الفصل الرابع

تقنيات العزل والحصول على مزارع نقية

عزل الكائنات الحية الدقيقة :

تهدف هذه العملية إلى عزل المسبب المرضي ، والتعرف عليه والتأكد من أنه المسبب الفعلي للمرض النباتي

آ – عزل الكائنات الحية الدقيقة من التربة :

تعتبر معرفة الحمولة الميكروبية للتربة ضرورية قبل الزراعة، أو أثناء نمو النبات في حال ظهور أعراض مرضية.

ويفيد ذلك في انتقاء المحاصيل المراد زراعتها بحيث تكون مقاومة أو متحملة لبعض المسببات المرضية

و يراعى عند أخذ العينة مايلي:

١- طريقة أخذ العينة :

تؤخذ العينات من الطبقة السطحية للتربة من عمق ١٠-١٥ سم حيث تتميز هذه الطبقة بـ:

- الحمولة الميكروبية العالية، لتهويتها الجيدة وتوافر المادة العضوية
- وانتشار جذور النباتات الحولية فيها

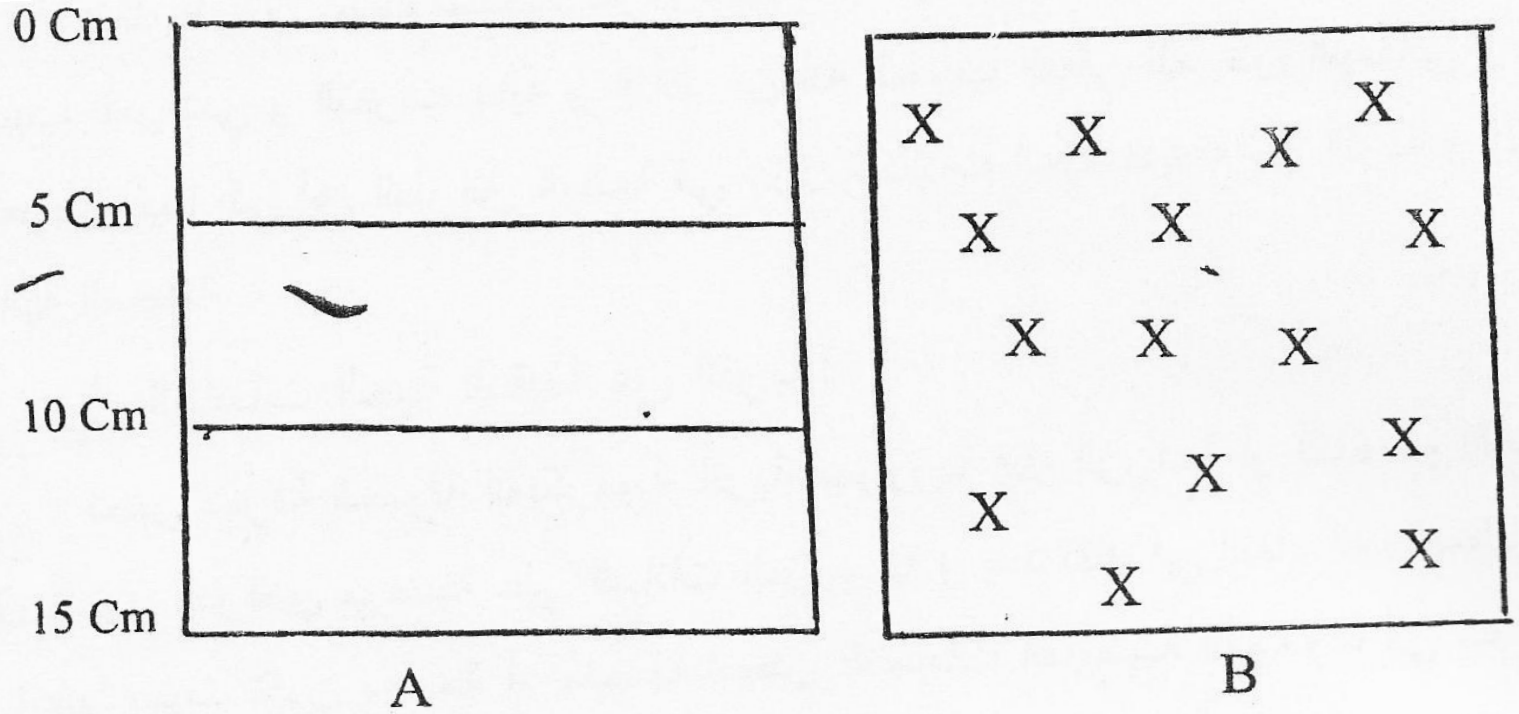
يستخدم عند أخذ العينة مجموعة من الأدوات مثل أنابيب اختبار معقمة ومرقمة ومغلفة بسدادات – مشرط أو سكين حاد لعمل المقاطع في التربة – مصباح كحولي.

