مقالات متنوعة عن الطرق المعملية للتعرف على الإصابات المرضية للنباتات
Isolation and Identification of Plant Pathogens

إعداد

د. محمد عبد الرحمن الوكيل

أستاذ أمراض النبات المتفرغ
جامعة المنصورة
mwakil.net
E-mail: mawakil@mans.edu.eg

إبريل ٢٠١٩

Fact Sheet (1)

المقالة الأولى: تشخيص أمراض النبات

Diagnosis of Plant Diseases

التشخيص هو التعرف على المرض وهو فن علمى مبنى على رد فعل النبات لمسبب ما ويبدأ ذلك بتحديد إذا ما كان المسبب المرضى طفيل أو ظروف بيئية غير مناسبة فإذا كان المسبب طفيل فإن المرض يقع تحت قسم الامراض المعدية.

أولاً: الأمراض المعدية:

- **تتصف الأمراض المعدية بوجود المسبب المرضى على أو فى النبات.**
- **وجود المسبب المرضى على سطح النبات فى صورة نشطة قد يعطى مؤشراً لأن هذا الطفيل هو السبب فى تلك الأعراض.**
- **فى بعض الأحيان يمكن بالعين المجردة أو بواسطة عدسة مكبرة التعرف على المسبب.**
- **بعض المسببات المرضية تحتاج إلى فحص ميكرسكوبى.**
- **إذا لم يتواجد المسبب على سطح النبات فإنة من الضرورى النظر بعمق إلى أعراض إضافية خاصة عندما يكون المسبب المرضى داخل النسيج النباتى.**

وفى العادة يوجد المسبب المرضى عند حواف الأنسجة المصابة أو النسيج الوعائى أو عند قاعدة النبات أو على الجذور.

أ- النباتات الزهرية المتطفلة (هالوك - حامول - عدار)

مجرد وجود هذه النباتات متطفلة على العائل يعتبر دليلاً كافياً على أنها هي السبب فى حدوث الحالة المرضية.

ب- الأمراض المتسببة عن النيماتودا

وجود النيماتودا المتطفلة (التى تتميز بوجود رمح Stylet) يشير إلى إحتمال أن تكون هذه النيماتودا هى السبب فى حدوث المرض أو على الأقل لها دور مشترك فى ظهور المرض فإذا أمكن تحديد نوع النيماتودا أو جنسها فيمكن تقدير اذا ما كانت هذة النيماتودا هى المسبب للمرض أم لا.

ج- الفطريات والبكتيريا

إذا ما وجدت جراثيم الفطر أو الميسليوم أو الخلايا البكتيرية على المساحة المتأثرة من النبات فإنة يوجد إحتمالين يجب أخذهم فى الإعتبار.

الأول : ربما يكون هذا الكائن هو المسبب لهذه الأعراض المرضية.

الثانى : وربما تكون هذه التكوينات تابعة للطفيليات المترممة التى يمكنها النمو على أنسجة سبق أن ماتت نتيجة الإصابة بمسببات مرضية أخرى سواء كانت بكتيريا أو فطريات أو غيرها.

١ - الفطريات Fungi

لتحديد اذا ما كان الفطر المعزول هو المسبب المرضى Pathogen أم أنة نما رميا Saprophyte فإن ذلك يحتاج الى فحص ميكرسكوبى لدراسة مورفولوجيا الفطر من ميسليوم أو أجسام ثمرية أو جراثيم ومن هذة يمكن تحديد إذا ما كان الفطر رمياً ام طفيلياً حسب ما هو معروف عنة فى المراجع المتخصصة لعلم الفطريات. فإذا تطابق العزل مع ما هو موجود فى المراجع فيمكن الإعتماد على هذة النتائج. وإذا لم يعرف عن هذا الفطر إنة يسبب أمراضاً لهذة النباتات فيمكن إعتبارة من الفطريات المترممة وعنئذ يجب البحث عن المسبب الحقيقى للمرض.

٢ - البكتيريا Bacteria ومفردها بكتيره Bacterium

يعتمد تشخيص الأمراض البكتيرية وتعريف المسبب المرضى على الأعراض ووجود أعداد كبيرة من الخلايا البكتيرية فى النسبج المصاب مع غياب أى كائن حى آخر فى نفس المكان. ومن الثابت أن البكتيريا الممرضة للنبات فى معظمها عصويات قصيرة سالبة لجرام عادة ويمكن مشاهدتها بالميكرسكوب المركب كما انه ليس لها صفات مورفولوجية يمكن الإعتماد عليها فى التعريف لذلك يجب الإحتياط الشديد لإستبعاد البكتيريا المترممة والنامية على الأنسجة الميتة والتى سبق أن قتلت بواسطة مسببات مرضية أخرى.

وأسهل وسيلة لأثبات أن هذة البكتيريا ممرضة هى عزلها على بيئة غذائية وتنقيتها ثم إعادة العدوى بها للنباتات القابلة للإصابة بهذة البكتيريا ثم متابعة الأعراض فإذا ظهرت نفس الأعراض فيمكن

الإعتماد نسبياً على إنها هى السبب الرئيسى للمرض. وتعتبر هذة أسرع الطرق واسهلها ويمكن مضاهاتها بما هو معروف من قبل عن هذة المسببات.

وحديثاً توجد طرق تعريف بيوكيمائية بإستخدام تقنية البيولوجيا الجزئية والأنشطة الإنزيمية للبكتيريا فى صورة Kits خاصة.

د. الأمراض المتسببة عن الفيروسات Viruses - الفيرودات viroids - الفيتوبلازما phytoplasma - سبيروبلازما spiroplasma - الفيروسيدات virusoids.

هذه المسببات المرضية أكثر صعوبة فى تعريفها حيث يتحكم فى ذلك عاملين:

١ - صغيرة الحجم جداً وتكون أجسام شفافة وأعداداها قليلة عادة....الخ - لايمكن مشاهدتها بالميكرسكوب المركب وطبيعة توزيعها فى كل اجزاء النبات يجعل من الصعب مشاهدتها حتى بواسطة الميكرسكوب الإلكترونى.

٢ - أعراضها غير متخصصة ومتشابهة لبعضها البعض وأيضاً للأعراض الناشئة عن الظروف البيئية الغير مناسبة أو أضرار الحشرات أو المسببات المرضية الأخرى التى تصيب المجموع الجذرى.

وبالرغم من ذلك فإن هناك بعض الأمراض الناشئة عن هذة المسببات من السهل فى الوقت الحالى التعرف عليها حيث تعطى أعراضاً ثابتة ومميزة.

أما الطرق المتاحة للتعرف على هذة المسببات فهى:

١ - عدوى عدة عوائل بالمسبب المعزول ومقارنة مظهر الإصابة بما هو معروف عنها من قبل وتسمى هذه بالعوائل المفرقة.

٢ - الفحص بالميكرسكوب الإلكترونى.

٣ - معاملة النباتات المصابة بالمضادات الحيوية لمعرفة مدى تأثيرها وحساسيتها لمركبات التتراسيكلين والبنسلين.

٤ - العلاج الحرارى Thermotherapy

وهناك طرق حديثة أخرى تستخدم فى التشخيص منها طرق الـ Biolog , Api تستخدم للتشخيص السريع.

ثانياً: الأمراض الغير معدية:

- **إذا لم يتواجد مسبب مرضى فإنة من المفترض أن يكون المسبب المرضى عامل غير حى. وعموماً فإن المسببات الغير معدية غير محدودة العدد وقد يحدث تداخل فيما بينها.**
- **بتتبع الظروف البيئية يمكن الحكم على بعضها مثل زيادة مياة الرى - سمية بعض المبيدات - تلوث الجو - الحرارة المرتفعة والمنخفضة....الخ.**

Fact Sheet (2)

المقالة الثانية: تقدير وتعريف البكتيريا في الأنسجه النباتيه

Detection and Identification of Bacteria

تعتمد كفاءه المقاومه علي درجه النجاح في إجراء إختيار سريع ودقيق في تعريف البكتيريا وتقدير كثافتها.

طرق تقدير كثافه البكتيريا في الأجزاء النباتيه المختلفه بما فيها البذور

أ ـ طرق مباشره .

ب ـ طرق غير مباشره.

ـ تعتمد هذه الطرق علي عده عوامل هي: الغرض المطلوب (هل بحث علمي أو إجراء روتيني)

ـ موقع البكتيريا في النبات ـ عامل الزمن (هل مطلوب الأختيار علي وجه السرعه أم ان هناك متسع من الوقت) ـ الأجهزه المعاونه ومدي توافرها ـ مهاره المشخصين كثافه البكتيريا في العينه ـ مستوي تعداد البكتيريا في الجزء النباتي والذي عنده تموت الأعراض.

أ ـ الطـــرق المبـــــــاشرة

DIRECT DETECTION

- **البـــــــذور:**

١ ـ طريقه الانبات والنمو Growing – On – Test

- **يعتمد تنفيذ هذه الطريقه علي زراعه البذور المحتمل إصابتها مباشره في التربه ثم متابعه الأعراض المرضيه المتوقع ظهورها علي هذه العينه من النباتات.**
- **ويمكن تنفيذ هذه الطريقه في الصوبه الزجاجيه أو في الحقل مباشره.**
- **وهي تناسب البكتيريا التي تتواجد بنسبه عاليه في البذور (١ ــ ١٠%) أي نسبه ١ ــ ١٠% بذور مصابه في اللوط. وهذه الطريقه اكثر مناسبه في حاله الفطريات المحموله علي البذور عن البكتيريا حيث نجد ان الأصابه بالبكتيريا لاتتعدي ٠,١% او أقل أي أن كثافتها قليله.**

  وعليه فإننا قد نحتاج الي عينة ممثلة تحتوى على الأقل على ١٠٠٠٠(عشره الآف) للحصول علي تعداد مقبول من الخلايا البكتيريه. لذلك فإن هذه الطريقه مكلفه جداً ومضيعه للوقت.
- **من عيوب هذه الطريقه أيضاً هو تأثر البذور بالظروف البيئيه ــ مشاكل المحافظه علي نباتات خاليه من المرض لفتره طويله ــ التداخل في الأعراض مع الكائنات الممرضه الأخري.**

وقد أستخدمت هذه الطريقه في التعرف علي البكتيريات.

Xanthomonas campestris pv. phaseoli - Pseudomonas syringae pv. glycinae

Xanthomona campestris pv. Campestris - Pseudomonas syringae pv. pisi

Xanthomona campestris pv. malvacearum

٢ ـ طريقه الزراعه علي البيئات الغذائيه مباشره خاصه البيئات شبه الاختياريه

Semi Selective Media

أمثله تطبيقيه لتقدير البكتيريا:

أ ـ في بذور الصليبيات

- **تعقم البذور في محلول هيبوكلوريت الصوديوم (محلول الكلور) تركيزه 5% لمده ٣ دقائق ثم تشطف وتجفف إما تحت Laminar Flow Hood أو بين ورق ترشيح معقم.**
- **تزرع البذور تحت ظروف معقمه في اطباق بتري بها البيئات الغذائيه الملائمه ثم تحضن فتظهر النموات البكتريه حول البذور المصابه.(توجد طرق ميكانيكيه سريعه لتنفيذ هذه الطريقه في أحواض بها بيئات غذائيه تتسع كل منها لـ ١٠٠٠بذره في المكرره الواحده).**
- **تناسب هذه الطريقه التقديرات الروتينيه في الشركات المنتجه للبذور لفحص أنتاجها قبل عرضه للبيع.**
- **تظهر كفاءه هذه الطريقه في الكشف عن البكتيريا *Xanthomonas campestris pv. Campistris* المسببه للعفن الأسود أو العرق الأسود في الصليبيات Black Rot or Black Vein In Crucifers**

ب ـ الطرق الغير مباشره

INDIRECT METHODS

١ ـ الطريقه الحيه Viable Method

- تلقيح النبات العائل:

- **ومنها يتم حقن النبات بالمعلق المستخلص من البذور مباشره.**
- **أو الرش بالمستخلص الخام مباشره.**
- **أو إدخال الخلايا البكتيريه الي البذور تحت تفريغ Vaccum Infeltrated With Extract ثم تزرع البذور في حضانات نمو Growth Chambers**
- **وعيب هذه الطريقه الأخيره هو إمكانيه ظهور أعراض اخري ناشئه عن الإصابه ببعض المترممات أو بسبب الأسلوب الخشن في التلقيح أو بسبب الظروف البيئيه الغير ملائمه لنشاط الميكروب ولتفادي ذلك يكون من الضروري إعاده عزل المسبب من النباتات المصابه ثم يعاد زراعه البذور واختبارها وبذلك تصبح هذه الطريقه مكلفه للفايه ومضيعه للوقت.**
- **أما ميزه هذا الأختبار ان النبات العائل يعمل كطعم Bait حيث ان عدداً محدوداً من البكتيريا يمكنها ان تتكاثر داخله وتعطي أعراضاً.**

-العزل علي بيئه الآجار:

- **يعتمد نجاح هذه الطريقه علي توافر Semiselective Midia ومع ذلك فإنه من الممكن الأعتماد مبدئياً علي العزل علي البيئات العاديه كما هو المتبع لعزل البكتيرة *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola* التي يمكن عزلها علي بيئه (KB) King's "B" Medium**
- **واما البكتيرة *Xanthomonas campestris pv. phaseoli* فيمكن عزلها علي بيئه Nutrient Agar**
- **وهذه الطريقهُ تظهر كفاءه في عينات البذور الملوثه بدرجه كبيره بهذه المسببات السابقه أو باعداد بسيطه من المترممات لذلك وبسبب عدم توافر هذه الظروف عاده فهذه الطريقه محدوده النجاح.**

٢ ـ الطرق الغير حيه Non Viable Methods

ليس من الضروري في هذه الطرق وجود الكائن الحي نفسه حيث يعتمد التعريف علي التفاعل الكيماوي وتتميز هذه الطريقه بسرعتها وقله تكلفتها إلا ان نتائجها لاتعطي دليلاً قلطعاً علي صحه النتائج لان الخلايا تكون ميته وأن الطرق السيرولوجيه للخلايا الميته اقل حساسيه من طرق العزل والعدوي وبالرغم من ذلك فإنها مازالت تستخدم في الأختبارات الروتينيه.

