الفصل الثالث

طرق تداول المسببات المرضية

نتناول بالدراسة فى هذا الفصل بعض الطرق العملية لأمراض النبات التى يتعين على المشتغل بالتربية لمقاومة الأمراض أن يكون ملما بها . وإلى جانب هذه الطرق العملية .. فإن على المربى أن يكون ملما كذلك بكثير من الحقائق المتعلقة بالمرض الذى يعمل عليه ؛ من حيث المسبب المرضى ، وأعراض المرض ، والتفاعل بين العائل والطفيل ، وتأثير العوامل البيئية فى كل منهما .

فبداية .. يتعين على المربى أن يتعرف على الطرق التى تمكنه من إنتاج اللقاح (المسبب المرضى أو مصدر العدوى) Inoculum بكميات تكفى لإجراء اختبارات التقييم ، وفى الوقت المناسب لإجراء العدوى . ولذا .. يلزم أن يكون المربى ملما بطرق زراعة المسببات المرضية المختلفة فى البيئات الصناعية ، وطرق تحضير هذه البيئات ، وتأثير مختلف العوامل البيئية على نمو المسببات المرضية بها . كذلك يلزم التعرف على طرق تقدير معدل النمو فى هذه البيئات الصناعية ، وكيفية استخلاص اللقاح وتجهيزه فى صورة صالحة للحقن (العدوى) به ، دون حدوث أى تسمم للنباتات Phytotoxicity من البيئة ذاتها .

ومن المعلوم أن الطفيليات الإجبارية Obligate Parasites (مثل : فطريات الأصداء ، والبياض الدقيقى ، والبياض الزغبى ، وكل النيماتودا ، و الفيروسات التى تسبب أمراضا نباتية) لا يمكنها النمو فى البيئات الصناعية ، ولذا .. كثيرا ما يلجأ المربى إلى استخدام أجزاء نباتية مصابة كمصدر للعدوى بها . ومع ذلك .. فقد أمكن زراعة عديد من فطريات

الأصداء فى بيئات صناعية ذات مواصفات خاصة ، كما أمكن تربية النيماتودا المسببة للأمراض النباتية فى مزارع الأنسجة .

كذلك يتعين على المربى الإلمام بطرق الحصول على مزارع نقية من جراثيم أو خلايا مفردة Monospore Cultures ؛ ليمكن تحديد التركيب الوراثى للقاح المستخدم فى التقييم.

كما يتطلب العمل بعزلة معينة من المسبب المرضى المحافظة عليها لفترة طويلة دون أن تفقد حيويتها ، أو تتعرض لتغيرات وراثية ، وهو ما يتطلب إلمام المربى بأفضل الطرق لتحقيق هذا الهدف .

ومن الأهمية بمكان إلمام المربى بطرق عزل المسببات المرضية من التربة أو من الأنسجة المصابة ، وتوفر طرق عديدة لتحقيق ذلك ، تختلف من مسبب مرض لآخر ، وتركز جميعها حول محاولة عزل المسبب المرضى منفردا ، وبعيدا عن الكائنات الدقيقة الأخرى التى تكون موجودة معه .

وبعد عزل وإنتاج المسبب المرضى .. يتعين إلمام المربى بطرق قياس تركيز اللقاح المستخدم Inoculum فى صورة عدد معين من الخلايا البكتيرية ، أو الجراثيم الفطرية ، أو الأجزاء المعدية من المسبب المرضى فى كل ملليلترمن المعلق المستخدم فى الحقن ، سواء أكان التقدير مباشرا ، أم بطرق غير مباشرة .

وإلى جانب ما تقدم .. فإن على المربى أن يكون ملما بالحقائق العلمية المتعلقة بحدوث الإصابة ، والطرق التى يُحدث بها المسبب المرضى الإصابة ، والكيفية التى تحدث بها الأعراض المرضية ، ليتسنى فهم طبيعة المقاومة للمرض .. فمثلا .. يجب أن يكون المربى ملما بالخطوات والتغيرات التى تصاحب إنبات الجراثيم فى التربة ، وتأثير إفرازات الجذور Root Exudates ، والكائنات الدقيقة التى تعيش بالقرب من الجذور Rhizosphere Microflora فى هذا الشأن . كما يلزم التعرف على الطريقة التى يحدث بها الاختراق Penetration ، والخطوات التى تسبق وتصاحب عملية الإصابة Infection ، وكيف يتمكن المسبب المرضى – بالوسائل الميكانيكية والكيميائية – من التغلب على العقبات

التى يضعها العائل فى طريقه .

وفى هذا الفصل .. نلقى الضوء على الأمور الهامة التى يتعين على المربى الإلمام بها؛ بخصوص كيفية تداول مسببات الأمراض . أما التفاصيل الخاصة بهذا الموضوع .. فيمكن الرجوع إليها فى أحد المصادر المتخصصة ؛ مثل :

المرجع	الموضوع
Alexopoulos & Beneke (١٩٦٢)	الطرق المعملية لدراسة الفطريات
Maramorosch & Koprowski (١٩٦٧)	الطرق العملية لدراسة الفيروسات
Kadd & Agrawal (١٩٧٢)	أساسيات وطرق دراسة الفيروسات
Commonwealth Agr. Bur. (١٩٨٣)	أساسيات وطرق دراسة مختلف مسببات الأمراض
Hill (١٩٨٤)	الطرق العملية لدراسة الفيروسات
Green (١٩٨٤)	مختصر للطرق العملية لدراسة الفيروسات
Dhingra & Sinclair (١٩٨٥) .	الطرق المعملية لدراسة البكتيريا والفطريات ، مع شرح مئات من بيئات الزراعة .

طرق التطهير والتعقيم

المصطلحات المستخدمة

١ – التعقيم Sterilization :

يقصد بالتعقيم التخلص من جميع مظاهر الحياة فيما يتم تعقيمه من بيئات ، أو مواد ، أو أدوات ، أو تربة ... إلخ ، ويطلق على المواد التى تستخدم فى التعقيم اسم معقمات .

٢ – التخلص من الإصابة Disinfection :

يعنى بذلك تخليص الكائن الحى مما يوجد به من إصابات بكائنات أخرى باستخدام ما يعرف باسم Disinfectants . وإذا استخدم المصطلح مع أشياء غير حية كالأدوات ، والحوائط ، والأرضيات – وهو استخدام غير دقيق – فإنه يعنى تخليصها مما قد يوجد بها من كائنات دقيقة ممرضة .

٣ – مضادات الكائنات الدقيقة Antiseptics :

يعنى بذلك المواد التى تمنع ، أو توقف نشاط الكائنات الدقيقة ، أو تقتلها ، وتستخدم هذه المواد – عادة – مع الأنسجة الحية .

٤ – المطهرات Disinfestants :

يستخدم هذا المصطلح للدلالة على المركبات أو العوامل الفيزيائية التى تستخدم فى التخلص من الكائنات الدقيقة التى توجد على الأسطح النباتية ، أو فى بيئة النبات ، أو على الأشياء غير الحية .

وتستخدم اللاحقة cide فى آخر الكلمات لتعنى القاتل (مثل : bactericide ، و Fungi-cide) ، بينما تستخدم اللاحقة stat لتعنى موقف النمو أو مانع النمو (مثل : bacteristat، وfungistat) .

إجراءات النظافة والوقاية من التلوث

يتعين توخى إجراءات النظافة العامة فى مختبر التربية لمقاومة الأمراض ؛ لتجنب تلوث مزارع المسببات المرضية بكائنات غير مرغوب فيها ، حيث تلزم مراعاة ما يلى :

١ – النظافة العامة المستمرة للمختبر .

٢ – منع دخول الهواء المحمل بالأتربة بغلق النوافذ واستعمال أجهزة تكييف الهواء عند الضرورة.

٣ – ارتداء ملابس وأحذية نظيفة أثناء العمل فى المختبر .

٤ – استعمال هواء مرشح فى حجرات عزل المسببات المرضية .

٥ – تعقيم مزارع مسببات الأمراض التى يرغب الباحث فى التخلص منها – فى الأوتوكليف – قبل فتحها لغسيلها .

٦ – الحرص عند تداول العينات ، أو البقايا النباتية ، أو التربة الحاملة لجراثيم الفطريات ؛ لمنع تلوث المختبر بها .

٧ – تنظيف الزجاجيات جيدا بالماء والصابون والفرشاة قبل استخدامها . ويعتبر حامض الكروميك Chromic Acid أكثر المحاليل استخداما لتنظيف الزجاجيات لأغراض

الدراسات الكمية ، وللتخلص مما قد يوجد بها من صبغات . يحضر الحامض بوضع ٢٥٠ مل من حامض الكبريتيك المركز فى دورق مخروطى سعة ٥٠٠ مل ، ووزن ٢٠ – ٣٠ جم من ثانى كرومات البوتاسيوم ، ثم إضافتها ببطء مع التقليب بقضيب زجاجى إلى أن يتفاعل كل حامض الكبريتيك مع الملح المضاف ، ويتبقى ما يزيد منه مترسبا فى قاع الدورق . يخزن حامض الكروميك فى زجاجة حامض ، ويغلق جيدا بسدادة زجاجية ، ويوضع على قاعدة خشبية لاستقبال قطرات الحامض التى قد تنزلق على جانب الزجاجة .

المطهرات

من أكثر المحاصيل المطهرة Disinfecting Solutions استخداماً مايلى :

١ – محلول كلوريد الزئبقيك Mercuric Chloride بتركيز واحد فى الألف :

يستخدم هذا المحلول لتطهير الأيدى ، والأسطح التى يجرى العمل عليها ، والعينات النباتية ، ويحضر بإذابة جرام واحد من كلوريد الزئبقيك فى لتر ماء . وتتوفر أقراص من كلوريد الزئبقيك موزونة سلفا ، وتحتوى على صبغة مميزة للتحذير .

٢ – محلول الهيبوكلوريت Hypochlorite Solution :

يستخدم هذا المحلول فى تطهير العينات النباتية ، ويحضر بإضافة ٣٠ جم من هيبوكلوريت الكالسيوم إلى ٤٢٠ مل ماء ، مع الرج جيدا ، ثم الترشيح فى دورق مخروطى وإغلاقه بإحكام . كما يمكن استخدام الكلوراكس التجارى فى تحضير محلول الهيبوكلوريت بعد تخفيفه بالماء بنسبة ١ : ١٠ ، ويحضر المحلول أولا بأول حسب الحاجة إليه .

