

## كشف العوامل الممرضة للنبات

### طرائق أخذ العينات للفحص المجهري:

تهدف عملية الفحص المجهري إلى تحديد المسبب المرضي وتسميته لوضع خطة لمكافحة والحد من انتشاره، وللتعرف على العامل الممرض مجهرياً لابد من إعداد محضر مناسب ينجز بعدة طرائق تعتمد على طبيعة الكائن الحي الدقيق وطريقة تطفله على النبات ونورد فيما يلي الطرائق المعتمدة في إعداد محضر مجهري:

#### 1- الكشط:

يتم فيها الحصول على بنيات الفطر دون المساس بالنسيج النباتي حيث يتكشف الفطر على الأجزاء السطحية للنبات ويكون واضحاً للعيان كما هو الحال عند الفطور المسببة للبياض الدقيقي والتفحم والصدأ. وتجرى عملية تحضير المحضر باستعمال طرف إبرة أو مشرط معقم تؤخذ بوساطته أجزاء من العامل الممرض الخارجي وتوضع في نقطة اللاكتوفينول + أزرق القطن الموجود على شريحة زجاجية نظيفة ثم يغطى المحضر بساترة ويفحص مجهرياً.

#### 2- 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 . وتجرى عملية السلخ بإجراء شق بسيط قرب مكان الإصابة بوساطة شفرة حادة أو مشرط حاد 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 نظيفة وتغطى بساترة نظيفة وتفحص مجهرياً.

#### 3- 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 ممصاته وأشكالها المختلفة ويتم عمل المقاطع بطريقتين:

#### 1- الطريقة اليدوية لعمل المقاطع:

يغسل الجزء النباتي بالماء العادي ثم تعمل به المقاطع بوساطة شفرة حادة مزدوجة تمرر على النسيج النباتي فنحصل على مقاطع رقيقة بين حدي الشفرة وكلما كانت المقاطع دقيقة كانت المحضرات أفضل، نختار من هذه المقاطع أفضلها ونفحصها بعد تلوينها مجهرياً ويستخدم في تلوين المحضرات الفطرية مجموعة من الأصبغة نذكر منها صبغة أزرق القطن بتركيز 1%. وتحوي الصبغة المستخدمة عادة على سائل تحميل يساعد في المحافظة على شكل الكائن الحي الدقيق ومنع تخربه وهناك العديد من سوائل التحميل المستخدمة 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:

1- اللاكتوفينول ويتكون من :

- الفينول (حمض الكربوليك) وهو مادة سامة وخطرة جداً يضاف بمعدل 20%.
- حمض اللبن أو حمض اللاكتيك ويضاف بمعدل 20%.
- غليسرين يضاف بمعدل 40%.
- ماء مقطر يضاف بمعدل 20%.

2 – أزرق القطن وهو الأزرق الأنيلين الحامضي يستخدم بتركيز 0.5% أي نصف غرام لكل 100 غ وإن أردنا تحضير نصف الكمية السابقة نضيف 250 ملغ لكل 50 غ.

ثانياً- طريقة تحضير الصبغة:

يؤخذ كأس زجاجي نظيف ومعقم ويوضع على الميزان بعد ذلك يتم وزن 40 غ غليسرين و20 غ حمض اللبن و20 غ ماء مقطر ثم يوضع الكأس الزجاجي جانباً ويتم وزن 20 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 قطرات خاصة يكتب عليها اسم الصبغة، تاريخ تركيبها.

2- الطريقة الآلية لعمل المقاطع:

يستخدم في هذه الطريقة المقطاع الآلي أو اليدوي (الميكروتوم) الذي يسمح بالحصول على مقاطع رقيقة تتراوح سماكتها بين نصف إلى سنتين ميكرون مع العلم أن السماكة المطلوبة للمقاطع في علم أمراض النبات لدراسة الفطور تتراوح بين 30 – 40 ميكرون، ويؤمن الميكروتوم الحصول على مقاطع رقيقة تسمح برؤية أجزاء الخلية بالكامل بما فيها الفيروس الموجود فيها وذلك عند الفحص بالمجهر الإلكتروني.

