

كشف العوامل الممرضة للنبات

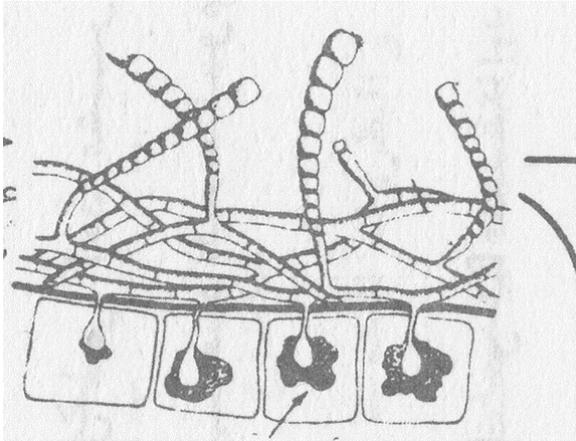
• طرائق أخذ العينات للفحص المجهرى:

• تهدف عملية الفحص المجهرى إلى تحديد المسبب المرضي وتسميته، لوضع خطة لمكافحته .

• للتعرف على العامل الممرض مجهرياً لأبد من إعداد محضر مناسب ينجز بعدة طرائق،
تعتمد على طبيعة الكائن الحي الدقيق، وطريقة تطفله على النبات .

١-الكشط :

يتم فيها الحصول على بنيات الفطر دون المساس بالنسيج النباتي، حيث يتكشف الفطر على الأجزاء السطحية للنبات ويكون واضحاً للعين المجردة، كما هو الحال عند الفطور المسببة للأمراض البياض الدقيقي والتفحم والصدأ.

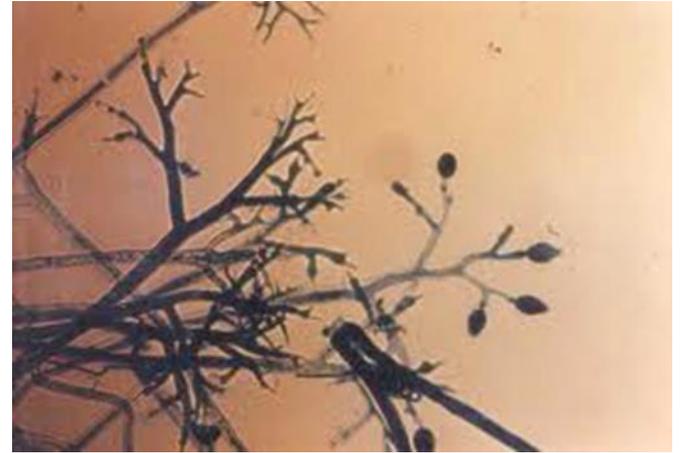
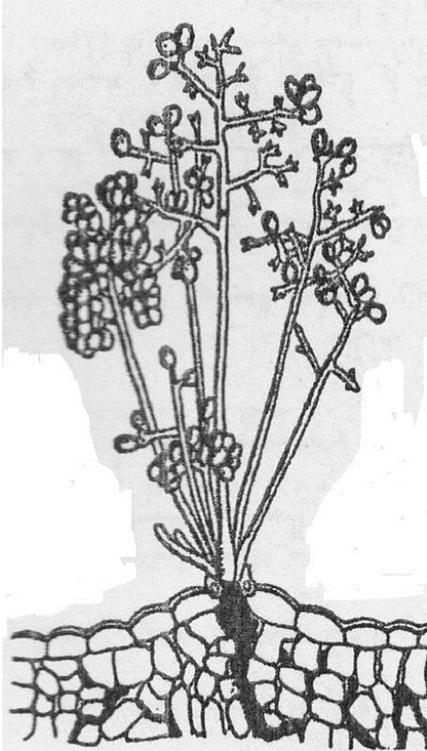


- تجرى عملية تحضير المحضر باستعمال طرف إبرة أو مشرط معقم، تؤخذ بوساطته أجزاء من العامل الممرض وتوضع في نقطة من اللاكتوفينول + أزرق القطن الموجود على شريحة زجاجية نظيفة ثم يغطى المحضر بساترة ويفحص مجهرياً.



- السلخ :

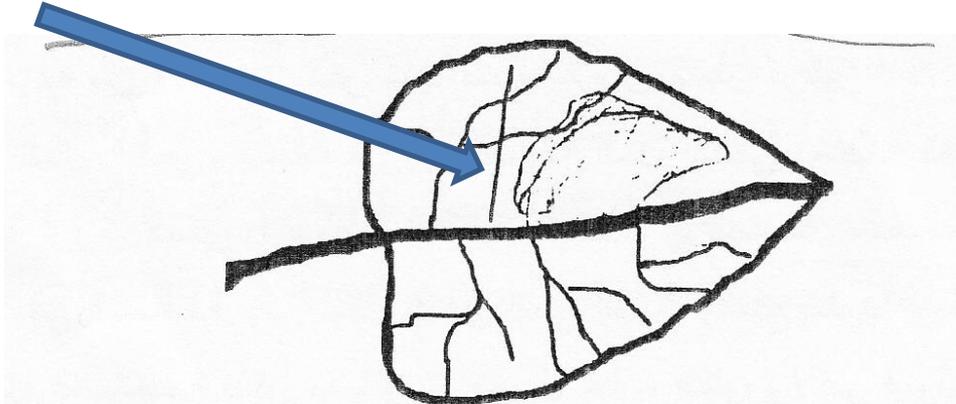
- تستخدم هذه الطريقة لدراسة الفطور المتطفلة داخلياً على النبات والتي ترسل ممصاتها في خلايا البشرة للنبات المصاب وتطلق حواملها البوغية عبر الثغور التنفسية كما هو الحال عند فطور البياض الزغبي .



