الباب الثانى: مقدمة و تعريف للأمراض النباتية

الفصل الثالث: تشخيص الأمراض النباتية.

تشخيص الأمراض النباتية PLANT DISEASES DIAGNOSIS

عملية تشخيص الأمراض النباتية هى الاساس فى المكافحة ومنع الخسارة الاقتصادية، وقد يؤدى التشخيص الخاطئ الى زيادة المشكلة وبذلك يصبح من الصعب السيطرة عليها. و يعد التشخيص السليم الخطوة الأولى في دراسة أي مرض نباتي، ولا بدّ من إجراء تشخيص دقيق وسريع للمرض قبل اقتراح أي طريقة للمعالجة. ويعتمد التشخيص أساساً على ملاحظة الأعراض المميزة التي يبديها النبات المريض، والعلامات الخاصة بالكائن الممرض. وهذا يلزمنا بالتذكير ووضع تعريف دقيق للأعراض و أخر للعلامات المرضية و اللذان يعتبران الأساس في تشخصي الأمراض النباتية (واللذين سبق استعراضهما في الفصل الأول من الباب الثانى هذا).

أعراض المرض: هي تعبيرات للحالات المرضية يظهرها النبات المريض نتيجة التفاعل بينه وبين المسبب المرضي. أو هي التعبير المظهري الذي يدل على التغير الفسيولوجي الذي حدث للنبات نتيجة الاصابة.

علامات المرض : هي تراكيب لمسبب المرض سواء خضرية أو ثمريه, وتتميز عن الأعراض بأنها دليل مباشر على وجود المرض لا مجرد تغيرات في النبات. أو هي وجود المسبب المرضي نفسه أو جزء منه مصاحباً لأعراض المرض.

***أهمية تشخيص المرض :**

عملية التشخيص هى الاساس الذى تعتمد عليه أسس مكافحة المرض خاصة إذا تطلب الأمر علاجاً كيماوياً أو تدخلاً من الإنسان لهذا المرض وعلى ذلك فان دقة التشخيص وسرعته لهما بالغ الأثر في محاصرة الأمراض النباتية ومنع أو تقليل الخسارة الاقتصادية الناجمة خاصة عن الإصابة بالأمراض المعدية.

وعملية تشخيص المرض النباتي تماثل تماما الكشف عند الطبيب بالنسبة للإنسان، حيث أنها هي الأساس الذي يُعتمد عليه فى عملية مكافحة المرض. وعلي ذلك فإن دقة التشخيص وسرعته أيضا يكون لهما بالغ الأثر في محاصرة الحالة ومنع أو تقليل الخسارة الاقتصادية, علي العكس من ذلك فإن التشخيص الخاطئ سيؤدي إلى عدم فعالية الإجراءات المتخذة وهذا يعني تفاقم المشكلة من ناحية وإلى مزيد من الخسائر من ناحية أخرى.

وحيث أنه هناك أمراض يمكن أن يتعرف عليها ذوي الدراسة والخبرة المحدودة في أمراض النبات بسهولة، بل أن المزارع نفسه يمكن أن يتعرف عليها إذا كانت شائعة الحدوث علي المحصول مثل أمراض الأصداء والتفحمات والبياض الدقيقي وغيرها. بينما قد تظهر في بعض الأحيان مشكلات مرضية أخرى يتطلب التعرف عليها الاستعانة بشخص علي درجه عالية من الخبرة, وقد يتطلب أجراء بعض التجارب فى المعمل للتعرف عليها. لذا سوف نتعرف في التالي عن المراحل التي تستلزم لتشخيص الامراض النباتية.

مراحل تشخيص الأمراض النباتية:

أولا: مرحلة التشخيص الحقلي:

يعتمد بالدرجة الأولى على المشاهدات التي يمكن ملاحظتها على النبات المصاب مثل الأعراض والعلامات المرضية وتوزيع المرض فى الحقل وعلى النبات نفسه وعلاقته بالنظام البيئي إلى جانب المعلومات التي يمكن الحصول عليها من المزارع أو المنتج.

فيمكن أن نُعرف تشخيص المرض النباتي بأنه علم و مهارة التعرف علي وجود مرض ما، و ذلك بناء علي الحس الدقيق و الإدراك الواعي لأعراضه و خصائصه، و من ثم التعرف على المرض والمسبب. لذلك فإن القائم بعمليه التشخيص لابد أن يقترن لديه العلم و المهارة. وأن يكون هذا الخبير على دراية بتشخيص الأمراض فى كافة المحاصيل. ويجب ان يمتلك بعض الادوات منها (الة تصوير - عدسة يدوية - مقص تقليم لقص أفرع الأشجار و فحصها بدقه).