أ ـ الطرق السيرولوجيه

أسرع الطرق للتعريف واكثرها فائده كطرق معترف بها للتعريف خاصه للبكتيريات الناميه وهذه تشمل علي:

الاختبار	المسبب المرضى
١ ـ إختبار التجلط Agglutination Test	وهذه تستخدم في حاله *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola*
٢ ـ الآجار المنتشر Agar Diffusion test	وتصلح في حاله *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola* *Xanthomonas campestris pv. phaseoli*
٣ ـ Immuno Fluoresence Staning (I F)	طريقه حساسه جداً ويمكن مشاهده الخلايا مورفولوجيا *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola* *Xanthomonas campestris pv campestris* *Xanthomonas campestris pv. phaseoli*
٤ ـ Enzyme Linked Immunosorbant Assay [ELISA] وتعرف أيضاً بإسم Enzyme immuno assay (EIA)	وتصلح في حاله *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola*

وهذه الأختبارات تحتاج الي كميات كبيره من البذور وبالرغم من ذلك فهي أساسيه في بعض الدول ممتلا القانون الفرنسي لايسمح بدخول بذور الطماطم الي فرنسا دون شهاده لاختبار (I F) .

- **وللطرق السيرولوجيه اشكال مختلفه فمثلاً الـ Agar Diffusian Test طريقه غير حساسه ويمكن للاتتسيرم Antiserium ان يتفاعل مع كل السلالات فلا يظهر التخصص.**

- **أما أهم اعتراض علي استخدام الطرق السيرولوجيه هو انـه اذا ظهرت نتيجتها موجبـه فإن النتائج تكون غير نهائيه.**

- **طريقة الايليزا ELISA Test (Enzyme Linked Immunosorbant Assay):**

  - **أدخلها Clark & Adams 1977 وأصبحت اكثر الطرق السيرولوجيه إستخداماً للتعرف علي البكتيريا والفيروسات.**
  - **<u>فكره الأختبار</u>**
  - **إحداث تفاعل بين Antibodies & antisen يمكن مشاهدته عن طريق تعليم الـ Antibodies بـإنزيم ثم الكشف عن هذا الانـزيم بإضـافه مـاده يتفاعل معهـا فيتكون لون يمكن تقديره وقياسه شدته بالطرق اللونيه**

- **طريقه الـ DNA Probes أو سلاسل الـ DNA (Long Chain Polymar)**
  - **تشتهر هذه الطريقه في تعريف الـ Viroids وتستخدم في تقدير الـ *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola***
  - **وبالتقدم السريع في تكنولوجيا الـ DNA وإختبارات العدوي ربما لاتحتاج مستقبلاً الي تعريف البكتيريا خاصه عندما يتم التعرف علي الجين المرضي.**

- **طريق إستخدام الفاج البكتيري (Combination of Viable and non viable methods)**
  - **يمكن إستخدام الطريقتين الحيه والغير حيه في الفحص فمثلاً في هولندا في البذور تفحص اولاً بـ "I F" ثم تزرع علي اطباق لتقيم القدره المرضيه. تستخدم بنجاح في حاله *Xanthomonas campestris pv campestris***

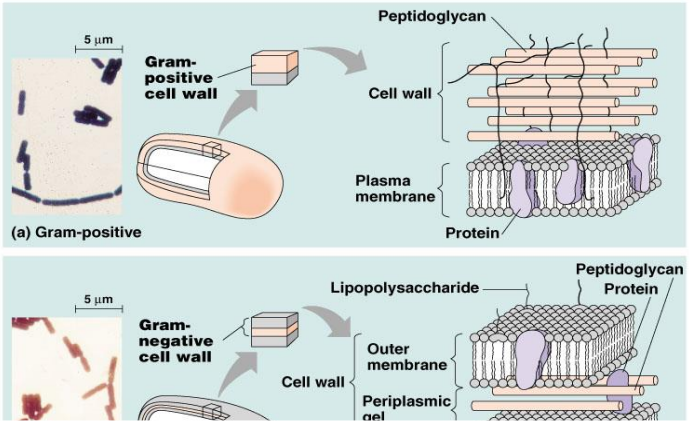
الخـــــــــلاصه

أفضل الطرق المتاحه حالياً خاصه في البكتيريات المحموله علي البذور هي عزل المسبب المرضي علي بيئه نصف إختياريه ثم الأختبارات السيرولوجيه (I F) والعينات التي تعطي نتائج موجبه يجري لها اختبارات العدوي الصناعيه.

Fact Sheet (3)

المقالة الثالثة: كيفية التعرف على البكتيريا الممرضة للنبات

- عن طريق زراعة البكتيريا على بيئات خاصة يمكن التمييز بين الأجناس المختلفة مع الوضع فى الإعتبار أن جنس ***Streptomyces*** يمكن تميزه بسهولة عن بقية الأجناس بتكوينة الميسيليوم المتفرع وكذلك الجراثيم الكونيدية التى يكونها. أما فيما يختص بالتمييز بين أجناس البكتيريا العصوية فهى عملية صعبة ومعقدة حيث لا تعتمد فقط على الصفات المرئية كالحجم والشكل والتركيب واللون، بل تحتاج إلى دراسة صفاتها الكيماوية والأنتجيينية ونشاطها الإنزيمى وطرق تغذيتها وقدرتها المرضية ودرجة اصابتها بالفيروسات البكتيريه ونموها على البيئات الإختيارية. فمن ناحية حجم وشكل البكتيريا، فإن هذه الصفة تختلف بإختلاف عمر المزرعة وتركيبها ودرجة pH للبيئة ودرجة الحرارة وطريقة الصبغ، فتحت ظروف معينة يمكن الإعتماد إلى حد ما على شكل الخلايا وترتيبها فى التعرف على بعض الصفات. ويمكن الإستعانة أيضاً بوجود أو عدم وجود الأسواط وترتيبها على سطح الخلية وذلك بصبغ الأسواط بصبغة خاصة أو بواسطة الميكروسكوب الألكترونى.
- يمكن الكشف عن التركيب الكيميائى لبعض المركبات فى خلايا البكتيريا بواسطة بعض طرق الصبغ المتخصصة حيث تفيد هذه المعلومات فى المساعدة على التعرف على البكتيريا.
- تساهم إستجابة أو عدم إستجابة الخلايا البكتيرية لصبغة الجرام فى التمييز بين البكتيريا ولتضعها فى مجموعتين موجبة أو سالبة لصبغة جرام.
- اما بالنسبة لتغذية البكتيريا فيمكن منها الاستدلال على قدرة البكتيريا على إستخدام أو عدم إستخدام مركب معين كمادة غذائية. فالإنزيمات التى تفرزها البكتيريا خارجياً فى البيئة لتحليلها والتغذية عليها يمكن أن تتخذ كأحد الوسائل فى التعرف على البكتيريا.
- وبخصوص القدرة المرضية للبكتيريا فهو أختبار هام يُجرى لمعرفة مدى قدرة خلايا النبات على التأثر بالبكتيريا المدروسة. ويعتبر هذا الإختبار فى بعض الأحوال كافياً ولو بصورة مبدئية للتعرف على البكتيريا المحدثة للمرض.
- تستخدم الطرق السيرولوجية كوسيلة سريعة ومتطورة للتعرف على البكتيريا الممرضة إلا انها ليست مستخدمة على نطاق واسع لعدم توافر الأمصال المضادة Antisera خاصة فى البلاد النامية. وفى حالات قليلة يمكن التعرف على أنواع البكتيريا وسلالاتها بواسطة إستخدام الفيروس البكتيري (البكتريوفاج).



شكل ــ٥

تركيب الجدار الخلوى فى البكتيريا (A) الموجبة لجرام (B) السالبة لجرام

- **تستخدم حديثاً مجموعة المركبات المسماه بالبكتريوسين Bacteriocins فى التفرقة بين العزلات البكتيرية بإختبار درجة حساسيتها أو انتاجها لهذه المركبات حيث ان هذه المركبات ما هى إلا مواد مضادة للنمو البكتيرى تنتجها بعض سلالات البكتيريا الممرضة وتفرز فى البيئة بكميات قليلة ويعتقد انها ناتجة عن التحلل التلقائى للخلايا. وتتكون هذه المركبات من بروتينات متخصصة تثبط وتحلل سلالات معينة من البكتيريا فهى تعمل عمل البكتربوفاج من ناحية تحليلية للخلية، إلا انها تختلف عنه فى عدم تناسخها فى خلايا البكتيريا. وتُحكم هذه المركبات بواسطة جينات موجودة على البلازميد Plasmid-DNA والذى يتناسخ فى البكتيريا ويتواجد بها حينما تحتفظ بقدرتها المرضية.**

تعتبر طريقة استخدام بيئات غذائية اختيارية لعزل البكتيريا والتعرف عليها من أحسن وسائل التعرف المستخدمة لأن البيئة الأختيارية تحتوى على مواد غذائية معينة تسمح بنمو أنواع معينة من البكتيريا بينما تثبط الأنواع الأخرى. وبالرغم من هذا فإنها ما زالت غير شائعة على نطاق واسع بالنسبة للعاملين فى حقل أمراض النبات البكتيرية، وذلك لعدم أمكانية توافرها خاصة فى العمل الروتينى.

Fact Sheet (4)

المقالة الرابعة: تشخيص أمراض النبات البكتيرية

- من الثابت أنه لا يمكن الاعتماد على الأعراض الظاهرية كوسيلة لتشخيص المرض وذلك لتشابه الأعراض. فعلى سبيل المثال تتشابه أعراض العفن الطري البكتيري والعفن الطري الفطري. وتتشابه التدرنات البكتيرية Bacterial Galls والحشرية Insect Galls. كما يتشابه الذبول البكتيري والذبول الفطري.

- ومن ناحية أخرى نجد تشابه لأعراض العفن الطري البكتيري قد تسببه أجناس من البكتيره *Erwinia* مع الذى تسببه أجناس البكتيريا *Pseudomonas*. وهناك العديد من الأمثلة تؤكد أنه لا يمكن الاعتماد على الأعراض بمفردها لتعريف المرض فمثلاً العديد من لفحات الفاصوليا وتبقعات الأوراق والثمار فى الطماطم والتخطيط في قصب السكر والذرة والسورجم كلها تحتاج إلى عزل ثم تعريف المسبب حتى يصبح التشخيص سليماً.

- كذلك يجب معرفة الهدف الرئيسي من التشخيص حيث تتداخل عوامل الوقت والجهد والتكاليف في الهدف فمثلاً هناك تشخيص سريع هدفه إعطاء توصية للمزارع أو البستاني للمقاومة "وهو تشخيص إفتراضى". وقد يكون المطلوب هو تحديد المسبب بدقة وهذا يحتاج إلى جهد وتكاليف أكبر وعادة ما تحتاج معظم الحالات إلى التشخيص السريع وقليل منها يحتاج إلى عزل وتنقية... إلخ.