تجري عملية السلخ بإجراء شق بسيط قرب مكان الإصابة بوساطة شفرة حادة أو مشرط ، ويمسك طرف البشرة عند حافة الشق بملقط وتسحب البشرة باتجاه مكان وجود نموات العامل الممرض.

- بعدها يوضع السلخ في صبغة اللاكتوفينول + أزرق القطن الموجودة على شريحة زجاجية وتغلى بساترة وتفحص مجهرياً.

مكان إجراء الشق بالشفرة



شكل رقم (٨) يبين طريقة عمل سلخ في ورقة نباتية مصابة

٣- المقاطع :

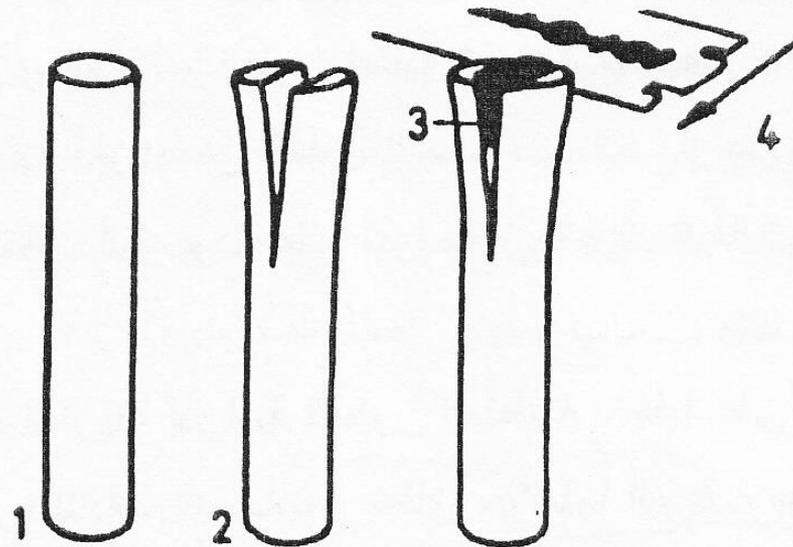
تستخدم هذه الطريقة عندما تكون الإصابة داخلية، أي عندما يتغلغل الفطر داخل أنسجة النبات العائل، ويتم التعرف من خلالها على طريقة تغلغل الفطر بين الخلايا أو ضمنها، وطريقة نشر ممرضاته وأشكالها المختلفة.

ويتم عمل المقاطع بطريقتين:
الطريقة اليدوية والطريقة الآلية.

الطريقة اليدوية لعمل المقاطع :

وفيها يغسل الجزء النباتي بالماء العادي ثم تعمل به المقاطع بوساطة شفرة حادة مزدوجة .

فنحصل على مقاطع رقيقة، وكلما كانت المقاطع دقيقة كانت المحضرات أفضل، وأحياناً نستخدم نخاع البيلسان أو الجزر (بعمق حوالي ١ سم) وتوضع ضمنه العينة النباتية وتعمل فيها مقاطع.



شكل رقم (١) يبين طريقة عمل مقطع في جزء نباتي غص بوساطة نخاع البيلسان. (عن Mühle et al).

نختار من هذه المقاطع أفضلها ونفحصها بالمجهر بعد تلوينها.
ويستخدم في تلوين المحضرات الفطرية مجموعة من الأصبغة
منها صبغة أزرق القطن بتركيز ١% .

- صبغة الفوكسين الحامضي + الخل الثلجي.
- صبغة اللاكتوفينول + أزرق القطن،
- صبغة أزرق القطن + حمض اللاكتيك.

- وتحوي الصبغة المستخدمة عادة على سائل تحميل يساعد في
المحافظة على شكل الكائن الحي الدقيق ومنع تخريبه وهناك
العديد من سوائل التحميل المستخدمة نذكر منها :

- الكلور لاكتوفينول، حمض اللاكتيك، الجيلاتين والغليسرين.

-

فيما يلي تركيب وطريقة تحضير صبغة أزرق القطن + اللاكتوفينول كونها الصبغة الأسهل تحضيراً والأكثر استخداماً في صبغ الفطور.

أولاً

– تركيب صبغة اللاكتوفينول + أزرق القطن:

١- اللاكتوفينول ويتكون من :

- الفينول (حمض الكربوليك) وهو مادة سامة وخطرة جداً يضاف بمعدل ٢٠%
- حمض اللبن أو حمض اللاكتيك ويضاف بمعدل ٢٠%
- غليسرين يضاف بمعدل ٤٠%
- ماء مقطر يضاف بمعدل ٢٠%.

• ٢ – أزرق القطن وهو أزرق الأنيلين الحامضي يستخدم بتركيز ٠,٥% أي نصف غرام لكل ١٠٠ غ وإن أردنا تحضير نصف الكمية السابقة نضيف ٢٥٠ ملغ لكل ٥٠ غ.

ثانياً – طريقة تحضير الصبغة : يؤخذ كأس زجاجي نظيف ومعقم ويوضع على الميزان بعد ذلك يتم وزن ٤٠ غ غليسرين و ٢٠ غ حمض اللبن و ٢٠ غ ماء مقطر ثم يوضع الكأس الزجاجي جانباً ويتم وزن ٢٠ غ من بلورات الفينول على ورق ترشيح نظيف ثم تضاف هذه الكمية إلى الكأس الزجاجي السابق وتحرك بمحرك زجاجي حتى تمام الذوبان. بعدها يتم وزن نصف غرام من أزرق القطن وهي مادة ناعمة جداً وخفيفة تضاف إلى الكأس الزجاجي الحاوي على المحلول السابق وتحرك قليلاً حتى تتحل فنحصل على محلول بلون نيلي غامق وهو صبغة اللاكتوفينول + أزرق القطن التي تحفظ في قطارات خاصة يكتب عليها اسم الصبغة، تاريخ تركيبها.

