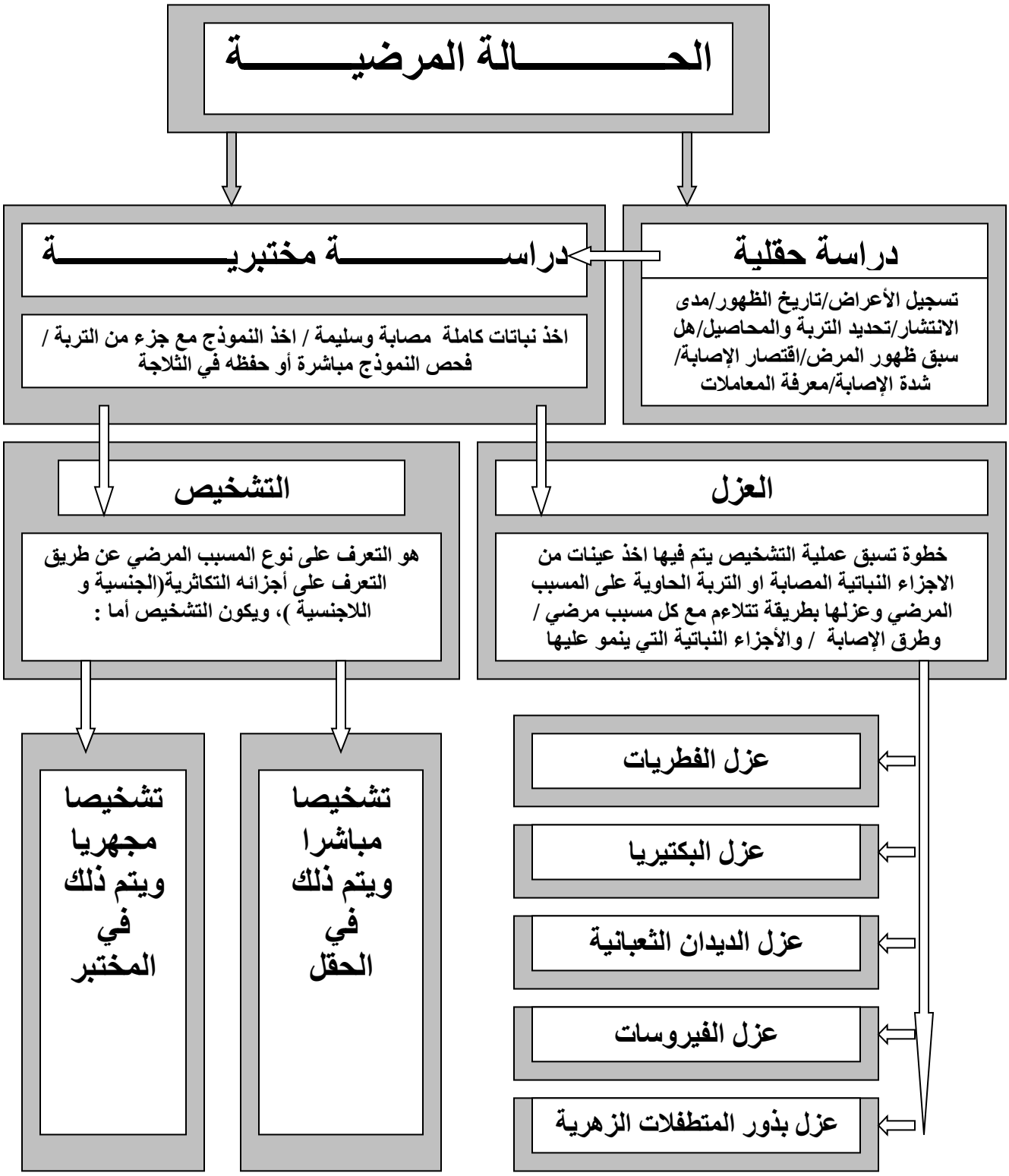

الحـــــــــالة المرضيـــــــة
دراســـــــــة مختبريـــــــــة
اخذ نباتات كاملة مصابة وسليمة / اخذ النموذج مع جزء من التربة / فحص النموذج مباشرة أو حفظه في الثلاجة
دراسة حقلية
تسجيل الأعراض/تاريخ الظهور/مدى الانتشار/تحديد التربة والمحاصيل/هل سبق ظهور المرض/اقتصار الإصابة/ شدة الإصابة/معرفة المعاملات
التشخيص
هو التعرف على نوع المسبب المرضي عن طريق التعرف على أجزائه التكاثرية(الجنسية و اللاجنسية)، ويكون التشخيص أما :
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
تشخيصا مجهريا ويتم ذلك في المختبر
تشخيصا مباشرا ويتم ذلك في الحقل
عزل الفطريات
عزل البكتيريا
عزل الديدان الثعبانية
عزل الفيروسات
عزل بذور المتطفلات الزهرية

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 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.

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 لـه 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

2- 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^O 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 .

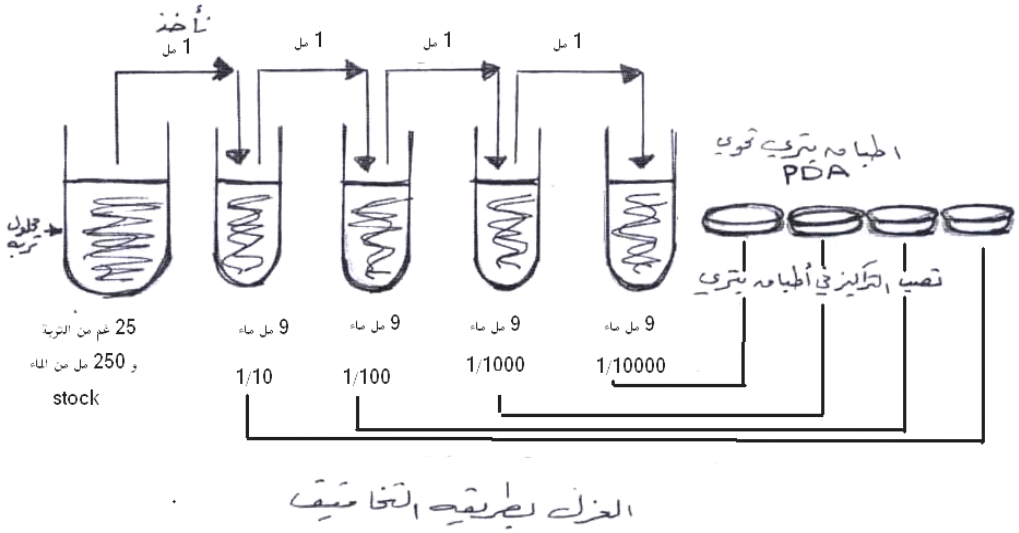
ب- العزل بطريقة التخافيف (الأطباق المصبوبة) ويتم كالآتي:

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.
- ملاحظة: تضاف مادة الروزبنكال Rose Bengal أو حامض اللاكتيك Lactic acid الى الوسط ألزرعي بعد تعقيمه لان هذه المواد تقلل نمو الفطريات وتمنع نمو البكتيريا
- 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



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.