كشف العوامل الممرضة للنبات

أولاً ـ طرائق أخذ العينات للفحص المجهري:

تهدف عملية الفحص المجهري إلى تحديد المسبب المرضي وتسميته لوضع خطة لمكافحته والحدّ من انتشاره.

تختلف طرائق أخذ العينات للفحص المجهري تبعاً لطبيعة المسبب المرضي وطريقة تطفله على النبات، **وهي:**

1- **الكشط:** كما في فطور البياض الدقيقي والتفحمات والأصداء التي تتكشف على الأجزاء السطحية للنبات. تجري عملية تحضير المحضّر بكشط أجزاء من **بُنى الفطر** بواسطة إبرة تلقيح أو حربة معقمتين، ووضعها في نقطة من صبغة اللاكتوفينول + أزرق القطن الموجودة على شريحة زجاجية نظيفة، ثم تغطى بساترة وتفحص مجهرياً.

2- **السلخ:** كما في فطور البياض الزغبي التي ترسل ممصاتها في خلايا بشرة النبات المصاب، تجري عملية تحضير المحضّر بإجراء شق قرب مكان الإصابة بواسطة شفرة أو مشرط معقمين، ثم يمسك طرف البشرة بملقط وتسلخ البشرة باتجاه مكان الإصابة، يوضع السلخ في نقطة من صبغة اللاكتوفينول + أزرق القطن الموجودة على شريحة زجاجية نظيفة، ثم يغطى بساترة ويفحص مجهرياً.

3- **المقاطع:** تستخدم عندما يتغلغل الفطر داخل أنسجة النبات المصاب، ويتم عمل المقاطع **بطريقتين:**

1- **الطريقة اليدوية:** يغسل الجزء النباتي المصاب، ثم تمرر شفرة حادة مزدوجة على النسيج النباتي، فيتم الحصول على مقاطع رقيقة، يوضع المقطع في نقطة من صبغة اللاكتوفينول + أزرق القطن الموجودة على شريحة زجاجية نظيفة، ثم يغطى بساترة ويفحص مجهرياً.

خطوات تحضير صبغة اللاكتوفينول + أزرق القطن: تحضير 100 مل من صبغة اللاكتوفينول + أزرق القطن: يوضع 20 مل ماء مقطر في كأس زجاجي + 20 مل حمض اللبن (حمض اللاكتيك) + 40 مل غليسرين، ويضاف 20 غ بلورات الفينول، يتم التحريك بمحرك زجاجي حتى تمام الذوبان، بعدها يضاف 0.05 غ من أزرق الأنيلين أو أزرق القطن، ثم التحريك جيداً، يفضّل الترشيح للتخلص من المواد غير الذائبة، ثم تحفظ الصبغة الناتجة في قطّارات داكنة (منعاً للتحلل الضوئي) مكتوب عليها اسمها وتاريخ تحضيرها.

2- **الطريقة الآلية:** يستخدم جهاز المقطاع الآلي (الميكروتوم) لعمل مقاطع غاية في الرقة تتراوح سماكتها بين 0.5 - 60 ميكرون. تتراوح السماكة المطلوبة لدراسة الفطور بين 30 - 40 ميكرون، حيث تبدأ بعملية التثبيت (قتل الأنسجة النباتية مع المحافظة على حجمها وتركيبها الخلوي)، ثم الغسيل بالماء، يلي ذلك الغمر بالأسيتون (لنزع الماء)، ثم الغمر بشمع البارافين، بعد ذلك عمل المقاطع، ثم إزالة الشمع من المقاطع المحضّرة، وأخيراً التلوين والتحميل. تستخدم **الملوّنات التالية:**

أحمر الكونغو + أخضر الميتيل: يتلون الجزء الفطري باللون الأحمر البني، أما النسيج النباتي باللون الأخضر.

أزرق الأنيلين + أحمر الروتينيوم: يتلون الجزء الفطري باللون الأزرق، أما النسيج النباتي باللون الأحمر.

4- **السحق أو التمزيق:** تستخدم لدراسة البكتيريا، يتم هرس الجزء النباتي المصاب **الغض**، ووضع جزء من العصارة النباتية الناتجة بواسطة إبرة تلقيح معقمة على شريحة زجاجية نظيفة، يتم الصبغ بأحمر الفوكسن أو أزرق الميتلين، ثم الفحص مجهرياً بواسطة العدسة الزيتية الغاطسة. أما إذا كان الجزء النباتي المصاب **قاسياً**: يتم نقعه بماءات الصوديوم تركيز 0.5 % لمدة 24 ساعة، ثم سحقه، كما يمكن الغلي لبضع دقائق قبل إجراء عملية السحق.

