المحاضره الخامسه عشر

3-طريقة الجمع بين قمع بيرمان والمناخل :

تفيد هذه الطريقه في الحصول على عالق نيماتودا خالي من الشوائب وتتلخص بأستخدام اجزاء الجذور او العالق الغير نقي الذي تم الحصول عليه من طريقة المناخل ثم استخلاص النيماتودا بطريقة قمع بيرمان .

4-طريقة الطرد المركزي مع الطفو Centrifuge – flatation method

تعتبر هذه الطريقه من الطرق الشائعه الاستعمال في مختبرات النيماتودا لاستخلاص معظم انواع النيماتودا في التربه . ولكن من عيوبها انها تسبب تلف لكثير من النيماتودا المستخلصه وبذلك لاتستعمل هذه النيماتودا كلقاح في التجارب العلميه .

المواد والادوات اللازمه :

1- محلول سكري يحضر بأذابة 454 غرام من السكر في كميه كافيه من الماء ويكمل الحجم الى لتر من الماء .
2- جهاز طرد مركزي ذو رأس افقي وبقوة طرد 420 غرام .
3- انابيب طرد المركزي تتسع لمعلق بحجم 50 مل او اكثر .
4- خلاط ميكانيكي او خلاط بألاهتزاز لخلط العينات في الانابيب .
5- مناخل ذو سعة 350 مش .
6- بيكرات زجاجيه سعة 100 ، 150 ، 1000 مل .

طريقة العمل :

1- تخلط عينة التربه ويؤخذ منها كميه بحجم 100 غم وتوضع في وعاء زجاجي سعته 1 لتر ثم يضاف اليها كميه كافيه من الماء بحيث يصبح الحجم النهائي 600 مل .
2- تحرك المحتويات جيدا مدة 20 ثانيه وتترك مدة دقيقه واحده لتترسب . بحيث أن لاتزيد فترة الترسيب 20- 30 ثانيه في حالة النيماتودا *Criconemella* .
3- يمرر المعلق من خلال المنخل 50 مش بعد وضعه فوق المنخل 350 مش . مع مراعات ان المناخل تمسك دائما اثناء الصب بزاويه مائله (30 – 40 درجه) . وذلك لتقليل فرصة مرور النيماتودا الصغيرة الحجم .
4- تغسل محتويات المنخل 50 مش وهو ما يزال فوق المنخل 350 مش بواسطة تيار خفيف من الماء مع ملاحظة تجنب الغسل الكثير لانه يسبب مرور النيماتودا الصغيرة الحجم عبر كلا المنخلين .
5- تنقل محتويات المنخل 350 مش نقلا كميا بواسطة تيار خفيف من الماء يسلط من خلف المنخل الى وعاء زجاجي سعة 150 مل .
6- يوزع المعلق المتحصل عليه في الخطوه السابقه على انابيب الطرد المركزي ثم توضع في جهاز الطرد المركزي مع التأكد من توازن الانابيب في الجهاز.
7- يغطى الجهاز ثم يدار على قوة طرد مركزي 420 غرام مدة 5 دقائق .
8- بعد الانتهاء من عملية الطرد السابقه تؤخذ الانابيب برفق ، ويتخلص من الماء الرائق فيها الى حوض الغسيل (توجد النيماتودا في كتلة التربه المترسبه في قاع الانابيب) .
9- تعبأ الانابيب بالمحلول السكري الى ما قبل فوهة الانبوبه بحوالي 6 سم .
10-تخلط العينات جيدا داخل الانابيب بواسطة الخلاط الميكانيكي او بواسطة جهاز الاهتزاز ، ليتم دمج المحلول السكري مع راسب التربه والنيماتودا .

11- توضع الانابيب مره اخرى في جهاز الطرد المركزي ويدار على السرعه السابقه نفسها مدة30 -60 ثانيه ، فتصبح النيماتودا بعد الطرد المركزي معلقه في المحلول السكري بينما تترسب التربه في قاع الانابيب .

12- بعد الانتهاء من عملية الطرد الثانيه تؤخذ الانابيب برفق ويمرر معلق النيماتودا في المحلول السكري ببطء من خلال المنخل 500 مش .

13- تغسل النيماتودا العالقه على المنخل 500 مش بتيار خفيف جدا من الماء لتخليصها من آثار السكر ثم تنقل كميا بواسطة تيار خفيف من الماء ويسلط من خلف المنخل بواسطة قنينة الغسيل الى وعاء زجاجي سعة 100مل ، بحيث يصبح معلق النيماتودا بحدود 20 مل .

