وتظهر كثير من تلك التغيرات — كذلك — كاستجابة لحالات شدّ الجفاف وشدّ الملوحة، لكن التغيرات فى درجة عدم تشبع دهون الأغشية، وتمثيل مضادات التجمد والتبريد الفائق تقتصر على حالة التأقلم على التجمد فقط.

هذا.. ويزداد تركيز حامض الأبسيسك فى عصير الخشب بالنباتات خلال فترة تأقلمها على البرودة، ويصل التركيز أقصاه قبل اكتمال التأقلم مباشرة. كذلك فإن المعاملة بحامض الأبسيسك فى الجو الدافئ (٢٠– ٢٥°م) يُكسب النباتات تأقلمًا على التجمد (Srivastava ٢٠٠٨).

ولقد أمكن عزل جليكوبروتين (٧ كيلو دالتون) من أوراق الكرنب التى أُقلمت على البرودة بالتقسية — وليس من الأوراق التى نمت فى ظروف طبيعية — كانت له القدرة — بعد تنقيته — على حماية الـ thylakoids — المأخوذة من نباتات سبانخ غير مؤقلمة — ضد أضرار التجمد (Sieg وآخرون ١٩٩٦).

أضرار شدّ التجمد

فسيولوجيا الضرر وكيفية حدوثه

يؤدى انخفاض درجة الحرارة إلى أقل من الصفر المئوى إلى تكوين بلورات ثلجية فى المسافات الموجودة بين الخلايا (المسافات البينية)، وكذلك داخل الخلايا نفسها. فالماء يوجد فى المسافات البينية على شكل غشاء مائى رقيق يغطى الأسطح الخارجية لجدر الخلايا، وكذلك فى صورة بخار ماء. وهذا الماء يكون نقيًا بدرجة عالية وذا درجة تجمد قريبة من الصفر المئوى. كذلك يوجد الماء فى الفجوات العصارية داخل الخلايا فى صورة محلول مذاب فيه عديد من المركبات والأملاح، وهذا الماء يكون ذا درجة تجمد أقل من الصفر المئوى بدرجات قليلة.

وفى حالة انخفاض درجة الحرارة إلى أقل من الصفر المئوى بقليل يبدأ الماء الموجود فى المسافات البينية فى التجمد (لقلة محتواه من المواد المذابة، مع زيادة محتواه من

نوبات البلورات الثلجية)، ويؤدى ذلك إلى نقص ضغط بخار الماء فى المسافات البينية عنه داخل الخلايا، فينتشر الماء تبعًا لذلك من داخل الخلية إلى المسافات البينية ؛ وتزيد بذلك الكتلة البلورية فى الحجم. ويؤدى استمرار هذه العملية إلى انكماش الخلايا فى الحجم، وزيادة تركيز عصيرها الخلوى؛ فتزيد نقطة تجمد محتوياتها، بينما يساعد الغشاء البلازمى على منع انتقال عملية بَلْوَرة الماء إلى داخل الخلايا ذاتها.

ومع ارتفاع درجة الحرارة إلى أعلى من الصفر المئوى تذوب بلورات الثلج المتكونة فى المسافات البينية تدريجيًا، ويعود الماء إلى داخل الخلية بصورة تدريجية، دون أن يُحدث أضرارًا بالخلية. وتحدث هذه العملية — وتتكرر بصورة طبيعية — فى عديد من النباتات العشبية والخشبية، والحولية والمعمرة التى تتميز بقدرتها على تحمل الصقيع،وهى الخاصية التى تعرف باسم "Freezing Tolerance"، التى تمكن النباتات من تحمل جفاف الخلايا الذى يحدث عند تجمد الماء فى المسافات البينية، وهى صفة وراثية.

لكن الأضرار قد تحدث عند تجمد الماء بين الخلايا فى الحالات التالية:

١–عند زيادة فقد البروتوبلازم للماء الذى ينتشر فى المسافات البينية، ويتوقف ذلك على نفاذية الغشاء البلازمى.

٢–عند حدوث تجمع لبعض مكونات الخلية بدرجة لا يعود معها البروتوبلازم إلى حالته الطبيعية.

٣–فى حالة الارتفاع الفجائى لدرجة الحرارة؛ حيث يذوب الثلج وينتشر الماء داخل الخلايا بسرعة؛ مما قد يؤدى إلى تمزق الغشاء البلازمى.

