المحاضرة الاولى
أساسيات عامة

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 المختبر
- 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 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
- 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 لتنمية المسببات المرضية وحضنها لفترة محدودة عند درجة حرارة ثابتة وغالبا ما تكون 25 ± 2 سيليزية للفطريات المسببة لإمراض النبات ومن المفضل استخدام حاضنات توفر مدى حراري واسع لتوفير درجات الحرارة اللازمة للدراسات الخاصة بتحديد المدى الحراري الملائم لنمو المسببات المرضية المختلفة .

اسم الجهاز

Laminar air flow cabinet	• غرفة الزرع ذات الجو المعقم
Autoclave	• المعقام
Incubator	• حاضنة
Cooled incubator	• حاضنة مبردة
Distilator	• جهاز تقطير

Oven	• فرن كهربائي
Magnetic stirrer , hot plate	• رجّاج مغناطيسي ذو سطح ساخن
Shaker	• هزّاز منضدي
pH meter	• مقياس الدالة الحامضية
Bench top centrifuge	• جهاز انتباذ منضدي
Water bath	• حمام مائي
Oil bath	• حمام زيتي
U.V. Spectrophotometer	• جهاز المطياف بالأشعة فوق البنفسجية
Microscopes	• مجاهر ضوئية
Binoculars	• مجاهر بسيطة
Ultra microtome	• مشراح فائق
Microscope with digital camera	• مجهر ضوئي مزود بكاميرا رقمية
Blender	• خلاط كهربائي
Refrigerator	• ثلاجة
Deep freezer	• مجمدة
Balance	• ميزان حساس كهربائي
Thermometers	• محارير زئبقية
Lenses	• عدسات تكبير يدوية
Mortar & pistils	• هاونات ومدقات خزفية مختلفة الأحجام
Micropipette	• ماصات دقيقة بأحجام مختلفة
Cork borer	• ثاقبة فلين
Millipore filters	• مرشحات دقيقة
Filter papers	• ورق ترشيح بحجوم مختلفة
Para film	• غشاء البارافلم

الجدول(1-2): أنواع الزجاجيات المستخدمة في مختبر امراض النبات

أنواع الزجاجيات المختبرية	الاسم الإنكليزي
دوارق بأحجام مختلفة	Flasks
بيكرات بأحجام مختلفة	Bakers
أطباق بتري زجاجية وبلاستيكية بأقطار مختلفة	Petri dishes
اسطوانات زجاجية بأحجام مختلفة	Cylinders
أقماع زجاجية وخزفية بأحجام مختلفة	Funnels
ماصات بأحجام مختلفة	Pipettes
مجففات بأحجام مختلفة	Desiccators
دوارق ايرلنماير بأحجام مختلفة	Erlenmeyer flasks
أنابيب اختبار زجاجية وبلاستيكية	Test tubes
قضبان زجاجية	Glass rods

يجهز المختبر بأنواع المواد الكيمائية اللازمة لإنجاز التجارب المختبرية والمبينة في الجدول (1-3)، والتي يجب أن تحفظ في ظروف خزن ملائمة وفي عبواتها الأصلية التي عبئت بها من

قبل الشركات المنتجة لوجود الملصقات التي تضم المعلومات الهامة عن المادة والتي تشمل رمزها الكيماوي ووزنها الجزيئي وظروف خزنها ومدة صلاحيتها ومخاطر استعمالها، وهي معلومات هامة ستفقد أن خزنت المواد في عبوات عادية بديلة.

الجدول (1-3): أهم الكيماويات المستعملة في مختبر امراض النبات

اسم المادة	الرمز الكيماوي	الاسم الإنكليزي
الايثانول المطلق 99% والايثانول المخفف 70%	C_2H_5OH	Ethanol
الأسيتون	$(CH_3)_2CO$	Acetone (propanone)
كبريتيت الصوديوم اللامائية	Na_2SO_4	Sodium sulphite anhydrous
ثايوكلايكوليت الصوديوم (ميركابتوخلات الصوديوم)	$HSCH_2$-COONa	Sodium thioglycollate (sodium mercapto –acetate)
هايبوكلورايت الصوديوم6%	NaOCL	Sodium hypochlorite
الفوسفات ثلاثي الصوديوم	Na_3PO_4	Trisodium phosphate (TSP)
التوين 20 و80		Tween 20-80
فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين	KH_2PO_4	Potassium dihydrogen Orthophosphate
الفوسفات ثنائية الصوديوم أحادية الهيدروجين	Na_2HPO_4	Disodium hydrogen Orthophosohate
الفوسفات ثنائية الامونيوم أحادية الهيدروجين	$(NH_4)_2HPO_4$	Diammonium hydrogen orthophosphate
هيدروكسيد الصوديوم (حبيبات)	NaOH	Sodium hydroxide (pellets)
حامض الهيدروكلوريك (36%)	HCl	Hydrochloric acid
فوق اوكسيد الهيدروجين	H_2O_2	Hydrogen peroxide
مسحوق الاكار	مادة كربوهيدراتية معقدة	Agar- powder (Agar -Agar, Nobel-Agar)

يجب التخلص من كافة الكيمياويات التي انتهت مدة صلاحيتها بطريقة أمينة وأفضل الطرق هي ردمها في حفر عميقة في الأرض بعيدا عن المناطق الزراعية ومصادر المياه كيلا تؤثر على البيئة وصحة الإنسان والحيوان والنبات و تحذير العاملين عند استعمال المواد الكيماوية السامة والخطرة لأخذ الاحتياطات اللازمة عند التعامل معها، مع الانتباه إلى العلامات والرموز الدولية الدالة على خطورة المواد الكيماوية والمبينة على الملصقات المثبتة على العبوات.

المحاضرة الثانية

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

ويمكن أجراء عملية التعقيم بعدة طرق تتبع أحد الأسس التالية

اولا -التعقيم بالطرق الفيزيائية PHYSICAL METHODS

ثانيا -التعقيم بالطرق الكيميائية CHEMICAL MEHODS

اولا- العوامل الفزيائية استخدام الحرارة استخدام الترشيح استخدام الإشعاع

1- **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

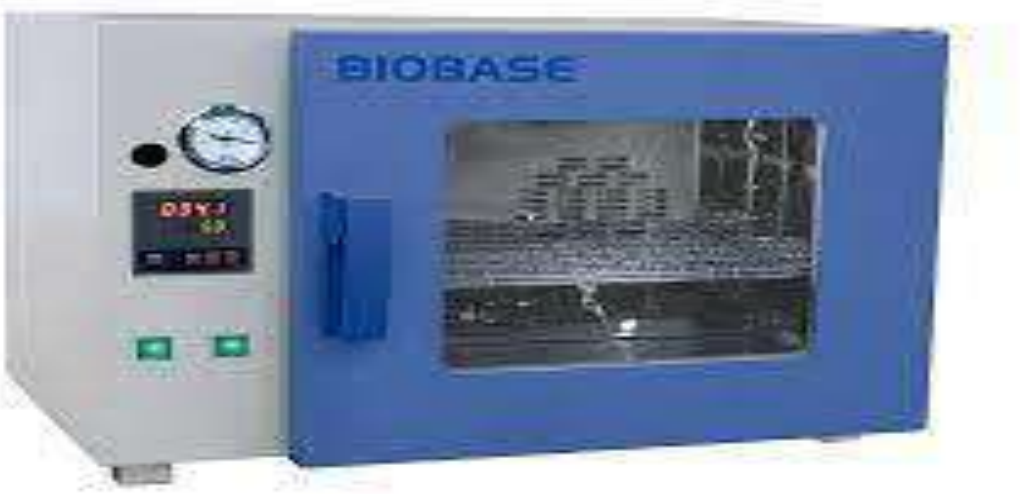
أ -الحرارة الجافة ب- الحرارة الرطبة

أ - **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

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

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

3 - **أفران الهواء الساخن** حيث تستخدم أفران تعمل بالكهرباء أو الغاز لتعقيم الزجاجيات المختلفة (اطباق بتري، الماصات ،الدوارق) وتكون درجة حرارة التعقيم160-180 ولمدة2-3 ساعة ويتم حساب وقت التعقيم عندما تصل درجة الحرارة الحد المطلوب.



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:

1 - 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 .

2 - 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

3 - 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 على درجة حرارة 100م ففي اليوم الأول تقتل الخلايا الخضرية وعند ترك الوسط الزرعي في الحاضنة عند حرارة الغرفة لمدة 24 ساعة يتم إنبات الطور البوغي الذي يقتل في تبخير اليوم الثاني أما تبخير اليوم الثالث فهو إجراء وقائي

4 - 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 المئصدة 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 الآتي:

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 بار.

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.

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

أ – **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.

ب - الأشعة غير المؤينة: وهي تمتلك طاقة اقل من الأشعة المؤينة بحيث لا يمكنها تأين المركبات ألانها تنشط الإلكترونات 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 DNA وتصنيع البروتين الخلوي، ولا تمتلك هذه الأشعة قابلية لاختراق الماد ولهذا تستخدم في التعقيم السطحي للمختبرات وصالات العمليات وغرف مصانع الأدوية وألبان .

3 - 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

ثانيا - 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 المذيبات 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.....الخ. 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 0(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.

المحاضرة الثالثة

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 الكاربون 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 الأحماض الأمينية والبروتينات
3-أن يوفر مصدرا لعناصر Mn, Fe, K, Na 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 METHIONIN أما عنصر 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 لتحديد نوع الوسط الزرعي الملائم لكل نوع من أنواع الكائنات الحية المجهرية .وهناك أربعة مجاميع في هذا المجال وهي

1-**الرميات الإجبارية التغذية OBLIGATE SAPROPHYTES**
وهي الكائنات المجهرية التي تعتمد في تغذيتها على المواد العضوية الميتة فقط ولا يمكن أن تتغذى على نسيج حي

2- **الرميات الاختيارية التغذية FACULTATIVE SAPROPHYTES**
وهي الكائنات المجهرية التي تعتمد في تغذيتها على المواد العضوية الميتة ويمكن أن تتغذى على نسيج حي 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 - **الطفيليات الاختيارية التغذيةFACULTATIVE PARASITES**
وهي الكائنات المجهرية التي تعتمد في تغذيتها على المواد العضوية الحية ويمكن أن تتغذى على مادة عضوية ميتة 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
أ - **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

ب - الأوساط الزرعية الصناعية SYNTHETIC CULTURE MEDIA : وتتكون من مواد عضوية وغير عضوية وتمتاز بما يأتي