يؤخذ على هذه الطريقة أنها طويلة ومعقدة حيث تبدأ 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، يتبع هذه العملية عمل المقاطع ثم تجرى عملية نزع وإزالة البرافين من المقاطع المحضرة وبعدها التلوين والتحميل ويستخدم لهذا الغرض الملونات التالية:

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

2 - أزرق الأنيلين + أحمر الروتينيوم حيث يتلون النسيج النباتي بالأحمر والنسيج الفطري بالأزرق.

#### 4 - 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 تلقى معقمة، ثم يصبغ بأحمر الفوكسن أو أزرق الميتيلين ويفحص بالمجهر بوساطة العدسة الزيتية الغاطسة.

في حال كان الجزء النباتي صلباً فيتم نعه بمادة ماءات الصوديوم NaOH تركيز 5% لمدة 24 ساعة ثم يسحق كما ويمكن غلي الجزء النباتي المصاب لبضع دقائق قبل إجراء عملية السحق.

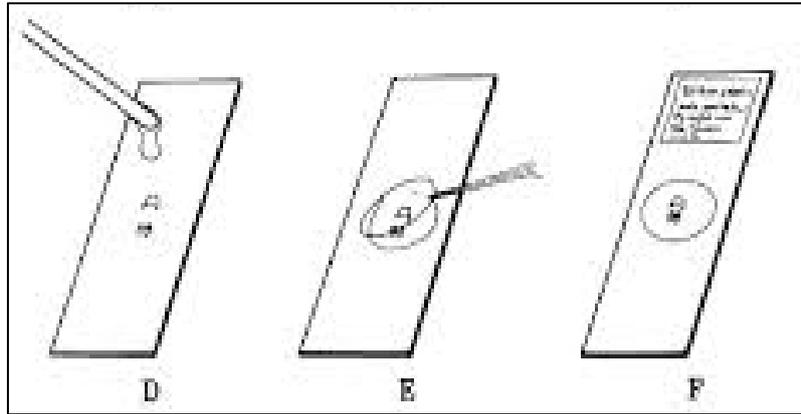
#### خطوات عمل المحضر المجهري:

يتم عمل المحضرات المجهرية لفحص الفطور على الشكل التالي :

1- توضع نقطة من صبغة اللاكتوفينول + أزرق القطن في وسط شريحة زجاجية نظيفة.

2- يوضع الجزء الفطري أو المقطع المراد فحصه ضمن هذه النقطة.

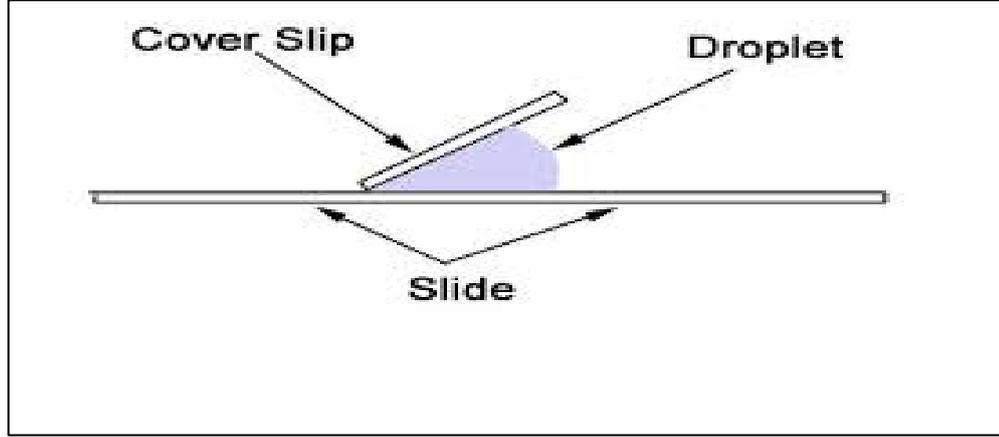
3- يغطي الجزء المفحوص بساترة زجاجية نظيفة بشكل يمنع تكون الفقاعات الهوائية حيث توضع حافة الساترة على طرف نقطة الصبغة ويمسك الطرف الثاني للساترة بوساطة إبرة أو حربة ثم تترك الساترة تدريجياً حتى تلامس الصبغة فيتم سحب الإبرة بحذر.



