الفصل الثاني

الطرق المختلفة لعزل الفطريات

● مقدمة ● عزل الفطريات اللزجة (الهلامية) من التراكيب المختلفة ● عزل الفطريات الطحلبية (الكتريدية البيضية واللاقحية) ● عزل فطريات الجذور ● عزل الفطريات الزقية والناقصة ● عزل الفطريات البازيدية

أولاً : مقدمة

هناك عدد من الطرق المستخدمة في عزل الفطريات من بيئات طبيعية إلا أن بعضًا من هذه الطرق معقد ولا يناسب الطلاب المبتدئين، وفيما يلي نستعرض بعض الطرق المستخدمة لعزل الفطريات بشكل عام (Hanln and Ulioa, 1979) .

يمكن الرجوع إلى تركيب البيئات الغذائية في فصل الملاحق من هذا الكتاب، وتجدر الإشارة إلى أنه ليس هناك بيئة وحيدة تصلح لنمو جميع الفطريات رغم أن بعض البيئات الغذائية مثل عصير الخضروات الثمانية V-8 juice ، ومستخلص الشعير Malt extract وديكستروز البطاطس Potato Dextrose agar وبيئة دوكس Dox' medium تساعد على نمو مجموعة كبيرة من الفطريات، وإذا أردت أن تحدد المجموعة الفطرية التي تنمو في بيئة طبيعية معينة فعندئذ يجب استخدام مجموعة بيئات غذائية، إلا أن هذا غير عملي، ولذا يجب اختيار بيئة غذائية جيدة ذات مدى تنموي واسع Broad spectrum medium ، وهناك بيئات غذائية خاصة مهمة لعزل وتنمية بعض أنواع الفطريات، فالفطريات التي تنمو تحت ظروف تركيز أسموزي عال مثلاً، يحب أن تعزل وتنمي على بيئة أجار الشعير والملح

Malt-salt agar ، والتي تعطى تقريبًا ظروفًا مشابهة للظروف الطبيعية حيث تكون الظروف البيئية مهمة في عزل وتنمية بعض الفطريات، كما يمكن عزل الأنواع المحبة للحرارة المرتفعة Thermophilic وتنميتها فقط عند درجات حرارة عالية، ولا يمكن الحصول على هذه الأنواع ما لم تستوف هذه الظروف، فلذا نجد أن اختيار البيئة الغذائية وظروف العزل عاملان مهمان في تحديد الفطريات المعزولة.

ويمكن مشاهدة تعاقب (تتابع) Succession النمو الفطري على الكثير من البيئات الطبيعية، مثل الروث Dung ، فالفطريات الميوكرية مثلاً Mucoraceous Fungi سريعة النمو على الروث إذ تظهر أولاً ثم تليها الفطريات الناقصة، ثم يتبع ذلك نمو الفطريات الزقية القارورية Perithecial ascomycetes وأخيرًا الفطريات البازيدية، فلذا يجب فحص مثل هذا النوع من البيئات الطبيعية لعدة أسابيع لملاحظة تتابع نمو الفطريات. وللحصول على الفطريات هذه أو غيرها بصورة نقية نلجأ إلى:

طريقة الجرثومة الواحدة Single spore technique

عندما يكون لديك طبق بترى يحتوي على مستعمرة فطر ما يمكنك بوساطة إبرة معقمة وندية (تسخن ومن ثم تغمس في الأجار) ـ وبالاستعانة بالمجهر ـ يمكنك التقاط جرثومة واحدة من أطراف المستعمرة في هذا الطبق ونقلها إلى بيئة غذائية مناسبة، وفي نهاية فترة التحضين سوف يكون لديك مزرعة نقية للفطر (Altman, 1966).

الدرس العملي الثالث

ثانيًا: عزل الفطريات اللزجة (الهلامية) من التراكيب المختلفة

١ ـ البثرات الثمرية

تظهر الفطريات اللزجة (الهلامية) على بيئات مختلفة تشمل التربة والمواد العضوية المتحللة مثل الأوراق أو الأجزاء الزهرية، وجذوع الشجر والروث، ويبدو أنها تكون بصورة عامة في التربة والأوراق المتحللة في الغابات النفطية Deciduous ، فلذا يجب أخذ بعض العينات من مثل هذه المواقع حيث توضع الكميات الصغيرة من هذه العينات مثل التربة والمخلفات النباتية على أحد جوانب أطباق الأجار، وحتى تتمكن من

الحصول على نتائج طيبة يجب ترك أجزاء من الأجار خالية من النمو حتى يتسنى للفطر أن ينمـو بحرية، ويمكن غمس العينات النباتية الجافة في ماء مقطر قبل زراعتها. والبيئات الغذائية المستخدمة عمومًا هي بيئات، Hay infusion or lactose-yeast extract ويمكن استبـدال الجلكـوز والبيبتون باللاكتوز ومستخلص الخميرة، وفي حالة عدم وجود تبن يمكن استخدام أجار غذاء الأرانب المجفف Rabbit food agar (1967 Bonner), .

