جامعة الموصل
كلية الزراعة والغابات
قسم وقاية النبات

مبادئ وقاية النبات
الدرس العملي

مدرس المادة
ريان سالم الحيالي

المجهر Microscope

هو جهاز لتكبير الأجسام الصغيرة التي لا يمكن رؤيتها بالعين المجردة أو لإظهار التفاصيل الدقيقة للأشياء من أجل اكتشاف تكوينها و دراستها. ، و العلم المهتم باستكشاف الأجسام الصغيرة أو التفاصيل الدقيقة للأشياء بواسطة هذه الأجهزة يسمي علم الاحياء المجهرية. و كلمة "مجهرية" أو "مجهري" تستخدم لوصف الشيء الذي لا يمكن رؤيته إلا بمساعدة المجهر. والمجهر أحد الأجهزة الأوسع استخداماً في علم الأحياء، يستخدمه علماء الأحياء لدراسة الكائنات الحية والخلايا وأجزائها الصغيرة التي لا يمكن رؤيتها بالعين المجردة.

- **تاريخ الاكتشاف :**

1- الحسن بن الهيثم: 965-1039

-اسهم في تقدم علم البصريات (Optics) وقدمه في كتاب(المناظر) .

- الضوء عند مروره يحدث له انعكاس Reflectionمن الأجسام الصلبه و انكسار Refraction من الاجسام الشفافه بدرجات مختلفه مما يؤثر في التكبير Magnification والإيضاح Resolution.

2- **جاليليو Galileo: 1564-1642**

- مخترع المجهر البسيط (عبارة عن عدسة واحدة) Simple Light Microscope

3- فان لوفينهوك :

- مخترع المجهر البسيط (بعدسة ثنائية التحدب)قوه 270 مرة للاشياء الدقيقة.

4- **فرانسيس و زكريا جانسينز:**

- مخترعا المجهر المركب (عبارة عن عدستين مكبرة لرؤية الكائنات الصغيرة مثل الحشرات).

5- **روبرت هوك Robert hooke**: مخترع المجهر المركب و مكتشف الخلية

6- **راسكا** : مخترع المجهر الالكتروني النافذ (رؤية داخل الخلية)

7- **فان اردن Van Ardenne**: مخترع المجهر الالكتروني الماسح (رؤية سطح الخلية و العضيات)

أنواع المجاهر

المجاهر الضوئية

المجاهر الالكترونية

المجهر الضوئي

هو عبارة عن جهاز مكبر يعتمد على الضوء والعدسات لتكبير المادة، ويتميز بأنه منخفض التكلفة، وأكثر انتشاراً في مجالات التعليم، والطب، ويتميز بتوفيره خاصية مراقبة أنشطة الخلايا الحية.

أنواع المجاهر الضوئية:

المجهر الضوئي البسيط: يعمل على تكبير الشيء بقوة تكبير بسيطة؛ لأنه يتكون من عدسة واحدة ذات وجهين.

المجهر التشريحي: يتكون هذا الجهاز من عدستين عينتين، وعدسات شيئية، وتتراوح قوة تكبيره للأجسام من 6 إلى 50 ميكرون.

المجهر الضوئي المركب: يتكون هذا الجهاز من عدسة تكبير في العدسة العينية، وأخرى في العدسة الشيئية، وتصل قوة تكبيره للجسم من 40 إلى 1000 مرة، ويعتبر من أهم الأجهزة في علم الأحياء.

المجهر الضوئي المقلوب: يختلف في تصميمه عن المجاهر الضوئية الأخرى من حيث العدسة الشيئية الموضوعة من الأسفل لتكبير العينة، ويتم التحكم بالضوء حسب الحاجة.

المجهر الرقمي: يتميز هذا النوع بوجود كاميرا تصوير مضافة إليه، ويتيح عرض الصورة المكبرة على شاشة الكمبيوتر، والداتاشو، والتلفاز، وتصل قوة تكبيره للصورة إلى 400 زوم.

مجهر الحقل المظلم: يتميز بأرضية الشريحة المعتمة، ويكون الضوء على شكل حلقة على الكائن الحي المراد مراقبة نشاطه، وهو خاص لفحص نوع من أنواع البكتيريا.

المجهر المستقطب: يعتمد على استقطاب الشعاع الضوئي للتمييز بين المواد ذات قوة انكسار مزدوجة، ومن أهم المجالات التي يستخدم فيها الجيولوجيا، والطب، وعلم الأحياء.

مجهر الطور المتباين: يضم هذا المجهر قرص به تجويف دائري على شكل حلقة، تسمى بحلقة الطور، وكذلك على صفيحة الطور، ويستخدم لدراسة الخلايا الحية غير المصبوغة.

المجهر الفلورسنتي أو المتألق: سمي بذلك لأنه يعتمد في تكبير الأشياء على صبغة الفلورسينية التي تمتص الضوء، وتعمل على إشعاعه بطول موجي أكبر.

مجهر الأشعة فوق البنفسجية: يتميز هذا النوع بأنه لا يحتوي على عدسات عينية، بل يعتمد على الأشعة فوق البنفسجية ذات الموجة القصيرة، وكذلك على كاميرات تقوم بتصوير الجسم ثم يتم تكبيره لاحقاً.

مما يتكون المجهر الضوئي ؟

يتركب المجهر الضوئي المركب من عدة أجزاء كما يلي:

أولا: الأجزاء الميكانيكية:

1- انبوبة جسم المجهر Body Tube

2- القرص الدوار

3- الذراع Arm

4- القاعدة Base

5- المسرح Stage

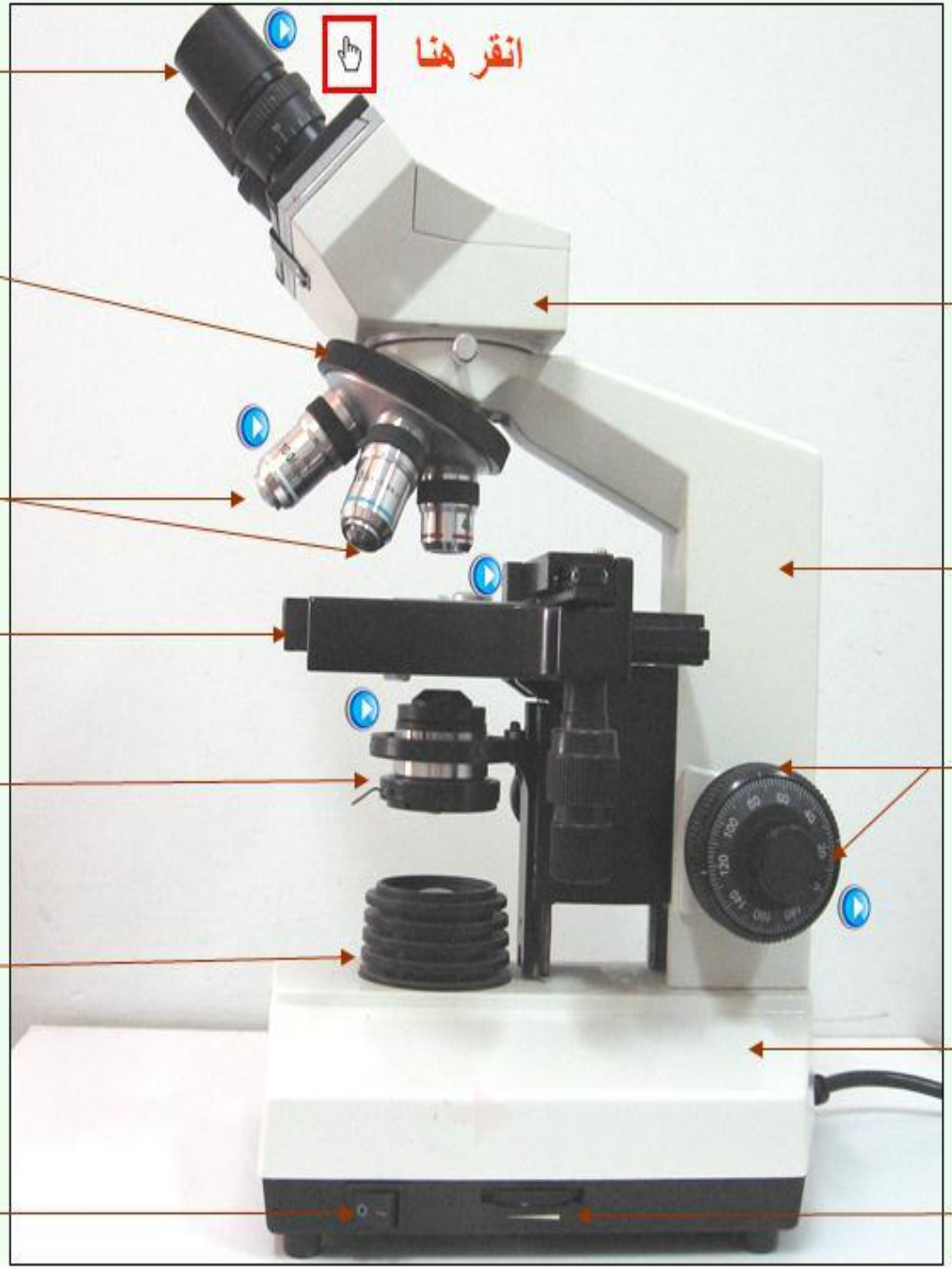
6- المنظم التقريبي والدقيق Coarse & Fine Adjustment