٢- طريقة العمل :

- نعمل المقاطع في التربة على العمق المراد أخذ العينة منه.
- يؤخذ أنبوب اختبار معقم ويوضع بشكل عمودي على المقطع في العمق المطلوب ويضغط على التراب فيدخل جزء منه إلى الأنبوب،

يغلق الأنبوب بعد تعقيم فوهته باللهب بسدادة قطنية معقمة، ويسجل عليه كافة البيانات عن العمق والمنطقة ثم ينقل إلى المختبر.

- تؤخذ العينات بشكل عشوائي من عدة أماكن في الحقل مع مراعاة الابتعاد عن المناطق المشبوهة والملوثة مثل المواقع التي يوجد فيها شحم أو زيت
- في المختبر تجرى عملية العزل بطرائق متعددة .



الشكل رقم (٢) يبين A مقطع في التربة وأعماق أخذ العينات الترابية B الطريقة العشوائية لأخذ العينات الترابية في الحقل

ب- طرائق عزل الكائنات الحية الدقيقة من التربة:

١- طريقة المحاليل المخففة :

تعتمد هذه الطريقة على مبدأ تخفيف التركيز عدة مرات،

لتأمين العزل الجيد للكائنات الحية الدقيقة في التربة وتقديرها كمياً

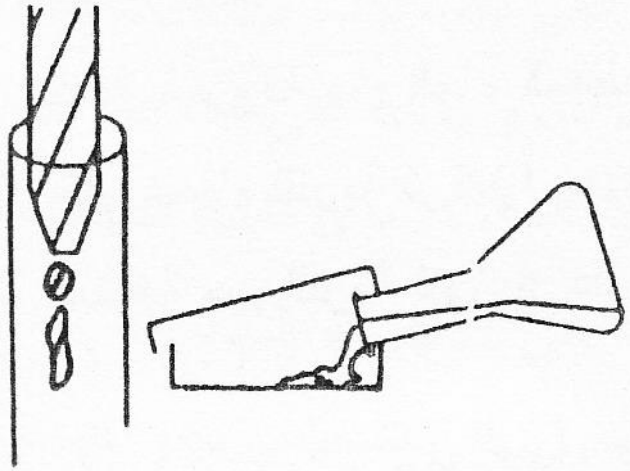
١ -١ – الأدوات اللازمة :

- هاون بورسلان معقم
- دورق زجاجي مخروطي سعة ٢٥٠ مل يحوي ٩٠ مل من الماء المقطر والمعقم رقم (١)
- دوارق مخروطية زجاجية سعة ٢٥٠ مل عدد /٧/ يحوي كل منها (٩٠) مل ماء مقطر ومعقم.
- دوارق مخروطية زجاجية سعة ٢٥٠ مل عدد (٨) يحوي كل منها (٩٠) مل مستنبت غذائي عضوي P.D.A.
- دوارق مخروطية زجاجية سعة ٢٥٠ مل عدد (٨) يحوي كل منها (٩٠) مل مستنبت معدني ،

إن تعدد المستنبتات الغذائية المستخدمة في العزل يهدف إلى تأمين وسط مناسب لأكبر عدد ممكن من الكائنات الحية الدقيقة الموجودة في التربة.

