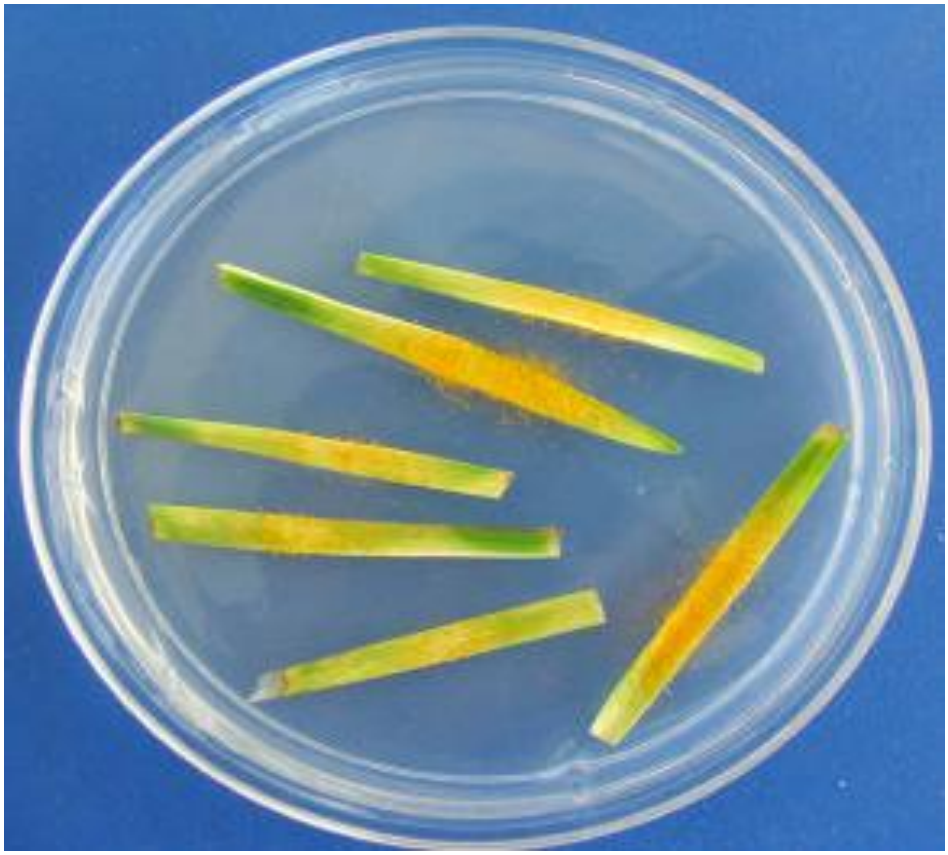
إسلوب الورقة المقطوعة في الأمراض النباتية

Detached Leaf Technique in Plant Pathology

د. محمد عبد الخالق الحمداني

M.A.AL-Hamdany

ma_alhamdany@yahoo.com

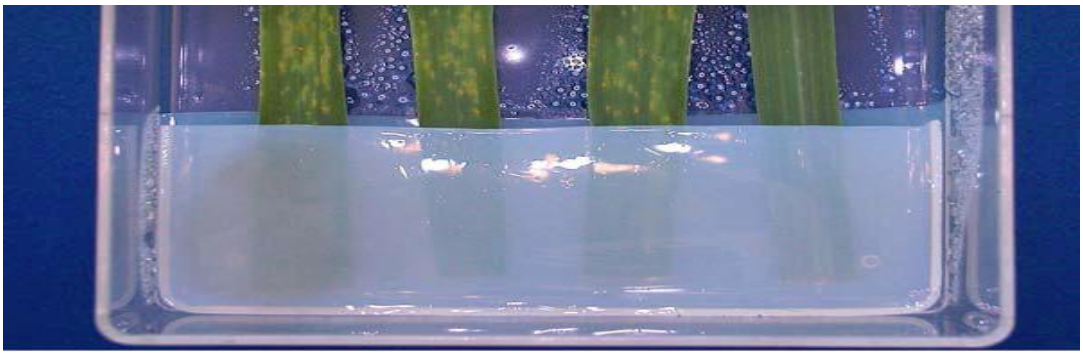


يمثل إسلوب أو تقنية الورقة الساقطة أو المقطوعة أحد أفضل طرائق العمل في كثير من التجارب الخاصة بإكثار الوحدات اللقاحية أو إنشاء مزرعة من بوغ واحد أو من بثرة واحدة لغرض إستخدامها في تلويث العوائل النباتية. يتظمن هذا الإسلوب قطع الورقة من العائل النباتي كأن تكون الورقة الأولى من بادرات أو ورقة العلم من نباتات العائلة النجيلية كالحنطة والشعير والرز والذرة الصفراء وغيرها... يمكن أن تؤخذ قطع محددة من تلك الأوراق . كما يمكن إستخدام أوراق جميع العوائل النباتية من ذوات الفلقتين . تعتمد أطوال أو مساحات القطع المستخدمة على الأوعية المستخدمة ، فقد تكون أطباق زجاجية مختلفة الأقطار وقد تكون أنابيب إختبار أو تكون

في صحون واسعة أو قد تترك الأوراق على طبقات مرطبة بالماء من أوراق الترشيح أو القماش.