ثانيا: الأجزاء البصرية:

1- المكثف Condenser

2- العدسة العينية Ocular Lens

3- العدسات الشيئية Objective Lenses



العدسات العينية
Ocular lenses

القطعة الانفية
Nose piece

العدسات الشيئية
Objective lenses

Stage المسرح

Condenser المكثف

المصدر الضوئي
Light source

رز التشغيل
Light on / off switch

جسم الانبوب
Body tube

Arm الذراع

المنظم الكبير والدقيق
Coarse and fine Adjustment knobs

Base القاعدة

منظم شدة الضوء
Light volume

عدسات المجهر

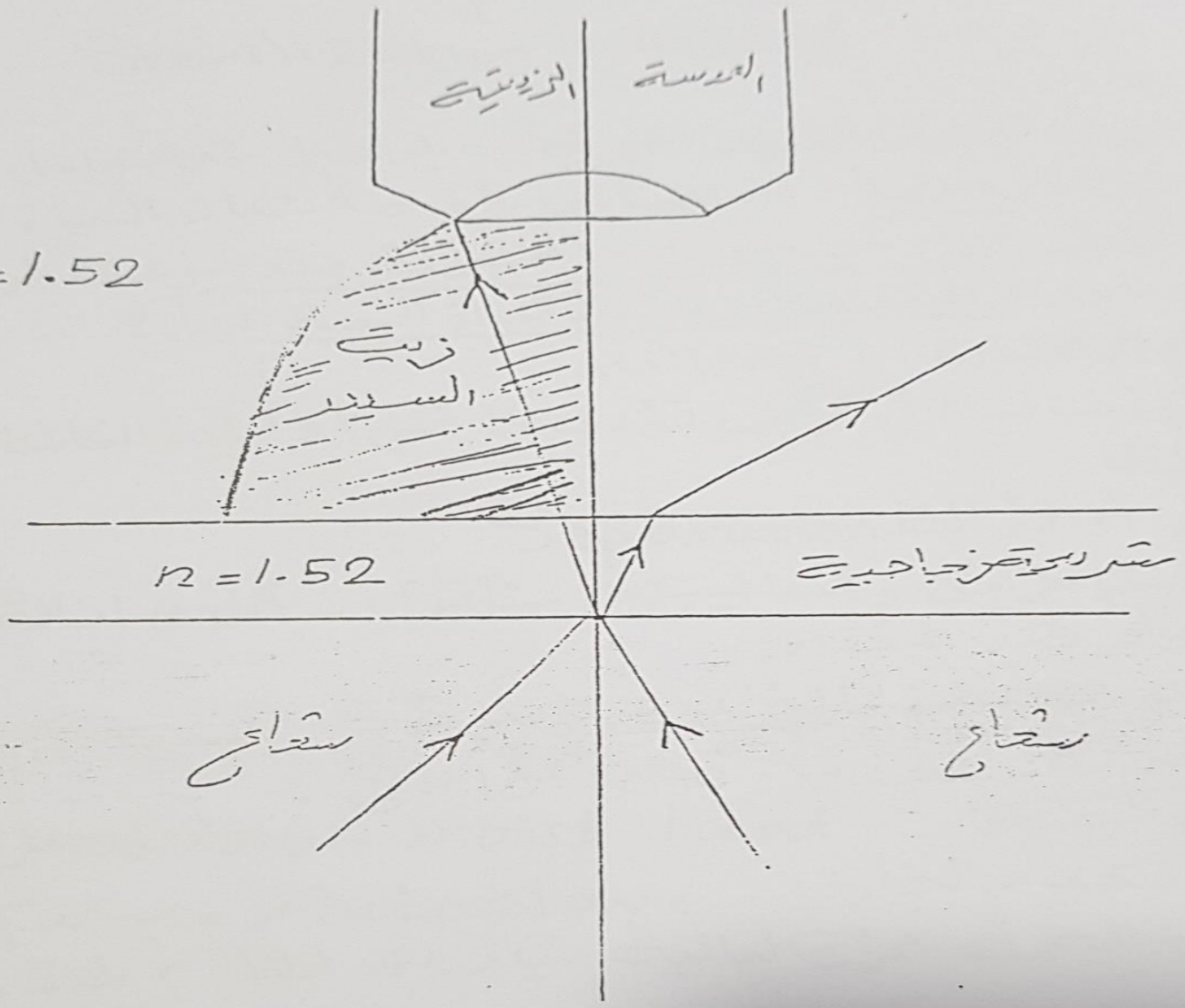
العدسة الزيتية

- يمكن تمييز العدسة الزيتية عن بقية العدسات الشيئية حيث يكتب عليها كلمة Oil أو في بعض الأنواع بوجود حلقة سوداء تحيط بها.
- إن العدسة الزيتية Oil immersion lens لا يمكن استعمالها إلا بوضع قطرة من زيت السيدر Ceddar oil على العينة فوق الشريحة لمنع انكسار الضوء عن مساره وتشتته ومنع انحرافه خارج العدسة العينية مما قد يتسبب في عدم رؤية العينة بصورة واضحة لأن مسافة عمل العدسة الزيتية تبلغ 0.13 ملليمتر وان فتحة هذه العدسة صغيرة جداً ويرجع سبب استخدام زيت السيدر تحديداً إلى إن معامل انكساره يبلغ 1.52 وهو مساو لمعامل انكسار الضوء للشريحة الزجاجية.
- تقدر قوة تكبير المجهر = قوة تكبير العدسة العينية X قوة تكبير العدسة الشيئية
  أما قوة تكبير لعدسات الشيئية فهي مدونة على العدسات نفسها.
- ينبغي تنظيف العدسة الزيتية بعد الانتهاء من استعمال المجهر بالزايلول أو الزايلين Xylene وورق النشاف Lens paper لإزالة الزيت من العدسة .

آلية عمل المجهر الضوئي

يكبر المجهر حجم الأجسام عن طريق آليةٍ معقدةٍ من تتالي العدسات، في البداية توجد عدستان رئيسيتان؛ **الأولى** هي العدسة المتواجدة من جهة العين وهي العدسة التي ننظر من خلالها أي العدسة العينية، **والثانية** هي العدسة المتواجدة من جهة العنصر الذي نريد رؤيته أي عدسة بداية وعدسة نهاية مع مصدرٍ للضوء إما مرآة أو مصباح كهربائي.

تقوم العدسة الخاصة بالعنصر بإنشاء صورة حقيقية مكبرة للعنصر، ثم مرةً أخرى يتم تكبير هذه الصورة عن طريق العدسة العينية لتنتج صورة افتراضية أكبر للعنصر، وهذه الصورة يمكن رؤيتها عن طريق العين المجردة عبر العدسة العينية بصورةٍ واضحةٍ مشرقةٍ بسبب وجود المنبع الضوئي.


العدسة
الزيتية
n = 1.52
زيت
السيدر
n = 1.52
سقاع
سقاع

المجهر الإلكتروني

هو نوع آخر من المجاهر التي لا تعتمد على الضوء، بل تستخدم الإلكترونات ذات الطول الموجي القصير في تكبير الأشياء، وتصل قوة تكبيرها العالية إلى 1000 ضعف قوة تكبير المجاهر الضوئية.

أنواع المجاهر الالكترونية:

المجهر الإلكتروني الماسح: يعمل هذا المجهر على تسليط تيار من الإلكترونات على السطح الخارجي للخلية، فهو يختص بدراسة الأجزاء الخارجية، لتتكون صورة ثلاثية الأبعاد تصل قوة تكبيرها إلى 50000 مرة.

المجهر الإلكتروني النافذ: يتم تسليط التيار الكهربائي أو الإلكتروني على كامل الخلية، حيث يختص هذا النوع بدراسة الجزء الداخلي للخلية.

Sterilization التعقيم

هي عملية قتل أو إزالة الكائنات الحية المجهرية من الوسط المراد تعقيمه

ويمكن أجراء عملية التعقيم بعدة طرق تتبع أحد الأسس التالية

1-التعقيم بالطرق الفزياويــة PHYSICAL METHODS

2 -التعقيم بالطرق الكيميائية CHEMICAL MEHODS

اولا : العوامل الفزياوية استخدام الحرارة استخدام الترشيح استخدام الإشعاع

استخدام الحرارة :آن لكل كائن حي درجة حرارة مثلى وصغرى وعظمى للنمو وعند زيادة درجة الحرارة فوق الحد الأعلى يموت الكائن المجهري وعند انخفاضها دون الحد الادنى يحصل تثبيط للكائن المجهري وقد تسمى هذه العملية(الحفظ) وهذه الطريقة هي المفضلة على غيرها إلا في حالة وجود ما يمنع استعمالها ويمكن استخدمها بطريقتين أساسيتين

أ -الحرارة الجافة

الحرارة الجافة تقتل الحرارة الجافة الكائن المجهري من خلال أكسدة المكونات الكيمائية للخلية.وهناك عوامل محددة منها أن الحرارة العالية المستخدمة قد تكون ضارة للمواد المراد تعقيمها ويمكن استخدام الحرارة الجافة بعدة طرق ومنها

الحرق وتستخدم هذه الطريقة في تعقيم ابر التلقيح في المختبر حيث تعرض إلى أللهب المباشر لمصباح (بنزن) إلى درجة الاحمرار ويراعى عند استخدام هذه الطريقة أن يتم الحرق في المنطقة الباردة من ألهب لمنع تطاير الأحياء المجهري.

