

## طرق عزل الفطريات :

### تجربة (١) عزل مسببات الامراض من الاجزاء النباتية المصابه.

لاجل عزل الامراض النباتية من الاجزاء النباتية المصابه يجب ان تتوفر لدينا عينات من النباتات المصابه بامراض نباتيه وان تتوفر لدينا اوساط غذائيه مناسبه وكذلك مواد معقمه حيث نقوم بقطع بعض الانسجه المصابه بمساحه صغيره ولتكن ١ سم مربع على ان تشمل الجزء المصاب مع الجزء المجاور السليم بحيث لايتعدى ذلك المساحه المعلومه ثم نقوم بغسل هذه الاجزاء تحت ماء جار او معقم ولمرات عديده لازالة الاوساخ والاتربه العالقه بعد ذلك نقوم بتعقيمالاجزاء النباتيه تعقيما سطحيما قبل اجراء عملية العزل باستخدام احد المحاليل المعقمه الاتيه :

١- كلوريد الزنبيك ١%

٢- الفاست ٦%

٣- الفورمالين ٥%

٤- الكحول ٧٠%

٥- ماء الاوكسجين ٣%

٦- برممنكات البوتاسيوم ٢%

٧- ازوتات الصوديوم ١%

تغمر فيها الاجزاء المصابه لمدة معينه حسب المحلول والجزء المصاب ونوعية النبات ثم يجب بعد التعقيم غسل الاجزاء النباتيه بالماء المعقم المقطر عدة مرات للتخلص

تماما من اثار المواد المعقمه الذي سبق استعمالها للتعقيم . وتحت ظروف التعقيم تنقل الاجزاء التي تم تحضيرها على الوسط الزراعي الخاص بالكائن المراد عزله ثم تسجيل المعلومات اللازمه على الاطباق الحاويه على الاوساط الزراعيه ونقلها الى الحاضنه وحسب ظروف الكائن الحي المراد عزله ووضعها بصورة مقلوبه ولفتره زمنيّه مناسبه والمراقبه لحين ظهور النموات حيث يعزل الكائن ذو المواصفات المطلوبه وحسب الدراسه.

في بعض الاحيان لا يمكننا اجراء عملية التعقيم السطحي خاصة في العينات التي ينمو فيها المسبب المرضي سطحيًا ففي هذه الحالة تقطع الاجزاء المصابه بمشروط وتؤخذ منها قطع صغيره بملقط معقم وتوضع كل قطعه على وسط اكار الماء ويضاف الى الوسط كميّه قليله من حامض عضوي مثل حامض اللاكتيك او مادة الروز بنكال ٥ ملغم / لتر لمنع كائن معين من النمو دون اخر يراد انماؤه.

### تجربة (٢) عزل وتقدير فطريات التربه :

ان فطريات التربه تلعب دورا كبيرا في التوازن الاحيائي في التربه كما وان لها دور كبير في تفسخ وتحلل المواد العضويه اما الجزء الاله بالنسبه للمشتغلين بالامراض فهو الفطريات التي تسبب امراضا نباتيه مثل امراض موت البادرات والذبول وتعفن الجذور لهذا لا بد من دراسته هذه الفطريات وتقدير كثافتها العديده وتوزيعها وفيمايلي اهم الطرق لعزل الفطريات من التربه :

#### ١- عزل الفطريات من التربه بصوره مباشره :

يؤخذ قليل من التربه الزراعيه على راس المشروط المعقم يوضع في طبق يحتوي على وسط غذائي **P.D.A** ثم تترك الاطباق في الحاضنه وحسب الظرف الملائم والمدّه الملائمه لنمو الكائن المراد عزله وتراقب الاطباق الموضوعه بصوره مقلوبه لحين ظهور

النموات بعدها يؤخذ من المايسيليوم النامي على شريحه يوجد عليها قطره من صبغة الفطريات الخاصه اللاكتوفينول الزرقاء وتنقل تحت المجهر .

٢- عزل فطريات التربه باستخدام الاجزاء ( الطعوم ) النباتيه :

تؤخذ ثمار صلبه او خضراء ويعمل فيها ثقوب بعمق ١ سم بواسطة ثاقب الفلين وبعد وضع قليل من التربه في الثقب يغلق بشريط لاصق تحضن الثمار بعد وضعها باكياس البولي اثيلين المثقبه بالحاضنه تحت درجه حراره ووقت مناسبين وحسب الكائن تقطع الثقوب طوليا بحيث تظهر حافة نسيج الثمار والتي تحول لونها الى البني ثم ينقل جزء من النسيج المصاب بواسطة ابرة معقمه لزراعته على الوسط الغذائي للمده والظروف الملانمه وكما مر سابقا .

