد رشه – بالإصبع أو باستعمال قطعة قطن أو قطعة من الشاش.

وبعد العدوى بالبكتيريا .. يمكن وضع النباتات مرة أخرى فى حجرة النمو الرطبة التى يجب أن تقترب رطوبتها من ١٠٠٪؛ فعلى سبيل المثال .. لم تظهر على أوراق الخيار التى حقنت بالبكتيريا *P. lachrymans* – المسببة لمرض تبقع الأوراق الزاوى – أية أعراض للإصابة عندما كانت الرطوبة النسبية ٨٠—٩٠٪ بعد العدوى، بينما ظهرت أعراض المرض الطبيعية عندما كانت الرطوبة النسبية ٩٥ – ١٠٠٪. تترك النباتات المعدية فى الرطوبة العالية لمدة ٦—١٨ ساعة بعد العدوى الصناعية بالمسبب المرضى. ثم تنقل إلى بيت محمى بعد ذلك.

٢ – حقن المعلق البكتيرى فى المسافات بين الخلايا:

تتم العدوى فى هذه الطريقة بحقن المعلق البكتيرى فى المسافات البينية لخلايا الورقة باستعمال محقنة طبية. يسمح ذلك بإدخال عدد معلوم من الخلايا البكتيرية بتجانس تام فى المسافات البينية دون إحداث ضرر لنسيج الورقة. يجرى الحقن من السطح السفلى

للورقة. وتزداد سهولة حقن الأوراق مع زيادتها فى العمر. ومن الضرورى أن يكون الجزء المائل من سن الإبرة – الذى توجد به الفتحة – إلى أسفل (أى تحت خلايا البشرة السفلى مباشرة) عند الحقن، وأن يكون الحقن بين عروق الورقة. وتسمح هذه الطريقة باختبار عدة سلالات بكتيرية على نفس الورقة أو على أوراق مختلفة من نفس النبات.

٣ – حك الأوراق:

يمكن إجراء العدوى بحك الأوراق التى سبق نثر الكربورندم عليها بقطعة من القطن أو الشاش يكون قد سبق غمسها فى المعلق البكتيرى.

يجب أن يزيد تركيز المعلق البكتيرى المستعمل عن مليون خلية بكل ملليلتر.

وبينما تفيد إضافة الكربورندم إلى المعلق البكتيرى المستخدم فى الرش فى زيادة شدة الإصابة، فإن ذلك قد يؤدى إلى ظهور بقع ومناطق متحللة غير طبيعية بالنباتات المقاومة.

٤ – التثقيب الدقيق أثناء العدوى:

من بين الطرق التى تتأكد معها حدوث الإصابة بالبكتيريا إحداث ثقوب كثيرة دقيقة فى المسطح الذى يراد عدواه بالبكتيريا – سواء أكان ورقة، أم نسيج لحمى – وذلك قبل العدوى بالبكتيريا مباشرة، أو أثناءها. ويستعمل فى إحداث الجروح دبابيس دقيقة تبرز نهاياتها (حوالى ٠,٥سم) من قطعة فلين. وقد تستعمل قطعة الفلين (أو قطعة من الخشب أو الاستيروفوم) مباشرة أو تثبت فى أحد طرفى ماسك زجاجى، بينما تُثبت فى الطرف الآخر قطعة فلين أخرى بدون دبابيس حتى يمكن الضغط على الورقة بينهما. وتعرف هذه الطريقة باسم pin- prick method.

وقد جربت هذه الطريقة بنجاح فى أمراض البقع الورقية، والعفن الطرى، وأعفان الساق، والذبول، والتضخمات.

ومن الطرق الأخرى المماثلة الناجحة وضع الورقة المراد عدواها بين الإبهام وورقة سنفرة (بها حبيبات رمل بقط ٢٠ ٠–٣٥ ٠مم) مبللة بالمعلق البكتيرى مع الضغط على الورقة قليلاً لإحداث بعض الجروح بها (عن Dhingra & Sinclair ١٩٨٥، وعن Greenleaf ١٩٨٦).

عدوى الأوراق بالفيروسات بطريقة الرش تحت ضغط

تتعدد طرق الحقن بالفيروسات النباتية حسب طرق انتقالها، وهو ما نتناوله بالتفصيل في موضع آخر من هذا الفصل، ونقصر حديثنا الآن على طريقة الرش تحت ضغط للحقن بالفيروسات.