يجب فحص الأطبـاق بعـد يومين إلى ثلاثة أيام من التحضين باستخدام مجهر التشريح، وذلك للبحث عن بثرات ثمرية Sorocarps ، وعند العثور على البثرات الثمرية يمكن بوساطة إبرة معقمة نقلها ووضعها في أطباق أجار جديدة. وفي بعض الأحيان قد يكون من الضروري إضافة بكتيريا مثل *Escherichia coli* كغذاء، ويمكن عزل الفطر وتنميته على البيئة الغذائية نفسها (1979 Hanlin and ulloa) .

٢ ـ البلازموديوم

يظهـر بلازموديوم العفن اللزج (الهلامي) Plasmodial slime molds على الكتل الخشبية أو الأوراق المتحللة بعد أيام قليلة من هطول الأمطار الغزيرة، كما أنه يظهر أحيانًا تحت جذوع الكتل الخشبية الرطبة، إلا أن الأجسام الثمرية Fruiting bodies للفطريات الهلامية غالبًا ما توجد في بيئات مختلفة، ويمكن عمل عزلات من كل أنواع هذه البيئات.

ومن الجدير بالذكر أنه يمكن أن تنمى فطريات العفن اللزج في الغرف الرطبة وفي أوساط نمو مختلفة، بيد أن أجود الأوساط التي تنمو عليها فطريات العفن هي القشور الخـارجية للأشجـار الحية أو الكتـل الخشبية المتحللة. خذ قطعًا رقيقة من القشور الخارجية في الأشجار الحية أو الكتل الخشبية المتحللة وضعها في غرفة رطبة Moist chamber ، ثم صب عليها قدراً من الماء فـــوق الأجزاء الخشـبية، غطها بورق ترشـيح مبلل ودعها حتى صباح اليوم التالي، ومن ثم افصل الماء الزائد واتركها عند درجة حرارة الغرفة العادية، حتى إذا مضت أربعة أو خمسة أيام اختبر وجود البلازموديوم. قد يكون

البلازموديوم صغير الحجم، الأمر الذي يقتضي استخدام المجهر التشريحي Stereomic-roscope للتأكد من وجوده، فإذا تأكدت من ذلك انقله إلى طبق بتري يحتوي على أجار دقيق الذرة على أن تكون هذه البيئة شبه مركزة، ولا تنس أن البلازموديوم غالبًا ما يكون ملوثًا ببعض الفطريات الأخرى، وإذا ما أريد الحصول على بلازموديوم خال من التلوث فما عليك إلا الانتظار بعض الوقت ليتسنى للبلازموديوم أن يزحف من موضع التلوث إلى موضع نظيف، ينقل منه إلى أطباق بتري جديدة محضرة وفيها أجار، وعندما تكون المزرعة نقية انقل إلى أطباق بتري جديدة بها بيئة غذائية ثم أضف الشوفان Oats المعقم غذاء له.

٣ ـ الخلايا السابحة

على الرغم من أن إخراج الجراثيم من مواقعها الموجودة فيها ليس عملية سهلة، إلا أنه بالإمكان إخراجها منها إذا ما ثقبت أغشية الأكياس الجرثومية بإبرة معقمة أصلاً، على أن يكون أمام الطالب الذي يقوم بعملية التثقيب بيئة غذائية من الأجار كي تنتشر الجراثيم المنطلقة من الأكياس عبر الثقب على سطح هذه البيئة مباشرة، ويضاف إلى البيئة آنفة الذكر ثلاثة إلى أربعة مل ماء مقطر ثم تحضن عند درجة حرارة الغرفة، وسيلاحظ أن عملية إنبات الجراثيم قد بدأت خلال ١٢ ـ ٢٤ ساعة من التحضين بحيث يمكن رؤية الخلايا السابحة Swarm cells تحت المجهر باستخدام قوة التكبير الوسطى (X٤٠). هذا وقد تتكون بعد خمسة أو ستة أيام من الإنبات البلازموديا الصغيرة على سطح الأجار التي لا تلبث أن تكبر بحيث يمكن رؤيتها بالعين المجردة ونقلها إلى أطباق تحتوي عليأجار دقيق الذرة جديدة، تعامل البلازموديات المتحصل عليها هذه بالطريقة نفسها التي ذكرت سابقاً عن عزل البلازموديوم.

ثالثًا : عزل الفطريات الطحلبية (الكتريدية البيضية واللاقحية)

١ ـ مقدمة

بناء على التقسيم الحديث لمملكة الفطريات فإن الفطريات الطحلبية تشمل ثلاث طوائف فطرية مختلفة هي : طائفة الفطريات الكتريدية، وطائفة الفطريات البيضية، وطائفة الفطريات اللاقحية.

والفطريات الطحلبية المائية هي الفطريات التي تعيش، عادة، في الماء وتتكاثر تكاثرًا لا جنسيًّا عن طريق الجراثيم السابحة Zoospores ، وتوجد هذه الفطريات في البحيرات والينابيع والخيران وفي كل من المياه العذبة والمالحة، بالإضافة إلى معظم أنواع التربة، حيث إنها تعيش في الميه التي تحيط بأجزاء التبربة، وأحجام الفطريات المائية تتراوح بين صغيرة ذات خلية واحدة وكبيرة تتميز بغزل فطري.