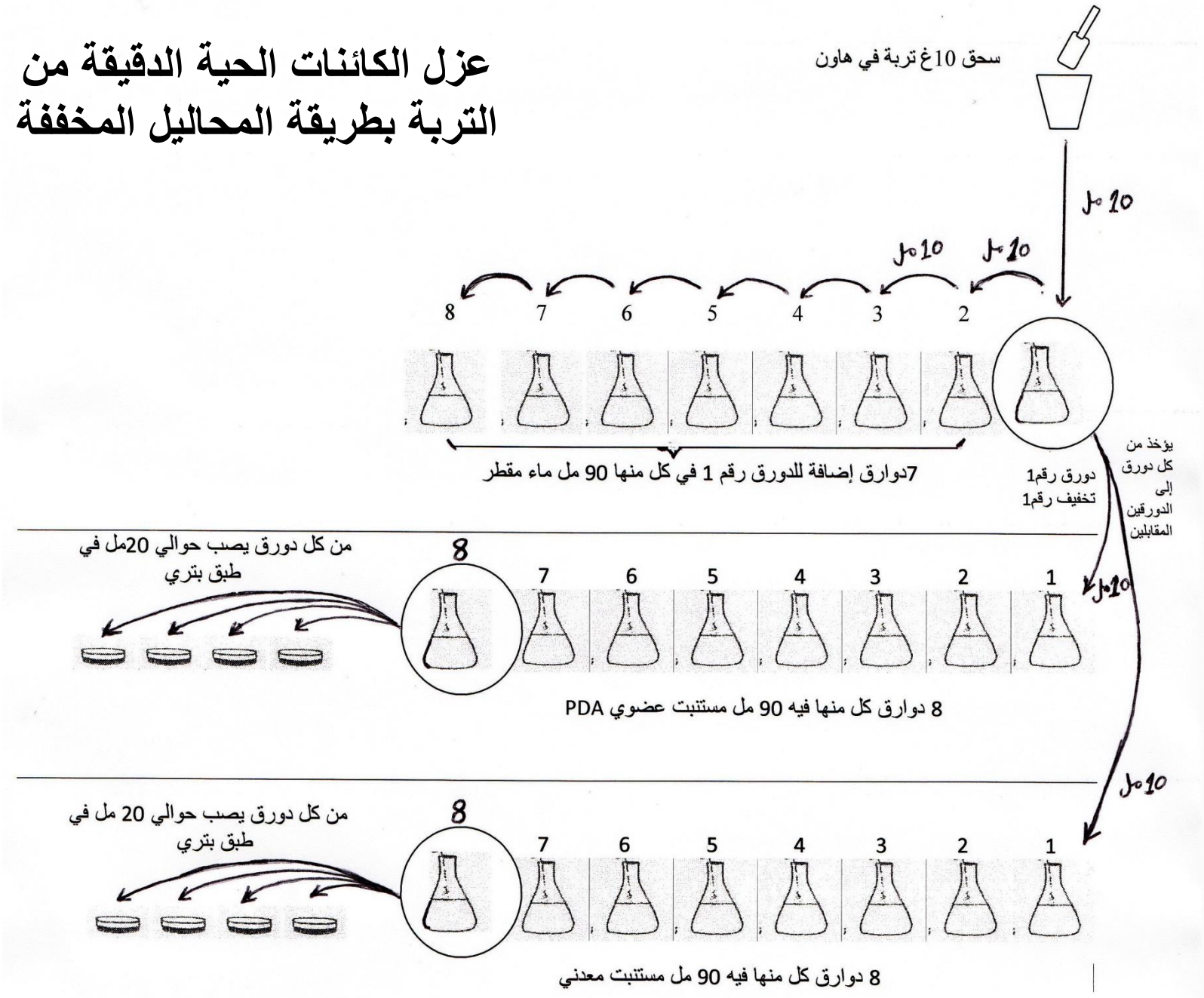
- أطباق بتري معقمة عدد (٤٠) أو أكثر بحيث يستخدم حوالي ست أطباق لكل تخفيف.
- أنابيب اختبار معقمة ويكون الصب بوساطة ماصة مباشرة إلى أسفل الأنبوب لمنع تلوث حواف الأنبوب العليا.
- ماصات معقمة مختلفة الأحجام.

- ١ – ٢- طريقة العمل :
- يؤخذ ١٠ غ تربة وتوضع في هاون معقم وتسحق العينة بلطف حتى لا تتخرب البنيات الخاصة بالفطر وخاصة الأجسام الحجرية ويضاف ماء مقطر من الدورق المخروطي الأول الحاوي على (٩٠) مل فنحصل على معلق نحركه بلطف ثم نصب المزيج في الدورق المخروطي رقم (١) فنحصل على التخفيف رقم (١).
- يرج المحلول رقم (١) لمدة ٣٠ دقيقة لفصل الكائنات الحية الدقيقة عن بقية التربة وجعله في المعلق. يؤخذ ١٠ مل من التخفيف رقم (١) ويضاف إلى الدورق رقم (٢) فنحصل على التخفيف رقم (٢) وتكرر عملية الرج لمدة ٣٠ دقيقة كما تكرر عملية النقل إلى الدوارق المخروطية الموجودة فنحصل على التخفيفات المطلوبة.
- من هذه التخفيفات يتم نقل ١٠ مل إلى كل من المستنبتات الغذائية العضوية والمستنبتات الغذائية المعدنية وذلك من كل تخفيف.
- بعدها يتم صب المستنبتات الغذائية المعلقة في أطباق بتري معقمة حيث يوضع في كل طبق حوالي العشرين مل ويتم الصب بهدوء لمنع تشكل فقاعات بعدها يوضع الطبق على سطح مستو ويحرك حركة رحوية لتوزيع المستنبت بشكل أفضل أو يتم الصب في أنابيب اختبار كما في الشكل رقم (٣).



الشكل رقم (٣) طريقة صب المستنبت الغذائي في كل من طبق بتري و أنبوب الاختبار (بتصرف عن فضول، العظمة).