الطريقة الآلية لعمل المقاطع:

- يستخدم في هذه الطريقة المقطاع الآلي أو اليدوي (الميكروتوم) الذي يسمح بالحصول على مقاطع رقيقة تتراوح سماكتها بين نصف إلى ستين ميكرون،
- مع العلم أن السماكة المطلوبة للمقاطع في علم أمراض النبات لدراسة الفطور تتراوح بين ٣٠ - ٤٠ ميكرون.
- يؤمن الميكروتوم الحصول على مقاطع رقيقة تسمح برؤية أجزاء الخلية بالكامل بما فيها الفيروس الموجود فيها، وذلك عند الفحص بالمجهر الإلكتروني.



• تبدأ هذه الطريقة بعملية التثبيت التي تؤمن قتل الأنسجة النباتية والمحافظة على حجمها وتركيبها الخلوي،

ثم يتبعها الغسيل بالماء

ثم الغمر في محاليل الأسيتون لنزع الماء

ثم الغمر بشمع البرافين

ثم عمل المقاطع

ثم تجرى عملية نزع وإزالة البرافين من المقاطع المحضرة

وبعدها التلوين والتحميل ويستخدم لهذا الغرض الملونات التالية:

١ - أحمر الكونغو - أخضر الميتيل حيث يتلون النسيج النباتي بالأخضر والأجزاء الفطرية بالأحمر البني.

٢ - أزرق الأنيلين - أحمر الروتينيوم حيث يتلون النسيج النباتي بالأحمر والنسيج الفطري بالأزرق



٤ - السحق أو التمزيق :

- تستخدم هذه الطريقة لدراسة البكتيريا كونها داخلية التطفل حيث يتم هرس الجزء النباتي المصاب بوساطة إبرتين أو بالحربة أو بالساترة إذا كان الجزء النباتي غصناً.



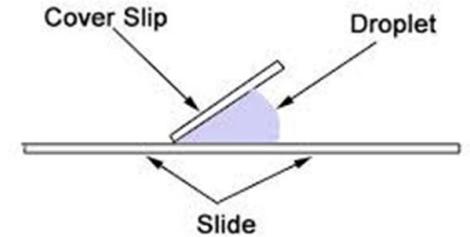
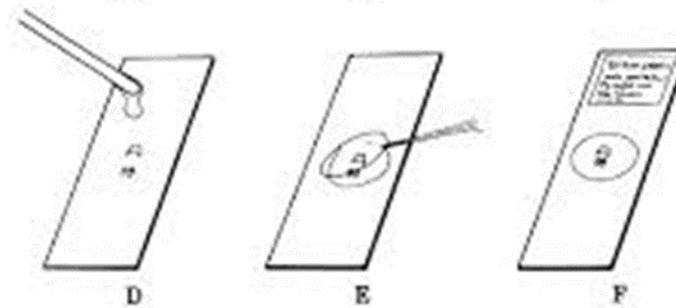
- ثم يوضع جزء من العصارة النباتية الناتجة عن هرس الجزء النباتي على شريحة زجاجية نظيفة بوساطة إبرة تلقيح معقمة ، ثم يصبغ بأحمر الفوكسن أو أزرق الميتيلين .
ويفحص بالمجهر بوساطة العدسة الزيتية الغاطسة .

- أما في حال كان الجزء النباتي صلباً فيتم نقهه بمادة مءاءات الصوديوم NaOH تركيز ٥% لمدة ٢٤ ساعة ثم يسحق ، كما يمكن غلي الجزء النباتي المصاب لبضع دقائق قبل إجراء عملية السحق .



- خطوات عمل المحضر المجهرى :

- يتم عمل المحضرات المجهرية لفحص الفطور على الشكل التالي :
- 1- توضع نقطة من صبغة اللاكتوفينول + أزرق القطن أو أي صبغة أخرى في وسط شريحة زجاجية نظيفة.
 - 2- يوضع الجزء الفطري أو المقطع المراد فحصه ضمن هذه النقطة.
 - 3- يغطي الجزء المفحوص بساترة زجاجية نظيفة بشكل يمنع تكون الفقاعات الهوائية حيث توضع حافة الساترة على طرف نقطة الصبغة ويمسك الطرف الثاني للساترة بوساطة إبرة أو حربة ثم تترك الساترة تدريجياً حتى تلامس الصبغة فيتم سحب الإبرة بحذر



خطوات عمل المحضر المجهرى

٤- تسخن الشريحة بهدوء للحصول على تلوين جيد للمحضر مع الحذر من عدم الوصول إلى درجة الغليان التي تؤدي إلى تخريب المحضر

٥- الفحص بالمجهر بوساطة العدسة الشيئية الصغرى $\times 4$ لتحديد مكان المحضر، ثم بوساطة العدسة الشيئية الكبرى $\times 40$ لتوضيح المحضر بشكل كامل.

وفي حال كان المحضر جيد وواضح يتم تثبيته على نار هادئة وحفظه باستخدام طلاء الأظافر الشفاف، وذلك بدهن حواف الساترة بشكل كامل دون تلوين المحضر.