التلهيب الكحولي وتستخدم هذه الطريقة لتعقيم الملاقط والمشارط والمقصات حيث تغمر الأداة في الكحول الاثيلي تركيز ثم تعرض إلى أتلهب المباشر فيحترق الكحول ونتيجة ذلك ترتفع الحرارة بشكل كبير وتتم عملية التعقيم.

أفران الهواء الساخن حيث تستخدم أفران تعمل بالكهرباء أو الغاز لتعقيم الزجاجيات المختلفة (اطباق بتري,الماصات,الدوارق)وتكون درجة حرارة التعقيم 160-180 ولمدة 2-3ساعة ويتم حساب وقت التعقيم عندما تصل درجة الحرارة الحد المطلوب.

الحرق
Incineration

التلهيب الكحولي
Alcohol-flamed

الهواء الساخن
Hot air

ب- التعقيم بالحرارة الرطبة: وهي من اكثر الطرق فعالية في قتل الأحياء المجهرية وهي كذلك أكثر فعالية من الحرارة الجافة وهي تقتل الكائن المجهري من خلال تخثير البروتين الخلوي ويستخدم الحرارة الرطبة بعدة طرق ومنها

البسترة سميت بذلك نسبة إلى لويس باستور الذي اكتشف إن التسخين البسيط عند درجة حرارة يمنع فساد النبيذ والبيرة وتستخدم اليوم بشكل واسع لتعقيم الحليب حيث يسخن لدرجة حرارة 60 ولمدة عدة دقائق .

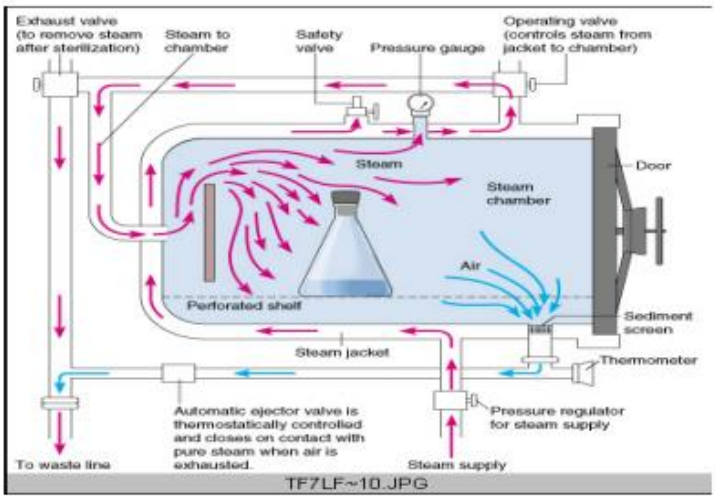
الغليان وتستخدم هذه الطريق بشكل واسع لتعقيم المقصات والمشارط .....الخ .أن الوقت اللازم للتعقيم ربما يكون أجزاء الثانية وهذا وقت كافي لقتل الخلايا الخضرية ولكن هناك تحفظات كونها لا تقتل الأطوار البوغية

التبخير عند (100 م) تستخدم هذه الطريقة لتعقيم الأوساط الزرعية التي تتحطم عند درجة حرارة اعلي من 100 م وستخدم لهذا الغرض جهاز يسمى المبخرة وهي عبارة عن صندوق معدني يحتوي خزان للمياه ومصدر حراري ورفوف للمواد المراد تعقيمها أن اضمن طريقة في استخدام المبخرة هي التعقيم المتناوب وهو تبخير لمدة 3 أيام على100م ففي اليوم الأول تقتل الخلايا الخضرية وعند ترك الوسط الزرعي في الحاضنة عند حرارة الغرفة لمدة 24ساعة يتم إنبات الطور البوغي الذي يقتل في تبخير اليوم الثاني أما تبخير اليوم الثالث فهو إجراء وقائي

التعقيم بالبخار تحت الضغط :وهي أكثر الطرق المعتمدة للتعقيم حيث إن البخار تحت الضغط يولد حرارة أعلى من تلك المحصلة عند الغليان إضافة إلى التسخين الأسرع والنفاذية الأعلى للحرارة الرطبة

والجهاز المستخدم هو جهاز AUTOCLAVE وهو عبارة عن وعاء من الصلب السميك وله غطاء محكم ومزود بحوض للماء ومصدر حراري ومقياس للحرارة ومقياس للضغط وصمام تهوية وعند التعقيم يتم مراعاة الأتي

1. أن يكون مستوى لماء في الجهاز عند الحد المطلوب
2. يترك صمام التهوية مفتوح إلى حين خروج البخار من فتحة صمام التهوية
3. يتم حساب مدة التعقيم عندما تصل الحرارة إلى 120 والضغط 1,5
4. بعد انتهاء فترة التعقيم لا يفتح الجهاز الأبعد آن ينخفض الضغط داخل الجهاز إلى الضغط الجوي الاعتيادي حيث يفتح صمام التهوية أولا ثم يفتح غطاء الجهاز وذلك لتجنب الغليان المفاجئ للسوائل



الإشعاع RADIATION تتم الاستفادة من التأثير الضار لبعض أنواع الأشعة في عملية التعقيم وهناك نوعين من الأشعة التي تستخدم في التعقيم

1 – الأشعة المؤينة: مثل الأشعة السينية وأشعة كاما وسميت بهذا السم لأنها تمتلك طاقة كافية لسحب الإلكتروني بعيدا عن الجزيئات وجعلها مؤينة إضافة إلى خلق جذور حرة والتي تسبب أنواع مختلفة من التحطيم للخلايا إن أشعة كاما هي الأكثر استخداما في هذا المجال ويتم الحصول عليها من نظير الكوبالت 60 وهي قاتلة لجميع أنواع الحياة إضافة إلى قابليتها العالية للاختراق ولهذا تستخدم على نطاق واسع في التعقيم التجاري للمواد الطبية والصيدلانية والغذائية ويسمى هذا التعقيم بالتعقيم البارد وذلك لعدم ارتفاع درجة حرارة المواد المعقمة ولهذا تستخدم في تعقيم المواد الحساسة للحرارة

2 – الأشعة غير المؤينة: وهي تمتلك طاقة اقل من الأشعة المؤينة بحيث لا يمكنها تأين المركبات ألانها تنشط ألالكترونات وترفع من مستوى طاقتها ومثال على ذلك الأشعة فوق البنفسجية في الطول الموجي 150–390 نانوميتر وأقوى طول موجي قاتل هو260نانوميتر

إن تأثيرها القاتل يأتي من خلال امتصاصها من الخلية وخصوصا D N A الذي يحصل فيه اغلب التحطيم مما يودي إلى حدوث طفرات مميتة أثناء استنساخ DNAوتصنيع البروتين الخلوي

ولا تمتلك هذه الأشعة قابلية لاختراق المادولهذا تستخدم في التعقيم السطحي للمختبرات وصالات العمليات وغرف مصانع الأدوية والألبان.

الترشيحFILTERATION :تستخدم هذه الطريقة في تعقيم المواد التي لا يمكن تعقيمها بالطرق الاعتيادية وخصوصا السوائل الحياتية (إنزيمات مضادات حيوية فيتامينات ...الخ) إضافة إلى الهواء ومن هذه المرشحات

1–مرشحات الخزف الدياتومي ومنها مرشح بيركفياد

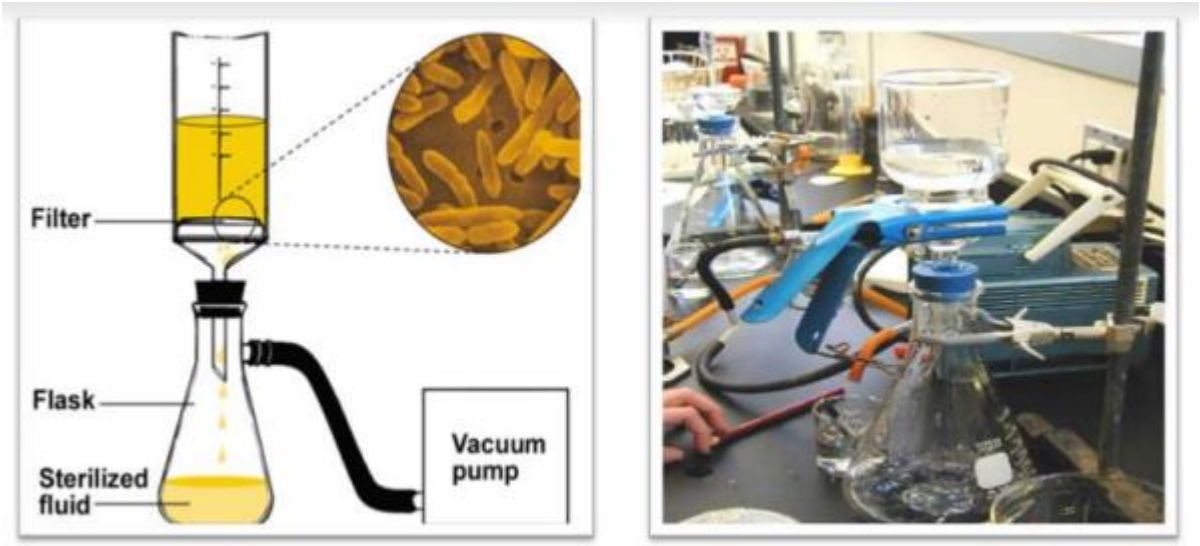
2–مرشحات الخزف غير المزجج ومنها مرشح تشامبرلاند