تعرف هذه الطريقة باسم Spray Gun Method، وهي شديدة الفاعلية مع بعض الفيروسات مثل فيرس موزايك التبغ. ويلزم عند اتباعها إضافة الكاربورندم إلى العصير الخلوي المستخدم في العدوى الصناعية بنسبة ٥٪ بالحجم. ترش النباتات بقوة من على مسافة ٨–١٠سم تحت ضغط ٤–٧كجم/سم^{٢}. ويمكن بهذه الطريقة عدوى مئات النباتات الصغيرة في دقائق معدودة (عن Greenleaf ١٩٨٦).

موجز لطرق عدوى الأوراق

يمكن إيجاز طرق إجراء العدوى (التلقيح أو الحقن) عن طريق الأوراق فيما يلي:

١ – تعد أبسط الطرق لعدوى الأوراق هي برش معلق من جراثيم المسبب المرضي الفطري أو الخلايا البكتيرية – وهي في ماء معقم. أو في الزيت – على سطح الورقة. وعند استعمال الماء تجب إضافة مادة ناشرة مثل توين ٢٠ Tween 20 أو توين ٨٠ بتركيز ٠.٥٪. أو صابون سائل بتركيز ٠,١٪. ويتعين اختبار إنبات الجراثيم في تلك المحاليل قبل إجراء اختبارات العدوى. تؤدي إضافة المواد الناشرة إلى زيادة أعداد الأوراق التي تُصاب في كل نبات، وزيادة شدة الإصابة وتجانسها، وخفض التباين في الأعراض المرضية. ونجد عند رش الأوراق المغطاة بغطاء شمعي بالمعلق الجرثومي في الماء دون استعمال المواد الناشرة – مع تحضين النباتات في جو رطب – أن الرطوبة الحرة التي تتجمع على الورقة تكوِّن قطرات كبيرة لا تلبث أن تتدحرج آخذه معها الجراثيم التي لم تنبت بعد، أو أنها تتجمع عند قاعدة الأوراق أو أطرافها؛ مما يحد من شدة الإصابة ويجعلها تتركز في مكان واحد من الورقة.

وتفيد في اختبارات عدوى الأوراق إضافة مواد لاصقة، مثل: الجيلاتين بتركيز ٠.٥٪،

والآجار بتركيز ٠,١٪ – ٠,٢٪، وكربوكسى مثيل السيليلوز carboxymethyl cellulose بتركيز ٠,٢٪ – ٠,٥٪؛ فهذه المواد تقوم – إلى جانب لصق الجراثيم بسطح الأوراق – بمنع جفاف الجراثيم، كما توفر لها قليلاً من الغذاء لأجل إنباتها.

يستمر رش الأوراق حتى يقطر منها محلول الرش، ويستثنى من ذلك الحالات التى يتعين فيها حفظ النباتات – بعد عدواها – فى رطوبة عالية، كما فى حالة العدوى بمسببات البياض الزغبى؛ إذ يكفى معها الرش العادى الخفيف.

ويناسب الرش على نطاق ضيق استعمال رشاشة صغيرة يتم توصيلها بمصدر لتوليد ضغط قدره ١–١,٥ كجم/سم^{٢}، وهو الذى يعطى رذاذ دقيق مناسب للعدوى. أما فى المساحات الكبيرة، فيمكن استعمال رشاشة طلاء تُوصَّل بمصدر لتوليد الضغط مع توصيلها – كذلك – بمصدر اللقاح باستعمال أنبوبة مطاطية طويلة، أو قد تستعمل رشاشة حقلية لهذا الغرض.

أما استعمال الزيوت غير السامة للنباتات كمعلقات للجراثيم فإنه يفيد – خاصة – مع الجراثيم الجافة، باستثناء الجراثيم الكونيدية لفطريات البياض الدقيقى، وهى التى تفقد قدرتها على إحداث الإصابة لدى تعليقها فى الزيوت. وتستخدم الزيوت – خاصة – فى عدوى النجيليات بفطريات الأصداء.