خطوات تشخيص المرض فى الحقل:

1. ملاحظة توزيع المرض في الحقل: حيث ان لكل مرض معين طريقة فى التوزيع، فإذا كان المرض مثلا منتشر فى الحقل يمكن ان يكون ذلك نقص العناصر المعدنية او وجود ملوثات، وإذا كانت عشوائية التوزيع يكون المسبب فطريات منقولة بواسطة الهواء.
2. ملاحظة توزيع الأعراض على النبات نفسه مثل ان يكون المرض على الاوراق الحديثة او الكبيرة.
3. فحص الاعراض والعلامات على النبات لأنه بذلك يستدل على الممرضات التى تتسبب فى حدوث المرض .
4. ملاحظة التغير العام فى مظهر النباتات فى الحقل
5. تصوير كافة الأعراض السابقة وتسجيلها بدقة و الاحتفاظ بها فى سجلات خاصة.

ما يجب على القائم بعملية التشخص للمرض القيام به:

1- ملاحظة جيدة جدا لتوزيع الحالة المرضية فى الحقل.
2- معرفة كل شئ عن هذا النبات الذى سوف يقوم بفحصة.
3- على المشخص المبتدئ أن يستعين بكتب أو كتيبات أمراض النبات أو مواقع الأنترنت ذات الصور الملونة ليطابق عليها ما يراه، نظرا للتشابه الكبير بين أعراض أكثر من مرض على النبات الواحد.
4- معرفة بعض المعلومات من المزارع نفسة قد تفيد المشخص فى التعرف على المشكلة وحلها.
5- فى حالة تعذر تحديد المرض، ويجب عرض المشكلة على شخص اخر لدية خبره أكبر.
6- الحصول على موافقة المزارع/المنتج قبل اخذ اى عينة من النبات المصاب او التربة.
7- اخذ عينة الى المعمل اذا لم تتمكن من التعرف على المرض أو حل المشكلة فى الحقل.

مميزات العينة الجيدة:

1. يجب أن تتضمن عينة النباتات المصابة نباتات كاملة فى حالة النباتات الحولية والشتلات وأن تتضمن فروعا وأجزاء من الجذور فى حالة الأشجار.
2. يجب حفر التربة للحصول على الجذور سليمة حتى لا تتمزق.
3. يجب أن تتضمن العينة ما لا يقل عن 6 نباتات تعبر عن درجات مختلفة من الأعراض .
4. يوضع كل نبات مصاب فى كيس ورقى منفصل.
5. تجمع عينات النباتات المصابة فى الصباح.
6. يجب تجنب تلويث المجموع الخضري للنبات بحبيبات التربة، أما الجذور فتغسل بحرص.

المرحلة الثانية: مرحلة التشخيص المعملي:

توجد بعض الخطوات الأساسية و الاختبارات المبدئية والتي قد تساعد فى سرعة الاستدلال على المرض مثل:

عند الوصول إلى المعمل تجرى عدة اختبارات مختلفة لمحاولة تشخيص المرض ومعرفة المسبب المرضى له , وفى كل الأحوال يجب اتباع الآتي:

- يتم عمل فحص ميكروسكوبي مبدئي سريع لإعطاء فكرة أفضل وسريعة عن المرض.
- في حالة عدم وضوح الأعراض توضع العينة في غرفة رطوبة وذلك لتشجيع نمو المسبب المرضى.

- أن يتم العزل من المنطقة الفاصلة بين الجزء المصاب والجزء السليم , وعدم العزل من الجزء المتعفن والمتهالك لأنه تكثر به المترممات.
- إذا كان المسبب المرضى موجود على سطح العينة يفضل عدم عمل تعقيم سطحي, على العكس من ذلك إن كان المسبب المرضى بداخل العينة.
- يفضل استخدام بيئات متخصصة عند العزل وذلك للحد من المترممات.