عزل الكائنات الحية الدقيقة من التربة بطريقة المحاليل المخففة



- بعد ذلك يتم التحضين Incubation على درجة ٢٠-٢٢مئوية ،

وبعد أربع إلى خمسة أيام تفحص المستعمرات النامية وتعزل كل واحدة في أنبوب اختبار يحوي مستنبت غذائي.

- ويتم العزل من طرف المستعمرة بوساطة إبرة تلقيح ويكتب على أنبوب الاختبار كافة البيانات.

٢ – طريقة Johnson:

تعتمد هذه الطريقة على الغسيل المتكرر للتربة حيث يوضع وزن معلوم من التربة على منخل معدني ، وتغسل بكمية معروفة من الماء المقطر والمعقم ،

ويتم الغسيل حوالي ٤٠ مرة متتالية، حيث يمثل كل غسيل للتربة تركيزاً جديداً يستخدم جزء منه في الزراعة على وسط مغذٍّ،

أما الأجزاء المتبقية من التربة فتوزع على أطباق بتري معقمة ويصب عليها مستنبت غذائي مناسب.

٣– طريقة النباتات الصائدة :

تستخدم هذه الطريقة لعزل الكائنات المجبرة التطفل والضيقة التطفل والبطيئة النمو

حيث تزرع النباتات الحساسة في التربة المراد دراستها،

وعندما تصاب هذه النباتات بالمرض، يعزل منها المسبب المرضي مثال على ذلك:

يتم عزل الفطر المسبب لمرض الجذر الصولجاني على الصليبيات Plasmodiophora brassicaeبوساطة نبات الخردل الأبيض Sinapis alba

ويؤخذ على هذه الطريقة أنها تحتاج إلى فترة زمنية طويلة وتتأثر بالظروف الجوية ، ومدى قابلية النباتات للإصابة.

عزل الكائنات الحية الدقيقة من الأجزاء النباتية :

تهدف هذه العملية إلى الحصول على تشخيص دقيق للمسبب المرضي والتأكد من أن هذا المسبب المرضي هو المسؤول عن إحداث المرض

حيث يعزل على وسط غذائي مناسب

ب – طرائق عزل الكائنات الحية الدقيقة من الأجزاء الخضرية :

تتم عملية العزل بطريقتين مع تطهير و بدون تطهير وذلك تبعاً لمكان وجود المسبب المرضي:

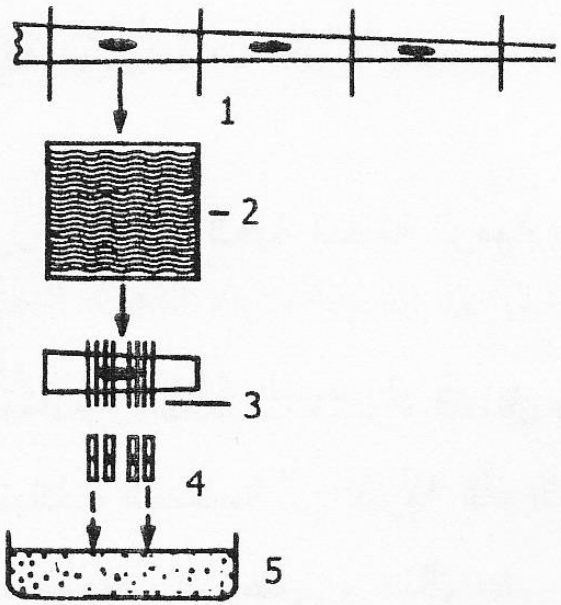
١- عزل الكائنات الحية الدقيقة بدون تطهير :

تستخدم هذه الطريقة بحالة الإصابة السطحية للتعرف على الكائنات الحية الدقيقة الموجودة على سطح النبات.

يؤخذ الجزء المصاب من النباتات سواء كان ورقة أو ساقاً على أن يحتوي على نسيج سليم ثم يغسل بالماء العادي ثم بالماء المقطر والمعقم

بعد ذلك يقطع الجزء النباتي المصاب إلى قطع صغيرة بوساطة مشرط أو مقص معقمين وتنقل هذه القطع وتوضع في أطباق بتري تحتوي وسطاً غذائياً مناسباً

بعدها تحضن على درجة ٢٠-٢٢ درجة مئوية



شكل رقم (٤) يبين طريقة عزل الكائنات الحية الدقيقة بدون تطهير. (بتصرف عن Spaar et al).

