الباب الثانى

طرق دراسة أمراض النبات

المرض النباتى هو انحراف النمو الطبيعى للنبات يظهر فى صورة اختلال فسيولوجى أو تغيير فى التركيب الطبيعى للنبات أو جزء من أجزائه يؤثر تأثيرا ضارا على النبات مقللا قيمته الاقتصادية • وقد ينتج المرض النباتى عن اضطراب فى التوازن بين العائل والظروف البيئية المحيطة به •

ولفحص الحالة المرضية على النبات يستلزم اجراء بعض الدراسات فى مكان ظهور الاصابة بالحقل يتبعها دراسات مكملة فى المعمل •

١ ــ دراسة المرض فى الحقل

يلزم تسجيل أعراض الاصابة فى الحقل سواء على المجموع الخضرى أو المجموع الجذرى أو كليهما ومعرفة تاريخ ظهور الاصابة ومدى انتشار المرض فى الحقل وهل هو واسع الانتشار أو محدد فى بقعة معينة من الحقل ، ونوع التربة والمحاصيل السابقة فى الدورة وهل سبق ظهور المرض فى نفس المكان من الحقل ؟ ومعرفة مدى انتشاره على الاصناف المختلفة فى المنطقة وهل تقتصر الاصابة على صنف دون آخر أم أنه عام الانتشار على جميع الاصناف المنزرعة بالمنطقة • ويراعى أن تشمل الدراسة شدة الاصابة Severity وبالتالى مقدار الخسائر المتسببة منه •

تشمل الدراسة أيضا مصدر التقاوى وهل التقاوى سبق معاملتها كيماويا أو لم يسبق معاملتها ومعرفة المعاملات الزراعية من خدمة وري وتسميد • وقد يستدل من الاعراض والظروف المختلفة على التعرف على المرض ولكن كل هذه الملاحظات لا تكفى لتحديد المرض حيث أن كثيرا من الامراض تتشابه فى أعراضها ولذلك يجب دراستها فى المعمل •

٢ ــ دراسة المرض فى المعمل

يفضل أن تؤخذ نباتات كاملة أو أجزاء نباتية تمثل الاعراض النباتية وتؤخذ معها فى نفس الوقت نباتات سليمة للمقارنة • اذا أخذ نبات كامل يفضل أن يكون بجزء من التربة ويوضع فى كيس من البلاستيك حتى لا يجف أثناء النقل ، ويفضل أن تتم الدراسة الميكروسكوبية فى المعمل بمجرد وصول العينة ، ولكن اذا لم يتسنى ذلك فيمكن حفظ العينات فى الثلاجة لحين الدراسة • ويستحسن أن يصاحب فحص الاعراض المرضية فى الحقل أو المعمل أخذ صور فوتوغرافية • ويتم الفحص الميكروسكوبى بعد عمل تحضيرات من الطفيل أو من الانسجة النباتية التى تحمل الطفيل وتشمل تلك التحضيرات ما يأتى :

١ ــ الكشط Scraping

الكشط هو ازالة النمو الخارجى للطفيل عن سطح العائل فلا يدخل من العائل شىء من أنسجته • الغرض من الكشط فحص شكل الهيفات والحوامل الجرثومية والجراثيم وبذلك يمكن التعرف على الطفيل • وقد يكون من المناسب وضع الانسجة المصابة فى جو رطب لفترة يوم واحد أو يومين حتى ينمو الميسيليوم وتتكون الجراثيم بالقدر الذى يمكن كشطه وفحصه بسهولة ووضوح •

٢ ــ السلخ Stripping

السلخ هو نزع بشرة العائل بما عليها من نمو الطفيل بغرض ملاحظة توزيع الميسيليوم على سطح العائل أو فحص شكل الحوامل الجرثومية وطريقة خروجها من الثغور أو ملاحظة الممصات وشكلها فى خلايا البشرة ، وكذلك فحص انبات الجراثيم على سطح العائل وطريقة اختراق أنابيبها الجرثومية للبشرة •

ويحضر السلخ فى أنسجة غضة ممتلئة • ويمكن عمل السلخ وذلك بعمل قطع غير عميق للبشرة والقشرة بواسطة موسى حاد ثم يمسك طرف القطع بواسطة ملقط وتنزع البشرة بسرعة ويراعى عدم احتواء السلخ على جزء من الانسجة الداخلية ، واذا احتوى السلخ على جزء سميك يفصل ويستبعد •

٣ ــ السحق Teasing

تستخدم طريقة السحق فى اختبار وجود النيماتودا وأطوارها داخل الانسجة النباتية ، كما يفيد السحق فى الاغراض البكتيرية حيث تظهر البكتيريا فى محلول التحميل مسببة تعكيره • ولجعل الانسجة الصلبة مفككة ينقع النسيج أولا فى محلول من البوتاسا الكاوية (٥٪) لمدة حوالى ٢٤ ساعة ، وللاسراع من عملية التفكيك تغلى الانسجة فى البوتاسا الكاوية لمدة قصيرة • تغسل الانسجة بعد ذلك فى الماء وتوضع على شريحة فى نقطة من ماء الصنبور وتسحق بقاعدة ابرة التشريح أو تمزق بواسطة ابرتين ثم يوضع غطاء الشريحة وتفحص •

٤ ــ القطع Sectioning

يمكن عمل قطاعات اليد بمهارة باستخدام موسى القطع أو موسى حلاقة حاد • تمسك النماذج النباتية المصابة (مثل السيقان والجذور) بين الابهام والسبابة مع عدم الضغط الزائد خوفا من سحق الانسجة ، أما النماذج الرقيقة مثل الاوراق فتوضع داخل نخاع بيلسان أو جذر جزر بعد شقه طوليا ويوضع الجزء المصاب من الورقة بين شقى النخاع أو الجذر وتعمل فيه القطاعات العرضية • تنقل القطاعات بعد تحضيرها مباشرة فى الماء •

ولتحضير قطاعات أكثر دقة يمكن استخـدام الميكروتوم الثلجى أو الميكروتوم الشمعى •

عمل القطاعات بالميكروتوم الثلجى :

يعد الميكروتوم الثلجى من أفضل الطرق وأسرعها فى تحضير القطاعات وعلى الاخص من النماذج اللينة الرقيقة التى يصعب قطعها باليد فتكون القطاعات كاملة وذو سمك ثابت يمكن ضبطه ويتراوح السمك من ٢٠ــ٤٠ ميكرون • ويعتمد الميكروتوم الثلجى على تبريد النموذج بواسـطة غاز ثانى أكسيد الكربون لدرجـة التجميد فى محـلول منـاسب لا يتبلور عند التبريد ويكتسب من الصلابة ما يمكن بها قطعه بسهولة ، ولذلك فيتصـل الميكروتوم الثلجى باسطوانة غاز ك أم السائل ، وعند فتح ضابط الغـاز يندفع الغاز بقوة على درجة حرارة منخفضة جدا فيتجمد السـائل الذى يحيط بالنموذج المحمل على مائدة التبريد وبذلك تتكون كتلة صلبة متماسكة يمكن قطعها بسهولة • ويتكون السائل المستخدم فى تحميل النموذج من ماء وصمغ عربى وفينول أو ثايمول بنسبة ١٠٠ : ٢٠ : ١ •

يقطع النموذج المُض الى قطع مناسبة وتوضع فى ماء جار ثم تنقل الى محلول من الصمغ العربى حيث يغلف النموذج من جميع أجزائه بطبقة منتظمة من محلول الصمغ • توضع نقطة أو نقطتين من محلول الصمغ على مائدة التثليج ويفتح ضابط الغاز ويقفل ويستمر فى ذلك بالتبادل حتى تبدأ النقطة فى التجمد ويتحول لونها للابيض • يوضع النموذج فى هذه النقطة المتجمدة فى الوضع المناسب للقطع ويفتح ضابط الغاز ويقفـل حتى يتم التجمد ويثبت النموذج • يضاف الى النموذج نقطة فنقطة من الصمـغ بواسطة فرشاة ويستمر فى التثليج حتى يتم تغطية النمـوذج ، وعنـدما يصل النموذج المحمل الى درجة الصلابة المناسبة يبدأ فى القطع •

تنقل القطاعات بفرشاة من موسى الميكروتوم الى طبق بترى به ماء صنبور ليذوب الصمغ بعد ذلك الى محلول التثبيت •

٥ ــ التثبيت Fixing

التثبيت هو قتل جميع خلايا النسيج النباتى قتــلا فجــائيا وتثبيت محتوياتها على حالة أقرب ما تكون الى حالتها الطبيعية من حيث الشــكل والتركيب ، وعلى ذلك فالمواد المستخــدمة فى التثبيت يجب أن تصــل الى جميع الخلايا الموجودة بالنسيج ، ولذلك يجب أن يتوفر فى محاليل التثبيت الصــفات الآتية :

١ ــ أن يكون سريع الانتشار حتى يتخلل الانسجة والخلايا ويقتلها بأسرع ما يمكن •

٢ ــ أن يكسب البروتوبلازم صلابة مناسبة فيتحمل المعاملات المختلفة التى تمر بها الانسجة أثناء التحضير دون تغيير •

