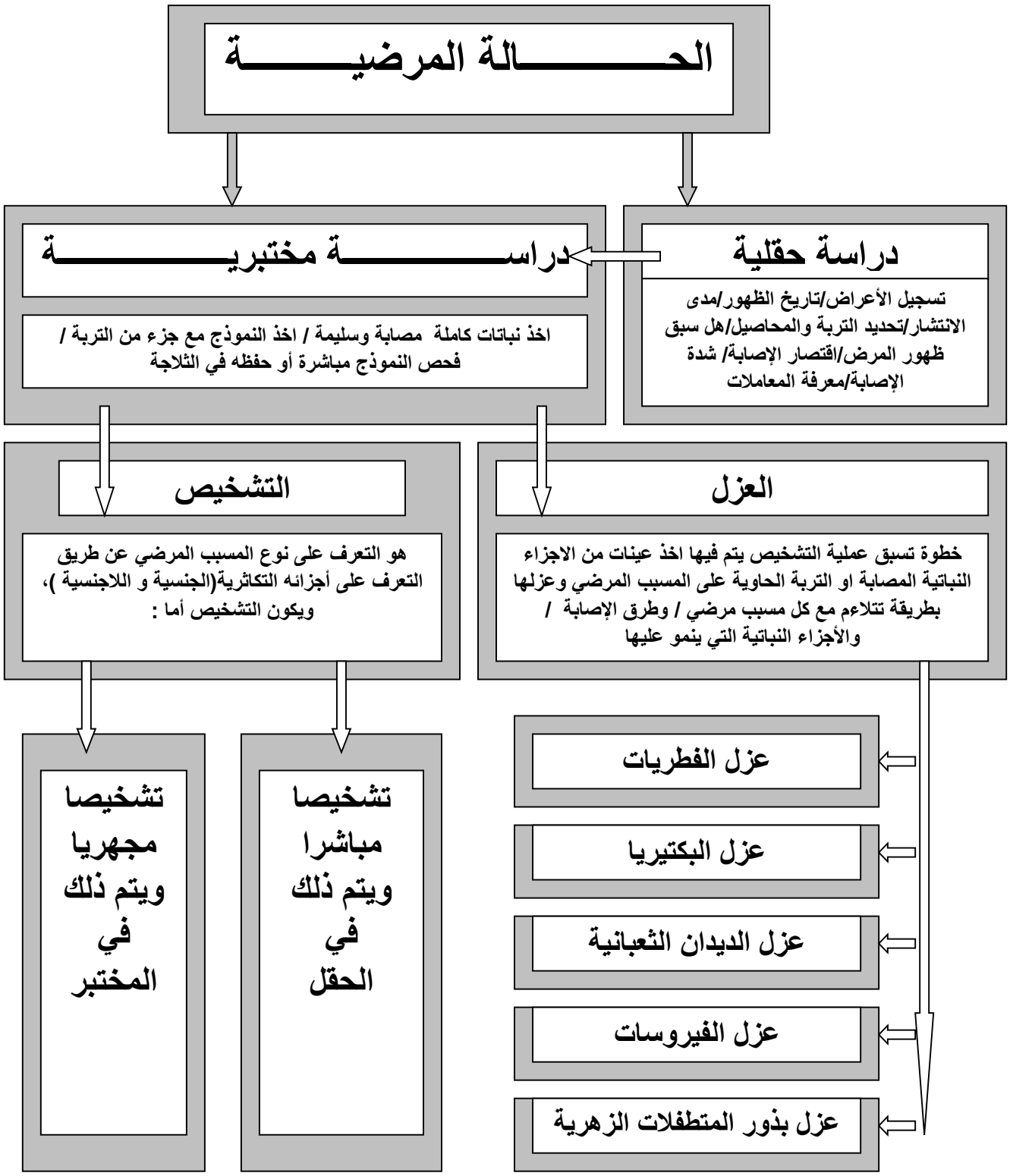

الحـــــــالة المرضيـــــــة
دراسة حقلية
تسجيل الأعراض/تاريخ الظهور/مدى الانتشار/تحديد التربة والمحاصيل/هل سبق ظهور المرض/اقتصار الإصابة/ شدة الإصابة/معرفة المعاملات
دراســـــــــة مختبريـــــــــة
اخذ نباتات كاملة مصابة وسليمة / اخذ النموذج مع جزء من التربة / فحص النموذج مباشرة أو حفظه في الثلاجة
العزل
خطوة تسبق عملية التشخيص يتم فيها اخذ عينات من الاجزاء النباتية المصابة او التربة الحاوية على المسبب المرضي وعزلها بطريقة تتلاءم مع كل مسبب مرضي / وطرق الإصابة / والأجزاء النباتية التي ينمو عليها
التشخيص
هو التعرف على نوع المسبب المرضي عن طريق التعرف على أجزائه التكاثرية(الجنسية و اللاجنسية)، ويكون التشخيص أما :
عزل الفطريات
عزل البكتيريا
عزل الديدان الثعبانية
عزل الفيروسات
عزل بذور المتطفلات الزهرية
تشخيصا مباشرا ويتم ذلك في الحقل
تشخيصا مجهريا ويتم ذلك في المختبر

طرق دراسة أمراض 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 حقلياً، 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.

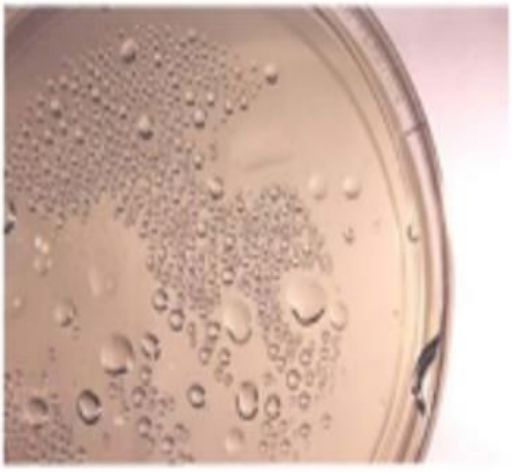