الأعراض وجمع العينات:

- يعتمد التشخيص السليم للمرض فى البداية على التسجيل الدقيق للأعراض المرضية وأيضاً التعريف السليم للعائل وهناك العديد من المراجع العلمية يمكن الاستعانة بها في التعرف على الأعراض من الصور الفوتوغرافية وأيضاً تفيد العينات المحفوظة Herbarium في ذلك.

- نظراً لعدم إمكانية فحص العينات المصابة مباشرة بعد جمعها من الحقل ونظراً لطول فترة النقل والتخزين فإن ذلك يؤدى غالباً إلى فشل عمليات العزل. ولتلافى ذلك يجب أن توضع العينات النباتية فور جمعها في أكياس من البولى إثيلين ثم توضع الأكياس في صندوق حفظ Ice Box به عبوات مغلقة من المسمى Blue Ice المجمد وهو عبارة عن محلول مركز من البولى إثيلين جليكول مع تجنب تعريض العينات أو الصندوق للشمس. كما يجب تجفيف العينات قبل وضعها في الأكياس من الماء الزائد. ومن الضرورى أن تكون العينات ممثلة للأعراض سواء كانت أعراضها على الجذر أو الساق أو الأوراق أو الأزهار أو الثمار .... إلخ.

- فى حالة الأمراض التي تصيب الجذور يغسل جزء من العينة لتخليص الجذر من الأتربة ثم تجفف من المياه والرطوبة الزائدة قبل نقل العينة ويترك الجزء الآخر بدون إزالة التربة حيث قد يحتاج العزل إلى إستخدام التربة الملاصقة للجذر فى العزل مع ضرورة لف الكيس جيداً حول الجذر لمنع تساقط الأتربة من حوله.

- **من الثابت أن إستخدام العينات التى تمثل الأعراض المبكرة للإصابة هى أفضل بكثير من إستخدام العينات التى تظهر عليها الأعراض المتأخرة وذلك من أجل تسهيل عملية العزل ومنع فرصة عزل مسببات أخرى ثانوية.**

- **فى حالة الأعراض المرضية التى تظهر على الأوراق والتى تسبب فى ظهور بقع شبه مائية Water Soaked فى مظهرها أو أعراض شبه شفافه عند تعرضها للضوء يفضل العزل منها قبل أن تتحول إلى المظهر البنى أو المتقرح Necrotic.**

- **فى حالة تبقعات الأوراق يجب الإحتفاظ ببعض النماذج جافة بعد ضغطها بين طبقتين من الورق الخالى من الأصباغ أو ورق الترشيح للرجوع إليها عند اللزوم كمعشب وأيضاً يمكن العزل منها.**

- **لوحظ أن العديد من البكتيريا الممرضة يمكنها أن تعيش فى الأنسجة الجافة لمدد تتراوح بين شهر لعدة سنوات ويمكن إستخدامها فى العزل مرات أخرى فمثلاً معظم البكتيريا من الـجنس *Xanthomonas* يمكنها المعيشة فى الأنسجة الجافة لمدد تزيد عن العام.**

الفحص الميكروسكوبى

- **قبل محاولة العزل من الأنسجة المصابة يجب فحصها بالميكروسكوبى المجسم للتعرف على ماهية الأعراض. كما يجب التأكد من خروج إفرازات لزجة Oozes من العينات المصابة عن طريق النظر إلى أسطح الأوراق المصابة فيمكن مشاهدة آثار طبقة رقيقة لامعة تظهر فى ضوء الشمس بسهولة وقد يشاهد ذلك أيضاً على أسطح السيقان وعلى البتلات.**

- **إذا ما تم تحضين الأجزاء المصابة وهي مازالت حية لعدة أيام وفى وجود رطوبة عالية فغالباً ما تظهر الـ Oozes علىالتقرحات.**

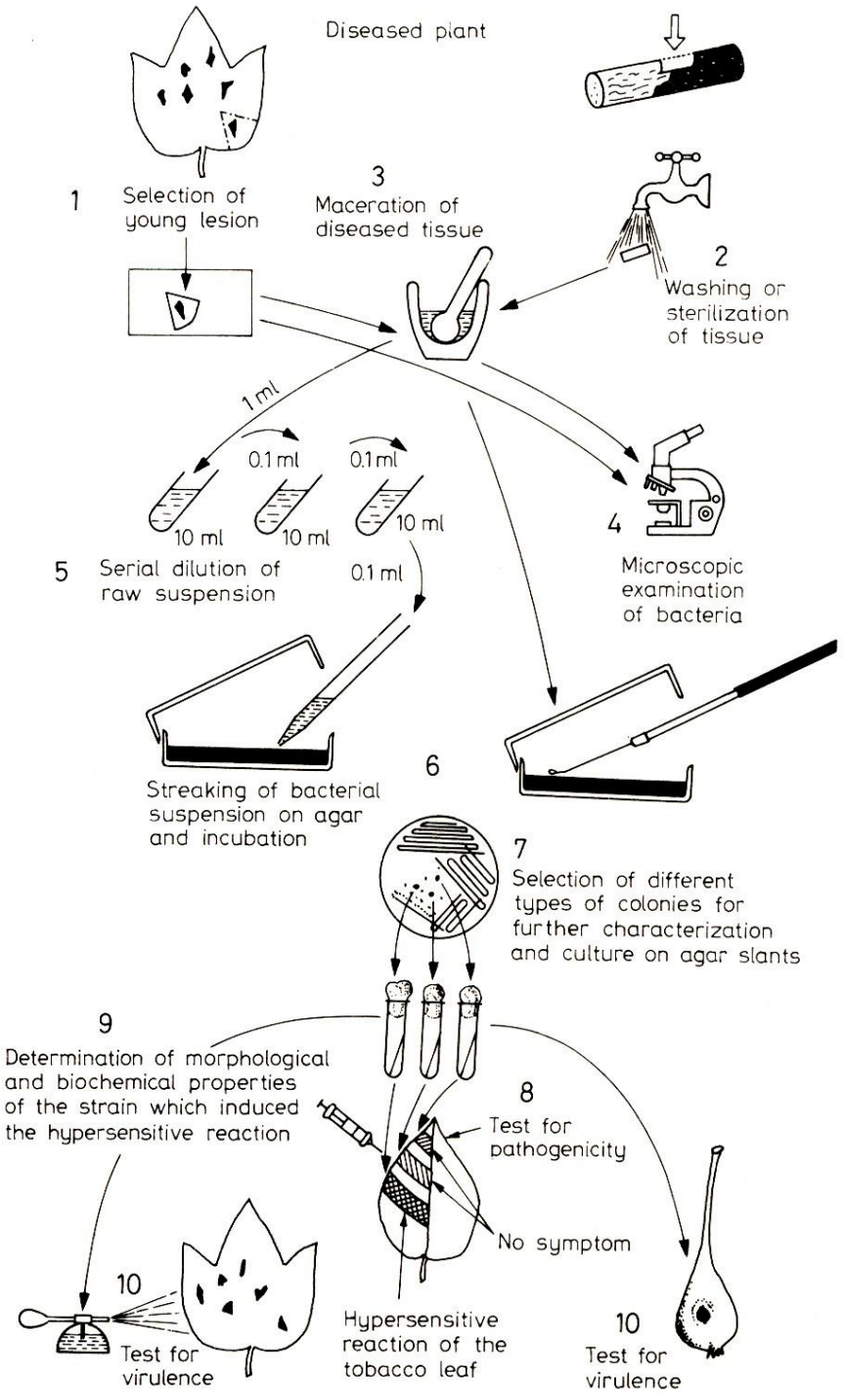
- **عند فحص درنات البطاطس الطازجة المصابة بالبكتيريا *Ralestonia (Pseudomonas) solanacearum*) يجب الإتجاه إلى فحص عيونها أولاً فقد يشاهد خروج البكتيريا منها فى صورة Oozes كما يخرج Ooze أيضاً من مدادات الدرنة.**

- **فى حالة تبقعات الأوراق والتخطيط يجب قطع حوالى ٤ مم من الحزم الوعائية المجاورة للمنطقة المصابة ثم تحمل فى قطرات من المياه وتفحص ميكروسكوبياً بعد وضعها على شريحة وتغطيتها بـ Cover وإستخدام تكبير X100 ، X40 ويفضل الفحص بإستخدام طريقة Phase Contrast Microscopy مكتشفه زرنك Fints Zernik (1934) وحصل على جائزة نوبل للحصول على صورة عالية الجودة للخلايا الميكروبية – الأنسجة – الخلايا وذلك دون إجراء أى معاملات عليها وفى صورتها الطبيعية وغير مكلفة وغير مصبوغة (فى الصورة الحقيقية لها).**

- **إذا كانت الأنسجة النباتية طازجة فإن الـ Ooze سيخرج منها مباشرة أما إذا كانت مسنة فسيخرج ببطئ خاصة عند حواف القطع.**

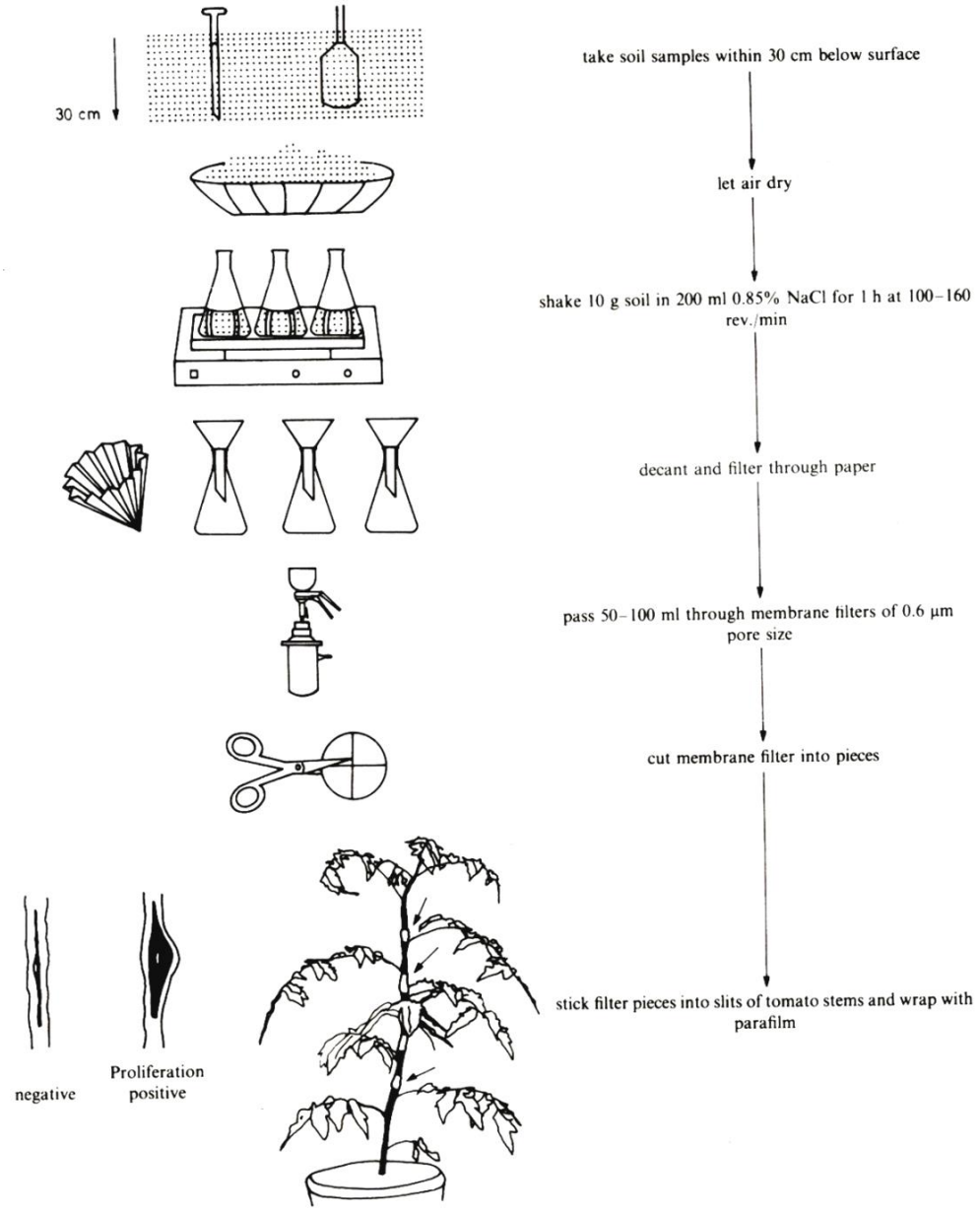
- **معظم البكتيريا الممرضة متحركة بالأسواط ويمكن مشاهدة الحركة فى الـ Oozes.**