٣ ــ أن لا يسبب انكماشا للبروتوبلازم •

٤ ــ أن لا يؤثر فى قابلية الانسجة والخلايا للصبغات •

وبالنسبة لعدم توفر كل هذه الصفات فى محلول واحد ، لذلك تحضر محاليل التثبيت من مادتين أو أكثر تخلط معا لتعادل بعضها • ومن أفضل المحاليل المستعملة فى تثبيت القطاعات النباتية التى يتخللها هيفات فطرية أو النموات الفطرية النامية على البشرة ويحصل عليها بالسلخ أو الكشط ، محلول اللاكتوفينول Lactophenol ويحضر هــذا المحلول من المــواد الآتيــة :

فينول (بللورات)	٢٠ جم
حامــض لاكتيك	٢٠ جم

جليسرين	٤٠ جم
ماء	٢٠ مل

ويستخدم اللاكتوفينول كالآتى :

١ ــ توضع نقطة من اللاكتوفينول فى منتصف شريحة زجاجية نظيفة ويوضع بها التحضير •

٢ ــ تسخن الشريحة تسخينا هينا بتعريضها وتحريكها فــوق لهب ضعيف وعلى مسافة حوالى ٢٠سم حتى يبدأ تبخر اللاكتوفينول •

٣ ــ يوضع القطاع فى المنتصف أو تفــرد هيفات الفطر بواســطة ابرتين تشريح •

٤ ــ يوضع غطاء الشريحة تدريجيا خــوق نقطة اللاكتوفينول وذلك بالاستعانة بابرة تشريح حتى لا تتكون فقاعات هــوائية ويزال الزائد من اللاكتوفينول بورقة ترشيح أو ورق بفره •

٥ ــ يفحص التحضير ميكروسكوبيا •

٦ ــ الصبـــــغ :

واذا أريد تثبيت وصبغ النموات الفطرية عديمة اللون فى آن واحد خيمكن اضافة ٥ مل من صبغة أزرق القطن (١٪ صبغة مائيــة) أو أزرق الميثيل أو أزرق الانيلين الى ١٠٠ مل من محــلول اللاكتوفينول الرائــق واتباع الخطوات الاتية :

١ ــ توضع نقطة من اللاكتوفينول الازرق فى منتصف شريحة زجاجية نظيفة ويوضع بها التحضير وتسخن الشريحة تسخينا هينا الى تصاعــد البخار قليلا •

٢ — ينقل التحضير بعيدا عن نقطة اللاكتوفينول الازرق ويغسك بواسطة عدة نقط من اللاكتوفينول الرائق حتى تزول الزيادة من الصبغة وتظهر الهيفات واضحة الصبغ •

٣ — التحضير الى نقطة من اللاكتوفينول الرائق على شريحة أخرى•

٤ — يوضع غطاء الشريحة برفق ويفحص التحضير ميكروسكوبيا •

ويمكن الاحتفاظ بالتحضير بصبغة مستديمة وذلك « ببرشمة » Sealing التحضير وذلك بتطويق حافة غطاء الشريحة مع جزء مساو من الشريحة وذلك بواسطة مادة طلاء الاظافر nail varnish ، وتحفظ فى علبة خاصة بحفظ الشرائح الزجاجية المجهزة •

ومن الصبغات الجيدة للهيفات والجراثيم الفطرية صبغة أسود كلورازول Chlorazol Black B ١٪ فى كحول ايثيل ٩٥٪ •

عمل القطاعات بالميكروتوم الشمعى :

للحصول على قطاعات ممتازة واضحة باستخدام الميكروتوم الشمعى يلزم اتباع خطوات متتالية وهى كالآتى :

١ — تحضير العينات ووضعها فى محلول التثبيت Finxing

٢ — التجفيف •

٣ — الترويق •

٤ — نقل العينات الى شمع البرافين (الاحمر) •

٥ — القطع •

٦ — لصق القطاعات على الشرائح الزجاجية •

٧ — صبغ القطاعات •

وسنتناول شرح كل خطوة فى الآتى :

التثبيت : Fixing

يجب أن تكون العينات النباتية المصابة طازجة وتقطع الى قطع صغيرة وتوضع فى محلول التثبيت لفترة من يومين الى ثلاثة وأحيانا يحدث طغو بعض القطع على سطح المحلول وذلك لاحتوائها على فراغات هوائية مما يعيق انتشار محلول التثبيت ولذلك فمن المستحسن استخدام طريقة تفريغ الهواء وذلك باستخدام مضخة تفريغ الهواء حول محلول التثبيت على فترات قصيرة متتابعة حتى تغمر القطع النباتية فى محلول التثبيت •

ومن أفضل محاليل التثبيت ما يأتى :

ومن أفضل محاليل التثبيت ما يأتى :

١ ــ محلول F.A.A. ويتكون من :

فورمالين	١٣ مل
حمض خليك ثلجى	٥ مل
كحول ايثيل	٢٠٠ مل

٢ ــ محلول كروم ــ حمض الخليك ويتكون من :

حمض كروميك مائى (١٠٪)	١٠ مل
حمض خليك مائى (١٠٪)	١٠ مل
ماء مقطر	١٠٠مل

يضاف ٢٪ مالتوز أو يوريا أو ٥ر٠٪ صابونين وذلك لتسهيل اختراق الانسجة •

٣ ــ محلول فلمنج Flemming ويتكون من :

أ	ماء مقطر	٥٥ مل
	حمض خليك ثلجى (١٪)	١٠ مل
	حمض كروميك مائى (١٪)	٢٥ مل

ب [حمض أوزميك (١٪) ١٠ مل

يحضر محلول أ ليكون جاهزا للاستعمال ولكن يؤجل تحضير واضافة محلول ب الى محلول أ الا قبل الاستعمال مباشرة حيث أن حامض الاوزميك يتلف اذا حفظ .

تغسل العينات جيدا بعد التثبيت فى ماء جار لمدة ٢٤ ساعة ، وفى حالة استخدام محلول فلمنج تغسل العينات فى محلول ٥٪ فوق أكسيد الايدروجين لعدة ساعات لاتمام تبييض الانسجة حيث أن حامض الاوزميك يسبب اسوداد الانسجة .

وفى بعض الحالات أمكن اجراء التجفيف والترويق فى نفس الوقت وذلك باستخدام تركيزات مختلفة من كحول البيوتايل n-butyl alcohol (butanol) وكحول الايثيل فى الماء يزداد فيها نسبة البيوتايل تدريجيا ويقل فيها الماء تدريجيا وهذه التركيزات كالآتى :

رقم التركيز	كحول بيوتايل	كحول ايثيل	ماء
١	١٠	٢٠	٧٠
٢	١٥	٢٥	٦٠
٣	٢٥	٣٠	٤٥
٤	٤٠	٣٠	٣٠
٥	٥٥	٢٥	٢٠
٦	٧٠	٢٠	١٠
٧	٨٥	١٥	—
٨	١٠٠	—	—

وبعد التثبيت فى محلول مائى يغسل التحضير فى المـاء ثم يجفف فى كحول ايثيل حتى ٣٠٪ ثم ينقل الى التركيزات السابقة • فى حالة التثبيت فى F.A.A. ينقل مرتين الى كحول ٥٠٪ ثم ينقل الى تركيز رقم ٢ •

التجفيف Dehydration

من الضرورى ازالة كل أثر لمـاء الغسـيل من الانسـجة حتى تتم عمليات الترويق والطمر فى الشمع بنجاح • ويستخدم فى التجفيف كحول الايثيل حيث يمكنه الاختلاط بالمـاء وازالته من الانسجة وحـلوله محل المـاء ، وفى الوقت نفسه يمكنه أن يختلط بالزيلول (سائل الترويق) ، كما يمكن للزيلول بدوره أن يزيل الكحول ويحل محله فى الانسجة• يتم التجفيف فى زجاجات عينات ذات سدادات من الفلين •

تنقل القطع النباتية من المـاء الى تركيزات متدرجة من الكحول حتى تصل الى الكحول المطلق ويستغرق ذلك عدة سـاعات فى كل تركيز فـفى التركيزات ١٠٪ و ٢٠٪ و ٣٠٪ و ٥٠٪ تغمر القطع لمـدة ساعتين فى كل تركيز ، أما فى حالة العينات النباتية التى تثبت فى محـلول F.A.A. فتنقل مباشرة الى تركيز ٥٠٪ كحول ايثيل • تغمر العينات لمدة اثنى عشر ساعة فى تركيز ٧٠٪ و ٨٥٪ ولمدة ساعتين فى تركيز ٩٥٪ ثم تنقل الى الكحول المطلق ثلاث مرات : تستغرق المرة الاولى من ٢ــ٤ ساعة والمرة الثانية من ٤ــ٢٤ ساعة والمرة الثالثة من ٢ــ٤ سـاعة • وتختلف مـدة المعـاملة فى التركيزات العالية من الكحـول تبعا لدرجـة الصـلابة المطلوبة حيث أن التركيزات المرتفعة فى الكحول تعمل على زيادة صلابة الاجزاء النباتية •

الترويـق Clearing (ازالة الكحول De-alcoholization)

الغرض من الترويق هو جعل الانسجة شفافة • ويستعمل فى الترويق الزيلول ، وهو سائل يختلط بالكحول ويحل محله بالتدريج ، ويذيب شمع