ويراعى عند الرغبة فى تطهير العينات النباتية – التى يصعب بلّها تماما بالمحلول المطهر غسلها – بكحول إيثيلى ٧٠ ٪ ، أو بمحلول لمادة مبللة مثل التوين ٢٠ Tween 20(نقطة أو نقطتان فى لتر ماء) قبل معاملتها بالمطهر .

المعقمات ومعاملات التعقيم

فيمايلى بيان بأهم المركبات الكيميائية ، والمعاملات الفيزيائية التى تستخدم فى التعقيم:

١ - السوائل والمحاليل

أ - الكحولات Alcohols :

إن أهم الكحولات التى تستخدم لأغراض التعقيم هى كحول الإيثيل Ethyl ، والأيزوبروبيل Isopropyl ، والبتريل Benzyl . ويعاب على الكحولات أنها ليست قاتلة للجراثيم البكتيرية . ويعتبر كحول الإيثيل المطلق (١٠٠ ٪) أقل فاعلية - فى قتل البكتيريا - من الكحول المخفف ببعض الماء . وأفضل تركيز لهذا الغرض بتراوح من ٦٠ - ٨٠ ٪ . وتزداد سمية الكحولات كمعقمات كلما ازداد وزنها الجزيئى ، ولذا .. فإن كحول الأيزوبروبيل أكثر سمية من كحول الإيثيل .

ب - الفينولات Phenols :

تعمل الفينولات إما كمعقمات Germicides ، أو كموقفات لنشاط الكائنات الدقيقة Germistatic ويتوقف ذلك على تركيزها . وتكون بعض الفينولات شديدة الفاعلية ضد الفطريات . وتزداد فاعلية الفينولات عند احتوائها على الكلور أو الهالوجنيات الأخرى . تستخدم الفينولات بتركيزات منخفضة ، وهى سامة للإنسان ويلزم تجنب ملامستها أو استنشاقها .

جـ - المعادن الثقيلة وأملاحها :

إن أهم المعادن الثقيلة هى : الزئبق ، والفضة (وكلاهما قاتل للبكتيريا والفطريات) ، والنحاس (وهو قاتل للفطريات فقط) . تكون هذه العناصر فعالة بتركيزات منخفضة للغاية، تصل فى حالة الفضة إلى جزء واحد فى كل ١٠٠ مليون جزء ، وتكون هذه العناصر مثبطة فقط لنمو الكائنات الدقيقة فى التركيزات الأقل من ذلك .

د - الهالوجينات Halogens :

يعتبر الفلورين أكثر الهالوجنيات سمية ، يليه الكلورين والبرومين ، بينما يعد الأيودين أقلها سمية . وبينما لا يشيع استخدام البرومين لما يسببه من مضايقات للعاملين به ، فإن الكلورين يعد أكثرها استخداما ، ويستخدم لذلك هيبوكلوريت الصوديوم (الكلوراكس

التجارى) ، وهو يتبخر ، لذا .. يلزم تحضيره أولا بأول حسب الحاجة .

٢ - الغازات والأبخرة

إن أكثر المعقمات استخداما على صورة غازات ، أو أبخرة هى تلك التى تستعمل للتخلص من البكتيريا ، وهى : الفورمالدهيد ، والأوزون ، وأكسيد الإيثيلين ، وأكسيد البروبلين، وجميعها تستخدم فى تعقيم العينات النباتية أيا كانت ، حيث توضع فى حيز مغلق مع كمية معينة من المركب (مثلا .. يستعمل ملليلتر واحد من أكسيد البروبلين / لتر من الحيز الذى تجرى فيه عملية التعقيم) ، علما بأن أكسيد البروبلين يتبخر على درجة ٩ر٣٣°م ، بينما يتبخر أكسيد الإيثيلين على ٧ر١٠°م ، و بينما يكون الأول قابلاً للإشتعال ، فإن الثانى متفجر، ولذا .. فإنهما يحفظان دائما فى الثلاجة .

ويحافظ التعقيم بالغازات على المركبات الحساسة للحرارة التى قد تفقد خصائصها المميزة إذا ما عقمت بالحرارة .

٣ - الحرارة

تعتبر " الحرارة الرطبة " Wet Heat (مثل : بخار الماء أو الماء) أكثر فاعلية من الحرارة الجافة Dry Heat (مثل الأفران) فى التخلص من الكائنات الدقيقة عند تساوى درجة الحرارة المستخدمة فى كليهما .

ويكفى - عادة - التعقيم لمدة ١٠ دقائق فى ماء يغلى للتخلص من الطرز الخضرية للكائنات الدقيقة ، ولكن ذلك لايكون كافيا للتخلص من الجراثيم البكتيرية وبعض الجراثيم الفطرية . ويمكن التخلص من غالبية الجراثيم بتعريض البيئة التى يراد تعقيمها لماء يغلى لمدة ٢٠ - ٣٠ دقيقة يوميا خلال ثلاثة أيام متتابعة . كذلك يتم التخلص من معظم الجراثيم لدى التعرض لحرارة ١٢١°م لمدة ١٥ - ٢٠ دقيقة ، وهو ما يجرى فى الأوتوكليف .

ويلزم - عند استخدام الأوتوكليف - التخلص تماما مما يوجد فيه من هواء قبل السماح بزيادة الضغط بداخله ، لأن الهواء يعد عازلا حراريا جيدا . وتحسب الفترة اللازمة للتعقيم - على درجة الحرارة المرغوبة - بعد وصول الحرارة داخل الأوتوكليف إلى تلك الدرجة . وتتوقف فترة التعقيم المناسبة على حجم الدوارق أو الأجسام التى يراد تعقيمها ، حيث تزيد

الفترة طرديا مع الزيادة فى الحجم ؛ لضمان وصول جميع أجزاء المادة المعقمة إلى درجة الحرارة المرغوبة .

هذا .. ويكون التعقيم باستخدام " الحرارة الجافة " – أى فى الأفران – على درجات حرارة أعلى مما يكون عليه التعقيم باستخدام " الحرارة الرطبة " ، فمثلا .. يكون التعرض لدرجة حرارة ١٦٠ ° م لمدة ٦٠ دقيقة فى الفرن مساويا – تقريبا – للتعريض لدرجة حرارة ١٢١°م لمدة ١٠ – ١٢ دقيقة فى الأوتوكليف . وتعقم الزجاجيات ، والزيوت ، والأدوات فى الأفران على درجة ١٦٠ – ١٧٠ °م لمدة ساعة ونصف الساعة إلى ساعتين . ويشترط أن تكون الزجاجيات جافة قبل إدخالها فى الأفران ، وأن يكون تعقيمها قبل الحاجة إليها بوقتٍ كاف ، لكى تنخفض حرارتها إلى درجة حرارة الغرفة .

٤ – الترشيح Filtration

يمكن فصل البكتيريا والكائنات الدقيقة الأكبر منها حجما عن معظم السوائل بالترشيح . وإذا ما أريد الإبقاء على السائل المرشح معقما ، فإنه يتعين تعقيم جهاز الترشيح والإناء الذى يستقبل فيه السائل المرشح قبل إجراء عملية الترشيح . وتعقم بهذه الطريقة جميع السوائل التى يتغير تركيبها إذا ماعقمت بالحرارة أو بالكيماويات .

ويستخدم فى تعقيم السوائل عدة أنواع من المرشحات ، منها ما يلى :

Chamberland Filter .

Diatomaceous Earth Filters.

Asbestos Pad Filter (Seitz) .

Sintered Glass Filters.

Millipore Filters.

Plaster - of - Paris Filters.

تختلف هذه المرشحات فى الشحنة الكهربائية التى تحملها ، وفى سعة ثقوبها ، وفى قدرتها على ادمصاص جزيئات معينة – مثل الإنزيمات والفيروسات – من السوائل التى تمر من خلالها ، و فى صلاحيتها لتكرار استعمالها ، وكذلك فى الوسائل المناسبة لتنظيفها

عقب استخدامها .

٥ – التعريض للإشعاع Irradiation

يتميز التعقيم بالإشعاع بإمكان تجنب التأثير السلبى للحرارة العالية ، وكثير من التغيرات الكيميائية التى يحدثها التعقيم بالحرارة ، أو بالكيماويات . . وتقسم الأشعة التى تستخدم فى التعقيم إلى نوعين كما يلى : –

أ – الأشعة المؤينة Ionizing Radiations :

من أمثلتها أشعة X ، وأشعة جاما Gamma ، وبيتا Beta ، والنيترونات ، والبروتونات ، والديوترونات Deuterons ... إلخ . تستخدم هذه الأشعة فى تعقيم البيئات والأدوات التى يخشى عليها من الحرارة العالية ، وهى تختلف من حيث قدرتها على اختراق الأجسام التى تكون فى طريقها ، وتعد أشعة جاما أكثرها قدرة ، يليها أشعة X .

ب – الأشعة الكهرومغناطيسية والأشعة فوق الصوتية Utrasonic Rays :

من أمثلتها الأشعة فوق البنفسجية Ultraviolet ، وتحت الحمراء Infra Red ، والموجات فوق الصوتية . وليس للأشعة تحت الحمراء تأثير قاتل على البكتيريا باستثناء تأثيرها الحرارى . وأكثر موجات الأشعة فوق البنفسجية تأثيرا هى التى تتراوح من ٢٤٠ – ٢٨٠ ملى ميكروناً . ونظرا لأن قدرتها على اختراق الأجسام محدودة .. لذا فإنها تستخدم فى تعقيم الأسطح والهواء .

طرق تعقيم البذور

يجب أن تكون البذور التى يراد تعقيمها سليمة تماما ، وخالية من الجروح والإصابات الميكانيكية . وتعقم البذور بإحدى الوسائل التالية :

١ – غمر البذور فى مخلوط من الكلوراكس Chlorax ، والإيثانول ٩٥ ٪ بنسبة ١ : ١ لمدة دقيقة ونصف إلى دقيقتين ، على أن تغسل بعد ذلك مباشرة – عدة مرات – بالماء المعقم، ثم تجفف باستخدام ورق ترشيح معقم .

٢ – وضع البذور فى طبقة رقيقة فى طبق بترى ، ويوضع بجانبها زجاجة ساعة بها ورقة ترشيح مطوية يوضع عليها أربع نقط من البانوجن Panogen (وهو مركب Methyl Mercury dicyandiamide بتركيز ٢ر٢ ٪) . يغطى الطبق ويترك داخل كيس بلاستيكى فى حرارة الغرفة لمدة ٤٨ ساعة ، حيث تصبح البذور بعد ذلك معقمة تماما .