٤–فى حالة النباتات الرهيفة tender، والتى يكون غشاؤها الخلوى أقل نفاذية للماء؛ الأمر الذى يؤدى إلى تجمع الماء فى المسافات البينية عند ذوبان البلورات الثلجية.

هذا.. ولا تتكون البلورات الثلجية داخل الخلايا إلا إذا انخفضت درجة الحرارة إلى القدر الذى يسمح بتجميد العصير الخلوى، ويحدث ذلك فى الحالات الآتية:

١-عندما يكون معدل الانخفاض فى درجة الحرارة أكبر من معدل الانخفاض فى نقطة تجمد العصير الخلوى (وهو الأمر الذى يحدث عند انتشار الماء من الخلايا إلى المسافات البينية)، ويحدث ذلك فى الحالات التالية:

أ- عندما يكون الانخفاض فى درجة الحرارة سريعًا وكبيرًا.

ب- فى حالة النباتات الرهيفة، وهى التى تكون أغشيتها الخلوية أقل نفاذية للماء؛ الأمر الذى لا يسمح بسرعة انتشار الماء إلى المسافات البينية.

٢-عندما لا تكون النباتات مؤقلمة جيدًا؛ حيث تكون نقطة تجمد العصير الخلوى مرتفعة نسبيا؛ لأن النباتات المؤقلمة جيدًا يزيد بها تركيز المواد الذائبة بالعصير الخلوى، كما يزيد محتواها من المركبات المحبة للرطوبة hydrophylic compounds؛ وهى مركبات تقوم بادمصاص الماء حولها، وترتبط به بشدة ؛ الأمر الذى يؤدى إلى خفض نقطة تجمده، وتزيد هذه المركبات فى الظروف التى لا تسمح بالنمو الخضرى السريع، وكذلك فى النباتات الأكبر سنًا.

ويؤدى تجمد الماء داخل الخلايا إلى الأضرار التالية:

١-فقدان الخلية للماء الحر.

٢-تمزق الغشاء البلازمى.

٣-حدوث أضرار ميكانيكية تؤثر على تركيب الكلوربلاستيدات والتركيب الغروى للسيتوبلازم (Walker ١٩٦٩، و Devlin ١٩٧٥).

وتتميز بعض الأجزاء والأنسجة النباتية بالقدرة على البقاء فى درجة حرارة التجمد؛ وذلك بتجنب تكوين البللورات الثلجية فيها، وهى الخاصية التى تعرف باسم

Freezing Avoidance، وتتميز بها البذور — التى تبقى ساكنة فى التربة خلال فصل الشتاء — والبراعم، وخلايا برانشيمية الخشب الشعاعية.

هذا.. وتُضار الأغشية الخلوية بتحولها من الحالة السائلة شبة البلّورية إلى حالة غروية (جل)، ويترتب على ذلك فقد لنشاط ما يرتبط بها من بروتينات وإنزيمات (مثل: الـ ATPases، والبروتينات الحاملة carrier proteins، وبروتينات القنوات channel proteins). وينتج عن هذه التغيرات فقد لخصائص النفاذية الاختيارية للأغشية بالنسبة لكل من الأيونات والفينولات والمحاليل المخزنة لدى تفكك النسيج المتجمد. وإذا ما تكونت بلورات ثلجية كبيرة فإنها تُحدث أضرارًا ميكانيكية بالأغشية، وهى الأضرار التى تزداد بتكرر التجمد والتفكك. وقد يحدث الضرر نتيجة لتكوين وتراكم مركبات سامة؛ بسبب حدوث تقليص للتنفس الهوائى، وتكوين عناصر نشطة فى الأكسدة، وأكسدة للأحماض الدهنية غير المشبعة فى الأغشية. وقد يحدث — كذلك — دنترة للبروتينات كجزء من أضرار فقد الماء (Srivastava ٢٠٠٨).

