طرائق الكشف عن الإصابة بفطريات المايكورايزا

١-تعريف المايكورايزا (Mycorrhiza) مصطلح لاتيني يتكون من مقطعين وهما (Mykes) ومعناه الفطر Fungus و (rhiza) ومعناه الجذر root ، ويعد العالم الألماني Frank أول من أطلق مصطلح المايكورايزا (فطر_ جذر) عام 1885 ، وذلك لوصف العلاقة التكافلية بين هذا النوع من الفطريات وجذور النباتات Harley (1978)، وهي علاقة مفيدة لها دور هام في تغذية النبات وتحسين امتصاص المغذيات الضرورية Mosse(1977) فتبدو بذلك النباتات المصابة بها بحالة أفضل من النباتات غير المصابة.

٢- اهميتها : أن التلقيح بفطريات المايكورايزا V A M يحسن نمو النبات عن طريق تشجيع تكوين نظام جذري فعال في امتصاص العناصر الغذائية الضرورية بطيئة الحركة ولا سيما الفسفور من مصادره غير الجاهزة للنبات ومقاومة الظروف غير الملائمة ومن ثم زيادة الحاصل للكثير من المحاصيل الاقتصادية ولاسيما المحاصيل النجيلية والبقولية ، ولا يمكن اكثارها بالاوساط الصناعية الا على جذور نبات نامي لانها اجبارية التطفل على النسيج الحي Obligate biotrophes.

٣-اقسامها : قسم Marx (1976) المايكورايزا إلى ثلاث مجاميع رئيسة اعتمادا على طبيعة اختراق الفطر لأنسجة جذور النبات العائل وتكوين التراكيب الداخلية والخارجية وهي :-

أ- المايكورايزا الخارجية Ectomycorrhiza :-

إن أنواع فطريات هذه المجموعة تتواجد طبيعيا على الجذور ، والعائل النباتي لها أشجار الغابات مثل أشجار الصنوبر Pine والبلوط Oak واليوكالبتوس Eucalyptus .

ب- المايكورايزا الداخلية Endomycorrhiza :-

يتميز هذا النوع من المايكورايزا بعدم تكوينها غلاف فطري خارجي حول الجذر بل تمتاز بتكوينها تراكيب داخل خلايا القشرة Intracellular .

ج- المايكورايزا الخارجية الداخلية Ectoendomycorrhiza :-

ويتميز هذا النوع من المايكورايزا بأنها تحمل صفات مشتركة للمايكورايزا الخارجية والداخلية إذ تكون غلاف فطري خارجي ضعيف التكوين ويخترق أنسجة قشرة الجذر الداخلية ويعد هذا النوع اقل انتشارا من الأنواع الأخرى وتتواجد في أشجار الغابات المصابة طبيعيا بالمايكورايزا الخارجية

١- تصبيغ الجذور بصبغة تريبان الزرقاء للكشف عن الاصابة بالمايكورايزا :-

وتتألف من المواد الآتية حسب طريقة Phillips و Hayman (1970)

- محلول صبغة تريبان الزرقاء Trypan blue :-

تستعمل للكشف عن التراكيب الفطرية مثل الهايفات والتراكيب الحويصلية Vesicular والشجيرية Arbuscular التي تعود إلى فطريات (VAM) الموجودة في جذور النباتات.

- محلول (F.A.A) Formaline Acetic Acid :-

يستعمل لحفظ نماذج الجذور لحين إجراء التصبيغ . إذ إن هذا المحلول يحافظ على التراكيب الفطرية دون أي تغيير مورفولوجي .

تصبيغ الجذور :-

طريقة Phillips و Hayman (1970) لتصبيغ الجذور وتجرى كما يأتي:-

1- توضع القطع الجذرية (طول القطعة الواحدة 1 سم) في أنبوبة اختبار

2- تغسل هذه القطع من بقايا الطين والأتربة العالقة بها .

