

باسمه تعالی



استخراج نماتدها

اغلب نماتدهای انگل گیاهی تمام یا حداقل بخشی از چرخه زندگی خود را در خاک سپری می کنند. جهت جداسازی نماتدها در ابتدا نمونه گیری از خاک انجام می گیرد.

نمونه برداری غالباً از منطقه ریزوسفر (rhizosphere) انجام می گیرد. جمعیت نماتدها در خاک های سبک و نیمه مرطوب اطراف ریشه در عمق ۳۰-۵ سانتی متر نسبتاً قابل توجه می باشد. پراکندگی نماتدها در مزارع غالباً به صورت موضعی است. می توان از یک مزرعه به صورت زیگزاک به فواصل ۳-۵ متر نمونه های کوچکی، در حد ۲۰۰-۵۰۰ گرم، جمع آوری کرده و در صورت کوچک بودن مزرعه (کمتر از یک هکتار) این نمونه های کوچک را با هم مخلوط کرده و بعد از آن مقداری خاک در حد ۲۰۰-۵۰۰ گرم انتخاب شود.

جهت جداسازی نماتدها از خاک و محیط های دیگر (اعم از بدن حشرات و بافت های گیاهان) از سه روش زیر می توان استفاده کرد:

۱- سانتریفیوژ یا شناورسازی در آب قند Centrifuge or sugar flotation method

۲- قیف بیرمن Baermann funnel method

۳- الک کردن

۱- سانتریفیوژ یا شناورسازی در آب قند

- ۱- ابتدا خاک را به صورت دوغاب در آورده و از الک درشت به قطر منافذ ۳-۲ میلیمتر عبور می دهیم .
- ۲- سوسپانسیون خاک را به ترتیب از الک های ۴۵ مش (۳۵۵ μm)، ۶۰ مش (۲۵۰ μm)، ۱۰۰ مش (۱۵۰ μm) و ۴۰۰ مش (۳۷ μm) عبور می دهند.
- (مش: Mesh: به تعداد منافذ موجود در یک اینچ طول (۲/۵۴ سانتی متر) اطلاق می گردد.)
- ۳- سوسپانسیون بر جای مانده در الک ۴۰۰ مش را در استوانه مدرج به حجم ۱۰۰۰ یا ۵۰۰ سی سی ریخته و به مدت ۲۰-۳۰ دقیقه صبر می کنیم تا ذرات سبک (خار و خاشاک و هوموس) خاک در سطح سوسپانسیون جمع شوند.
- ۴- پس از این مدت، ذرات سبک جمع شده بر سطح آب را از سوسپانسیون جدا می کنیم. برای اینکار می توان مقدار کمی آب به استوانه مدرج اضافه کرد تا ذرات سبک سطح سوسپانسیون به آرامی شسته شوند.
- ۵- به میزان ۳۰۰-۵۰۰ سی سی از قسمت ته نشین شده در استوانه مدرج را برداشته و پس از همگن کردن به طور مساوی در تیوپ های سانتریفیوژ می ریزیم. می توان پس از جدا کردن ذرات سبک از سطح سوسپانسیون، مجدداً محتویات استوانه مدرج را در الک ۴۰۰ مش ریخته و محتویات الک ۴۰۰ مش را در یک بشر جمع آوری می کنیم . با این کار حجم سوسپانسیون کاهش یافته و سپس به تیوپ های سانتریفیوژ منتقل می کنیم. تیوپ های سانتریفیوژ باید دو به دو، وزن یکسانی از سوسپانسیون را دریافت کنند.
- ۶- سانتریفیوژ را به مدت ۵ دقیقه به ۵۰۰۰ دور در دقیقه جهت آگیری از نمونه ها انجام می دهیم می توان میزان دور را کم و در مقابل زمان سانتریفیوژ را بیشتر کرد.
- ۷- پس از پایان سانتریفیوژ آب روی لوله ها را دور ریخته(بهرتر است روی الک ۴۰۰ مش خالی کنیم) و به جای آب به لوله ها محلول آب شکر به جرم حجمی ۱/۱۸ gr/cm^۳ اضافه می کنیم.