٣- عزل فطريات التربه بواسطة التراكيز المخففه :

تؤخذ عدة مكررات من عينات التربه وبصوره عشوائيه او تؤخذ عينات من الرايزوسفير لجذور النبات المراد دراسته ثم نتبع الخطوات التاليه :

١- تخلط عينات التربه جيدا ثم تقدر الرطوبة النسبيه فيها وتؤخذ عينه معلومه الوزن فيها بدقه تجفف على ١٠٥ منويه لمدة ٢٤ ساعه وتوزن مره اخرى ثم تجفف وتوزن مره ثالثه وحتى يثبت الوزن ثم نحسب الرطوبه النسبيه فيها لان تقدير الفطريات يحسب على اساس الوزن الجاف.

٢- عمل عدة تخفيف وبمكررات وحسب التجربه .

٣- تحضير الوسط الغذائي وليكن **P.D.A** مضاف له احد المضادات الحياتيه لمنع نمو البكتريا .

٤- اخذ ١ مل من كل تخفيف ويضاف اما فوق الوسط بنشره بواسطة قضيب زجاجي على شكل حرف **L** او يوضع في الطبق ويصب فوقه الوسط اللازم وبالمكررات المطلوبه وتحضن جميع الاطباق في الحاضنه بصورة مقلوبه بعد تعليمها بالمعلومات اللازمه. على الوقت والظروف المناسبه .

٥- تفحص الاطباق بعد المراقبه وانهاء مدة التحضين وتسجل المعلومات الاتيه:

١- عدد المستعمرات الفطريه مع الوصف المزرعي

٢- عمل شرائح للوصف المجهرى

٣- المقارنه بين الكائنات

يمكن معرفة عدد المستعمرات الفطريه من على الطبق وضرب العدد \*

مقلوب التخفيف للحصول على عدد الخلايا الفطريه في العينه الماخوذه اصلا وهي ١

غم من التربه ويمكن ايضا استخدام هذه الطريقه لتقدير العدد الكلي للبكتريا الموجوده

في ١ غم تربه على اساس الوزن الجاف بعد اختيار الوسط الغذائى اللازم

## عزل الفطريات Isolation of fungi

الغرض من التجربة:

عزل وعد وتشخيص الاعفان الموجوده في عينه التربه ودراسة صفاتها المظهرية وعمل شرائح وفحصها تحت المجهر .

المواد المستخدمة:

١. يستخدم الوسط ( Potato Dextrose Agar PDA أو Rose Bengal Media)

٢. أنابيب اختبار، ماء مقطر معقم ، محلول اللاكتوفينول ، أطباق زجاجية، سلايدات

زجاجية، أغطية الشريحة cover slip .

طريقة العمل:

١. تحضر التخافيف المطلوبه من نماذج التربه المختلفه لغاية التخفيف ١/١٠٥ وينقل

١.٠ مل من التخفيف المطلوب إلى طبق زجاجى معقم (ثلاث أطباق لكل تخفيف).

٢. يصب الوسط الغذائي المختار (وسط الروز بنكال Rose Bengal Media) أو (وسط أكار البطاطا دكستروز Potato Dextrose Agar PDA) ثم يمزج الوسط مع العينة مباشرة ويترك ليتصلب.

٣. احضن الأطباق في حاضنة عند درجة حرارة ٣٠°م مدة أسبوع وتلاحظ مستعمرات الاعفان النامية على الوسط (النمو خيطي، المستعمرات هشة وذات ذات حبيبات صبغية مختلفة منها البيضاء والخضراء والسوداء) وتقاس أقطار المستعمرات وتفحص نماذج من مستعمرات مختلفة تحت المجهر. وذلك بوضع قطره من محلول اللاكتوفينول (فينول وحامض اللاكتك وكليسيروول وماء مقطر) على شريحة زجاجية نظيفة ثم ينقل جزء من مستعمره العفن بواسطة إبرة التلقيح ويوزع هذا الجزء برفق على قطرة اللاكتوفينول ثم يوضع غطاء الشريحة على العينة ثم تفحص الشريحة وتسجل الملاحظات التالية:

- تشعبات خيوط العفن Hyphae.
- أشكال الكونيدات وحواملها Conidia & Conidiophore .
- أشكال حافظات الأبواغ وحواملها Sporangia & Sporangiphore.
- أشكال الأبواغ.
- رسم الأجناس المعزولة