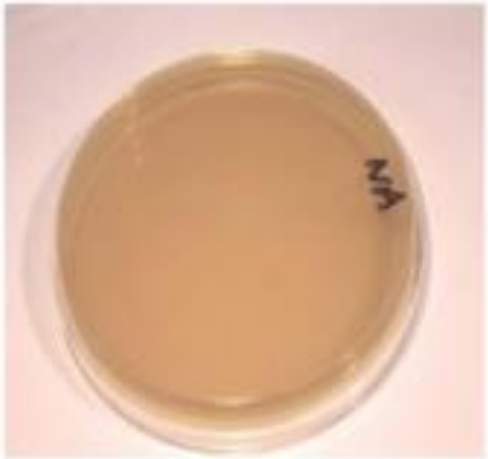
تحضير البيئات المغذية Media preparation

وهي العملية التي تسبق العزل للحصول على البيئات مناسبة لغرض نمو الاحياء الدقيقة في المختبر، ويتطلب توفير مواد مناسبة لاستمرارها ونموها وتكاثرها، اذ يحتوي على الماء ومصادر الطاقة وعناصر مغذية والفيتامينات وحسب متطلبات الميكروبات المختلفة.

فالهدف من تحضير البيئة المغذية والمعقمة هو:

1- للحصول على نوع واحد من المسبب المرضي بصورة نقية.
2- تدعيم نمو المستعمرات المرضية والمحافظة عليها لفترات طويلة.
3- تنمى للحصول على كميات منها لتحضير اللقاحات.

أهم الامور الواجب مراعاتها وهي عدم صب البيئة وهي ساخنة بدرجة 50 °م إذ يسبب ذلك تكثف بخار الماء على السطح الداخلي للطبق وهذه مشكلة تعيق رؤية الأحياء المراد تنميتها كما موضح في الصورة (1)، الصب بطريقة سليمة عند 45 °م لن يكثف بخار الماء بالطبق كما في صورة (2).

	
1) تكثف بخار الماء داخل الطبق بسبب صب البي عند درجة حرارة أعلى من 50 °م	2) الصب داخل الطبق بطريقة سليمة عند درجة حرارة 45 °م

العزل والتشخيص ISOLATION & DIAGNOSIS

العزل ISOLATION

وهو 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.