تختلف الطرق التقنية لعزل الفطريات الطحلبية المائية باختلاف بيئة كل نوع، فهناك فطريات طحلبية تتطفل على طحالب أو على فطريات أخرى كما تتطفل على اللافقاريات، وحتى يمكن عزل كل نوع من هذه الفطريات الطحلبية من البيئات المختلفة التي تتطفل عليها يتم جمع عينات من العوائل (البيئات الطبيعية) آنفة الذكر وتفحص باستخدام المجهر، إلا أن هذه الطريقة طريقة بطيئة وغالباً ما تكون عملية العزل بوساطتها صعبة. وهناك عدة طرق لعزل الفطريات الطحلبية (المائية والأرضية) حسب البيئة التي تنمو عليها (Hanlin and Ulloa, 1979).

تسمى الطريقة العامة المستخدمة في عزل الفطريات الطحلبية المائية عن طريق استخدام وسط نمو مناسب الطعم Bait ـ تسمى بطريقة الطعوم، والطعوم هي حبوب الذرة أو القمح أو حبوب اللقاح الخاصة بنباتات الصنوبر، والسيلوفان (السيليلوز)، وشعر الإنسان الذي أزيل عنه الدهن عن طريق الايثر Ether ، وجلد الثعبان أو قطع صغيرة من الأظافر أو قرون البقر (التي تحوي Keratin)، والهيكل الخارجي للجمبري (الذي يحوي Chitin)، أو عن طريق استخدام الذباب الميت المعقم، ويمكن خلط هذه الطعوم مع ماء من البحيرات والينابيع أو مع المخلفات النباتية (الأوراق، والبراعم الصغيرة والثمار) أو مع تربة.

ولتحضير الأطباق للعزل ضع كمية صغيرة من مخلفات الخضروات أو حوالي ملعقتين من التربة داخل طبق بتري ثم أضف ماءً معقمًا إلى عمق ٥ مم، واحذر أن تضيف كمية كبيرة من المخلفات أو التربة حتى لا يصير الماء ساكنًا الأمر الذي لا يؤدي إلى نتائج طيبة، وإذا بدأت بماء بحيرة أو ينبوع فصبه في وسط الطبق البتري ثم ضع

كميات صغيرة من الطعم على سطح الماء، ويمكن استخدام أنواع مختلفة من الطعم في كل طبق، على ألا تخلط هذه الطعوم حتى لا تصعب الملاحظة والمشاهدة. ومن المفضل استخدام أطباق كثيرة بحيث يكون في كل طبق كمية قليلة من الطعم، وانشر كمية يسيرة من حبوب اللقاح على سطح الماء. أما بالنسبة لأنواع الطعوم الأخرى مثل الهيكل الخارجي للجمبري أو السيلوفان فإنه يجب تقطيعها إلى مربعات صغيرة، حتى يتسنى لها أن توضع وتغطى عند فحصها مجهريًا، ضع قليلاً من هذه المربعات في الماء بعد أن تعقمها وذلك بغمسها سريعًا في ماء مغلي إذا لزم الأمر. أما حبوب الذرة أو القمح فينبغي تقطيعها نصفيًا بمقطع أو موسي قبل وضعها داخل الماء. يسهل قطع الحبوب جيدًا إذا ما غمست في ماء مغلي، حيث تترطب القشرة الخارجية للحبة من جهة وتعقم الحبة من جهة أخرى.

حضن الأطباق لمدة ثلاثة أو أربعة أيام عند درجة حرارة الغرفة ثم افحص بعض الطعم تحت المجهر، ويكون ذلك بأخذ عينة من حبوب اللقاح عن طريق لمسها بغطاء الشريحة، أو بغمس نهاية الإبرة في قطرة ماء ومن ثم في العينة، ثم ضع الحبوب على الشريحة وضع مربعات السيلوفان أو المواد المشابهة في قطرة ماء على شريحة أخرى. افحص الطعم جيدًا ولا تنس أن أيسر الأنواع يتكون من خلية وحيدة كروية شفافة.

وللحصول على مزرعة نقية من الفطر الذي وجدته، ضع بعض الطعم الذي يحمل الفطر في أطباق جديدة فيها ماء مقطر معقم وأضف طعمًا جديدًا، ولما كانت هذه العملية عرضة للتلوث البكتيري لزم أن تكرر العملية مرات حتى يتم الحصول على مزرعة نقية تمامًا.

٢ ـ الفطريات المائية Aquatic Fungi

تنمو الفطريات الطحلبية الخيطية المائية Filamentous aquatic fungi على بذور الكتان والذباب، ويمكن التعرف على هذا النوع من الفطريات عن طريق أحجامها الكبيرة وخيوطها الكثيرة النامية خارج الطعم، كما يمكن نقل الطعم كاملاً أو أجزاء من الغزل الفطري إلى كأس فيها ماء معقم يحتوي على طعم جديد والحصول على مزارع نقية.