- **تختلف طبيعة Oozes من مسبب لآخر فالـ Ooze الخارج من الأنسجة المصابة بـ *Xanthomonas* أكثر تماسكاً من الناتج عن البكتيريا *Pseudomonas*.**



شكل ــ٨

تسلسل عزل البكتيريا من الانسجة النباتية المصابة سواء من الورقة أو من ساق نبات مصاب



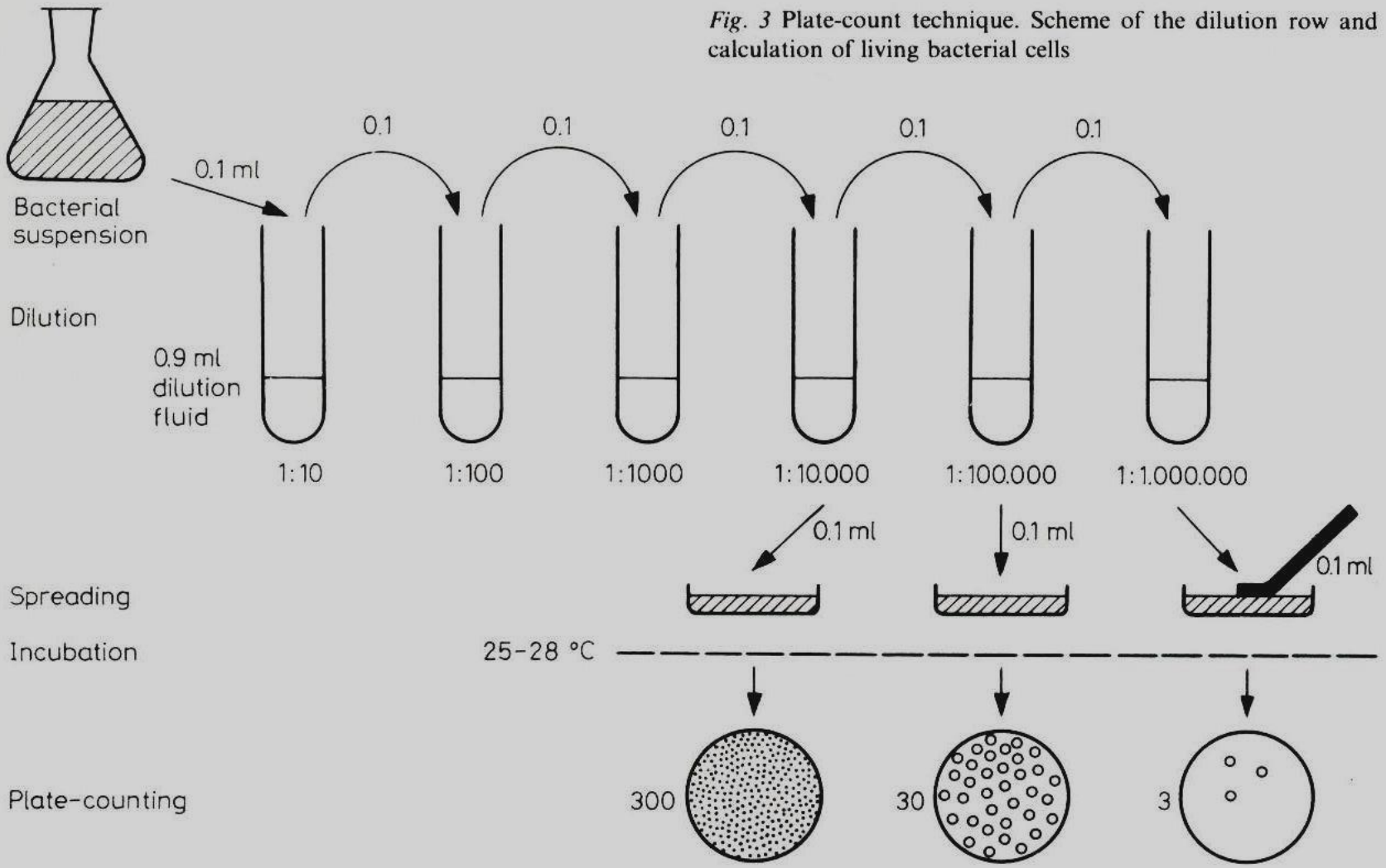
Fast diagnosis of the crown gall pathogen, *Agrobacterium tumefaciens* in soil by means of membrane filtration and bio-assay (from Knösel, 1988)

شكل ــ٩

طريقة سريعة للتعرف على مدى تلوث التربة بالبكتيريا

Agrobacterium tumefaciens

Fig. 3 Plate-count technique. Scheme of the dilution row and calculation of living bacterial cells



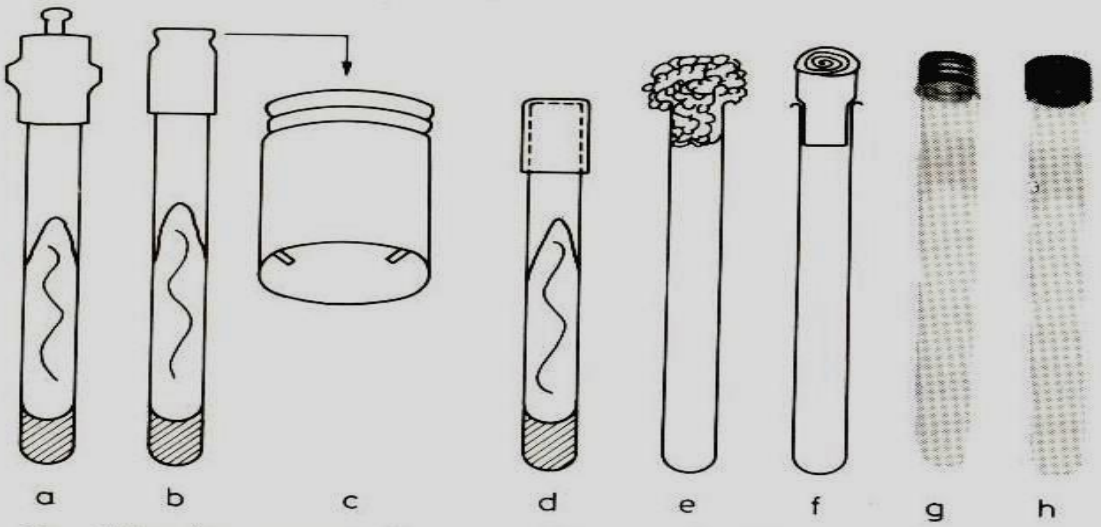


Fig. 1 Sterile stoppers for test tubes (a): Kapsenberg cap (b), (c): Cap-0-Test cap (d): straight aluminium cap (e): hand-made (rolled) cotton plug (f): machine-made cotton or cellulose plug (g): aluminium screw cap (h): plastic screw cap Rimless test-tubes used for stoppers (a-d) and lipped test-tubes for stoppers (e) and (f)

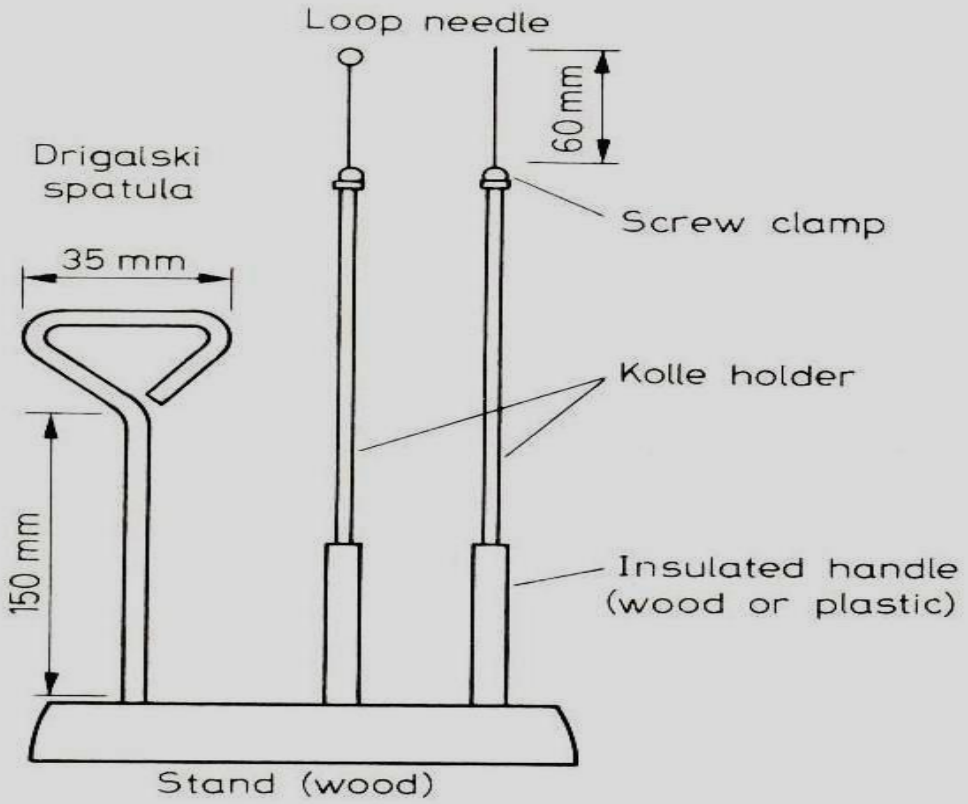


Fig. 2 Tools for transferring bacteria

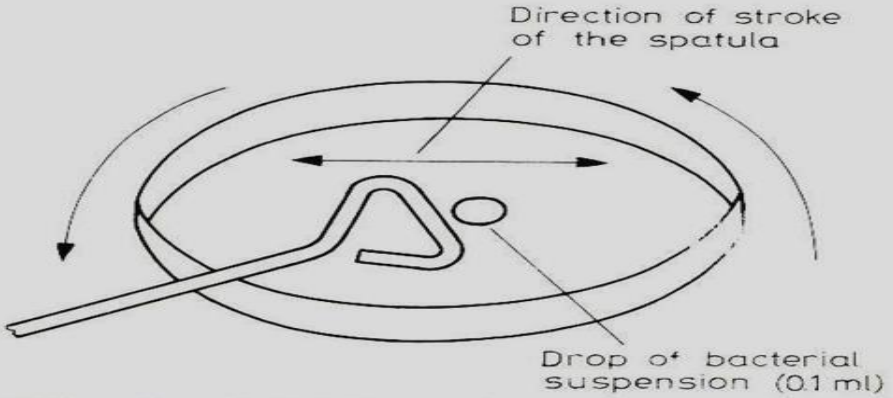


Fig. 13 Spreading a bacterial suspension on the agar surface of a Petri dish

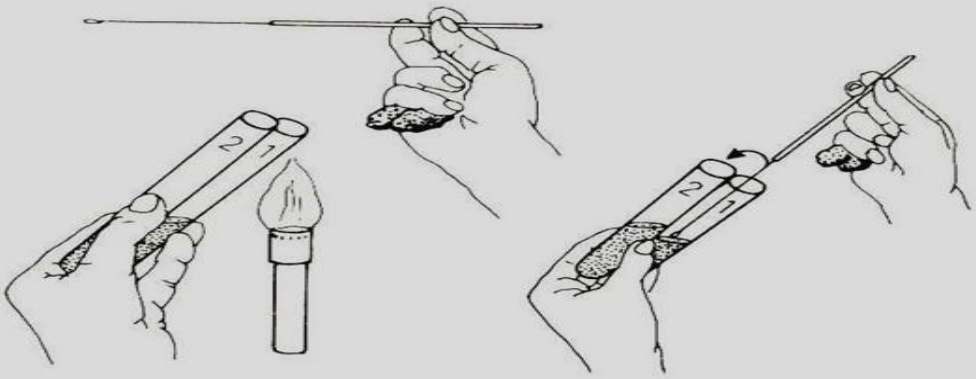


Fig. 14 Transfer of culture from tube 1 to tube 2 with a loop. The cotton stoppers are held with the little finger