3–مرشحات الاسبست ومنها مرشح زايتس

4–المرشحات الغشائية ومنها مرشح استرات السيليلوز

إن عملية الترشيح لا تعتمد على أقطار ثقوب المرشح والتي تتراوح وبين مايكرون إلى عدة مايكرونات بل على حدوث نوع من التجاذب الكهروستاتيكي بين المرشح والكائن المجهري مما يودي إلى حجز الكائن المجهري ومعظم المرشحات تصنع بشكل أقراص مختلفة الأقطار ويجري تثبيتها على قمع والذي بدوره

تثبت على دورق ويجب تعقيم المرشح قبل الاستعمال ومما يجدر بالذكر إن بعض المرشحات تستخدم مرة واحدة فقط



التعقيم بالطرق الكيميائية :هناك العديد من المواد الكيماوية لهل خاصية القتل للجراثيم ألا أن القليل منها يستخدم في هذا المجال هذا إضافة إلى أن استخدامها أكثر تعقيدا من العوامل الأخرى بسبب السمية العالية أو بسبب عامل التركيز المستخدم وهناك عدة صفات يجب توفرها في المادة الكيميائية المستخدمة وهي

1–لها القابلية على القتل أو التثبيط في تراكيز واطئة

2–لها القابلية على الذوبان في الماء أو المذبيات الأخرى

3–لها قابلية اختراق الأغشية والنفاذ منها

4–أن تكون متوفرة بأسعار مقبولة

ومن أهم المجامع الكيميائية المستخدمة في هذا المجال هي

1. المركبات الفينولية: وهى عوامل مطهرة فعالة جدا حيث أن محلول فينول يقضي بسرعة على الخلايا الخضرية ومن مركبات هذه المجموعة الكريزول وهكسيل فينول وتستخدم أما كعوامل مثبطة أو عوامل قاتلة وذلك حسب التركيز المستخدم. إن طبيعة التأثير المثبط أو القاتل لهذه المركبات غير واضح بدقة ولكنها قد ترسب البروتين الخلوي او تثبط الأنزيمات أو تعمل على تسريب أحماض الأمينية إلى الخارج ويعتقد إن التأثير القاتل يعود إلى التحطيم الفيزيائي للغشاء الخلوي الذي يقود إلى هذه التأثيرات

2. الكحوليات: ومنها الكحول الاثيلي والمثيلي والبروبيلي. والكحول الاثيلي أكثرها شيوعا حيث يستخدم في التعقيم السطحي للأيدي ومناضد العزل والأجزاء النباتية قبل عملية العزل منها حيث يستعمل بتركيز 70% إن التأثير القاتل يعود إلى إحداث تغيرات في بروتين الخلية وإذابة الدهون من غشاء الخلية كما تعمل على سحب الماء من الخلية ومن هنا ندرك قلة تأثير الكحول المطلق على الخلايا الجافة لعدم وجود الرطوبة ,ولعدم قدرته اختراق جدار الخلية.

3. الهالوجينات :يعد الكلور أكثر الهالوجينات استخداما حيث يستخدم بشكل غاز أو بشكل سائل (غاز مضغوط) وهناك مركبات للكلور أسهل استخداما من الكلور الحر مثل الهايبوكلورايت حيث تستخدم على هيئة هايبوكلورارت الصوديوم و الكالسيوم واهم استخدام للكلور هو تعقيم مياه الشرب والتعقيم السطحي للأجزاء النباتية قبل عملية العزل منها. إن التأثير القاتل يعود إلى كون الكلور من العوامل المؤكسدة القوية حيث أيون الكلور عامل سام لبروتوبلازم الخلية إضافة إلى أن التحلل المائي للكلور هو حامض الهايدروكلوريك وذرة أوكسجين والتي هي عامل مؤكسد قوي جدا.

مبادئ وقاية النبات (أمراض النبات)
الدرس العملي الثاني

مختبر أمراض النبات

يعد مختبرات أمراض النبات المختبر الرئيسي في جميع المؤسسات التعليمية او البحثية التي تهتم بأمراض النبات وإعداد هذا المختبر من أولويات العمل لدراسة أمراض النبات بهدف تحديد المسببات المرضية والتعرف عليها ومن المهم أن تخصص بناية للمختبر بمساحة كافية والتصميم المناسب الذي بلائم العمل بشكل مريح لتنفيذ التجارب وللتدريس ويؤثث بأعداد كافية من "الطاولات المختبرية" Benches المزودة "بمغاطس" Sinks والتي تستخدم لوضع الأجهزة والمعدات المختبرية عليها ولتنفيذ التجارب ويزوّد المختبر بشبكة ماء صافي مع نظام إنارة جيدة وأنظمة للتدفئة والتبريد

مختبر أمراض النبات والسلامة فيه

يتطلب العمل في مختبر أمراض النبات دراية كافية بمحتوياته ومعداته ونوعية المواد المتداولة فيه وأسلوب التعامل مها بما يضمن سلامة العاملين

- ارتداء المعطف النظيف قبل الدخول للمختبر ويجب غلق المعطف.
- الحضور إلى المختبر في موعد الدرس
- عدم الأكل والشرب أو جلب الأغراض الشخصية داخل المعمل
- الانتباه لشرح التجارب المختبرية وتنفيذها بدقة
- تنظيف طاولة العمل Bench بالمطهر المناسب قبل وبعد العمل.
- يجب إبلاغ المشرف على المختبر في حال تلوث أو انسكاب أي مادة او كسر أي أداة زجاجية
- عدم حمل العينات أو المزارع الميكروبية خارج المختبر
- كتابة جميع البيانات التوضيحية على كل عينة
- الحرص على نظافة وسلامة الأجهزة والمعدات
- غسل اليدين جيدا بالماء والصابون قبل مغادرة المختبر يجب التعامل مع جميع المواد الكيميائية بحذر والتعامل معها حسب توصيات الصانعين
- عدم لمس العينين أو استخدام الفم أثناء العمل داخل المختبر
- كافة أدوات المختبر المستخدمة من أنابيب وماصات وشرائح وماصات توضع في الاواني الخاصة بها لحين تنظيفها
- تلقح مزارع الأحياء الدقيقة الخطرة داخل الكابينة الواقية Safety cabinet مع ارتداء القفازات الواقية

مبادئ وقاية النبات (أمراض النبات)

الدرس العملي الثاني

- في حالة استخدام القفازات الواقية يجب عدم لمس كافة محتويات المختبر حتى لا تتلوث
- العينات والمزارع الملقحة والقفازات الملوثة المراد التخلص منها توضع في الانية المحددة لذلك حتى يتم تعقيمها والتخلص منها بالطرق الصحيحة المناسبة
- غسل اليدين جيدا بالماء والصابون قبل مغادرة المختبر يجب التعامل مع جميع المواد الكيميائية بحذر والتعامل معها حسب توصيات الصانعين
- عدم لمس العينين او استخدام الفم أثناء العمل داخل المختبر
- تحرق ابرة التلقيح Loop او الإبرة الناقلة قبل وبعد الاستعمال
- المجهر Microscope يجب صيانته والتعامل معه بدقة, ويجب تنظيف العدسات وازالة اثار زيت السيدر وعدم ترك الشريحة على المجهر وغلق المجهر بعد الانتهاء من الفحص
- عدم رمي المواد التالفة والاوساخ في حوض الغسيل
- الحرص على اطفاء اللهب بعد الانتهاء من العمل

حال وقوع مزارع ميكروبية حية, يتبع الاتي

- اخبار المشرف بأسرع وقت
- وضع منشفة ورقية او قطعة قطن فوق المادة المسكوبة
- سكب مادة مطهرة بكمية وافرة فوقها
- رفع المنشفة او القطن بعد 15 دقيقة وضعيها في الوعاء المخصص

الأجهزة والمعدات المستعملة في أمراض النبات

الحاضنة Incubator

وهي جهاز يمكن التحكم من خلاله بدرجة الحارة المطلوبة لتمنية المسببات المرضية وحضنها لفترة محدودة عند درجة حرارة ثابتة وغالبا ماتكون 25 ± 2 سيليزية للفطريات المسببة لامراض النبات ومن المفضل استخدام حاضنات توفر مدى حراري واسع لتوفير درجات الحرارة اللازمة للدراسات الخاصة بتحديد المدى الحاري الملائم لنمو المسببات المرضية المختلفة .