هنـاك تقنيات عديدة متخصصـة لعـزل فطر معـين، فمثـلاً الفـطريات البلاستوكلادية Blastocladiaceous التي توجد عادة على الفروع الصغيرة Twigs ، وعلى ثمار الفواكه، يمكن عزلها إذا ما اقتطع عنق الثمرة (كثمرة التفاح أو الكمثرى ثم تقـطع إلى أجزاء صغيرة، وتوضع هذه الأجزاء في سلة حديدية، وتغمر في بحيرة أو ينبـوع، وبعد عدة أسابيع تؤخذ السلة إلى المعمل حيث تغسل المادة اللزجة Slime المحيطة بهذه الأجـزاء (يجب فحص الفطريات فيها أيضًا) ويبحث عن الانتفاخات الفطرية (بثرات) Pustules على سطح الثمار وغالبًا ما تحتوي على الفطريات من أنواع بلاستوكلادية.

يمكن عزل فطرة فيتوفثورا *Phytophthora* sp. باستخدام طريقة التفاح التي تقوم على حفر حفرة في تفاحة سليمة بوساطة ثاقب الفلين بحيث يكون قطر الحفرة ١ سم، وتملأ الحفرة حتى نهايتها بتربة ثم تندى بماء مقطر، ومن ثم نقفل الحفرة بشريط لاصق Scotch tape ، وتحضن التفاحة عند درجة حرارة الغرفة، فإذا توافر في التفاحة فطر فيتـوفثـورا فستغـزو أنسجـة التفـاح مسببة عفنًا جافًا جامدًا Firm dry rot ، وبعد ٥ ـ ٧ أيام من التحضين تقطع قطعة صغيرة من التفاحة المتعفنة تحت الجزء الملاصق للتربة وتوضع في بيئة أجار دقيق الذرة، ويمكن للفطريات الأخرى أن تغزو أنسجة التفاح لكنها تنمو ببطء (في العادة بعد ٨ ـ ١٠ أيام) مسببة العفن الطري Soft rot ، أما أفضل أنواع التفاح التي تعطي نتائج طيبة فهو التفاح الذهبي Golden deliciaous ، وإن كان من الممكن استعمال الأنواع الأخرى والمتوافرة في الأسواق.

هذا ويمكن تنمية أنواع عديدة من الفـطريات المائية علة بيئة خاصـة مثل مستخلص الخميرة Yeast extract أو بيئة النشا Starch medium تحضر لهذا الغرض، كذلك يمكن حفظ المزارع النقية في أواساط نمو موجودة في دوارق صغيرة أضيف إليها ماء معقم، ومما يجدر ذكره أنه ينبغي نقل الفطريات النامية إلى أوساط غذائية جديدة وذلك بصورة متكررة.

٣ ـ الفطريات الأرضية (الترابية) Terristrial Fungi

تعتبر الفطريات الطحلبية التي تستوطن التربة Terristrial phycomycetes ـ وبخاصة الأنواع الميوكرية منها Mucoraceous ـ أكثر الفطريات انتشارًا في أوساط النمو الفطري، إذ أنها سرعان ما تنمو وتعطي غزلاً فطريًا Mycelium ، ومن الممكن عزل الغزل الفطري والأكياس الجرثومية إذا ما نُقلت إلى بيئة غذائية مناسبة، مثل بيئة عصير الخضروات الثمانية أو بيئة مستخلص الشعير Malt agar extract .

الدرس العملي الرابع

رابعًا : عزل فطريات الجذور Isolation of Mycorrhizae

١ ـ مقدمة

لاحظ الكثير من الباحثين خلال النصف الثاني من القرن التاسع عشر وجود فطريات على جذور النباتات دون ظهور أية أعراض مرضية أو تقرحات، وفي عام ١٨٨٥م أطلق العالم فرانك على هذه الفطريات اسم فطريات الجذور، وأخيرًا تمكن فرانك من أن يفرق بين الفطريات التي تنمو بين الخلايا ثم تنمو خارج الجذور. وهي ما يعرف بالفطريات الخارجية Ectomycorrhizae وبين الفطريات التي تنمو داخل خلايا الجذور وتعرف بالفطريات الداخلية Endomycorrhizae. (Schenck, 1982) .

كان بعض أصحاب الدراسات الأولية يعتقدون أن هناك علاقة مرضية بين العائل وبين الفطر، واعتقد البعض الآخر أن العلاقة تكافلية ذات منفعة متبادلة، وقد أكدت البحوث والتقارير التي ظهرت في أواخر القرن التاسع عشر العلاقة التكافلية آنفة الذكر.

وقد نشطت البحوث الخاصة بفطريات الجذور منذ عام ١٩٦٠م، ومرد ذلك لتطوير طرق تكاثر هذه الفطريات بوساطة الأصص الزراعية علاوة على إمكانية استخلاص الجراثيم.