وتختلف طرق العزل باختلاف نوع المسبب المرضي وكما يأتي:

1- العزل من الأجزاء النباتية

أ- العزل المباشر Direct Isolation

حيث يتم عزل نموات او بعض تراكيب الفطر الظاهرة على الأجزاء النباتية مباشرة في أطباق حاوية على وسط زرعي غذائي او وضعها مباشرة على شريحة زجاجية لغرض فحصها تحت المجهر.

ب- العزل غير المباشر Indirect Isolation

تؤخذ قطع صغيرة من الجزء النباتي المراد العزل منه سواء كان ساقا او ورقة أو جذرا ، ويراعى أن تكون القطع محتوية على جزء من النسيج المصاب وجزء من النسيج السليم (لان الفطر يمتد الى الجزء غير المصاب بصورة اشد)، وتكون القطع بقياس 0.5 سم ،ويتم تعقيم القطع باستخدام محلول القاصر الذي يحتوي في تركيبه على هايبوكلوريت الصوديوم بنسبة 1-5% ،يؤخذ 10سم^3 من محلول القاصر ويضاف له 90 سم^3 من الماء أي أن يكون محلول القاصر بتركيز 10% ، ويضاف الى القطع النباتية ، وتترك هذه القطع في المحلول فترة 1-2 دقيقة حيث يعمل المحلول على إزالة الملوثات الخارجية ، وبعدها تنقل القطع الى أطباق بتري وتتم عملية النقل باستخدام ملاقط معقمة بالكحول واللهب، ثم تنقل الى الماء لإزالة اثر الكحول لكي لا يؤدي الى قتل المسبب المرضي ، ثم تنقل قطع الأجزاء النباتية باستعمال الملاقط الى ورق ترشيح ليعمل على إزالة اثر الماء لان الرطوبة الزائدة تعمل على تنشيط البكتيريا، ثم تنقل القطع النباتية الى الأوساط الغذائية المعقمة بجهاز الاوتوكليف Autoclave ، ثم توضع في الحاضنة على درجة حرارة 25 م^0 لمدة 3 – 5 أيام بعدها تفحص النموات الفطرية تحت المجهر، كذلك تستخدم نفس الخطوات السابقة في عزل المسببات المرضية من البذور، أما إذا أريد معرفة الملوثات السطحية

فتزرع البذور مباشرة وبدون تعقيم على الوسط ألزرعي المعقم ثم توضع في الحاضنة على درجة حرارة 25 م^0 لمدة 3 – 5 أيام بعدها تفحص النموات الفطرية تحت المجهر

ج – العزل بطريقة المزارع المائية Water Culture

توضع الأجزاء النباتية المراد العزل منها وغالبا ما تكون جذور في أطباق بتري معقمة تحتوي على ماء معقم بعد غسلها جيدا بماء الحنفية لمدة 15 دقيقة لإزالة الأتربة والملوثات الخارجية ثم توضع في الحاضنة على درجة 25م^{0}لمدة 24 ساعة وبعدها تفحص مباشرة تحت المجهر، تستخدم هذه الطريقة لعزل بعض أنواع الفطريات مثل فطر بثيم *Bythium* وفطر *Phytophthora* ، وغالبا ما تكون هذه الفطريات موجودة في التربة ،لذلك تصيب الجذور في معظم الأحيان .

وتساعد هذه الطريقة على تكوين السبورات السابحة Zoospores لهذه الفطريات ، وبعد تكون السبورات يمكن عزلها أما بصورة مباشرة او باستخدام الأوساط الغذائية.

د – العزل بطريقة ورق الترشيح الرطب Moist Chamber

وهنا يتم وضع أوراق ترشيح في أطباق بتري معقمة ، ويتم ترطيب هذه الأوراق باستخدام ماء معقم ،ثم توضع عليها الأجزاء النباتية المراد العزل منها (وخاصة البذور)بعد تعقيمها سطحيا بالكلوراكس. ثم توضع في الحاضنة على درجة حرارة 25 م^0 .تستخدم هذه الطريقة من العزل في الفطريات التي تسبب التبقع على الأوراق والسيقان مثل فطر الالترناريا *Alternaria,* والفطر *Stemphylium* ،تساعد هذه الطريقة على كيفية تتبع تكوين السبورات.