ثانياً- خطوات تحضير المحضّر المجهري لفحص الفطور:

- وضع نقطة من صبغة اللاكتوفينول + أزرق القطن في وسط شريحة زجاجية نظيفة.
- وضع الجزء الفطري المراد فحصه ضمن هذه النقطة.
- تغطّية الجزء المراد فحصه بساترة زجاجية نظيفة بشكل يمنع تكوّن الفقاعات الهوائية.
- تسخّين الشريحة على نار هادئة للحصول على تلوين جيد للمحضّر، مع عدم الوصول إلى درجة الغليان.
- الفحص بالمجهر بواسطة العدسة الشيئية 10× لتحديد مكان المحضّر، ثم بواسطة العدسة الشيئية 40× لتوضيح المحضّر.
- تثبيت المحضّر إذا كان جيداً على نار هادئة وحفظه بواسطة دهن حواف الساترة بطلاء الأظافر الشفاف بعد إزالة الزائد من الصبغة.

- **طرائق حفظ المحضّرات المجهرية:** تحفظ المحضّرات المجهرية لاستعمالها كوسائل إيضاح في المختبر، من أبسط **طرائق حفظها**: استخدام طلاء الأظافر الشفاف، كما تستخدم طريقة الجيلاتين الممزوج مع الغليسرين للحفظ لفترة طويلة بوضع القليل منه فوق المحضّر على الشريحة الزجاجية، ثم التسخين على نار هادئة حتى يذوب مزيج الجيلاتين والغليسرين، بعد ذلك توضع الساترة فوق المحضّر ويترك حتى يبرد، ثم تطلى حواف الساترة بسائل سيللوزي.

ثالثاً ـ دراسة الصفات العامة للمزارع الفطرية:
يستفاد من دراسة الصفات العامة للمزارع الفطرية النامية على مستنبتات غذائية من حيث (الشكل، اللون، شكل الحواف والقوام، والمظهر العام للسطح العلوي والسفلي) في تمييز وتعريف بعض الأجناس الفطرية كما في فطريّ Aspergillus, Penicillium، تستكمل هذه الدراسة بالفحص المجهري للفطور المعزولة عن المستنبتات الغذائية للتعرف فيما إذا كانت هذه المزارع نقية أو مختلطة، كما يتم من خلالها تحديد شكل الأبواغ ولونها والتزيينات الموجودة عليها، بالإضافة إلى معرفة شكل الهيفا ولونها ونوع الإثمارات الفطرية من وسائد هيفية وأجسام ثمرية.

رابعاً ـ تعاريف خاصة بالمجهر الضوئي:
ـ **التكبير:** هو حاصل جداء قوة تكبير العدسة العينية في قوة تكبير العدسة الشيئية.
ـ **المسافة الفعالة:** هي المسافة المحصورة بين العدسة الشيئية والمحضّر المجهري، وتتناسب عكساً مع قوة تكبير العدسة الشيئية المستخدمة للفحص، وتبلغ المسافة الفعالة: ـ **7** مم عند استعمال العدسة الشيئية ذات قوة التكبير 10×.
ـ 1.5 مم عند استعمال العدسة الشيئية ذات قوة التكبير 40×.
ـ 1 مم عند استعمال العدسة الشيئية ذات قوة التكبير 60×.
ـ تكون العدسة الشيئية ذات التكبير 100× ملتصقة بالمحضّر، ولا بدّ من وضع مادة زيتية مناسبة ما بين العدسة والشريحة كزيت الأرز.
ـ **معايرة المجهر:** تحديد المسافة بين كل تدريجتين من الميكرومتر الموجود في العدسة العينية، وتسبق عملية القياس المجهري.
ـ **القياس المجهري:** تهدف هذه العملية إلى التعرف على أبعاد الأبواغ الفطرية وسماكة الميسليوم.

طرائق تقدير الإصابة الفطرية

عند تقدير الإصابة الفطرية يجب التمييز بين كلّ من:
1ـ شدة الإصابة: تقدّر شدة الإصابة بالعين المجردة في الحقل أو البيت الزجاجي بوضع **درجات** تتراوح من 1 ـ 9، وتعطى الدرجة (1) للنباتات التي لا تظهر عليها إصابة واضحة للعيان، بينما تعطى الدرجة (9) للنباتات ذات الإصابة الشديدة جداً. يعتمد تحديد درجات الإصابة حسب نوع **النبات** المدروس ونوع **المرض** الذي يصيبه.
2ـ طبيعة الإصابة: يتم تقديرها في البيت الزجاجي حصراً، حتى لا تؤثر الظروف الجوية على أعراض الإصابة، تجري الدراسة على نباتات فتية مزروعة و معداة بطور (2 ـ 4) وريقات، وقد حدّدت النماذج التالية لتقدير مدى مقاومة النباتات للأمراض التي تسببها فطور البياض الدقيقي والأصداء:
ـ النموذج 0: نباتات منيعة: لا تبدي النباتات أعراض إصابة واضحة.
ـ النموذج 1: نباتات مقاومة (عالية المقاومة): اصفرار أو بقع ميتة، لا تتشكل أبواغ.
ـ النموذج 2: نباتات متحملة (مقاومة أو نصف مقاومة): اصفرار أو بقع ميتة، تتشكل الأبواغ بكميات قليلة.
ـ النموذج 3: نباتات متحملة (متوسطة الحساسية): اصفرار، تتشكل الأبواغ بكميات متوسطة.
ـ النموذج 4: نباتات حساسة: تتشكل الأبواغ بكميات كبيرة جداً.
3ـ نسبة الإصابة %: عدد النباتات المصابة ÷ العدد الكلي للنباتات المدروسة × 100