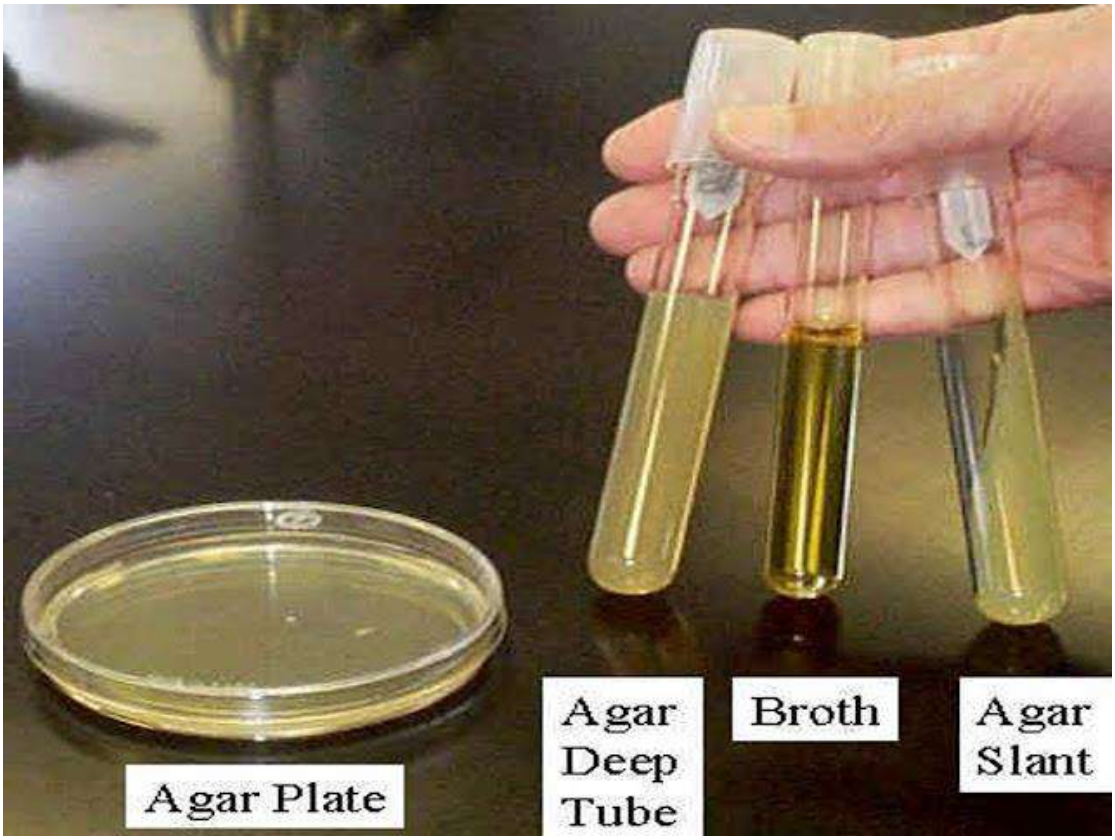
1- معروفة التركيب كما ونوعا

2-تستعمل في دراسة تأثير التغذية على الكائن المجهري

من الأمثلة عليها وسط براون Brown's media ووسط ريتشارد Richard's media وسط تشابك دوكسCZAPEK DOX

ج - الأوساط الزرعية الطبيعية الصناعية SYNTHETIC – NATURAL CULTURE MEDIA

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



أشكال الأوساط الزرعية CULTURE MEDIA FORMS

1 الأوساط الصلبة SOILD MEDIA

وهي أوساط صلبة طبيعيا كشرائح الجزر أو البطاطا تمتاز الأوساط الصلبة بسهولة الاستعمال والنقل واكتشاف التلوث كما تستخدم بنجاح في عزل وتنقية الفطريات كذلك في حفظ مزارع الفطريات المختلفة كأصول في الثلاجة لفترات طويلة وتحضر هذه الاوساط اما في انابيب اختبار مائلة او عميقة او يصلبها في اطباق بتري

2- الأوساط السائلةLIGUID MEDIA

هي الاوساط المحضرة بدون اضافة مادة الاكار لذلك يجب الاحتياط عند نقلها لتفادي وصول الوسط الى السدادات القطنية. وهي مستخلصات نباتية أو حيوانية مثل الحليب أو الدم أو مستلخص البطاطا أو الشعير .....الخ وتمتاز بما يأتي

سهولة التحضير والاستخدام والنقاوة العالية وانها تسمح بتهوية المزارع ويمكن من وزن الغزل الفطري وتحليل المنتجات الأيضية بسهوله وتستخدم في الدراسات الغذائية كنقص العناصر الغذائية والفيتامينات وتأثير اضافتها للفطريات كما تستخدم هذه الاوساط في الدراسات الأيضية الثانوية من قبل الفطريات مثل افراز المضادات الحياتية والسموم والانزيمات وغيرها وتحضر هذه الاوساط في دوارق مخروطيه مختلفة الحجم وحسب نوع الدراسة ولكن يعاب عليها سهولة تلوثها وعدم إمكانية الحصول على مزرعة نقية للكائن المجهري عند استخدامه .

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

الاكارAGAR : 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 تحضير بعض الأوساط الشائعة

1- وسط اكار البطاطا والدكستروز والاكارPOTATOES DEXTROES AGAR

لتحضير لتر واحد من هذا الوسط تتبع الخطوات التالية

1-يوزن 200غم من البطاطا ثم تغسل وتقشر وتقطع إلى أجزاء صغيرة
2-تغلى البطاطا في 500مل ماء مقطر لمدة20 إلى 30 دقيقة
3 -ترشح البطاطا ويؤخذ الراشح فقط
4 -يذاب 15الى 20 غم اكار و15 إلى 20 غم دكستروز في 500 مل ماء مقطر
5 -يضاف راشح البطاطا الاكار والدكستروز الذائبان ويكمل الحجم الى واحد لتر
6- يعبا في دوارق مختلفة الأحجام ويعقم في AUTOCLAVE على 121م وضغط 1.5جو لمدة من15- 20دقيقة، وهي من الاوساط الطبيعية الصناعية.

وسط اكار الماء WATER AGAR : هذا الوسط من الأوساط الفقيرة بالمواد الغذائية ويستخدم لغرض عزل فطريات التربة ولتنقية الفطريات لتحضير لتر واحد من هذا الوسط تتبع الخطوات التالية:

1-يذاب 15 إلى 20 غم أكار في لتر ماء مقطر
2- يعبا في دوارق مختلفة الأحجام ويعقم في جهاز AUTOCLAVEعلى 121م وضغط 1.5 جو لمدة 15 -20 دقيقة وهي من الاوساط الطبيعية الصلبة.

وسط أكار مستخلص الشعير Malt extract Agar

20 غم مستخلص الشعير

15 غم اكار

ا لتر ماء مقطر

الدرس العملي الرابع
تشخيص المرض النباتي

تشخيص المرض النباتي

يمكن أن نعرف تشخيص المرض بأنه علم و مهارة التعرف علي وجود مرض وذلك بناء علي الحس الدقيق والإدراك الواعي لأعراض و خصائصه، ومن ثم التعرف على المرض والمسبب.
يتضح لنا من التعريف السابق أن القائم بعمليه التشخيص أو المشخص لابد أن يقترن لديه العلم و المهارة. فالعلم هو ما نستقيه من معلومات عن الأمراض النباتية و مسبباتها و العوامل المؤثر عليها. تكمن المهارة في القدرة على الملاحظة الجيدة و القدرة على الخروج بالاستنتاجات والمهارة تكتسب من تراكم الخبرات في تشخيص الأمراض النباتية لمحصول ما أو مجموعة معينه من المحاصيل بحيث تكون مألوفة لدي المشخص. ليس هذا فقط بل يجب أن يكون للمشخص أولا خبره عمليه بالمحصول نفسه و طبيعة نموه في الحقل تحت الظروف العادية حتى يستطيع أن يدرك أي انحراف يحدث عن النمو الطبيعي للمحصول. وعلي ذلك فإن المشخص يمكن أن يكون له دراية بتشخيص الأمراض التي تصيب مجموعة معينه من المحاصيل دون الأخرى و ذلك بناء علي خبراته المكتسبة فيها، ومن غير المتوقع أن يكون المشخص الخبير على دراية بتشخيص الأمراض في كافة المحاصيل.

أهمية تشخيص المرض النباتي

تعد عملية التشخيص هي الأساس الذي تعتمد عليه مكافحة المرض خاصة إذا تطلب الأمر علاجا كيماويا متاحا لهذا المرض وعلي ذلك فإن دقة التشخيص و سرعته أيضا سيكون لها بالغ الأثر في محاصرة الحالة ومنع أو تقليل الخسارة الاقتصادية علي عكس ذلك فإن التشخيص الخاطئ سيؤدي إلى عدم فعالية الإجراءات المتخذة و هذا يعني تفاقم المشكلة من ناحية و إلى مزيد من الخسائر من ناحية أخرى .

وتتضمن عملية التشخيص ما يأتي :

1- 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

أدوات التشخيص الحقلي

1. آلة التصوير يمكنها تقريب الصور .
2. عدسة يدوية لفحص الأعراض و العلامات بدقه .
3. سكين صغيرة لشق النبات إذا تطلب البحث عن علامات داخليه .
4. مقص تقليم لقص أفرع الأشجار و فحصها بدقه أو أخذ عينة منها .

5. أكياس ورقية و أخرى من البولي إثيلين لأخذ عينات نباتية أو عينات من التربة إلى المعمل إذا لزم الأمر .
6. بطاقات تدوين بيانات و أقلام للكتابة على أكياس البولى إيثيلين .
7. بطاقات بيانات تشخيص مرض لجمع كافة البيانات التي يستعين بها في التشخيص .

خطوات التشخيص الحقلي

أولا : ملاحظة توزيع المرض في الحقل

تؤدي طريقة توزيع المرض في الحقل إلى ترجيح الاحتمال تجاه ممرض ما أو مجموعة معينة من الممرضات .من الأمثلة على ذلك :

1- ظهور أعراض بطريقة عشوائية علي نباتات بالحقل يرجع أن الحالة راجعة إلى أحد الفطريات المحمولة بالهواء .
2- ظهور أعراض علي جميع نباتات الحقل يرجع أن الحالة راجعة إلى أحد العوامل الغير حيه في التربة ،كنقص العناصر ،أو في الجو كتأثير ملوثات الهواء.
3- ظهور الحالة كبقع متناثرة في الحقل يرجع أن الحالة راجعه إلى أحد الممرضات المحمولة بالتربة مثل أمراض عفن الجذور و الذبول الوعائي .ويلاحظ ما إذا كان هناك علاقة بين توزيع الحالة و طبوغرافية الحقل .
4- ظهور الحالة على حافة الحقل يرجح أنها راجعة إلى ممرض محمول بالحشرات

ثانيا: ملاحظة توزيع الأعراض على النبات

تختلف توزيع الأعراض على النبات باختلاف العامل الممرض و أحينا تبعا للظروف البيئية في حالة الممرض الواحد . فهناك ممرضات تتميز بأنها تحدث الإصابة في الأوراق الحديثة و هناك ممرضات تحدث الإصابة في الأوراق الكبيرة ، وربما يكون تفضيل بعض الممرضات للأوراق السفلى راجع إلى أنها تحتاج إلى رطوبة مرتفعة تكون أكثر توفرا في الجزء السفلى من النبات ، قرب سطح التربة .