ومن الحوافز التي دعت إلى الاهتمام بفطريات الجذور، النتائج التي نشرت دالة على تحسين نمو النباتات المتكافلة مع هذه الفطريات، فقد تبين أنها تزيد على طريق خيوطها الفطرية المتشعبة معدلات امتصاص الماء، كما تزيد من امتصاص العناصر بطيئة الحركة مثل الفوسفور P ، والنحاس Cu ، والخارصين Zn ، إذ أن هذه الخيوط تزيد من مساحة الامتصاص مقارنة بالنباتات غير المصابة، وفضلاً عن ذلك فهذه الخيوط تقوم بالتفرع في التربة، الأمر الذي ينتج عنه حجم أكبر مما يوفر سطح امتصاص أكبر، وهكذا تكون النباتات ذات الشعيرات الجذرية (القليلة في الغالب) أكثر اعتمادًا على هذه الفطريات، وهناك بعض النباتات تعتمد تمامًا على هذه الفطريات مما يجعلها غير قادرة على النمو إذ لم تصب بفطريات الجذور. بالإضافة إلى ذلك لوحظ أن النباتات المصابة بهذه الفطريات لها المقدرة على تحمل تأثيرات المعادن الثقيلة السامة، وأمراض الجذور، والجفاف، ودرجات الحرارة العالية، والتربة المالحة، وتأثيرات معدل تركيز أيون الهيدروجين في التربة، والصدمات الناتجة من نقل البادرات (الشتلات)، مقارنة مع النباتات غير المصابة بهذه الفطريات. ولهذا تعتبر فطريات الجذور عاملاً مهمًا في زراعة النباتات في المواقع ذات الظروف الزراعية غير الملائمة، مثل مواقع مناجم الفحم والنحاس والأماكن التي تعرضت لعوامل التعرية كالصحارى.

٢ ـ الطرق المختلفة لدراسة فطريات الجذور

ا) جمع العينات

عند جمع الجذور يجب انتقاء الجذور الصغيرة حيث إنها تعتبر مرتعًا طيبًا لهذه الفطريات، وكلما كبرت الجذور فإن القشرة Cortex تنكسر ولا تلبث أن تتطاير ولذا يندر وجود مثل هذه الفطريات في الجذور الكبيرة، وإذا لم يتخذ الحذر الشديد عند حفر جذور النباتات فإن نهايات الجذور الصغيرة تدفن في التربة ولذا تصبح نسبة الإصابة الحقيقية غير معلومة.

يمكن جمع الجذور في أي وقت من أوقات السنة لفحص فطريات الجذور الشجرية (Arbuscular mycorrhizae (AM ، وليس بالضرورة فحصها فور وصول العينات للمختبر، بغض النظر فيما إذا كان العائل حوليّاً أو معمرا

أو عشبيًا أو خشبيًا فإن نهايات الجذور المغذية تعتبر موقعًا أساسيًا لنمو فطريات الجذور، لهذا يفضل أخذ العينة من أربعة أو خمسة أجزاء من المجموع الجذري.

أما بالنسبة لحفظ العينات فيمكن وضعها في قوارير لدنة صغيرة (بلاستيكية) Vials، أو في أنابيب زجاجية مناسبة، ثم تغطى بعد ذلك بمحلول قتل وتثبيت، ويمكن الاحتفاظ بهذه العينات لمدة سنتين ونصف دون أن يحدث لها أي تغيير (Kormanik and McGraw, 1982).

ويشمل الفحص عادة درجة الإصابة وكثافتها الناتجة من هذه الفطريات، بالإضافة إلى الأشكال الظاهرية للفطريات الموجودة على هذه الجذور.

هذا وقد لوحظ عند تنمية بذور النباتات المتكافلة المضيفة أنه تمر مدة من الزمن دون أن تصاب جذور النباتات بالفطريات الجذرية، ولا تحدث الإصابة المذكورة أعلاه (إذا كان سببها الجراثيم) إلا بعد زمن طويل، وأيًا كان السبب فإن من الأفضل أخذ عينات من الجذور أسبوعيًا، حتى يتضح فيما إذا حصلت الإصابة أم لا.

ب) تنظيف العينات وصبغها

تعتبر طريقة فليبس وهيمان (Phillips and Hayman 1970) في تنظيف الجذور وصبغها خطورة رائدة في مسار بحوث فطريات الجذور الشجرية إذ أنها لا تستغرق وقتاً طويلاً.

الطريقة:

تغسل الجذور بالماء بمجرد استخراجها من القوارير بملقط وذلك لتنظيفها من بقايا المحلول عليها.

تقطع الجذور الصغيرة إلى وحدات أصغر لا يزيد طول أي منها على سنتيمتر واحد.

توضع الجذور المقطعة في كأس وتغطى بمحلول هيدروكسيد البوتاسيوم /KOH ذي تركيز ١٠٪، وتسخن لمدة ساعة واحدة عند درجة حرارة ٩٠°م وذلك باستخدام حمام مائي ثنائي.

تغسل هذه الجذور من آثار محلول هيدروكسيد البوتاسيوم بالماء المقطر برفق شديد.

توضع الجذور في محلول مائي مخفف (١٪) من فوق أكسيد الهيدروجين وذلك لمدة تتراح بين ثلاث وأربع دقائق بحسب درجة تلون الجذور.