١- جزء نباتي مصاب ٢- الغسيل بالماء المقطر و المعقم ٣- تقطيع الجزء النباتي المصاب ٤- الزرع على مستنبت غذائي ٥- مستنبت غذائي

٢- عزل الكائنات الحية الدقيقة مع تطهير :

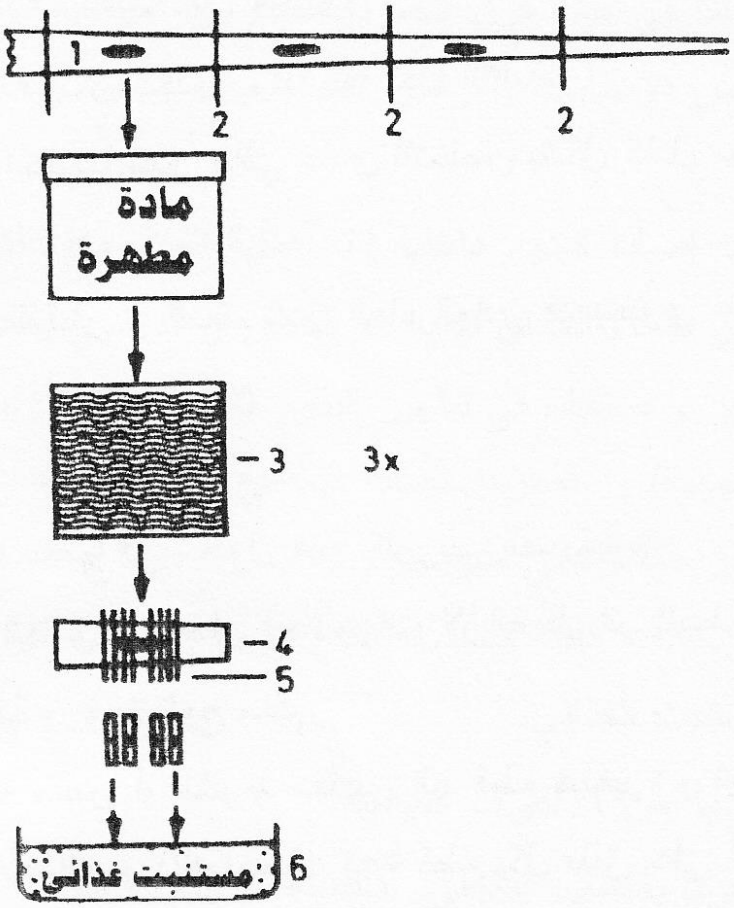
تستخدم هذه الطريقة عندما نرغب بالتخلص من الكائنات الحية الدقيقة الموجودة على سطح النبات، والتي تعيق التشخيص الدقيق للمسبب المرضي الحقيقي الموجود داخل النبات

ونلخص فيما يلي هذه الطريقة :

الغسيل بالماء الجاري – الغسيل بالماء المقطر المعقم – التطهير السطحي - الغسيل مرة أخرى بالماء المقطر والمعقم لعدة مرات للتخلص من كل أثر للمطهر–

تقطيع الجزء النباتي المصاب الحاوي على جزء سليم إلى قطع صغيرة بوساطة مشرط أو مقص معقمان – زرع هذه القطع على أطباق بتري تحوي مستنبت غذائي مناسب – التحضين على درجة حرارة بين

٢٠-٢٢درجة مئوية .



شكل رقم (٥) يبين طريقة عزل الكائنات الحية الدقيقة مع التطهير. (عن Spaar et al).

- جزء نباتي مصاب ٢- الغسيل بالماء المقطر و المعقم ثم التطهير ٣- الغسيل مرة أخرى بالمـــاءالمقطر و المعقم ٤- تقطيع الجزء النباتي المصاب ٥- الزرع على مستنبت غذائي ٦- مستنبت غذائي

وفيما يلي نبين أهم المحاليل المستخدمة في التطهير :

- محلول ثاني كلوريد الزئبق Hgcl٢ وهو محلول سام جداً يجب توخي الحذر عند استعماله في التطهير يستخدم بتركيز من ١ إلى ٠،٠٠٥ على ألا تتجاوز مدة التعقيم من دقائق لأن تجاوز هذه الفترة يؤدي إلى تجاوز هذه الفترة يؤدي إلى قتل المسببات الممرضة الموجودة داخل النبات (هذا المحلول منع استخدامه).
- محلول نترات الفضة AgNO٣وهو يستخدم بتركيز١/١٠٠٠.
- كحول يستخدم بتركيز ٧٠-٨٠% ويتم التطهير بواسطة قطعة قطنية مبللة بالكحول تمسح بها سطوح الأجزاء النباتية المصابة، لأن وضع النبات بالكامل أو لأجزاء منه في كحول يؤدي إلى قتل النبات والمسببات المرضية الموجودة فيه.