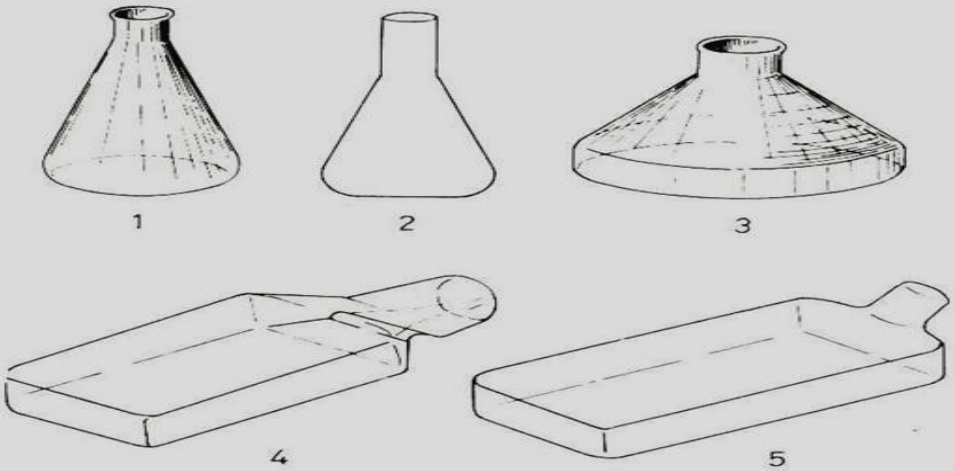


Fig. 15 Vessels for aerobic cultivation of microorganisms in thin layer cultures (modified from Schlegel, 1985) 1: Erlenmeyer flask for cotton stoppers 2: Erlenmeyer flask for Kapsenberg caps or other metal caps 3: Fernbach flask 4: Kolle flask 5: Penicillin flask

- **بإستثناء البكتيريا *Agrobacterium* فإن الـ Oozes تخرج من الإصابات البكتيرية أو تظهر كتل من النموات البكتيرية فى مكان القطع. وعلى الرغم من ذلك فقد تغيب هذه الظاهرة فى بعض الحالات فيظن البعض خطأ عدم وجود إصابة بكتيرية وقد يكون السبب فى ذلك هو تداخل مسبب آخر ثانوى مثل الفطريات ويمكن ملاحظة ذلك بالفحص الميكروسكوبى أو بالعدسات المكبرة.**

- **يجب الدقة التامة عند الفحص الميكروسكوبى حتى لا يختلط الأمر فتشخص العصارات اللبنية Latex أو البلاستيدات أو حبيبات النشا على أنها خلايا بكتيرية فالاختلاف بينهم واضح فى الشكل والحجم ودرجة إنعكاس الضوء عليهم فى حالة إستخدام الـ Phase Contrast Microscopy.**

- **قد تظهر البكتيريا المعزولة من الـ Oozes مختلفة مورفولوجياً عن شكلها في المزرعة الصلبة.**

طرق العزل:

- **عند التأكد من وجود الـ Ooze فإن الخطوة التالية هو قطع جزء من العينة المصابة بإستخدام أدوات تشـريح معقمـة ثم تعلق فى ٢-٣ مم ماء معقم أو Phosphate Buffer معقم أو بيئة سائلة معقمة حتى تنتشر البكتيريا فى السائل.**

- **تترك العينة لمدة ٢٠-٣٠ دقيقة على درجة حرارة الغرفة ثم تغمس الإبرة البكتيرية من المعلق وتخطط على البيئة الصلبة المناسبة وتكرر في عدة أطباق.**

- **من الضرورى جداً أن يكون سطح البيئة الغذائية الصلبة جاف وإلا فإن البكتيريا ستسبح على السطح المبلل وتتكون نموات ممتزجة ولا يمكن الحصول على مستعمرات فردية. ولتنفيذ ذلك تبرد البيئة إلى ٤٥ درجة مئوية قبل صبها وتترك الأطباق المصبوبة علي درجة حرارة الغرفة لمدة ٢٤-٤٨ ساعة. ويمكن اختصار الوقت إذا ما ترك الطبق مفتوحاً فى Biological Safty Cabinet (Laminar Flow Apparatus) لمدة ١٥ دقيقة مع ملاحظة أن يكون الفلتر الخاص بالتهوية صالح للإستعمال.**

- **بعد التخطيط تحضن الأطباق على درجة حرارة ٢٥-٣٠°م لكل المسببات البكتيرية بإستثناء البكتيريا (*Corynebacterium*) *Clavibacterium* لأن درجة الحرارة المثلى لنموها تتراوح بين ٢٣-٢٥°م.**

- **يجب متابعة فحص الأطباق يومياً للكشف عن ظهور المستعمرات.**

- **هناك إختلافات واضحة فى معدل نمو البكتيريا المختلفة الموجودة على النبات والتى يمكن إستخدامها كمرشد عند التشخيص. فمعروف مثلاً أن معظم البكتيريا الرمية تنمو بدرجة أسرع من الممرضة. وفى معظم الحالات نجد أن الرميات تنتج مستعمرات ميكروسكوبية بعد ٢٤-٣٦ ساعة على درجة حرارة ٢٥-٢٨°م وبالتالى يجب إستبعادها.**

- **يوجد بين الأجناس إختلافات فى معدل النمو فمثلاً معظم الـ *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, تنتج مستعمرات ميكروسكوبية خلال ٣٦-٧٢ ساعة من التحضين على الدرجة المثلى لنموها.**

- **يلاحظ أنه إذا كانت العينات المعزول منها عينات طازجة وحالتها جيدة فإن نتيجة التخطيط على البيئات الصلبة هو ظهور المستعمرات سائدة فى الطبق دون تلوث بالرميات.**

- **البكتيريا الرمية *Erwinia herbicola* تعطى نمو رقيق لزج أصفر اللون ذو صبغة غير منتشرة وهذه تحتاج إلى خبرة خاصة لتميزها عن البكتيريا *Xanthomonas* حيث يقع الكثيرين فى خطأ التفريق بينهما.**

- **إذا تركت الأجزاء النباتية مبللة عقب جمعها فإنها ستحمل العديد من البكتيريا الرمية التى تفوقفي سرعة نموها البكتيريا الممرضة وفى هذه الحالة يحتاج العزل إلى بيئات شبه إختيارية أو تحضير سلسلة من التخفيفات العالية، وذلك عند إجراء عمليات التخطيط على البيئات الصلبة فالمعلق المعتم Opaque يمكن تخفيفه بنسبة ١ : ١٠٠ ، ١ : ١٠٠٠ بإستخدام كمية من بيئة سائلة معقمة. ويمكن ببساطة ملئ الحلقة Loop الخاص بالإبرة (ومعروف أن قطرها حوالى ٣- ٤مم) ثم يلقح به البيئة السائلة.**

طريقة عزل أخرى:

وهى طريقة إقتصادية ويستخدم فيها أدوات زجاجية معقمة مثل المستخدمة فى عزل الفطريات كالاتي :

- **يوضع جزء صغير من النسيج النباتى المصاب قرب حافة الطبق المحتوي علي بيئة صلبة ثم يوضع علي هذا النسيج قطرة من ماء معقم ويترك لمدة ١٥-٢٠ دقيقة.**

- **يخطط هذا المعلق مباشرة فى الطبق والهدف من ترك العينة لهذه المدة هو السماح للبكتيريا بالخروج من النسيج المصاب إلى الماء وتحررها.**

- **يمكن رفع كفاءة هذه الطريقة بالضغط على النسيج النباتى بإبرة معقمة.**

- **التعقيم السطحى بالمطهرات غير مطلوب فى عزل البكتيريا إلا فى حالات نادرة وأيضاً فى حالة ما إذا كان السطح طارد للماء كما فى حالة أوراق قصب السكر.أما السبب فى عدم التعقيم هو أن المواد الداخلة فى التعقيم تمتص بسرعة فائقة فى الأنسجة النباتية وتقتل البكتيريا الموجودة بها.**

- **أهم المواد المستخدمة فى التعقيم هى هيبوكلوريت الصوديوم ويستخدم بنسبة ٠,٥% لمدة دقيقتين ثم الشطف بالماء المعقم عدة مرات.**

- **وعموماً فإن الأفضل هو غسل الأجزاء النباتية بالماء الجارى عدة مرات ثم المعقم وذلك قبل إجراء تقطيع للنسيج.**

طريقة العزل بـ Needle Puncture Method:

- نفذها Goth, 1965 وذلك لعزل البكتيريا من الفاصوليا وتستخدم الآن على نطاق واسع فى محاصيل أخرى وتتم كالاتي.

- للعزل من القرون المصابة تغمس إبرة مدببة معقمة فى مكان الإصابة ثم يعاد غمسها فى بيئة الآجار ويوضع قطرة ماء معقم فى مكان الثقب ثم تفرد بإبرة البكتيريا.

- فى تبقعات الأوراق توضع العينة المغسولة سطحياً على سطح الآجار ثم تغمس الإبرة المدببة المعقمة فى مكان البقعة ثم ترفع العينة ويوضع قطرة ماء معقم عليها وتفرد بإبرة البكتيريا.

البيئات الاختيارية:

- تعتبر عملية العزل من التربة أو من الأجزاء النباتية المتحللة عملية صعبة نظراً لوجود خليط من المترممات والمتطفلات والأولى أسرع فى نموها وقد تخلق ظروف بيئية غير ملائمة لنمو البكتيريا الممرضة وذلك من خلال التنافس على الغذاء أو خلق pH غير مناسب أو إنتاج مضادات حيوية ..... إلخ.

- ولحل هذه المشكلة نلجأ إلى البيئات المسماة مجازاً إختيارية وهى فى الواقع شبه إختيارية وهذه تقلل من نمو المترممات بينما تنمو المتطفلات. والفكرة منها هى تنشيط ظهور الأعداد القليلة من المسببات المرضية المخلوطة بأعداد كبيرة من الكائنات الأخرى الموجودة فى التربة.

وهناك عدة ثغرات فى إستخدام هذه البيئات:

١. معقدة - مرتفعة التكاليف – صعبة التحضير.

٢. قد تعطى نتائج غير حقيقية عن تعداد البكتيريا المعزولة وذلك لوجود المواد المثبطة فى البيئة.

- إلا أنها ذات فوائد عديدة خاصة فى حالة الدراسات الكمية لحياة البكتيريا الممرضة والرمية فى منطقة الريزوسفير Rhizosphere وفى منطقة الـ Phyllosphere وأيضاً على البذور والأجزاء النباتية.

- أيضاً مهمة فى دورة العدوى حيث يمكن التعرف على الدورة خاصة فى وجود مصادر عدوى فى الحقل.

- وتعتمد هذه البيئات على التحكم في مصادر الكربون في البيئات المختلفة ذات التركيب المعقد.

- وأيضاً فى التداخل Inclusion للصبغات والمضادات الحيوية أو المضادات الحيوية المحببة للمسبب.

إختبارات العدوى:

- هى الخطوة التالية بعد العزل وذلك استكمالا لاشتراطات كوخ لإثبات القدرة المرضية.

- لا تعتبر الطرق الخاصة بتلقيح الثمار أو شرائح الأنسجة النباتية إختبارات عدوى بالرغم من دورها الهام فى التشخيص والمساعدة على فصل البكتيريا الممرضة عن المترممة.

الإختبارات الشائعة:

- فرط الحساسية فى أوراق الدخان Hypersensitive Reaction.
- تلقيح قرون الفاصوليا "لإختبار أمراض الفاصوليا".
- الحقن Infiltration Technique.
- الرش Atomization.
- تلقيح السيقان والجذور.
- تلقيح شرائح البطاطس وهى طريقة مفيدة فى التعرف على البكتيريا التابعة لـ *Erwinia carotovora* مع ملاحظة أن هذه ليست طريقة عدوى ولكنها مجرد إختبار.

Fact Sheet (5)

المقالة الخامسة: الطرق المستخدمة للتعرف على البكتيريا المسببة لأمراض النبات

Methods for identification of the Plant Pathogenic Bacteria

للتعرف على البكتيريا المسببة لأمراض النبات تتبع الطرق المختلفة من تقليدية إلى طرق حديثة وذلك تبعاً للإمكانات المتاحة حيث بعضها مرتفع التكاليف أو معقد فى تنفيذة ويحتاج إلى تدريب وأجهزة مرتفعة الثمن، وعلى أية حال فجميع الطرق تؤدى فى النهاية إلى التعرف على البكتيريا حتى مستوى النوع مع إختلاف درجة الدقة بينها وهذا لن يؤثر فى الهدف الأكبر وهو مقاومة هذة البكتيريا والتى قد تكون سبباً فى هلاك محصول زراعى معين وهنا نستعرض هذة الطرق دون الدخول فى تفاصيل تنفيذها ونترك الإختيار للباحث لإلتقاط الأنسب لة حسب إمكانياتة المعملية ودرجة خبرتة فى التنفيذ مع الوضع فى الإعتبار التسلسل العلمى فى التعريف بدأ بدراسة مورفولوجيا البكتيريا وذلك تمهيداً للدخول فى الطرق المتقدمة للحصول على بيانات أكثر دقة عن هذة الكائنات وسلالاتها المختلفة.