تغسل الجذور هذه بماء مقطر ثلاث مرات على الأقل بهدف تنظيفها من محلول فوق أكسيد الهيدروجين.

تغطى العينات بمحلول حمضي مخفف (تؤخذ عشر قطرات من حمض الهيدروكلوريك HCl المركز لتضاف إلى ٢٠٠ سم ماء) لمدة ثلاث إلى أربع دقائق، ومما ينبغي الإشارة إليه ألا تغسل العينات بعد هذه الخطوة لتحتفظ الجذور بالوسط الحمضي وذلك ليتسنى صبغها بصورة جيدة.

توضع الجذور في لاكتوفينول مضاف إليه صبغة أزرق ترايبان (١ر٠٪) Trypan blue ، وتسخن لمدة ٥ دقائق عند درجة ٩٠ ـ ١٠٠°م أو إلى أن تظهر الصبغة في الجذور.

تترك الجذور لتبرد ثم يؤخذ منها عينات تتضمن العينة ٢٥ وحدة، وتوضع كل وحدة من العينات على شريحة، ثم تغطى وتفحص تحت المجهر. تكرر هذه التجربةأربع مرات وتفحص جيدًا لمعرفة الإصابات فيها ومن ثم تحسب النسب المئوية.

جـ) طريقة جمع الجراثيم الفطرية من التربة

يتم جمع جراثيم فطريات الجذور وفقًا لطريقة (Gerdemann and Nicolson 1963) كما يلي :

الطريقة :

ـ يوضع ٢٥ جرامًا من التربة المراد جمع الجراثيم منها في أنبوبة من أنابيب آلة الطرد المركزي سعة الأنبوبة ٥٠ مل .

ـ يضاف إلى الأنبوبة آنفة الذكر ماء مقطر بحيث يصل حجم محتواها إلى ٤٥ مل .

ـ يترك محتوى الأنبوبة يركد مدة عشر دقائق .

– توضع الأنبوبة داخل جهاز الطرد المركزي ويشغل الجهاز بحيث تعمل سرعته إلى ألفي دورة في الدقيقة الواحدة، وستمر ذلك لمدة عشر دقائق .

ـ يفصل السائل عن الراسب (عينة التربة) .

ـ يخلط راسب الأنبوبة آنفة الذكر بمحلول سكر الطعام (٢ مول) المتضمن ٢٪ من منظف الكالجون .

ـ توضع الأنبوبة في جهاز الطرد المركزي ويُدار بسرعة ألفي دورة في الدقيقة لمدة ١٠ دقائق .

ـ تلتصق الجراثيم بحكم الدوران بمحلول سكر الطعام مما يمكن الحصول عليها لدى ترشيح هذا المحلول عبر قمع بخنر.

يسهل الآن عد الجراثيم تحت مجهر تشريح عادي .

٣ ـ تحضير أصص فطريات الجذور Mycorrhizal Pot Cultures

تقوم طريقة تحضير أصص فطريات الجذور على عاملين: اللقاح والتربة.

أما اللقاح Inoculum فيشمل الجراثيم وخيوطًا فطرية وجذور نباتية مصابة، وأما التربة الزراعية فيستحسن أن تكون فقيرة من العناصر الغذائية ـ وبخاصة الفسفور ـ على أن تخلط هذه التربة مع الرمل بنسبه ١ : ١ وزنًا. (Mertz *et. al.*, 1979).

أولاً: تعقم تربة الزراعة لمدة ساعة داخل جهاز الأوتوكليف ثم تترك للتهوية، ومن ثم تعقم مرة أخرى لمدة ساعة أيضًا وتوزع داخل الأصص اللدنة (البلاستيكية).

ثانيًا: يفضل إضافة الكائنات الدقيقة الأخرى Other soil microbiota إلى التربة على النحو التالي:

١ ـ يخلط ٢٥جم من تربة الزراعة قبل التعقيم في ١٠٠ مل ماء مقطر.

٢ ـ ينخل محلول التربة عبر مناخل مختلفة الفتحات على أن تكون فتحة المنخل الأخير لا تزيد على ٤٥ ميكرونًا.

٣ ـ ترشح رشاحة النخل آنف الذكر بوساطة قمع بخنر Buchner funnel وبذا يتم الحصول على جميع كائنات الأحياء الدقيقة بالتربة عدا فطريات الجذور الموجودة أساسًا في التربة.

ثالثًا:

١ ـ يضاف الرشيح الأخير المتضمن كائنات التربة الدقيقة (ما عدا جراثيم فطريات الجذور) إلى الأصص.

٢ ـ يوضع اللقاح في طبقة منتظمة تحت سطح التربة الموزعة في الأصص المعقمة أو يخلط جيدًا فيها.

٣ ـ تزرع البـذور وتسقى بمحلول هوقـلاند Hoagland's solution مرة في كل أسبوع كما تسقى بماء مقطر كلما لزم الأمر.

٤ ـ توضع الأصص داخل البيوت الزراعية المحمية إلى أن تكتمل الإصابة خلال شهرين.