#### طريقة وضع الساترة الزجاجية بشكل مائل على المحضر

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

5- الفحص بالمجهر بوساطة العدسة الشيئية الصغرى لتحديد مكان المحضر، ثم بوساطة العدسة الشيئية الكبرى X40 وذلك 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 تلويث المحضر بعد إزالة الزائد من الصبغة.



### 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 جيلاتين الممزوج مع الغليسيرين:

يتركب المزيج من 7 غ جيلاتين - 42 سم<sup>3</sup> ماء مقطر - 50 سم<sup>3</sup> غليسيرين - 1 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 بالوسائل السيللوزي.

- طريقة الحفظ باستخدام طلاء الأظافر الشفاف التي تعتبر أبسط الطرق لحفظ المحضرات المجهرية وأكثرها استخداماً وفيها تدهن أطراف الساترة بقليل من طلاء الأظافر الشفاف وتترك جانبا لتجف تماماً.

### دراسة الصفات المزرعية للمستعمرات الفطرية:

تسبق هذه العملية عادة عملية الفحص المجهرى ويستفاد من الصفات العامة للمستعمرات الفطرية النامية على أوساط مغذية في تفريق وتعريف بعض الأجناس الفطرية مثل نوع *Penicillium* و *Aspergillus* وبعد تشكل المستعمرات تدرس من حيث الشكل واللون والمظهر العام للسطح السفلي والعلوي وشكل الحواف والقوام. تستكمل هذه الدراسة بالفحص المجهرى للفطور المعزولة عن المستنبتات الغذائية للتعرف ما إذا كانت هذه المستعمرات نقية أو مختلطة. كما يحدد شكل الأبواغ المكونة للفطور ولونها والتزيينات الموجودة عليها بالإضافة إلى معرفة نوعها وشكل الهيفات ولونها ونوع الإثمارة الفطرية من وسائد فطرية وأجسام ثمرية. تخدم هذه

الدراسة بشكل عام في تصنيف الفطور المدروسة كما تدرس الصفات المزرعية للمستعمرات البكتيرية بطريقة مشابهة لما ورد فيما سبق.

صورة تبين أشكال المستعمرات الفطرية حسب النوع الفطري



### المجهر الضوئي والدراسة المجهرية

لتحديد وتشخيص العامل الممرض بشكل نهائي وقاطع لابد من إجراء الفحص المجهرية، الذي يسمح بالتعرف على المسبب المرضي من خلال إظهار بنياته وإثماراته المختلفة المميزة وللوصول إلى نتيجة جيدة بالفحص المجهرية لابد أولاً من معرفة ودراية كافية في تحضير محضرات مجهرية جيدة وثانياً معرفة تامة بكيفية استخدام المجهر لإظهار المحضر.

### تركيب المجهر الضوئي:

يتألف المجهر الضوئي من عدة أجزاء أساسية وهي القاعدة والذراع وأنبوبة المجهر ولولب الإحكام الكبير ولولب الإحكام الدقيق والعدسات العينية وقد تكون واحدة أو اثنتين، العدسات الشيئية المتوضعة على قطعة دائرية وتسمى أنفية المجهر وتتحرك حركة دائرية، والعدسات الشيئية في الغالب أربع، مسرح المجهر ويكون مزوداً بملاقط خاصة لتثبيت المحضر وقد تكون متحركة أو ثابتة، مكثف، منبع ضوئي.



أنفية المجهر وتتحرك حركة دائرية:



### تعريف خاصة بالمجهر الضوئي :

- **التكبير:** هو حاصل جداء قوة تكبير العدسة العينية في قوة تكبير العدسة الشيئية وتتراوح قوة تكبير العدسات العينية المستخدمة في المجاهر العادية بين 6 – 15 مرة أما قوة تكبير العدسات الشيئية المستخدمة فتتراوح بين 4 – 100 مرة ويرمز عادة إلى قوة التكبير (Magnification) بالحرف X.