وعموما توجد طرق متعددة ومختلفة لتعريف الميكروبات المتحصل عليها, حيث تختلف هذه الطرق تبعا لاختلاف الميكروب المعزول وأيضا طبقا للإمكانات المتاحة, ويمكن تقسيم هذه الطرق المعملية إلي مجموعات على النحو التالي:

اولا: الاختبارات الفسيولوجية:

تلك الاختبارات التي تعتمد على العمليات الحيوية التي يقوم بها الميكروب مثل قدرته على تحليل بعض المركبات مثل النشا والدهون والجيلاتين وغيرها إلى جانب اختبار البصمة التنفسية, تخمر السكريات, تحليل الدهون, تحليل النشا, تحليل الجيلاتين, اختزال النترات, إفراز التوكسينات KOH , وتكوين اللويفان. هذه الاختبارات مفيدة في حالة الفطر والبكتيريا والخمائر ولكنها لا تصلح لتشخيص الفيروسات والفيرويدات والبكتيريا صعبة الانماء وتفيد البيئات المتخصصة فى بعض هذه المسببات.

ثانيا: الاختبارات البيولوجية:

الاختبارات البيولوجية التي تعتمد على علاقة المسبب المرضى بالنبات، وتشمل اختبار القدرة المرضية والحساسية الزائدة واختبارات المدى العوائلى وطرق انتقال المسبب المرضى، وهى من أهم الاختبارات التي تؤكد فروض/مقترحات كوخ لعزل المسبب وتعريفه.

توجد اختبارات عدة ضمن الاختبارات البيولوجية نذكر أهمها هي:

1. **اختبار القدرة المرضية للمسبب المرضى (Pathogenicity test):**

وهى تستخدم في تشخيص معظم مسببات أمراض النباتات عموما، ماعدا الفيروسات ويتم ذلك عن طريق تطبيق افتراضات كوخ (Koch's Assumptions) على النحو التالي.

أ- مصاحبة المسبب المرضى للحالة المرضية (علامات المرض), وظهور أعراض مرضية واضحة.
ب- عزل المسبب المرضى بصورة نقية وتنميته بعيدا عن العائل.
ج- ظهور نفس الأعراض عند إعادة عدوى عائل سليم بالمسبب المرضى.
د- إعادة عزل المسبب المرضى ومطابقته بالمعزول سابقا.

2. **اختبار الحساسية الزائدة (Hypersensivety reaction) :**

ويقصد به مدى تقبل النسيج النباتي للميكروب المحقون فيه وبالتالي رد فعل النبات الذي يعقب ذلك, ويتم هذا الاختبار بحقن المسبب المرضى في نبات حساس جدا لهذا المرض وتسجيل الأعراض الناتجة, وهو من الاختبارات الهامة في البكتريا والفيروسات.

3. **اختبار المدى العوائلى (Host rang test):**

ويقصد به اختبار الميكروب على عدد معين من أنواع النباتات الكشافة من نفس عائلة النبات الأصلي المعزول منة الميكروب ومقارنة الإصابة على هذه العوائل المختلفة. حيث أن بعض المكروبات لها مدى عوائلى واسع مثل بكتريا (*Erwinia carotovora*) والبعض الآخر ذو مدى عوائلى ضيق أو محدود مثل النوع (*Erwinia amylovora*) وبهذه الطريقة يمكن التفرقة بين هذه الأنواع المختلفة.

4. **اختبار العوائل المفرقة (Differential host):**

وهى مجموعة من النباتات تصاب بنسب مختلفة من مسبب مرضى واحد, أي يختلف رد فعلها لنفس المسبب المرضى مثل نباتات الدخان والداتورة والونكا وغيرها. وهذا الاختبار من الاختبارات الهامة في التعرف على العديد من الفيروسات والبكتريا والميكروبلازما.

5. **النقل بالحشرات والحلم (Transited by Insect and dodder):**

وهو من الوسائل المتبعة في التعرف على بعض الفيروسات والميكروبلازما, وذلك عن طريق معرفة طريقة نقل العدوى، هل هو خارجي أو داخلي, وهل الميكروب يتكاثر داخل الناقل.

6. **النقل بالتقاوي (:Seeds transition):**

يمكن الكشف عن العديد من مسببات أمراض النبات في تقاوى النباتات، وهى من الوسائل الشائعة في العديد من مسببات أمراض النبات مثل الفطريات والبكتيريا و النباتات الزهرية المتطفلة و افات السوس وغيرها.