٤ ـ طرق العناية بفطريات الجذور داخل غرف النمو

تتطلب الرعاية السليمة لأصص فطريات الجذور (Menge *et al.*, 1978) عددًا من العمليات الزراعية صممت من أجل:

ا) منع تلوث الأصص بالكائنات الممرضة.

ب) التأكد من عدم خلط أنواع فطريات الجذور التي تكون نامية في الأصص بأنواع أخرى.

ولتحقيق ذلـك يجب الاعتنـاء بالنظافة ومكافحة الحشائش والحشرات والآفات البكتيرية والفطريات، كذلك ينبغي أن يُحال بين الفئران والوصول إلى الأصص خوفًا من أن تفـترس البـادرات الصغـيرة، كما ينبغي عزل الأصص عن النباتات المصابة بالكائنات الممرضة إذ يمكن أن تنتقل الكائنات الممرضة عن طريق التيارات الهوائية ولا سيما الجراثيم الفطرية وبيض الديدان الثعبانية (النيماتودا). هذا، وعلى الباحث أن يقوم بتعقيم المعدات والأواني قبل استخدامها في ري الأصص، وعليه كذلك أن يقوم بطلاء الطاولات كلما اقتضت الضرورة لتفادي نمو الكائنات الممرضة.

مشكلات زراعة الأصص

لما كان العشب الذي يستخدم في زراعة الأصص هو عشب السودان Sudan grass وعشب الباهية Bahia grass ، وهي أعشاب من ذوات الفلقة الواحدة، وجذورها ذات جذور ليفية، فهي تعتبر لذلك عوائلاً ممتازة لفطريات الجذور. ونظراً للنمو المكثف لهذه الجذور فإنها تخرج عبر فتحات الأصص المعدة لتصريف ما يفيض من الماء مسببة تلوثاً

يعرف بالتلوث الخلطي بين المزارع. لهذا اقتضى أن نتجنب هذه الظاهرة باستخدام أصيصين يقع أحدهما ضمن الآخر، فيحتاج للجذور بهذا الشكل النمو الطولي في الأصص الخارجي.

يفضل استخدام وسط مكون من تربة قليلة في المحتوى الفسفوري لتنمية العوائل، كما يستحسن وضع ورق تنشيف أو قطن على فوهات التصريف لتجنب ضياع حبات التربة أثناء الري المكثف إذ أن مسام ورق الترشيح أو القطن تساعد في تصريف الماء الزائد، وتمنع خروج التربة. هذا، وينبغي ري الرمل بالماء ليشتد تماسكه على بعضه وينكمش حجمه وذلك قبل أن تضاف إليه التربة.

المخصبات: دلت التقارير العلمية على أن تركيزات الفسفور العالية تمنع الإصابة بفطريات الجذور، وقد اتضح أن الرمل الخشن الذي يروى من وقت لآخر بمحلول مغذ ـ مثل محلول هوقلاند الخالي من الفوسفور ـ يمكن أن يؤمن وسطًا جيدًا لنمو فطريات الجذور.

الأصيص الكامل: يمكن حصاد الأصيص بتقليم النبات إلى مستوى التربة وأخذ كتلة التربة المتماسكة. ويمكن استخدام بعض المعدات كالسكاكين والمناشير الصغيرة، وينبغي إذا ما أريد حفظ اللقاح تجفيف خليط التربة والجذور للتخلص من الماء في اللقاح، وتحفظ العينات بعد التجفيف عند درجة حرارة ٥°م داخل أكياس بلاستيكية تقفل بإحكام حتى يبقى اللقاح جافًا، وبذا يمكن حفظ العينات بهذه الطريقة لمدة أربع سنوات.

الدرس العملي الخامس
خامسًا : عزل الفطريات الزقية والناقصة

١ ـ مقدمة

توجد الفطريات الزقية والناقصة في أوساط النمو الطبيعية بكثرة، وفيما يلي بعض مصادرها وكذلك طرق عزلها، مع العلم أن طرق عزل الفطريات الناقصة لا تختلف عن الطرق المستخدمة في عزل الفطريات الزقية.

من أوساط النمو التي تنمو عليها الفطريات الزقية والناقصة قطع الخشب والأوراق المتحللة والروث والمواد المتشابهة، ويمكن وضع هذه المواد على أجار أو في غرف رطبة ثم تحضن عند درجة حرارة الغرفة لعدة أيام، فإذا ما بدت مظاهر النمو الفطري تنقل إلى بيئات نمو جديدة، وذلك بالتقاط الجراثيم الكونيدية عن طريق لمسها بإبرة معقمة وندية، أو بإبرة غمست أصلاً في أجار، كذلك يمكن عزل بعض أنواع الفطريات ذات الثمار القارورية المغلقة عن طريق وضع أطباق الأجار مقلوبة على كتلة من الثمار الكيسية الندية، مما يؤدي ـ بسبب نمو هذه الثمار نموًّا متدافعًا ـ إلى التصاق هذه الثمار على سطح الأجار الذي يعلوها، ويؤخذ الطبق فيما بعد ويغطى بغطاء معقم.