مبادئ وقاية النبات (أمراض النبات)

الدرس العملي الثاني

اسم الجهاز

- غرفة الزرع ذات الجو المعقم Laminar air flow cabinet
- المعقام Autoclave
- حاضنة Incubator
- حاضنة مبردة Cooled incubator
- جهاز تقطير Distilator
- فرن كهربائي Oven
- رجّاج مغناطيسي ذو سطح ساخن Magnetic stirrer , hot plate
- هزّاز منضدي Shaker
- مقياس الدالة الحامضية pH meter
- جهاز انتباذ منضدي Bench top centrifuge
- حمام مائي Water bath
- حمام زيتي Oil bath
- جهاز المطياف بالأشعة فوق البنفسجية U.V. Spectrophotometer
- مجاهر ضوئية Microscopes
- مجاهر بسيطة Binoculars
- مشراح فائق Ultra microtome
- مجهر ضوئي مزود بكاميرا رقمية Microscope with digital camera
- خلاط كهربائي Blender
- ثلاجة Refrigerator
- مجمدة Deep freezer
- ميزان حساس كهربائي Balance
- محارير زئبقية Thermometers
- عدسات تكبير يدوية Lenses
- هاونات ومدقات خزفية مختلفة الأحجام Mortar & pistils
- ماصات دقيقة بأحجام مختلفة Micropipette

مبادئ وقاية النبات (أمراض النبات)

الدرس العملي الثاني

- ثاقبة فلين Cork borer
- مرشحات دقيقة Millipore filters
- ورق ترشيح بحجوم مختلفة Filter papers
- غشاء البارافلم Para film

الأوساط الغذائية CULTURE MEDIA

الوسط الغذائي: هو المادة أو مجموعة المواد التي يمكن للكائن الحي المجهري من النمو عليها .

والوسط الغذائي يجب أن يوفر المتطلبات آلاتية

1-أن يوفر مصدرا لعنصر الكاربون, أن الكائنات الحية المجهرية تختلف في صورة تجهيز الكابون فبعضها يكتفي بصورة بسيطة لعنصر الكاربون بهيئة CO_2 أو في صورة أكثر تعقيدا مثل الكاربوهيدرات .

2-أن يوفر مصدرا لعنصر النتروجين, أن الكائنات الحية المجهرية تختلف في صورة تجهيز النتروجين فبعضها ذات القدرة البناية العالية يكتفي نتروجين الهواء الجوي مثل بعض أنواع بكتريا التربة واقسم الآخر تحتاج صورة من عنصر النتروجين اكثر تعقيدا مثل ألاحماض الأمينية والبروتينيات

3-أن يوفر مصدرا لعناصر Na ,K ,Fe ,Mn في صورة تجهيز أملاح أو في صورة أكثر تعقيدا

4-أن يوفر الفيتامينات ومنضمات النمو للكائن المجهري

5-أن توفر الماء ألازم للنمو هذا بل إضافة إلى أن الماء هو وسيلة نقل المواد من والى الخلية

6-مصدر لعنصر الكبريت والفسفور حيث يدخل الكبريت في تصنيع الأحماض الأمينية مثل أحماض سستين CYSTINE وميثايونين METHIONINأماعنصر الفسفور فهو ضروري في عمليات تخليق الأحماض النووية والنيوكليوتيدات إضافة آلي الليبيدات المفسفرة

تقسيم الكائنات الحية المجهرية تبعا لطريقة تغذيتها أو معيشتها

إن الغرض من دراسة هذا التقسيم هو لتجديد نوع الوسط الزرعي الملائم لكل نوع من أنواع الكائنات الحية المجهرية .وهناك أربعة مجاميع في هذا المجال وهي

1-كائنات اجبارية الترمم OBLIGATE SAPROPHYTES

وهي الكائنات المجهرية التي تعتمد في تغذيتها على المواد العضوية الميتة فقط ولا يمكن أن تتغذى على نسيج حي

2- الكائنات اختيارية الترمم FACULTATIVE SAPROPHYTES

مبادئ وقاية النبات (أمراض النبات)

الدرس العملي الثاني

وهي الكائنات المجهرية التي تعتمد في تغذيتها على نسيج حي ويمكن أن تتغذى على المواد العضوية الميتة أيضا في بعض الحالات

3- الطفيليات الإجبارية التغذية OBLIGATE PARASITES

وهي الكائنات المجهرية التي تعتمد في تغذيتها على المواد الحية فقط ولا يمكن أن تتغذى على مواد عضوية ميتة مطلقا

4 – الكائنات اختيارية التطفل FACULTATIVE PARASITES

وهي الكائنات المجهرية التي تعتمد في تغذيتها على المواد العضوية الميتة ويمكن أن تتغذى على مادة عضوية حية أيضا في بعض الحالات. إن المجامع 1,2,4 يمكن تنميتها في المختبر على الأوساط الزرعية المكونة من مواد عضوية ميتة أما المجموعة الثالثة فهي تحتاج إلى أوساط وطرق زرعيه خاصة

أنواع الأوساط الزرعية CULTURE MEDIA TYPES

هناك ثلاثة أنواع من الأوساط الزرعية وهي

الأوساط الزرعية الطبيعية NATURAL MEDIA : وهي مستخلصات نباتية أو حيوانية وتمتاز بما يأتي

1) معقدة وغير معروفة التركيب
2) تماثل الوسط الطبيعي الذي ينمو عليه الكائن المجهري
3) تحتوي على العناصر والفيتامينات التي لا يمكن توفيرها في الأوساط الأخرى
4) سهلة التركيب ورخيصة الثمن

من الأمثلة عليها وسط البطاطا الخضراوات والفاكهة والمرق المغذي

الأوساط الزرعية الصناعيةSYNTHETIC CULTURE MEDIA : وتتكون من مواد عضوية وغير عضوية وتمتاز بما يأتي

1- معروفة التركيب كما ونوعا

2-تستعمل في دراسة تأثير التغذية على الكائن المجهري

من الأمثلة عليها وسط تشابك دوكسCZAPEK DOX

الأوساط الزرعية الطبيعية الصناعية SYNTHETIC CULTURE MEDIA– NATURAL

وهي خليط من النوعين السابقين وذلك لاحتوائها على مواد طبيعية غير معروفة التركيب إضافة ألي مواد معروفة التركيب وهي الأكثر شيوعا في الاستخدام ومن الأمثلة عليها وسط اكار البطاطا والدكستروزPDA

مبادئ وقاية النبات (أمراض النبات)

الدرس العملي الثاني

أشكال الأوساط الزرعية CULTURE MEDIA FORMS

1 الأوساط الصلبة SOILD MEDIA

وهي أوساط صلبة طبيعيا كشرائح الجزر أو البطاطا

2- الأوساط السائلةLIGUID MEDIA

وهي مستخلصات نباتية أو حيوانية مثل الحليب أو الدم أو مستلخص البطاطا أو الشعير .....الخ وتمتاز بما يأتي

سهولة التحضير والاستخدام والنقاوة العالية ولكن يعاب عليها سهولة تلوثها وعدم إمكانية الحصول على مزرعة نقية للكائن المجهري عند استخدامها

3- الأوساط الصلبة القابلة للإسالة

وهي الأكثر شيوعا في الاستخدام ومن الأمثلة عليها وسط اكار البطاطا والدكستروز وهي أوساط سائلة مضاف إليها مادة تصلبيه مثل الاكار ولهذا تكون هذه الأوساط صلبة في درجة حرارة الغرفة وتصبح سائلة عند رفع الحرارة إلى 98م وتعود إلى الحالة السائلة عند انخفاض الجرارة إلى 48م تقريبا وهذه الميزة توفر سهولة التعامل مع الوسط في عمليات تعقيم واستخدام الوسط

المواد التصلبية:وهي المواد التي تضاف إلى الوسط الزرعي السائل لتحوله إلى وسط صلب قابل للإسالة ومن أهم هذه المواد

الاكار AGAR : وهو مادة كاربوهيدراتية معقدة التركيب تستخرج من بعض أنواع الطحالب البحرية وهو شائع الاستخدام للأسباب آلاتية

1 - يتحمل درجة حرارة التعقيم بدون أن يتلف

2 لايمكن لآي نوع من الأحياء المجهرية استخدامه كمادة غذائية

3 ينصهر عند 98م ويتصلب عند 45الى48م وهذا يوفر مرونة في الاستخدام

4 يضاف بنسبة منخفضة 1.5الى2% إلى الوسط

طرق دراسة امراض النبات

للتعرف على الحالة المرضية للنبات يجب إجراء بعض الدراسات في مكان ظهور الإصابة وهذه الدراسات تنقسم الى نوعين :

أ - دراسة المرض في الحقل :

وعند إجراء دراسة أو تشخيص المرض حقليا ، لابد من الاهتمام بمعرفة النقاط الآتية:

1- معرفة وتسجيل أعراض الإصابة في الحقل سواء كانت على المجموع الخضري أو الجذري أو كلاهما ومقارنتها بالنباتات السليمة.