ثالثا: فحص الأعراض و العلامات بدقة علي النبات

على المشخص أن يكون على دراية تامة بالحالة الطبيعية للنبات و المظهر العام للنمو في مثل هذا العمر و تحت مثل تلك الظروف حتى يمكنه أنه يضع يده على الخلل الحادث في النمو . و عليه أن يقوم بفحص الأعراض بدقة علي نباتات مختلفة يبدو عليها درجات متفاوتة من التأثير و علية فحص العلامات المرضية بدقة ، و عليه أن يستعين بعدسة إذا لزم الأمر عند فحص الأعراض و العلامات .كما يجب عليه أن يصنف تلك الأعراض تبعا لنوع العمليات الحيوية التي حدث بها خلل في النبات ، فكل نوع من أنواع الخلل يشير إلى الارتباط بنوعية معينة من الممرضات ،

مميزات العينة الجيدة :

1 - يجب أن تتضمن عينة النباتات المصابة نباتات كاملة في حالة النباتات الحولية والشتلات وأن تتضمن فروعا وأجزاء من الجذور في حالة الأشجار .

2 - يجب حفر التربة للحصول على الجذور سليمة لأن جذب النبات يؤدى إلى تمزيق الجذور .

3 - يجب أن تتضمن العينة ما لا يقل عن 6 نباتات تعبر عن درجات مختلفة من الأعراض.

4- يوضع كل نبات مصاب في كيس ورقى وتوضع نباتات العينة مجتمعة في كيس من البولى إثيلين .

5- تجمع عينات النباتات المصابة في الصباح و يجب أن تصل فيما لا يزيد عن أربعة ساعات حتى لا تتدهور فتصبح غير صالحة لأعمال الفحص و في حالة نقل العينة من مسافة بعيدة أو في الجو الحار تنقل العينة داخل صندوق مبرد .

6- يجب تجنب تلويث المجموع الخضري للنبات بحبيبات التربة ،أما الجذور فتغسل بحرص لإزالة حبيبات التربة من على سطحها مع تجنب كشط سطح الجذر أثناء الغسيل فتزيل جزءا هاما لعملية التشخيص.

2 – 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.

الدرس العملي الخامس
الأعراض والعلامات المرضية

تعد دراسة الأعراض و العلامات المرضية من الأمور المهمة جدا في عملية تشخيص المسبب المرضي وبالتالي تحديد الطرق المناسبة لمقاومته والحد من انتشاره.

الأعراض المرضية (disease symptom) وهي التغيرات الواضحة والمرئية التي تظهر على النبات نتيجة الإصابة أو نتيجة لتعرضه لظروف بيئية غير موافقة لنموه الطبيعي .

علامات المرض (disease signs) ظهور الكائن المسبب للمرض نفسه أو جزء منة مصاحبا لأعراض المرض.

وتتسبب الإصابة بمسببات المرضية في ظهور أعراض مختلفة على النبات المصاب تميز كل مرض عن غيرة وإن كان بعض ونادرا ما يظهر نوع واحد من الأعراض إذ تبدأ الإصابة بظهور عرض معين ثم يتوالى بعدة ظهور أنواع أخرى من الأعراض بتقديم الإصابة فيما يعرف بطيف الأعراض (symptoms spectrum)

وتقسم الأعراض على أساس درجة انتشار ظهورها على النبات إلى

1 - أعراض موضعية (local symptoms)

2- أعراض جهازية (systemic symptoms)

وتعرف الأعراض المرضية التي تظهر على النبات خارجيا سواء على المجموع الخضري (shoot system) أو المجموع الجذري (root system) بأنها أعراض خارجية أو ظاهرية (external or morphological symptoms) وهذه يمكن تمييزها بالعين المجردة أو بحسها عند اللمس أو الشم ، والحالة الأخيرة تلاحظ في الأنسجة النباتية المصابة ببكتريا العفن الطري(soft rot bacteria) أما الأعراض التي تظهر بالداخل فتسمى الأعراض الداخلية (internal symptoms) أو التشريحية (anatomical) أو الهستولوجية (histological) وغالبا ما يحتاج فحصها إلى عدسات مكبرة .. وتسمى دراسة هذه الأعراض ال (histopathology) او بالـ (pathological anatomy). وقد تتشابه الأمراض الطفيلية وغير الطفيلية من حيث طبيعة تكشف الأعراض إلا أنها تختلف باختلاف الطفيل أو العائل فتختلف الأعراض إذا تغيرت العوائل للطفيل الواحد كما تختلف الأعراض على نفس العائل نتيجة للإصابة بطفيليات مختلفة ، بل قد تختلف الأعراض إذا أصاب الطفيل عدة أعضاء نباتية لنفس العائل كما تختلف أيضا باختلاف الظروف البيئية النامي تحتها النبات.

ويمكن تقسيم الأعراض المرضية إلى خمسة مجموعات حسب طبيعة تلك الأعراض :

أولا- أعراض تغير اللون
ثانيا- الأعراض الناجمة عن موت الأنسجة
ثالثا- الأعراض الناجمة عن انخفاض في معدل نمو الأنسجة
رابعا- الأعراض الناجمة عن زيادة في معدل نمو الأنسجة
خامسا- أعراض الذبول

أولا- أعراض تغير اللون

ونعني بذلك تغير لون الأوراق أو الأجزاء النباتية الأخرى كالسيقان والأزهار نتيجة لحدوث خلل في تكوين الكلوروفيل تحدثه كائنات حية دقيقة (مسببات مرضية) أو نتيجة لوجود نقص في بعض العناصر الغذائية أو لأسباب أخرى.

وأعراض تغير اللون تشمل:

1- **الشحوب chlorosis** : وهو حالة تحول اللون الأخضر للنبات إلى اللون الأصفر نتيجة

لتحلل أو نقص في كمية الصبغة الخضراء (الكلوروفيل) وهذا الاصفرار قد يكون بعدة أشكال منها

2- **التبرقش Mosaic** : تتصف هذه الاعراض بتناوب مساحات خضراء مع مساحات شاحبة او صفراء وتعتبر أعراض التبرقش كدالة أولية على إصابة النبات بمرض فيروسي

3- **اصفرار عام للنبات Yellowing** : ويحدث هذا النوع من الاصفرار نتيجة لإصابة النبات ببعض المسببات المرضية التي تسبب تعفن الجذور فتصبح غير قادرة على نقل المواد الغذائية والماء إلى بقية أجزاء النبات مما يؤدي إلى ظهور حالة من الاصفرار العام على النبات.

4- **شفافية العروق Vien Clearing** وهو تبادل في لون الورقة بين الأخضر والأخضر الفاتح أو الأصفر كما في مرض فايروس العرق الكبير في الخس

5 - **الابيضاض Albinism** :وهي حالة تحول اللون الأخضر للنبات إلى اللون الأبيض لعدم تكون الكلوروفيل نهائيا بسبب وراثي

.6- **تغير في صبغة الانثوسيانين البنفسجية Changes in Anthocyanin:** إلى جانب الصبغة الخضراء (الكلوروفيل) توجد هناك صبغات ذائبة في عصير الخلية النباتية كصبغة الانثوسيانين البنفسجية التي تعطي الألوان الزاهية لأوراق النبات في الخريف. وقد وجد أن هذه الصبغة تزداد في النباتات التي تعاني نقصا في عنصر الفسفور فتظهر الأوراق بلون بنفسجي.

7- **تكوين الصبغة البنية (الميلانين) Melanin Formation:** تتكون الأنسجة المصابة بلون بني غامق وخاصة تلك التي تصاب بأمراض الذبول الوعائي الذي يسببه كل من الفطر *Fusarium* والفطر *Verticillium* بسبب تكون صبغة الميلانين التي تلون الأنسجة المصابة بلون بني غامق إلى اسود مثل مرض الذبول الفيوزارمي والذبول الفرتسيلي في القطن. كذلك يمكن أن يكون تكوين هذه الصبغة دليل على موت خلايا النسيج المصاب كما في مرض سقوط

البادرات الذي يسببه الفطر *Rhizoctonia solani* حيث تتلون أنسجة السويقة بلون بني غامق ثم تسود وتموت.

ثانيا – الأعراض الناجمة عن موت الأنسجة Nicrosis Tissues

تموت الأنسجة المصابة كنتيجة لقتل بروتوبلازم الخلايا المصابة فيها، وقد يكون الموت لجزء أو أجزاء محددة من النبات أو قد يشمل النبات بأكمله، لذا يكون القتلأماقتل موضعي أو قتل عام

1- **القتل الموضعي Localized Necrosis**:وهو موت مساحة محددة من أنسجة النبات بغض النظر عن حجمها وفي أي جزء من النبات ويكون بعدة أشكال

أ- تبقع الأوراق Leaf Spots ب- تثقب الأوراق Leaf Shot-Hole ت- التلطخ Blotch ث- التخطيط Streak ج- موت البادرات Damping-off Seedling ح- الإفرازات Exudate خ- القرحة Canker

د- موت الأطراف Die Back ذ- الانثراكنوز Anthracnose ر- ضربة الشمس Sun Scald

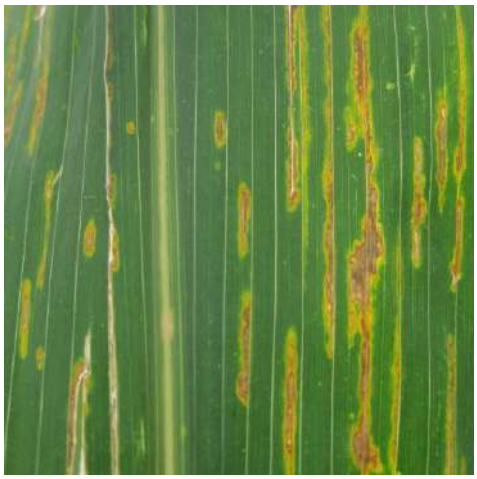
أ- تبقع الأوراقLeaf Spots : وهو موت مساحة محددة من خلايا النسيج النباتي المصاب بسبب مهاجمة بعض المسببات المرضية للنسيج النباتي مسببة موت الخلايا المحيطة بمنطقة دخولها فتظهر بشكل بقع مريضة ومحددة وتكون البقع محددة المساحة عادة بسبب إحاطتها بنسيج فليني يفرزه العائل كوسيلة للدفاع عن نفسه لحصر المسبب المرضي في منطقة محددة ، مثل مرض التبقع الحلقي والتبقع الزاوي في القطن. وقد يسبب النقص في بعض العناصر

المعدنية أعراض موت موضعية بشكل بقع صغيرة رمادية اللون كما في مرض النقطة الرمادية في الشوفان المتسبب عن نقص المنغنيز أو بسبب زيادة في بعض العناصر كالبورون وبعض المبيدات الكيميائية.

ب -تثقب الأوراقLeaf Shot-Hole :وهي حالة البقع الميتة من الأجزاء المصابة التي تترك ورائها، بعد تيبسها وسقوطها، ثقوبا على سطح الورقة كما في مرض تثقب أوراق الخوخ

ت – التلطخBlotch:وهي عبارة عن أنسجة ميتة ومتحللة بشكل بقع محددة مختلفة الأحجام، يختلف لونها عن اللون الطبيعي للنبات كما في مرض التلطخ البقعي في الشعير الذي يسببه الفطر *Helminthosporium sativum*.

ث - التخطيطStreak: وهو موت الأنسجة بشكل أشرطة أو بقع طويلة وضيقة تمتد بين العروق ثم تتحد مع بعضها لتشمل مساحة واسعة من الورقة يمتد إلى الغمد، كما في مرض الصدأ المخطط في الشعير .