و– العزل بطريقة حقن النبات

عندما يكون الفطر متطفلا إجباريا ولا يمكن تنميته على بيئة غذائية صناعية ، فبالإمكان حقن العائل مباشرة بالمحلول الفطري للفطر الممرض حيث يتم التعرف على الفطر الممرض(المسبب المرضي) بعد ظهور الأعراض على النبات.

2– العزل من الماء

يستخدم في هذا النوع من العزل ما يسمى بالطعوم الصائدة النباتية ، التي غالبا ما تكون بذور نباتات زهرة الشمس او الذرة او بذور الجت . تؤخذ البذور لتغلى في الماء لفترة قصيرة لغرض

تعقيمها ولغرض عدم إنباتها، بعدها توضع في أطباق بتري تحتوي على الماء المراد العزل منه ثم توضع في الحاضنة ، بعد فترة تنمو بعض الفطريات والمسببات المرضية الموجودة في الماء على تلك البذور. تعزل أما بصورة مباشرة او باستخدام الأوساط الغذائية.

3- العزل من التربة Isolation from Soil : وتتم كالآتي :-

أ- **العزل المباشر :** تؤخذ كمية قليلة من التربة الزراعية المأخوذة من عينة عشوائية مختارة وتنثر على أطباق بتري تحوي على الوسط الغذائي PDA بواسطة مشرط معقم أو بواسطة الإبهام والسبابة بعد تعقيمها ثم توضع في الحاضنة تحت درجة حرارة 25 °م وبعد 4-5 أيام تفحص وتشخص المسببات النامية ، ومن مساوئ هذه الطريقة هو نمو الأحياء بكثافة عالية بحيث يصعب عد المستعمرات النامية ويمكن معالجتها بتخفيف التربة بالرمل المعقم .

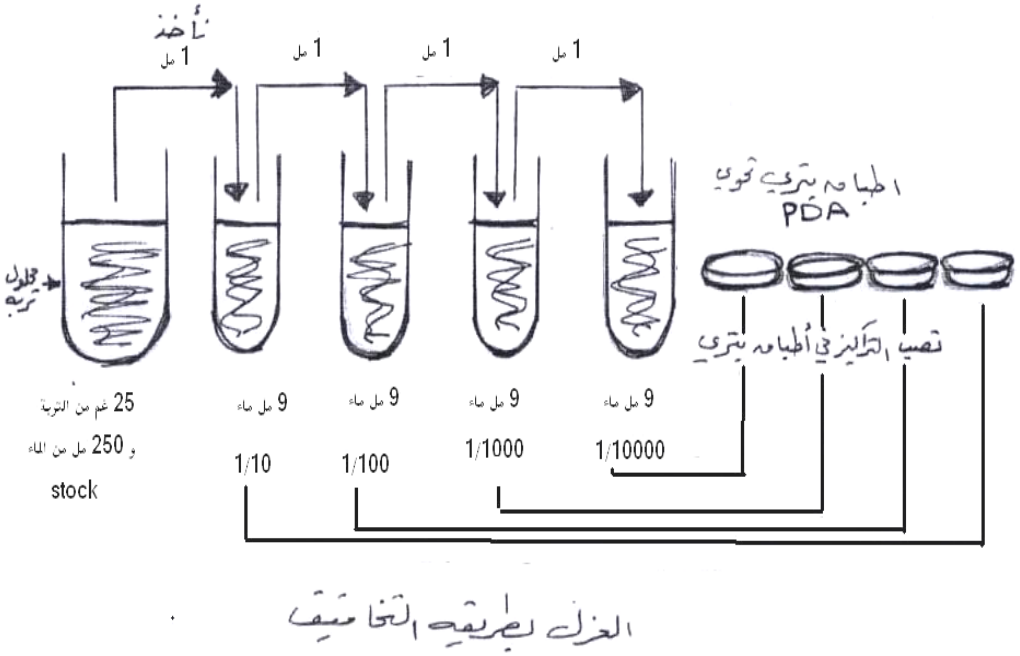
ب- العزل بطريقة التخافيف (الأطباق المصبوبة) ويتم كالآتي:

- تؤخذ عينة عشوائية من تربة الحقل، ويجب أن تكون العينة مأخوذة من أماكن متعددة ومن أعماق مختلفة ثم تجانس وتمزج جيدا.