البرافين • يزال الكحول بتمرير العينات النباتية فى تدريجات مختلفة من الزيلول فى كحول مطلق بنسبة ١٠٪ و ٢٥٪ و ٥٠٪ و ٧٥٪ لمدة أربع ساعات فى كل تدريج ، ثم تنقل العينات النباتية فى زيلول نقى مرتين أو ثلاثة كل مرة لمدة ٤ــ٢٤ ساعة لضمان التخلص من الكحول كلية • وقد وجد أن وضع بضع قطرات من صبغة السفرانين المذابة فى الكحول المطلق واضافة تلك القطرات الى تركيز ٥٠٪ أو ٧٥٪ من الزيلول فى الكحول المطلق يساعد على رؤية وتنظيم وضع العينات فى الشمع أثناء عملية الطمر •

الطمر Imbedding

يقصد بالطمر تشرب الانسجة بشمع البرافين وحلوله محل الزيلول وذلك بنقل الاجزاء النباتية الى زيلول جديد فى انابيب عينات ذات غطاء مع اضافة رقائق من الشمع الى الزيلول الى أن يتشبع الزيلول ويقف ذوبان الشمع وذلك على درجة الحرارة العادية •

تنقل أنابيب العينات الى سطح فرن الشمع (٣٥ــ٤٠م) وتضاف كمية أخرى من رقائق الشمع كل ساعة تقريبا ويكرر ذلك أربع مرات • تنقل الانابيب داخل فرن الشمع وهى ما زالت مغطاة لمدة ٢٤ ساعة مع اضافة كمية أكثر من رقائق الشمع • تسكب أنابيب العينات فى طبق بترى صغير قطره ٥سم داخل فرن الشمع ويترك مفتوحا لسهولة تطاير ما تبقى من الزيلول •

تنقل الاجزاء النباتية الى شمع نقى منصهر داخل قوالب من الورق المقوى الناعم بعد دهان أسطحها الداخلية بالجلسرين ، وذلك لسهولة نزع قالب الشمع بعد تماسكه • ويمكن تنظيم الاجزاء النباتية باستخدام ملقط دافىء لوضع الاجزاء النباتية فى وضع ملائم للقطع وترك مسافة بينها •

يقسم القالب الى قطع صغيرة يحتوى كل منها على قطعة واحدة • وينبغى تجمد الشمع بسرعة وذلك بوضع القوالب فى ماء مثلج حتى لا يتبلور الشمع • ويجب أن يكون شمع البرافين المستخدم قليل التبلور خال من المواد الزيتية وذو درجة انصهار ٥٥م • ويمكن تحسين صفات شمع البرافين وذلك باضافة شمع العسل اليه بنسبة ١٪ •

القطع Sectioning

يراعى أن تكون قطع الشمع مكعبة أو مستطيلة مع ترك اطار من الشمع حول العينة على أن تكون طبقة الشمع أكبر عند القاعدة • تثبت القاعدة على حامل الميكروتوم وذلك بصهر رقائق من الشمع على سطح الحامل بواسطة مشرط ساخن ثم غمس الحامل بما عليه من مكعب الشمع فى ماء بارد ، ويكرر وضع رقائق الشمع حول قاعدة مكعب الشمع وصهرها بواسطة المشرط الساخن حتى يتم تثبيت المكعب على الحامل • يوضع الحامل فى الميكروتوم ويضبط وينظم سمك القطاعات بواسطة التدريج • تفرد شرائط القطاعات فى علبة من الكرتون بعيدا عن التيارات الهوائية •

لصق القطاعات على الشرائح الزجاجية :

تستخدم عدة مواد للصق القطاعات على الشرائح الزجاجية ، ومن أكثر المواد استعمالا البيومين البيض حيث يوضع البيومين بيضة واحدة فى زجاجة نظيفة ويضاف اليها حجم مساو من الجلسرين وآخر من الماء وجرام واحد من سلسلات الصوديوم و ½ جم من بنزوات الصوديوم • ترج المركبات رجا جيدا لعدة دقائق • توضع نقطة واحدة من البيومين البيض فى مركز شريحة زجاجية نظيفة وتنشر بالاصبع حتى تتكون طبقة رقيقة متجانسة على سطح الشريحة • توضع نقطة من الماء على سطح

الشريحة وينقل اليها شريط من القطاعات ويزال الزائد من المـاء بواسطة ورقة ترشيح • تسخن الشريحة تسخينا هينا حتى تنبسط الاشرطـة ثم توضع الشرائح على سطح فرن الشمع لمدة ٢٤ ساعة • يزال الشمع بغمر الشرائح فى وعاء كوبلن به زيلول لمدة ١٥ دقيقة وتكرر هذه العملية مـرة أخرى فى وعاء آخر به زيلول • تنقل الشرائح الى أوعية كوبلن بها تركيزات من زيلول وكحول مطلق بنسبة ٥٠٪ زيلول ثم ٣٠٪ ثم ١٠٪ ثم الى كحول مطلق • تدرج الشرائح فى تركيزات تنازلية من الكحول ٩٠٪ و ٧٠ ٪ و٥٠٪ و ٣٠٪ و ٣٠٪ ثم الى ماء مقطر وذلك لاعدادها للصبغ •

صبغ القطاعات Staining

قبل الصمغ يزال الشمع وذلك بغمر الشرائح بما تحمـل من قطاعات فى زيلول ، ثم تدرج الشرائح تنازليا فى تركيزات من الزيلول / كحول حتى تصل الى المـاء •

يستخدم فى صـبغ القطاعات الشمعية ما يعـرف بالصبغ المضـاد Counter staining أى يصبغ القطاع بصبغتين أو أكثر فى تتابـع ويحدث احلال للصبغة الثانية محل الصبغة الاولى فى بعض الانسجة دون الاخرى ، ومن الصبغات الهامة ما يأتى :

١ ــ صبغة ثيونين ــ برتقالى ج Thionin - Orange G

وتتكون هذه الصبغة من ١ر٠ جم من الثيونين تذاب فى ١٠٠ مل من المـاء المضاف اليه ٥ جم بلورات فينول • تصبغ الشرائح لمدة سـاعة ثم تدرج تصاعديا فى تركيزات من الكحول حتى تصل الى الكحـول المطلق • يعاد الصبغ فى محلول مركز من برتقـالى ج فى كحول مطلق حتى تفقـد

القطاعات لونها الارجوانى المزرق ويصبح لونها مصفر ولا يستغرق ذلك أكثر من دقيقة واحدة • تغسل القطاعات جيدا بالكحول المطلق وتنقل الشرائح الى زيلول / كحول وتروق فى زيلول وتحمل القطاعات فى كندا بلسم Canada Balsam • تصبغ هيفات الفطر باللون البنفسجى والجدر باللون الاصفر والاوعية الخشبية باللون الازرق •

٢ ــ صبغة سفرانين ــ أخضر سريع Safranin - Fast green

تغمر الشرائح فى السفرانين المائى (١ر٠٪) لمدة ٢ــ٨ ساعات وتغسل بالماء حتى يزول الزائد من الصبغة • تمرر الشرائح فى تركيزات تصاعدية من الكحول حتى ٩٥٪ ثم تصبغ بصبغة أخضر سريع المذاب فى ٩٥٪ كحول لمدة نصف دقيقة • تمرر الشرائح فى كحول مطلق ثم فى زيت قرنفل • تمرر فى زيلول عدة مرات وتحمل فى كندا بلسم • تصبغ الهيفات والجدر السليولوزية للعائل باللون الاخضر وتصبغ الجدر الملجننه والنوايات باللون الاصفر •

٣ ــ صبغة أزرق ميثيل ــ اريثروسين Methyl Blue - Erythrosin:

يحضر محلول مائى من أزرق ميثيل (١٪) ومحلول من اريثروسين (١ ٪) فى كحول ٩٥٪ • تتبع الخطوات كما فى الطريقة السابقة •• تتلون هيفات الفطر والجدر السليولوزية باللون الاحمر والجدر الملجننه والنوايا باللون الازرق •

٤ ــ صبغة تشيف الحامضية Periodic Acid Schiff

تغمر الشرائح فى محلول حامض ١٪ لمدة ثلاث دقائق ثم تغسل فى ماء جار لمدة عشر دقائق • تغمر فى دليل تشيف Schiff لمدة عشر دقائق ويحضر هذا الدليل بالطريقة الآتية :

يضاف ١٠٠ مل ماء مغلى على ٥ر٠ جم من الفوكسين القاعدى ويذاب • يترك ليبرد حتى ٥٠°م ويرشح ثم يضاف اليه ١٠ مل من محلول عيارى من حامض أيدروكلوريك و ٥ر٠ جم من ثيوكبريتات البوتاسيوم ويترك الدليل لمدة ١٢ ساعة للترويق ويصبح عديم اللون أو أصفر فاتح •

تنقل الشرائح مرة أخرى لمدة عشر دقائق فى محلول تشيف (مع حفظ الدليل فى زجاجة داكنة اللون مقفلة وبعيدة عن الضوء ويفضل حفظها فى ثلاجة) • تغسل الشرائح فى ماء جار لمدة عشر دقائق ثم تدرج تصاعديا فى تركيزات كحولية الى أن تصل الى الكحول المطلق ثم فى زيت قرنفل ثم فى زيلول عدة مرات ثم تحمل فى كندا بلسم •