ثالثا :التقنيات المجهرية "الميكروسكوبية" (Microscopic techniques) **:**

تعتبر تلك التقنيات هي الأكثر دقة عما سبق من اختبارات، وتعتمد على استخدام المجهر (الميكروسكوب) الضوئي أو الالكتروني بأنواعه المختلفة للتعرف على المسببات المرضية، ودراسة صفاتها التركيبية والتشريحية ومعرفة تأثيرها على العائل أو الناقل وأماكن تواجدها في الخلايا، ويزيد من قدرة وكفاءة هذه التقنيات المجهرية استخدام الصبغات المتخصصة والكيماويات الكاشفة والأجسام المضادة. ولقد ثبت أن استخدام التقنيات المجهرية له قيمة عظيمة جدا في تشخيص أمراض النبات عن طريق التعرف على مسببات أمراض النباتية المختلفة وعمليات تطورها وتفاعلها مع عوائلها، و يعتبر قليل التكلفة مقارنة بالتقنيات الحديثة، بجانب ارتفاع دقة النتائج مقارنة بطرق التشخيص التقليدية الأخرى. ونستعرض باختصار كلا النوعين من تلك التقنيات كالاتي:

1. **الميكروسكوب الضوئي** (Optical microscope)**:**

ويستخدم في فحص الأعراض وبعض العلامات على النباتات, كما أنه يستخدم في التعرف على العديد من مسببات الأمراض الفطرية وأيضا البكتيرية والنيماتودا, كما أنه يمكن الكشف عن الاسبيروبلازما داخل اللحاء بعد الصبغ. ويمكن رؤية بعض الأجسام التي تدل على وجود المسببات مثل رؤية الأجسام البلورية لفيروس موزايك الدخان (TMV) في نباتات الدخان. كما يستخدم في وصف كثير من صفات مزارع الطفيليات وأشكالها المورفولوجية للعديد منها النامية في أطباق بتري مثل لون المزرعة, حجم وشكل الجراثيم وغيرها.

2. **-الميكروسكوب الإلكتروني (Electron microscopy):**

استخدام الميكروسكوب الإلكتروني يوفر امكانيات أعلى عن الميكروسوب الضوئى، من بينها تكبير حجم الصور بدرجة واضحة تتيح للفاحص سهولة تحديد المسبب المرضى، ويكون هاما جدا في دراسة التفاعل بين النباتات ومسبباتها المرضية, وخاصة بعد استخدام الميكروسكوب الإلكتروني في دراسة دور كيمياء الخلية في المناعة وذلك بالتحكم العالي في وصف دقيق للعلامات المميزة وتصوريها وخاصة التركيب البنائى الكامل أو وحداته الجزيئية.

وإدخال تعزيزات الفيديو لاستخدامات الميكروسكوب قد أتاح تسجيل وقت حقيقي ملموس لما يحدث في الخلية الحية. وحديثا أدى استخدام الأجسام المناعية المعلمة بأشعة ضوئية (فلورسنتية) والفحص الميكروسكوبي إلى تحسين فهمنا للتفاعل بين مسببات أمراض النبات المختلفة وعوائلها. مع إدخال مركبات مميزة في طرق الكشف الفلورسنتية الجديدة والتقدم الهائل في طرق التصوير

الفلورسنتى, مما يتيح الآن دراسة الممرضات في النباتات وتفاعلها مع عوائلها باستخدام الطرق المختلفة.

وأصبح اليوم استخدام الميكروسكوب الإلكتروني مفيدا في تشخيص معظم الأمراض النباتية ومسبباتها المختلفة من فطريات وبكتريا وفيروسات وشبيهاتها ونيماتودا وغيرها.

رابعا: الاختبارات المصلية "السيرولوجية" (Serological assay):

كل الاختبارات المصلية "السيرولوجية" ترتكز على الاساس العلمي أنه عندما يحقن دم الحيوان الدافئ (الأرنب مثلا) بواسطة بروتين غريب (المُسْتَضَدّ أو مولد الضد أو مولد المضاد (الأنتيجين Antigen) وهو الفيروس النقي (فى هذه الحالة، فنجد أن الأجسام المضادة (Antibody) تتكون فى مصل الدم (Serum) "السيرم"، و معظم الفيروسات تعتبر مستضدات (أنتيجينات) جيدة و مصل الدم (*Serum*) "السيرم" المتكون يمكن فصله و يعرف حينئذ بالأنتيسيرم (الجسم المضاد Antibody) و عندما يجهز و يخلط فى المعمل مع الفيروس المراد الكشف عنه (الأنتيجين فى هذه الحالة)، نجد أن التفاعل الذى يتم يمكن منه تحديد نوع الفيروس الطفيل. للفيروسات النباتية قدرة انتيجينية، حيث يعتبر البروتين وخاصة المنطقة الخارجية للفيرس هو الجزء النشط انتيجينيا، اما الحامض النووي فربما يزيد القدرة على انتاج الاجسام المضادة.

