فى الكحول ، ثم إشعال الكحول العالق به . ويمكن استخدام نفس القضيب الزجاجى إذا بدأ العمل بأكبر التخفيفات (أقل تركيز للخلايا البكتيرية) ، ثم تقدم نحو التخفيفات الأقل منها (Kiraly وآخرون ١٩٧٤) .

يعاب على هذه الطريقة أنها تحتاج إلى يومين على الأقل لتنفيذها ، مع ما يتطلبه ذلك من جهد ، بالإضافة إلى أنها تعطى – بعد يومين من العدوى – تقديرا لتركيز المعلق البكتيرى الذى استخدم بالفعل ، وبذا .. لا يمكن استخدامها فى التحكم فى تركيز المعلق البكتيرى الذى يرغب فى استخدامه .

طرق حفظ مزارع مسببات الأمراض

تحتاج دراسات التربية لمقاومة الأمراض إلى الإلمام بوسائل حفظ مزارع الفطريات والبكتيريا لفترات طويلة ؛ لأن ذلك يفيد فى الأمور التالية :

١ – استخدام نفس السلالة فى الدراسات الوراثية فى أى وقت يكون الباحث فى حاجة إليها .

٢ – تجنب تكرار زراعة المسبب المرضى ، وبذا .. تقل فرص تلوثه ، وتغير تركيبه الوراثى بالطفور .

مزارع الفطريات والبكتيريا

من أهم طرق إدامة وحفظ المزارع الفطرية والبكتيرية ما يلى :

١ – النقل الدورى Periodic Transfer :

يسمح بنمو المزارع الفطرية أو البكتيرية فى بيئة أجار بأنابيب اختبار ، ثم تخزن بعد ذلك إما فى الثلاجة على درجة ٥°م – وهو ما يحدث غالبا – وإما فى درجة حرارة الغرفة بالنسبة لبعض المسببات المرضية .

وتتخذ أثناء فترة التخزين الاحتياطيات التى تمنع جفاف البيئات ، أو تلوثها ، فتغطى أنابيب البيئات جيدا بورق الألومنيوم ، أو بالورق المشمع ، أو بالبارافين ، ولكن يجب عدم

إحكام الغطاء فى حالات المزارع التى تكون نشطة فى نموها . وتعقم السدادات القطنية جيدا قبل تغطيتها إما بتعريضها للهب (مع سرعة إطفائها) ، وإما ببلها ببضع نقاط من ١٪ كلوريد الزئبقيك فى مخلوط من كحول الإيثايل النقى والجليسرول بنسبة ٩٥ : ٥ . يمنع هذا الإجراء تلوث البيئات بالفطريات ، وبالأكاروس الذى يحمل معه عديدا من الكائنات الدقيقة .

وتختلف الفترة التى تمر قبل تجديد زراعة المزارع ، ونقلها إلى بيئات جديدة من مرة كل ٧ – ١٥ يوما إلى كل ٦ – ١٢ شهرا تبعا لطبيعة الكائن الدقيق المستخدم . وتتطلب هذه الطريقة جهدا كبيرا ، ولكنها تكون هى الطريقة المفضلة فى غياب أية معلومات عن مدى صلاحية الطرق الأخرى لتخزين وإدامة الكائنات الدقيقة التى يستعملها الباحث .

٢ – التخزين تحت الزيت :

تخزن بهذه الطريقة المزارع القوية النشطة التى تكون فى بيئات الآجار فى أنابيب الاختبار ، حيث تغطى بزيت معدنى معقم مثل زيت البارافين الذى يمنع فقدان الماء من البيئة فلا تجف ، ويمنع وصول الأكسجين إلى المزرعة فيحدّ من نشاطها الأيضى . تخزن أنابيب المزارع بعد ذلك عمودية على ٥°م غالبا . ويتطلب اتباع هذه الطريقة فى تخزين المزارع مراعاة ما يلى :

أ – أن يكون الزيت المعدنى ذا درجة نقاء عالية تماثل تلك المستخدمة فى الأغراض الطبية .