ج - **سقوط البادراتDamping-off Seedling:**وهو موت مساحة محددة في منطقة السويقة الجنينية وتعفنها بسبب بعض المسببات المرضية الموجودة في التربة مثل أنواع الفطر *Pythium* والفطر *Rhizoctonia* وتكون فيها الأنسجة المصابة رخوة، مائية، بنية إلى سوداء اللون، لذلك تسقط السويقة الجنينية ميتة بسبب ضعف وتلف منطقة الإصابة.

ح – **الإفرازاتExudate :**وهنا تكون البقع الميتة مصحوبة بنوع من الإفرازات أما بهيأة كتل صمغية Gummosis كما في مرض التصمغ أو التعفن البني في الحمضيات الذي يسببه الفطر *Phytophthora citrophthora*، أو بهيأة إفرازات تحتوي على خلايا بكتيرية تسمى Ooze كما في مرض اللفحة النارية في العرموط والتفاح الذي تسببه البكتيريا *Erwinia amylovora*.

خ - **القرحةCanker :**وهي عبارة عن بقع ميتة محددة النمو، غائرة على أغصان وسيقان الأشجار والشجيرات، محاطة بطبقة فلينية لمنع انتشار المسبب المرضي وتوسع البقعة، وتكون البقع أما طولية أو حلقية تحيط بالساق، وهذه الأخيرة اخطر لأنها تمنع نزول أو صعود الماء والمواد الغذائية في النبات.

د - **موت الأطرافDie Back :**وهي حالة مرضية تبدأ بموت الأفرع والأغصان ابتداءً من الطرف العلوي نزولا إلى الأسفل، ويسمى الموت الرجعي، ويحدث في الأشجار والشجيرات عادة كما في مرض "التدهور البطيء" في الحمضيات والمرض الفايروسي "التدهور السريع" أو الترستيزا Tristeza في الحمضيات

ذ- الانثراكنوزAnthracnose :عبارة عن بقع ميتة محددة النمو، بنية إلى سوداء اللون، دائرية الشكل، منخفضة قليلا عن سطح النسيج النباتي وذات حواف مرتفعة قليلا، بقطر 0.5 – 1 ملم، كما في مرض انثراكنوز الفاصوليا والبازلاء والباقلاء يظهر على أجزاء النبات المختلفة (الثمار، البذور، الأوراق، السيقان).

المحاضرة السادسة

القتل العام General Necrosis: وهو عبارة عن الموت الكامل لخلايا النسيج النباتي نتيجة مهاجمتها من قبل المسببات المرضية ونموها داخل خلايا النسيج والمسافات البنية للخلايا، ومن أنواع القتل العام:

أ-اللفحة Blight or Scorch: ويقصد به الموت الكامل للأجزاء الهوائية (الثمار، البراعم، الأوراق، الأزهار، السيقان) نتيجة إصابتها ببعض المسببات المرضية كما في مرض اللفحة المتأخرة في البطاطا والذي يسببه الفطر *Phytophtora infestans*، ومرض اللفحة النارية في التفاح والعرموط.

ب – التعفن Rot: وهو عبارة عن موت الأنسجة النباتية وتحللها بشكل كامل بفعل بعض انزيمات التحلل كأنزيم اليكتنيز الذي يحلل مادة اليكتين لجدران خلايا النبات الذي تفرزه بعض انواع الفطريات والبكتيريا عند مهاجمتها الاجزاء النباتية (السيقان ، الجذور ، الثمار ، البذور) فتسبب تعفنها ، والتعفن على نوعين :

ج- التعفن الطري (الرخو) Soft Rot : وهو التحلل الكامل لأنسجة النبات من قبل المسبب المرضي حيث تتجمع العصارة النباتية بشكل مواد سائلة ويصبح قوام النسيج النباتي رخوا هلامي الملمس ومصحوب برائحة كريهة أحيانا، لذلك يطلق على هذا النوع من التعفن بالطري أو الرخو، كما في أمراض تعفن الفواكه والخضر المتسبب عن البكتيريا *Erwinia caratovora* والفطر *Rhizopus stolonifer*.

د- التعفن الجاف: Dry Rot وهذا النوع من التعفن لا يكون مصحوبا بمواد سائلة أو رخوة القوام، إذ يتحول التعفن الطري إلى تعفن جاف إذا ما تعرض لدرجات حرارة عالية ورطوبة نسبية منخفضة. وقد تتعفن الجذور بفعل بعض المسببات المرضية فيسبب التعفن عجز الجذور على تجهيز النبات بالماء فيصفر ويذبل وتجف أوراقه كما في مرض تعفن جذور البنجر السكري. وقد تتعفن الأزهار بفعل بعض المسببات المرضية كما في تعفن أزهار العصفر الذي يسببه الفطر Botrytis

ثالثا – الأعراض الناجمة عن انخفاض معدل نمو الأنسجة

إن ظهور هذه الأعراض ينتج عن إصابة النبات ببعض المسببات المرضية التي تعمل على إعاقة أو منع الانقسام الخلوي وتكوين الأنسجة بصورة طبيعية، وهذا يؤدي إلى ظهور نوع من التشوه أو التخلف في نمو النبات، ومن تلك الأعراض ما يأتي:

1- **التقزم Dwarfness** :وهو عدم نمو النبات نموا طبيعيا أو وصوله إلى حجمه الطبيعي، ويحدث ذلك نتيجة لصغر حجم الخلايا Hypotrophy وقلة أو توقف انقسامها Hypoplasia، لذلك تكون العقد فيها متقاربة نسبيا إذا ما قورنت بالنباتات السليمة من حيث الارتفاع، كما في مرض التفحم القزمي في الحنطة الذي يسببه سلالة من الفطر *Tilletia caries* ومرض التقزم الأصغر في الشعير الذي يسببه فايروس التقزم في الشعير (BYDV) أو Barly Yellow Dwarf Virus.

2- **التورد Rosetting** : ويحدث نتيجة قصر في طول سلاميات الأغصان والأفرع وتقاربها بسبب توقف خلاياها عن الاستطالة الطبيعية حيث تتجمع الأوراق الموجودة على السلاميات بشكل متقارب فتظهر كالزهرة كما في مرض تورد الأوراق في الخوخ الذي يسببه فايروس تورد الخوخ (PRV) أو Peach Rosette Virus.

رابعا – الأعراض الناجمة عن زيادة في معدل نمو الأنسجة

وهنا تبدو الأعراض معاكسة للحالة السابقة (ثالثا) حيث يحدث انقسام سريع وغير منتظم في خلايا النسيج النباتي فيزداد عددها Hyperplasia ويتضخم حجمها Hypertrophy بسبب إصابة النبات ببعض المسببات المرضية التي تعمل على تحفيز خلايا أنسجة النبات على الزيادة غير الطبيعية مما يؤدي إلى ظهور نمو غير طبيعي على النبات، ومن هذه الأعراض ما يأتي:

1- الأورام Tumors:

وهي عبارة عن نموات شاذة أو انتفاخات موضعية على أجزاء النبات المصاب، تنشأ نتيجة انقسام الخلايا بصورة متكررة وتضخمها بصورة غير طبيعية، وهذه الأورام تأخذ أشكالا مختلفة فقد تظهر على قواعد السيقان فتسمى تدرنات Galls كما في مرض التدرن التاجي الذي تسببه البكتيريا Agrobacterum، أو قد تظهر على الجذور بشكل تعقد Knot كما في مرض تعقد الجذور الذي تسببه النيماتودا Meloidogyn

2- تجعد الأوراق Leaf Curl :

وهو نوع آخر من النمو وتضخم الأنسجة حيث تحصل زيادة في نمو سطح واحد من الورقة دون الآخر مما يؤدي إلى التفاف وتجعد الورقة كما في مرض تجعد أوراق الخوخ الذي يسببه الفطر *Taphrina deformans*.

3- الجرب Scab :

وهو عبارة عن بقع قشرية ميتة محددة النمو مرتفعة وخشنة الملمس، تنشأ عادة من نمو زائد غير طبيعي للأنسجة السطحية للأوراق أو الثمار أو الدرنات، والتي تتشقق فتصبح ذات تركيب فليني كلما تقدمت الإصابة مثل مرض جرب التفاح الذي يسببه الفطر *Venturia inaequalis*

4- الاستطالة Elongation

وهي الزيادة الحاصلة في طول خلايا الأنسجة المصابة عن المعدل الطبيعي والتي تؤدي بدورها إلى استطالة العقد أو الساق بصورة غير طبيعية ، ويعزى سبب زيادة الطول إلى هرمون الجبريلين الذي يفرزه المسبب المرضي فيحفز خلايا النبات على الاستطالة.

خامسا – أعراض الذبول Wilt وهي حالة فقدان الحيوية والنشاط في الأوراق والأغصان وانكماشها وتدليها نتيجة لحدوث خلل في وظيفة الجذر (امتصاص ونقل الماء إلى النبات) وبالتالي فان كمية الماء التي تصل إلى النبات تكون اقل من الحاجة، لذا تحصل ظاهرة الذبول. وهي على نوعين:

أ- الذبول المتسبب عن الإصابة بالمسببات المرضية:

ويحدث هذا النوع من الذبول نتيجة لإصابة النبات وخاصة إصابة منطقة الأوعية الناقلة، بالمسببات المرضية، ولهذا النوع من الذبول عدة نظريات، هي:

نظريات الذبول:

1- نظرية انسداد الأوعية الناقلة للماء (أوعية الخشب) ويتم ذلك كما يأتي:

أ- غلق الأوعية الناقلة بتراكيب الفطر الممرض مثل فطر Fusarium.

ب- غلق الأوعية الناقلة بالثايلوسات وهي تثخنات في جدار الوعاء الناقل، تتكون نتيجة لتحفيز المسبب المرضي لجدران الوعاء الناقل على تكوينها.

ت- إفراز الأنزيمات من قبل المسبب المرضي والتي تعمل على تحلل الجدار الداخلي للأوعية الناقلة المكونة من مادة السليلوز والبكتين فتعمل هذه المواد كسدادات تغلق الأوعية الناقلة وتعيق عملية صعود الماء.

2- نظرية الإفرازات السامة Toxicity Theory

حيث ان المسبب المرضي يقوم بفرز مواد سامة تقتل الأوعية الناقلة مثل الفطر Fusarium الذي يفرز المادة السامة فيوزاريك اسيد Fusaric acid التي تسبب ذبول النبات.

ب- الذبول الفسيولوجي Physiologic Wilt

وهو الذبول الذي يحصل نتيجة نقص أو عدم توفر الماء اللازم للنبات في التربة لذلك يحصل له حالة من الذبول المؤقت ، لكن يمكن للنبات أن يستعيد حيويته ونضارته إذا ما توفر الماء اللازم له،أماإذا استمرت حالة نقص الماء أو انعدامه فان الذبول المؤقت سيتحول إلى ذبول دائم وبالتالي موت النبات.

أعراض ذبول نبات الطماطم

أعراض على الجذور

تلون الأنسجة الداخلية للساق بلون بني فاتح

العلامـــــات المرضية Diseases Signs

ويقصد بها وجود طفيلي المرض (المسبب المرضي) نفسه سواء كان فطرا أو بكتيريا أو نيماتودا بأي تركيب من تراكيب المسبب المرضي الجنسية أو الخضرية (اللاجنسية) داخل أو على أنسجة النبات العائل.