2- معرفة تاريخ ظهور الإصابة.

3- مدى انتشار المرض في الحقل.

4- تحديد نوع التربة والمحاصيل السابقة.

5- هل سبق ظهور المرض في نفس المكان من الحقل.

6- هل تقتصر الإصابة على صنف واحد دون آخر أم انه عام الانتشار.

7- معرفة شدة الإصابة Severity ومقدار الخسائر الناجمة عنها.

8- معرفة المعاملات الزراعية والكيميائية.

قد يساعد وجود الأعراض والظروف البيئية المختلفة في الحقل والتي تحيط النبات ، على التعرف على المرض ، غير أن ذلك لا يعتبر كافيا لتحديد المرض بسبب أن كثيرا من الأمراض ذات أعراض متشابهة ، وهذا يجعل الدراسة المختبرية ضرورة حتمية

ب – دراسة المرض في المختبر:

لدراسة وتشخيص الحالة المرضية لنبات معين ، في حالة تعذر تشخيص المرض حقليا ، يراعى اخذ نماذج مرضية من الحقل وجلبها الى المختبر ، مع الأخذ بالاعتبار النقاط الآتية عند ذلك

:1- يفضل اخذ نباتات كاملة أو أجزاء نباتية تظهر عليها الأعراض المرضية، وتؤخذ في نفس الوقت نباتات سليمة من اجل المقارنة.

2- يفضل اخذ النموذج النباتي الكامل مع جزء من التربة ويوضع في كيس من البلاستك حتى لا يتعرض للجفاف أثناء النقل.

3- يفضل إجراء الفحص المختبري للعينة او النموذج النباتي المصاب حال وصوله الى المختبر، أو أن يحفظ في الثلاجة لحين الفحص.

البيئات المغذية Media

يتحتم على الباحثين في مجال الفطريات التعرف على ماهية البيئات الغذائية المستخدمة في عزل الفطريات المختلفة والتي تنقسم بشكل عام إلى ثلاثة أنواع رئيسية وهى:

1- بيئات طبيعية Natural media

2- بيئات شبه مركبة Semi synthetic media

3- بيئات مركبة Synthetic media

1- البيئات الطبيعية Natural media

هي بيئات تتكون من مواد طبيعية غير معروفة التركيب ذات أصول نباتية أو حيوانية ومن أمثلتها بيئة البطاطس ومستخلص المولت ومستخلص الخميرة والببتون وبيئة الذرة غيرها من مستخلصات الأوراق أو الثمار النباتية والتي تتميز بسهوله تحضيرها وصلاحيتها لنمو العديد من الفطريات.

بيئة آجار البطاطا Potato agar

وتتكون من:

بطاطا 200 جرام.

آجار 15-20 جرام.

ماء 1000سم3.

ويتم تحضيرها بتقشير البطاطا وغسلها جيداً وتقطيعها إلى قطع صغيرة ووزنها ثم وضعها في كأس زجاجي ويضاف عليها كمية كافية من الماء وتغلى لمدة نصف ساعة ثم تصفي جيداً باستخدام قماش شاش نظيف ثم يكمل المستخلص الى 1000سم ويضاف الآجار ثم تعقم.

بيئة آجار المولت Malt extract agar

وتتكون من:

مستخلص مولت 200 جرام.

آجار 15-20 جرام.

ماء 1000سم3.

2- البيئات شبه المركبة Semi synthetic media

هى بيئات تتكون من مواد طبيعية غير معروفة التركيب ومواد أخرى محددة التركيب ومن أمثلتها بيئة أجار البطاطا والدكستروز .

بيئة آجار البطاطا والدكستروز Potato dextrose agar

وتتكون من:

بطاطا 200 جرام.

آجار 15-20 جرام.

ماء 1000سم3.

3- البيئات المركبة Synthetic media

تتكون هذه البيئات من مواد عضوية أو غير عضوية معروفة التركيب الكيمائي وبتركيز معلوم ويجب أن تكون تلك المواد على درجة عالية من النقاوة وصالحة للإغراض المختبرية ومن أمثلتها بيئة ريتشارد وبيئة تشابك. وهناك العديد من أنواع البيئات المستخدمة لعزل الفطريات منها ما هو متخصص يصلح لعزل أنواع بعينها من الفطريات ومنها ما هو صالح لعزل العديد من الأنواع الفطرية المختلفة.

عزل الكائنات المسببة للأمراض

Isolation of Disease - Causing Organisms

يتطلب تشخيص مرض معين التعرف على العامل المسبب للمرض عن طريق إجراء عملية العزل وهي خطوة تسبق عملية التشخيص، يتم فيها أخذ عينات من المسبب المرضي، بطريقة تتلاءم مع خصائص كل مسبب مرضي ومع طرق الإصابة ومع الأجزاء النباتية التي ينمو عليها

من المعلوم أنه ليس كل العوامل الممرضة هي عوامل حيوية ، كما أنه ليس كل العوامل الحيوية يمكن عزلها على وسط غذائي . فالفيروسات والكائنات الشبيهة بالميكوبلازما (MLO) وكثير من الفطريات مثل فطريات البياض الدقيقي والأصداء لا تنمو على البيئات الغذائية المعتادة ، ولكنها تنتج تراكيب ثمرية على العوائل المصابة ، حيث يمكن التعرف عليها بالتشخيص المباشر . ويقتصر عزل الكائنات المسببة للأمراض على كل من الفطريات والبكتيريا الاختيارية التطفل .

وهناك بعض الحقائق المهمة يجب أخذها في الاعتبار قبل الشروع في عملية العزل منها:

1- قد يكون المسبب داخل الجزء المصاب لا يكون قد أنتج تراكيب ثمرية أو نموات واضحة.
2- وإذا كانت الأعراض من نوع موت الخلايا necrotic type فقد يكون المسبب ما يزال في الأنسجة الميتة مختلطا بكثير من المترممات ، لأن الخلايا التي تموت بفعل العامل المسبب الرئيسي سرعان ما تستعمر بكائنات غير ممرضة مختلفة . والتفريق بين المسبب الرئيسي والمترممات أمر ضروري . لذلك - يجب استبعاد الأنسجة الميتة لأن المسبب المرضى يكون في الغالب في الأنسجة الانتقالية بين الأنسجة السليمة والأنسجة الميتة
3- هناك أيضا الكثير من الملوثات السطحية والتي يمكن أن تتواجد على هذه الأنسجة الانتقالية ولهذا يعد من الضروري جدا إتباع التعقيم السطحي للأنسجة التي سيتم العزل منها كذلك يجب العزل من الأنسجة حديثة القطع من النبات لأن معظم الأجزاء المصابة تجتاحها المترممات فور قطعها من النبات .
4- المسببات المرضية التي تنتج أعراض موت الخلايا necrotic symptom كالذبول أو تلك التي تنتج أعراض عدم موت الخلايا كالتضخمات والتدرنات على الأفرع والسيقان قد يكون المسبب المرضى في الجذور وهو بعيد تماما عن منطقة العرض المرضى
5- الاختيار الصحيح لمنطقة العزل والتعقيم السطحي السليم ينتج مزارع شبه نقية من المسبب المرضى الذي له القدرة على النمو في المزارع الصناعية .

طرق عزل وإنماء المسببات المرضية

العزل من أجزاء نباتية

ويشمل ذلك الأوراق والسيقان والجذر والبذور والثمار ويتم العزل كما يأتي

1- يتم غسل هذه الجزاء في الماء الجاري للتخلص من التربة العالقة وتكون مدة الغسل من بضع دقائق للجزاء الهوائية إلى 1-2 ساعة للجذور

2- تقطع الأجزاء إلى قطع منتظمة الحجم لا تتجاوز أبعادها 1سم .

3- تعقم هذه الأجزاء سطحيا بواسطة الكحول أو هايبوكلورات الصوديوم لمدة 3الى 5 دقائق حسب نوع الجزء النباتي

4- تغسل بالماء المقطر لإزالة اثر المعقم

5 - تنقل الأجزاء بواقع 4 إلى أجزاء إلى أطباق بتري مسبقة الصب تحتوي على الوسط PDA المضاف اليه المضاد الحيوي ستربتومايسين بمعدل 100 ملغم / لتر .

6 - تحضن الأطباق في درجة حرارة 25 ± 2 وتراقب الأطباق بعد 48 ساعة للكشف عن أي نمو فطري.

العزل من التربة Isolation from Soil :

أ- العزل المباشر : تؤخذ أجزاء صغيرة من التربة الزراعية عشوائيا وتوزع على أطباق بتري تحوي على الوسط الغذائي PDA ثم توضع في الحاضنة تحت درجة حرارة 27±2 مºوتراقب لحين ظهور المستعمرات .

ب- العزل بطريقة التخافيف (الأطباق المصبوبة)

1- -تنخل (تغربل) كمية من تربة الحقل بمنخل دقيق للتخلص من الشوائب العالقة بها.