ترک حیات کبز سبحان

- ۸- برای تهیه محلول آب شکر به جرم حجمی $1/18 \text{ gr/cm}^3$ ، در یک استوانه مدرج به حجم ۱۰۰۰ سی سی، ۷۰۰ CC آب ریخته و آنقدر شکر اضافه می کنیم تا حجم محلول به ۱۰۰۰ برسد. نسبت آب و شکر باید ۷۰۰ به ۳۰۰ باشد. (در سانتریفیوژ، تیوب ها را حداکثر تا $2/3$ حجم آن ها از سوسپانسیون خاک یا آب شکر پر می کنیم)
- ۹- پس از اضافه کردن آب شکر و تنظیم وزن تیوب های مقابل هم، محتویات تیوب را همگن کرده و در دستگاه سانتریفیوژ قرار می دهیم.
- ۱۰- عمل سانتریفیوژ را به مدت یک دقیقه با سرعت هزار دور در دقیقه انجام می دهیم.
- ۱۱- بلافاصله پس از اتمام سانتریفیوژ، تیوب ها را از دستگاه خارج و محتویات رویی آن ها را در الک ۴۰۰ مش خالی می کنیم. همزمان جهت شسته شدن شکر، شیر آب را روی الک باز می کنیم.
- ۱۲- نهایتاً محتویات الک ۴۰۰ مش را در یک پتری ریخته و زیر بینو کولر مشاهده می کنیم.



۲- روش قیف برمن

برای جداسازی نماتدهای موجود در خاک، بدن حشرات و گیاه میزبان می توان استفاده کرد

مراحل آن به شرح ذیل است:

- ۱- انتهای یک قیف شیشه ای را به یک لوله ی پلاستیکی به طول ۲۰-۱۰ سانتی متر وصل می کنیم و انتهای لوله را با یک گیره مسدود می کنیم.

آدرس دفتر مرکزی: بزرگراه خیام- حدفاصل صمدیه و صارمیه کوچه ۷۹

کانال تلگرامی: t.me/HayateSabzCo

www.Hayatsabz.com

شماره تماس: ۰۳۱۲۳۳۷۴۳۵۸

تَرَک حیات کے بز سبجان

۲- در محل قیف یک توری فلزی یا پلاستیکی (در حدود ۱۰ مش یا کمتر) قرار می دهیم، قیف را تا زیر توری از آب پر می کنیم.

۳- یک لایه نازک از دستمال کاغذی یا پارچه با منافذ نسبتاً ریز روی توری قرار می دهیم.

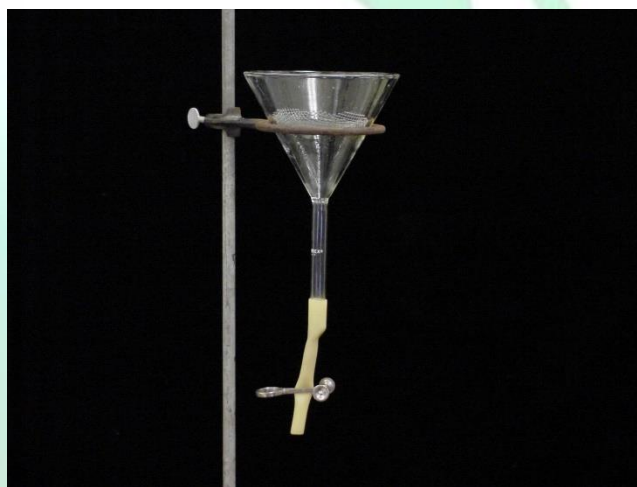
۴- روی پارچه یا دستمال کاغذی مقداری خاک یا خرد شده ی گیاهان یا حشرات را می ریزیم .

۵- نماتدهای موجود در خاک یا نمونه به درون آب شنا کرده و با گذر از پارچه یا دستمال کاغذی وارد لوله می شود. پس از ۱۴ ساعت می توان نماتدها را استخراج کرد.

۶- قرار دادن یک لامپ روشن روی قیف سبب حرکت سریع تر نماتدها به طرف پایین قیف می گردد.

۷- می توان به جای قیف از صفحات بزرگتر توری که دارای یک صفحه سینی مانند در زیر خود هستند استفاده کرد.

۸- در این روش غالباً نماتدهای آزاد و بسیار فعال و زنده از منافذ دستمال کاغذی یا پارچه عبور کرده و به دست می آیند. و در مقابل نماتدهای مرده و کم تحرک مانند اغلب نماتدهای گیاهی از منافذ عبور نمی کنند.