ـ بعض المفاهيم العلمية:
ـ **المرض النباتي Plant disease**: كل تغير أو تحوّل أو انحراف عن الحالة الطبيعية التي ينمو بها النبات.
ـ **الأعراض المرضية Disease symptoms**: هي التغيرات المرئية الواضحة التي تظهر على النبات نتيجة تعرضه لظروف غير متوافقة مع نموه الطبيعي.
ـ **علامات المرض Disease sings**: هي بُنى الفطر الجنسية أو اللاجنسية المتشكلة على أنسجة النبات العائل، والتي تظهر للعين المجردة، مثل الأبواغ والأجسام الحجرية والحوامل البوغية ... إلخ.

ـ من العوامل المسببة للأمراض النباتية:
ـ **طفيلية:** البكتريا، الفطور، الفيروسات، الفيروئيدات، النيماتودا، النباتات الزهرية المتطفلة كالهالوك والحامول، الأشنيات، الطحالب، وحيدات الخلية... إلخ.
ـ **لاطفيلية:** نقص أو زيادة العناصر، اضطرابات بيئية، تأثير المواد الكيماوية المستخدمة في المكافحة والتسميد ... إلخ.

- الأعراض الظاهريّة للأمراض النباتيّة:
تظهر حسب المسبب المرضي ونوع النبات المصاب، تكون إما على جزء من النبات: أعراض **موضعيّة** Local Symptoms، أو على كامل النباتات: أعراض **جهازيّة** Systemic Symptoms.

- تقسّم أعراض الأمراض النباتية حسب طبيعة ظهورها إلى عدة مجموعات رئيسية:

1 - تغير اللون Discoloration:
الاصفرار Yellowing، الشحوب اليخضوري Chlorosis، الاحمرار Reddening، الابيضاض Albinism، الموزاييك والتبرقش Mosaic and Mottling.

2 - الذبول Wilt.

3 - موت الخلايا والأنسجة (النكرزة) Necrosis:
اللفحة Blight، التبقع Spot، الذبول الطري Damping off، التقرح Canker، التثقب الخردقي Shot-hole، التصمغ Gummosis، العفن الطري Rot، الجرب Scab، القشب Russet.

4 - التشوه deformation:
التقزم Dwarfing، الأورام والتدرنات Tumors، الجذر الشعري Hairy root.

- تصنيف الفطور:
تصنّف اعتماداً على البُنى الفطرية التالية:
- **الأبواغ الفطرية:** من حيث: اللون، الشكل، وجود أو عدم وجود تزيينات عليها، الأبعاد.
- **الأجسام الثمرية Ascocarps وطريقة تفتحها:** وهي ثمار أسكية ناتجة عن التكاثر الجنسي في الفطريات الأسكية، لها ثلاثة أشكال: مغلق Cleistothecium، قاروري Perithecium، كأسي Apothecium.
- **الحوامل البوغية وطريقة تفرعها:** يمكن الاعتماد عليها في التفريق بين الأجناس التابعة لأشباه الفطور المسببة لمرض البياض الزغبي.
- **التحورات الغريبة لبعض الفطور:** تشكّل بعض الفطور تشكيلات خاصة يعتمد عليها في التصنيف مثل:
  - **الأبواغ الكلاميدية** Chlamydospores: جراثيم ساكنة، غير متحركة، جدارها سميك، تختزن بداخلها المواد الغذائية، لتجاوز الظروف غير المناسبة، وتنبت عند تحسن الظروف، يشكّلها **فطر** Fusarium**.**
  - **الأجسام الحجرية** Sclerotia: أجسام صلبة محكمة، تتكون نتيجة تجمع عدد من الهيفات، تمتلئ خلاياها بالمواد الغذائية، تساعد الفطر على تحمل الظروف غير المناسبة، وتنبت عند تحسنها، يشكّلها **فطر** Verticillium**.**
  - **أشباه الجذور** Rhizoids: هي تفرعات خيطية تشبه جذور النباتات، تتكون في قاعدة المشيجة أو في قاعدة الحامل البوغي، تتخصص في تثبيت المشيجة على الوسط وامتصاص الماء والعناصر المغذية، يشكّلها **فطر** Rhizopus.