تلويث الأوراق الطافية على المحاليل المانعة لتحلل الكلوروفيل بطريقة القطرة

يفضل مستخدمي هذا الإسلوب إن يحافظو على نظارة الأوراق (Leaf or Leaf Segment Vigor)من خلال تأخير تحلل المادة الخضراء في أنسجتها . إن ترك الأوراق طافية على الماء المقطر أو على الآكر المائي (Water Agar) لأيام عديدة قد تتجاوز إسبوع كامل... عادة ما يؤدي إلى تكشف الإصفرار (Chlorosis) ، وبذلك تكون جميع نتائج التجربة غير دقيقة . إن عدم دقة النتائج المسجلة على أوراق أو قطع أوراق يغلب على أنسجتها إصفرار لايمكن أن يرتبط بنوع الممرض المستخدم في التلويث، وذلك لأن الإصفرار سوف يختزل الإصابة في حالة الممرضات ذات التطفل الإجباري كممرضات أمراض الأصداء والبياض الدقيقي والزغبي.... لكنه يزيد من شدة إصابة الممرضات ذات التطفل أو الترمم الإختياري....لذلك فإن إستخدام الماء المقطر أو الآكر المائي (10 غم /لتر ماء) قد يكون كافيا عند التعامل مع البكتريا، لأن تلويث قطع الأوراق بالبكتريا بعد إحداث جروح فيها ... لايتطلب أكثر من 48 ساعة لملاحظة النتائج، بينما يتطلب 10 يوم لقراءة أنواع الإصابة والإستجابة المرضية عند التعامل مع الفطريات الممرضة.



وضع الوراق بين طبقتين من الآكر المائي المدعوم بالمواد المانعة لتحلل الكلوروفيل

ولأهمية المحافضة على نظارة الأوراق أو قطع الأوراق أطول فترة ممكنة (10 يوم) بعد التلويث.... فقد درست كفاءة عدد من المركبات وكذلك خصصت دراسات عديدة لإختيار أفضل التراكيز التي يمكن إستخدامها في عمل المحاليل التي تطفو فوقها قطع الأوراق..ومنها المركبات أو المواد التالية المذكورة في الجدول 1.

وكما ذكرنا سابقا، في أن أهم معيار للتفضيل بين هذه المركبات المستخدمة في تهيئة مزارع الورقة الساقطة (Detached Leaf Culture) هو كفاءة أي محلول في تأخير تكشف الإصفرار إلى ما بعد اليوم العاشر من التلويث على أكثر تقدير ، لاسيما وإن فترات الحضانة وأنواع الإصابة في كثير من المسببات الممرضة تتطلب أكثر من إسبوع. وعلى الرغم من كفاءة معظم المزارع المذكورة في جدول 1، إلا إن أفضلها في المحافضة على نظارة الأوراق المقطوعة لعشرة أيام بدون حدوث أي نسبة من الإصفرار المادة BAP بتركيز 100 ملغرام باللتر الواحد من الماء المقطر (جدول 1) ، وهي المادة الوحيدة التي لم يظهر على الأوراق الطافية أي إصفرار بالمقارنة مع الآكر المائي الذي سبب تكشف كامل للإصفرار على مساحة الورقة الموضوعة عليه أو المغروزة فيه. من جانب آخر تفوق الكاينتين 100 ملغرام/ لتر ماء مقطر على البنزيميدازول ، حيث أدى إستخدامه إلى تكشف إصفرار على 9% من مساحة الورقة الطافية ، بينما تكشف الإصفرار على أكثر من 40% من مساحة الورقة عن إستخدام البنديميدازول أو الخليط المغذي ، ويبدو بأن الخليط المغذي لم يكن جيدا على الإطلاق فقد سبب خلطه مع BAP إلى تدني قدرة BAP في المحافضة على نضارة الأوراق المقطوعة ، بحيث تكشف الإصفرار في أكثر من 70% من مساحة الورقة.

من جانب آخر إنعكست كفاءة المحاليل المذكورة على كمية الأبواغ المنتجة على قطع محددة من تلويث محدد وعلى عائل محدد ... حيث تم إنتاج أعلى الكميات على الأوراق الطافية على BAP ثم الكاينتين بينما بلغت كمية الأبواغ اليوريدينية المنتجة على أوراق طافية على خليط المغذي 25% من الكمية المنتجة على الوسط BAP ...