- **المسافة الفعالة:** هي المسافة المحصورة بين العدسة الشيئية والمحضر المجهرى وتتناسب هذه المسافة عكساً مع قوة تكبير العدسة الشيئية المستخدمة للفحص فكلما زادت قوة تكبير العدسة الشيئية كلما قلت المسافة الفعالة.

وهنا يجب الحذر عند استعمال العدسات الشيئية ذات التكبير الكبير، وتبلغ المسافة الفعالة:

7 مم عند استعمال العدسة الشيئية ذات قوة التكبير (10X.....)

1,5 مم عند استعمال العدسة الشيئية ذات قوة التكبير (40X.....)

1 مم عند استعمال العدسة الشيئية ذات قوة التكبير (60X.....)

وتكون العدسة الشبئية ذات التكبير X100 ملتصقة بالمحضر ولا بد من وضع مادة زيتية مناسبة ما بين العدسة والشريحة كزيت الأرز.

#### - توجيهات عامة حول استعمال المجهر:

يوضع المجهر في مكان محدد بحيث يستطيع الفاحص استخدامه بسهولة أثناء وضعية الجلوس و يحظر نقل المجهر أو تحريكه خاصة أثناء عمل الإضاءة، وعند الضرورة يجب نقله بصورة صحيحة وسليمة بحيث يمسك المجهر من الذراع باليد اليمنى وتوضع اليد اليسرى أسفله ويتم إطفاء الإضاءة في المجهر عند عدم الاستعمال المباشر، أي في حالة تحضير المحضر المجهرى لأن المصباح المستخدم ذو عمر محدد.

يترك المجهر نظيفاً بعد الاستعمال وذلك بمسح المجهر وعدساته بمواد منظفة خاصة مثل مادة الكزيلول ويغطى بغطائه الخاص، اطلب المساعدة فوراً من القائمين على المختبر عند حدوث أي عطل أو استعصاء في عمل المجهر وعدم محاولة إصلاحه.

#### خطوات استخدام المجهر :

- 1- ترفع أنبوبة المجهر بواسطة لولب الإحكام الكبير حتى تتمكن من وضع الشريحة على ساحة المجهر بسهولة .
- 2- تثبت الشريحة على ساحة المجهر بواسطة الملاقط الخاصة الثابتة أو المتحركة.
- 3- يتم تشغيل المجهر بكبس زر الإنارة كما يعدل المكثف والحجاب للحصول على أفضل إضاءة ممكنة.
- 4- يتم الفحص أولاً بالعدسة الشبئية الضعيفة  $4\times$  لتحديد موقع المحضر في ساحة الرؤيا.
- 5- تحرك أنفية المجهر للفحص بواسطة العدسة الشبئية الأكبر رقم  $40\times$  ولرؤية المحضر يجب تحريك أنبوبة المجهر رويداً رويداً إلى الأعلى بواسطة لولب الإحكام الكبير حتى رؤية المحضر عندها تتم عملية الإظهار بشكل جيد بواسطة تحريك لولب الإحكام الدقيق.
- 6- فحص المحضرات ورسمها وعند الانتهاء تنظيف المجهر والعدسات بعد إطفاء المجهر.

#### فحص المحضر تحت المجهر



### القياس المجهري:

تهدف عملية القياس المجهري إلى التعرف على أبعاد الأبواغ الفطرية وسماكة الميسيليوم وتستخدم هذه المعلومات للتعرف على الفطور وتصنيفها. ويسبق عملية القياس المجهري عادة عملية معايرة المجهر ويستخدم فيها عدسة عينية مدرجة وشريحة ميكرومترية خاصة.

### معايرة المجهر:

تهدف عملية معايرة المجهر إلى تحديد المسافة بين كل تدريجتين من الميكرومتر الموجود في العدسة العينية وتتم معايرة المجهر بوضع الميكرومتر العيني في العدسة العينية ووضع الشريحة الميكرومترية Micrometric على ساحة المجهر وثبيتها، ثم تتم عملية مطابقة تدريجات ميكرومتر العدسة العينية مع تدريجات الشريحة الميكرومترية المعروفة بالأبعاد، حيث تبلغ المسافة بين التدريجة والأخرى عليها 10 ميكرون.