وتستخدم تلك الطريقة فى الكشف عن المسبب المرضى غير المعروف و تصلح مع عدة مسببات مرضيه واشهرها الاصابات الفيروسية، بينما لا تصلح مع الفيرويد وتنقسم تلك الاختبارات الى:

1. **ختبارات الترسيب (Sedimentation tests):** تخلط نقطة من الأنتيسيرم مع نقطة من عصير النبات المصاب بالفيروس، وبعد مدة من الوقت يحدث ترسيب، والذى يمكن أن يلاحظ بواسطة الفحص بالميكروسكوب العادي. و الترسيب هذا يحدث فى عينة العصير المصاب، و لكن لا يظهر فى حالة العينات السليمة. ويشمل اختبار الترسيب عدة انواع، من هذه الاختبارات الترسيب فى انابيب واختبار التجمع واختبار الانتشار فى الاجار، وهى اختبارات متوسطة الحساسية ولكن تستهلك كميه كبيرة من الأجسام المضادة. الا ان اختبار الانتشار خلال الاجار لازال يفيد فى المعلومات عن القرابة بين بعض العزلات الفيروسية. و لكن يعيب هذه الطريقة حاجتها إلي كميات كبيرة من المواد البروتين (الانتيجين) والاجسام المضادة (الانتيبدى)، و أنها متوسطة الحساسية، بل ربما قد تؤدى إلى نتائج مضللة، مع وجود صعوبة في التقديرات الدقيقة و تفسيرات بعض النتائج.

2. **اختبار الإسالة**: اختبار مشابه لاختبار الترسيب و تزداد حساسية هذا الاختبار بواسطة الارتباط الكبير بين جزيئات الأجسام المضادة (نقطة من الاجسام المضادة الحساسة) الموجودة في الأنتي سيرم مع نقطة من عصير النبات المصاب. فإذا كان العصير يحتوى على نفس الفيروس نجد أن الجزيئات سوف تظهر و التفاعل يكون مرئى بدون ميكروسكوب، و اختبار الإسالة يكون أكبر مائة أو ألف مرة فى الحساسية عن اختبار الترسيب الدقيق، و لكنه يتطلب ترويق عصير النبات المصاب. و لكى يكون التفاعل سريع يحتاج إلى كمية كبيرة من الأنتيسيرم، و هذا يتطلب كيماويات و إمكانيات معملية كبيرة.

3. **اختبارات لونيه (Color Tests):** ولها مميزات عدة مقارنة باختبارات الترسيب، او الإسالة، فهي أكثر حساسية من كليهما، و تحتاج لكميات قليلة جدا من البروتين (الانتيجين) والاجسام المضادة (الانتيبدى) مقارنة بالاختبارات الأخرى. أيضا تعطى فكرة واضحة عن تركيز الفيروس في العينات، هذا بالإضافة لإمكانيه الكشف عن عدد كبير من العينات في نفس الوقت. ومن تلك الاختبارات اللونية:-

أ- اختبار إليزا ELISA (**Enzyme-linked immunosorbent assay**) :

وتشمل اختبارات الاليزا (**ELISA**) الطرق المباشرة وغير المباشرة وتتم هذه الاختبارات في اطباق خاصه، وهى من اكثر الطرق شيوعاً في الكشف عن الأمراض الفيروسية.

تستخدم هذه الطريقة بصورة كبيرة فى تحاليل المناعة والفيروسات كالإيدز والتهاب الكبد الوبائي فى البشر، وكذلك في التعرف على الفيروسات النباتية. تعتمد فكرة الاختبار على قاعدة هامة فى علم المناعة وهى فكرة المناعة المتخصصة والتي تتلخص فى أنه عند دخول جسم غريب الى جسم الانسان (فيرس معين مثلا) يقوم جهاز المناعة بتكوين أجسام مضادة مناعيه ضد انتيجينات هذا الجسم الغريب وتظل موجودة فى الجسم فيما يسمى الذاكرة المناعية, تكون هذه الاجسام المضادة خاصة للأنتيجين الذى تكونت من أجلة فقط. ومن هنا تأتى الفكرة فعندما نريد أن نبحث عن انيجين أو فيرس معين فى عينة لشخص ما نأتي بالأجسام المضادة المتخصصة له فترتبط به والعكس صحيح.