- تنخل (تغربل) كمية من تربة الحقل بمنخل دقيق للتخلص من الشوائب العالقة بها.
- تؤخذ عينة بوزن 25 غرام من التربة أعلاه على أساس الوزن الجاف وتوضع في وعاء بسعة لتر ثم يضاف إليها 250 مل من الماء المعقم ، وتخلط التربة بالماء جيدا ويكون الخلط أما يدويا أو باستعمال الهزاز الكهربائي shaker.
- ينقل 1 مليلتر من المعلق بواسطة ماصة معقمة الى أنبوبة تحوي على 9 مليلتر من الماء المعقم لنحصل على محلول مخفف بنسبة 10/1 .
- يؤخذ 1 مليلتر من المعلق الأخير ويضاف الى 9 مليلتر من الماء المعقم للحصول على محلول مخفف بنسبة 100/1 ، وباستمرار هذا العمل نستطيع الحصول على تخفيف بنسبة 1000/1 و 10000/1.....الخ
- ينقل 1 مل من المحلول المعلق بتركيز 100/1 بواسطة ماصة معقمة الى طبق زجاجي ثم تضاف كمية 15 مل تقريبا من الوسط الزرعي أكار الدكستروز والبطاطا PDA ثم يحرك الطبق حركة دائرية لكي يتجانس المحلول مع الوسط الزرعي ويترك حتى يتصلب ويكرر نفس العمل بالنسبة للتخافيف الأخرى.

- توضع الأطباق في الحاضنة على درجة حرارة 25 م^{O} ولمدة 5 أيام يمكن بعدها ملاحظة نمو المستعمرات للتعرف على الفطريات النامية.
-
- يمكن معرفة عدد الأحياء أو الكثافة العددية من المعادلة الآتية

عدد الأحياء = عدد المستعمرات النامية × مقلوب التخفيف



العزل بطريقة التخافيف

ج – العزل بطريقة المصائد النباتية :

1- العزل باستعمال مقاطع من أوراق نباتية

تؤخذ كمية من التربة وتخفف بالماء كما ذكر في (ب) ، بعد وضعها في دورق زجاجي ، ثم يتم عمل مقاطع من أوراق نباتيــة سليمة بواسطة ثاقبة الأوراق وتوضع في الدورق بعد تعقيمها سطحيا بالكلوراكس لمدة 1–2 دقيقة، بعدها يوضع الدورق في هزاز كهربائي لفترة 2–3 ساعة أو يرج يدويا فتعمل مقاطع الأوراق النباتية باصطياد الفطريات الموجودة في التربة ، ثم يفرغ محتوى الدورق بمنخل لغرض اخذ مقاطع الأوراق النباتية فقط بعد غسلها بالماء لإزالة الطين العالق ثم تنشف بورق ترشيح ، بعدها تزرع في أطباق بتري معقمة تحتوي على وسط زرعي معقم ثم توضع في الحاضنـــة وبعد 5أيام تفحص الفطريات النامية

2- العزل باستعمال درنات البطاطا

ممكن استعمال شرائح صغيرة من درنات البطاطا تطمر أو تدفن في التربة المراد عزل الفطريات منها ثم توضع في الحاضنة وبعد 3-5 أيام ترفع القطع من التربة ويلاحظ ما موجود عليها من نمو ثم يعزل على الوسط ألزرعي PDA ويحضن في الحاضنة ويتم تشخيص الفطريات بعدها. تفيد هذه الطريقة في عزل فطريات التربة ومنها الفطر رايزوكتونيا سولاني *Rhizoctonia solani*

3- العزل باستعمال ثمار الخيار

وهي طريقة خاصة تستخدم للكشف عن الفطر *Bythium* والفطر *Phytophthora* وتتم بعمل ثقوب بواسطة ثاقب فلين في ثمار الخيار ثم توضع فيها كمية من التربة وتسد بنفس النسيج الذي رفع منها ثم توضع في الحاضنة وبعد 3-5 أيام ترفع القطع من التربة ويلاحظ ما موجود عليها من نمو على شكل عفن ابيض حول الثقب الحاوي على التربة ثم يعزل على الوسط ألزرعي PDA ويحضن في الحاضنة ويتم تشخيص الفطريات بعدها.