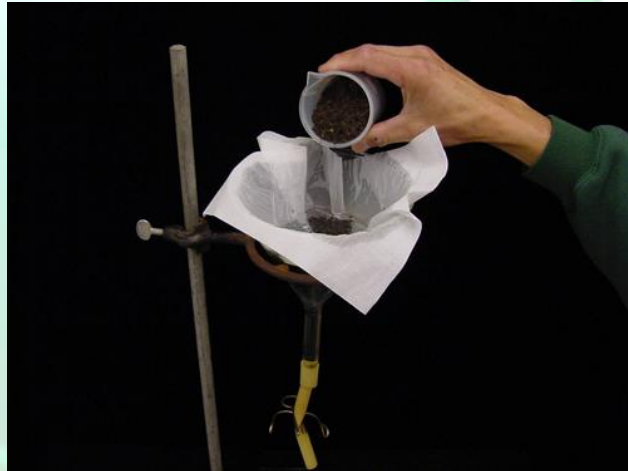
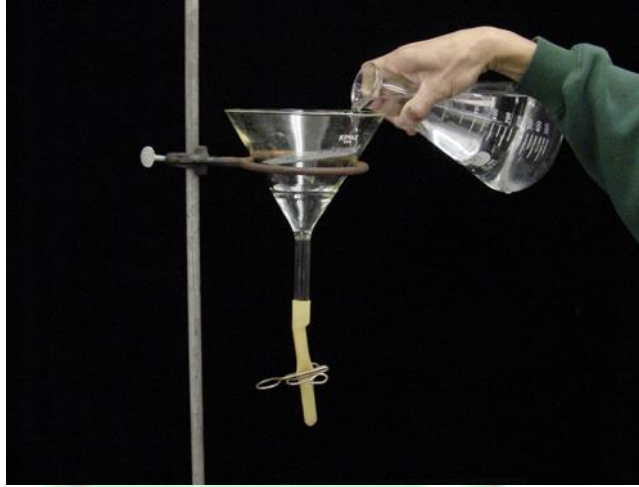


آدرس دفتر مرکزی: بزرگراه خیام- حدفاصل صمدیه و صارمیه کوچه ۷۹

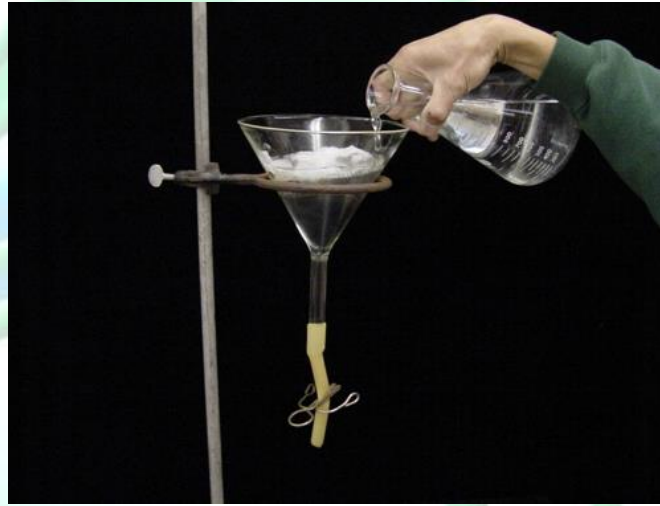
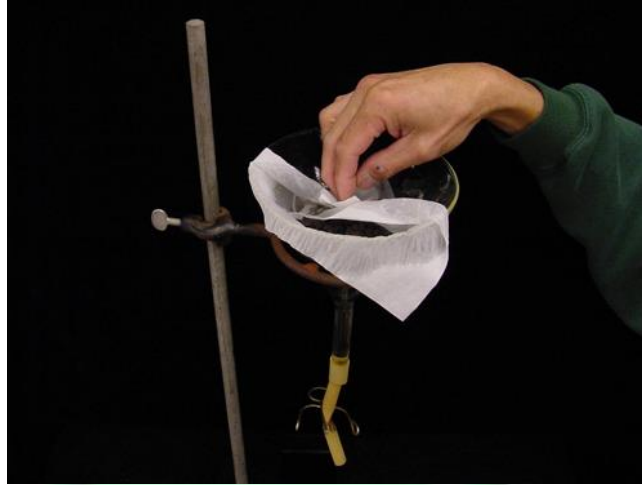
کانال تلگرامی: t.me/HayateSabzCo