تصبغ الهيفات والجدر السليولوزية للعائل بلون أحمر أرجوانى ولكن لا تتأثر الجدر الملجننة بالصبغ •

٥ ــ صبغة هيماتوكسلين دليفيلد Delafield's haematoxylin

وتفيد فى صبغ التركيب الداخلى للاجسام الحجرية Sclerotia ولتحضير الصبغة يعمل ١٠٠ مل من محلول مشبع من شب الامونيوم ammonium alum ومحلول مكون من ٦ مل كحول مطلق مذاب فيه ١ جم هيماتوكسلين • يضاف المحلول الثانى الى المحلول الاول نقطة فنقطة ثم يعرض للضوء فى زجاجة مكشوفة مدة سبعة أيام ثم يرشح ، ويضاف اليه ٥ر٢ مل جلسرين و ٥ر٢ مل كحول ميثيل • يترك لمدة شهرين حتى ينضج ثم يرشح • ولتحضير قطاعات شمعية فى الاجسام الحجرية تثبت الاجسام الحجرية فى محلول مكون من كحول مطلق وحمض خليك ثلجى بنسبة ١:٤ ، وتمرر فى تركيزات كحولية ٧٠٪ ، ٩٥٪ وكحول مطلق ، ثم تنقل الى مخلوط من كحول ايثيل وكحول بيوتايل بنسبة ١:٢ ثم الى آخر بنسبة ٢:١ ثم تجرى عملية الطمر فى الشمع والقطع بالميكروتوم • يذاب الشمع بالتمرير فى زيلول ثم فى كحولات حتى الماء ثم تصبغ •

obeikandl.com

الفحص الميكروسكوبى

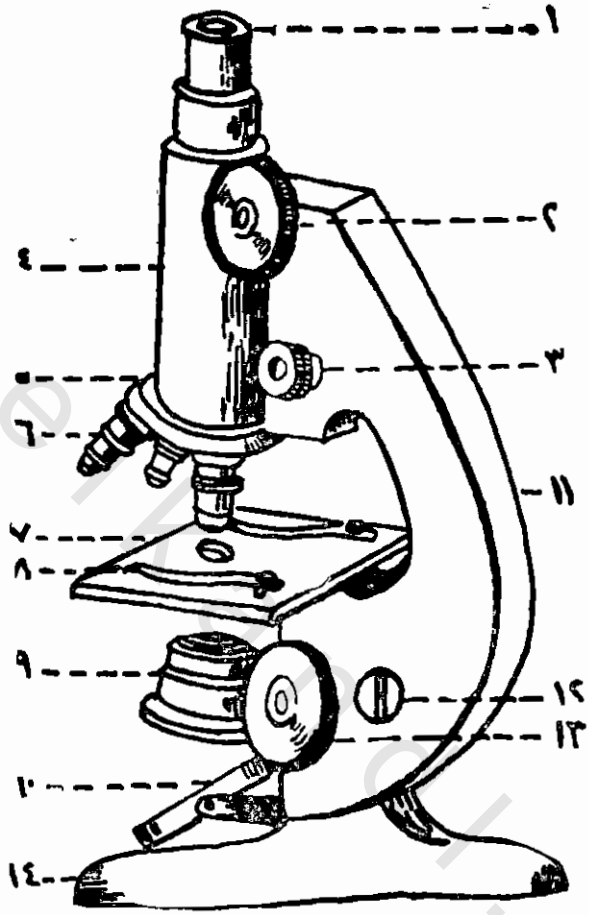
MICROSCOPIC EXAMINATION

وظيفة الميكروسكوب هو امكان رؤية الاجسام الدقيقة التى لا يمكن رؤيتها بالعين المجردة • ومن المعلوم أن الشخص السليم النظـر يمكنه التمييز بين نقطتين المسافة بينهما ٠٫٠٧ مم تقريبا ، ويبعـدان عن عينيه مسافة ٢٥ سم أى يصنعان زاوية قدرها دقيقة واحدة ($\frac{1}{60}$ من الدرجة) وتكون هذه المسافة أقصر مسافة للرؤية الواضحة ، لذا فالصورة التقديرية التى ترى بواسطة الميكروسكوب فى حالة الشخص السليم النظر يجب أن تكون على بعـد ١٥ سم من العـين ، وعلى هـذه بنيت فكرة تركيب الميكروسكوب •

تركيب الميكروسكوب :

يتكون الميكروسكوب (شكل ٣) من قدم يتحرك عليه ذراع حـركة مفصلية ، ومثبت على الجزء العلوى من الذراع أنبـوبة يمكنها التحـرك حركة رأسية بواسطة ضابطين : ضابط تقـريبى Course adjustment وضابط دقيق fine adjustment • وتعد أنبوبة الميكروسكوب الجـزء الاساسى للميكروسـكوب اذ يثبت فى طرفها العـلوى العدسـات العينية ocular lens وهى ذات قوة تكبير ١٠ مرات عادة ، كما يثبت فى طرفها السفلى العدسات الشيئية objectives ويتراوح عـددها من ٢ الى ٥ ، وعادة توجد ثلاث شيئيات الاولى قوة صغرى low power magnification وهى ذات تكبير ١٠ مرات (10×) والثانيـة قـوة كبرى high power magnification ذات قوة تكبير ٤٠ مـرة (40 ×) والثالثـة تعرف

شـــكل ٣ الميكروســـكوب



١ - عدسة عينية	٢ - ضابط تقريبي	٣ - ضابط دقيق
٤ - أنبوبة الميكروسكوب	٥ - قطعة أنفية	٦ - عدسة شيئية
٧ - المسرح	٨ - حامل	٩ - مكثف
١٠ - مرآة	١١ - الذراع	١٢ - مفصل آلي
١٣ - ضابط المكثف	١٤ - القاعدة	

بالعدسة الزيتية oil immersion وهي ذات قوة تكبير ٩٥ مرة (95 ×)
وتركب العدسات الشيئية على جسم قرصي يعرف بالقطعة الانفية Nose piece ، تتحرك حركة دائرية بحيث يمكن جعل احدى العدسات الشيئية على امتداد أنبوبة الميكروســـكوب وبذلك يمكن الحصول على قـــوة تكبير مختلفة .

ومثبت على الجزء السفلى من الذراع مسرح Stage الميكروسكوب وهو مسطح مربع أو مستدير الشكل وفى منتصفه فتحة تسمح للضوء بالمرور ومثبت أيضا على المسرح ماسكين Clips لتثبيت الشريحة الزجاجية أثناء الفحص •

يتحرك أسفل المسرح مرآة لتوجيه الضوء الى داخل أنبوبة الميكروسكوب ، والمرآة ذات وجهين أحدهما مستوى والاخر مقعر ، وكثيرا ما يجهز الميكروسكوب بمكثف condenser يثبت بين المرآة والمسرح وذلك لتجميع الضوء المنعكس من المرآة وتوجيهه لفتحة المسرح ، ويزود المكثف بحجاب diaphragm للتحكم فى كمية الضوء الواصلة الى الميكروسكوب • ومعظم الميكروسكوبات الحديثة مزودة بجهاز اضاءة سفلى ولا تحتاج الى مرآة •

وللاستعمال الصحيح للميكروسكوب تتبع الارشادات التالية :

١ ــ التأكد من نظافة العدسات ويفضل تنظيفها بورق تنظيف العدسات •

٢ ــ الحذر من تلوث أجزاء الميكروسكوب وخاصة العدسات بشىء من المحاليل المستعملة ، واذا تلوثت العدسة الشيئية بلاكتوفينول أو كندا بلسم فتنظف بقطعة قماش بها زيلول ثم تجفف بسرعة ويمكن استخدام ورق تنظيف العدسات بعد ذلك • ويجب تجنب استخدام الكحول فى تنظيف العدسات حيث أنه يؤثر فى المادة اللاصقة التى تثبت العدسات ويؤثر أيضا فى دهان الميكروسكوب •

٣ ــ استخدام القوة الصغرى (الشيئية الصغرى) فى ضبط الضوء،

ويجب أن يكون الضوء كافيا سواء كان ضوء النهار أو لمبة أسفل فتحة المسرح ، ولذلك يفتح الحجاب عن آخره ويرفع المكثف الى نهايته وتحرك المرآة صوب منبع الضوء وتنظم كمية الضوء الداخلة الى الميكروسكوب بواسطة توسيع أو تقليل فتحة الحجاب أو بخفض المكثف ببطء •

٤ ــ استعمال السطح المقعر للمرآة فى حالة عدم وجود المكثف ، أما فى حالة وجود المكثف فيستعمل السطح المستوى للمرآة عند العمل فى ضوء النهار ، وأذا استخدمت لمبة ميكروسكوب كمصدر ضوئى فيستعمل السطح المستوى للمرآة مع القوة الصغرى للميكروسكوب والسطح المقعر مع القوة الكبرى للميكروسكوب •

٥ ــ وضع الشريحة على مسرح الميكروسكوب بحيث يكون التحضير فى مسار الضوء من المكثف الى الشيئية • خفض أنبوبة الميكروسكوب بالضابط التقريبى ببطء بحيث تكون الشيئية الصغرى على بعد حوالى ٥مم من التحضير وتبدأ معالم التحضير فى الظهور ثم يستخدم الضابط الدقيق فى رؤية معالم التحضير • يمكن بعد ذلك استبدال الشيئية الصغرى بالشيئية الكبرى وذلك بادارة القطعة الانفية واستعمال الضابط الدقيق فقط وذلك لرؤية تفاصيل التحضير •