يتم عزل الفطريات التي تحلل السيليلوز عن طريق وضع شرائط Strips من أوراق الترشيح المعقمة على العينة، فتنمو الفطريات خارج الورقة، مما يساعد على عزل هذه الفطريات.

٢ ـ عزل الفطريات الزقية وحيدة الخلية (فطريات الخميرة)

يمكن عزل فطريات الخميرة Yeast من أسطح الثمار الناضجة السابق وضعها في غرفة رطبة لعدة أيام، حيث يمكن عزلها بطريقة مباشرة من المستعمرات النامية على هذه الثمار، وهناك طريقة تقوم على غسل سطح الثمار ببضعة ملليترات من الماء المعقم، ثم وضع ماء الغسيل في طبق بتري، ويخفف إذا تطلب الأمر ذلك.

٣ ـ عزل الفطريات الزقية الخيطية

يتم عزل الفطريات الزقية الخيطية من :

ا) الأنسجة

تحتوي بعض الأنسجة النباتية كأنسجة البذور والأوراق والسيقان على فلورا فطرية داخلية على الرغم من عدم ظهور أعراض مرضية على هذه الأنسجة ، ولعزل الفطريات الداخلية ينبغي القيام بتطهير سطوح الأنسجة هذه ، وذلك لإزالة الجراثيم والغزل الفطري الخارجي ، لهذا لزم تقطيع العينة إلى قطع بطول ١ سم وغمرها لمدة دقيقتين في محلول يحتوي على ١٠ مل مبيض تجاري (هيبوكلوريت الصوديوم Sodium hypochlorite و ١٠ مل من الإيثانول Ethylalchol و ٨٠ مل ماء) حيث إن الإيثانول يعمل على خفض التوتر السطحي ، وقد يفضل البعض غمس العينة في الإيثانول بنسبة ٩٥٪ على أن يلي ذلك غمسها في مبيض ومن ثم وضع القطع على سطح بيئة مناسبة مثل بيئة مارتن Martin's rose bengal streptomycin medium ، وبالنسبة للعينات ذات السطوح المجعدة فيزاد كمية المبيض والإيثانول حتى ٢٠ مل أما كمية الماء فلا تزاد عن ٦٠ مل .

يمكن استخدام الطريقة المذكورة أعلاه في عزل الفطريات الممرضة من الأنسجة المريضة .

ب) التربة

تعتبر التربة مصدراً من مصادر الفطريات لاحتوائها على كمية وافرة من الفطريات التي توجد في معظم الأراضي ، بخاصة الأراضي التي تحتوي على كميات كبيرة من المواد العضوية إذا يوجد فيها عدد كبير من أنواع الفطريات .

ولكي يكون عزل الفطريات الكيسية عزلاً سليمًا يؤدي الغرض المطلوب منه ، فإنه يلجأ إلى معالجة عينات التربة بالإيثانول أو الحرارة قبل زرع عينات التربة هذه ، أما المعالجة فتكون كما يلي :

يضاف ٥ مل من الإيثانول (٦٠٪) إلى :

٥ جم من التربة ، تترك لمدة ٨ ـ ١٠ دقائق .

وأما إذا كانت التربة رطبة فيمكن معالجتها بالحرارة عند درجة ٦٠ ـ ٧٠°م ولمدة ١٥ ـ ٦٠ دقيقة بدلاً من معالجتها بالإيثانول وفقًا للطريقة آنفة الذكر.

سادسًا : عزل الفطريات البازيدية

على الرغم من أن عددًا كبيرًا من الفطريات البازيدية تعطي غزلاً فطريًا إلا أن معظمها لا تكون أجسامًا ثمرية داخل الأطباق، ولهذا يتعذر تعريف الفطريات البازيدية على أساس الغزل الفطري، وإنما يتوقف تعريفها على ما تكونه من أجسام ثمرية.

١ ـ فطريات التفحم

لزراعة بعض فطريات التفحم Smut fungi ، ضع جراثيم هذه الفطريات على بيئة غذائية واتركها لتنمو حتى يتكون الغزل الفطري، ثم انقل أجزاء من الغزل الفطري إلى بيئة غذائية جديدة، وبذا تستطيع أن تحصل على مزرعة نقية من هذه الفطريات.

٢ ـ فطريات عيش الغراب

يمكن عزل فطريات عيش الغراب Musbrooms عن طريق أخذ قطع صغيرة من أنسجة الجسم الثمري ووضعها على الأجار، على أن يتم العزل هنا في ظروف معقمة تتحاشى التلوث بقدر الإمكان، كذلك يمكن استخدام أنسجة القلنسوة Cap والعنق Stipe إذ أنهما يعطيان نتائج لا بأس بها تتفاوت وفقًا لأنواعها.

٣ ـ الفطريات المحللة للأخشاب

ا) تعزل الفطريات البازيدية المسببة لتعفن الأخشاب عن طريق أخذ قطع صغيرة من الخشب من طرف المنطقة المتحللة.

- توضع هذه القطع الصغيرة على الأجار (وتختار عادة بيئة أجار الشعير) فتنمو الفطريات المعنية مثل أنواع الأجاريكس Agaricus وفطريات عفن الخشب.