أولاً: Conventional methods الطرق التقليدية

١- الشكل المورفولوجى للمستعمرات Morphology of Bacterial Colonies

٢- الصفات الفسيولوجية Physiological Characteristics

ويندرج تحت هذا الإختبار درجات الحرارة المثلى لنموها - درجات الحرارة المميتة لها - درجة حساسيتها للكيماويات والمضادات الحيوية - إنتاجها للسموم - قدرتها على تكوين انوية الثلج Ice-nucleation activity.وعديد من الصفات الأخرى

٣- الصفات الكيماوية Biochemical characteristics

مقدرة البكتيريا على تحليل بعض مصادر الغذاء من سكريات - كحولات - مواد عضوية – جليكوسيدات أو مصادر النيتروجين من الأحماض الأمينية – إنتاج H_2S – تحليل النشا – الجيلاتين – الكازين – السليلوز .....إلخ بواسطة الإنزيمات التى قد تنفرد بها دون غيرها من السلالات أو تنتجها بكميات أكثر نتيجاتها سرعة التحلل .. إختبار الأكسيديز – إختبار نشاط إنزيم الكاتاليز – تحليل البكتين ..... إلخ.

٤- الطرق السيرولوجية Serological characteristics

ومنها

أ- إختبار التجلط Agglutination test

ب- إختبار الترسيب Precipitation test

ت- الإستشعاع المناعى Immunofluorescence test (IF)

ث- إختبار الإليزا Enzyme - Linked Immuno Sorbent assay (ELISA)

ج- قدرتها على تحمل الإصابة بالفاج Bacteriophage test

ثانياً: الطرق الحديثة للتعريف Newer Methods

a) Monoclonal antibodies test (MA)
b) Slot - blot) hybridization /dot RNA (/DNA
c) Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) using r RNA (r DNA) oligonucleotide probes
d) Polymerase chain reaction(PCR)
e) Real – time (Taq Man®) PCR

وفيها يمكن قياس درجة التشعع fluorescence الحادثة خلال دورة ال PCR

Special serological techniques, eventually in combination with others

1- Immuno – electrophoresis
2- Monoclonal or polyclonal antibodies against specific components(e.g. protein or polysaccharides) of the bacteria, so-called monospecific antibodies
3- Immuno – gold labeling

طرق فصل الخلايا البكتيرية لمكوناتها

Separation of Bacterial components

A. **طرق الفصل بإستخدام الكروماتوجرافى**

Separation by chromatography technique

توجد ثلاث طرق للفصل الكروماتوجرافى يمكن إستخدامها وهى

1- **Amino acids and cell wall carbohydrate (paper chromatography, thin-layer chromatography)**
2- **Isoprenoid quinones (thin – layer, high performance Liquid chromatography)**
3- **Fatty acids, fats (Gas chromatography)**

B. **طرق الفصل بإستخدام المجال الكهربائى**

Separation of the components (Protein, Nucleic acids) in an electric field

توجد عدة طرق دقيقة وشائعة الإستخدام لفصل المكونات البكتيرية إعتماداً على درجة هجرة المكونات داخل المجال الكهربى وهى

1- **Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of the whole cell protein**
2- **Immuno – electrophoresis**
3- **Native protein electrophoresis(enzyme detection)**
4- **Restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP)**
5- **Random amplified polymorphism DNA(RAPD) analysis**
6- **Repetitive sequence based (RAP) fingerprinting PCR**
7- **Amplified fragment length polymorphisms analysis (AFLP)**

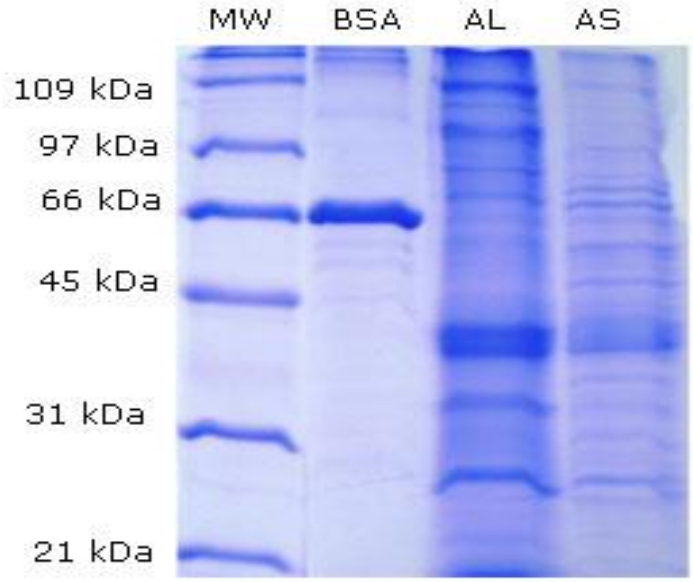
أمثلة توضيحية لبعض طرق الفصل

Case study (1)

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of the whole proteins

من أشهر الطرق المتبعة لفصل مكونات الخلايا البكتيرية إعتماداً على سرعة حركتها فى المجال الكهربى وبها يمكن المقارنة بين الشكل العام لمكونات بروتين البكتيريا وبين غيرها ولو من نفس النوع حيث يوجد ما بين ٢٠-٤٠ نوع مختلف من البروتين يمكن الإعتماد عليهم بفصل البروتين ثم تكسيره بإستخدام Sodium dodecyl sulfate (SDS) وأشهرها إستخداماً فى هذا المجال هو Detergents المنظفات الصناعية مع Mercaptoethanol حيث ينشأ عن ذلك أن يفقد البروتين شكلة الثلاثى the 3 dimensional structure يصبح محملاً بالشحنات السالبة فقط. عند وضع هذا المخلوط فى مجال كهربى يمر فى Polyacrylamide gel على ثقوب متساوية متزنة فإن قطع gel حيث يحتوى هذا ال gel وتتباين سرعة مرورها إعتماداً على البروتين تهاجر من القطب السالب إلى الموجب خلال ثقوب ال حجمها وما تحملة من شحنات ومن المعروف أن قطع البروتين صغيرة الحجم ستكون أسرع وتتواجد

قريبة من القطب الموجب. بعد فترة محدودة يتم فصل التيار الكهربى وصبغ البروتين بالصبغة الملائمة ومنهاSilver nitrate, coomasia blue, fluorosent dyes) (



قد تكون العين المجردة كافية فى بعض الأحيان للتفرقة بين أنظمة توزيع قطع البروتين داخل المجال الكهربى إلا انة فى غالب الأحيان وفى مجال فحص عينات كثيرة لا يمكن ذلك وهنا تكون الحاجة إلى نقل الصورة إلى برنامج خاص من Soft ware الذى يقوم بتحويل هذة التراتيب إلى أشكال هندسية مختلفة بل وتقوم بتحليلها إحصائياً لتوضيح أوجة التقارب أو التباعد بين العزلات المختلفة من نفس النوع أو الأنواع فيما بينها.

Case study (2)

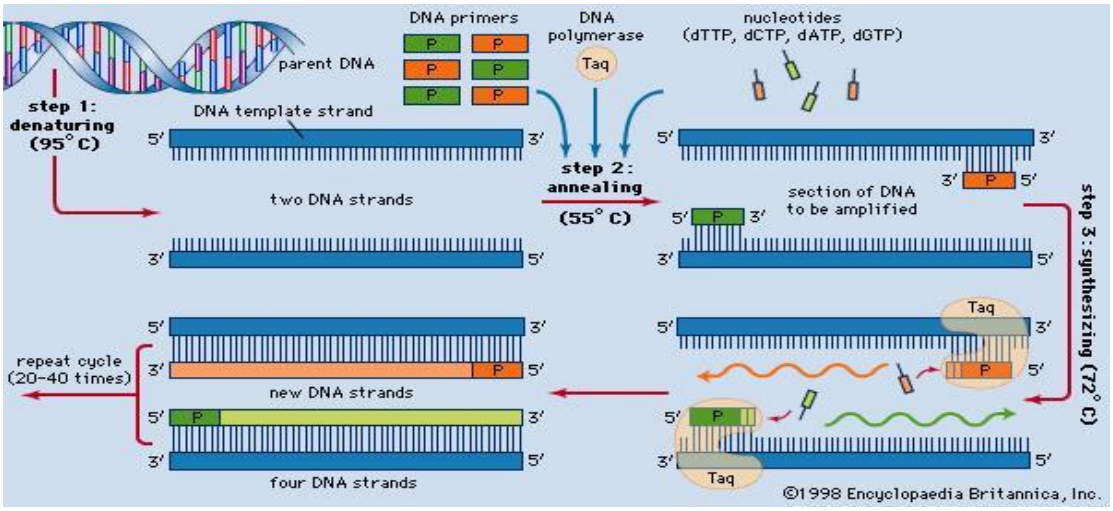
Polymerase chain reaction (PCR)

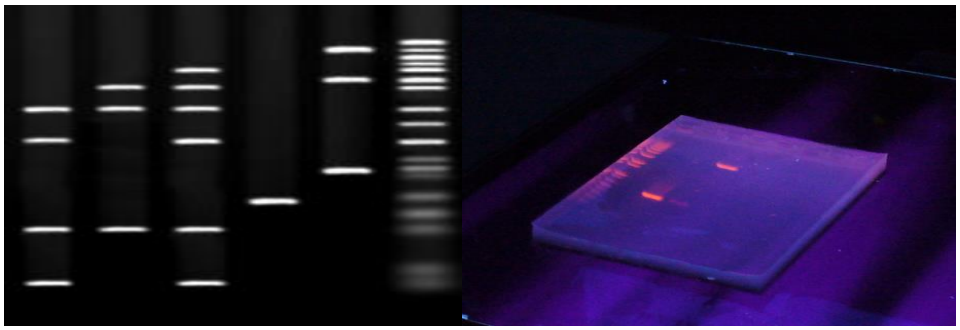
وفى هذة الطريقة يتم تعظيم حجم قطعة من الحمض النووى الخاص بالبكتيرة محل الدراسة وذلك قبل البدء فى عملية التقدير ويتم ذلك فى خطوات هى

١- تغيير طبيعة البروتين البكتيرى أو صهرة على درجة حرارة ٩٥ م° Denaturation(Melting) فى وجود أو عدم وجود الصودا الكاويا NaOH لتحطيم الجدار الخلوى وفصل الDNA عن الشوائب من بواقى الجدار الخلوى

٢- تقسية القطع الصغيرة الناشئة عن الحامض النووى المنصهر والتى تسمى Primers وذلك بالتسخين على درجة ٦٨ م° Annealing of short strands of the nucleic acids

٣- فرد الأجزاء السابقة Extension على درجة ٧٢م° فى وجود نيكليتيدات حرة وإنزيم محلل للحامض النووى يتحمل الحرارة Thermostable nucleic acid polymerase وأشهرها Taq polymerases وعقب هذة العملية فإن ناتج ال PCR يمكن التعرف علية ظاهرياً بعد صبغة بصبغة Ethidium bromide فى Agrarose gel electrophoresis فى الظلام بتعريض المكونات للأشعة فوق البنفسجية.