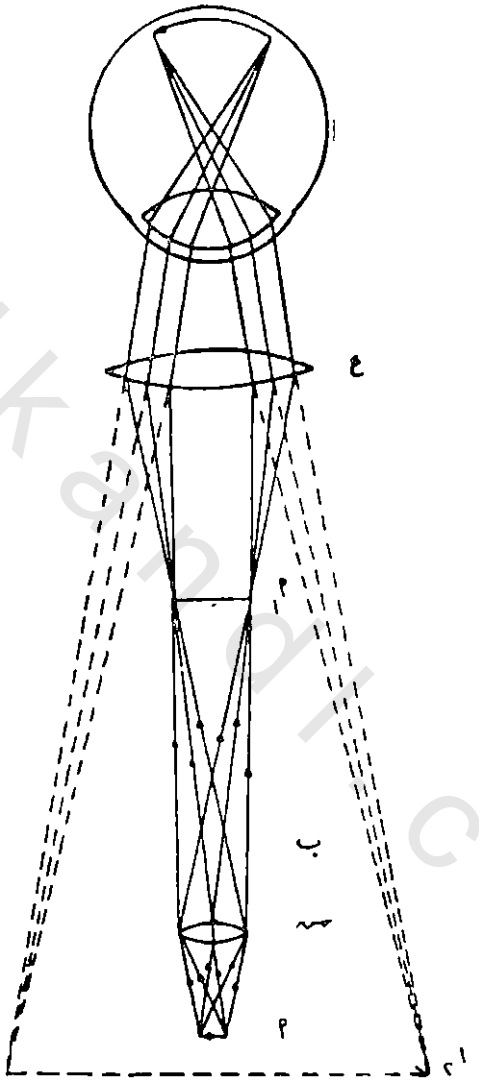
٦ ــ مراعاة وضع غطاء الشريحة على التحضير فى حالة الفحص بالشيئية الكبرى •

٧ ــ تجنب غمض احدى العينين عند الفحص الميكروسكوبى لان ذلك يضعفها ، ويجب التعود على فتح العينين أثناء استعمال الميكروسكوب ، ولذلك يفضل استخدام الميكروسكوب ذو العينين Binocular microscope

نظرية الميكروسكوب :

عند وضع التحضير على مسرح الميكروسكوب فى مسار الضوء وضبط الميكروسكوب يكون التحضير على بعد أكثر قليلا عن البعد البؤرى للعدسة

شـــكل ٤



كيفية تكوين صورة التحضير الميكروسكوبي

س : عدسة شيئية . ع : عدسة عينية . ب : بؤرة العدسة الشيئية

ا : التحضير . ا١ : صورة مكبرة حقيقية . ا٢ : صورة مكبرة تقديرية

ا٣ : صورة التحضير على شبكية العين

الشيئية ، ولذا فان الاشعة الضوئية المـارة على التحضير تتجمـع بعـد العدسة مكونة صورة مكبرة حقيقية مقلوبة للتحضير (شكل ٤) ، وتكون تلك الصورة على بعد أقل من البعد البؤرى للعدسة العينية للميكروسكوب ولذا فان الاشعة الساقطة منها على العدسة تخرج متفرقة وتكون صـورة تقديرية تظهر قرب مستوى مسرح الميكروسكوب .

اننا ننظر بالعين عند العدسة العينية وتوجد نقطة معينة فوق عينية الميكروسكوب بقليل تسمى النقطة العينية للميكروسكوب وعندها تستقبل العين ــ عدسة العين عبارة عن عدسة بسيطة وشبكية العين حاجز استقبال للصورة ــ مخروط الاشعة المكونة للصورة وتكون على شبكية العين صورة ذات حجم معين يراها الفاحص عند مستوى مسرح الميكروسكوب . ويلاحظ أن وضع الصورة المتكونة يكون كالوضع الطبيعى للمرئى بينما تظهر للعين مقلوبة (اتجاه حركة المرئى يكون عكسيا) وحجمها هو نفس الحجم المتكون عند استقبالها على حاجز استقبال على بعد ٢٥ سم من العينية .

خـــواص الشيئيات :

١ ــ التكبير Magnification

يجب أن يكون التكبير كافيا للتمييز بين الدقائق الصغيرة التى تبعد عن بعضها مسافات لا تقل عن ٠٫٠٧ مم .

ويتوقف تكبير الصـورة على تكبير العـدسات الشـيئية والعينية المستعملة وهى تساوى حاصـل ضرب تكبير العـدستين فاذا كان تكبير العينية ١٠ مرات والشيئية ١٠ مرات يكون التكبير النهائى ١٠×١٠=١٠٠ مرة ، واذا كان تكبير الشيئية ٤٠ مرة يكون التكبير النهائى ١٠×٤٠=٤٠٠ مـــرة .

المسـافة الفعـالة Working distance

وهى المسافة المحصورة بين العـدسة الشيئية وغطاء الشريحـة • وتكون هذه المسافة واسعة نسبيا (٧ مم) عند استخدام العدسة الشيئية الصغيرة ، بينما تصبح هذه المسافة ١٣ر٠ مم فى حالة استخدام العـدسة الشيئية الكبرى ، وعلى ذلك يلزم اتخاذ الحرص وخاصة عند استخـدام الشيئية الكبرى حتى لا تتلف العدسة •

العمـق البـؤرى Depth of focus

العمق البؤرى هو المدى العمودى لمنطقة البؤرة ، وهذا المدى يقـل بزيادة قوة التكبير للعدسة الشيئية ويظهر ذلك عند فحص خـلايا نباتية بالشيئية الصغرى حيث يمكن رؤية السطحين العلوى والسـفلى وبدون تحريك الضابط الدقيق حيث يقع سطحى الخلية فى مجال بؤرى واحـد ، بينما فى حالة استخدام الشيئية الكبرى فاننا لا نرى السطحين فى مجال بؤرى واحد ، ويلزم فى هذه الحالة تحريك الضابط الدقيـق لرؤية أحـد السطحين وتحريكه مرة أخرى لرؤية السطح الاخر حيث يقع كل سطح فى مجال بؤرى مختلف •

قـوة تمييز المرئى Resolution

قوة تمييز المرئى هو قدرة العدسات الشيئية على التوضيح والتفرقة بين نقطتين متقاربتين كشيئين مميزين وليس كشىء واحد غير واضـح • والعدسات ذات قوة التمييز الضعيفة تظهر الكروموسوم الدقيق كأنه خيط واحد بينما العدسة ذات قوة التمييز القوية تظهره على حقيقته بصـورة خيطين ملتفين على بعضهما ، وعلى ذلك فان فائدة الميكروسـكوب ليست

فى قدرته على التكبير بقدر ما فى قدرته على التمييز بين المرئيات المتقاربة •

وتتوقف قوة التمييز على خاصية الفتحة العددية Numerical aperture(N.A.) وطول الاشعة الضوئية المستعملة ، وكلما كانت الفتحة العددية أكبر كلما كانت قوة التمييز بين المرئيات المتقاربة أكثر وتفاصيلها أوضح•

ويمكن حساب الفتحة العددية بالمعادلة الآتية :

$$\text{الفتحة العددية} \quad (N.A.) = \mu \sin \frac{\theta}{2}$$

حيث أن θ = زاوية مخروط الاشعة الواصل الى العدسة الشيئية •

μ = معامل انكسار الضوء للوسط الذى تسير فيه الاشعة بين العدسة الشيئية وغطاء الشريحة •

وأكبر زاوية ممكنة لمخروط الاشعة هى ١٨٠° (وجا) (sin) نصف هذه الزاوية ، أى جا ٩٠° = ١ • فاذا كان الوسط الذى تسير فيه الاشعة بين العدسة الشيئية وغطاء الشريحة هو الهواء ومعامل الانكسار μ = ١ فان الفتحة العددية تساوى نظريا ١ ، ولكن عمليا فان أعلى قيمة للفتحة العددية التى نحصل عليها هى ٩ر٠ باستعمال شيئيات جافة أى أن الفاصل بين الشيئية والشريحة هو الهواء ، ولكن يمكن زيادة قيمة الفتحة العددية اذا استعمل زيت السيدر حيث أن معامل انكسار الضوء خلاله كالزجاج تقريبا أى أن الضوء يمر خلال الشريحة الى الشيئية مارا بالزيت دون أن يعتريه أى انكسار ، وقد وجد أن قيمة الفتحة العددية تصبح ١ر٤ عندما يستعمل السيدر ، ولذلك يستخدم زيت السيدر لفحص التحضيرات البكتيرية لدقة حجم الخلايا وتجمعاتها ، كما يستخدم لذلك عدسة شيئية قوة تكبيرها ٩٥ مرة (95×)

ولا تتوقف قدرة العدسة الشيئية على تمييز المرئى على الفتحة فقط

ولكن على طول الموجه الضوئية المستعملة وعلى وجود المكثف أيضا ، ففى حالة وجود مكثف واستعمال عدسة شيئية ذات فتحة عددية = ١ واستعمال ضوء أخضر مزرق طول موجته ٠٫٠٠٠٥ مم تحسب قوة التمييز للعدسة الشيئية كالآتى :

$$\text{قوة التمييز للعدسة الشيئية المستعملة} = \frac{\text{طول موجة الضوء}}{٢ \times \text{قيمة الفتحة العددية}} = \frac{٠٫٠٠٠٥}{٢ \times ١} = ٠٫٠٠٠٢٥ \text{ مم}$$

أما فى حالة عدم وجود مكثف فتكون قوة التمييز

$$= \frac{\text{طول موجة الضوء}}{\text{قيمة الفتحة العددية}} = \frac{٠٫٠٠٠٥}{١} = ٠٫٠٠٠٥ \text{ مم}$$

ومعنى ذلك أنه فى حالة وجود خليتين بكتيريتين يمكن التمييز بينهما باستعمال هذه الشيئية اذا بعدا عن بعضهما بمسافة ٠٫٠٠٠٢٥ مم فى حالة وجود مكثف ، أو اذا بعدا عن بعضهما بمسافة ٠٫٠٠٠٥ مم فى حالة عدم وجود مكثف .