٣ – غمر البذور فى حامض الكبريتيك المركز لمدة ٣٠ دقيقة فى حرارة تقل عن ٢٥°م مع التقليب كل عدة دقائق ، ثم يصفى الحامض ، وتغسل البذور بعد ذلك مباشرة من ثمانى مرات إلى تسع مرات بالماء المقطر المعقم ، على أن تستخدم كميات كبيرة من الماء – خاصة فى المرة الأولى – لتجنب أى ارتفاع حاد فى درجة حرارة البذور . ويلى ذلك غسيل البذور فى ١٠٠ مل من الماء المقطر المعقم المضاف إليه ٢ –٣ مل من ٣٠ ٪ فوق أكسيد الأيدروجين.

تعقيم النيماتودا

يلزم تعقيم النيماتودا عند الرغبة فى نقلها إلى الآجار فى أنابيب الاختبار ، أو عند الرغبة فى إكثارها على مزارع الجذور أو الكالس ، وتتم عملية تعقيم النيماتودا كما يلى :

١ – يحصل على النيماتودا المرغوبة من التربة أو النباتات المصابة باستخدام قمع بيرمان Baermann ، وتبدأ إجراءات التعقيم بعد ذلك مباشرة وهى مازالت فى حالة نشطة.

٢ – تغسل النيماتودا ٤ – ٥ مرات بماء مقطر معقم ، مع ترسيب النيماتودا – بعد كل مرة غسيل – باستخدام جهاز طرد مركزى ، والتخلص من ماء الغسيل (الرائق العلوى) باستعمال ماصة .

٣ – توضع النيماتودا بعد ذلك فى محلول Hibitane diacetate بتركيز ١ر٠ – ٥ر٠ ٪ ، لمدة ٥ – ٢٠ دقيقة ، حيث يستخدم التركيز المنخفض – لفترة طويلة – مع النيماتودا الحساسة للمركب .

٤ – تعقيم النيماتودا الحساسة لـ Hibitane بتعريضها ٤ – ٥ مرات لمخلوط ، مكون من ٢٠٠ جزء فى المليون malachite green ، و١٠٠٠ جزء فى المليون من كبريتات الاستربتومايسين Streptomycin sulfate .

٥ – تنقل النيماتودا بعد ذلك إلى مزارع الكالوس ، أو إلى مزارع الجنور ، ويكون نقل النيماتودا إما مفردة باستخدام إبرة تشريح ، وإما متجمعة بواسطة ماصة . ويمكن تحضير نسيج الكالوس بتطهير بنور البرسيم الحجازى بواسطة محلول السليمانى ، ومعاملة البادرات بالمبيد 2,4 - D بتركيز ٤ مجم / لتر لمدة دقيقة واحدة ، ثم تنميتها لمدة أسبوع على بيئة White فى أنابيب اختبار .

بيئات زراعة مسببات الأمراض

البيئات الشائعة الاستخدام

١ – بيئة البطاطس والدكستروز والآجار Potato – Dextrose – Agar (PDA) :

تستخدم هذه البيئة لمزارع الفطريات بوجه عام ، وتحضر من المكونات التالية :

المكـــون	الكمـيـة
شرائح بطاطس كاملة	٢٠٠ جم
دكستروز	٢٠ جم
آجارمطحون	١٧ جم
ماء	١٠٠٠ مل

تقطع البطاطس إلى شرائح وتوضع فى ٥٠٠ مل ماء على درجة الغليان لمدة ٤٠ دقيقة . يسخن ٥٠٠ مل أخرى من الماء إلى درجة الغليان ، ثم يضاف إليها الآجار المطحون مع التقليب . ويراعى تقليل اللهب أثناء إضافة الآجار حتى لا يحدث فوران . يستمر التقليب لحين ذوبان كل الآجار . يلى ذلك إضافة الدكستروز إلى الآجار ، ثم يضاف إليها مستخلص البطاطس ، ويكمل الحجم إلى ١٠٠٠ مل .

٢ – بيئة البطاطس والدكستروز Potato – Dextrose – Broth (PDB) :

تتشابه تماما مع بيئة الـ PDA ، ولكن ينقصها الآجار ، وبذا .. فهى بيئة سائلة .

٣ – بيئة الآجار المغذى Nutrient Agar (NA) :

تستخدم هذه البيئة لمزارع البكتيريا بوجه عام ، وتحضر من المكونات التالية :

المكون	الكمية
مستخلص اللحم Beef Extract	٣ جم
ببتون Peptone	٥ جم
آجار	١٧ جم
ماء	١٠٠٠ مل

يسخن الماء إلى درجة حرارة الغليان ، ثم يضاف إليه الآجار ببطء مع التقليب إلى أن يذوب ، ثم تضاف بقية المكونات وتقلب إلى أن تذوب كذلك . ويلى ذلك إكمال حجم المخلوط (البيئة) إلى ١٠٠٠ مل .

٤ – بيئة المرق المغذية Nutrient Broth (NB) :

تتشابه تماما مع بيئة الآجار المغذى ، ولكن ينقصها الآجار ، وبذا .. فهى بيئة سائلة .

٥ – بيئة شوربة الخضار Vegetable Juice (V- 8) :

تفيد هذه البيئة فى تحفيز تجرثم عديد من الفطريات ، وتحضر من المكونات التالية :

المكـــون	الكـمـيـة
مخلوط عصير ثمانية – خضروات V-8 (منتج تجارى)	٢٠٠ مل
آجار	١٧ جم
ماء	٨٠٠ مل

يسخن الماء إلى درجة حرارة الغليان ، ثم يضاف إليه الآجار ببطء مع التقليب إلى أن يذوب ، ثم يضاف العصير . ونظرا لأن العصير يكون حامضياً بدرجة عالية (PH = ٤٫٠).. فإنه يجب رفع الـ pH إلى ٦ –٧ باستخدام أيدروكسيد الصوديوم (1N) .

٦ – بيئة الآجار المائى :

يحتوى الآجار على كميات صغيرة من العناصر الغذائية التى يمكن أن تسمح بالنمو البطىء لبعض الفطريات . وتفيد بيئة الآجار والماء فى إنبات الجراثيم المفردة ، وتحضر بإذابة ١٧ جم من الآجار فى ١٠٠٠ مل ماء عند درجة حرارة الغليان .

٧ – بيئة الآجار ودقيق الشوفان Oatmeal Agar :

تفيد هذه البيئة فى زراعة بعض الفطريات التى تصعب زراعتها مثل الفطريات التى تتبع الجنس Phytopthora ، وهى تحضر من المكونات التالية:

المكـون	الكمـيـة
دقيق الشوفان	٧٥ جم
آجار	٢٠ جم
ماء مقطر	١٠٠٠ مل

يخلط الدقيق مع ٦٠٠ مل من الماء لمدة خمس دقائق فى خلاط ، ويذاب الآجار فى ٤٠٠ مل من الماء ، ثم يخلط الجزآن . ويراعى رفع درجة حرارة مخلوط الشوفان مع الماء قبل خلطه مع الآجار والماء لمنع تجمدهما السريع . توضع البيئة فى زجاجات يمكن إحكام غلقها (لمنع الفوران) ، ثم تعقم فى الأوتوكليف على درجة ١٢١ °م لمدة ٧٥ دقيقة .

البيئات الانتخابية

يحتاج الأمر أحيانا إلى تحضير بيئات لا تسمح بنمو كائنات دقيقة معينة ؛ كأن تسمح بنمو الفطريات ولاتسمح بنمو البكتيريا أو العكس ، وهى التى تعرف باسم البيئات الانتخابية Selective Media ، فمثلا :

١ – يمكن تثبيط نمو الفطريات مع السماح بنمو البكتيريا بخفض pH البيئة . ويتحقق ذلك بإضافة حامض لا كتيك ٥٠ ٪ بمعدل نقطة واحدة لكل ١٠ – ١٥ مل من البيئة قبل صب البيئة فى أطباق بترى مباشرة .

٢ – يمكن تثبيط نمو البكتيريا مع السماح بنمو الفطريات بإضافة الـ Cristal Violet

إلى البيئة الآجار المغذى – قبل تعقيمها – بمعدل ١ : ٥٠٠٠٠ . كذلك يمكن تحقيق نفس الهدف بإضافة أى من مضادات الحيوية التجارية مثل الاستربتومايسين ، والأوريوميسين ، والبنسلين ... إلخ ، بتركيز يتراوح عادة من ١٠ – ٣٠٠ جزء فى المليون . ويفيد خلط إثنين أو ثلاثة من مضادات الحيوية بالبيئة فى زيادة أعداد الأنواع البكتيرية التى يوقف نموها . ويجب تعقيم محاليل مضادات الحيوية بالترشيح ، وإضافتها إلى البيئات المعقمة عندما تصبح درجة حرارتها حوالى ٤٥°م ؛ أى قبل تصلبها .

هذا .. ويحتاج عديد من المسببات المرضية إلى بيئات خاصة لعزلها وزراعتها ، وتتوفر المئات من أمثلة هذه البيئات التى يمكن الرجوع إليها فى Dhingra & Sinclair (١٩٨٥) .

أوعية البيئات

تُفرّغ البيئات – بعد تحضيرها – إما فى أنابيب إختبار ، وإما فى دوارق مخروطية بأحجام مختلفة . تملأ أنابيب الاختبار إلى مايقرب من ربعها أو ثلثها فقط ، وتغطى بسدادات قطنية . وتستخدم الدوارق المخروطية الصغيرة كمزارع للفطريات والبكتيريا ؛ حيث يوضع فى قاعها طبقة رقيقة من البيئة . أما الدوارق الأكبر حجما فإنها تستخدم فى ملء أطباق بترى بالبيئة . ويكون تعقيم البيئات فى الأوتوكليف بعد تفريغها فى أنابيب الاختبار أو الدوارق المخروطية .

أنابيب البيئات المائلة Slants

لزيادة سطح البيئات فى أنابيب الاختبار(بغرض زيادة المسطح الذى تنمو عليه البكتيريا ، أو الفطريات) .. يسمح للبيئات – بعد تعقيمها – أن تتلصب وهى فى وضع مائل . ويجرى ذلك إما بوضع أنابيب البيئات على لوح خاص مائل لهذا الغرض ، وإما بوضع السلال المملوءة بأنابيب البيئات فى وضع مائل . ويراعى فى كلتا الحالتين عدم بل سدادات القطن بالبيئة ؛ لأن ذلك يجعل من الصعب تحريك السدادات من مكانها ، ويزيد من فرصة تلوث البيئات .