التفحم Smut : وهي علامات مرضية بشكل كتل تفحمية سوداء وهي عبارة عن جراثيم الفطر الممرض كما في أمراض التفحم

2- **الصدأ Rust :** وهي عبارة عن بثرات بشكل نموات بارزة بمساحات صغيرة على سطح النبات المصاب تشبه صدأ الحديد وهي عبارة عن جراثيم الفطر الممرض كما في أصداء الحنطة والشعير.

3- البياض Mildew : وهو عبارة عن نموات دقيقية لجراثيم الفطر الممرض تغطي الأوراق والأغصان ويكون أما بشكل بياض دقيقي Powdery Mildew ابيض اللون أو بياض زغبي Downy Mildew رمادي اللون.

الدرس العملي السابع

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 تتلائم 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 ثمريه 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 قد 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

أ - 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 للأجزاء الهوائية و 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 (10%) لمدة 2الى 3 دقائق حسب نوع الجزء النباتي

4 -تغسل بالماء المقطر لإزالة اثر المعقم

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

6 - ولكن بالإمكان استعمال طريقة اخرى للعزل من السيقان والثمار (خاصة عندما يكون الكائن الممرض داخل الانسجة) وذلك عن طريق شق الساق طوليا او قطع الثمرة من الجانب السليم ثم تتجه بالقطع الى الانسجة المصابة، وعندما يشق الساق او تقطع الثمرة فان الانسجة التي يتم كشفها لم يسبق لها ان عرضت للملوثات وبالتالي فهي غير ملوثة، تؤخذ مقاطع صغيرة من الانسجة المصابة بمشرط معقم ثم تنقل مباشرة الى اطباق زجاجية تحتوي على بيئة غذائية مناسبة وتترك لتنمو لعدة ايام.

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

ب - 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 م وتراقب 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 م لحين ظهور المستعمرات

ج – العزل بطريقة المصائد النباتية الحية Trap plants :

وتستخدم لعزل الفطريات الممرضة من التربة ويمكن تلخيص الطريقة بما يأتي:

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

تغسل البادرات المريضة والميتة والبذور المتعفنة في الماء الجاري ثم تزرع في أطباق بتري تحتوي على وسط زرعي PDA ثم توضع في الحاضنة درجة حرارة 25 ± 2 سيليزية وتراقب بعد 48 ساعة لملاحظة نمو المستعمرات للتعرف على الفطريات النامية

د - 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* وPythium وPhytophthora

المحاضرة الثامنة

تنقية المسبب المرضى

قد يظهر على البيئة ، أحيانا ، أكثر من كائن حي ، وهنا يلزم فصل الكائن المشتبه 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 :

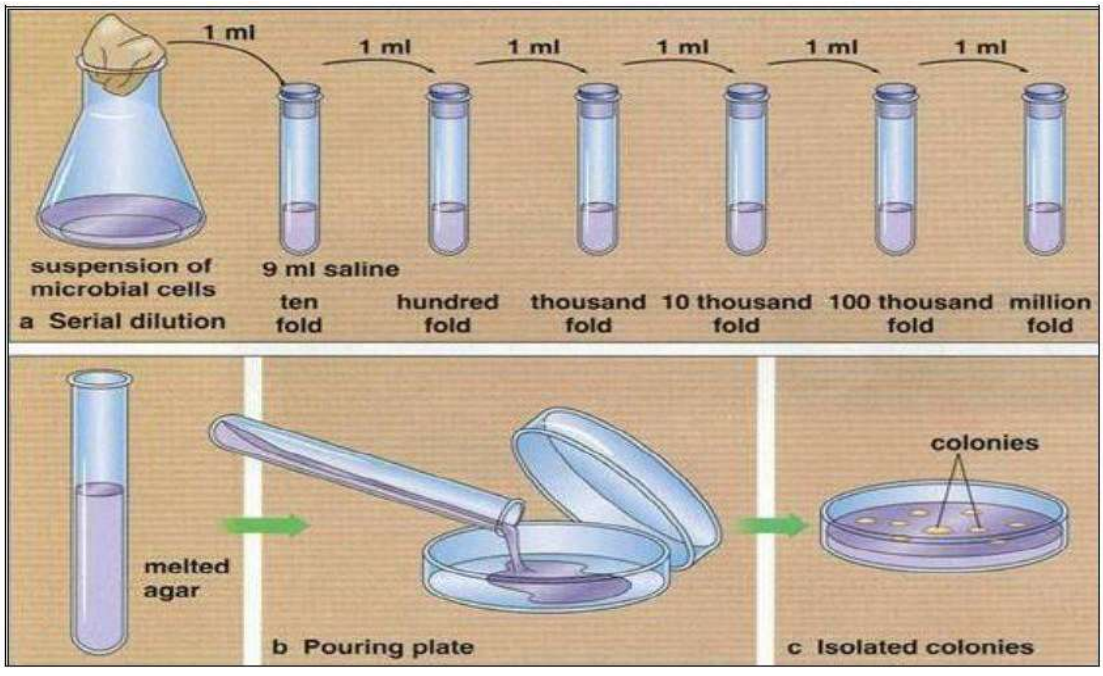
إن هذه الطريقة تتطلب تحضير عدة تخفيفات في أنابيب اختبار معقمة كما يأتي

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

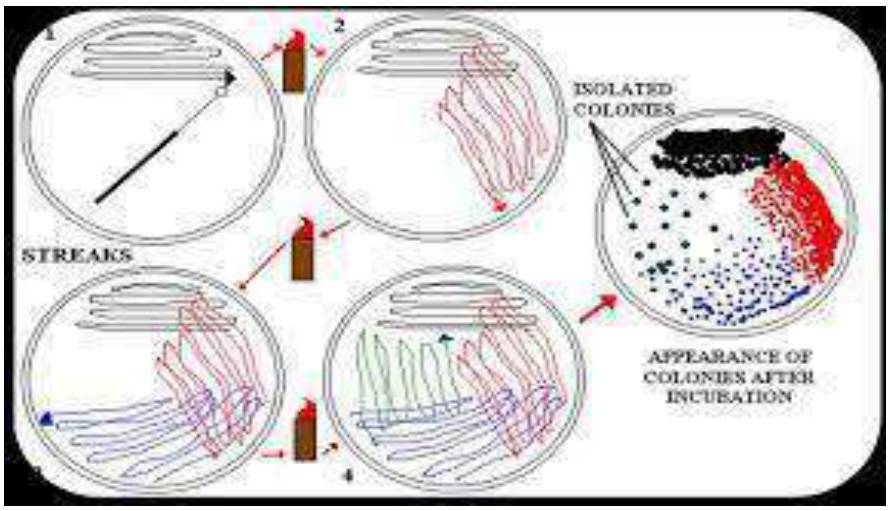
4 - ينمى للحصول على مزرعة نقية بعد 2الى 4 أيام من تاريخ النقل

ثانيا : تنقية البكتيريا

وهناك طريقتين للحصول على مستعمرة بكتيرية مفردة باستخدام الأطباق .

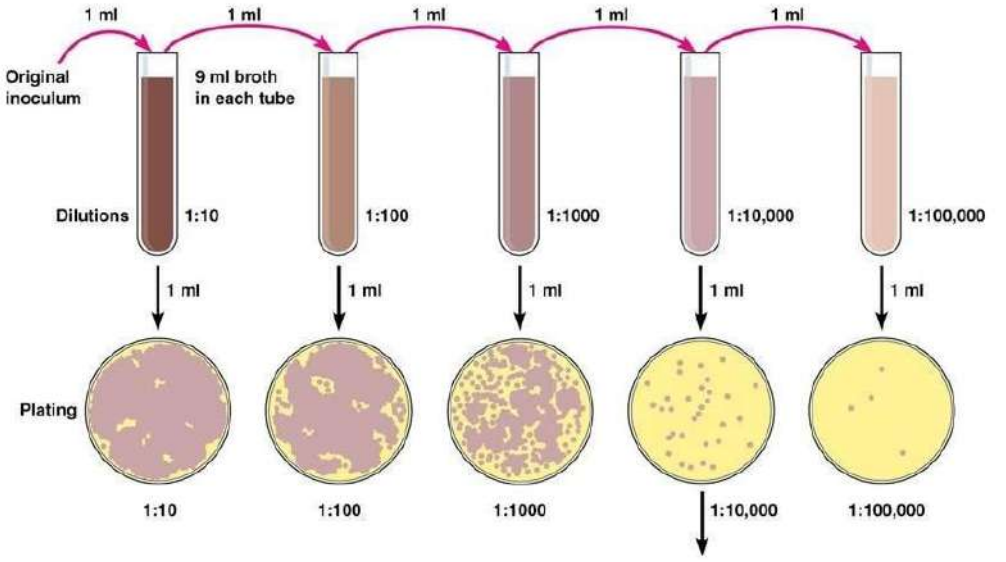
1- طريقة التخطيط على الأطباق Streaked plate method

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



2 - طريقة الأطباق المصبوبة Pour plate method

حيث يتم صهر بيئة الأكار المغذى الموجودة بالأنابيب ، ثم تبرد إلى 45مº ، 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



Calculation: Number of colonies on plate × reciprocal of dilution of sample = number of bacteria/ml
(For example, if 32 colonies are on a plate of $^{1}/_{10,000}$ dilution, then the count is 32 × 10,000 = 320,000 bacteria/ml in sample.)

Copyright © 2007 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

المحاضرة التاسعة

عزل المسببات المرضية من البذور

تنتقل العديد من الفطريات عن طريق البذور وتتم عن طريق التلوث الخارجي والقسم الأخر ينتقل عن طريق داخل اغلفة البذرة او في الجنين وهذا يساهم في نقل الأمراض من حقل لأخر ومن بلد لأخر ولهذا الغرض لابد من فحص سلامة البذور قبل استخدامه في الزراعة ،

هناك عدة طرق منها :-

1-فحص معلق ماء غسيل البذور الجافة

وهي طريقة لاختبار سلامة البذور وتستخدم فقط لمعرفة وجود المسببات المرضية المحمولة على سطح البذور وتعد هذه الطريقة مفيدة خاصة لفصل الفطريات المسببة للتفحم والتعرف عليها في النجيليات ويستخدم عدد من البذور وهو 400 بذرة ويجب ان لا يقل عدد البذور عن عدد البذور المحدد من قبل الجمعية العالمية لفحص البذور ISTA وهو 200 بذرة لكل اختبار . ويتم اجراء عليها طريقة التخافيف للحصول على المسبب المرضي.