ج – عزل الكائنات الحية من الجذور :

- نغسل الجذور المراد فحصها بتيار مائي عادي للتخلص من الأتربة العالقة بها.
- تغسل الجذور بالماء المعقم والمقطر.
- تجفف الجذور بوساطة ورق ترشيح معقم.
- تطهر الجذور سطحياً بنقعها في محلول هيبو كلوريت الصوديوم.
- تغسل الجذور بالماء المقطر لعدة مرات لإزالة كل أثر للمطهر.
- تجفف الجذور بوساطة ورق ترشيح معقم.
- تقطع الجذور بوساطة مقص أو مشرط معقمين إلى قطع صغيرة وتوزع على أطباق بتري تحتوي مستنبت غذائي، وذلك بمعدل من ٣ إلى ٥ قطع بكل طبق، على أن تحتوي هذه القطع على نسيج مصاب وآخر سليم.
- تجري كافة العمليات في ظروف معقمة ضمن غرفة العزل وقرب اللهب.
- تحضن الأطباق على درجة ٢٢ درجة مئوية وبعد فترة التحضين تظهر نموات بعض الفطور على المستنبت الغذائي ومنها أنواع Fusarium, Rhizoctonia, Alternaria.

د – عزل الكائنات الحية الدقيقة من الثمار المتعفنة :

- تؤخذ قطع صغيرة من الجزر أوالبطاطا وتعقم بوساطة الأوتوكلاف وتوضع في أطباق بتري

يوضع عليها بوساطة حربة أو إبرة تلقيح معقمة جزء من النسيج الثمري المتعفن ثم تحضن

فتنمو الكائنات الحية الدقيقة على هذه الأجزاء النباتية.

في حالة الرغبة في الحصول فقط على الفطور، نلجأ إلى معاملة هذه القطع النباتية ببعض المضادات الحيوية كالتتراسكلين أو البنسلين أو الستروبتومايسين

وفي حال استخدام المستنبتات الغذائية يمكن التحكم بذلك عن طريق رفع درجة الحموضة بإضافة قطرات من حمض اللبن ليصبح الوسط حامضياً.

ه – عزل الكائنات الحية الدقيقة من البذور :

- قد تكون البذور ملوثة سطحياً أو داخلياً

فعند الإصابة السطحية، لا تطهر البذور وإنما يتم وضع وزن معلوم من البذور في حوجلة، ويضاف إليها كمية معلومة من الماء المقطر والمعقم وترج للحصول على معلق،

يؤخذ مقدار معين من هذا المعلق ويزرع على مستنبت غذائي مناسب ثم يتم التحضين على درجة ٢٢ درجة مئوية.

- أما في حالة كون الحمولة الميكروبية مرتفعة نلجأ إلى إجراء عملية تخفيف.
- كما تفحص الإصابات بأمراض التفحم مباشرة بالمجهر (من المعلق السابق) كون المسببات المرضية إجبارية التطفل (لا تنمو على مستنبت غذائي).

أما إذا كانت إصابة البذور داخلية تتم عملية العزل وفق التالي :

تغسل البذور بالماء العادي ثم بالماء المقطر ثم يتم معاملة البذور بمحلول مطهر، ثم تغسل بالماء العادي ثم بالماء المقطر.

بعد انتهاء عملية التطهير والغسيل تزرع البذور مباشرة في طبق بتري، ولتسهيل خروج الفطر يتم فتح البذور ذوات الفلقتين،

أما البذور وحيدات الفلقة كحبوب القمح فتوضع بحيث يكون الشق الطولي للحبة ملامساً لسطح المستنبت الغذائي.

و – عزل البكتيريا من الأجزاء النباتية :

- تتميز البكتيريا بالتطفل الداخلي لذلك تغسل العينات النباتية المصابة بالماء المقطر ،

وتهرس أو تطحن حتى تخرج البكتيريا مع العصارة النباتية،

- ثم يؤخذ جزء من العصارة بوساطة إبرة تلقيح معقمة، و تزرع في طبق بتري يحوي مستنبت غذائي بطريقة التخطيط أو التشطيب على سطح المستنبت ، ثم التحضين على درجة ٣٠- ٣٢ درجة مئوية.

شكل رقم (٦) يبين عزل البكتيريا بطريقة التخطيط على سطح المستنبت

ز – عزل الفطور من الأجسام الحجرية :