٢ – العدوى باستعمال الجراثيم المحمولة فى بودرة التلك:

يفيد حمل البذور فى بودرة التلك فى عدوى الأوراق بالجراثيم الجافة، ولكنها تتطلب كميات كبيرة من الجراثيم مقارنة باستعمال معلقات الجراثيم فى الماء أو فى الزيت. وتتبع هذه الطريقة – خاصة – فى العدوى بفطريات الأصداء، ويجرى ذلك باستعمال عفارة خاصة، مثل DeVillbis powder insufflator أو cyclone spore collector. تقوم العفارة الأخيرة بتجميع الجراثيم من الأوراق المصابة، ثم – بإعكاس اتجاه تيار الهواء – تقوم بتعفير تلك الجراثيم – وهى مختلطة بالتلك – على الأوراق التى يرغب فى عدواها. ويلى التعفير تحضين النباتات فى رطوبة عالية. وقد ترش النباتات بالماء أولاً – تحت ضغط – قبل تعفيرها بالجراثيم مع التلك.

٣ – يفيد هز الأوراق المصابة على النباتات التى يرغب فى عدواها – أو حكها بها – فى إحداث العدوى بالمتطفلات الإجبارية، مثل فطريات البياض الدقيقى. وفى حالة استعمال هذه الطريقة مع فطريات الأصداء فإن النباتات ترش بالماء أولاً قبل حك الأوراق المصابة بها، ولا يجوز اتخاذ هذا الإجراء (الرش بالماء) مع فطريات البياض الدقيقى. أما فى حالة فطريات البياض الزغبى التى تُنتج جراثيمها ليلاً، والتى تكون حساسة للجفاف، فإن الأوراق التى تظهر عليها الجراثيم تجمع من الحقل فى الصباح أثناء وجود الندى، وتوضع على اتصال مباشر بأوراق النباتات التى يراد اختبارها.

٤ – يفيد غمس الأوراق فى معلق لجراثيم الفطر فى اختبار أعداد كبيرة من البادرات التى تكون نامية فى أصيص واحد (عن Dhingra & Sinclair ١٩٨٥).

العدوى عن طريق السيقان والجذور والأسطح المقطوعة

تُجرى العدوى (الحقن) عن طريق السيقان فى اختبارات المقاومة لأمراض الذبول الوعائية. وعلى الرغم من إمكان إتباع هذه الطريقة – كذلك – مع أمراض أعفان الجذور، والذبول الطرى، وعفن الرقبة، وعفن قاعدة الساق، والتقرحات، إلاّ أنه يتعين الحرص فى تفسير نتائجها لأن مقاومة مختلف الأعضاء النباتية قد تختلف بالنسبة للمسبب المرضى الواحد.

العدوى عن طريق السيقان

من بين الطرق الشائعة لحقن السيقان، ما يلى:

١ – عمل قطع عمودى بطول ١–١,٥سم بالساق باستعمال مشرط حاد، ثم إضافة جزء صغير من مزرعة المسبب المرضى إليه. يجرى هذا القطع فى حالة أمراض الجذور التى تصيب السيقان على ارتفاع ٢–١٠سم من سطح التربة. ويلى إضافة المسبب المرضى تغليف مكان الجرح جيدًا.

٢ – غرز عود أسنان toothpick ملوث بالمسبب المرضى فى ساق النبات حتى عمق ١–٢سم ثم قطع الجزء البارز منه وتغليفه جيدًا.

٣ – غرز إبرة تشريح فى ساق النبات عند العقدة الثانية فوق عنق الورقة مباشرة، ثم إضافة نقطة من معلق جراثيم المسبب المرضى فى إبط الورقة بحيث تغطى مكان الجرح. وفى حالة الأمراض البكتيرية فإن نقطة المعلق البكتيرى تضاف قبل غرز الإبرة.

٤ – العدوى بالمسببات المرضية البكتيرية بقطع أعناق الأوراق الصغيرة أو القمة النامية للبادرات ثم إضافة البكتيريا على مكان الجرح باستعمال ماصة أو فرشاة.

٥ – تتبع كذلك طريقة حقن الساق باستخدام إبرة محقنة (سرنجة) سبق غمسها فى معلق المسبب المرضى، وذلك حتى عمق ٢مم، فوق الأوراق الفلقية مباشرة، حيث تنسحب نقطة المعلق الجرثومى للمسبب المرضى الموجودة بالإبرة إلى داخل ساق النبات لدى سحب الإبرة (عن Dhingra & Sinclair ١٩٨٥).