الشرائح الجاهزة للفحص



طرائق حفظ المحضرات المجهرية:

تحفظ المحضرات المجهرية الجيدة للرجوع إليها عند الحاجة لمقارنتها مع محضرات عينات جديدة، والتعرف عليها بشكل دقيق ولاستعمالها كوسائل إيضاح في المختبر.

- طريقة جيلاطين الممزوج مع الغليسيرين:

يتركب المزيج من ٧ غ جيلاطين - ٤٢ سم^٣ ماء مقطر - ٥٠ سم^٣ غليسيرين - ١ غ فينول بللوري. ويمكن بوساطته حفظ المحضرات لفترة طويلة جداً وبحالة جيدة وتتم بوضع قليل من مزيج الجيلاتين مع الغليسيرين فوق المحضر على الشريحة الزجاجية وبعد ذلك يسخن المحضر بهدوء حتى يذوب الجيلاتين والغليسيرين بعدها توضع الساترة فوق المحضر ويترك حتى يبرد ومن ثم تطلّى أطراف الساترة بالسائل السيللوزي.

- طريقة الحفظ بريزين الفينيليك.

- طريقة الحفظ باللاكتوفينول حيث يدهن طرف الساترة بالسيليلوز السائل.

- طريقة الحفظ باستخدام طلاء الأظافر الشفاف التي تعتبر أبسط الطرق لحفظ المحضرات المجهرية وفيها تدهن أطراف الساترة بقليل من طلاء الأظافر الشفاف .

– دراسة الصفات المزرعية للمستعمرات الفطرية :

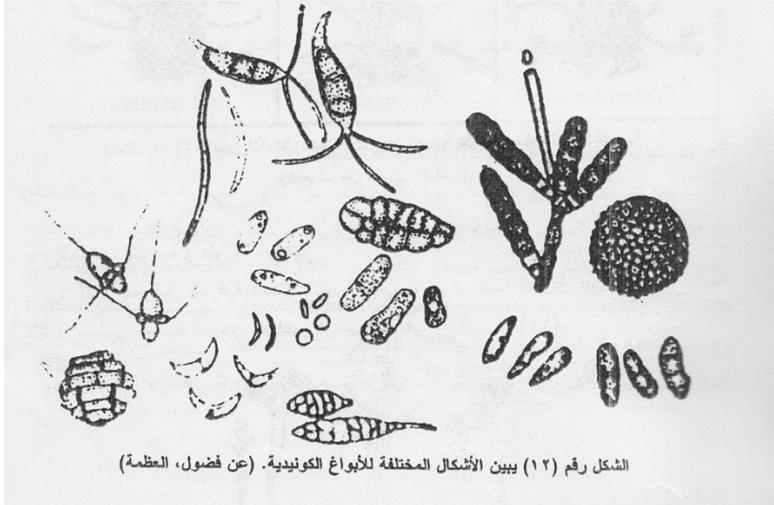
- تسبق هذه العملية عملية الفحص المجهرى، ويستفاد من الصفات العامة للمستعمرات الفطرية النامية على أوساط مغذية في تفريق وتعريف بعض الأجناس الفطرية مثل نوع *Aspergillus* و *Penicillium*.

- بعد تشكل المستعمرات تدرس من حيث الشكل واللون والمظهر العام للسطح السفلي والعلوي وشكل الحواف والقوام.

- وتستكمل هذه الدراسة بالفحص المجهرى للطور المعزولة عن المستنبتات الغذائية للتعرف ما إذا كانت هذه المستعمرات نقية أو مختلطة.



- كما يحدد شكل الأبواغ المكونة للفطور ولونها والتزيينات الموجودة عليها ، وشكل الهيفات ولونها ونوع الإثمارات الفطرية من وسائد فطرية، بكنيدات أجسام ثمرية.
- وتخدم هذه الدراسة بشكل عام في تصنيف الفطور المدروسة.
- تدرس الصفات المزرعية للمستعمرات البكتيرية بطريقة مشابهة لما سبق.



طرائق تقدير الإصابة الفطرية

- إن عملية تقدير الإصابة الفطرية في الحقل صعبة ويكون هناك احتمال كبير للوقوع بأخطاء تقديرية.
- أما الدراسة المخبرية فتكون أكثر دقة، حيث يمكن مثلاً قياس قطر النموات الفطرية على الأوساط المغذية بالميليمتر،
أو حساب الوزن الجاف للميسيليوم الفطري بالميلليغرام،
أو معرفة عدد الأبواغ الكونيدية في حجم معين من المحلول.
- وعند تقدير الإصابة الفطرية يجب التمييز في هذا المجال بين كل من شدة الإصابة وطبيعة الإصابة ونسبة الإصابة.

١ - تقدير شدة الإصابة :

تقدر شدة الإصابة بالعين المجردة في الحقل أو البيت الزجاجي بوضع درجات لشدة الإصابة تتراوح من ١ إلى ٩ حيث تعطى درجة ٩ للنباتات ذات الإصابة الشديدة جداً أو في حال موت النبات .

ودرجة ١ للنباتات التي لا تظهر عليها إصابات واضحة للعين المجردة

وتكون التقديرات غالباً محصورة في الأعداد ١-٣-٥-٧-٩ .

- مثلاً: بالنسبة لفطر البياض الدقيقي تعد بقع الإصابة على الأوراق الثلاث العليا، لأن هذا المرض يبدأ من الأسفل للأعلى.



- أما بالنسبة لتحديد شدة الإصابة بأمراض التفحم على النجيليات فيتم بعد النباتات المصابة في مساحة معينة في الحقل على سبيل المثال ١٠٠ متر مربع.