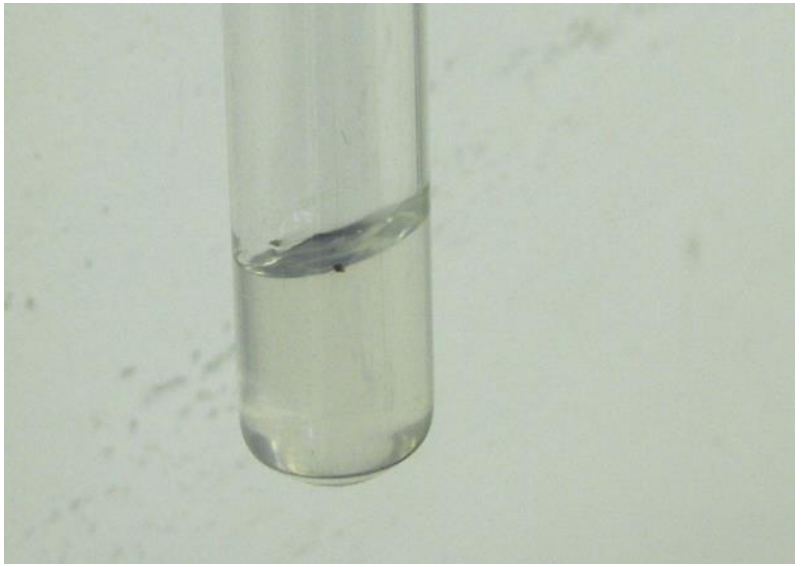
- يعزل الفطر من الجسم الحجري عن طريق شق الجسم الحجري بعد تطهيره ، وأخذ جزء من الميسيليوم الداخلي بوساطة إبرة تلقيح معقمة، وزرعها على مستنبت غذائي في طبق بتري معقم ثم تحضن على درجة ٢٠-٢٢ درجة مئوية.

ثانياً – طرائق عزل الكائنات الحية الدقيقة إجبارية التطفل :

١ – طريقة مورل (زراعة الأنسجة) :

يعتمد مبدأ هذه الطريقة على أنه يمكن الحصول على نبات كامل اعتباراً من خلية نباتية واحدة

وأنه من الممكن الحصول على نبات كامل من زراعة القمة النامية للنبات.



تستخدم هذه الطريقة في إنتاج نباتات خالية من الفيروسات حيث أن الميريستيم القمي خال عادة من الفيروسات.

كما تستخدم أنسجة نباتية حية لتنمية الكائنات الدقيقة إجبارية التطفل.

٢ – طريقة إجراء العدوى الاصطناعية على النباتات الحساسة :

توضع النباتات الحساسة في المختبر والبيت الزجاجي المجهز بوسائل خاصة للتهوية والتبريد والتدفئة ووسائل إنارة....

- تستخدم هذه الطريقة بشكل واسع في دراسة الأمراض الفيروسية كما تستخدم لعزل الفطور إجبارية التطفل مثل فطر البياض الدقيقي ،

وذلك بتنميتها على نبات مشابه للعائل الأصلي حيث تعدى النباتات الصغيرة بطور من ٢ إلى ٤ وريقات بالعامل الممرض،

وتنفذ هذه العملية بالنسبة لفطر البياض الدقيقي برش النباتات المراد إعداؤها بالماء بشكل جيد،

وبعد ذلك يتم هز نباتات مصابة فوقها وتوضع النباتات المعداة في البيت الزجاجي تحت رطوبة كافية وإنارة جيدة.

بعد ٨ إلى ١٠ أيام
تظهر الأعراض المرضية
على النباتات.

٣ – طريقة العزل على أوراق نباتية معزولة وموضوعة ضمن أوساط معينة :

تتميز هذه الأوساط بتركيب خاص يحوي عادة على بعض الهرمونات التي تساعد على بقاء الأجزاء النباتية حية لفترة من الزمن، تكفي لتنمية الكائنات الحية إجبارية التطفل، ومنها على سبيل المثال هرمون (الكينيتين Kinetine).

ثالثاً – الحصول على مزارع نقية :

إن عزل الكائنات الحية الدقيقة بالطرائق المذكورة سابقاً لا يعني أنه تم الحصول على مستعمرات نقية للمسبب المرضي،

فقد تختلط المستعمرات مع بعضها البعض أو تتلوث .

وتتم تنقية مستعمرات الفطور و الحصول على مستعمرات نقية بإحدى الطريقتين التاليتين :

مستعمرات نقية

مستعمرات مختلطة

أ – طريقة التخفيف :

تحضر ثلاث أنابيب اختبار معقمة تحتوي مستنبت نباتي رائق تعقم وتترك لتبرد وتصل درجة حرارتها إلى ٥٠ درجة مئوية ونحافظ عليها ثابتة ليبقى المستنبت سائلاً