تعقيم البيئات

يكون تعقيم كل أنواع البيئات فى الأوتوكليف على ١٢١°م ، وتتوقف المدة اللازمة لاكتمال

التعقيم على حجم أوعية البيئات كما يلى :

الـوعاء	المـدة
دوارق مخروطية سعة ٢٠٠٠ – ٣٠٠٠ مل	٢٠ دقيقة
دوارق مخروطية سعة ١٠٠٠ – ١٥٠٠ مل	١٥ دقيقة
دوارق مخروطية سعة ٥٠٠ مل	١٢ دقيقة
دوارق مخروطية سعة ١٢٥ – ٢٥٠ مل	١٠ دقائق
دوارق مخروطية سعة ٥٠ مل	٣ – ٦ دقائق
أنابيب اختبار	٣ – ٦ دقائق

الماء المعقم

يطلق على أنابيب الاختبار التى يحفظ فيها الماء المعقم(ماء الصنبور أو الماء المقطر) اسم Water Blanks . ويوضع عادة نحو ١٠ – ١٥ مل من الماء فى كل أنبوبة اختبار ، ثم تغلق بالقطن وتعقم . كما قد تستخدم أحجام مختلفة من الدوارق المخروطية لنفس الغرض . وتفيد الـ Water Blanks فى تخفيف البيئات المعقمة ، وفى تحضير معقمات البكتيريا أو الجراثيم الفطرية ... إلخ .

عزل المسببات المرضية

عزل الفطريات

لعزل الفطريات من النباتات ، فإن الأجزاء المصابة تغسل أولا فى الماء مع مسحوق الصابون ، ثم تجفف بين مناشف ورقية . ويراعى أن تكون عملية الغسيل لفترة قصيرة بالنسبة للأعضاء النباتية الرهيفة كالأوراق الرقيقة وبتلات الأزهار ، بينما قد يستمر الغسيل لمدة ساعة إلى ساعتين فى ماء جار بالنسبة للجذور .

ويلى غسيل الأجزاء النباتية تطهيرها سطحيا إما باستخدام هيبوكلوريت الصوديوم (الكلوراكس التجارى) بتركيز ٥ – ١٠ ٪ ، وإما باستخدام كلوريد الزئبقيك (محلول السليمانى) بتركيز ١ : ٥٠٠ ، أو ١ : ١٠٠٠ . وتتراوح مدة المعاملة من عدة ثوان إلى عدة

دقائق حسب العضو النباتى وتركيز المحلول المطهر . كما يمكن تطهير الأنسجة الخشبية بغمسها فى كحول إيثيلى ٧٠ ٪ ثم إشعال الكحول . تنقل أجزاء صغيرة من الأنسجة النباتية المصابة إلى سطح بيئة مغذية فى أطباق بترى ، ثم توضع فى الحضان على درجة ٢٠ – ٢٥ °م لمدة ٥ – ١٠ أيام . تستخدم بيئة البطاطس والدكستروز والآجار بصورة روتينية لهذا الغرض ، بينما تستخدم بيئات خاصة لفطريات معينة ؛ فمثلا تستخدم بيئة الآجار والماء لعزل فطر الـ Pythium .

هذا .. ويمكن نقل التراكيب الفطرية التى توجد على النباتات المصابة – كالأجسام الحجرية ، والميسيليوم ، والجراثيم – مباشرة إلى بيئة الآجار . فمثلا يمكن التقاط الأجسام الحجرية وتعقيمها سطحيا ، والتقاط الجراثيم الكبيرة بإبرة تشريح معقمة ، أو أخذ جزء من الجراثيم الكلاميدوسبورية لفطريات التفحم وتخفيفها بالماء قبل نقلها إلى المزارع فى أطباق بترى .

عزل البكتيريا

لعزل البكتيريا من النباتات تغسل الأجزاء المصابة بالماء ، وتجفف كما سبق بيانه بالنسبة للفطريات . يلى ذلك قطع أجزاء صغيرة من الأنسجة المصابة لعمل سلسلة من التخفيفات ، ويتم ذلك إما بوضع الجزء المصاب فى عدة نقاط من الماء المعقم فى طبق بترى، ثم تنقل نقطة منه إلى عدة نقاط من الماء المعقم فى طبق بترى آخر ، وإما بإجراء التخفيف باستخدام سلسلة من أنابيب الاختبار التى يوضع بكل منها ٩ مل من الماء المعقم يضاف إليها مل واحد من المعلق البكتيرى للتخفيف السابق . تستخدم هذه التخفيفات فى زراعة البكتيريا على بيئة الآجار المغذية ، ثم تحضن المزارع على درجة ٢٠ – ٢٥°م لمدة ٥ – ٧ أيام .

هذا .. وقد تغسل الأجزاء النباتية المصابة وتعقم سطحيا ، ثم تزرع مباشرة على بيئة الآجار المغذية كما أسلفنا ، أو قد يؤخذ النمو البكتيرى Bacterial Ooze مباشرة – إن كان ظاهرا – ويخفف ، ثم يزرع على البيئة .

عزل سلالات مفردة من الفيروسات

يمكن الحصول على سلالات مفردة من الفيروسات بعمل عدوى من البقع الصفراء اللون – فى الأوراق المصابة بالموزايك – أو من البقع المحلية Local Lesions ، لتوفُّر عديد من الأدلة على أن كل بقعة محلية تنشأ من جزىء واحد من الفيرس ، وبذا .. فإن استخدام البقع المحلية فى عدوى نباتات تحدث بها إصابات جهازية يعد طريقة عملية لإكثار سلالات الفيرس . ويتعين عند اتباع هذه الطريقة أن تكون البقع المحلية واضحة ومحددة ، وأن يتم اختيار أفضل العوائل لهذا الغرض ، فمثلا : نجد أن N. glutinosa وبعض أصناف الفاصوليا تكون صالحة لعزل سلالات فيرس موزايك التبغ (عن Smith ١٩٧٧) .

ويقدم Kiraly وآخرون (١٩٧٤) عرضا للأسس العامة التى تراعى عند تنقية الفيروسات النباتية ، مع شرح مفصل لطرق تنقية فيرس موزايك الدخان .

عزل النيماتودا

تعزل النيماتودا من التربة والنبات بأخذ عينات من الجذور النباتية والتربة المحيطة بها تمثل الأربعين سنتيمتراً العلوية من التربة . وتحفظ العينات فى أكياس بلاستيكية ، ويراعى عدم تعرضها للجفاف ، أو للحرارة العالية لحين عزل النيماتودا منها ، وهو الأمر الذى يتعين إجراؤه فى غضون ٢٤ ساعة من جمع العينات .

أولا : عزل النيماتودا من التربة

تتبع عدة طرق لعزل النيماتودا من التربة ، وهى تعتمد على أحجام النيماتودا التى تتباين حسب نوعها ، وحسبما إذا كانت ذكرا أم أنثى ، كما فى جدولى (٣-١) ، و (٣-٢) .

١ – الحوصلات Cysts :

تمر حوصلات (الإناث البالغة) للجنس Heterodera خلال مناخل مقاسها ٢٥ مش mesh (أى المناخل التى توجد بها ٢٥ ثقباً فى البوصة الطولية) ، ولكنها تبقى على المناخل التى يكون مقاسها ٦٠ مش . هذا .. وتطفو الحوصلات الجافة على سطح الماء ، ولذا .. يتم أحيانا فصل الحوصلات بتجفيف عينة التربة ، ثم تقليبها جيدا فى كمية كبيرة من الماء ، ثم تفريغها على منخل مقاس ٢٥ مش ، مثبت على منخل آخر مقاس ٦٠ مش ،

حيث تتجمع الحوصلات على المنخل الأخير . ويمكن تجميع الحوصلات غير الجافة بتفريغ معلق التربة فى الماء خلال المنخلين .

جدول (٣ –١) : أحجام مراحل النمو المختلفة لبعض أنواع النيماتودا .

النيماتودا	الأبعـــاد			
	البيض	اليرقات	الإناث البالغة	الذكور البالغة
Meloidogyne spp.	١١٥ × ٥٥	(٥٠٠ – ٦٠٠) ×	(٢٢٠ – ٤٠٠) ×	—
نيماتودا تعقد الجذور	ميكرون	(٢٠ – ٢٥) ميكرون	(٥٠٠ – ٨٠٠) ميكرون	
Belonolaimus spp.			١٫٥ ٢ مم × ٤٠	١٫٧ مم ×
النيماتودا الواخذة			ميكرون	٣٥ ميكروناً
Paratylenchus minutus	١٥ × ٤٠		(١٢ – ١٥) ×	(٩ – ١٠) ×
النيماتودا الدبوسية	ميكروناً		(٢٤٠ – ٣١٠) ميكروناً	(٢٢٠ – ٢٧٠) ميكروناً
Xiphiena index			٣٫٤٠ مم	٤٫٦ مم ×
النيماتودا الخنجرية				٧٥ ميكروناً

جدول (٣–٢) : مقاسات وسعة ثقوب المناخل المستخدمة فى عزل النيماتودا .

المقاس : رقم الشبكة mesh(أ)	سعة الفتحات (ميكرون)	الاستخدامات
٢٠	٨٤٠	تحجز عليها المخلفات النباتية وحبيبات التربة الكبيرة
٦٠	٢٥٠	تحجز عليها حوصلات النيماتودا
١٠٠	١٤٧	تحجز عليها النيماتودا الكبيرة الحجم
٢٠٠	٧٤	تحجز عليها النيماتودا من معظم الأحجام ماعدا الصغيرة جداً
٢٧٠	٥٣	تحجز عليها النيماتودا من جميع الأحجام ، ويمر السلت المعلق فى الماء من خلالها بسهولة
٣٢٥	٤٤	تحجز عليها النيماتودا من جميع الأحجام ، ويمر السلت المعلق فى الماء من خلالها ببطء .

(أ) عدد الفتحات فى البوصة الطولية .

٢ – الديدان الثعبانية :

تعزل الديدان الثعبانية من عينات التربة باستخدام الطرق والأجهزة التالية :

أ – قمع بارمان Baermann Funnel :

يتكون قمع بارمان من قمع زجاجى ذى ساق زجاجية قصيرة مثبت بها أنبوبة مطاطية قصيرة يمكن فتحها أو إغلاقها بواسطة مشبك ، و يثبت فى فوهة القمع شبكة سلكية أو بلاستيكية واسعة الفتحات ، يوضع عليها نسيج مسامى رقيق كالحرير أو الكلينكس . توضع عينة التربة على النسيج المسامى ، ويضاف الماء بالقدر الذى يكاد يبلل هذا النسيج . حينئذ تتحرك النيماتودا النشطة من العينة لتنفذ من خلال المسام إلى ساق القمع ؛ لتستقر – بفعل حركتها والجاذبية الأرضية – فوق مستوى المشبك فى الأنبوبة المطاطية . وبذا .. فإنها تتجمع فى معلق مركز خال تقريبا من حبيبات التربة والشوائب . تسحب النيماتودا من هذا المعلق حسب الحاجة ، حيث تؤخذ العينات بعد مرور ٦ – ٧٢ ساعة من البداية .