ولعلنا نستعرض باختصار طرق القياس الكيميائى (طريق الاليز) وهما طريقتان:-

أولا: الطريقة المباشرة (Direct Elisa) : وهى احدى الطرق التي تستخدم لتحديد نسبة انتيجين مجهول في العينة (أي الميكروب نفسه).

أما الطريقة غير المباشرة -: (Indirect ELISA) وهى تحديد نسبة أجسام مضادة فى العينة. (مضادات الميكروب)، طريقة الاليزا المباشرة (Direct Elisa) فى الاليزا عادة نستخدم أطباق الاليزا وهو طبق مكون من صفوف وكل صف مكون من 8 عيون (wells) وعادة يكون بالطبق 96 عينا.

- **فى الطريقة المباشرة (Direct ELISA):** نبحث عن أنتجين مجهول، حيث تكون جدران العيون مبطنة بالداخل بالأجسام المضادة الخاصة بالانتيجين المراد الكشف عن وجودة. وعند اضافة العينة الى العين تقوم الاجسام المضادة الموجودة على جدران العين بالارتباط بالانتيجن اذا وجد فى العينة.
- ثم يتم غسيل العيون للتخلص من الاجسام المضادة غير المرتبطة والانتيجنات الاخرى الغريبة، ويتبقى الانتجين المطلوب مرتبط بالجسم المضاد الموجود على جدار العين الداخلية (Antibody-Antigen Complex)يسمى هذا المعقد (معقد الانيجين والجسم المضاد ، أو معقد الضد والمستضد).
- بعد ذلك يتم اضافة جسم مضاد أخر يكون مميز او معلم بواسط انزيم يتفاعل هذا الجسم المضاد الثانى مع معقد الانتيجين والجسم المضاد.
- تكرر عملية الغسيل مرة أخرى للتخلص من الاجسام المضادة غير المرتبطة.
- فى الخطوة الاخيرة يتم اضافة مركب (substrate or tmb) ، يقوم الانزيم المرتبط فى الجسم المضاد الثاني بتحويلة من مادة عديمة اللون الى مادة ملونه.
- بعد ذلك يتم وضع محلول (Stop solution) لوقف هذا التفاعل.
- يتم القراءة على جهاز يعمل بطريقة الاليزا عند الطول الموجى المناسب.

تتناسب قوة امتصاص هذا اللون مع تركيز الانيجين المجهول فى العينة ويأتي مع كل طاقم اليزا (كيت kites) عدة محاليل قياسيه (6 غالبا) بتركيزات متدرجة معلومة يتم عمله مع الاختبار المطلوب ثم يتم رسم منحنى قياسى يمثل العلاقة بين قوة التركيز (Concentration) الامتصاص (Absorbance) ويتم حساب النتائج من هذا المنحنى.

***طريقة الاليزا غير المباشرة (**Indirect ELISA**):** نفس خطوات الاليزا المباشرة السابقة ولكن فى هذه الحالة نبحث عن الاجسام المضادة المجهولة فى

العينة، فيتم العكس، حيث تكون جدران العيون مبطنة بالانتيجنات الخاصة بالأجسام المضادة المراد الكشف عنها وباقي الخطوات هى نفسها ولعل اشهر الامثلة لهذا النوع الاليزا الخاصة بالكشف عن الاجسام المضادة بفيروس C) التهاب الكبد الوبائي).

ونعرض مثالين عن الأمراض التي تم تشخيصها بهذه الطريقة:

- -فيروس تورد قمة الموز Banana Bunchy Top Virus (BBTV).
- فيروس الاصفرار المتقزم في الشعير Barley Yellow Dwarf Virus (BYDV)

ب- اختبار الـ ELISA-NCM (ELISA-NitroCellulose Membrane)

يستخدم في هذا الاختبار غشاء النيتروسيللوز الذي يتمتع بقدرته على ادمصاص البروتين, ويوجد نوعين لهذا الاختبار هما:

- Dot blot (DBIA) .وفية يتم عمل تنقيط Spotting للعصارة على الغشاء.
- Tissue-Print (TPIA) .وفية يتم عمل بصمة Printing للعصارة على الغشاء.