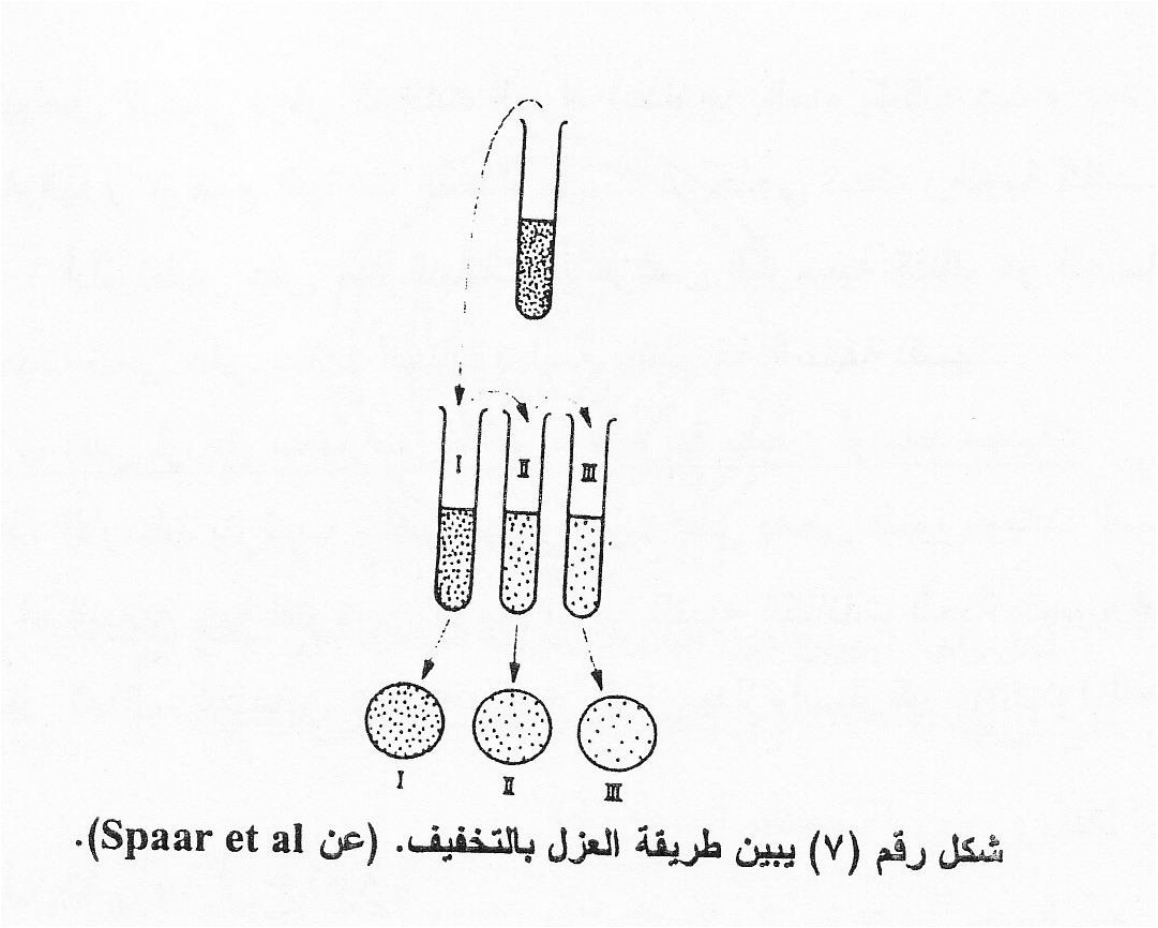
ثم يتم تحضير معلق من الأبواغ المراد عزلها بصورة نقية في ماء مقطر ومعقم ترقم الأنابيب السابقة من ١ – ٣

وتحضر ثلاثة أطباق بتري معقمة فارغة وترقم أيضاً من ١ – ٣

تتم عملية تلقيح الأنبوب الأول بنقل نقطة من المعلق إليه ويرج جيداً ، ثم ينقل نقطة منه إلى الأنبوب الثاني وتتم عملية الرج

ويتبعها نقل نقطة من الأنبوب الثاني إلى الأنبوب الثالث الذي يرج جيداً

بعد ذلك تصب الأنابيب الثلاثة كلٌّ في الطبق البتري الموافق له في الرقم ثم تترك ليتصلب المستنبت ويحضن بعدها على درجة الحرارة المناسبة



شكل رقم (٧) يبين طريقة العزل بالتخفيف. (عن Spaar et al).

بعد التحضين يمكن ملاحظة المستعمرات منفردة في الطبق الثاني أو الثالث
تعلم أوضح المستعمرات وتفصل مع قطعة من الآغار التي تحملها وتنقل إلى أنبوب اختبار أو طبق بتري جديد يحوي مستنبت غذائي ثم يحضن
فنحصل بعد التحضين على مزرعة فطرية نقية.

ب – طريقة طرف الهيفا :

تستخدم هذه الطريقة عند تعذر استخدام الطريقة الأولى حيث يتم تحديد طرف هيفا فطرية بوساطة العدسة الشيئية الصغرى للمجهر أو المكبرة (الباينيكولار)،

ثم يغرس طرف أنبوبة شعرية معقمة في المستنبت الصلب حول الهيفا وينقل إلى وسط غذائي في طبق بتري آخر بالنفخ في الطرف الثاني للأنبوبة الشعرية.