العدوى بالبكتيريا بطريقة الوخز Pricking

يمكن عدوى السيقان أو الأجزاء اللحمية للنباتات بالبكتيريا بوخزها بإبرة أو تجريحها بمشرط سبق غمسه فى معلق للبكتيريا التى يُراد استخدامها فى العدوى، وهى أفضل الطرق للعدوى بأمراض الذبول البكتيرية وأعفان أعضاء التخزين. وتظهر أعراض الذبول الطبيعية عند اتباع هذه الطريقة أيًّا كان تركيز البكتيريا فى المعلق المستخدم.

ولعدوى أعداد كبيرة من النباتات بطريقة الوخز .. تثبت الإبرة وسط فرشاة بحيث يكون سن الإبرة دون مستوى أطراف شعر الفرشاة بقليل. وبغمس الفرشاة فى المعلق البكتيرى .. يمكن ضمان تلوث الإبرة بالبكتيريا بالقدر المناسب أثناء عدة وخزات متتالية. ويتم وخز النباتات الصغيرة – فى حالات أمراض الذبول – فى المنطقة التى تقع مابين الأوراق الفلقية والورقة الأولى.

وقد استخدم Hassan وآخرون (١٩٨٦) هذه الطريقة فى تقييم الطماطم لمقاومة البكتيريا *C. Michiganense* المسببة لمرض التقرح البكتيرى.

العدوى بالبكتيريا عن طريق الأسطح المقطوعة

تجرى العدوى بأمراض الذبول البكتيرية بقطع نحو ١–٢سم من الجذور، ثم غمسها

– بعد ذلك مباشرة – فى المعلق البكتيرى المناسب لمدة ساعتين، ثم تشتل النباتات فى التربة.

كما قد تجرى العدوى فى حالة أمراض الذبول أيضًا بطريقة أخرى تكسر فيها أعناق بعض الأوراق الصغيرة، أو بعض الفروع الصغيرة، ثم يوضع المعلق البكتيرى على مكان القطع بواسطة فرشاة أو ماصة.

وتجرى العدوى فى حالات أمراض الأعفان الطرية بعمل قطع فى عضو التخزين (الثمرة أو الجذور، أو الدرنة ... إلخ) بمشرط أو نصل سكين معقم، ثم يوضع المعلق البكتيرىعلى مكان القطع. وتوضع الأعضاء النباتية المحقونة بهذه الطريقة فى مكان رطب لمدة ٤٨ ساعة بعد الحقن (Kiraly وآخرون ١٩٧٤).

العدوى عن طريق الجذور

تحدث الإصابة الطبيعية والصناعية بأمراض الجذور والحزم الوعائية عن طريق التربة. ولكن العدوى الصناعية بأمراض الحزم الوعائية يمكن إحداثها عن طريق كل من الجذور والسيقان على حدٍّ سواء، كما يلى:

١ – تجرى العدوى الصناعية عن طريق التربة فى حالات الأمراض التى تحدث الإصابة الطبيعية فيها عن طريق الجذور، وتعيش مسبباتها فى التربة، مثل أمراض الذبول، وأعفان الجذور، وتتأثل الجذور فى الصليبيات، وتتأثل البطاطس ... إلخ. تجرى العدوى الصناعية لتربة الحقل، أو الصوبة بالمسبب المرضى، ويحافظ على اللقاح فيها باستمرار زراعة صنف قابل للإصابة بهذا المسبب المرضى سنويًا.

٢ – لا يلزم فى معظم أمراض الذبول تقطيع الجذور لكى تحدث الإصابة، إلا أنه يُنصح بهذا الإجراء أحيانًا لزيادة تجانس الإصابة (Walker ١٩٦٦)، كما يكون التجريح ضروريا فى حالات أخرى كما فى الذبول الفيوزارى فى البطاطا. حيث يوصى – عند إجراء اختبار التقييم للمقاومة – بغمر قواعد العقل الطرفية لسيقان البطاطا فى معلق لجراثيم الفطر، مع هرس تلك القواعد بآله حادة (Hanna وآخرون ١٩٦١).