Ethidium bromide staining

مراجع

١- أمراض النبات البكتيرية e-Book2006 د. محمد عبد الرحمن الوكيل

٢- Phytobacteriology 2006. J.D. Janse

٣- Methods in phytobacteriology 1990 klement *et al.*

٤- Plant Bacterial Diseases. A Diognoses Guide 1983 Fahy p. and G. parsley

٥- Microbial Plant Pathogens and Crop Disease Management 2002. P. Narayanasamy

Fact Sheet (6)

المقالة السادسة: أمراض النبات المتسببة عن النيماتودا

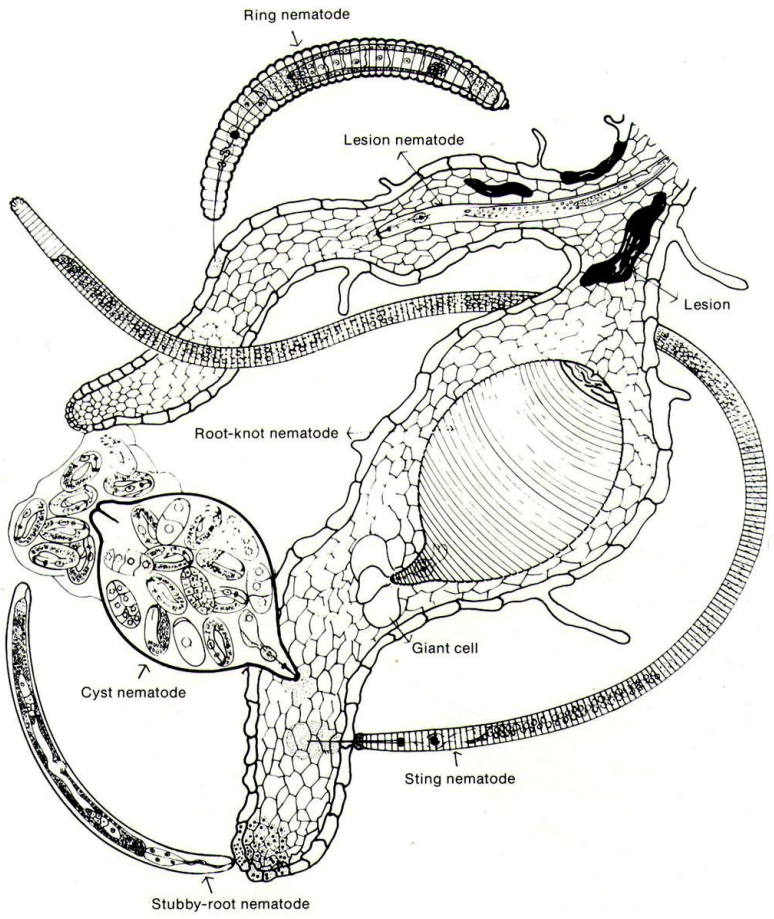
Plant diseases caused by Nematodes

❍ تـقـديـم:

تنتمي النيماتودا إلى المملكة الحيوانية فى شعبة مستقلة (Nematoda) والنيماتودا تشبه فى مظهرها الديدان Worm like ولكنها في الحقيقة تختلف من الناحية التقسيمية إختلافا كبيرا عن الديدان الحقيقية.

ومعروف حتى الآن عدة آلاف من أنواع النيماتودا تعيش معظمها حرة سواء في المياه العذبة أو المالحة أو التربة وتتغذى في ذلك على النباتات والحيوانات الميكروسكوبية.

والعديد من النيماتودا يتطفل على الإنسان والحيوان محدثاً لهما أمراضاً مختلفة كما يوجد عدة الاف من الانواع ذات المقدرة على مهاجمة النباتات محدثة لها أمراضاً متنوعة.



شكل ــ ٩٥

يوضح تواجد واشكال النيماتودا واطوارها الممرضة فى انسجة النباتات

صفات النيماتودا الممرضة للنبات
Characteristics Of Plant Pathogenic Nematodes

المورفولوجى:

- **يتراوح طول النيماتودا الممرضة للنبات بين** 300-1000 µm **و قد يصل أحيانا إلى** 4mm **أما قطرها فيتراوح بين** 15-35µm **ونظرا لهذا القطر الرفيع فهى غير مرئية للعين المجردة ولكن يسهل مشاهدتها ميكرسكوبيا. وعموما فالنيماتودا تظهر في شكل الثعابين**-Eel shaped **مستديرة في القطاع العرضي وجسمها ناعم غير مقسم وليس بها أرجل أو زوائد والاناث في بعض الأنواع تنتفخ عند النضج وتكون شكل كمثرى أو كروى.**

- **تتميز النيماتودا الممرضة للنبات بوجود رمح أو حربة** Stylet or Spear **مجوف يستخدم في إحداث خدوش لخلايا النبات وعن طريقة تمتص محتويات الخلايا.**

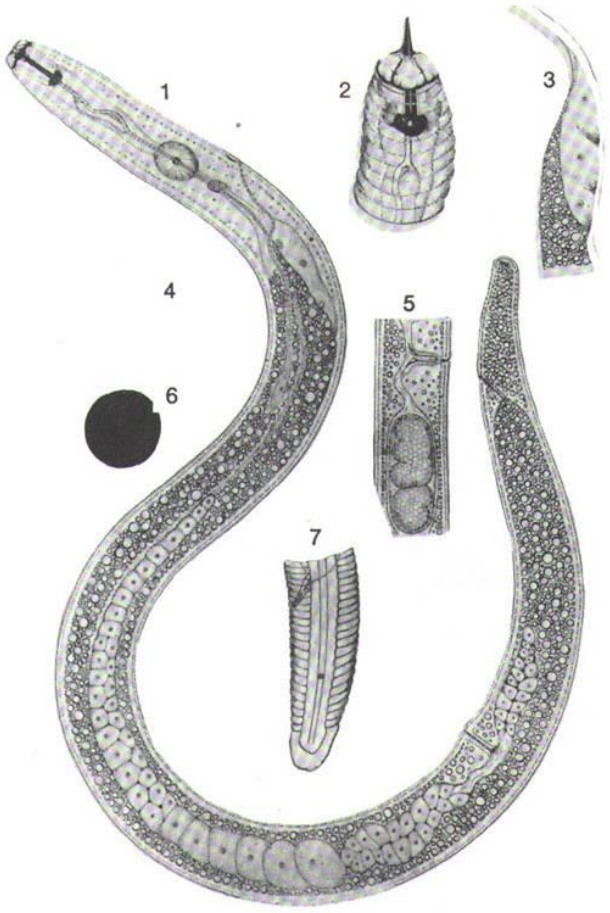
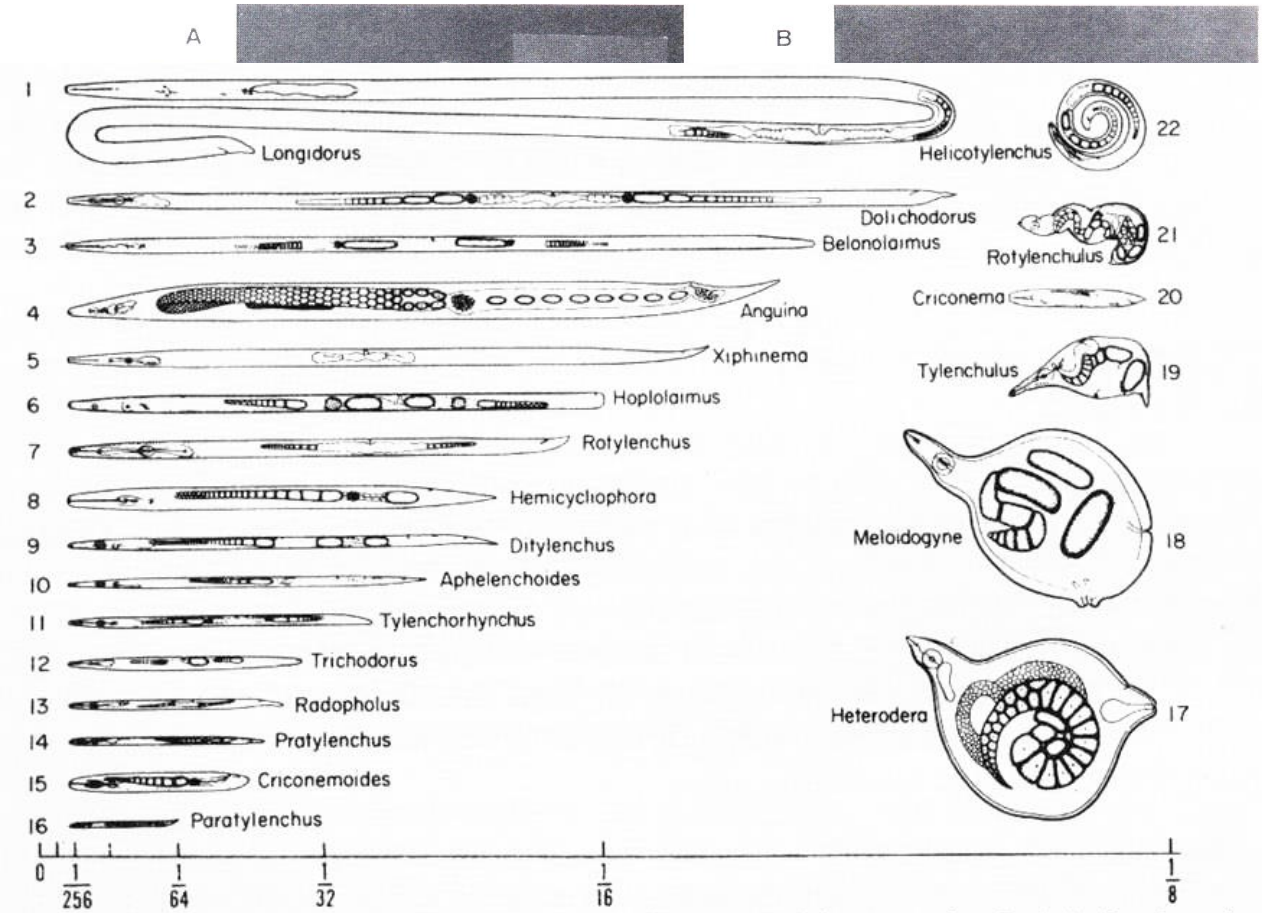


Fig. 96 *Pratylenchus brachyurus,* a root-lesion nematode. 1, female; 2, head (showing stylet); 3, lower portion of esophagus; 4 and 6, cross sections; 5, vulvar region (showing eggs in the uterus); 7, tail. (From Perry, 1978; courtesy of Limhuot Nong.)

شكل ــ ٩٦

يوضح شكل النيماتودا *Pratylenchus brachyurus* المسببة للتقرح واجزاء جسمها المختلفة



e 1. Size and shape of the most important genera of plant parasitic nematodes. Scale in fraction of an inch. (From G.N. Agrios, Plant Pathology©, 1969. Reproduced by permission of Academic Press, Inc.)

Fig. 97

دورة الحياة Life Cycle

- تتشابه إلى حداً كبير دورات الحياة في معظم النيماتودا الممرضة للنبات حيث يفقس البيض ليعطى يرقات `ذات مظهر وتركيب مشابه للنيماتودا الناضجة. تزداد اليرقات في الحجم وتنسلخ عدة إنسلاخات ينتهى كل طور من الأطوار اليرقية بانسلاخ Molt . وكل أنواع النيماتودا لها ٤ أطوار يرقية وعادة يحدث الانسلاخ الأول داخل البيضة عقب الانسلاخ الأخير تتميز النيماتودا إما إلى ذكور ناضجة أو إناث ناضجة وتنتج الإناث عندئذ بيضاً مخصباً إما عقب التقاءها مع الذكور أو بكريا Parthenogenically كما إنه فى إمكانها إنتاج حيوانات منوية Sperms تستخدم فى تخصيب نفسها.

- تكتمل دورة الحياة من البيضة إلى البيضة في غضون ٣-٤ أسابيع تحت الظروف المثلى من درجات الحرارة وتزيد الفترة عن ذلك في الجو البارد.

- في بعض أنواع النيماتودا لا ّيحدث الطور الأول والثاني إصابات للنبات بل يعتمدوا في غذائهم على الطاقة المخزنة في البيضة ولكن عندما يتكون الطور المعدي فعليه البحث عن عائل قابل للإصابة و إلا سيموت جوعا ومن الثابت أن غياب العوائل المناسبة يؤدى إلى موت كل أنواع النيماتودا في خلال شهور قليلة وفى أنواع أخرى فان الأطوار اليرقية تجف وتظل ساكنة Quiescent أو أن البيض يظل ساكن في التربة لعدة سنوات.

البيئة والانتشار Ecology and Spread

- عادة ما تقضي كل أنواع النيماتودا الممرضة للنبات جزءاً من حياتها في التربة ويعيش العديد منها حراً يتغذي على أسطح الجذور والسيقان النامية تحت سطح التربة.

- تلعب حرارة التربة والرطوبة والتهوية أدواراً هامة في حياة وحركة النيماتودا أثناء تواجدها في التربة.