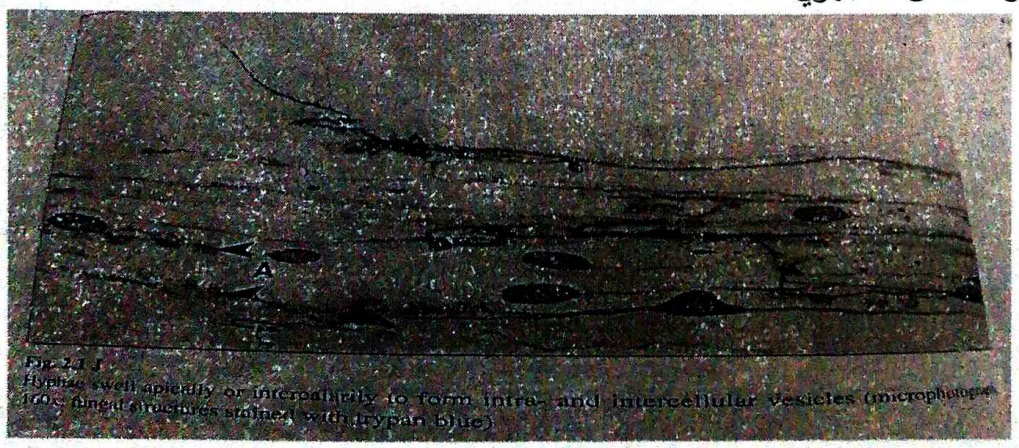
3- يضاف محلول هيدروكسيد البوتاسيوم تركيز 10 % (المحضر من إذابة 10 غرام هيدروكسيد البوتاسيوم KOH في 100 مل ماء مقطر) ثم توضع في الحمام المائي بدرجة حرارة 90 °م ولمدة 30 – 60 دقيقة .

4- تغسل القطع الجذرية بالماء الاعتيادي بعد استخراجها من الحمام المائي .

5- يضاف محلول حامض الهيدروكلوريك تركيز 10% (المحضر من إضافة 10 مل حامض الهيدروكلوريك HCl في 90 مل ماء مقطر) لمدة 2 – 3 دقائق .

6- يضاف محلول صبغة Trypan blue لأنبوبة الاختبار. ثم توضع في الحمام المائي بدرجة حرارة 90 °م ولمدة 15 – 20 دقيقة.

7- يضاف حامض اللاكتيك Lactic acid بعد استخراجها من الصبغة . وبذلك يصبح النموذج جاهزا للفحص المجهري .



٢ - عملية تصبيغ و فحص الجذور المصابة بفطريات المايكورايزا بطريقة تصبيغ الجذور بالصبغة الحمراء Acid fuchsin :-

أ- كيفية اعداد المحاليل :-

١- محلول F.A.A يستخدم لحفظ نماذج الجذور لحين اجراء عملية التصبيغ اذ يحافظ على التراكيب الفطرية دون اي تغيير مورفولوجي و يتركب من :-

- Formalin (١٣ مل)
- Acetic acid (٥ مل)
- Ethanol (٢٠٠ مل بتركيز ٥٠%)

٢- محلول H_2O_2 القاعدي :-

يضاف لقصر الجذور و يضاف بدون تسخين و يتركب من :-

- NH_4OH (٣ مل)
- H_2O_2 (٣٠ مل بتركيز ١٠ %)
- Water (٣٦٧ مل)

٣- محلول الصبغة Acid Fuchsin و يتركب من :-

- Lactic acid (٨٧٥ مل)
- Glycerine (٦٣ مل)
- Tap Water (٦٣ مل)
- Acid Fuchsin (٠.١ غم)

طريقة تصبيغ الجذور بالصبغة الحمراء Acid fuchsin وحسب طريقة (Kormanik ،واخرون ،١٩٨٠).

١- تجمع عينات الجذور ، و نختار الجذور الدقيقة و ليست الرئيسة ، تؤخذ عينات من (٤-٥) من مناطق الجذر .

٢- تغسل الجذور جيداً بالماء للتخلص من بقايا الطين و التراب .