ب – يجب تعقيم الزيت فى الأوتوكليف على درجة ١٢١°م لمدة ساعتين ، ثم يجفف فى الفرن على درجة ١٧٠°م لمدة ساعة إلى ساعتين .

جـ – أن تكون تغطية البيئة بالزيت تامة ؛ حتى لا تشكل الأجزاء غير المغطاة منفذا لتبخر الماء منها . هذا .. وتعيش معظم المزارع الفطرية والبكتيرية المحفوظة بهذه الطريقة لفترات أطول بكثير مما فى الطريقة الأولى ، حيث لا يتطلب الأمر إعادة زراعتها إلا كل عدة سنوات .

٣ – التخزين فى الماء :

تخزن بعض الأنواع البكتيرية مثل Pseudomonas solanacearum فى الماء المقطر لفترات طويلة جدا تصل إلى تسع سنوات . وتتبع هذه الطريقة فى تخزين عديد من الأنواع البكتيرية حيث لا يتطلب الأمر أكثر من نقل جزء يسير من النمو البكتيرى إلى أنابيب الماء المعقم ، ثم تخزن الأنابيب بعد ذلك فى درجة حرارة الغرفة ، أو على ٥°م . كذلك تنجح هذه الطريقة مع بعض الفطريات ، حيث يُنْقَل إلى أنابيب الماء جزء متجرثم من المزرعة الفطرية .

٤ – التخزين فى التربة أو الرمل :

تخزن المزارع الفطرية فى التربة ، أو الرمل ، أو الفيرميكيوليت المعقم بإضافة نحو ملليلتر واحد من معلق كثيف لجراثيم الفطر الكونيدية إلى ٥ جم من الوسط المستخدم فى التخزين (التربة أو الرمل ... إلخ) فى أنبوبة اختبار ، مع مراعاة تعقيم الوسط – وهو فى أنبوبة الاختبار – قبل إضافة المعلق الفطرى إليه . يلى ذلك التجفيف على درجة حرارة الغرفة ، ثم التخزين فى الثلاجة . تفيد هذه الطريقة فى تخزين الفطريات التى تفقد ضراوتها عند تكرار زراعتها فى بيئات مغذية ؛ مثل فطر الفيوزاريم Fusarium ، لأنها لاتحفز حدوث أية تغيرات وراثية ، ويمكن بواسطتها تخزين المزارع الفطرية بنجاح لمدة ٢ – ٦ سنوات .

٥ – التجفيف :

يفيد التجفيف السريع فى حفظ مزارع عديد من الفطريات لفترات طويلة يمكن أن تزيد على ١٥ عاما . ويشترط لنجاح التخزين بهذه الطريقة ما يلى :

أ – أن يكون التجفيف سريعا كأن يكون تحت تفريغ ، أو فوق إحدى المواد المجففة .
ب – أن تحفظ المزرعة وهى مخلوطة مع مواد حامية لها مثل الحليب أو سيرم الدم .
جـ – التخزين فى الثلاجة بعد اكتمال التجفيف .

ويستخدم – لهذا الغرض – قطرة من المعلق الفطرى ، تخلط مع قطرة من السيرم فى أنبوبة اختبار صغيرة توضع فى أنبوبة أكبر هى التى توضع بها المادة المجففة ، مع إحكام إغلاق الأنبوبة الكبيرة .

٦ – التجفيف مع التجميد Freeze - drying أو التجفيد Lyophilization :

يجرى التجفيد بوضع كمية صغيرة من المعلق الخلوى للمزرعة الفطرية أو البكتيرية فى أنبوبة زجاجية خاصة وتجميدها بسرعة ، ويلى ذلك تجفيف العينة بتعريضها لتفريغ شديد حيث يتسامى الماء المجمد ويتبخر فى الحال ، ثم تغلق الأنبوبة بإحكام وهى لاتزال تحت التفريغ الشديد . وتخزن الأنابيب بعد ذلك فى الثلاجة على درجة ٣ – ٥°م .