فسيولوجيا تكوين نويات البللورات الثلجية والتجمد ودور البكتيريا

التبريد الفائق

تتمكن أحيانًا النباتات الحساسة للصقيع من البقاء خلال فترات الصقيع القصيرة، وذلك عندما يحدث تبريد فائق super-cooling للماء الموجود فى أنسجتها. وتزداد فرصة حدوث التبريد الفائق عندما تكون الأسطح الورقية خالية نسبيًّا من البكتيريا المكونة لنويات البللورات الثلجية. ونجد تحت الظروف الحقلية أن الأسطح النباتية نادرًا من ما تكون خالية من تلك البكتيريا، إلا أن أعدادها قد تكون منخفضة إلى الحد الذى يسمح بحدوث تبريد فائق بدلاً من تكوين نويات البللورات الثلجية. وقد تبين أن وجود الندى على الأوراق يزيد من فرصة تكوين نويات البللورات الثلجية.

وقد عرض Cary & Lindow (١٩٨٦) بادرات فاصوليا من صنف Pinto لحرارة تراوحت بين -٢، و-٥°م لمدد تراوحت بين ٣٠ دقيقة و١٢ ساعة، ووجدا أن النباتات التى لم تكن قد رُشَّت بمعلق من البكتيريا *Pseudomonas syringae*، وتلك التى تعرضت لشدّ رطوبى وصل إلى نقطة الذبول كانت أكثر مقاومة لتكوين نويات البللورات الثلجية. كذلك كانت النباتات التى لم تبلل سطحيًّا أكثر ميلاً للتبريد الفائق عن تلك التى تعرضت أسطحها لرذاذ من الماء المقطر، سواء أكانت قد عوملت بالبكتيريا، أم لم تعامل. وقد ذكر الباحثان أن معاملة النباتات بالمواد المبللة للأوراق wetting agents (المواد الناشرة) عند رش النباتات بمختلف المركبات الكيميائية ربما يعيق عملية التبريد الفائق.

ويمكن أن تُثار أو تنشط عملية التجمد ذاتها بالمواد التى تعمل كنويات للبللورات الثلجية Ice Nucleoters، وهى التى تسبب عملية بلورة الماء الذى يكون سائلاً فى حالة فائقة التبريد Supercooled قبل تعرضه لتلك النويات. وعندما تبدأ عملية البلورة هذه.. فإنها تستمر سريعًا إلى أن تتجمد المحاليل الفائقة التبريد.

وتحدث تلك البلورة للماء فيما بين حرارتى الصفر المئوى وعشر درجات تحت الصفر، ولكن الماء الذى يوجد على صورة نقاط صغيرة — لا يتعدى قطرها ١٠ ميكروميترات — يمكنه أن يبقى مبردًا تبريدًا فائقًا حتى درجة ٣٨,١°م تحت الصفر، وهى الدرجة التى تعرف باسم Homogenous Nucleation Temperature، ويرمز إليها بالرمز : ΔT_h

وإذا كانت الـ Melting Point Depression Temperature هى ΔT_m .. فإن:

$$\Delta T_m = (-2\ \Delta T_m + 38.1)$$

وتقع ΔT_m بالنسبة لمعظم النباتات بين — ٤١°م ، و -٤٧°م. ولا يحدث التبريد الفائق إلى هذه الدرجة من البرودة إلاّ بالنسبة لبعض الأعضاء والأنسجة النباتية لبعض النباتات، أما النباتات الكاملة فإنها لا تتعرض للتبريد الفائق إلا بقدر محدود.

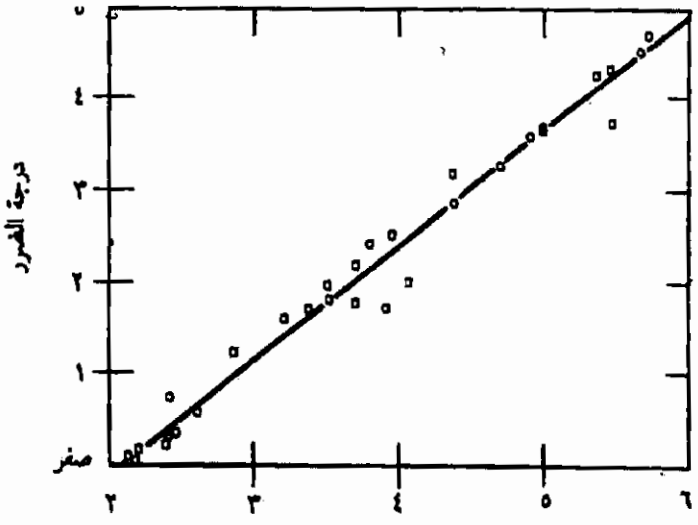
دور البكتيريا فى تكوين نويات البللورات الثلجية