2 -تؤخذ عينة بوزن 10 غرام من التربة أعلاه وتوضع في وعاء بسعة لتر ثم يضاف اليها 90 مل من الماء المعقم ،وتخلط التربة بالماء جيدا ، للحصول على تخفيف بنسبة 10/1 .

3 -ينقل 1 مليلتر من المعلق بواسطة ماصة إلى انبوبة تحوي على 9 مليلتر من الماء للحصول على تخفيف بنسبة 100/1

4 - يؤخذ 1 مليلتر من المعلق الأخير ويضاف الى 9 مليلتر من الماء المعقم للحصول على محلول مخفف بنسبة 1000/1

5 -وباستمرار هذا العمل نستطيع الحصول على تخفيف بنسبة 10000/1 .....الخ

6- ينقل مل من المحلول المعلق بتركيز 100/1 إلى طبق زجاجي يحوي على بيئة اكار الدكستروز والبطاطا PDA ثم يحرك الطبق حركة دائرية حتى يوزع المعلق على سطح البيئة ويكرر نفس العمل بالنسبة للتخافيف الأخرى.

7- توضع الأطباق في الحاضنة على درجة حرارة 27±2 مº لحين ظهور المستعمرات

د – العزل بطريقة المصائد النباتية الحية Trap plants :

وتستخدم لعزل الفطريات الممرضة من التربة ويمكن تلخيص الطريقة بما ياتي

1- تؤخذ عينات من التربة وتوضع في اصص معقمة بالكحول او هايبوكلورات الصوديوم.

2- تزرع التربة بعدد ثابت ومعلوم من بذور النباتات الحساسة كبذور الفجل واللهانة والرشاد والطماطة والبنجر السكري وغيرها بواقع 50 بذرة على الاقل لكل اصيص

3- بعد مضي فترة من الزراعة اسبوع- اسبوعين تحسب نسب الإنبات وعدد البذور المريضة والميتة.
4- تغسل البادرات المريضة والميتة والبذور المتعفنة في الماء الجاري ثم تزرع في أطباق بتري تحتوي على وسط زرعيPDA ثم توضع في الحاضنة درجة حرارة 25 ± 2 سيليزية وتراقب بعد 48 ساعة لملاحظة نمو المستعمرات للتعرف على الفطريات النامية.

طريقة الطعوم Baiting

تشمل الطعوم سيقان النباتات والاوراق وجذور النباتات والبذور لنباتات البطاطا والخيار والنارنج والتفاح وغيرها
ويمكن تلخيص الطريقة بما ياتي
1-تؤخذ عينات من التربة وتوضع في اصص معقمة باالكحول او هايبوكلورات الصوديوم
2- تغمر الطعوم في التربة لمدة أسبوع-أسبوعين
3- تستخرج الطعوم من التربة وتغسل في الماء الجاري ثم تزرع اجزاء منها في أطباق بتري تحتوي على وسط زرعيPDA ثم توضع في الحاضنة درجة حرارة 25 ±2 سيليزية وتراقب بعد 48 ساعة لملاحظة نمو المستعمرات للتعرف على الفطريات النامية
تستخدم هذه الطريقة لعزل *Fusarium* و *Rhizoctonia solani* و *Pythium* و *Phytophthora*

تنقية المسبب المرضى

قد يظهر على البيئة ، أحيانا ، أكثر من كائن حي ، وهنا يلزم فصل الكائن المشتبـه في أنه هو المسبب المرضي في مزرعة نقية .وتعرف المزرعة النقية Pure culture :وهي المزرعة التي تحتوي على نوع واحد فقط من الأحياء المجهرية
ويمكن الحصول على مزارع نقية لمسببات المرضية بعدة طرق منها:

أولا- طرق الحصول على مزارع نقية للفطريات

1 – طريقة التخافيف :

إن هذه الطريقة تتطلب تحضير عدة تخفيفات في أنابيب اختبار معقمة كما يأتي
1- تحضر عدة تخفيفات من معلق الابواغ المراد عزلها وهي 1\10 1\100 1\1000 1\10000 1\100000
2- يتم نقل مقدار صغير من التخفيفات الأخيرة والتي تحتوي على أعداد قليلة من الابواغ إلى أطباق بتري مسبقة الصب
3- تحضن الأطباق على 28 م وتفحص بعد 48 ساعة حيث سوف تكون كل جرثومة مستعمرة واضحة المعالم
4- ينقل جزء من حافة المستعمرات النامية إلى أطباق بتري كل على حدى للحصول على مستعمرات نقية

2 - طريقة طرف الخيط الفطري

تستخدم هذه الطريقة مع الفطريات التي لأتكون ابواغ أو في حالة صعوبة تطبيق الطريقة الأولى ويتم أجرائها كما يأتي

1- يتم تحديد هايفة منعزلة من مزرعة حديثة 24 ساعة بواسطة المجهر
2- بواسطة إبرة يتم قطع الاكار على هيئة قرص في وسطه الهايفة
3- ينقل القرص المحتوي على الهايفة إلى وسط غذائي ملائم لغرض النمو
4- ينمى الحصول على مزرعة نقية بعد 2الى 4 أيام من تاريخ النقل

ثانيا : تنقية البكتيريا

وهناك طريقتين للحصول على مستعمرة بكتيرية مفردة باستخدام الأطباق .

1- طريقة التخطيط على الأطباق Streaked plate method

وفيها تستخدم إبرة التلقيح ذات العقد ، حيث تعقم على اللهب ، ثم يؤخذ ملء عقدة Loop full من المزرعة ثم يخطط سطح البيئة أما بالتخطيط البسيط أو المتعامد كما هو موضح بالشكل . كذلك يمكن استخدام الإبرة نفسها لتلقيح طبق آخر. بعد حوالي 24-48 ساعة نجد أن النمو البكتيري يتصل في بداية التلقيح ثم تتباعد المستعمرات عن بعضها بعد تخفيف اللقاح على الإبرة ويمكن الحصول على المستعمرات البكتيرية الفردية الناتجة من نمو خلية واحدة في صورة نقية

طريقة الأطباق المصبوبة Pour plate method

حيث يتم صهر بيئة الأكار المغذى الموجودة بالأنابيب ، ثم تبرد إلى 45^{5}م ، ثم يؤخذ ملء عقدة من المزرعة ونلقح بها الأنبوبة الأولى ثم ترج جيدا ، ثم يؤخذ ملء عقدة من هذه الأنبوبة وتلقح بها أنبوبة ثانية وهكذا... ثم تصب محتويات كل أنبوبة بعد تلقيحها في طبق بتري معقم ثم تترك حتى تتصلب ثم تحفظ الأطباق في الحضان ، بعد حوالي ا - 2 يوم ستظهر مستعمرات بكتيرية متباعدة عن بعضها ، ويلاحظ أن الطبق الأول يحتوى على مستعمرات أكثر من الثاني والثاني أكثر من الثالث وهكذا .. بعد ذلك تنقل مستعمرة فردية إلى طبق جديد حيث تكون نقية تماما ويتم التأكد من نقائها بالفحص المجهري.

القدرة المرضية Pathogenicity:

هي صفة نوعية للكائن الحي والتي توضح قدرته على إحداث المرض وقد وضعت فرضيات لإثبات القدرة المرضية تسمى فرضيات كوخ وهي:

1. يجب أن تكون هناك حالة مرافقة بين المسبب المرضي والمرض، فأينما تجد المرض يفترض أن تجد المسبب نفسه.
2. عزل المسبب المرضي وتنقيته على مزرعة (وسط غذائي) عندما يكون اختياري التطفل أو الترمم أو يربى على عائل حساس عندما يكون اجباري التطفل وتثبيت صفاته.
3. عدوى النباتات في نفس النوع وصنف النبات الذي عزل منه المسبب الممرض ومتابعة ظهور الأعراض فإذا كانت الأعراض مطابقة للمسبب المرضي الذي يتم العدوى به فان فرضيات كوخ قد أثبتت أن المسبب المرضي هو المسؤول عن الحالة المرضية.

العدوى الصناعية

يتم إجراء العدوى الصناعية ببساطة بنقل جزء من الكائن الذي تم عزله ، سواء غزل فطري أو جراثيم أو خلايا بكتيرية ، ووضعه على أو في الجزء المراد عدواه من النبات السليم.

1-**عدوى الأجزاء الخضرية** (الأوراق والفروع) تتم بعمل معلق من جراثيم أو الغزل الفطري ثم يرش المعلق على الأوراق أو الفروع ، وقد يستلزم الأمر عمل تجريح بسيط للجزء المراد عدواه وذلك باستخدام مسحوق الكاربورانديم

2-عدوى الأجزاء الخضرية بالبكتيريا يتم بتحضير معلق من الخلايا البكتيرية ثم تلقح به النباتات ، وقد يستخدم في ذلك الحقنة Syringe عند حقن المجموع الخضري بالخلايا البكتيرية.