٣ – يفضل إجراء اختبارات التقييم للنيماتودا – بالنسبة للأنواع النباتية التى يسهل شتلها – فى صوانى إنتاج شتلات speedling trays تُملأ عيونها بمخلوط زراعة يتكون من البيت موس والفيرميكيوليت. تستعمل لأجل ذلك صوان ذات عيون واسعة لكى تسمح بتكوين نمو جذرى جيد يكون من السهل تقييمه جيدًا. يضاف إلى كل عين ٢٠٠٠ بيضة عند زراعة البذور أو عند وضع البادرات فيها. توضع الصوانى على سنّادات حديدية أو من قوالب الطوب لكى لا ترتكز على الأرض؛ وبذا يسهل تقليم جذورها التى تبرز منها (عن Fassuliotis ١٩٨٥).

٤ – بينما يسهل عدوى المجموع الجذرى للنباتات التى تشتل – مثل الطماطم والفلفل – حيث يغمر المجموع الجذرى فى معلق للمسبب المرضى قبل الشتل، فإنه قد يستحيل إجراء ذلك بالنسبة للمحاصيل التى يصعب شتلها مثل الفاصوليا. وقد تغلب Wallace & Wilkinson (١٩٦٥) على هذه المشكلة عند تقييمهما الفاصوليا لمقاومة الفطر *F. solani* f. *phaseoli* المسبب لمرض عفن الجذور الجاف بإجراء اختبارات التقييم فى أصص بقطر ١٥سم مثبت فى قمتها حلقة ورقية (مبطنة بالبوليثيلين) بارتفاع ٦سم، وتملأ بالفيرميكيوليت. تزرع البذور على سطح التربة فى الأصيص، ثم يضاف الفيرميكيوليت. بعد الإنبات .. تجرى العدوى بإضافة معلق جراثيم الفطر إلى الفيرميكيوليت. وعند تقييم النباتات .. تزال الحلقة الورقية وما بداخلها من فيرميكيوليت، ثم تقدر درجة الإصابة فى السويقة الجنينية السفلى للنباتات؛ حيث يمكن – حينئذ – التخلص من النباتات القابلة للإصابة والإبقاء على النباتات المقاومة. وقد اتبعت هذه الطريقة فى دراسة المقاومة لكل من مرضى العفن الجاف والعفن الأسود فى الفاصوليا (Hassan وآخرون ١٩٧١ أ، ب).

٥ – تزداد المشكلة تعقيدًا بالنسبة للنباتات الصعبة الشتل – كالفاصوليا – حينما لا يكون هناك مناص من فحص الجذور لتقدير شدة الإصابة، حيث يتعذر حينئذٍ الاستفادة من النباتات المقاومة بعد تقليعها – لفحص جذورها – خاصة وأن عملية التقييم لا يمكن إجراؤها قبل مضى شهر أو شهر ونصف الشهر من زراعة البذور.

وقد توصل Wyatt & Fassuliotis (١٩٧٩) إلى طريقة تسمح بالاستفادة من النباتات المرغوب فيها المنتخبة، والمحافظة عليها، ليمكن تهجينها، أو تركها لتتلقح ذاتيا. وتتلخص تلك الطريقة فى عدوى تربة "البنشات" فى الصوبة، وزراعة الفاصوليا فى أصص من البيت موس أو الفخار مملوءة بتربة غير معدية بالنيماتودا، ثم دفن هذه الأصص فى تربة (البنش). تنمو - نتيجة لذلك - بعض الجذور من الثقوب التى توجد بأسفل الأصيص، حيث تتعرض للإصابة بالنيماتودا، وبذا .. يمكن تقييمها مع الإبقاء على النباتات المقاومة التى تحتفظ بجذورها فى الأصص.

وقد تمت عدوى تربة (البنشات) فى الطريقة السابقة بمعلق من بيض النيماتودا *M. incognita* فى قاع حُفَرَ عمق كل منها ١٠سم، وقطرها ٨سم وموزعة كل ٢٠سم فى صفوف تبعد عن بعضها البعض بمقدار ٣٠سم، بحيث يصل إلى كل حفرة نحو ١٢٠٠ بيضة من النيماتودا. وكانت أصص البيت المستخدمة فى الزراعة بقطر ٧.٦سم. وثُقِّبت من القاع بقطر ٢,٢ سم. وضعت هذه الأصص فى الحفر التى أضيف إليها اللقاح فى تربة (البنشات). وزرع بكل أصيص ثلاث بذور، ثم أجريت عملية الخف على نبات واحد بعد الإنبات. وقد سجلت شدة الإصابة على الجذور التى نمت من قاع الأصص بعد ٣٥، و ٤٥، و ٥٥ يومًا من زراعة البذور.