توافق العدسات الشيئية Parfocalization

ذكر سابقا عند تمام ضبط التحضير بالشيئية الصغرى (10×) أنه يمكن الفحص بالقوة الكبرى (40 ×) عن طريق ادارة القطعة الانفية ورؤية التحضير،ويقال فى هذه الحالة بأن هناك توافق بين الشيئيتين Parfocal ، أما اذا لم تكن رؤية تفاصيل التحضير واضحة بعد ادارة القوة الكبرى واحتاج الامر الى استعمال المحرك الدقيق لاعادة

الضبط فلا يكون هناك توافق بين الشيئيتين ، ويسبب عدم التوافق بين الشيئيتين كسر أغطية الشرائح وخدش العدسات •

العينيات Oculars (Eyepieces)

عند استعمال عدسة شيئية معينة يلزم معرفة العدسة العينية المناسبة لها للحصول على أفضل تمييز للمرئى • وتتفاوت العدسات العينية فى قوة تكبيرها ولكن أكثرها استعمالا هى قوة تكبير (× 10) ، وهناك حد أعلى لقوة تكبير العينية يمكن استعمالها مع شيئية للحصول على أفضل تمييز فمثلا فى حالة استعمال شيئية قوة تكبيرها (× 45) والفتحة العددية لها ٠ر٧ فان أعلى تكبير للعينية يمكن حسابها من المعادلة الاتية :

$$\text{أعلى تكبير للعينية} = \frac{\text{١٠٠٠ × قيمة الفتحة العددية للشيئية المستعملة}}{\text{قوة تكبير الشيئية}}$$

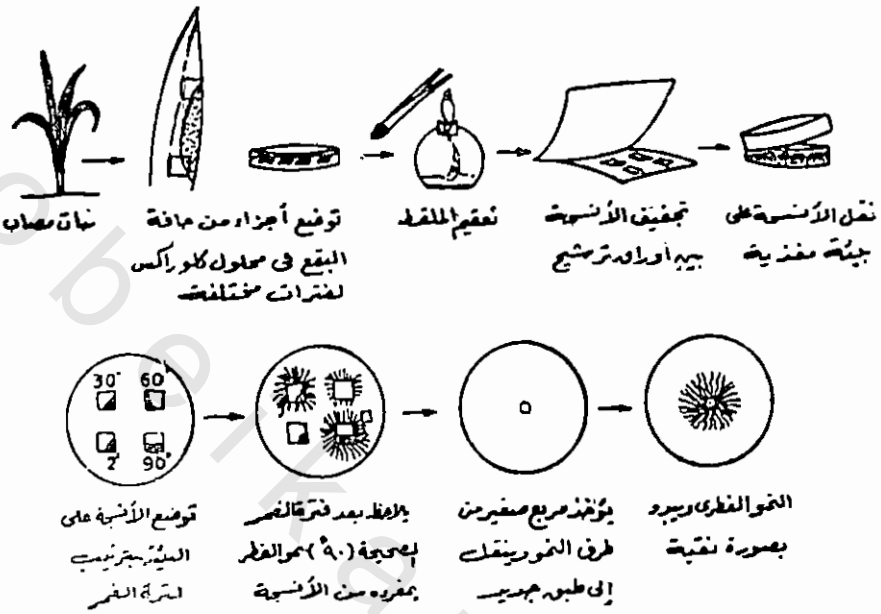
$$= \frac{\text{١٠٠٠ × ٠ر٧}}{\text{٤٥}} = \text{١٥}$$

أى أنه عند استعمال شيئية قوة تكبيرها ٤٥ لا يجدى معها استعمال عينية قوة تكبيرها أكبر من (× 15) للحصول على أوضح تمييز للمرئى •

عـــزل المسبب المـرضى

ISOLATION

غالبا ما ينتج المرض النباتى من مسبب مرضى طفيلى واحد أو أكثر وفى كثير من الاحوال يمكن الحصول على هذا المسبب المرضى عن طـريق العزل فاذا كان المسبب فطرا متجـرثما على ســطح العــائل ، على هيئة مسحوق من الجراثيم أو مكونا لتركيبات ثمرية فيمكن الحصول على مزرعة من هذا الفطر عن طريق لمس الجراثيم أو التقاط التركيب الثمرى المتكون بواسطة ابرة معقمة غمست أولا فى كحول ٩٥٪ ثم عرضت للهب ، ويمكن الاستعانة بعدسة يد أو اجراء ذلك تحت القوة الصغرى للميكروسكوب ذو العينيتين ، ثم يمرر طرف الابرة على سطح بيئة مغذية صلبة معقمــة فى أطباق بترى • واذا كان المسبب غير متجرثم وغير مرئى على سطح الورقة المصابة مثلا ، تؤخذ أجزاء صغيرة تتراوح من ٥ــ١٠ مم٢ من حافة البقعة المصابة بحيث تشمل جزء مصاب وجزء سليم ظاهريا (شكل ٥) • تعقم هذه الاجزاء ســطحيا وذلك بغمــرها فى محــلول ١٪ من هيبوكلــوريت الصوديوم (يعرف تجاريا باسم كلوراكس Chlorox) لفترات مختلفة ½ و ١ و ١½ و ٢ دقيقة ، ثم تنقل قطعة تلو الاخرى بواســطة ملقط معقم الى سطح ورق ترشيح نظيف لتجفيفها ثم تنقل الى سطح بيئة مغذية فى أطباق بترى بمعدل ٣ــ٥ قطع/طبق • يلاحظ أن الاجزاء التى تم تعقيمها لاقصر فترة تحتوى عادة على كائنات ملوثة بجانب المسبب المرضى بينما تلك التى عقمت لاطول فترة لا تنتج أى نمو حيث يكون المطهر السطحى قد قضى على جميع الكائنات ، أما الاجزاء التى عرضت لفترة متوسطة فانهــا تسمح بنمو المسبب المرضى على هيئة مستعمرات نقية ظاهريا حيث تكون هذه الفترة كافية للمطهر للقضاء على الكائنات الملوثة ولكن ليست كافيــة



• شكل ٥ • عزل المسببات الفطرية من الأنسجة النباتية المصابة

لقتل المسبب المرضى الذى يكون نامياً بمفرده من داخل النسيج المصاب الى النسيج السليم • يؤخذ جزء طرفى من المستعمرة وتنقل ــ تحت ظروف معقمة ــ الى سطح بيئة مغذية فى طبق بترى آخر لدراسة المسبب المرضى •

ويمكن عزل المسببات المرضية بسهولة من داخل السيقان والثمار وذلك بشق الساق طوليا أو قطع الثمرة من الجانب السليم أولا باستخدام سلاح معقم وذلك بعد تعقيم الجزء النباتى تعقيما سطحيا واستمرار القطع نحو الحافة المصابة وتجاوزها مع عدم التعرض للكائنات الملوثة أو لمسها باليد أو المشرط • تؤخذ أجزاء صغيرة من الحافة المصابة بحيث تشمل الاجزاء المقطوعة أنسجة مصابة وأنسجة سليمة وتوضع مباشرة على سطح البيئة المغذية •

أما العزل من الجذور الدرنية والدرنات والكورمات وثمار الخضر الملاصقة للتربة والتى تكون قد تعرضت للتلويث بكائنات رمية عديدة بعد أن تكون أنسجتها قد قتلت بالمسبب المرضى ، فيلزم أولا غسلها جيدا بالماء لاستبعاد حبيبات التربة وأنسجة النبات المتآكلة التى تحتوى على معظم الرميات ، واذا كان الجذر صغيرا فتتبع نفس خطوات العزل من الاوراق وذلك بعد غسله جيدا بالماء ، واذا كانت الانسجة طرية وكانت الاصابة سطحية يغسل النسيج بالماء وتؤخذ منه أجزاء صغيرة وتغمر فى محلول كلوراكس وتنقل قطعة تلو الاخرى الى ورق ترشيح ثم على سطح الاجار فى أطباق بترى ، أما اذا كانت الاصابة عميقة داخل الانسجة الطرية فتتبع خطوات العزل كما ذكرت فى حالة السيقان والثمار •