هذا .. ويتم التبريد الأولى السريع بوضع الأنابيب فى الأسيتون أو الإيثانول مع الثلج الجاف ، وتعلق المزارع فى محلول ٢٠ ٪ جلوكوزاً أو سكروزاً . وقد يحتاج الأمر إلى عملية التبريد الأولى ؛ لأن التفريغ الشديد يحدث هذا التأثير .

الفيروسات

يمكن حفظ الفيروسات النباتية بإحدى الطرق التالية :

١ – الإبقاء على الفيروسات فى عوائل مناسبة بصورة دائمة، وهذه الطريقة هى الأكثر شيوعاً . ويتم ذلك – فى حالة العوائل غير المعمرة – بتكرارعدوى نباتات جديدة من العائل بالفيرس على فترات .

٢ – حفظ الأجزاء النباتية المصابة بالفيرس فى أكياس بلاستيكية على درجة ٢٠°م ، إلا أن الفيرس يفقد قدرته على إحداث الإصابة مع تكرار عمليتى تجميد وفك thawing النسيج النباتى المصاب .

٣ – تجفيف الأوراق النباتية المصابة بالفيرس – بسرعة – وتخزينها فوق كلوريد الكالسيوم على درجة صفر – ٤°م . يستخدم لذلك كلوريد كالسيوم محبب بقط ٥ – ١٥ مم ، يوضع فى قاع وعاء زجاجى ، ثم يغطى بطبقة رقيقة من القطن أو المناشف الورقية (كلينكس) ، ويوضع عليها من ٥ – ١٠ جم من عينة الأوراق المصابة بالفيرس بعد تجزيئها إلى قطع صغيرة باستخدام شفرة حلاقة نظيفة . ويلى ذلك إحكام إغلاق الوعاء الزجاجى بالبرافين . ولأجل تجفيف عينة الأوراق المصابة تماما .. يلزم فتح الوعاء الزجاجى عدة مرات ، واستبدال بللورات كلوريدالكالسيوم الموجودة به بأخرى جديدة .

٤ – التجفيد Freeze Drying .

إقامة الدليل على التطفل

يلزم لإقامة الدليل على أن كائنا مرضيا معينا هو المسئول عن الإصابة بمرض ما أن ينطبق على هذه الحالة أربعة شروط أو مبادىء تعرف باسم شروط أو مسلمات كوخ Koch's Postulates ، وهى كما يلى :

١ – ارتباط جملة أعراض المرض دائما بوجود الكائن الممرض .

٢ – ضرورة عزل الكائن الدقيق الممرض ، وزراعته مستقلا عن النبات ، وتعريف خصائصه .

٣ – ظهور نفس أعراض المرض عند عدوى نباتات سليمة بهذا الكائن الدقيق .

٤ – عزل الكائن الدقيق مرة أخرى من النبات المعدى ، وإثبات أنه مطابق للكائن الذى استخدم فى العدوى .

وتستثنى القاعدة الثانية (الخاصة بضرورة عزل وزراعة الكائن الدقيق) – بالنسبة للمسببات المرضية الإجبارية التطفل – من شرط إقامة الدليل على التطفل ، حيث يكتفى إما بدراسة الكائن الدقيق ميكروسكوبيا واستخدام جراثيمه – التى تجمع من النباتات المصابة – فى العدوى مباشرة ، كما فى فطريات البياض الزغبى والبياض الدقيقى ، وإما بتنقيته كما فى حالة الفيروسات ، وإما بعزلة واستخدامه فى العدوى دونما حاجة إلى زراعته كما فى حالة النياتودا .

ولتحقيق الجزء الأخير من الشرط الثانى من قواعد كوخ ، وهو الخاص بدراسة خصائص المسبب المرضى بعد عزله بعيدا عن النبات .. يلزم أن يكون المربى على دراية ببعض الاختبارات التى تجرى فى هذا الشأن ، والتى يمكن الرجوع إليها فى المراجع المتخصصة، مثل :