2- طريقة ورق الترشيح

ويمكن تلخيص الطريقة بما يأتي

1-توخذ عينة من البذور المراد عزل الفطريات منها بمقدار 400 بذرة او اكثر

2- توضع في اطباق بتري معقمة على ورق الترشيح المبلل بمعدل 10-25 بذرة / طبق ويعتمد ذلك على حجم البذرة ترتب البذور في محيطين المحيط الخارجي 15-16 بذرة والمحيط الداخلي 8-9 بذور ثم بذور الوسط

3- ثم توضع في الحاضنة درجة حرارة 25 ± 2 سيليزية وتراقب بعد 48 ساعة لملاحظة نمو المستعمرات للتعرف على الفطريات النامية وتحديد النسبة المئوية لكل فطر من الفطريات في عينة البذور. ومن المفيد تحضين الاطباق بشكل اضاءة متبادلة مع الظلام كل لمدة 12 ساعة ومن الممكن تنقية المستعمرات الناتجة في أطباق بتري تحتوي على وسط زرعيPDA ثم توضع في الحاضنة درجة حرارة 25 ± 2 سيليزية . وتستخدم هذه الطريقة لاختبار فطريات *Fusarium ,Phoma ,Rhizoctonia ,Curvularia ,Alternaria*

3- طريقة أوراق الترشيح الملفوفة

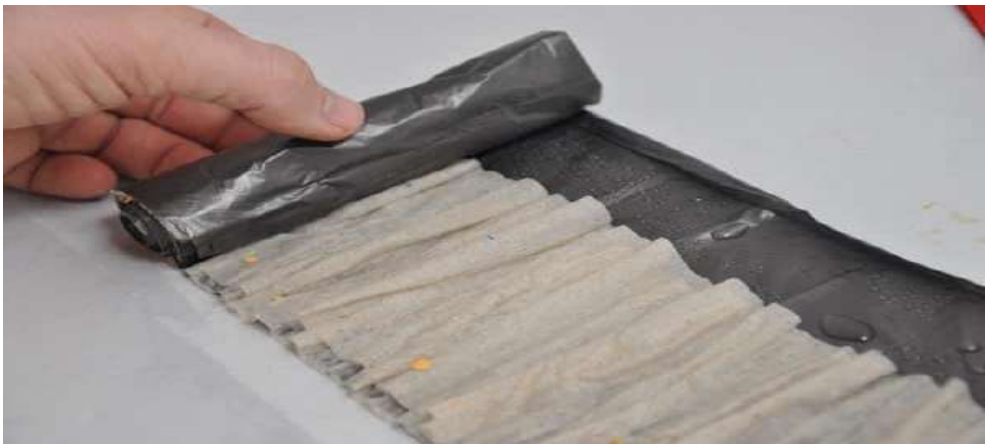
ويمكن تلخيص الطريقة بما يأتي

1-توخذ عينة من البذور المراد عزل الفطريات منها بمقدار 400 بذرة في ثمانية مكررات في كل مكرر 50 بذرة وترتبت في صفوف منتظمة .

تشبع بماء الحنفية ثم تغطى البذور بورقة ترشيح أخرى

تلف الورقتين على بعضهما بحذر بحيث لا تنجرف البذور عن موقعها ويثبتان بحلقة مطاط حول الجزء العلوي والقاعدي وتوضع في وضع قائم في سلة

3- ثم توضع في الحاضنة درجة حرارة 25 ± 2 سيليزية ومن المفيد لتحضين بشكل إضاءة متبادلة مع الظلام كل لمدة 12 ساعة وتفحص الأعراض المرضية على البادرات الناتجة وتسجل الفطريات النامية عليها وتحدد نسب الاصابة. ومن الممكن تزرع اجزاء من البادرات في أطباق بتري تحتوي على وسط زرعيPDA ومن ثم تنقية المستعمرات الناتجة .



4- طريقة الأطباق المصبوبة Agar plate method

ويمكن تلخيص الطريقة بما يأتي

1-توخذ عينة من البذور المراد عزل الفطريات منها بمقدار 400 بذرة او اكثر

2- تعقم البذور سطحيا بغمرها بمحلول هايبوكلورات الصوديوم بتركيز 1% لمدة 1-3 دقائق

3- تغسل البذور بالماء المقطر والمعقم للتخلص من اثر المعقم ثم تجفف البذور بورق النشاف

4- تزرع البذور في أطباق بتري تحتوي على وسط زرعي PDA ثم توضع في الحاضنة درجة حرارة 25 ± 2 سيليزية وتراقب بعد 48 ساعة لملاحظة نمو المستعمرات للتعرف على الفطريات النامية

5- عزل الفطريات الكامنة في البذور Isolation of seed born fungi

تنتقل الفطريات المرضية من البذور إما على السطح الخارجي للبذرة External او داخل البذرة ولعزل البذرة تحت الغلاف Internal ولعزل الفطريات منها يمكن إتباع الطريقة الآتية :

أ- عزل الفطريات من على السطح الخارجي للبذرة :

1- تؤخذ عينة البذور المراد فحصها وتقسم إلى قسمين .

2- القسم الأول يعقم سطحيا بأحد المطهرات أو بمحلول القاصر 10% ثم تزرع البذور على وسط غذائي مثل PDA وذلك بعد غسل البذور بالماء المعقم لإزالة آثار التعقيم السطحي.

3- القسم الآخر من عينة البذور تزرع على نفس الأوساط الغذائية لكن بدون أي تعقيم سطحي او غسل ويجب إجراء جميع العمليات تحت ظروف التعقيم .

4- تحضن الأطباق جميعاً على درجة 25° م لمدة (3 – 5) ايام مع ملاحظة عمل مكررات لا تقل عن (5) أطباق لكل نوع على ان يوضع في كل طبق 4 بذور متقابلة تقريبا .

5- تفحص الأطباق بعد فترة التحضين وتحدد الفطريات النامية حول البذور ثم تزرع في مزارع نقية وتشخص .

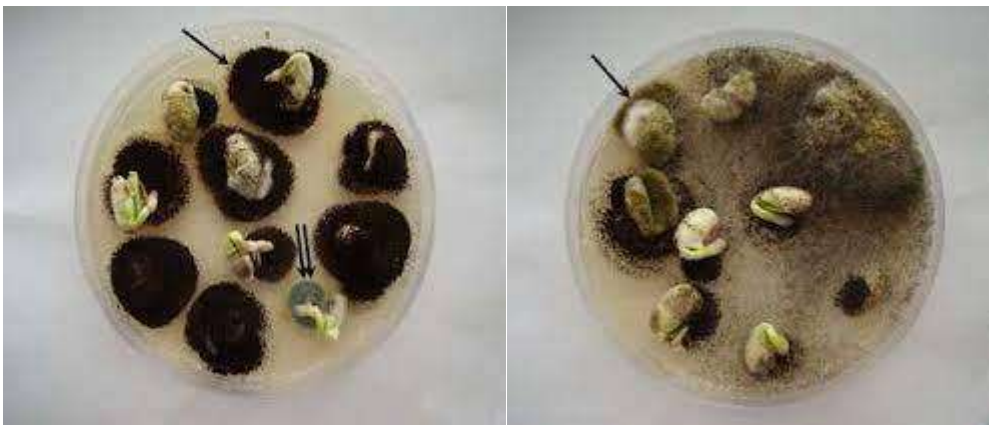
6- تعتبر الفطريات المعزولة من البذور المعقمة هي فطريات مرضية pathogenic fungi اما الفطريات المعزولة من البذور غير المعقمة هي فطريات رمية saprophytic fungi .

ب- عزل الفطريات من داخل البذور :

1- تعقم عينة البذور المراد فحصها تعقيما سطحيا بواسطة محلول القاصر 10% ثم تغسل بماء معقم لإزالة اثار المطهر .

2- توضع البذور المراد فحصها في وسط PDA بعد كسرها الى نصفين في عدة اطباق مكررات .

3- تحضن الاطباق لمدة (3-5) ايام وعلى درجة حرارة 25°م وبعد فترة التحضين تفحص الاطباق لتحديد انواع الفطريات المعزولة ولتحديد عدد البذور المصابة من غير المصابة .



المحاضرة العاشرة

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.

4 . اعادة عزل المسبب المرضي من النبات ومقارنته مع العزل من النقطة 2

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 الكاربوراندم carborundum.

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.

قياس المرض النباتي : وهي عملية تقييم كمية المرض الموجودة في المحصول وذلك لغرض
1-الدراسات الوبائية 2-تقييم الخسائر الناتجة عن أمراض النبات 3-تقييم طرق المكافحة المختلفة المستخدمة في السيطرة على أمراض النبات

ومن تلك الطرق

1- **حساب نسبة أو عدد النباتات المصابة** :حيث يتم حساب عدد النباتات المصابة حيث تقسم النباتات الى نباتات مصابة وسليمة فقط ويتم حساب نسبة الإصابة كنسبة مئوية وحسب العلاقة التالية

$$\% \text{ للإصابة} = \frac{\text{عدد النباتات المصابة}}{\text{عدد النباتات الكلي}} \times 100$$

وهذا القياس يستخدم بشكل كبير مع الأمراض الجهازية كأمراض الذبول والتفحمات مثل التفحم السائب والمغطى في الحنطة .

2- حساب شدة الإصابة على مقياس للمرض Disease Scale

تقدر شدة الإصابة في هذه الحالة بحصر عدد النبتات أو الأعضاء المصابة التي تقع في أقسام معينة لمقياس شدة الإصابة الذي يتم اختياره ثم نحص على رقم معين لشدة الإصابة عن طريق المعادلة التالية

$$\text{شدة الإصابة} = \frac{\text{عدد النباتات من الفئة (1)x دليلها المرضي} + \text{عدد النباتات من الفئة الاخيرة xدليلها المرضي}}{\text{العدد الكلي للنباتات x اعلى الدليل المرضي}}$$

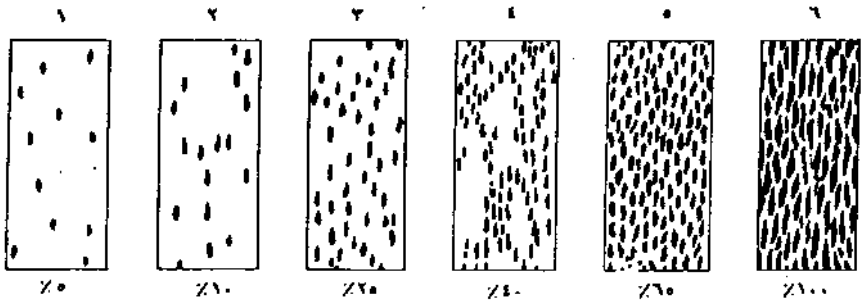
ومن أمثلة المقاييس لتحديد شدة الإصابة

أ-مقاييس الفئات : حيث تعتمد هذه المقاييس على توزيعات متساوية لنسبة الاعضاء او الانسجة المصابة مثل : الفئة الاولى صفر– 25% الفئة الثانية 25-50% الفئة الثالثة 50-75 % الفئة الرابعة 75-100 %

ب- المقاييس الوصفية لشدة الاصابة : Descriptive Scales مثل قليلة ،متوسطة ،وشديدة ثم تعوض هذه الفئات الى ارقام

ويرافق هذا النوع من المقاييس صور فوتوغرافية او أشكال تخطيطية توضح درجات الاصابة المختلفة كما في المقياس الوصفي والذي يمثل شدة الاصابة بمرض الصدأ في النجيليات تحت ظروف الحقل والمكون من ستة فئات تمثل كل فئة نسبة مئوية للإصابة وهي كم في الجدول والشكل التاليين

رقم الفئة	1	2	3	4	5
النسبة المئوية للإصابة	%0	%40-20	%60-40	%80-60	%100
دليل المرضي	0	1	2	3	4



(شكل ٤–١١) : مقياس وصفى يمثل شدة الإصابة بالصدأ فى النجيليات تحت ظروف الحقل .