تؤثر درجة حرارة الماء ومحتواه من الأكسجين فى نشاط وحركة النيماتودا ، ولذا .. فإن إضافة أزرق الميثيلين تزيد من كفاءة عملية عزل النيماتودا بزيادة توفيره للأكسجين .

يوضع فى كل قمع بقطر ١٠ سم ملء ملعقتين صغيرتين من عينة التربة . وإذا سقطت بعض حبيبات التربة فى قاع الأنبوبة المطاطية فى بداية العمل يمكن التخلص منها بفتح المشبك .. وجدير بالذكر أن النيماتودا غير النشطة والنيماتودا الميتة لا تمر من خلال النسيج المسامى .

ب – الترسيب والنخل Decanting and Sieving :

يجرى عزل النيماتودا من عينات التربة بطريقة الترسيب والنخل كما يلى :

(١) توضع عينة تربة تقدر بنحو ٣٠٠ – ٤٠٠ سم٣ فى دلو .

(٢) يضاف نحو لترين من الماء إلى العينة وتقلب جيدا ، مع تكسير كل القلاقيل .

(٣) يترك المخلوط لمدة ٣٠ ثانية حتى تترسب حبيبات التربة الكبيرة الحجم .

(٤) ينخل الرائق خلال منخل مقاس ٢٠ – ٢٥ مش فى دلو آخر ، ويتم التخلص من البقايا التى تتجمع عليه .

(٥) تكرر الخطوات من ١ – ٤ مرتين إلى خمس مرات حسب الحاجة إلى عزل كل النيماتودا الموجودة فى العينة .

(٦) يتم التخلص من الرواسب الموجودة فى الدلو الأول و يغسل بالماء .

(٧) يفرغ المعلق الموجود فى الدلو الثانى خلال منخل مقاس ٦٠ مش فى الدلو الأول .

(٨) تغسل المتبقيات المحجوزة على المنخل (مقاس ٦٠ مش) ، وتنقل إلى كأس زجاجى . يحتوى هذا الجزء على الحوصلات التى قد تكون موجودة فى عينة التربة .

(٩) يفرغ المعلق الذى مر خلال المنخل (مقاس ٦٠) ببطء خلال منخل مقاس ٢٠٠ أو ٢٧٠مش ، مع جعله مائلا ليتسنى جمع النيماتودا عند حافته .

(١٠) يمكن غسيل المتبقيات على المنخل (مقاس ٢٠٠ أو ٢٧٠ مش) فى كأس زجاجية برذاذ خفيف من الماء يوجه نحو الجانب الخلفى للمنخل ، أو قد يمكن تصريف الماء الزائد الذى تتجمع فيه النيماتودا على حافة المنخل ثم نقل النيماتودا باستخدام ملوق .

جـ – الترسيب والنخل مع قمع بارمان :

توضع النيماتودا – بعد تجميعها بالترسيب والنخل – فى قمع بارمان ، وبذا .. يمكن عزل نيماتودا خالية من السلت بدرجة أكبر مما لو اتبعت أى من الطريقتين منفردة .

ثانياً : عزل النيماتودا من العينات النباتية

يمكن عزل النيماتودا من الأنسجة النباتية بأى من الطرق التالية :

١ – الفحص المباشر بالمنظار الثنائى binocular ، وإخراج النيماتودا من النسيج المصاب .

٢ – باستخدام قمع بارمان .

٣ – بنقع الجذور المصابة فى طبقة رقيقة من الماء لا تغطى الجذور ، ثم جمع النيماتودا – التى تخرج إلى الماء – بعد نحو ١٢ ساعة ، ويستمر ذلك لعدة أيام .

٤ – برش الجذور المصابة برذاذ من الماء على فترات ، واستقبال ماء الرش على منخل مقاس ٢٠ ، ثم فى إناء واسع .تترسب النيماتودا فى قاع الإناء؛ حيث يمكن تصريف الجزء العلوى واستقبال الراسب السفلى – الذى يحتوى على النيماتودا – فى كأس زجاجية .

ويمكن جمع أعداد كبيرة من بيض وبرقات نيماتودا تعقد الجذور لاستخدامها فى العدوى

واختبارات التقييم ، وتتباين الطريقة المتبعة لذلك حسبما إذا كانت كتل البيض الظاهرة من الجذور قليلة ، أم كثيرة ، كما يلى :

١ – عندما تكون كتل البيض الظاهرة من الجذور قليلة :

تغسل الجذور المصابة وتقطع إلى أجزاء صغيرة بطول حوالى ٥مم . يوضع ٥ جم من هذه القطع فى خلاط كهربائى منزلى مع ٥٠٠ مل من الماء ، ويشغّل الخلاط على سرعة منخفضة لمدة ١٥ ثانية . يرشح المعلق الناتج خلال منخل ذى ثقوب بقطر ملليمتر واحد ، ثم فى منخل آخر ذى ثقوب قطرها يتراوح من ١٠ر – ٣٠ر مم ، يلى ذلك غسيل الجزء المتبقى على المنخل الثانى جيدا بالماء ، ثم ينقل بالماء أيضا إلى أنبوبة جهاز طرد مركزى ، ويضاف إليه نحو واحد سنتيمتر مكعب من مسحوق الكولين Kaolin ، وبعد الخلط الجيد ، يعرض المخلوط للطرد المركزى لمدة ٥ دقائق ، ثم يفرغ الجزء الرائق العلوى ، ويضاف للراسب محلول سكر (سكروز) ذو كثافة نوعية ١٥ر١ ، ويقلب المخلوط جيدا ، ثم يعرض للطرد المركزى لمدة ٤ دقائق . يتجمع البيض فى قمة الأنبوبة ؛ حيث يمكن استقباله على منخل دقيق .

٢ – عندما تكون كتل البيض الظاهرة من الجذور كثيرة :

تقلب الجذور المصابة فى الماء جيدا مع الطرق عليها لإسقاط ما بها من كتل بيض فى الماء . وتجمع كتل البيض والشوائب الأخرى على منخل مقاس ٦٠ مش (ذى فتحات ٢٤٢ر٠مم) . يلى ذلك ضرب كتل البيض فى خلاط كهربائى مع ٥٠٠ مل من محلول ١ ٪ هيبوكلوريت الصوديوم لمدة ٤٠ ثانية بغرض فصل البيض من كتل البيض . يفصل البيض بعد ذلك عن الشوائب الكبيرة بإمرار المعلق المحتوى على البيض خلال منخل مقاس ١٠٠ مش (ثقوب قطرها ١٤٩ر٠ مم) ، ثم خلال منخل آخر مقاس ٤٠٠ مش (ثقوب قطرها ٠٣٧ر٠ مم) . ويلى ذلك جمع البيض من على المنخل الأخير بالماء ، ثم تعريضه للطرد المركزى بالماء ، ثم مع محلول السكروز (٤٥٤ جم سكروز / ١٠٠٠ مل ماء) ، ثم الغسيل ، وإزالة الشوائب الصغيرة (عن Taylor & Sasser ١٩٧٨) .

ولمزيد من التفاصيل عن عزل الأنواع المختلفة من النيماتودا من التربة والأنسجة النباتية

يراجع Goody (١٩٦٢) ، و Mckenry & Roberts (١٩٨٥) .

نمو الكائنات الدقيقة فى المزارع

يتخذ منحنى النمو growth curve مع الزمن فى مزارع الكائنات الدقيقة – خاصة الوحيدة الخلية كالبكتيريا – الوضع المبين فى شكل (٣ – ١) . فبعد فترة قصيرة من التوقف عن الانقسام والنمو lag- phase (أ) .. تكون الزيادة فى أعداد الخلايا – مع الوقت – لوغاريتمية Logarithmic (أو أُسّية exponential ، ب) ، و يلى ذلك فترة (جـ) تكون فيها العلاقة خطية Linear بين أعداد الخلايا والوقت ، ثم تتبعها فترة (د) ينخفض فيها معدل الزيادة . وتعرف المرحلة الأخيرة أحيانا باسم الشيخوخة Senescence ، وهى تحدث نتيجة لاستهلاك الغذاء ، أو بسبب تراكم مركبات سامة للنمو . ويعرف المنحنى (١) فى شكل (٣ –١) بالاسم Sigmoid (على شكل حرف S) ، وهو شكل النمو الطبيعى الغالب فى جميع الكائنات الحية وأعضائها المفردة .

وجدير بالذكر أنه إذا أخذت عدة خلايا من مزرعة فى مرحلة شيخوخة ، ونقلت إلى مزرعة جديدة .. فإنها تبدأ مرحلة جديدة من النمو السيجمويد . أما المنحنى (٢) فى شكل (٣ –١) فيوضح العلاقة بين الزيادة فى أعداد الخلايا فى وحدة الزمن ، مع تقدم المزرعة فى العمر .

ويمكن التعبير عن الزيادة فى أعداد الخلايا خلال مرحلة النمو اللوغاريتمى بالمعادلة التالية :

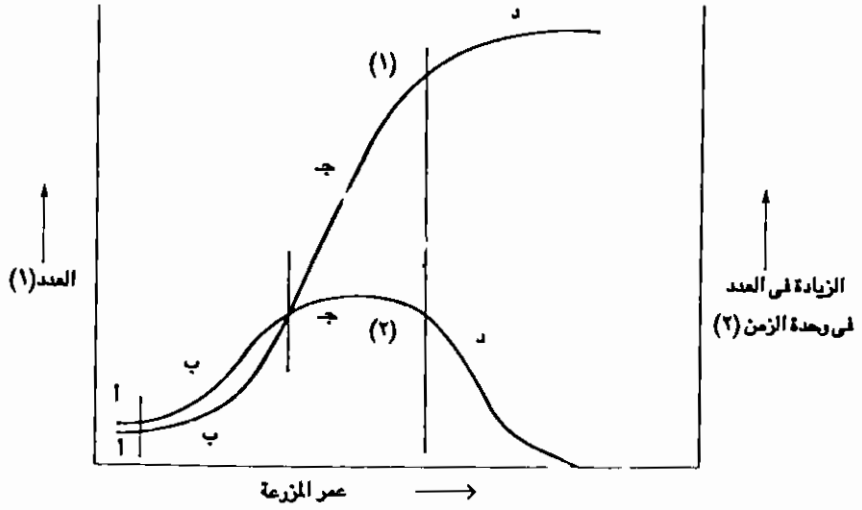
$$\log n_t = \log n_o + Kt$$

حيث :

n_o = عدد الخلايا فى البداية .

n_t = عدد الخلايا بعد زمن t .