- عادة تنتشر النيماتودا في الطبقة السطحية من التربة بعمق يتراوح من صفر ـ ١٥سم مع ملاحظة أن توزيع النيماتودا في التربة المنزرعة غير منتظم حيث ينتشر بدرجة كبيرة حول جذور النباتات القابلة للإصابة لتواجد غذائها المفضل والذي تنجذب إليه بواسطة المواد الجاذبة التي يفرزها العائل في التربة خاصة في منطقة الريزوسفير Rhizosphere وهو ما يسمى بتأثير عامل الفقس Hatching factor effect للمواد التي تفرز من الجذور وتنتشر في التربة المحيطة بها حيث تعمل على تنشيط فقس البيض لبعض الأنواع. ومن ناحية أخرى فإن معظم بيض النيماتودا يفقس حرا في الماء في غياب أي مواد منشطة له.

- تنتشر النيماتودا ببطيء شديد في التربة فإذا اعتمدت على نفسها فقد لا تتعدى المسافة التي تتحركها خلال الموسم عن متراً طولياً. كما أنها تتحرك بدرجة أسرع إذا كانت الثقوب بين جزيئات التربة مبطنة بطبقة رقيقة من الماء (سمكها عدة ميكرومترات) وعكس ذلك فى التربة الغدقة Waterlogged.

- بالإضافة إلى ذلك فان النيماتودا يمكنها الإنتشار بأي أسلوب من أساليب الانتشار المعروفة والتي تساعد على حمل جزيئات من التربة من مكان لأخر مثل أجهزة المزرعة ومياه الري والصرف والعواصف الرملية وأثناء رعى الحيوان وإنتقاله أما إنتقال النيماتودا لمسافات طويلة فيكون عن طريق نقل المنتجات الزراعية والنباتات (الشتلات) من مكان لأخر أو من

بلد لأخر أو من قارة لأخرى وهناك عدد قليل من النيماتودا يمكنه الانتقال بين النباتات المتجاورة بواسطة طرطشة مياه الأمطار أو عن طريق الري الزائد.

عزل النيماتودا الممرضة Isolation of Nematodes

- **يمكن عزل النيماتودا من الجذور المصابة أو من التربة المحيطة بالجذور التي تتغذى عليها.وحيث أن عدداً قليلاً من النيماتودا يصيب الأجزاء النباتية فوق سطح التربة ومنها على سبيل المثال:**

Stem, leaf, and bulb nematode, Grass and seed nematodes **فإنها تعزل من الأجزاء المصابة مباشرة.**

١- عزل النيماتودا من التربة: Isolation of Nematodes from soil

- **يمكن عزل النيماتودا من التربة المأخوذة من أعماق تتراوح بين صفر-١-٣ متراً وذلك بالإستعانه بأقماع بيرمان أو المناخل.**

٢-عزل النيماتودا من الأجزاء النباتية: Isolation of nematodes from plant material

- **تقطع الأجزاء النباتية المصابة قطعاً صغيرة بواسطة اليد أو بالإستعانة بالخلاط ولعدة ثواني ثم توضع في أقماع بيرمان حيث تخرج النيماتودا من الأنسجة وتتحرك مع الماء لترسوا بواسطة الجاذبية الارضية عند عنق القمع.**

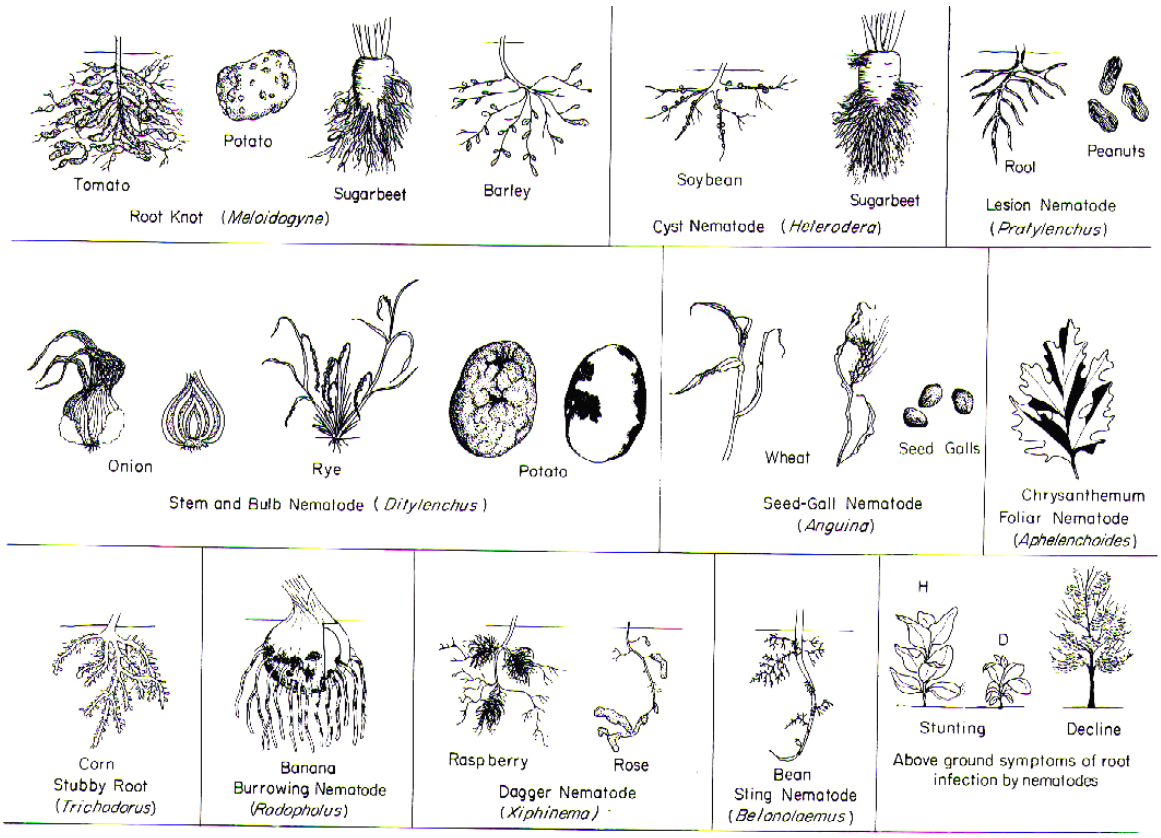
الأعراض التي تسببها النيماتودا Symptoms Caused by Nematodes

- **تسبب النيماتودا أعراضها على كل من الجذور والأجزاء الهوائية فوق سطح التربة. وتظهر الاعراض في صورة تعقدات أو تورمات أو قرح على الجذور وقد يحدث غزارة في تكوين الجذور الشعرية قرب قمم الجذور. قد يحدث أيضاً عفناً للجذور إذا ما تواجدت النيماتودا مع بكتيريا أو فطريات ممرضة أو مترممة.**

- **أما الأعراض على الجذور فتكون مصحوبة بأعراض فوق سطح التربة حيث يصبح نمو النبات ضعيفاً ومصحوباً بأعراض أشبة بأعراض نقص العناصر مثل إصفرار المجموع الخضري أو ذبول زائد خاصة في الجو الحار أو الجاف كما يقل جودة المنتج الزراعى ويتدهور الانتاج.**

- **تغزو بعض أنواع النيماتودا الأجزاء فوق سطح التربة بالإضافة إلى الاعراض على الجذور حيث تسبب أوراماً وتقرحات وأعفاناً أو التفاف للأوراق والأفرع .**

- **بعض أنواع النيماتودا تهاجم الحشائش مكونة أوراما ممتلئة بالنيماتودا على جذورها.**



Types of symptoms caused by some of the most important plant parasitic nematodes.

شكل ــ ٩٨

أنواع والاعراض المتسببة عن الاصابات المرضية الناتجة عن الاصابة بالنيماتودا

- **الضرر الميكانيكي الذي يحدث بواسطة النيماتودا أثناء التغذية في حد ذاته ذو تأثير محدود على النبات ولكن معظم الضرر يحدث بواسطة اللعاب** Saliva **الذى يحقن في النبات أثناء تغذية النيماتودا. وبعض أنواع النيماتودا تكون سريعة فى تغذيتها حيث تخدش الجدار الخلوي وتحقن لعابها في الخلية لتمتص جزء من محتوياتها ثم تتحرك من مكانها في خلال ثواني معدودة وبعضها يتغذى ببطء شديد كما يمكنها البقاء في نفس الجزء المخدوش لساعات أو أيام. وفى حالة الإناث التي تعيش في الجذور تظل تفرز اللعاب طالما هي موجودة وتتغذى.**

- **وعملية التغذية هذه تجعل الخلايا النباتية تتفاعل إما بالموت أو بتكوين شعيرات جذرية أو براعم أو قرح وقد تموت الأنسجة أو تنتفخ مكونة أوراماً أو يحدث التفافاً أوالتواءاً للسيقان والمجموع الخضري.**

- **تنشأ بعض هذه الأعراض نتيجة ذوبان محتويات الأنسجة بواسطة إنزيمات النيماتودا وهذه الانزيمات بمفردها تسبب موت الخلايا.**

- **بعض أنواع النيماتودا تسبب نموا زائداً فى الانسجة** Hypertrophy (Abnormal cells)
- **والبعض يسبب تثبيطاً للخلايا** Suppression of cells
- **والبعض الأخر ينشط إنقسام الخلايا لتكون أوراماً أو لإنتاج عدداً كبيراً من الجذور الجانبية وعموماً فالاعراض المتسببة عن الإصابة بالنيماتودا أعراضاً متشابكةومعقدة فمثلاً الأنواع**

التي تتغذى على الجذور تقلل قابلية النبات لامتصاص الماء والمواد المعدنية من التربة ولهذا فإنها تسبب أعراض نقص العناصر وجفاف الأجزاء النباتية فوق سطح التربة.

- **في بعض الأحوال تلعب النيماتودا دورا هاما في تسهيل أصابة النباتات بكائنات ممرضة أخرى عن طريق إحداث فتحات لها تدخل منها وعلية فان وجود أعداد محدودة من النيماتودا تتغذى علي الجذور قد لا يحدث أضراراً اقتصادية ولكن الأساس هو أنها تحدث أضراراً ميكانيكية تساعد على دخول المسببات المرضية الاخرى للنبات أما فى حالة وجود النيماتودا بأعداد كبيرة فإن تأثيرها الاقتصادي يكون محسوساً.**

<u>التفاعل بين النيماتودا والمسببات المرضية الأخرى:</u>

- **بالرغم من أن النيماتودا تسبب بمفردها أمراضا للنباتات إلا أن طبيعة وجودها في التربة مع كائنات أخرى مثل البكتيريا والفطريات المحيطة بها وهذه أيضا ممرضة فأنه في عديد من الحالات يحدث تفاعل فيما بينها يؤدى إلى حدوث أضراراً مضاعفة أكثر من التي يحدثها كل بمفردة.**

- **يوجد العديد من هذه العلاقات المركبة مثل تفاعل النيماتودا والفطريات المسببة لأمراض الذبول حيث تزيد الاصابة بهذه المسببات فى وجود النيماتودا ومن أهم هذه الفطريات** *Verticillium* spp.*, Phytophthora* spp.*, Phythium* spp., and *Fusarium* spp.

- **ومن المشاكل التي تسببها النيماتودا أيضا صعوبة إنتاج أصناف مقاومة للفطريات مثل الاصناف المقاومة للفطر** *Fusarium* spp. **والذى يسبب مشاكل اقتصادية فى التربة المصرية فوجود النيماتودا يعمل على كسر صفة المقاومة فى الاصناف المنتجة فتتحول بذلك إلى أصناف قابلة للاصابة ويذهب جهود المربين هباءاً.**

- **ومن الملاحظ عند تفكير الاجهزة التنفيذية في مقاومة مثل هذه الحالات إنهم لايهتمون في العادة إلا بمقاومة النيماتودا وإهمال إحتمال وجود فطريات منتشرة في التربة تسبب أمراضاً للنبات وبالتالى يصبح برنامج المقاومة غير مكتمل.**

- **توجد علاقات بين النيماتودا والبكتيريا الممرضة فتزيد شدة الإصابة بالبكتيريا المسببة للذبول الوعائى** *Pseudomonas solanacerum* **فى وجود نيماتودا تعمل على إحداث جروح تدخل منها البكتيريا.**

- **العلاقات بين النيماتودا والأمراض الفيروسية معروفة فكثيرا من الأمراض الفيروسية مثل مرض الورقة المروحية في العنب** Tomato Fan leaf **ينتقل عن طريق التربة بواسطة النيماتودا أثناء تغذيتها.**