www.Hayatsabz.com

شماره تماس: ۰۳۱۲۳۷۴۳۵۸



ترکت حیات کے بزنس جہان



آدرس دفتر مرکزی: بزرگراہ خیام - حدفاصل صمدیہ و صارمیہ کوچہ ۷۹

کانال تلگرامی: t.me/HayateSabzCo

www.Hayatsabz.com

شمارہ تماس: ۰۳۱۳۲۳۷۴۳۵۸



۳- روش الک کردن

در روش الک کردن، اساس کار بر این است که نمونه ای کوچک از خاک، مثلاً ۳۰۰ سانتیمتر مکعب، با مقدار بیشتری آب (در حدود ۲ لیتر) مخلوط می شود. نماتدها در آب شناور می شوند و می توان آن ها را روی الک هایی با اندازه سوراخ های مناسب جمع آوری کرد. برای این کار، ابتدا مخلوط آب و خاک بهم زده می شود و برای ۳۰ ثانیه بی حرکت باقی می ماند. آب بالای سطح از داخل خاک الک ۲۰ مش (یعنی ۲۰ سوراخ در اینچ مربع) گذرانده می شود. این الک قطعات بزرگ مواد را نگه می دارد و نماتدها را درون سطل دیگری رد می کند. آب حاوی نماتدها سپس از الک ۶۰ مش رد می شود. که نماتدهای بزرگ تر و بخشی از ذرات مواد را جمع می کند، اما نماتدهای ریزتر را به داخل دیگری عبور می دهد. این نیز از الک ۲۰۰ مش عبور داده می شود. که نماتدهای ریز و دیگر مواد هم اندازه را می گیرد. هر دو الک ۶۰ و ۲۰۰ مش، دو یا سه بار شست و شو داده می شوند تا مواد زاید هرچه بیشتر حذف شوند و در پایان، نماتدها به درون ظرفی ریخته می شوند تا بیشتر جداسازی یا مستقیماً بررسی شوند.



تهیه اسلایدهای دائمی از نماتدها

برای تهیه اسلایدهای دائمی از نماتدهای استخراج شده، نماتدها را درون محلول گلیسرین فیکس می کنیم. برای فیکس کردن نماتدها آب موجود در پتری محتوی نماتدها را تا حد امکان به کمک باریکه دستمال کاغذی یا پنبه خارج کرده و محلول های فیکساتیو را به ترتیب زیر به پتری محتوی نماتدها اضافه می کنیم:

۱- فیکساتیو I (شامل ۱۰٪ فرمالین ۴۰٪، ۱٪ اسید استیک، ۱٪ گلیسرین و ۸۸٪ آب مقطر)

۲- فیکساتیو II (شامل ۵٪ گلیسرین و ۹۵٪ الکل اتانول)

۳- فیکساتیو III (شامل ۵۰٪ گلیسرین و ۵۰٪ الکل اتانول)

به میزان ۲-۳ سی سی از فیکساتیو I را در لوله ی آزمایش تا حدود ۸۰ درجه سانتیگراد (نزدیک به جوشیدن) حرارت داده و روی پتری محتوی نماتدها خالی می کنیم. پتری را درون دسیکاتور حاوی کمی الکل اتانول، در انکوباتور به دمای ۳۵-۴۰ درجه به مدت ۲۴ ساعت قرار می دهیم.

پس از این مدت فیکساتیو I را همانند آب اضافی پتری خالی کرده و فیکساتیو II را به میزان ۲-۳ سی سی بدون گرم کردن به پتری اضافه می کنیم و در انکوباتور به مدت ۴ ساعت با همان دما قرار می دهیم.

سپس فیکساتیو II را خارج کرده و فیکساتیو III را به میزان ۲-۳ سی سی بدون گرم کردن به پتری اضافه و در دسیکاتور حاوی CaCl_2 قرار می دهیم تا به تدریج الکل از محیط پتری خارج و گلیسرین تمام بدن نماتد را فرا بگیرد.

برای تهیه اسلاید دائمی، ابتدا روی یک لام تمیز به کمک لوله ی شیشه ای یا چوب پنبه سوراخ کن، یک حلقه پارافینی به قطر تقریباً ۱/۵-۱ سانتی متر ایجاد می کنیم سپس یک قطره ی کوچک از گلیسرین در مرکز حلقه پارافین قرار داده و ۲-۳ نماتد هم شکل و هم اندازه را روی آن قرار می دهیم. لامل را به آرامی روی حلقه ی پارافین قرار داده و حرارت می دهیم تا حلقه ی پارافین ذوب شود. کمی صبر می کنیم تا پارافین مجدداً منجمد شود. می توان به جای حلقه ی پارافین از رشته ی نازک پشم شیشه یا الیاف پلاستیکی استفاده کرد.