ج- اختبار ألـ "وسترين بلوت" (Western blot):

يتم في هذا الاختبار تقدير البروتينات الموجودة في العصارة النباتية في إطار سلسلة من الإجراءات والخطوات التي تدخل ضمن ما يسمى بالـ Protein Electrophoresis.

بعد توزيع البروتينات إلى حزم (Bands) في اوعية التفريد الكهربي (الجل Gel), مع ملاحظة ظهور الحزم التى تمثل بروتين المسبب المرضى, بعد ذلك يتم نقل نسخة من التفريد الكهربي للبروتين (الـ Pattern) الموجود على الجل في مجموعة من المحاليل المنظمة (Buffers) إلي غشاء النيتروسيللوز, ثم بعد ذلك تستكمل خطوات الاختبارات السيرولوجية كما في اختبارELISA-NCM .

يعتبر وسترين بلوت (Western blot) من الاختبارات الأساسية في الكشف عن الفيتوبلازما والاسبيروبلازما, ولكن لا تنجح مع الفيروسات وذلك لان الفيروس يحتوى على نوع واحد فقط من البروتين وهو الخاص بالغلاف.

***أمثلة عن الأمراض التي تم تشخيصها بطريقة وسترين بلوت:**

- تشخيص الفيتوبلازما *Deltocephalus vulgaris* التى تصيب قصب السكر.

خامسا: تشخيص الامراض النباتية باستخدام تقنيات المادة الوراثية Genetic Materials Techniques):

رغم أن للطرق المعملية السابقة بعض الايجابيات فإن لها كثير من السلبيات فى الكشف عن و التأكد من كنه المسببات المرضية، مما استوجب معه البحث عن طرق اكثر حساسيه وسرعه ودقة فى الكشف عن المسببات المرضية المختلفة والمتفاوتة إلى حد كبير.

لذلك كان الاتجاه لاستخدام المادة الوراثية (Genetic Materials) هو الحل الأمثل وأصبح استخدام الطرق التي تعتمد على تكنولوجيا المادة الوراثية من الاهمية حيث انها تعطى نتائج عالية الدقة وحساسة، حيث ان الاحماض النووية هى مركبات كيميائية معقده ذات أوزان جزيئيه عالية لا يمكن للخلية الاستغناء، وهى مميزة لكل كائن حى عن الاخر. وتنقسم المادة الوراثية في الكائنات الراقية الى نوعين وهما الـ DNA ووظيفته حمل المعلومات الوراثية من جيل لآخر، والنوع الثانى هو الـ RNA وظيفته نقل وترجمة المعلومات الوراثية (الشفرات) من النواه الى السيتوبلازم وتصنيع البروتينات. و هناك بعض الكائنات (خاصة الفيروسات) مادتها الوراثية فقط هى الـ RNA. ويعتبر تركيب الاحماض النووية صفة مميزه لكل كائن حي عن غيره، ومن هنا كانت أهميتها في عمليه التشخيص، وفى ما يلى بعض الطرق المستخدمة في تشخيص الأمراض وخاصة الفيروسية ولكنها لا تنجح مع الفيتوبلازما وذلك بسبب صعوبة الحصول على الحامض النووي لها بصورة نقية.

مميزاتها:

1. الدقة العالية.
2. عدم استهلاك كميات كبيرة من المواد المستخدمة, فيكفى وجود جزيء واحد من الحمض النووي المراد الكشف عنة لبدء الاختبار والحصول على نتائج إيجابية.
3. السرعة في الحصول على النتائج مقارنة بطرق التشخيص الأخرى.
4. الكشف عن عدد كبير من العينات في وقت قياسي.
5. من أفضل الطرق في تشخيص الأمراض المتسببة عن إجباريات التطفل التي لا تنمو على بيئات صناعية.

والأن نلقى الضوء سريعا على بعض هذه الاختبارات كالتالي:

1. **-اختبار الـ "بى سى أر" PCR (Polymerase Chain Reaction)**

يعتبر من اوائل الاختبارات التى تعتمد على المادة الوراثية واكثرها دقه وحساسيه فى الكشف عن ما هو غير معروف الا ان الجانب الاكثر فاعليه كان فى التوصل لتركيب جينوم المسبب المرضى ودراسة ومعرفة التعبير الجيني وقد حظيت هذه الطرق بالعديد من التطورات التى ادخلت عليها مثل:

RT-PCR, IC-RT-PCR, Nested & Heminested-PCR, Multiplex-RT-PCR.