تتم المعايرة على درجة تكبير معينة حيث يعمل على مطابقة صفر التدريجتين على بعضها البعض، بعدها تعد تدريجات العدسة العينية وتدرجات الشريحة الميكرومترية المتطابقة مع بعضها ونحصل على المسافة المحصورة بين كل تدريجتين لميكرومتر العدسة العينية بتقسيم حاصل جداء عدد تدريجات الشريحة الميكرومترية المطابقة لتدرجات العدسة العينية المدرجة بعشرة على عدد تدريجات العدسة العينية المطابقة، كما في المثال التالي:

- عدد التدريجات على الشريحة الميكرومترية 17 تدريجة بعد مطابقة صفر التدريجتين.

- عدد التدريجات على العدسة العينية المدرجة المطابقة 40 تدريجة.

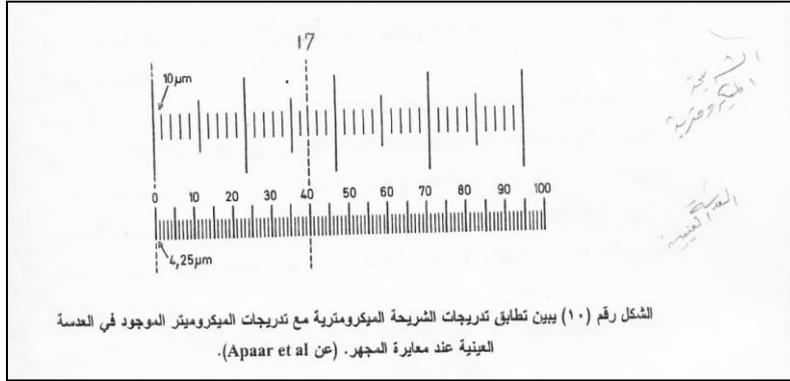
هذا يعني أن 40 تدريجة على العدسة العينية تطابق 17 تدريجة على الشريحة الميكرومترية كما في الشكل رقم (10)

ولما كانت المسافة بين التدريجة والأخرى على الشريحة الميكرومترية تساوي 10 ميكرون نعد إلى ضرب عدد التدريجات بعشرة فنحصل على الرقم 170 ميكرون وهي المسافة التي تطابق عدد تدريجات ميكرومتر العدسة العينية.

ولحساب المسافة بين التدريجة والأخرى على العدسة العينية المدرجة نقسم العدد 170 على 40 فتكون هذه المسافة 4,25 ميكرون.

ينبغي تكرار عملية المعايرة للمجهر عدة مرات وأخذ واعتماد المتوسط الحسابي.

كما يجب معايرة المجهر في كل مرة يراد فيها القياس، وعلى كل درجة تكبير مستخدمة، وتكون عملية المعايرة صالحة للمجهر الذي تتم معايرته وللباحث الذي قام بإجراء المعايرة.



### عملية القياس:

تجري عملية القياس بعد معايرة المجهر حيث ترفع الشريحة الميكرومترية ويوضع مكانها المحضر المراد فحصه وقياس أبعاده، وتنفذ عملية قياس أبعاد البنات الفطرية (أبواغ أو ميسيليوم) بوضع أول تدرجات ميكرومتر العدسة العينية المدرجة على أول البوغ، لقياس طوله، وتعد التدرجات المطابقة للبوغ من أوله حتى نهايته، ويضرب هذا العدد بقيمة المسافة بين كل تدرجتين لميكرومتر العدسة العينية فنحصل على طول البوغة بالميكرون.

بنفس الطريقة يمكننا قياس عرض البوغة وذلك بتعديل ميكرومتر العدسة العينية بما يتناسب مع وضع البوغة.

يتم قياس أبعاد عدد من الأبواغ للتعرف عليها بشكل دقيق، أما في حالة كون الأبواغ ذات أشكال خاصة كما هو الحال مثلاً عند الأبواغ الكونيدية لفطر *Fusarium* التي تأخذ شكلاً هلالياً فيعمد إلى إجراء القياس من القمة إلى القمة كما في الشكل رقم (11).