K = ثابت (عن Birkett ١٩٧٩) .



شكل (٣-١) : منحنى نمو مزارع الكائنات الدقيقة مع الزمن .

طرق تقدير تركيز المعلق البكتيرى المستخدم فى العدوى الصناعية

تُستخدم لأجل تقدير المعلقات البكتيرية المستعملة فى العدوى الصناعية للنباتات طريقتان رئيسيتان ، هما :

أولاً : طريقة تقدير تعتمد على كثافة المعلق Turbidimetric Measurements

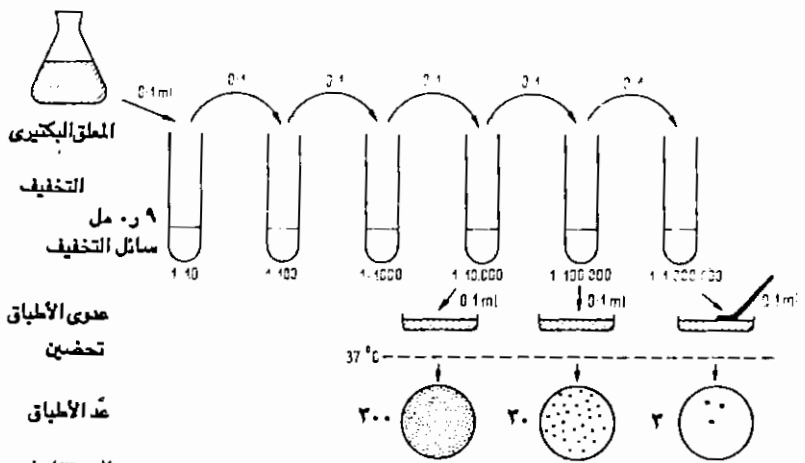
تتميز هذه الطريقة بسرعتها وبساطتها ، ولكن يعاب عليها أنها تعطى تقديرا لتركيز الخلايا البكتيرية الحية والميتة على حد سواء ، مع ضرورة معايرة الجهاز المستخدم عند قياس تركيز كل نوع من الأنواع البكتيرية . تعرف القياسات التى تسجل لتركيز المعلق البكتيرى باسم Photoelectric Measurements ، ويستخدم فى قياسها جهاز الـ Densiometer ، أو الـ Colorimeter، أو Spectrophotometer

وتعتمد فكرة قياس التركيز فى هذه الأجهزة على وضع أنبوبة زجاجية تحتوى على المعلق البكتيرى فى طريق شعاع من الضوء ، ثم قياس كمية الضوء التى تنفذ خلاله وتصل إلى

خلية ضوئية ، حيث يمكن الحصول على تقدير لعدد الخلايا البكتيرية فى كل ملليلتر من المعلق من العلاقة الخطية العكسية التى تربط بين عدد الخلايا ، وشدة الضوء الذى ينفذ من المعلق ، والتى يتم التوصل إليها من دراسات أولية تجرى لكل نوع بكتيرى على حدة . ويراعى دائما ضبط الجهاز على الصفر بوضع أنبوبة مملوءة بالماء أو بالبيئة السائلة قبل وضع الأنبوبة المحتوية على المعلق البكتيرى فى الماء ، أو فى البيئة السائلة ، على التوالى .

ثانيا : طريقة العد فى الأطباق Plant count Techuique

يجرى تخفيف تركيز المعلق البكتيرى بسلسلة من التخفيفات كما هو مبين فى شكل (٣-٢) . تؤخذ عينات معلومة الحجم من المعلق البكتيرى من التخفيفات الثلاثة الأخيرة ، وتفرد على بيئة مناسبة فى طبق بترى ، وتترك لتنمو فيها البكتيريا ، حيث يمكن - من عدد المستعمرات البكتيرية النامية - التوصل إلى تركيز الخلايا البكتيرية فى المعلق الأصلى .



شكل (٣-٢) : طريقة عَد المستعمرات البكتيرية فى الأطباق لتقدير تركيز المعلقات البكتيرية .

يراعى عند اتباع هذه الطريقة استخدام ماصات مختلفة عند إجراء التخفيفات المتتابعة ، و عند نقل جزء من المعلقات المخففة إلى أطباق بترى ، مع نشر المعلق على البيئة باستخدام قضيب زجاجى على شكل حرف L . يعقم القضيب الزجاجى أولا بغمسه

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 آجار 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 :

المرجع	الموضوع
Noordam (١٩٧٣)	طرق التعرف على الفيروسات المسببة للأمراض النباتية .
Kiraly وآخرون (١٩٧٤)	مرجع رئيسى لأهم الاختبارات التى تجرى للتعرف على خصائص المسببات المرضية ، خاصة البكتيرية والفيروسية .
١٩٧٨ Taylor & Sasser	شرح مفصل لطرق التعرف على أهم أنواع نيماتودا تعقد الجذور وسلالاتها .
Schaad (١٩٨٠)	اختبارات التعرف على البكتيريا المسببة للأمراض النباتية .
Lelliott & Stead (١٩٨٧)	اختبار التعرف على الأمراض البكتيرية ومسبباتها .

تقدير أعداد البكتيريا فى الأنسجة النباتية المصابة

يلزم أحيانا تتبع أعداد البكتيريا فى الأنسجة النباتية المصابة ، ويجرى ذلك بطريقة العد فى الأطباق Plate Count Technique التى سبقت الإشارة إليها . ويوضح شكل (٣ -٣) كيفية تحضير سلسلة من التخفيفات للبكتيريا التى يحصل عليها من النسيج النباتى المصاب . يراعى غسيل العضو النباتى المستعمل أولا وتطهيره سطحيا ، ثم تؤخذ منه أقراص صغيرة باستعمال ثاقبة فلين . تهرس الأقراص فى هاون صينى ، مع استعمال ١ر٠ مل من الماء لكل قرص من الأنسجة الورقية ، ويستمر الاختبار كما فى طريقة العد فى الأطباق.

تحديد هوية الفيروسات المسببة للأمراض النباتية

يلزم فى هذا الصدد التفريق بين السلالات المختلفة لنفس الفيرس ، وبين الفيروسات المختلفة التى تنتمى لنفس مجموعة الفيروسات ، والفيروسات المختلفة كلية عن بعضها البعض ، كما يلى :

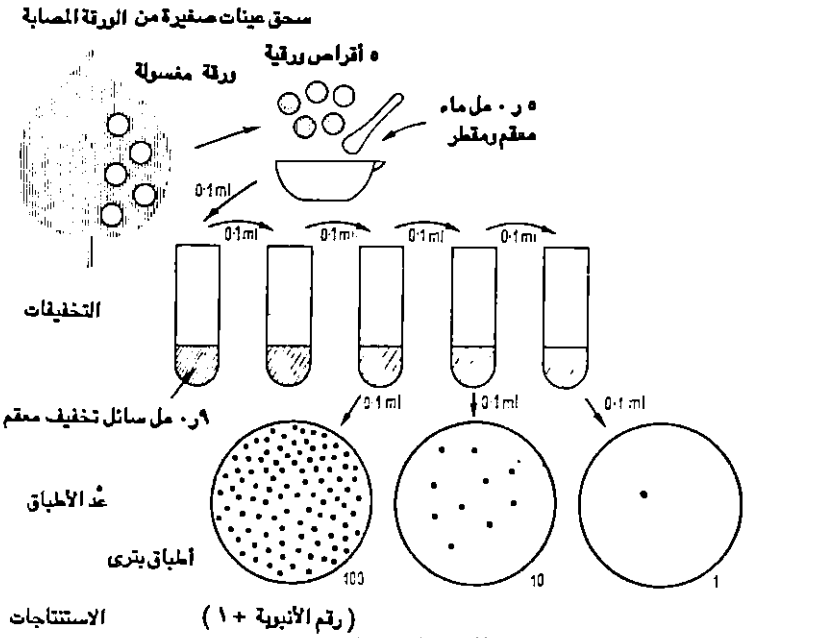
أولا : تختلف الفيروسات غير القريبة Unrelated عن بعضها فى صفة أو أكثر من الصفات الثابتة وراثيا ، مثل :

١ - نوع الحامض النووى وخصائصه .

٢ - حجم جزيئاته ، وشكلها ، ومدى تساوقها .

٣ - حجم وعدد البولى بيبتيدات فى جزىء الفيرس .

٤ - قدرة الجزيئات على التفاعل مع مضادات السيرم لجزيئات الفيروسات الأخرى .



شكل (٣ -٣) : طريقة عدّ المستعمرات البكتيرية فى الأطباق لتقدير تركيز المعلقات البكتيرية .

٥ – نوع الأعراض المرضية التى تحدثها فى عوائلها .

٦ – المجموعة التى تنتمى إليها الكائنات الناقلة له .

٧ – طبيعة العلاقة بين الفيرس والكائن أو الكائنات الناقلة له .

ثانياً : تشترك الفيروسات التى تنتمى إلى نفس المجموعة الفيروسية فى خاصية أو أكثر من الخصائص السابقة ، ولكنها قد تتميز بما يلى :

١ – الاختلاف فى بنية الغلاف البروتينى من الأحماض الأمينية بالقدر الذى يجعل لكل فيرس خصائص سيرولوجية ، وإليكتروفوريتية electrophoretic (الحركة فى المجال الكهربائى) تميزه عن غيره من الفيروسات .

٢ – يكون لها أنواع مختلفة من الكائنات الناقلة لها ، ولكنها تكون قريبة من بعضها .

٣ – تختلف فى مدى عوائلها وشدة الأعراض التى تحدث بها ، ولكنها تتشابه فى نوع الأعراض المرضية التى تحدثها .

ثالثاً : تتشابه سلالات الفيرس الواحد فى معظم الخصائص ، ولكنها غالبا :

١ – تختلف قليلا فى بنية الغلاف البروتينى من الأحماض الأمينية ، ولذا .. فإنها تختلف قليلا فى خصائصها السيرولوجية والإليكتروفوريتية .

٢ – تختلف فى نوع Species الكائن الناقل لها ، أو فى مدى سهولة انتقالها به .

٣ – تحدث أعراضا تختلف فى شدتها (Gibbs & Harrison ١٩٧٦) .