كذلك استخدمت أصص فخارية زرعت فيها بذور سبق استنباتها على مهاد ورقية إلى أن وصل طول النمو الجذرى فيها إلى ٦—٨سم، مع إبراز طرف الجذير من قاع الأصيص قبل تغطية البادرة بالتربة. وقد كانت تلك الطريقة أفضل من طريقة أصص البيت؛ لأن الجذور كانت نافذة من قاع الأصص منذ البداية، وكان التقييم - فى جميع النباتات - على الجذر الرئيسى، وبذا .. فإنه كان متجانسًا.

وكان من أبرز عيوب تلك الطريقة ما يلى:

أ - اعتمد التقييم - فى الحالات التى لم ينم فيها الجذر الرئيسى من قاع الأصيص - على إصابة الجذور الرفيعة التى نفذت من القاع؛ الأمر الذى لا يجعل التقييم دقيقًا.

ب – نادرًا ما أصيبت الجذور التى نفدت من جوانب الأصص بالنيماتودا، حيث لم يتوفر لها الوقت الكافى لذلك.

جـ – لم تتحمل أصص البيت تأخير عملية التقييم إلى ٤٥ أو ٥٥ يومًا من الزراعة، حيث كان من الصعب تداول الأصص آنذاك، وغالبًا ما أضير المجموع الجذرى للنباتات عندما نُزعت الأصص من مكانها فى تلك المرحلة، حيث ذبلت النباتات، إلا أنها عادت إلى حالتها الطبيعية خلال يوم أو يومين عندما كان الفحص بعد ٣٥–٤٥ يومًا من الزراعة.

ويلجأ البعض إلى تقييم نباتات الفاصوليا لمقاومة نيماتودا تعقد الجذور عندما يبلغ عمرها خمسين يوما، وذلك عندما تكون القرون ناضجة جزئيًا، ولكن يعيب على تلك الطريقة ما يلى:

أ – تكون البذور التى تنتجها تلك النباتات ضعيفة، وتعطى بادرات بطيئة النمو، مقارنة بالبذور المكتملة النمو.

ب – لا تسمح هذه الطريقة بتلقيح النباتات المنتخبة رجعيًا، أو مع نباتات أخرى مرغوب فيها.

جـ – قد تتعرض جذور النباتات المنتجة – فى تلك المرحلة من النمو – للإصابة ببعض الفطريات المسببة للعفن، مما يحدث تلفًا فى قشرة الجذور يصعب معه التقييم للمقاومة.

ومن الطرق الأخرى التى استخدمت لتقييم نباتات الفاصوليا لنيماتودا تعقد الجذور إجراء الزراعة والعدوى الصناعية فى أحواض زجاجية شفافة، كتلك التى تستخدم فى دراسات نمو الجذور، وبذا .. يمكن ملاحظة تكوين الثآليل مباشرة.

موجز لطرق عدوى الجذور

يمكن تلخيص طرق إجراء العدوى (التلقيح أو الحقن) عن طريق الجذور فيما يلى:

١ – الزراعة فى أرض مصابة طبيعيًا أو سبق تلويثها بالمسبب المرضى.

٢ – استخدام المزارع المائية:

عند اتباع طريقة المزارع المائية تُنتج البادرات أولاً فى بيئة معقمة، ثم تُنقل إلى محلول مغذٍ. وقد تُحقن الجذور بالمسبب المرضى إما بغمسها فى معلق منه قبل نقلها إلى المحلول المغذى، وإما بإضافة المسبب المرضى إلى المحلول المغذى ذاته. وغالبًا ما يُستعمل محلول هوجلند المغذى، ولكن بربع أو بنصف تركيزه القياسى. يفيد التركيز المنخفض فى سرعة ظهور الأعراض المرضية، إلاّ أن التركيز الشديد الانخفاض قد يؤدى إلى ظهور أعراض نقص بعض العناصر، وهى التى قد تختلط على بعض الأعراض المرضية.

٣ – طريقة غمس الجذور:

يمكن اتباع طريقة غمس الجذور فى معلق المسبب المرضى مع غالبية المسببات التى تصيب الجذور. يتم إنتاج البادرات أولاً فى بيئة معقمة، ثم تغمس جذورها فى معلق من جراثيم المسبب المرضى لمدة تتراوح بين ساعة واحدة إلى ٢٤ ساعة حسب العائل والمسبب المرضى. يلى ذلك شتل البادرات فى بيئة مناسبة. وتؤثر فترة الغمس على الشدة التى تظهر بها أعراض المرض.