يعتبر جهاز الـ PCR واستخداماته من أهم الطرق المستخدمة حديثا في مجال تشخيص الأمراض النباتية والحيواني ايضا والتعرف على مسبباتها. لأنه يتميز بالتخصصية العالية - الحساسية - السرعة. وتعتبر طريقة استخدام PCR من الطرق المعملية لإكثار الحامض النووي DNA والذي يمكن عن طريقة إكثار منطقة معينة مختارة منه (معلمات جزيئية Molecular Markers) والذي يصل إكثارها إلى حوالي مليون ضعف في دقائق معدودة، لذا أصبحت الان من أهم الطرق التي يعتمد عليها. وتعتمد هذه الطريقة على تكرار الدورات في دراجات حرارة عالية وحرارة منخفضة مع توفر المواد الاولية لتخليق المادة الوراثية و محاكاة ما يتم في الخلايا الحية لإكثار المادة الوراثية.

***أمثلة عن الأمراض التي تم تشخيصها بهذه الطريقة:**

أ- الذبول البكتيري والعفن البني في البطاطس المتسبب عن بكتيريا *Ralestonia solanacarium*.

ب- اللفحة النارية في الكمثرى المتسبب عن البكتريا *Erwinia amylovora*.

ت- التقرح البكتيري في الموالح المتسبب عن *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri*.

ث- التشخيص المبكر للتفحم المغطى في القمح المتسبب عن الفطر *Tilletia tritici*.

ج- التفرقة بين عزلات الفطر *Verticillium dahliae* المسبب لمرض الذبول الفرتسليومى على الزيتون.

ح- فيروس الاصفرار المتقزم في الشعير Barley Yellow Dwarf Virus (BYDV).

2. طرق تهجين الحامض النووى (Molecular Hybridization)

اختبار تهجين الحمض النووي: DNA- Hybridization يتم فيه نفس خطوات الـ PCR العادي، ولكن يلزم وجود مسبار أو مجس (Probe) معلم بمواد مشعة أو مواد إنزيمية مثل ال Dig أو biotin ثم يتم الكشف عن الإشعاع في

النهاية من خلال استقبال الأشعة على أفلام حساسة مثل X-ray Film أو يتم الكشف السيرولوجى الخاص بال Antibodies لل ..Dig
*أمثلة عن الأمراض التي تم تشخيصها بهذه الطريقة:

- فيروس الاصفرار المتقزم في الشعير Barley Yellow Dwarf Virus (BYDV).
- تشخيص الفيتوبلازما *Deltocephalus vulgaris* فى قصب السكر.

3. **-اختبار الشظايا المتباينة الاطوال RFLP (Restricted Fragments Length Polymorphosum):**

من أهم الاختبارات التي تستخدم للتفرقة بين سلالات البكتريا والفيتوبلازما، حيث يؤخذ ناتج الـPCR لعينة الطفيل ويعامل بإنزيمات القطع المحدد (Restriction Enzymes) التي تجزء شريط المادة الوراثية بأطوال معينة طبقا لوجود تتابعات مميزة على الشريط ثم يفرد كهربائيا (على الجل), حيث تظهر الاختلافات في عدد الحزم الناتجة (Bands) ومواقعها وحجمها مما يشير إلي الاختلافات في العينات المختبرة، والتي تختلف تبعا للتركيب الوراثى للطفيل وتكون مميزة له.

4. **اختبار:البقع الجنوبية و اختبار البقع الشمالية (Southern and Northern Blots)**

يستعمل اختبار الـ Southern Blot إذا كانت العينة DNA واختبار الـ Northern Blots إذا كانت العينة RNA. ويتم في هذين الاختبارين معاملة الحمض النووي (DNA & RNA) سواء cDNA أو منتج الـ PCR) بإنزيمات القطع, ثم يتم الفصل على الجل (Agarose Gel) حسب الحجم. ثم يتم النقل إلي غشاء النيتروسيللوز باستخدام جهاز خاص وتحت تأثير قوى ضاغطة, تنقل قطع الحمض النووي من الجل إلى غشاء النيتروسيللوز. بعد ذلك يتم تطبيق خطوات التهجين للحمض النووي كما في اختبار NASH ويستخدم المجس (Probe) إما معلم بمواد مشعة أو بمواد ذات تفاعل إنزيمي.