اكتشف Lindow وآخرون (١٩٧٨ أ، ١٩٧٨ ب) وجود عدة سلالات من نوعين من البكتيريا التى تعيش على الأسطح النباتية epiphytic bacteria وبين خلايا النبات؛ هما: *Pseudomonas syringae* و *Erwinia herbicola*. وقد كانت بعض سلالات هذين النوعين على درجة عالية من الكفاءة فى تكوين نويات البلورات الثلجية ice nuclei فى درجات حرارة تراوحت بين ٢°م تحت الصفر و٥°م تحت الصفر. وقد وجدت هذه الأنواع البكتيرية بأعداد كبيرة بأوراق معظم النباتات التى جمعت من مناطق جغرافية مختلفة وفى مواسم مختلفة.

وقد وجدوا كذلك أن أضرار الصقيع فى الذرة على درجة حرارة — ٥°م تناسبت طرديًا مع لوغاريتم أعداد هذه البكتيريا (شكل ٢–٢)، لكن البكتيريا لم تكن نشطة فى تكوين نويات البلورات الثلجية فى حرارة أقل من — ١٠°م.

كما حصل Feng (١٩٩٠) على نتائج مماثلة فى الخيار؛ حيث وجد أن هناك علاقة خطية موجبة بين كل من لوغاريتم أضرر الصقيع ولوغاريتم أعداد البكتيريا النشطة فى تكوين نويات البللورات الثلجية — من أى من النوعين *P. syringae* و *E. herbicola* — على الأسطح النباتية.

وأوضحت دراسات Lindow وآخرين (١٩٧٨ ب) على الذرة أن أضرار التجمد على درجة –٤°م تزداد كثيرًا بزيادة الفترة — التى تمر بين رش النباتات بالبكتيريا *E. herbicola* وتعريضها للحرارة المنخفضة — من ١٢ ساعة إلى ٣٦ ساعة؛ حيث تبدأ البكتيريا انقسامها النشيط بعد ٦ ساعات من رش الأوراق بها، وتتناسب شدة الضرر خطيا مع أعداد البكتيريا المتواجدة على سطح الأوراق وقت تعرضها للحرارة المنخفضة.



شكل (٢-٢): العلاقة بين لوغاريتم أعداد الخلايا البكتيرية النشطة فى تكوين نويات البللورات الثلجية وشدة الإصابة بأضرار الصقيع فى الذرة على حرارة تراوحت بين -٥° م و٤,٥° م .

وقد أثبتت عديد من الدراسات أن هذه البكتيريا هى المسئولة عن أضرار الصقيع فى النباتات الرهيفة؛ مثل: الذرة، والموالح، والأفوكادو، والكمثرى، والطماطم، والقرع العسلى، والفاصوليا، وفول الصويا، وغيرها، كما أضيف إليها كذلك بعض سلالات من النوعين *P. fluorescens*، و*P. viridiflava* (عن Ashworth & Davis ١٩٨٤، وHirano وآخرين ١٩٨٥).

وتتواجد هذه البكتيريا بأعداد ضخمة على أسطح الأوراق النباتية، بما فى ذلك النباتات الخالية تمامًا من أية أعراض مرضية. وبعض هذه الأنواع تعيش معيشة رمية، وتتفاعل مع البكتيريا المرضية، وتقلل من حدة الأمراض التى تحدثها؛ فمثلاً:

١- تعمل *E. herbicola* على تثبيط الإصابة بـ *Xanthomonas oryzae* فى الأرز.

٢–وتعمل بعض أنواع البكتيريا على تقليل شدة الإصابة بـ *E. amylovora* فى الكمثرى.

٣–وتفيد عديد من البكتيريا التابعة للجنس *Pseudomonas* فى تقليل شدة الإصابة بـ *P. syringae pv. morsprunorum* فى الكريز (Lindow وآخرون ١٩٧٨، Kelman ١٩٧٩).