٣- تحفظ الجذور في محلول F.A.A لمدة يومين و الذي هو عبارة عن (Formalin Aceto Alcohol)

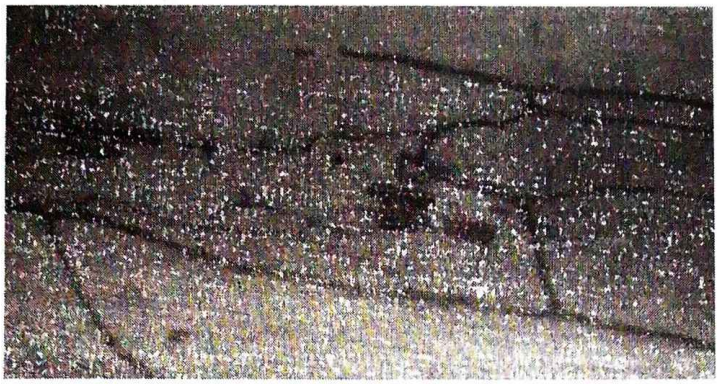
٤- يضاف اليها محلول هيدروكسيد البوتاسيوم (١٠ %) KOH و توضع في حمام مائي بدرجة حرارة (٩٠ م) لمدة (١٠- ١٥) دقيقة ، و تغسل بالماء الاعتيادي .

٥- تقصر باستخدام محلول (١٠ %) H_2O_2 القاعدي لمدة (٣-٤) دقائق و تغسل بالماء الاعتيادي .

٦- يضاف حامض HCL (٥ %) لمدة (٥ دقائق) لتحميض الجذور لان الصبغة حامضية .

٧- يضاف محلول الصبغة (Acid fuchsin) و توضع في حمام مائي بدرجة حرارة (٩٠ م) لمدة (١٥) دقيقة .

٨- يضاف حامض (Lactic acid) للنموذج بعد استخراجه من الصبغة .



٣- طريقة التصبيغ بالحبر ومحلول الخل

تستخدم طريقة Ink and Vinegar حسب ما ذكر VIERHEILIG (1998) في تصبيغ الجذور وتجرى كما يأتي:-

1- توضع القطع الجذرية (طول القطعة الواحدة 1 سم) في أنبوبة اختبار

2- تغسل هذه القطع من بقايا الطين والأتربة العالقة بها .

3- يضاف محلول هيدروكسيد البوتاسيوم تركيز 10 % (المحضر من إذابة 10 غرام هيدروكسيد البوتاسيوم KOH في 100 مل ماء مقطر) ثم وضعت في الحمام المائي بدرجة حرارة 90 °م ولمدة 3 – ٥ دقيقة .

4- تغسل القطع الجذرية بالماء الاعتيادي بعد استخراجها من الحمام المائي .

5- يضاف محلول حامض الخليك تركيز ٥% (المحضر من إضافة ٥ مل حامض الخليك في 95 مل ماء مقطر) لمدة 2 – 3 دقائق .

6- يضاف محلول صبغة Ink and Vinegar (المحضر من إضافة ٥ مل حامض الخليك في 90 مل ماء مقطر مع محلول الحبر المحضر من ٥% حبر مع ٥% حامض الخليك) ، لأنبوبة الاختبار ثم وضعت في الحمام المائي بدرجة حرارة 90 °م لمدة ٤ – ٥ دقائق.

7- يمكن غسل النماذج بالماء المقطر بعد استخراجها من الصبغة . وبذلك يصبح النموذج جاهزا للفحص المجهري .

- تقدير نسبة إصابة الجذور ب VAM :-

تحسب نسبة إصابة الجذور بالمايكورايزا الحويصلية الشجيرية VAMعن طريق تقدير النسبة المئوية للقطع الجذرية المصابة حسب طريقة الشريحة(Root Slide Method) إذ يتم اختيار عشر قطع جذرية لكل عينة بصورة عشوائية وتوضع على الشريحة الزجاجية Slide ، طول القطعة الواحدة 1 سم وتفحص الجذور تحت المجهر . و تستخرج النسبة المئوية للإصابة حسب المعادلة الآتية :-

% القطع الجذرية المصابة = عدد القطع الجذرية المصابة \ المجموع الكلي للقطع الجذرية × 100

شعيرة جذرية غير مصابة