الجدول رقم (١) يبين طريقة تقدير شدة الإصابة بالبياض الدقيقي على النجيليات
بالاعتماد على النسبة المئوية للمساحة المغطاة بالإصابة وعدد البقع المصابة

درجات شدة الإصابة	النسبة المئوية للمساحة المصابة %	عدد البقع المصابة
١	٠	٠
٢	١	١-٣
٣	٣	٤-٨
٤	٦	٩-١٥
٥	١٠	١٦-٢٥
٦	٢٠	
٧	٣٣	
٨	٥٠	
٩	٧٠	

جدول لتقدير شدة مرض اللفحة المتأخرة على البطاطا

طبيعة الإصابة	النسبة المئوية لللفحة
المرض غير ملاحظ	٠,٠
نباتات قليلة ملفوحة وعدد التبقعات لا يزيد عن ١-٢ في مساحة (حوالي ١١ متر)	٠,١
حتى ١٠ تبقعات على النبات أو إصابة عامة خفيفة	١
حوالي ٥٠ بقعة على النبات، من ١-١٠ وريقات مصابة	٥
كل الوريقات مصابة تقريباً وشكل النبات يبقى طبيعياً ويمكن أن تصدر النباتات رائحة اللفحة، تبدو الحقول خضراء رغم إصابة كل النباتات	٢٥
كل النباتات مصابة وحوالي ٢٥% من مساحة الورقة مخربة تبدو الحقول خضراء مبرقشة بالبني	٥٠
حوالي ٧٥% من مساحة الورقة مخربة الحقول ليست بنية ولا خضراء	٧٥
بقاء أوراق قليلة على النباتات والسوق خضراء	٩٥
جميع الأوراق ميتة والسوق ميتة أو في طريقها للموت	١٠٠

٢-تقدير طبيعة الإصابة (رد فعل العائل النباتي)
يتم تقدير أشكال الإصابة في البيوت الزجاجية حصراً ،
حتى لا تؤثر الظروف الجوية على أعراض الإصابة.

تجري الدراسة على نباتات فتية بطور الورقتين إلى أربع
ورقات مزروعة ومعداة في البيت الزجاجي.

تستخدم هذه الطريقة لبيان مدى مقاومة النباتات لفطور الصدأ
والبياض الدقيقي

النموذج ٠	لا تبدي النباتات أي إصابة واضحة (نباتات منيعة)
النموذج ١	عالي المقاومة، اصفرار أو بقع ميتة، لا تتشكل الأبواغ (نباتات مقاومة)
النموذج ٢	مقاوم أو نصف مقاوم، اصفرار أو بقع ميتة، تتشكل الأبواغ بكميات قليلة (نباتات متحملة)
النموذج ٣	متوسط الحساسية، حساس، اصفرار، تتشكل الأبواغ بكميات متوسطة (نباتات متحملة)
النموذج ٤	عالي الحساسية، لا يوجد اصفرار، تتكون الأبواغ بكميات كبيرة جداً (نباتات حساسة)

٣- تقدير نسبة الإصابة (درجة انتشار المرض)

وتمثل عدد النباتات المصابة من أصل كامل النباتات وتحسب على الشكل التالي :

تردد المرض =Disease incidence

عدد النباتات المصابة / العدد الكلي للنباتات المدروسة × ١٠٠

The Fungi الفطور

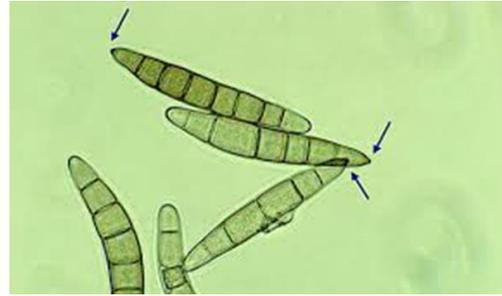
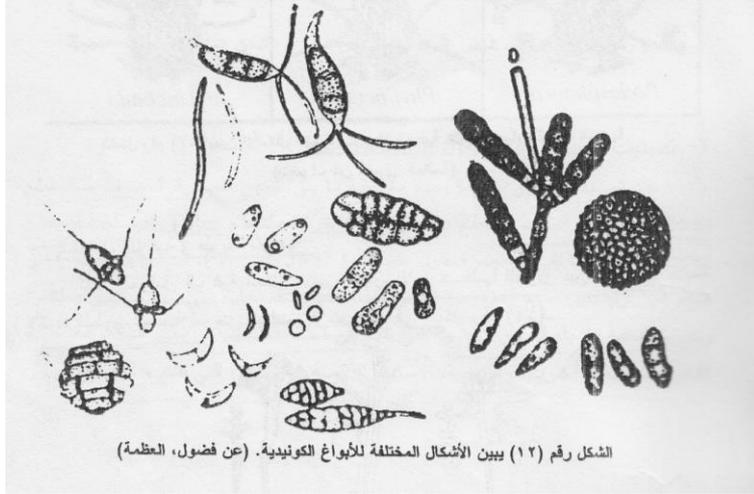
البنيات المعتمدة في تصنيف الفطور:

يعتمد في تصنيف الفطور على البنيات الفطرية *Fungal structures* التالية:

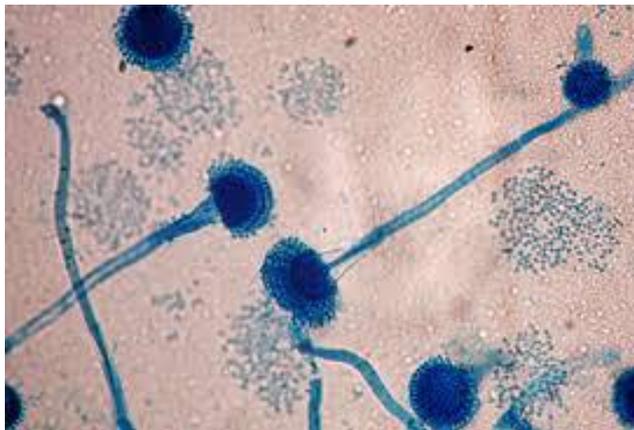
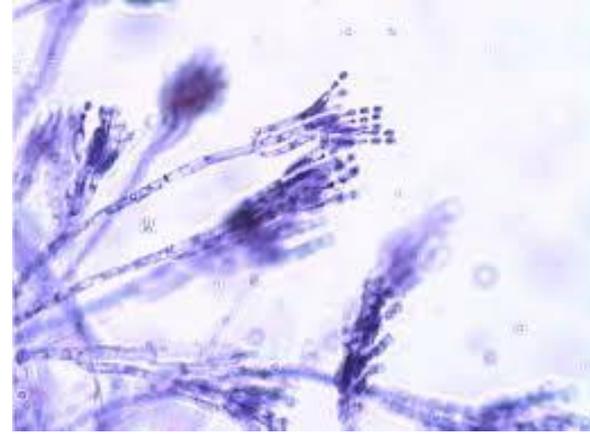
- أ- الأبواغ الفطرية.
- ب- الأجسام الثمرية و طريقة تفتحها.
- ج- الحوامل البوغية و طريقة تفرعها.
- د- التحورات الغريبة لبعض الفطور.

أ_ الأبواغ الفطرية:

و ذلك من حيث لونها، شكلها الخارجي (كروي، متطاوّل، منحني) وجود أو عدم وجود تقسيمات أو تزيينات على الأبواغ، أبعاد البوغة (طولها و عرضها)

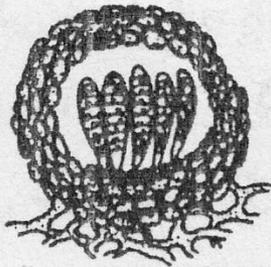


أشكال الأبواغ الفطرية

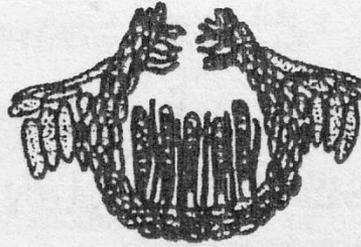


ب- الأجسام الثمرية و طريقة تفتحها:

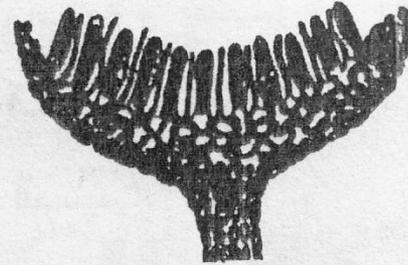
- للأجسام الثمرية التي تشكلها الفطور الأسكية أشكال متعددة، فمنها القرصي و الدورقي و الكروي.