ومعظم الفطريات والبكتيريا تنمو على بيئات مغذية بسهولة ، الا أن البعض لا ينمو على بيئات مغذية مثل فطريات البياض الزغبى وفطريات البياض الدقيقى فهى فطريات اجبارية التطفل لا تنمو الا على عوائلها النباتية • كما أن بعض المسببات المرضية الاخرى مثل الكائنات الشبيهة بالميكوبلازما والبكتيريا الشبيهة بالركتيزيا والفيروسات والنيماتودا والبروتوزوا لم يمكن تنميتها على بيئات مغذية حتى الان ولو أن من المتوقع قريبا اكتشاف بيئات لتنمية الكائنات الشبيهة بالميكوبلازما والبكتيريا الشبيهة بالركتيزيا •

المزارع النقية للفطريات

PURE CULTURES

تعدالمزرعة نقية اذا نتجت من جرثومة مفردة Single spore أو من طرف هيفا hypha tip • وهناك طرق عديدة للحصول على

مزارع نقية ، ففى الفطريات التى تكون جراثيم تتبع بعض الطرق للحصول على جرثومة مفردة ، أما فى الطريات التى لا تكون جراثيم أى الفطريات العقيمة فتتبع طريقة الحصول على طرف هيفا ، ومن أسهل تلك الطـرق ما يأتى :

طرق الحصول على جرثومة مفردة :

١ ــ يعمل تخفيف من معلق الجراثيم وذلك بنقل كتلة صـغيرة من النمو الفطرى الى أنبوبة بها ماء معقم • ترج الانبوبة بين اليدين • تعمل تخفيفات فى أنابيب بها ماء معقم الى أن نحصل على تخفيف لا يزيد فيـه عدد الجراثيم فى نقطة المـاء المحمولة على الابرة ذات العقدة عن جرثومة واحدة وذلك بوضعها على شريحة زجاجية وفحصها بالميكروسكوب • تنقل عدة نقط بواسطة الابرة الى أطبـاق بترى بهـا آجار مائى وتفحـص ميكروسكوبيا • تعلم النقط التى تحتوى على جـرثومة واحـدة وذلك من أسفل الطبق • توضع الاطباق فى حضان لفترة عدة ساعات الى أن تنبت الجراثيم ثم تنقل الجراثيم المنبتة الى بيئة مغذية فى أطباق أو الى آجار مائل فى أنابيب •

٢ ــ تفيد هذه الطريقة فى عزل جـراثيم مفـردة للفطـريات ذات الجراثيم الداكنة اللون • يعمل تخفيف من معلق الجراثيم فى بيئة آجار مائى مسال • تسحب البيئة الى أنابيب شعرية معقمة وتترك قليلا الى أن تتجمد داخل الانابيب • تفحص الانابيب تحت الميكروسكوب فتظهـر بها الجراثيم مفردة ومتباعدة • يطهر جدار الانبوبة الشعرية سطحيا بكحول ٩٥٪ ثم تكسر الانبوبة لاخذ الاجزاء التى بها جراثيم فردية وتنقل تلك الاجزاء الى بيئة مغذية فى أطباق تبرى وتحضن • تنبت الجراثيم وتظهـر أنابيب الانبات من نهايات القطع الشعرية وتكون مستعمرات •

طريقة الحصول على طرف هيفا :

تصب بيئة الآجار المائى فى أطباق تبرى معقمة وقبل أن تتجمد البيئة توضع حلقة زجاجية (مجهزة من أنبوبة اختبار بعد تقطيعها الى حلقات بسمك ٤ــ٥ مم) معقمة فى مركز الطبق • بعد أن تتجمد البيئة يوضع جزء صغير من الفطر فى مركز الحلقة وعندما ينمو الفطر يملأ مساحة الحلقة ويتسلق جدار الحلقة ويستمر فى النمو خارجها وهذا مما يساعد على تباعد الهيفات عن بعضها • يقطع مربع من البيئة حول طرف هيفا وذلك تحت القوة الصغرى للميكروسكوب بواسطة مشرط حاد معقم وينقل الى طبق آخر أو أنبوبة بها بيئة آجار مائل •

obeikandl.com

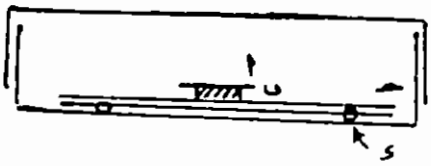
obeikandl.com

التجرثم فى الفطريات

SPORULATION IN FUNGAL CULTURES

وجد أن تعريض المزارع الفطرية للاشعة القريبة من فوق البنفسجية يساعد على زيادة تجرثم كثير من الفطريات ، ولذلك تستخدم هذه الطريقة فى الوقت الحاضر فى معظم معاهد الفطريات فى العالم • يستخدم لهذا الغرض لمبات تشبه لمبات الفلورسنت العادية فى طولها (١٢٠ سم) ولذلك تصلح حوامل اللمبات الفلورسنت لتركيب لمبات الاشعة القريبة من فوق البنفسجية • تعطى تلك اللمبات أشعة ذات موجه تتراوح من ٣١٠٠ـ٤١٠٠ أنجستروم • تستخدم الاطباق البيركس أو الاطباق البلاستيك عند تعريض المزارع الفطرية لتلك الاشعة حيث يسمح الزجاج البيركس أو البلاستيك بنفاذ كمية كبيرة من تلك الاشعة خلالها • تعرض المزارع الفطرية عادة لمدة ١٢ ساعة للاشعة القريبة من فوق البنفسجية تتبادل مع ١٢ ساعة ظلام يوميا ، ويتم الفحص بعد عدة أيام تبعا لسرعة نمو الفطريات • يفضل ضبط درجة حرارة غرفة الاشعة على ٢٠°م ، ويراعى الاحتراس عند استخدام تلك الاشعة حيث أنها قد تسبب بعض الاضرار للعين والجلد •

وللتعرف على الفطريات قد يكتفى فى بعض الحالات بشكل الجراثيم ولكن فى حالات أخرى — وخاصة اذا أريد معرفة النوع — يلزم تتبع مراحل نمو الجراثيم والحوامل الجرثومية وطريقة التصاق الجراثيم بالحوامل الجرثومية ، ولفحص التركيب الكامل للفطر يمكن تحضير مزرعة شريحية Slide culture (شكل ٦) وذلك بأن يسمح للفطر بالنمو على طبقة رقيقة من الاجار بين الشريحة وغطاء الشريحة • ينقل مكعب صغير ٣×٣×٣ مم من بيئة مغذية مثل آجار البطاطس والدكستروز



شكل ٦ . مزرعة شريحية

ا ـ غطاء شريحة ب ـ أسطوانة من الآجار .
حـ ـ شريحة زجاجية ء ـ قضيب زجاجي .

أو آجار المولت على منتصف شريحة زجاجية معقمة بالكحول • يلقح مكعب البيئة من جوانبه الاربعة بكمية قليلة من الفطر المراد التعرف عليه • يغطى المكعب بغطاء شريحة معقم أيضا بالكحول وتنقل الشريحة الى طبق بترى معقم به ثلاث أوراق ترشيح مبللة بالماء المعقم والجلسرين (٢٠٪) ، وترفع الشريحة عن أوراق الترشيح المبللة بواسطة قضيبين زجاجيين قصيرين • يغطى الطبق ويحفظ فى درجة حرارة الغرفة • تعمل عدة مكررات لكل فطر • تفحص الشريحة كل يومين تحت القوة الصغرى للميكروسكوب لتتبع تكوين الحوامل الجرثومية والجراثيم • بعد تمام تكوين الحوامل والجراثيم وفحصها يمكن أيضا الاحتفاظ بها مدة طويلة • يمكن عمل تحضيرين الاول من غطاء الشريحة والاخر من الشريحة • ينقل غطاء الشريحة ــ الذى يكون الفطر ناميا عليه أيضا ــ الى شريحة أخرى عليها نقطة من اللاكتوفينول الابيض أو الملون • يرفع مكعب البيئة من الشريحة بواسطة ملقط معقم وتوضع نقطة من اللاكتوفينول الابيض أو الملون مكانه ثم يوضع غطاء شريحة نظيف • يعمل تشميع حول غطاء الشريحة ــ فى كل تحضير ــ بواسطة مستحضر طلاء الاظافر •

حفـظ المـزارع الفطرية

MAINTENANCE OF FUNGAL CULTURES

يتطلب عزل الفطر وتنقيته والتعرف عليه ـ وخاصـة الى النوع ـ كثير من الوقت والجهد والخبرة ، وقد يستدعى ذلك أيضـا ارسـاله الى معاهد الفطريات المتخصصة بالخارج ممـا يستحق الاحتفاظ بمجمـوعة الفطريات المسماة لاغراض البحث والتدريس • وتوجد طرق عديدة لحفظ المزارع الفطرية تتباين فى طول فترة الحفظ وفى توفر الاجهـزة الـلازمة والملاءمة للانواع المختلفة من الفطريات ، وتتلخص تلك الطرق فيما يأتى :

١ ــ الحفظ فى أنابيب فى درجة حرارة الغرفة :