4- العزل باستعمال بذور النباتات كمصائد حية

إن هذه الطريقة تستخدم للكشف فقط عن الفطريات أو الكائنات الحية الممرضة للنبات ، وتتم بأخذ عينة عشوائية من تربة الحقل ثم تقسم العينة الى قسمين إحداهما يعقم بجهاز التعقيم البخاري Autoclave ليكون مقارنة والآخر غير معقم يوضع في حوض بلاستيكي ويزرع فيه نباتات حساسة كالرشاد-السبانخ-اللهانة -السلق-الطماطة-البنجر ،تسقى بكمية معتدلة من الماء ثم تغلف بالنايلون المثقب ثم توضع تحت درجة حرارة25 م أو في جو المختبر وبعد 7-10 أيام يلاحظ موت البادرات فتعزل من هذه البادرات إما على أوساط زرعية أو بطريقة المزرعة المائية ثم توضع في الحاضنة وبعد 24 ساعة تفحص تحت المجهر.

طرق تنقية المسبب المرضي (الحصول على عزلة نقية) :-

1- طريقة السبور الواحد Single Spore Isolation

عندما يراد عزل جرثومة واحدة وبصورة نقية من مسبب مرضي ، يزرع الجزء المصاب من النبات في وسط زرعي وبعد 3-5 أيام ينمو المسبب المرض فيؤخذ جزء منه ويوضع في أنبوبة اختبار تحتوي على ماء معقم وترج الأنبوبة جيدا بحيث تنتشر الجراثيم من الجزء المصاب إلى الماء ثم تؤخذ قطرة من الماء وتزرع في وسط غذائي بحيث تفرش على الوسط الغذائي ثم

يوضع الطبق في الحاضنة لمدة 24 ساعة بعدها يفحص تحت المجهر مباشرة ، فيلاحظ نمو الجراثيم على الوسط الغذائي ، يتم قطع احد الجراثيم بواسطة سكين أو نيدل معقم ثم ينقل إلى وسط غذائي آخر ويوضع في الحاضنة فنلاحظ تكون نموا فطريا عليه. تستعمل هذه الطريقة للحصول على عزل نقي للسبورات.

2- طريقة العزل من طرف هايفة Hyphal Tipe Isolation

وتشترك هذه الطريقة مع الطريقة السابقة بنفس الخطوات غير انه عند الوصول الى مرحلة قطع الجرثومة يتم هنا قطع ما قبل نهاية الهايفة hypha المفردة ،وتستعمل هذه الطريقة في حالة عدم وجود سبورات.

طرق عزل وتشخيص البكتيريا:

وتتم كما يأتي:

1. **العزل من الأجزاء النباتية :**

أ- **العزل غير المباشـر:** يتم عزل البكتيريا بطريقة العزل غيرا لمباشـر من الأجزاء النباتية بإتباع نفس الخطوات الســابقة في عزل الفطريات ،ولكن باســتخدام الوســط الزرعي الأكار المغذي Nutrient Agar،ويتم وضــع الأطباق في الحاضــنة بصــورة مقلوبة لكي لا تسـقط قطرات البخار المتكاثفة على غطاء الطبق على الوسط الزرعي وبالتالي انتشـار وتخفيف المستعمرات البكتيرية) .