٤ – طريقة القطع والغمس:

تستخدم طريقة قطع الجذور قبل غمسها فى معلق المسبب المرضى فى اختبارات المقاومة لمسببات الذبول، ولكنها تُميِّز فقط بين المستويات العالية والمنخفضة من المقاومة. ولإجراء هذه الطريقة يُقطع نحو ٣–٤سم من أطراف جذور البادرات التى يكون قد سبق إنتاجها فى بيئية معقمة، وذلك قبل غمسها فى معلق المسبب المرضى، ثم شتلها. وفى حالة البكتيريا المسببة للذبول الوعائى تُقطع الجذور على بعد سنتيمتر واحد من أطرافها، ثم تُغمس فى المعلق البكتيرى لمدة ١٠–٦٠ ثانية، أو تقطع الجذور أثناء غمسها فى المعلق. وقد يجرى الحقن بقطع أطراف جذور البادرات ثم شتلها فى صوانى الشتلات مع إضافة حوالى ٢–٤ مل من المعلق لكل عين قبل الشتل فيها. كذلك فإن الجذور قد تُجَّرح أثناء غمسها فى المعلق البكتيرى.

٥ – طريقة التجريح العميق:

تتبع طريقة التجريح العميق للجذور مع مسببات أمراض الذبول الوعائية، وفيها يغمد مشرط عدة مرات فى الكومبوست المحيط بجذور البادرات، ثم يضاف معلق جراثيم المسبب المرضى. ويفيد منع أو تقليل الرى قبل العدوى فى زيادة احتفاظ بيئة الزراعة بمعلق المسبب المرضى عند إضافته.

٦ – حقن الجذور الخشبية الكبيرة:

عند الرغبة فى حقن الجذور الخشبية المسنة يتم تتبعها نحو نهاياتها حتى نصل إلى النقطة التى تكون فيها الجذور بقطر ١–٢سم، حيث تُزال من الجذور شريحة سطحية بطول سنتيمتر واحد بامتداد أحد جوانبه، ويلى ذلك إضافة جزء من بيئة أجار للمسبب المرضى. ثم تغطيتها جيدًا، وربطها قبل ردم التربة على الجذر مرة أخرى.

٧ – حقن الجذور دون التأثير على وضعها الطبيعى فى التربة:

قد تؤدى عملية الشتل إلى إحداث أضرار بالجذور، مما قد لا يمثل العلاقة الطبيعية بين العائل والمسبب المرضى فى بعض الحالات. وفى حالات كهذه تجرى العدوى بإضافة معلق المسبب المرضى إلى بيئة نمو الجذور مباشرة، أو تُخلَّص الجذور من بيئة الزراعة بحرص شديد حتى لا تتقطع، ثم تُرش بمعلق جراثيم المسبب المرضى أو تغمس فيه قبل إعادة زراعتها من جديد.

وبالإضافة إلى الطرق التى تقدم بيانها فإنه يمكن توفير المسبب المرضى الذى يصيب النبات عن طريق الجذور بتلويث البذور سطحيًا به.

تتبع تلك الطريقة فى اختبارات المقاومة لبعض أمراض أعفان الجذور، وتتم بتطهير البذور سطحيًا، ثم نقعها فى معلق مركز للمسبب المرضى لمدة ساعة واحدة إلى ٢٤ ساعة، ثم زراعتها (عن Dhingra & Sinclair ١٩٨٥).

عدوى البذور

تتبع طريقة عدوى البذور فى اختبارات المقاومة لأمراض البذور، والأمراض التى

تنتقل عن طريق البذور، وأمراض الذبول الطرى السابق للإنبات والتالى له، وأعفان الجذور، وأعفان قاعدة الساق، والأمراض ذات الطبيعة الجهازية مثل التفحمات. ويعتبر استخدام الجراثيم أفضل من الغزل الفطرى، كما تعتبر العدوى تحت تفريغ (١٥٠-٢٠٠مم زئبق) أفضل من مجرد غمس البذور فى معلق جراثيم الفطر. ويراعى - فى كل الحالات - عدم زيادة أعداد الجراثيم التى تصل إلى البذور على الحد المناسب.