المحاضرة الحادية عشر

المجهر الضوئي

المجهر جهاز يستخدم لفحص وتكبير الأجسام الدقيقة التي لا يمكن رؤيتها بالعين المجردة ، والتي تقاس أقطارها بالمليمتر والميكرون . ولذلك يجب أن يتميز المجهر بقوة تكبير بدرجة تكفى لرؤية التفصيلات الدقيقة للأشياء المفحوصة بدرجة عالية من الوضوح وقوة التمييز

ويمكن تعريف قوة التمييز بأنها أقصر مسافة ممكنة للرؤيا الواضحة بين نقطتين بحيث تبدو كل نقطة منفصلة عن الأخرى بوضوح وليست مندمجة معها .

تركيب المجهر الضوئي :-

يتكون المجهر من قاعدة مثبت عليها ذراع Limb ، ومثبت على الجزء العلوي من الزراع أنبوبة Tube يمكن تحريكها حركة رأسية بواسطة ضابطين :

أ - ضابط تقريبي Course adjustment

ب- ضابط دقيق Fine adjustment

وتعتبر أنبوبة المجهر هي الجزء الرئيسي فيه ، حيث يثبت في طرفها العلوي العدسات العينية Ocular lens ذات قوة التكبير 10 مرات عادة (X 10) ، ويثبت في طرفها السفلي العدسات الشيئية Objective lens الذي يتراوح عددها بين 2-5 عدسات ، ولكن يوجد في العادة ثلاث عدسات شيئية هي :-

الأولى : قوة صغرى ذات تكبير 10 مرات (X 10)

الثانية : قوة كبرى وقوة تكبيرها 40 مره (X 40)

الثالثة : تكبيرها 95 -100 مره (X 100) وتعرف بالعدسة الزيتية Oil immersion

وتركب العدسات الشيئية على قرص يعرف بالقطعة الأنفية Nose piece يتحرك حركة دائرية بحيث يجعل إحدى العدسات الشيئية على امتداد أنبوبة المجهر وفوق مصدر الضوء بحيث تكون العدسة جاهزة لفحص العينة في الشريحة.

أما مسرح المجهر Stage فيوجد على الجزء السفلي من الزراع ، ويوجد في منتصف المسرح فتحة تسمح بمرور الضوء إلى الشريحة . كما يوجد على المسرح ماسكين Clips لتثبيت الشريحة الزجاجية عند الفحص ، أو أن يزود المسرح بمحرك ميكانيكي يمكن تحريكه في أربع اتجاهات مختلفة .

ويوجد أسفل المسرح مصدر ضوئي موجه إلى داخل أنبوبة المجهر ، وكذا مكثف لتوجيه الضوء باتجاه العينة ، وهذا الأخير مزود بحجاب Diaphragm للتحكم في كمية الضوء المتجه إلي العينة وذلك بواسطة ضابط خاص

ويمكن حساب قوة تكبير المجهر من المعادلة :-

قوة تكبير المجهر = قوة تكبير العدسة العينية × قوة تكبير العدسة الشيئية

الاحتياطات الواجب مراعاتها عند استعمال المجهر :-

1- التأكد من نظافة جميع العدسات .

2- الاحتراس من اتساخ أجزاء المجهر وخاصة العدسات بأي من محاليل التحميل أو الصبغ المستعملة ، وإذا حدث واتسخت العدسات الشيئية فيمكن تنظيفها باستخدام الزيلول ثم تجفف بسرعة

3- تستخدم العدسة الشيئية الصغرى (10 X) في ضبط الضوء ، وتوضع الشريحة على مسرح المجهر بحيث يكون التحضير في مسار الضوء من المكثف إلى الشيئية

4- يتم تحريك أنبوبة المجهر إلى أسفل باستخدام الضابط التقريبي ببطء ، بحيث تكون العدسة الشيئية الصغرى على بعد حوالي 5مم من التحضير ، ثم يستخدم الضابط الدقيق في رؤية معلم التحضير ، يمكن بعد ذلك استبدال العدسة الصغرى بالعدسة الكبرى وذلك بإدارة القطعة الأنفية واستعمال الضابط الدقيق فقط لرؤية تفاصيل التحضير

5- يجب التأكد من وضع غطاء الشريحة (Cover) على التحضير عند الفحص بالعدسة الشيئية الكبرى

6- يجب وضع قليل من زيت خشب السيدر Cedar - wood oil في حالة استخدام العدسة الشيئية الزيتية (100 X) وبحيث تكون العدسة ملامسة للزيت . حيث أن زيت السيدر يزيد من مقدار الفتحة العددية

تجنب غمض إحدى العينين عند الفحص المجهري لأن ذلك يضعفها

المحاضرة الثانية عشرة

تحضير الشرائح الزجاجية

إن الهدف من تحضير الشرائح الزجاجية هو فحص النماذج الفطرية لغرض تشخيصها والتعرف عليها من خلال الصفات المظهرية والشكلية للخيوط الفطرية والابواغ والحوامل الكونيدية وحوامل الحوافظ البوغية والتراكيب التكاثرية ولهذا الغرض يجب معرفة ما يأتي:

1 - تركيب جسم الفطر

لمعظم الفطريات جسماً خضريا يتألف من خيوط فطرية مستمرة يعرف كل خيط منها بالهايفة Hypha وتكون الخيوط بمجموعها مايسمى الغزل الفطري Mycelium وهذه الخيوط قد تكون مقسمة بجدر مستعرضة الى خلايا تحتوي على نواة واحدة أو أكثر أو غير مقسمة وفي هذه الحالة تسمى مدمج خلوي Coenocytic وان نمو الفطريات يحدث في أطراف الخيوط الفطرية وان بعض الفطريات الواطئة تفقد الغزل الفطري الحقيقي وتنتج كتل بروتوبلازمية متعددة النوى تعرف بالبلازموديوم Plasmodium او يتكون جسم الفطر من خلية مفردة بسيطة كما في الخمائر

تحورات الغزل الفطري

يبقى الغزل الفطري على هيئة خيوط غير متماسكة ولكنه في العديد من الفطريات المتطورة وفي مراحل معينة من النمو يأخذ الغزل الفطري شكل نسيج وكما يأتي

1- النسيج البروزونكيمي Prosenchyma وفيه يكون النسيج مفكك ويمكن تمييز الخيوط الفطرية فيه .

2- النسيج البرنكيمي الكاذب Pseudoparenchma وفيه يكون النسيج متماسك لا تمييز الخيوط الفطرية فيه وانما يظهر بشكل خلايا في المقطع العرضي قريبة الشبه في النباتات الراقية

وتكون هذه الانسجة تراكيب خاصة قد تكون خضرية او تكاثرية منه:

1- الحشية الثمرية Stroma التي تنشا من نسيج مندمج تتكون على سطحها او في داخلها الاجسام الثمرية لبعض الفطريات الكيسية

2- الجسم الحجري Sclerotia ينشا من نسيج برنكيمي كاذب مندمج بدرجة كثيفة تتغلظ جدر الخيوط الخارجية منه وتتكون طبقة واقية تشبه القشرة وهو مرحلة ساكنة قادرة على الانبات عند عودة الظروف الملائمة

3- السبورات الكلاميدية Clamydospore وفيه تتجمع محتويات الخلية في اجزاء من الخيط الفطري فتتركز محتويات الخلية وتسدير وتحيط نفسها بجدار سميك لمقاومة الظروف غير الملائمة

4- الممصات Haustoria نموات جانبية تكونها الفطريات اجبارية التطفل الى داخل خلايا العائل لامتصاص الغذاء منها وهي ذات أشكال وأحجام مختلفة فمنها الكروية والكمثرية والمفصصة .

2- تكوين الابواغ :

رغم استخدام العديد من التسميات والمصطلحات للأنواع العديد من الابواغ فهناك نوعان أساسيان من الابواغ اعتمادا على طرق إنتاجها وتكوينها الى

1-الابواغ الجنسية : وهي

ا-الابواغ البيضية Oospore

ب-الابواغ اللاقحية Zycospore

ج-الابواغ الكيسية :Ascospore

د-الابواغ البازيدية Basidiospore

وتعد الاختلافات بين في شكل وطريقة تكوين الابواغ الجنسية كمعايير أساسية للتمييز بين المجاميع الرئيسية للفطريات

2-الابواغ اللاجنسية : تتكون الابواغ اللاجنسية خلال دورة حياة الفطر وهي على نوعين

1- الابواغ اللاجنسية الحافظية Sporangiospores والتي تنشا داخل تركيب يعرف بالحافظة البوغية Sporangia وهي على نوعين

أ-الابواغ المتحركة Zoospores وتتحرك بواسطة الاسواط وقد تكون احادية او ثنائية السوط

ب- الابواغ الساكنة Aplanospores وهي ابواغ ساكنة غير متحركة

2 الابواغ الكونيدية Conidiospores وهي التي لاتنشا داخل حافظة البوغية Sporangia وتنشا الكونيدات على سطح الخيوط الفطرية مباشرة وتكون جالسة او حمولة على أطراف حوامل يطلق عليها الحوامل الكونيدية Conidiophores وهذه الحوامل مفردة او قد تتجمع مكونة تراكيب ثمرية لاجنسية وهي

1-الوسادة البوغية Sporodochium حوامل كونيدية متراكبة بشكل حشية

2-الظفيرة الكونيدية Synnema وهي تجمع لحوامل كونيدية متداخلة بشكل ظفيرة

3 –الكويمة الكونيدية Acervulus وهي تجمع لحوامل كونيدية قصيرة قائمة بصورة عمودية

4-البكنيدة Pycnidium وهي تجمع لحوامل كونيدية مركبة كروية الى قارورية الشكل

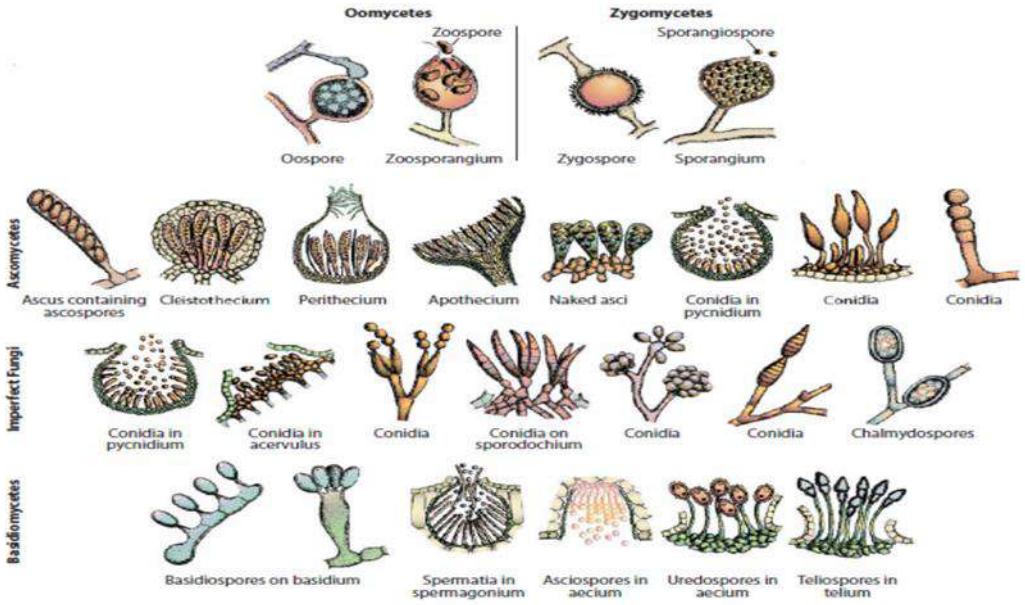


FIGURE 11-2 Representative spores and fruiting bodies of the fungal-like Oomycetes and the main groups of fungi.