- توضع الأطباق في الحاضنة على درجة 30-35 درجة مئوية لمدة 1-3 ايام .
- بعدها تفحص النموات البكتيرية (الإفرازات البكتيرية Ooze) بأخذ مسحة منها بواسطة Loop ونشرها على مساحة 1.5 سم تقريبا على شريحة زجاجية نظيفة
- يتم تجفيف الشريحة بالهواء وتثبيتها بالحرارة وذلك بتمريرها مرتين او ثلاثة على لهب المصباح ثم تصبيغها بصبغات معينة حسب نوع البكتيريا المراد تشخيصها
- توضع قطرة من زيت السيدر Cedar Oil على الشريحة لإعطاء صورة واضحة للبكتيريا عند الفحص تحت المجهر باستخدام العدسة الزيتية Oil Immersion

ب- العزل بطريقة التخافيف

ويعني بها عزل البكتيريا من الأجزاء النباتية المصابة بطريقة التخافيف:

- حيث تؤخذ أجزاء صغيرة من نباتات مصابة ، وتعقم سطحيا بواسطة القاصر (الكلوراكس10%) لمدة 1-2 دقيقة ثم تغسل بماء مقطر معقم

- توضـــع الأجزاء أعلاه في انبوبة اختبار تحتوي على 10 مليلتر من الماء المقطر المعقم وتترك لمدة كافية من اجل خروج البكتيريا الى الماء
- يؤخذ 1 مليلتر من المحلول البكتيري بواسـطة ماصـة معقمة ليضـاف على 9 مليلتر من الماء المقطر والمعقم في انبوبـة اختبـار ليصـــبح التخفيف 10/1 ، وتتكرر هذه العمليـة لغرض تحضير عدة تراكيز من المحلول البكتيري المخفف .
- تصـــب هذه التراكيز في أطباق بتري حاوية على الوســـط الزرعي الأكار المغذي Nutrient Agar وتوضع في الحاضنة بصورة مقلوبة على درجة 30–35 درجة مئوية لمدة 1–3ايام .
- بعد نمو المسـتعمرات البكتيرية في الاطباق يتم فحصـها وتشـخيصـها مجهريا بإتباع الخطوات أعلاه .

2. العزل من التربة :

العزل المباشـر: وهي نفس طريقة عزل الفطريات من التربة التي سـبق شـرحها حيث تؤخذ كمية صـغيرة من التربة الزراعية من حقل ،عشـوائيا ، بواسـطة مشـرط لتوزع على عدد من الاطباق الحاوية على الوســط الزرعي الأكار المغذي NA ثم توضـــع الاطباق في الحاضـنة على درجة حرارة 30–35 درجة مئوية لمدة 1–3 أيام ، ثم تفحص تحت المجهر بعد بإتباع الخطوات أعلاه ذلك لغرض تشخيص أنواع البكتيريا النامية.

2. **العزل من الهواء:** تتبع نفس طريقة عزل الفطريات من الهواء التي سبق شرحها.

طرق حفظ العزلات Isolation save method

بعد عزل وتنقية المسببات المرضية يتم حفظها بطرق مختلفة من اجل تعريفها واستخدامها في الدراسات المختلفة. وتوجد عدة طرق للحفظ منها:

اولاً: طرق الحفظ لفترات قصيرة

1)- الحفظ باستخدام انابيب الاجار المائل Agar slant

هو عبارة عن انبوبة ذات غطاء تحتوي على بيئة اكار ووضعت على السطح المائل اثناء تبريدها ليتصلب الاكار بداخل الانبوبة مكونة سطحاً مائلاً مما يسهل تلقيحهُ بإبرة التلقيح المستقيمة او ذات العقدة (Loop) وتحفظ بعد تلقيحها عند 4 °م.

2)- الحفظ بالكلسيرول Glycerol

يجمع النمو البكتيري النقي بالإبرة المعقمة ثم يوضع في انبوبة محتوية على الكلسيرين.

ثانياً: طرق الحفظ لفترات طويلة: هناك العديد من الطرق منها

1)-الحفظ بأستخدام النتروجين السائل Liquid nitrogen

يحفظ الميكروب النقي في النتروجين السائل لمنع عملية التلوث ثم يحفظ ب Deep freeze -20 °م.

2)- الحفظ بالتربة المعقمة Sterilized soil

يمكن حفظ المسببات التي تنمو بالتربة باستخدام تربة معقمة وفي هذه الطريقة يؤخذ بواسطة ابرة معقمة النمو النقي ويوضع في انبوبة تحتوي التربة المعقمة وتخلط جيداً وتحفظ بدرجة حرارة المختبر.