وقد عُرِفَ ٢٠ نوعًا على الأقل من هذه البكتيريا ذات المقدرة على تكوين نويات البلورات الثلجية التى تعيش على أسطح الأوراق النباتية (Ashworth ١٩٨٦، و Lindow وآخرون ١٩٧٨ أ، و Kelman ١٩٧٩).

ومن أكثر الأنواع البكتيرية انتشارًا وأهمية – فى تكوين نويات البللورات الثلجية – ما يلى:

Pseudomonas syringae pv. *syringae*

P. fluorescens

P. viridiflava

Erwinia herbicola

Xanthomonas campestris pv. *tranlucens*

وقد تباينت سلالات البكتيريا *P. sysringae* pv. *syringae* – التى عزلت من التفاح – فى مدى ضراوتها على ثمار الطماطم الخضراء، وقرون الفاصوليا الخضراء، وبادرات الخوخ (عن Olive & McCarter ١٩٨٨).

وتتميز البكتيريا *P. syringae* بقدرتها على إصابة عدد كبير من الأنواع النباتية. وقد وجدت على كثير من النباتات التى لم تَبْدُ عليها أية أعراض للإصابة، ولكن أعدادها كانت كافية لتكوين نويات البللورات الثلجية عند انخفاض درجة الحرارة إلى

ما دون درجة التجمد (عن Anderson وآخرين ١٩٨٢).

وكما أنه توجد اختلافات بين الأنواع والسلالات البكتيرية فى قدرتها على تكوين نويات البللورات الثلجية، فإن الخلايا المفردة من السلالة الواحدة تختلف كذلك فى تلك القدرة. وتعرف النسبة بين الخلايا القادرة على تكوين النويات الثلجية إلى مجموع الخلايا البكتيرية باسم Bacterial Ice Nucleation Frequency. وقد تراوحت هذه النسبة — للسلالة ٣١ من *P. syringae* (على بادرات الذرة) تحت ظروف حجرات النمو على حرارة ٤°م تحت الصفر — بين ١ فى المليون و١ فى البليون (عن Hirano وآخرين ١٩٨٥).

وهذا.. ولم يجد Anderson (١٩٨٨) اختلافات معنوية بين ستة أصناف من الطماطم فى درجة الحرارة التى تتجمد عندها بادرات وشتلات الطماطم التى يتراوح وزنها بين ٠,٣ جرام و٣٤ جرامًا. وقد تأثرت حرارة التجمد — أساسًا — بوجود أو غياب بكتيريا نويات البللورات الثلجية، حيث تراوحت حرارة تجمد البادرات بين -٤,٧ و -٥,٧°م فى وجود البكتيريا وبين -٦,١ م و-٦,٩°م فى غيابها.

وكما أسلفنا.. تعد البكتيريا *Pseudomonas syringae*، و *Erwinia herbicola* من أهم الأنواع البكتيرية المكونة لنويات البللورات الثلجية، وهما المسئولتان عن كثير من أضرار التجمد فى كثير من النباتات الحساسة للصقيع، ومنها الطماطم. وتصيب البكتيريا *P. syringae* مدى واسعًا من العوائل النباتية، كما وجدت فى بقايا النباتات — التى كانت تخلو من أى أعراض مرضية — بأعداد كافية لبدء تكوين النويات الثلجية. وقد وجد أن رش هذه البكتيريا على أوراق الطماطم أدى إلى تجمدها عند حرارة -٤°م، مقارنة بالتجمد على حرارة -٨°م فى نباتات الشاهد التى كانت خالية من هذه البكتيريا. وكان وجود البكتيريا بتركيز ٤ × ١٠°م خلية بكتيرية/ مل (سم^{٣}) من المعلق البكتيرى ضروريًا لتكوين النويات الثلجية. وقد أدى حفظ هذه البكتيريا على حرارة ٢°م

قبل رشها على أوراق النباتات إلى جعلها أكثر قدرة على تكوين النويات الثلجية (بتكوينها للنويات على حرارة أعلى) عما لو كان حفظها — قبل استعمالها — على حرارة ٢١°م (Anderson وآخرون ١٩٨٢).