المحاضرة الثالثة عشر

هناك أكثر من طريقة لتحضير الشرائح الزجاجية للفطريات منها ما يأتي

1-شريحة من مزرعة فطرية حديثة :

يمكن تحضير شريحة من مزرعة فطرية حديثة لغرض دراسة الخيوط الفطرية والتراكيب الاخرى والاختلافات فيما بينها :

المواد المستخدمة

1-شرائح زجاجية مع الاغطية

2-ابرة عزل

3 -مصباح بنزن

4-ماء مقطر

5- لاكتوفينول

6 - مزارع حديثة العمر 3-5 ايام لبعض الفطريات مثل: .
Fusarium sp ,Alternaria sp,penicillium sp sp,Rhizopussp ,Aspergillus sp

طريقة العمل

1 –تعقم ابرة النقل باللهب حتى الاحمرار تبرد عند حافة الوسط الزرعي قبل نقل الفطر

2-ينقل جزء صغير من الفطر بالإبرة المعقمة ويوضع على شريحة زجاجية مع قطرة من الماء المقطر او اللاكتوفينول ثم يوضع غطاء الشريحة

1- تفحص الشريحة تحت المجهر ويلاحظ المظهر العام للخيوط الفطرية وصفاتها التركيبية وهل هي عديمة الحواجز او هي من النوع المقسم بحواجز عرضية

2-شريحة الشريط اللاصق الشفاف

تستخدم هذه الطريقة لتحضير الشرائح من المزارع ذات الخيوط الهوائية لغرض دراسة طبيعة هذا النوع من الخيوط والحوافظ البوغية وحوامل الحوافظ البوغية الموجودة على سطح المستعمرة .

المواد

المواد المستخدمة

1-شرائح زجاجية

2-شريط لاصق شفاف

3-ماء مقطر

4- لاكتوفينول

5 - مزارع حديثة العمر 3-5 ايام لبعض الفطريات مثل: .
Fusarium sp ,Alternaria sp,penicillium sp sp,Rhizopussp ,Aspergillus sp

طريقة العمل

1 – يؤخذ 4 سم من الشريط اللاصق الشفاف (بعرض 1-2 سم)

2-تمسك قطعة الشريط اللاصق من طرفيها بالسبابة والابهام ووضع الوجه اللاصق من الشريط على سطح مستعمرة الفطر ويضغط عليها برفق

3- يرفع الشريط اللاصق ويوضع على شريحة زجاجية مع قطرة من الماء المقطر او اللاكتوفينول

4 -تفحص الشريحة تحت المجهر ويلاحظ المظهر العام للخيوط الفطرية والتراكيب الاخرى مثل الابواغ والكونيدات وحواملها والحوافظ البوغية وحواملها

3 –تحضير شرائح من اجزاء نباتية مصابة

يمكن تحضير شرائح من اجزاء نباتية مصابة باستخدام عدة طرق منها

ا- السلخ Stripping : وهي عمل سلخ لبشرة الجزء المصاب بما عليه من نمو فطري التي تستعمل هذه الطريقة في معرفة إذا كان نمو الطفيلي سطحي (البياض الدقيقي) أو داخلي مثل البياض الزغبي . فيتم ذلك عن طريق عمل شق غير عميق في بشرة الجزء المصاب بواسطة شفرة حادة ثم تمسك طرف البشرة عند حافة الشق بواسطة ملقط رفيع مدبب .

ب- الكشط Scrapping: يتم ذلك عن طريق اخذ جزء من نمو الطفيلي الخارجي وبدون أي جزء من أنسجة العائل وبواسطة إبرة يفرد على وسط التحميل المستخدم ثم يغطى بغطاء الشريحة وتستخدم هذه الطريقة مع الفطريات التي تنمو سطحيا على العائل مثل الأصداء والتفحمات .

ج- السحق والتمزيق Crushing and Tearing :حيث تسحق الأنسجة المحتوية على النمو الطفيلي ويسحق الطفيلي نفسه لتحرير مكوناته كالأجسام الثمرية باستخدام قاعدة الإبرة والضغط عليه بالغطاء الزجاجي .

خطوات العمل لصبغ وتحميل العينة المراد فحصها :-

تم إتباع الخطوات المدرجة أدناه في كيفية تحميل العينة المزمع فحصها :-

1- يتم تهيئة شرائح مع أغطيتها نظيفة وجافة .

2- تم توضع قطرة من سائل التحميل (الاكتوفينول) أو الماء في وسط الشريحة .

3- تم وضع غطاء الشريحة الذي يوضع بشكل مائل ويمسك باليد اليسرى ثم يغطي الجزء المراد فحصه تدريجيا .

4- تعلم الشريحة وتفحص .

المحاضرة الرابعة عشر

تقييم المبيدات الفطرية مختبرياً

تستخدم العديد من المبيدات الفطرية في برامج المكافحة الكيماوية لإمراض النبات ولابد من إجراء تقيم لهذه المبيدات قبل استخدامها لتحديد تأثير هذه المبيدات على الفطريات المسببة لهذه الأمراض وتحديد التركيز المناسب من هذه المبيدات وكذلك للمفاضلة بين أنواع المبيدات وهناك العديد من طرق التقييم المختبرية ومن هذه الطرق :

1- اختبار كفاءة المبيدات الفطرية في تثبيط النمو الشعاعي للفطريات الممرضة

ويتم تنفيذ هذه الاختبار كم يأتي

1-يحضر الوسط الغذائي PDA ويعقم بواسطة جهاز الاوتوكليف وعلى درجة حرارة 121 سليزية وضغط جوي 1.5 جو

2- يضاف المبيد الفطري إلى الوسط الغذائي المعقم ويتم حساب تركيز المبيدات المستخدمة على أساس تركيز المادة الفعالة حيث تستخدم عادة التراكيز التالية 50 ، 100 ،150، 200 مل مادة فعالة من المبيد قيد الدراسة / لترمن الوسط الغذائي

3- يصب الوسط الغذائي الحاوي على المبيد الفطري في أطباق بتري معقمة وبواقع 3 أطباق لكل تركيز مع 3 أطباق للمقارنة والتي تحتوي على الوسط الغذائي PDA فقط

4-يلقح مركز الطبق بعد تصلبه بقرص بقطر 0.5 سم مأخوذ من مزرعة حديثة للفطر قيد الدراسة

5 تحض الأطباق في حاضنة في درجة حرارة 27 ± 2 سيليزية وتؤخذ القراءات قبل يصل نمو مستعمرة الفطر في أطباق المقارنة إلى حافة الطبق أو بعد فترة زمنية محددة اذ كانت طبيعة نمو الفطر بطيئة وذلك بحساب أقطار مستعمرات الفطر الممرض بأخذ معدل نمو قطرين متعامدين

يتم حساب النسبة المئوية لتثبيط النمو في تثبيط النمو الشعاعي للفطريات وفق العلاقة التالية

$$\text{النسبة المئوية للتثبيط} = \frac{\text{معدل قطر المستعمرة المقارنة} - \text{معدل قطر المستعمرة في المعاملة}}{\text{معدل قطر المستعمرة في المقارنة}} \times 100$$

2 - اختبار تأثير المبيدات الفطرية على الوزن الجاف للفطريات الممرضة

ويتم تنفيذ هذه الاختبار كم يأتي

1-يحضر الوسط الغذائي السائل PDB Potato Dextrose Broth المكون من مستخلص 200غم بطاطا و 20غم Dextrose/لتر ماء مقطر وزع في دوارق مخروطية سعة 250مل وبمعدل 100مل/دورق. يعقم الوسط الغذائي بجهاز التعقيم البخاري على درجة حرارة 121 سليزية وضغط 15 باوند/انج^2 لمدة 20 دقيقة.

2-تبرد الدوارق ويضاف المبيد الفطري إلى الوسط الغذائي المعقم ويتم حساب تركيز المبيدات المستخدمة على أساس تركيز المادة الفعالة حيث تستخدم عادة التراكيز التالية 50 ، 100 ،150، 200 مل مادة فعالة من المبيد قيد الدراسة / لترمن الوسط الغذائي و وبواقع 3 دوارق لكل تركيز مع 3 دوارق للمقارنة والتي تحتوي على الوسط الغذائي PDA فقط

3- يلقح كل من الدوارق بقرص قطر 0.5 سم من مأخوذ من مزرعة حديثة للفطر قيد الدراسة تحضن الدوارق عند درجة حرارة 27 ± 2 سيليزية لمدة 10 أيام

4- ترشح مزرعة الفطر السابقة خلال ورق ترشيح نوع Whatman No.1 تم وزنها مسبقا

5- تجفف أوراق الترشيح الحاوية على مزرعة الفطر في فرن في درجة حرارة 70 سيليزية لمدة 84 ساعة ثم توزن أوراق الترشيح ويحسب منها الوزن الجاف لمزرعة الفطر

6 - يتم حساب النسبة المئوية لتثبيط في الوزن الجاف للفطريات الممرضة وفق العلاقة التالية

$$\text{النسبة المئوية للتثبيط} = \frac{\text{معدل الوزن الجاف المقارنة} - \text{معدل الوزن الجاف في المعاملة}}{\text{معدل الوزن الجاف في المقارنة}} \times 100$$

3- تأثير المبيدات الفطرية على النسبة المئوية لإنبات ابواغ الفطريات

1-يحضر الوسط الغذائي PDA ويعقم بواسطة جهاز الاوتوكليف
2- يضاف المبيد الفطري إلى الوسط الغذائي المعقم ويتم حساب تركيز المبيدات المستخدمة على أساس تركيز المادة الفعالة حيث تستخدم عادة التراكيز التالية 50 ، 100 ،150، 200 ملغم مادة فعالة من المبيد قيد الدراسة / لترمن الوسط الغذائي
3- تصب طبقة رقيقة من الوسط الغائي الحاوي علة المبيد الفطري على سطح شريحة زجاجية من شرائح الفحص المكرسكوبي بعد تصلب الوسط الغائي ينشر مقدار 0.1 مل من معلق بوغي للفطر الممرض
4- تخضن الشرائح في 27 ± 2 سيليزية وتفحص بعد 4 -6 ساعات ويتم حساب عدد الابواغ النابتة في 5 حقول مجهرية
5 - يتم حساب النسبة المئوية لتثبيط في إنبات الابواغ للفطريات الممرضة وفق العلاقة التالية

$$\text{النسبة المئوية للتثبيط} = \frac{\text{معدل عدد الابواغ النابتة المقارنة} - \text{معدل عدد الابواغ النابتة في المعاملة}}{\text{معدل عدد الابواغ النابتة في المقارنة}} \times 100$$