ثانياً:- طرق الإستخلاص من الأنسجه النباتيه

هنلك عدة طرق لإستخلاص النيماتودا من الأنسجه النباتيه المصابه ومنها مايلي :-

1-**طريقة تمزيق الأنسجه (الفحص المباشر):-**

تفيد هذه الطريقه في الكشف عن جميع انواع النيماتودا التي تتطفل داخل الانسجه النباتيه وتتلخص هذه الطريقه في وضع النسيج النباتي المصاب سواء كان جذور اوسيقان او اوراق او براعم او بذور بعد تقطيعه الى قطع صغيره في طبق زجاجي او زجاجة ساعه مع قليل من الماء ، ومن ثم يتم تمزيق النسيج بواسطة ابره ومشرط تشريح حاد او ابرتي تشريح حادتين فبذلك يتم تحرير عدد كبير من النيماتودا سواء كانت ذات تطفل داخلي او خارجي حيث تنتشر في الماء ، ثم نفحص تحت مجهر تشريح ويفضل اجراء التمزيق اثناء الفحص تحت المجهر .

2- طريقة الخلاط :-

طريقة العمل :

1- تغسل الجذوروتزال منها الاتربه بلطف تحت تيار من ماء حنفيه جاري .
2- تقطع الجذور بمقص او سكين االى قطع صغيره بطول 1- 2 سم .
3- يؤخذ وزن معين من الجذور 10 – 20 غم وتوضع في خلاط كهربائي ويضاف لها قليل من الماء وتخفق مرتين مدة 5 – 10 ثواني بعدها يسمح للعالق بالترسيب ثم يخفق مرة ثانيه مدة 10 – 15 ثانيه .
4- تجمع عالق الجذور ونضعه في وعاء زجاجي ونغسل وعاء الخلاط ونضيفه الى الوعاء الزجاجي .
5- نمرر المعلق من خلال المنخل 150 مش الى وعاء زجاجي وتغسل محتويات المنخل بتيار خفيف من الماء . ثم تنقل المواد المتجمعه على المنخل 150 مش الى وعاء زجاجي نظيف وذلك بغسل المنخل من الخلف بواسطة تيار من الماء . ويتم استخلاص
محتويات الكأس بطريقة قمع بيرمان .
6- نمرر المعلق الذي تم الحصول عليه من الطريقه السابقه خلال منخل 350 مش .
7- تنقل المواد المتجمعه من على المنخل 350 مش الى وعاء زجاجي بواسطة تيار خفيف من الماء وبعد ذلك يتم فحص النيماتودا في العالق بواسطة مجهر تشريح.

عيوب هذه الطريقه

1- مدة الوقت اللازمه لخفق الجذور بالخلاط تكون ضروريه وحرجه لتحرير النيماتودا من الجذور .

2- تتعرض النيماتودا للضرر لذلك لا ينصح بهذه الطريقه في الحصول على نيماتودا كلقاح لانها تؤثر على نشاط النيماتودا .

3-طريقة النقع :-

تقطع الاجزاء النباتيه المصابه كالجذور مثلا بعد غسلها بالماء الجاري الى قطع صغيره بطول 1 – 2 سم وتوضع في طبق بتري يحتوي ورق ترشيح مبلل بالماء ثم يضاف قليل من الماء يكفي لكي يشبع جو الطبق بالرطوبه دون غمرها . وتحفظ على درجة مئويه مناسبه لنشاط النيماتود 25 – 30 درجه مئويه لمدة 24 ساعه . وبعد ذلك تزال كمية الماء المحتويه على النيماتودا بواسطة تيار خفيف من الماء بأستعمال قنينة الغسيل الى وعاء زجاجي ، وتضاف كميه جديده من الماء الى الطبق السابق وتترك لمدة 24 ساعه اخرى . وفي النهايه يؤخذ 1 مل من الماء المتجمع في الوعاء لاجل الفحص تحت المجهر التشريحي . وهذه الطريقه تعتبر من أنسب الطرق لاستخلاص نيماتودا السوق والابصال ونيماتودا التقرح.