وحقيقة الأمر أن ما يحدث فى هذه الطريقة هو تلويث للبذور بالمسبب المرضى (وليس إصابتها به). بحيث يكون الطفيل قريبا من العائل منذ المراحل الأولى لإنبات البذور. وتجرى هذه الطريقة خاصة عند العدوى بفطريات التفحم المغطى فى النجيليات.

تستخدم فى حالة التفحمات الجراثيم الكلاميدية والتيليتية. وفى البداية تغمر البذور فى محلول فورمالين بتركيز ٠,٣٪ لمدة ساعة، ثم تغسل فى ماء صنبور جارٍ لمدة ٣٠ دقيقة لتطهيرها تمامًا من أى تلوث سطحى. ويلى ذلك تجفيف البذور لمدة ٢٤ ساعة على ٢٠°م، ثم يرج ١٠٠جم من البذرة مع ٠,٥-١,٠جم من الجراثيم

ويجرى الاختبار لمقاومة البياض الزغبى بتغليف البذور بالجراثيم البيضية. ثم زراعتها (عن Dhingra & Sinclair ١٩٨٥).

عدوى الأزهار

تتبع طريقة عدوى الأزهار - أساسًا - مع مسببات أمراض أعفان الكوز فى الذرة والسورجم، وكذلك فى حالات التفحم السائب، وفى مرض الإرجوت فى الشيلم. تعدى النورات الزهرية وقت تفتح الأزهار بجراثيم الفطر بالرش، أو بالتعفير، أو بالحقن. حيث ينتقل الفطر من مياسم الأزهار إلى الأجنة التى تتكون بعد الإخصاب (عن Kiraly وآخرين ١٩٧٤). فمثلاً .. تستعمل الرشاشات الحقلية لعدوى الشيلم فى الحقل بالفطر *Claviceps* المسبب لمرض الإرجوت، وتحقن جراثيم التفحم السائب فى نورة نبات القمح باستعمال محقنة تحت جلدية، وتعدى نورات القمح والشعير بجراثيم التفحم السائب

تحت تفريغ. ويتعين فى حالات الرش بجراثيم الفطر تغطية النورات بكيس بلاستيكى لمدة ٢٤–٧٢ ساعة بعد المعاملة.

عدوى الثمار

لا تفضل عدوى الثمار إذا أمكن تقييم النباتات عن طريق الأجزاء النباتية الأخرى فى طور مبكر من النمو، لأن عدوى الثمار يتطلب الانتظار وقتا طويلا إلى أن تثمر النباتات، كما أن وصول النباتات إلى هذه المرحلة المتقدمة من النمو يتطلب مساحات أكبر من الوحدات التجريبية لإجراء عملية التقييم. وبالرغم من ذلك .. فإنه يلزم عدوى الثمار ذاتها فى بعض الأحيان، كما فى مرض الأنثراكنوز فى الطماطم.

وقد حصل Robbins & Angell (١٩٧١) على ٩٥٪ إصابة بالأنثراكنوز فى ثمار صنف الطماطم Heinz 1350 بوضع نقطة صغيرة من معلق جراثيم الفطر على سطح الثمرة بواسطة محقنة، ثم ثقب بشرة الثمرة تحت نقطة المعلق بإبرة المحقنة. وقد ظهرت أعراض المرض فى حرارة الغرفة وفى الرطوبة الجوية العادية، وبذا .. لم تكن هناك حاجة إلى التحكم فى درجات الحرارة أو الرطوبة الجوية.

الطرق المختبرية لتقييم مقاومة النباتات للأمراض

تتعدد الطرق المختبرية المستخدمة فى تقييم مقاومة النباتات للأمراض، ومن أمثلتها ما يلى:

عدوى الأوراق المفصولة

تتبع طريقة عدوى الأوراق المفصولة عن النبات (detached leaves) مع كثير من المسببات المرضية الفطرية، مثل فطريات الأصداء، والبياض الزغبى، والبياض الدقيقى، وتبقع الأوراق السركسبورى. ولاتباع هذه الطريقة تُعَوَّم الأوراق على محلول سكروز بتركيز ١–٣٪ فى ماء معقم، وتجرى العدوى برش جراثيم الفطر، أو نثرها جافة على سطح الورقة التى تعرض لإضاءة شدتها ١٠٠ قدم – شمعة لمدة ١٢–٢٤ ساعة، مع