a



b

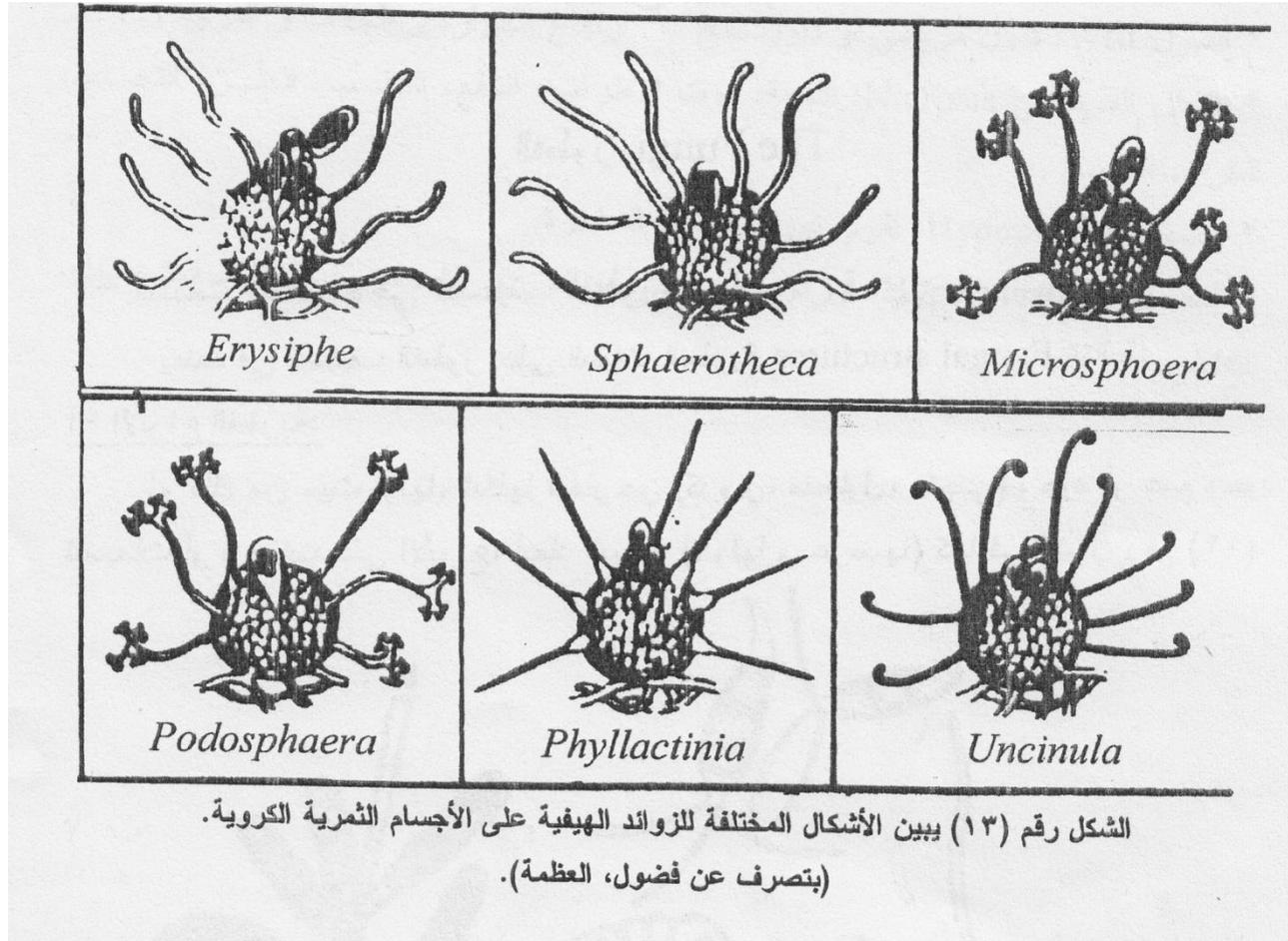


c

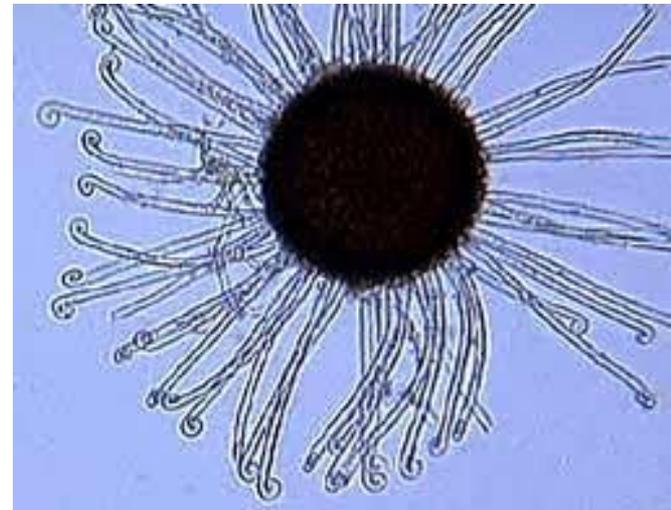
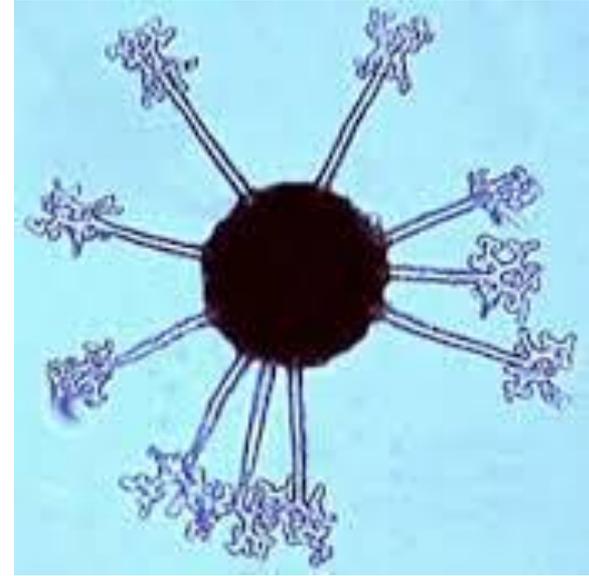
الشكل رقم (٢٨) يبين الأشكال المختلفة للأجسام الثمرية. (بتصرف عن أجريوس)

a : جسم ثمري كروي b : جسم ثمري دورقي c : جسم ثمري قرصي .

و بعض الأجسام الثمرية يحمل زوائد خاصة تساعد في التصنيف
و تستخدم للتفريق بين الأجناس الفطرية المسببة لمرض البياض الدقيقي.