يستدل على هوية الفيروسات النباتية بعديد من الشواهد والاختبارات ، ويستفاد من بعض هذه الاختبارات فى دراسات التربية لمقاومة هذه الفيروسات ، ولذا .. فإننا نذكر – فيما يلى – بعضا من هذه الطرق ؛ لتكون دليلا للمربى فى هذا المجال .

أولاً: أعراض الإصابات الفيروسية

برغم أنه لايمكن الاعتماد كلية على أعراض الإصابة فى تحديد هوية الفيروسات المسببة للأمراض النباتية ، إلا أنها تعد مرشدا هاما فى هذا الشأن يمكن أن يوجه الباحث نحو الاتجاه الصحيح من حيث كون الإصابة فيروسية ، أم غير فيروسية ، ومن حيث حصرها فى مجموعة فيروسات معينة تتشابه من حيث الأعراض التى تحدثها للنباتات .

ويجب أن يراعى أن نفس الأعراض المشاهدة يمكن أن تحدثها الإصابة بفيروسات مختلفة ، كما أن الفيرس الواحد يمكن أن يحدث مدى من الأعراض ، ويتوقف ذلك على التركيب الوراثى للعائل والظروف البيئية . هذا .. ولا يستدل – بالضرورة – من اختفاء الأعراض على عدم وجود إصابات فيروسية ، فقد تكون الإصابة كامنة أو مستترة Latent . ونتناول – فيما يلى – أعراض الإصابات الفيروسية بشىء من التفصيل .

١ – المظهر العام للإصابة :

يتباين المظهر العام للنباتات المصابة بالفيروسات ، فقد تأخذ الأعراض مظهر تغيرات فى اللون ، أو تقزم Dwarfing ، أو توقف عن النمو Stunting، أو تورد Rosetting (نتيجة لقصر السلاميات ؛ مما يجعل الأوراق متقاربة من بعضها ، كما تتقارب بتلات الوردة) ، أو شكل المكنسة Witches' Broom (نتيجة لزيادة التبرعم ، والتفرع مع التقزم

وقصر السلاميات) ، أو التدهور Decline (نتيجة لفقد قوة النمو) الذى قد يشمل النبات كله، أو أجزاء منه .

٢ – الانحرافات فى اللون :

أ – الأوراق :

(١) تغيرات اللون المتجانسة التوزيع :

قد تكون تغيرات اللون متجانسة التوزيع على كل سطح الورقة ، ويتضمن ذلك : اللون الأخضر الباهت chlorosis ، واللون الأبيض bleaching ، و الاصفرار yellowing ، والاحمرار reddening ؛ بتكوين صبغة الأنثوسيانين ، (وهو ما قد يختلط بأعراض نقص العناصر) ، والتلون البنى browning والأسود blackening ؛ بتكوين مركبات الميلانين القاتمة اللون ، والتلون البرونزى bronzing ؛ نتيجة لتحلل وانهيار خلايا البشرة مع بقاء النسيج الوسطى سليما (وهو ما قد يختلط بأعراض الإصابة بالعنكبوت الأحمر) .

(٢) تغيرات اللون غير المتجانسة التوزيع :

قد تكون تغيرات اللون غير متجانسة التوزيع ، ويتضمن ذلك ما يلى :

(أ) الموزايك Mosaic :

يتميز الموزايك بظهور مناطق خضراء باهتة اللون ، أو صفراء متبادلة على سطح الورقة مع مناطق خضراء تكون هذه المناطق ذات زوايا ؛ حيث تحدها العروق الصغيرة التى توجد بالورقة .

(ب) التبرقش Mottling :

تكون المناطق المختلفة فى اللون متبادلة مع المناطق الطبيعية اللون كما فى الموزايك ، إلا أنها تكون متداخلة مع بعضها ، وذات حواف دائرية .

(جـ) البقع الموضعية Local Lesions :

تتراوح البقع الموضعية فى المساحة من بقع صغيرة مثل سن الدبوس pin - point إلى

مساحات كبيرة غير منتظمة الشكل . وتكون هذه البقع صفراء ، أو متحللة .

(د) البقع الحلقية Ringspots :

قد تكون الحلقات مفردة ، أو عديدة ومتتابعة حول مركز واحد للبقعة Concentric ، وتشمل أنسجة صفراء أو متحللة يفصل بينها نسيج سليم .

(هـ) التخطيط Streaking :

يظهر التخطيط على شكل مناطق صفراء طويلة ذات حدود واضحة .

(٣) تغيرات اللون المتجانسة التوزيع على أجزاء معينة من الورقة .. ويتضمن ذلك مايلى:

(أ) اصفرار العروق Vein Yellowing:

يظهر اللون الأصفر على العروق نتيجة لغياب الكلوروفيل مع بروزلون الكاروتينات والزانثوفيللات .

(ب) شفافية العروق Vein Clearing :

تبدو العروق نصف شفافة Translucent .

(جـ) تحوط العروق Vein Banding :

تبدو العروق محاطة بمناطق مختلفة اللون عن بقية نصل الورقة .

(د) تحلل العروق Vein Necrosis :

يكون ذلك مصاحبا بموت النسيج الوعائى فى الورقة وتحلله واكتسابه لونا بنيا .

ب – الأزهار :

إن من أهم التغيرات فى لون الأزهار ما يلى :

(١) تحول الأجزاء الزهرية إلى أوراق خضرية Phyllody :

(٢) انحرافات فى لون بتلات الزهرة بزيادة شدة اللون ، أو ضعفه ، أو حدوث تغير فى

الصبغات التى توجد فى طبقة البشرة فى بتلات الزهرة

(٣) تغير فجائى Breaking ، يكون عادة على صورة نقط ، أو خطوط ، أو أجزاء من نسيج متغير اللون ، وهى أعراض قد تختلط مع التغيرات الوراثية .

(٤) الاخضرار العام للبتلات Verescence .

جـ – الثمار :

قد تشمل التغيرات فى لون الثمار كل الثمرة ، أو أجزاء منها ، وتكون هذه التغيرات على شكل تعريق (مثل الرخام) Marbling ، أو تبرقش ، أو تبقع Spotting .

د – الجذور :

قد تكون التغيرات فى لون الجذور على شكل بقع ، أو تحلل .

٢ – التشوهات Malformations :

قد تشمل التشوهات أيا من الأجزاء النباتية كما يلى :

أ – الأوراق :

قد تظهر تشوهات الأوراق على إحدى الصور التالية :

(١) تحرف أو تشوه Distortion .. مثل التغضن Crinkling ، والالتفاف Curling ، والالتواء Twisting .

(٢) الانحناء لأسفل Epinasty .

(٣) ضيق نصل الورقة Narrowing مع بقاء نمو العروق طبيعيا تقريبا .

(٤) صغر الحجم .

(٥) زيادة السمك .. وقد يشمل ذلك كل نصل الورقة ، أو أجزاء منه ، أو يقتصر على العروق .

(٦) تكون بروزات على نصل الورقة Enation يترتب عليها غالبا التفافها .

ب – الأزهار .. تحدث بها أنواع مختلفة من التشوهات ، وقد تظهر أجزاء زهرية غير طبيعية .

جـ – الثمار .. تتكون ثمار مشوهة وذات أشكال غير منتظمة ، كما قد تتكون تورمات سرطانية ، وقد تفشل البذور فى إكمال تكوينها .

د – السيقان .. تحدث بها تشوهات ، وقد تقصر السلاميات .

هـ – الجذور .. قد تتحلل ، أو تموت من القمة نحو القاعدة dieback ، وقد تتكون بها أورام سرطانية .

٤ – أعراض أخرى :

تشمل الأعراض الأخرى للإصابات الفيروسية : الذبول ، و سقوط الأوراق Defoliation ، والسقوط المبكر للأوراق ، والانحراف عن العدد الطبيعى للأزهار ، والإزهار المبكر أو المتأخر عن الموعد الطبيعى، وظهور طعم غير طبيعى للثمار ، وتكوين إفرازات غير طبيعية ، والتصمغ gummosis ، وحرشفة القلف Bark Scalling ، وتكون النقر بالخشب Wood Pitting ، وتورم النموات الخضرية ، وعدم توافق الطعوم Graft Incompatibility .

٥ – احتجاب الأعراض Masking of Symptoms :

لا تظهر أية أعراض للإصابة بالفيروسات – تحت بعض الظروف – بالرغم من وجود الفيرس فى النبات ، وهى الحالة التى تعرف باسم الإصابة الكامنة Latent Infection ، وترجع إلى عوامل بيئية خاصة كدرجة الحرارة ، والضوء ، ونقص أو زيادة العناصر الغذائية .

٦ – تحمل الإصابة Tolerance :

تظهر حالة تحمل الإصابة عندما لا تظهر أية أعراض مرضية على النبات بالرغم من حمله للفيرس ، وهى ترجع إلى التركيب الوراثى للعائل .

٧ – العوامل المسببة لأعراض شبيهة بأعراض الإصابات الفيروسية :

من أهم هذه العوامل الطفرات التى تتسبب فى ظهور نموات غير طبيعية ، ونقص

العناصر ، وأضرار مبيدات الحشائش ، و أضرار الإصابات الحشرية والأكاروسية ، وأضرار ملوثات الهواء الجوى .

وتتميز جميع هذه الحالات بأن أعراضها لاتنتقل خلال التطعيم ، أو مع العصير الخلوى.

ثانياً: وسائل انتقال الإصابة بالفيرس

يعد تحديد الوسائل التى ينتقل بها الفيرس فى الطبيعة أمرا بالغ الأهمية ، وليس فقط لتحديد هوية الفيرس ، و إنما كذلك لدراسات التربية لمقاومة الفيرس ، وفضلاً عما لذلك من أهمية بالغة فى التعرف على أكثر الوسائل فاعلية فى مكافحة الفيرس . ولذا .. فإننا نتناول موضوع انتقال الفيروسات إلى النباتات بالتفصيل فى موضع آخر من هذا الكتاب .

ثالثاً: تحديد حجم الفيرس وشكله

يتحدد حجم وشكل الفيرس بواسطة الميكرسكوب الأليكترونى ، ويستخدم لذلك تحضيرات نقية ، أو شبه نقية semi - purified من الفيرس ؛ الأمر الذى يتطلب عدة دورات من الطرد المركزى السريع والبطىء ، يعقبها طرد مركزى يعتمد على الكثافة Centrifugation Density ويمكن كذلك إجراء الفحص باسخدام العصير الخلوى للنبات . وللتفاصيل الخاصة بهذه الطريقة .. يراجع Green (١٩٨٤) .