جدول 1. المواد المستخدمة في عمل مزارع الورقة الساقطة أو المقطوعة في تجارب الأمراض النباتية

أسماء المواد أو المركبات والتراكيز المناسبة	
1. محلول سكري مركز جدا ..	1غم/1مل
2. محلول سكري	50-100غم/ لتر
3. محلول سكري عادي + كاينتين	(40 ppm)
4. مادة البنزيميدازول (Benzimidazole)	40-100 ملغرام /لتر
5. كاينتين (Kinetin)	10 -100 ملغرام/ لتر
6. آكر مائي (Water Agar)...	10 غم / لتر
7. خليط مغذي (Nutrient Mix) مكون من المركبات :	
أ . نترات البوتاسيوم	2.83 KNO3 غرام/لتر
ب . فوسفات البوتاسيوم	0.4 KH_2PO4 غرام/لتر
ج . كبريتات المغنسيوم المائية	0.185 ($MgSO4\ 7H_2O$) غرام
د . كلوريد الكالسيو(2H2O)	0.166 $CaCl_2$ غرام /لتر
هـ . كبريتات الحديد	0.040 FeSO4 غرام/لتر
و . كلايسين	0.2 Glycine غرام /لتر
ز . ثايمين	0.1 Thiamine غرام/ لتر
ح . بايريدوكسين	0.05 Pyridoxine غرام/لتر
ط . حامض النيكوتين	0.05 Nicotinic Acid غرام/ لتر
8. بنزايل أمينو بيورين Benzylaminopurine (BAP)	100 ملغرام /لتر
9. BAP + الخليط المغذي	(المواد 3-9)

يفضل أغلب المختصين إجراء تعقيم سطحي للإوراق أو قطع الأوراق قبل تلويثها بالوحدات اللقاحية وكما يلي:

1. غسل الأوراق بماء الحنفية (Tap Water) لإزالة الأتربة من سطوح الأوراق خاصة عند إستخدام أوراق نباتات مزروعة في الحقل.
2. غمر القطع في الإيثانول (Ethanol) تركيز 70% لمدة دقيقة واحدة
3. غسل الأوراق بالماء المقطر المعقم ...
4. وضع الأوراق على الوسط بحيث تكون سطوحها السفلى للإعلى ...
5. تلويث الأوراق...
6. غلق الأطباق مع مراعاة عدم وصول المحاليل للسطوح الملوثة ... وحفظها تحت درجات حرارة وفترة إضاءة تلائم حدوث وتطور الإصابة....

كما يمكن إجراء التعقيم السطحي بـ 0.5% من هايبوكلورات الصوديوم NAOCl الحاوي على مادة Polyxyethylen Sorbitan المعروفة بـ Tween بواقع 5 قطرات في لتر واحد .... تغسل الأوراق بعد التعقيم بالماء المقطر المعقم....

أما طرائق إستخدم مزارع الأوراق المقطوعة فهي كثيرة ومتنوعة قد تقررها طبيعة الجزء النباتي المستخدم . يمكن إجراء الإختبارات على النحو التالي:

1. **ترك الأوراق أو قطع الأوراق تطفو على 10-15 مل من المحلول داخل طبق زجاجي ... أو على الآكر المائي المدعم بمركبات تمنع تحلل الكلوروفيل...**
2. **غمر حوامل الأوراق أو نهايات الأوراق في أنابيب إختبار تحوي على كميات مناسبة من المحاليل..**
3. **تجري عمليات التلويث بطرائق مختلفة كالتتريب (Dusting) أي نثر الأبواغ على قطع الأوراق الطافية وهي مناسبة جدا لممرضات البياض الدقيقي . يمكن قياس أعداد الأبواغ الساقطة من خلال مسكها على قطع من الآكر المائي بمساحة 1 سم 2 توضع على شرائح زجاجية توزع بين الأطباق الزجاجية الحاوية على المحاليل والأوراق الطافية.... كما يمكن تلويث قطع الأوراق بإسلوب الغمر (Dipping) ، حيث تغمر قطع الأوراق في معلق مائي للأبواغ اليوريدينية لمسببات الأصداء... قبل أن تترك تطفو فوق المحاليل.... ومن الطرائق المنتشرة في مسببات أمراض التبقع واللفحات إستخدام تلويث القطرة.. حيث توضع قطرة من المعلق المائي للأبواغ الكونيدية أو خلايا البكتريا الممرضة على ورقة النبات. يمكن إحداث جروح بإبرة ملوثة نتيجة ملامستها لمعلق الخلايا البكترية ....**

وأخيرا... فعلى من يتعامل بهذه التقنية البسيطة ذات النتائج المماثلة للنتائج المأخوذه على النباتات الكاملة، كما إنها لاتتطلب مساحات كبيرة ، عليه التأكد من عدم حدوث تماس بين السطوح الملوثة وبين المحلول المستخدم لوجود فعل مبيدي... كما ويفضل لمن يستخدم مادة البنزيميدازول أن يبحث عن التركيز المناسب ... فقد أشارت دراسات عديدة إلى حدوث إختزال في شدة الإصابة عند إستخدام تراكيز عالية من المادة.أي أكثر من 100 ملغرام في اللتر الواحد... ومن خلال التعامل مع هذه المادة ، فقد كان تركيز 40 ملغرام /لتر ماء مقطر والذي يعادل 40ppm ملائما لقطع أوراق الشعير...

مع تمنياتي

د. محمد عبد الخالق الحمداني

أيلول 2012