وفى الخيار.. تحدث أضرار التجمد فى أوراق الخيار عندما تتكون البللورات الثلجية فى المسافات التى تقع بين الخلايا، وتتباين درجة الحرارة التى تتكون عندها تلك البللورات باختلاف الأوراق. وقد حفَّز تواجد البكتيريا النشطة فى تكوين نوايا البللورات الثلجية ice nucleation-active bacteria على سطح الأوراق .. حفز تواجدها تكوين البللورات الثلجية؛ مما أدى إلى زيادة أضرار التجمد. وعندما عوملت النباتات بنوعين من هذه البكتيريا — هما: *Pseudomonas syringae*، و *Erwinia herbicola* — ازدادت أضرار التجمد مع زيادة أعداد هذه البكتيريا عند أى درجة حرارة تحت الصفر. ووجدت علاقة خطية بين لوغاريتم أضرار التجمد ولوغاريتم أعداد البكتيريا (Feng ١٩٩٠).

تأثير بكتيريا تكوين نويات البللورات الثلجية فى عملية التبريد الفائق

فى الحالات التى تكون فيها الأسطح النباتية خالية — نسبيًّا — من البكتيريا المكونة لنويات البللورات الثلجية نجد أن النباتات الحساسة للصقيع يمكنها تحمل فترات الصقيع المعتدل القصيرة بحدوث تبريد فائق Super Cooling للماء الموجود بأنسجتها. وبينما نجد — تحت الظروف الحقلية- أن الأسطح النباتية نادرًا ما تخلو من تلك البكتيريا، فإن أعدادها قد تكون منخفضة إلى القدر الذى يسمح بحدوث تبريد فائق.

وقد تميزت نباتات الفاصوليا ذات الأسطح الورقية الجافة بقدرة على التبريد الفائق أكبر من تلك التى كان على أسطحها نقط من الماء المقطر، سواء أكانت معاملة بالبكتيريا *Pseudomonas syringae*، أم غير معاملة بها؛ ولذا .. فإن رش الأوراق بمواد مبللة wetting agents ربما يعوق عملية التبريد الفائق (Cary & Lindow ١٩٨٦).

هذا.. وعند وجود هذه البكتيريا — وهى متواجدة دائمًا — فإنها لا تسمح بحدوث تبريد فائق لأقل من درجتين تحت الصفر، بينما يمكن أن يصل التبريد الفائق إلى أقل من ذلك بكثير (حتى — ٧°م) فى غيابها.

وقد وجد Anderson وآخرون (١٩٨٢) أن هذه البكتيريا زادت من حساسية الطماطم وفول الصويا للصقيع عند رشها على النباتات قبل تعريضها لدرجة الحرارة المنخفضة؛ حيث تجمدت نباتات الطماطم فى حرارة — ٤°م وفول الصويا فى حرارة — ٥°م فى الوقت الذى ظلت فيه النباتات غير المعاملة بالبكتيريا دون أن تتجمد حتى حرارة — ٨°م. وقد كان من الضرورى أن يصل تركيز البكتيريا إلى ٤ × ١٠ ° / مل لكى تكون فعّالة فى إحداث التجمد. كما أدى تعريض البكتيريا لدرجة حرارة ٢°م قبل معاملة النباتات بها إلى زيادة فاعليتها فى تكوين نويات البللورات الثلجية.

وقد توصل Yelenosky (١٩٨٣) إلى نتائج مماثلة فى البرتقال؛ حيث وجد أن رش أشجار البرتقال الصغيرة بمعلق مائى من أى من نوعى البكتيريا أدى إلى تجمدها فى درجة حرارة أعلى مما فى الأشجار غير المعاملة. كذلك حصل على النتائج ذاتها عند رش النباتات بمعلق مائى من أنواع بكتيرية أخرى أو بمعلقات بعض المركبات الكيميائية؛ مثل: يوديد الفضة، والفينازين phenazine، والفلوروفلوجوبيت flurophlogopite ... فجميعها عملت كنويات للبللورات الثلجية.

وأظهرت دراسات Cary & Lindow (١٩٨٦) أن نباتات الفاصوليا التى عُرِّضت لحرارة تراوحت بين — ٥°م و — ٢°م لمدة نصف ساعة إلى اثنتى عشرة ساعة كانت مقاومة — بدرجة عالية — لتكوين نويات البللورات الثلجية بها، حينما لم يسبق رشها بمعلق من البكتيريا *Pseudomonas syringae*، أو حينما كانت تعانى نقصًا فى الرطوبة الأرضية اقترب من نقطة الذبول.