رابعاً: تحديد الخصائص الطبيعية للفيرس

من أهم الخصائص الطبيعية التى تفيد فى التعرف على هوية الفيرس ما يلى :

١ – درجة الحرارة المثبطة للفيرس Thermal Inactivation Point :

تعرف درجة الحرارة المثبطة للفيرس بأنها الدرجة التى تلزم لتثبيط نشاط الفيرس – فى العصير الخلوى – تماما خلال فترة تعرض للحرارة مقدارها عشر دقائق .

ولإجراء اختبار درجة الحرارة المثبطة للفيرس .. يتم تحضير العصير الحلوى للنبات المصاب بالفيرس فى محلول منظم مناسب ، ثم ترشيحه ، وإضافة ملليلترين من الراشح إلى كل واحدة من ثمانى أنابيب خاصة ذات غطاء بـ " قلاووظ " توضع هذه الأنابيب فى

حمامات مائية ذات درجات حرارة تتراوح من ٣٠ – ١٠٠°م بفارق ١٠°م بينها . تترك الأنابيب فى الحمامات المائية لمدة ١٠ دقائق ، ثم تخفض حرارتها بسرعة ؛ بتعريضها لتيار من الماء البارد . ويلى ذلك اختبار فاعلية الفيرس بعد المعاملة باستخدامه فى عدوى نباتات قابلة للإصابة ، ويفضل أن تكون النباتات من التى يحدث فيها الفيرس بقعا موضعية .

تلاحظ النباتات المختبرة لمدة أربعة أيام إلى ثلاثة أسابيع ، وعلى ضوء النتائج .. يحدد المجال الحرارى الذى يحدث عنده التثبيط (مثلاً من ٦٠ – ٧٠°م) . ولتحديد درجة الحرارة التى يحدث عندها التثبيط .. يكرر الاختبار السابق مع استخدام حمامات مائية ذات درجات حرارة تتراوح من ٥٩ – ٧١ °م بفارق ثلاث درجات ، حيث تكون درجة الحرارة المثبطة للفيرس هى أقل درجة حرارة لا يصاحبها ظهور أية أعراض للإصابة بالفيرس .

ويقدر معامل التثبيط الحرارى Thermal Inactivation Coefficient للفيرس – فى الحالات التى يُحدث فيها الفيرس بقعا موضعية على النباتات المختبرة – كما يلى :

$$Q_t = \frac{C_o - C_T}{C_o - C_{T-t}}$$

حيث :

Q_t = معامل التثبيط الحرارى الذى يرتبط بفرق فى درجة الحرارة قدره t .

C_o = التركيز الأصلى للفيرس (عدد البقع الموضعية التى يحدثها العصير الخلوى غير المعامل حراريا) .

C_T = تركيز الفيرس بعد معاملته حراريا عند درجة حرارة T.

C_{T-t} = تركيز الفيرس بعد معاملته حراريا عند درجة حرارة مقدرها (T – t).

وتكون قيمة t عاده ١٠ درجات مئوية ، كما تكون قيمة Q_t أكثر دقة كلما كانت T أقل قليلا من درجة التثبيط الحرارى .

٢ – فترة احتفاظ الفيرس – وهو خارج العائل – بقدرته على إحداث

الإصـــابة In Vitro Longevity :

تعرف هذه الفترة بأنها المدة التى يظل معها الفيرس – المحمول فى العصير الخلوى المستخلص من النبات المصاب – قادرا على إحداث الإصابة ، مع حفظ العصير الخلوى خلال تلك الفترة فى درجة حرارة الغرفة (٢٠ – ٢٢°م) .

وتقدر تلك الفترة بتحضير عصير خلوى رائق (مرشح) لنبات مصاب ، ويضاف إليه ٠,١ ٪ ستربتوميسين ، أو أوريوميسين Aureomycin لمنع أى تلوث بكتيرى . ويلى ذلك وضع العصير المعامل فى أنابيب ذات غطاء بـ " قلاووظ " بمعدل ملليلترين من العصير بكل أنبوبة . ويستخدم العصير المخزن بهذه الطريقة فى عدوى عائل مناسب ، ويفضل أن يكون من العوائل التى يحدث فيها الفيرس بقعا موضعية .

يجرى اختبار فاعلية الفيرس بعد ١ ، و٣ ، و٦ ، و٩ ، و١٢، و١٥ ، و ٣٠ ، و ٦٠ ، و٩٠ ، و ١٥٠ يوما من التخزين . وإذا اتضح أن مدة احتفاظ الفيرس بفاعليته تقع بين فترتين متباعدتين (مثل بين ١٥ ، و ٣٠ ، أو بين ٣٠ ، و ٦٠ يوما) .. لزم إعادة الاختبار ، مع قصر معاملات التخزين فى حدود الفترتين اللتين دل عليها الاختبار الأول ، و اختبار فاعلية الفيرس كل ٢ – ٥ أيام .

وإذا أجرى هذا الاختبار على فيرس يحدث بقعا موضعية على عوائل دالة indicator hosts ، فإنه يمكن تقدير " فترة نصف الحياة " Half- Life time – وهى الفترة التى تفقد فيها عشيرة متجانسة من الفيرس نصف نشاطها – حسب المعادلة التالية :

$$t_{1/2} = \frac{T \log 2}{\log P_0 - \log P_1}$$

حيث إن :

$t_{1/2}$ = فترة نصف الحياة .

P_0 = نشاط العشيرة الأصلية (العصير الخلوى المستخلص قبل تخزينه) .

P_1 = نشاط العشيرة بعد مرور فترة مقدارها T .

T = فترة المعاملة .

٣ – نقطة التخفيف النهائى Dilution End Point :

تعرف نقطة التخفيف النهائى بأنها أقصى تخفيف ممكن للعصير الخلوى للنبات المصاب يسمح باستمرار احتفاظه بالقدرة على إحداث الإصابة بالفيرس .

وتقدر نقطة التخفيف النهائى بسحق أوراق نبات مصاب (فى هاون صينى) مع كمية قليلة من محلول منظم buffer مناسب ، ثم تحضير سلسلة من التخفيفات من العصير الخلوى تتراوح من ١٠ $^{-١}$ إلى ١٠ $^{-٨}$ بفارق ١٠ $^{-١}$. يحضر كل تخفيف برج التخفيف السابق له جيدا ، ثم يؤخذ منه ملليلتر ويخفف بـ ٩ مل من المحلول المنظم . تستخدم هذه المستويات من العصير الخلوى الأصلى والمخفف فى عدوى عائل مناسب ، و يفضل أن يكون من العوائل التى يُحدث فيها بقعا موضعية . وبناء على نتيجة الاختبار .. يحدد أقصى تخفيف يستمر معه الفيرس فى إحداث الإصابة .

خامساً : التعرف على مدى عوائل الفيرس Virus Host Range

يجرى الاختبار – فى حالة الفيروسات التى تنقل ميكانيكا – بسحق جزء من أوراق مصابة فى هاون صينى مع خمسة أجزاء من محلول منظم مناسب ، وترشيح الناتج بعصره خلال قطعة من الشاش المعقم ، ثم يستخدم العصير الرائق فى عدوى أكبر عدد ممكن من الأنواع النباتية .

سادساً : الاختبارات السيرولوجية Serological Tests

تعتمد معظم الاختبارات السيرولوجية على الترسيب الذى يحدث عند تقابل واتحاد الأجسام المضادة antibodies (السيرم المنيع antiserum) مع الأنتيجينات (الفيرس). ويجب تحضير السيرم المنيع باستخدام تحضيرات نقية أو شبه نقية من الفيرس . كما يمكن الحصول على السيرم المنيع لكثيرمن الفيروسات من :

ATCC(American Type Culture Collection)
12301 Parklawn Drive
Rockville
Maryland 20852
USA

(عن Green ١٩٨٤) .

استخدام الأرانب فى إنتاج السيرم المنيع للفيروسات

يجب أن تكون الأرانب المستخدمة فى إنتاج السيرم المنيع Antiserum كبيرة الحجم ، وأن تكون آذانها كبيرة وذات عروق واضحة .

تستخدم حقن بحجم ملليلتر واحد مع ضرورة أن تكون إبرتها دقيقة . تملأ الحقنة بتحضير الفيرس ، ويطرد منها الهواء ، ثم تُحقن بها الأرانب داخل العرق الذى يمتد بطول السطح العلوى للأذن بمحازاة الحافة ، وعلى مسافة ٣ – ٤ مم منها . ولاتفيد محاولة استخدام العروق الأخرى برغم أن بعضها يبدو أكبر حجما .

وفى حالة إعطاء الأرنب سلسلة من الحقن فإنه يفضل إعطاء الأولى منها قرب نهاية الأذن ، ثم تعطى الباقيات فى مواضع متتالية تقترب من قاعدة الأذن تدريجيا .

وبعد مرور أسبوعين من الحقن .. تتم إسالة دم الأرنب من الأذن الأخرى بعمل قطع صغير فى العرق الحافى بالقرب من قاعدة الأذن باستعمال مشرط حاد . وفى حالة عمل سلسلة من القطوع لإسالة مزيد من دم الأرنب فإنه يفضل عملها فى مواضع متتالية تقترب من طرف الأذن تدريجيا .

يجمع الدم فى أنبوبة اختبار ، ويترك لعدة ساعات حتى يتخثر ، ثم يفرغ السيرم المنيع ويوضع فى جهاز طرد مركزى للتخلص من أية خلايا دم حمراء قد تكون متبقية فيه .

وجدير بالذكر أن هذا السيرم المنيع لا يكون معقما ، ولذا .. يجب تخزينه فى ظروف جيدة تمنع النمو البكتيرى فيه (Smith ١٩٧٧) .

وأكثر الإختبارات السيرولوجية استخداما ما يلى :

١ – اختبار الترسيب الدقيق Microprecipitation test فى أنابيب اختبار صغيرة.

٢ – اختبار أو شترلونى Ouchterlony agar gel double diffusion test فى أطباق بترى .

٣ – اختبار المناعة المرئى بالميكرسكوب الإليكترونى Immunosorbent electron

. (ISEM) microscopy

٤ – اخـــتـــبـــار المـــنـــاعـــة المـــرتـــبـــط بالإنـــزيـــمـــات Enzyme - linked immunosorbent assay (اختصاراً : ELISA) .

يمكن إجراء الاختبارات السابقة باستخدام العصير الخلوى العادى ، أو الرائق ، أو الفيرس النقى .

ولمزيد من التفاصيل عن الاختبارات السيرولوجية التقليدية .. يراجع Ball(١٩٦١) .