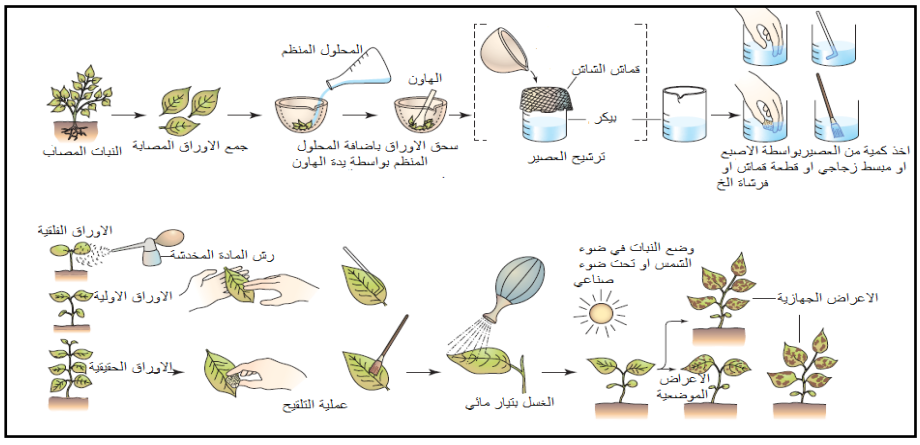
3-عدوى الثمار :تتم برش المعلق الفطري أو البكتيري على الثمرة ، أو بعمل جرح في الثمرة ثم وضع النمو الفطري أو البكتيري تحت سطح هذا الجرح.

في جميع الحالات السابقة يجب حفظ النباتات بعد إجراء العدوى لها تحت ظروف ملائمة من رطوبة وحرارة حتى تتكشف أعراض المرض ، ويتم ذلك بوضعها في بيوت زجاجية خاصة أو قد تحاط الأجزاء التي تم تلقيحها بأكياس بولي إيثلين (نايلون) لمدة 12 - 24 ساعة.

4-عدوى التربة لدراسة أمراض الذبول الطري والذبول الوعائي وأمراض الجذور يتم بعد تعقيمها وتركها لمدة أسبوع للتهوية ثم يتم تلقيح التربة بمعلق من جراثيم الفطر ثم تترك التربة حتى يتم استيطان الفطر بها (ما يقارب الأسبوع) بعد ذلك تزرع بذور النبات بها.

5- **عدوى النبات بالنيماتودا** ، عادة ما تزرع النباتات أولا ثم تعمل دائرة حول النبات بعمق 2-3 سم يوضع بها بيض أو يرقات النيماتودا أو كلاهما معا ثم تغطى هذه الدائرة بنفس التربة أو الرمل ، هذا ويمكن استخدام جذر نبات مصاب في عدوى التربة أو زراعة النبات في تربة ملوثة بالنيماتودا.

6- **العدوى الصناعية بالفايروسات :**هي عملية نقل "العصير النباتي الخام" Crude sap للنبات المصاب إلى النبات السليم بعد فتح جروح دقيقة غير مميتة في بشرة الأوراق أو بكسر شعيرات أوراق النبات السليم. ويطلق على هذا العصير المستعمل مصطلح "اللقاح" Inoculum لأنه يحوي على الجسيمات الفايروسية. تزداد احتمالية نجاح التلقيح



مخطط للعدوى الصناعية بالفايروسات (التلقيح الميكانيكي) من Agrios (2005)

مختبر أمراض النبات

يعد مختبرات أمراض النبات المختبر الرئيسي في جميع المؤسسات التعليمية او البحثية التي تهتم بأمراض النبات وإعداد هذا المختبر من أولويات العمل لدراسة أمراض النبات بهدف تحديد المسببات المرضية والتعرف عليها ومن المهم أن تخصص بناية للمختبر بمساحة كافية والتصميم المناسب الذي بلائم العمل بشكل مريح لتنفيذ التجارب وللتدريس ويؤثث بأعداد كافية من "الطاولات المختبرية" Benches المزودة "بمغاطس" Sinks والتي تستخدم لوضع الأجهزة والمعدات المختبرية عليها ولتنفيذ التجارب ويزوّد المختبر بشبكة ماء صافي مع نظام إنارة جيدة وأنظمة للتدفئة والتبريد

مختبر أمراض النبات والسلامة فيه

يتطلب العمل في مختبر أمراض النبات دراية كافية بمحتوياته ومعداته ونوعية المواد المتداولة فيه وأسلوب التعامل مها بما يضمن سلامة العاملين

- ارتداء المعطف النظيف قبل الدخول للمختبر ويجب غلق المعطف.
- الحضور إلى المختبر في موعد الدرس
- عدم الأكل والشرب أو جلب الأغراض الشخصية داخل المعمل
- الانتباه لشرح التجارب المختبرية وتنفيذها بدقة
- تنظيف طاولة العمل Bench بالمطهر المناسب قبل وبعد العمل.
- يجب إبلاغ المشرف على المختبر في حال تلوث أو انسكاب أي مادة او كسر أي أداة زجاجية
- عدم حمل العينات أو المزارع الميكروبية خارج المختبر
- كتابة جميع البيانات التوضيحية على كل عينة
- الحرص على نظافة وسلامة الأجهزة والمعدات
- غسل اليدين جيدا بالماء والصابون قبل مغادرة المختبر يجب التعامل مع جميع المواد الكيميائية بحذر والتعامل معها حسب توصيات الصانعين
- عدم لمس العينين أو استخدام الفم أثناء العمل داخل المختبر
- كافة أدوات المختبر المستخدمة من أنابيب وماصات وشرائح وماصات توضع في الاواني الخاصة بها لحين تنظيفها
- تلقح مزارع الأحياء الدقيقة الخطرة داخل الكابينة الواقية Safety cabinet مع ارتداء القفازات الواقية
- في حالة استخدام القفازات الواقية يجب عدم لمس كافة محتويات المختبر حتى لا تتلوث

- العينات والمزارع الملقحة والقفازات الملوثة المراد التخلص منها توضــع في الانية المحددة لذلك حتى يتم تعقيمها والتخلص منها بالطرق الصحيحة المناسبة
- غســـل اليدين جيدا بالماء والصـــابون قبل مغادرة المختبر يجب التعامل مع جميع المواد الكيميائية بحذر والتعامل معها حسب توصيات الصانعين
- عدم لمس العينين او استخدام الفم أثناء العمل داخل المختبر
- تحرق ابرة التلقيح Loop او الإبرة الناقلة قبل وبعد الاستعمال
- المجهر Microscope يجب صــيانته والتعامل معه بدقة, ويجب تنظيف العدســات وازالة اثار زيت السيدر وعدم ترك الشريحة على المجهر وغلق المجهر بعد الانتهاء من الفحص
- عدم رمي المواد التالفة والاوساخ في حوض الغسيل
- الحرص على اطفاء اللهب بعد الانتهاء من العمل

حال وقوع مزارع ميكروبية حية, يتبع الاتي

- اخبار المشرف بأسرع وقت
- وضع منشفة ورقية او قطعة قطن فوق المادة المسكوبة
- سكب مادة مطهرة بكمية وافرة فوقها
- رفع المنشفة او القطن بعد 15 دقيقة وضعيها في الوعاء المخصص

الأجهزة والمعدات المستعملة في أمراض النبات

الحاضنة Incubator

وهي جهاز يمكن التحكم من خلاله بدرجة الحارة المطلوبة لتمنية المســـببات المرضـــية وحضـــنها لفترة محدودة عند درجة حرارة ثابتة وغالبا ماتكون 25 ± 2 ســيليزية للفطريات المســببة لامراض النبات ومن المفضل استخدام حاضنات توفر مدى حراري واسع لتوفير درجات الحرارة اللازمة للدراسات الخاصة بتحديد المدى الحاري الملائم لنمو المسببات المرضية المختلفة .

اسم الجهاز

- غرفة الزرع ذات الجو المعقم Laminar air flow cabinet
- المعقام Autoclave
- حاضنة Incubator
- حاضنة مبردة Cooled incubator
- جهاز تقطير Distilator
- فرن كهربائي Oven
- رجّاج مغناطيسي ذو سطح ساخن Magnetic stirrer , hot plate
- هزّاز منضدي Shaker
- مقياس الدالة الحامضية pH meter
- جهاز انتباذ منضدي Bench top centrifuge
- حمام مائي Water bath
- حمام زيتي Oil bath
- جهاز المطياف بالأشعة فوق البنفسجية U.V. Spectrophotometer
- مجاهر ضوئية Microscopes
- مجاهر بسيطة Binoculars
- مشراح فائق Ultra microtome
- مجهر ضوئي مزود بكاميرا رقمية Microscope with digital camera
- خلاط كهربائي Blender
- ثلاجة Refrigerator
- مجمدة Deep freezer
- ميزان حساس كهربائي Balance
- محارير زئبقية Thermometers
- عدسات تكبير يدوية Lenses
- هاونات ومدقات خزفية مختلفة الأحجام Mortar & pistils
- ماصات دقيقة بأحجام مختلفة Micropipette
- ثاقبة فلين Cork borer

- مرشحات دقيقة Millipore filters
- ورق ترشيح بحجوم مختلفة Filter papers
- غشاء البارافلم Para film