4-طريقة التحضين :

تؤخذ الأجزاء النباتيه بعد غسلها بالماء الجاري وتقطيعها الى قطع صغيره في دوارق زجاجيه نظيفه ويضاف لها قليل من الماء يكفي لتغطيتها ، ويمكن أضافة قليل من محلول مضاد حيوي اذا كان يخشى عليها من التحلل أو التعفن بفعل الكائنات الحيه الدقيقه ، إذ يمكن أستخدام محلول من مادة كبريتات الاستربتومايسين 50 غم/لتر ماء أو اي مضاد حيوي آخر . توضع الدوارق عند درجة حراره 25 – 30 درجه مئويه لمدة 3 أيام لتنشط خلالها النيماتودا وتتحرك خارج النسيج النباتي الى الماء وبعد ذلك ننقل محتويات الدوارق نقلا كميا الى وعاء زجاجي مع غسل الدورق بالماء وأستقبال ماء الغسيل أيضا في وعاء التجميع . ونمرر محتويات وعاء التجميع من خلال منخلين متراكبين 150 مش 350 مش . وبع ذلك تجمع محتويات المنخل 350 مش الى كأس نظيف بواسطة تيارخفيف من الماء يسلط من خلف المنخل بأستخدام قارورة غسيل وبعد ذلك تتم عملية الفحص بواسطة مجهر تشريح .

5-طريقة هايبوكلورات الصوديوم NaOCl :

طريقة العمل :

1- غسل الجذور المصابه لإزالة الاتربه منها بلطف تحت تيار من ماء حنفيه جاري وتقطع الى قطع صغيره بطول 1 – 2 سم .
2- توضع 50غم من الجذور في وعاء زجاجي نظيف سعة 1 لتر .
3- إضافة 200 مل من محلول هايبوكلورات الصوديوم 0.5% (20 مل من محلول القاصر بتركيز 6% + 180 مل ماء) الى الوعاء الحاوي على الجذور ثم يرج يدويا بقوه لمدة 3-4 دقائق .
4- يمرر العالق بسرعه من خلال منخل 100 مش موضوع فوق منخل 500 مش . حيث يتم جمع البيوض على المنخل 500 مش بينما يحتفظ المنخل 100 مش بقطع الجذور.
5- وضع المنخل 500 مش بما يحتويه من البيوض بسرعه تحت تيار خفيف من الماء لعدة دقائق لإزالة بقايا هايبوكلورات الصوديوم .
6- تنقل كمية البيوض المتجمعه على المنخل 500 مش بواسطة تيار خفيف من الماء يسلط من الخلف بواسطة قارورة ماء الى وعاء زجاجي سعة 150 مل .
7- يؤخذ 1مل أو 5 مل من العالق (حسب نوع شريحة عد النيماتودا) لتقدير كثافة النيماتودا بواسطة شريحة عد النيماتودا .

تستخدم هذه الطريقه لجمع بيوض نيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne spp.* ونيماتودا الحوصلات *Heterodera spp. , Globodera spp.* وهي سهلة التطبيق وكفوءه لجمع البيوض .

تقدير اعداد النيماتودا

بعد استخلاص النيماتودا من عينات التربه او المجموع الجذري او المجموع الخضري يتم تشخيص وتقدير اعداد النيماتودا بأستخدام مجهر تشريحي وشريحة عد النيماتودا ، حيث ان هذه الشريحه مقسمه الى مربعات ، يتم تركيز عالق النيماتودا الى 5 مل وحساب اعداد النيماتودا فيها . في حالة تعذر العد بسبب كثافة النيماتودا فيتم تخفيف العالق الى حجم مناسب ومعلوم ويؤخذ 5 مل من العالق بعد رجه يدويا لتجانس الديدان في المعلق وتقدر اعداد النيماتودا فيها ومن خلالها يتم تقدير اعداد النيماتودا في الحجم الكلي للعالق كالاتي :

1- استخلاص النيماتودا من العينه النباتيه او عينة التربه وفق الطريقه المناسبه .
2- تركيزعالق النيماتودا الى حجم معلوم وليكن 10 مل على سبيل المثال .
3- رج المحلول قبل اخذ العينه من العالق لكي يتجانس توزيع النيماتودا في العالق .
4- يؤخذ 5 مل من العالق بأستخدام ماصه ذات فتحه واسعه لتجنب انسدادها بالشوائب ونضع العالق برفق في شريحة عد الديدان . اذا كان عدد الديدان قليل نحسبها في العالق الكلي اما اذا كانت كثافة الديدان عاليه يصعب عدها يمكن مضاعفة حجم العالق .
5- بعد حساب النيماتودا في العالق الموجود في الشريحه نعيده الى العالق الاساسي ويرج وتكرر عملية العد 3 – 4 مرات ونستخرج معدل عدد النيماتودا في 5 مل ثم نستخرج العدد الكلي للنيماتودا في العالق الكلي .