تلقح أنابيب الآجار المـائل بالفطـريات وتحفظ الانابيب فى دولاب خشبى أو معدنى ولكن من عيوب هذه الطريقة سرعة جفاف المزارع الفطرية مما يستدعى تجديدها باستمرار على فترات متقاربة •

٢ ــ الحفظ فى الثلاجة أو غرفة باردة (٥ــ٨°م) تشـبه الطـريقة السابقة وتستدعى تجديد المزارع الفطرية كل ثلاثة أو أربعة شهور •

٣ ــ الحفظ تحت زيت معدنى :

تغطى المزارع الفطرية النامية على آجار مائل فى أنابيب بزيت معدنى معقم (فى الفرن على درجة حرارة ١٥٠°م لمدة ٣ ساعات) • بعد أن يبرد الزيت يغطى سطح الاجار ويرتفع عنه بحوالى سنتيمتر • تغطى الانابيب بسدادات فلينية ثم بشمع البرافين • تتميز هذه الطريقة برخص تكاليفها وعدم تلوث المزارع بالحلم ولا تتطلب أجهزة مرتفعة التكاليف •

٤ ــ الحفظ فى التربة :

توضـع تربة فى أنابيب اختبـار الى نصـف حجمهـا ، وتعقم فى

الاوتوكلاف • يصب عليها معلق الجراثيم وتترك فى درجة حرارة الغـرفة لمـدة ٧ــ١٠ أيام ثم تحفظ فى الثلاجة لمدة طويلة دون تغيير فى حيويتها • تفيد هذه الطريقة فى حفظ مزارع فطر .Fusarium spp

٥ ــ الحفظ فى درجة حرارة تجمد منخفضة (ــ ٢٠°م) deep freeze وفى هذه الطريقة يمكن أن تعيش الفطريات مدة طويلة دون تلوث •

٦ ــ الحفظ بالتجفيد Freeze drying or Lyophilization

توضع المزارع الفطرية أو معلق الجراثيم فى أنابيب زجاجية صغيرة بها لبن خال من الدهن ، ويتم تجفيف المزارع أو معلق الجراثيم وهى فى حالة تجمد (ــ ٢٥°م) وذلك بسحب بخار المـاء تحت ضغط منخفـض • تصهر فوهة الانبوبة الزجاجية ليتم غلقها وتصبح بشكل أمبـولة وبذلك يستبعد احتمال أى تلوث • الجهاز المستخدم فى التجفيد معقـد وباهـظ التكاليف ولكن الفطريات التى تتحمل تلك المعاملة يمكنها أن تعيش لفترة تتراوح من ٥ــ١٠ سنوات • لا تستخدم هذه الطريقة فى حفظ فطـريات *Pythium* و *Phytophthora* حيث أنها لا تتحمل تلك المعاملة •

٧ ــ الحفظ باستخدام النتروجين السائل Liquid nitrogen

تحفظ المزارع الفطرية ومعـلقات الجـراثيم فى جلسرين ١٠٪ فى أمبولات زجاجية وتجمد تحت درجة حرارة منخفضـة كثيرا (ــ ٩٦°م) باستخدام النتروجين السائل ، والفطريات التى تتحمل تلك الدرجـة من التجمد يمكنها المعيشة حية لفترة غير محدودة • تتطلب هـذه الطـريقة استخدام جهاز معين مرتفع التكاليف ومصدر لامداد النتروجين السائل •

العـــدوى الصـــناعية

ARTIFICIAL INOCULATION

قد لا تكفى الاعراض الظاهرية للتعرف على المرض ، فلا يكفى وجود كائن ما مصاحبا للمرض للتأكد من كونه المسبب الاصلى للمرض فقد يكون كائنا رميا أو طفيلا ضعيفا ثانويا ، ولاثبات أن هـــذا الكائن هـــو المسبب الاصلى للمرض يجب تتبع فروض كـــوخ Kock's way of proof للتعرف على المرض المعدى وتتلخص فى الآتى :

١ ــ يجب أن تكون الاعراض مصحوبة دائما بوجود طفيل •

٢ ــ يجب عزل الطفيل فى مزرعة نقية على بيئة مغذية خالية من أى تلوث •

٣ ــ يستعمل الطفيل المعزول فى عدوى نباتات سليمة قابلة للاصابة ويلزم الحصول على نفس الاعراض السابقة •

٤ ــ يعاد عزل الطفيل من النباتات المعدية صـــناعيا ويجب أن يكون الطفيل المعزول ثانية مطابقا تماما للطفيل المعزول أولا •

وتتوقف الطرق المستخدمة فى عمل العدوى الصناعية على نوع الكائن الممرض والعائل المختبر وطريقة احداث العدوى وطبيعة المرض ، وتتلخص طرق العدوى فى الآتى :

١ ــ العدوى بواسطة التربة :

تستخدم هذه الطريقة فى حالة الامراض التى تنقل عن طريق التربة مثل موت البادرات والذبول ، وفى هذه الحالة يضاف الى التربة جـــزء من نمو الطفيل معلقا فى بيئة سائلة أو ماء بعد تقطيعه فى خلاط ثم زراعة العائل المراد اختبار قابليته للعدوى فى تلك التربة •

٢ ــ تلويث البذور :

تلوث البذور بمسحوق الجراثيم الجاف وتستخدم هذه الطريقة فى حالة أمراض التفحم المغطى فى القمح والشعير •

٣ ــ عدوى الاوراق والسيقان :

تلقح الاوراق بجراثيم الفطر بطريقة الرش أو الدهان بفرشاة أو تعفير جراثيم الفطر الجافة مثل جراثيم الصدأ ، أو بالحقن فى حالة الامراض البكتيرية الجهازية ، كما يستخدم خشب تسليك الاسنان tooth - pick بعد غمسها فى معلق من خلايا البكتيريا أو جراثيم الفطر وتوخز بها النباتات وتترك داخلها وتغطى النباتات المعاملة بأكياس من البولى ايثيلين لتوفير الرطوبة الكافية • وفى السوق الدرنية مثل البطاطس يعمل ثقب بواسطة ثاقب الفلين وينزع قطعة من النسيج النباتى ثم تلقح بجزء من مزرعة الفطر ويعاد الجزء المنزوع الى وضعه الاصلى •

٤ ــ عدوى الازهار :

تجرى هذه الطريقة فى حالة التفحم السائب فى القمح والشعير ومرض الارجوت حيث تعفر الازهار بجراثيم الفطر أو تحقن بها •

٥ ــ العدوى الميكانيكية :

يؤخذ عصير من أوراق نبات مصاب تظهر عليه الاعراض بوضوح ويرشح ويجفف ثم تعفر نباتات حديثة السن ذات أوراق نظيفة جافة بمسحوق الكاربوراندم ويحك السطح العلوى للاوراق بخفة بالعصير المستخلص من النباتات المصابة •

٦ ــ العــدوى بالتطعيم :

ينقل أى فيروس نباتى عن طريق التطعيم اذا كان هناك توافــق بين الاصل والطعم •

٧ ــ العدوى بواسطة النباتات الزهرية المتطفلة :

تنقل بعض الفيروسات النباتية من نباتات مصابة الى أخرى سليمة بواسطة الحامول وفيها تعدى النباتات المصابة بفيروس معين بواســطة خيوط نبات الحامول ، وبعد نمو الحامول جيدا تقطع جميع خيوط الحامول التى عليه ويستبقى فقط اثنين منها ثم نجعلها تلامس نباتات أخــرى من نفس النوع حديثة السن ، وبعد أن تصيب هذه الخيوط النباتات المعــدية (بعد ٢ــ٤ أيام) تزال أوراق النبات المعدية ، واذا نجحت العــدوى فان الاوراق الجديدة تظهر أعراض المرض •

٨ ــ العدوى بواسطة الحشرات :

يتم ذلك تحت ظروف محكمة ، ويكون ذلك باختيار النبات العــائل ونوع الحشرة والظروف البيئية ، وتختلف تلك الظروف تبعا لنوع الفيروس المراد نقله ، فتنتقل كثير من فيروسات أمراض التبرقش بواســطة حشرة المن ، وتنقل نطاطات الاوراق أمراض الميكوبلازما غالبا ، وينقل التربس والذباب الابيض والبق الدقيقى فيروسات أخرى • ويتم ذلك بواســطة الحشرات المختبرة فى أقفاص بها النبات العائل المريض ، وبعد فترة تغذية مناسبة للحشرات تنقل تلك الحشرات فى أقفاص أخرى بداخلها النباتات المراد اختبارها ثم تفحص هذه النباتات دوريا لمعرفة حدوث العدوى لها وبالتالى معرفة دور الحشرة الفعال فى نقل المرض •

كما تتطلب دراسة كثير من الامراض النباتية تحديد احتياجات كل منها من العوامل البيئية المختلفة كالحرارة والرطوبة والضـــوء حتى يمكن التعرف على الظروف البيئية التى توافق تكشف المرض أو الحد من انتشاره فى الطبيعة ، كما أن بعض مسببات الامـــراض الاجبارية التطفل لا يمكن تنميتها على النبات العائل القابل للاصابة بها والذى يعد فى هذه الحـــالة بمثابة بيئة طبيعية حية تستخدم فى تجهيز مزارع الطفيل التى تســـتلزمها الدراسة مثل الاصداء والبياض الدقيقى والامراض الفيروسية .

obeikandl.com