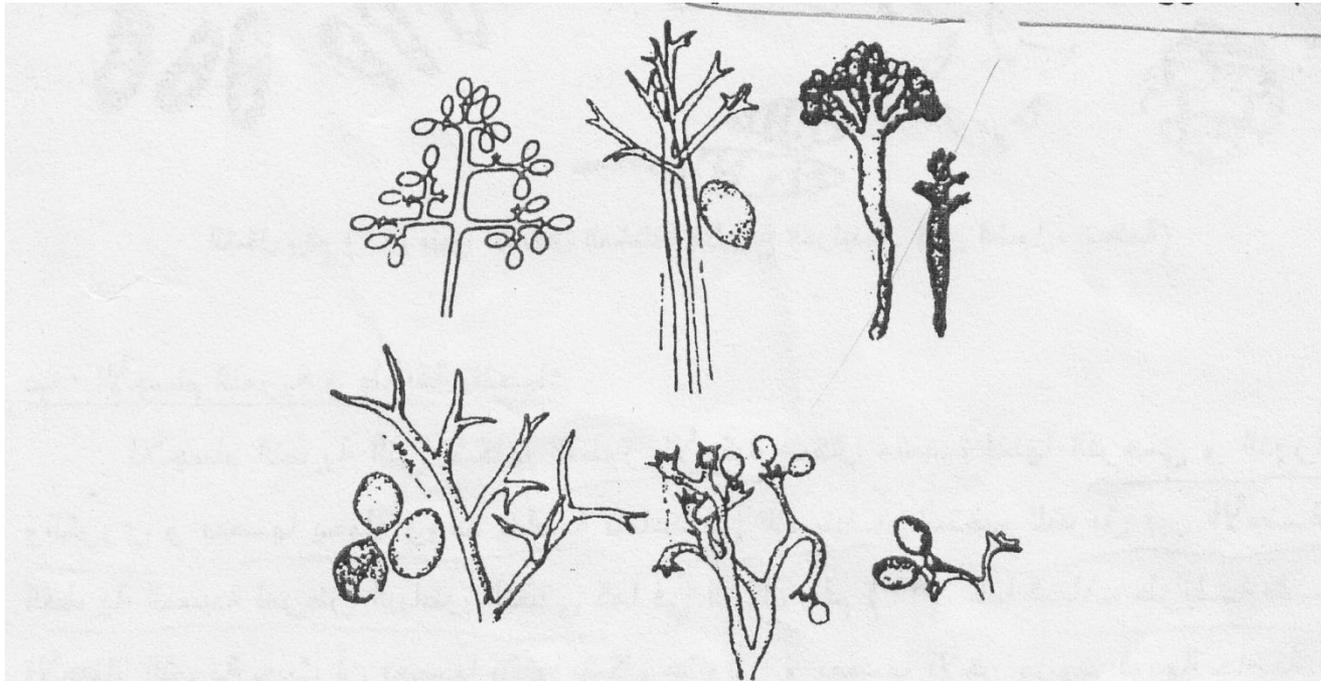


بعض أشكال الأجسام الثمرية الكروية



ج- الحوامل البوغية و طريقة تفرعها:

تأخذ الحوامل البوغية أشكالاً متميزة يمكن الاعتماد عليها للتفريق بين الأجناس التابعة لأشباه الفطور المسببة لمرض البياض الزغبي.



الشكل رقم (١٤) يبين الأشكال المختلفة للحوامل البوغية الخاصة بأشباه الفطور المسببة لمرض البياض الزغبي. (عن فضول، العظمة)

بعض أشكال الحوامل البوغية



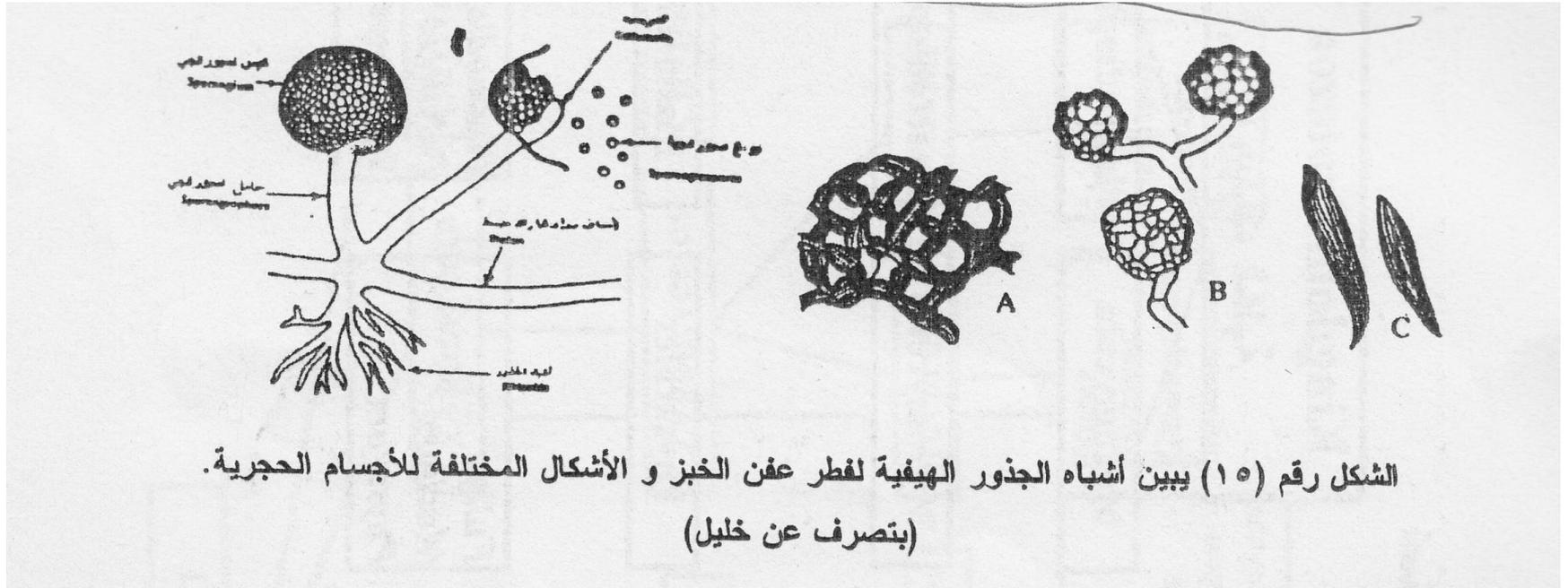
د- التحورات الغريبة لبعض الفطور:

تشكل بعض الفطور تشكلات خاصة يعتمد عليها في التصنيف،

كأشباه الجذور التي يشكلها عفن الخبز *Rhizopus*

و الأبواغ الكلاميدية التي يشكلها الفطر *Fusarium*

والأجسام الحجرية التي يشكلها الفطر *Verticillium*.



تصنيف الفطور:

تنتهي تسمية الصف بالمقطع mycetes

و تحت الصف بالمقطع mycetidae

و الرتبة بالمقطع ales

و الفصيلة بالمقطع .aceae