أولاً ـ إعداد مختبر أمراض النبات وتجهيزاته:

لابد من توفر **مواصفات هندسية** عند تأسيس المختبر **تهدف** إلى إبقائه خالياً قدر الإمكان من الكائنات الملوثة وسهولة العمل به:

1- الموقع: يفضل أن يكون ضمن الأبنية، حيث تقل التيارات الهوائية والأتربة.

2- البناء: يجب أن تكون جدرانه سميكة عازلة، جيد الإنارة والتهوية، مع عدم وجود تشققات في الجدران والأرض، وتوزع ملائم لمنابع الغاز ومآخذ الكهرباء وصنابير الماء.

تجهيزات مختبر أمراض النبات:

1- جهاز العزل الميكروبي: يؤمن جواً معقماً، يتم فيه التعامل مع الكائنات الحية الدقيقة في كل ما يتعلق بعمليات العزل والتنقية والعدوى قرب اللهب، يتم التعقيم فيه بواسطة الأشعة فوق البنفسجية (UV)، كما يحتوي على مضخات سحب الهواء المزودة بمصافي لا تسمح بمرور أجسام أكبر من 0.3 ميكرون.

2- الأفران: تستخدم للتعقيم بالهواء الساخن الجاف على درجة حرارة 160- 180°م لمدة 2 ـ 3 ساعات، تغلّف الزجاجيات والمواد المراد تعقيمها بورق الألمنيوم للحفاظ عليها معقمة بعد إخراجها من الفرن، يحسب زمن التعقيم من اللحظة التي تصل فيها درجة الحرارة إلى الدرجة المطلوبة للتعقيم.

3- الأوتوكلاف: يستخدم للتعقيم بالحرارة الرطبة على درجة حرارة 120°م لمدة 20 ـ 30 دقيقة وضغط 1.1 ضغط جوي، يتم فيه قتل المزارع الفطرية القديمة، وتعقيم المستنبتات الغذائية وأدوات العمل المخبرية.

4- الحاضنات: تؤمن درجة الحرارة ونسبة الرطوبة المناسبتين لنمو الكائنات الحية الدقيقة، كما تزود بعضها بالإضاءة.

5- جهاز قياس درجة الحموضة (PH): يستخدم لضبط درجة حموضة المستنبتات الغذائية والمحاليل المستخدمة في دراسة الكائنات الحية الدقيقة، ويمكن استخدام الأوراق الكاشفة.

6- جهاز تقطير الماء: تأمين الماء المقطر الذي لا يستغنى عنه في الأعمال المخبرية.

7- الحمامات المائية: تأمين درجة حرارة معينة للماء لإبقاء المستنبتات الغذائية المقساة بالآغارسائلة لحين صبها في الأطباق البتري أو أنابيب الاختبار.

8- المجاهر: من أهم تجهيزات المختبر، تستخدم لدراسة المقاطع والمحضرات التي تساعد في التعرف على التغييرات التي تحصل على النبات، كما تستخدم في عملية القياس المجهري.

9- جهاز عمل المقاطع الرقيقة (الميكروتوم): يستخدم لعمل مقاطع غاية في الرقة تتراوح سماكتها بين 0.5 ـ 60 ميكرون، تؤمن رؤية أجزاء الخلية النباتية بالكامل والتعرف على كيفية تغلغل الفطر داخل النسيج النباتي.

10- الموازين الحساسة والعادية: قياس الأوزان الصغيرة جداً (أجزاء من عشرة آلاف جزء من الغرام) إلى الأوزان الكبيرة.

11- البراد: حفظ العينات النباتية المريضة لفترة محدودة، وحفظ المستنبتات الغذائية والمزارع المختلفة.

12- المواد الكيميائية: هي المواد اللازمة لتحضير المستنبتات الغذائية، الأصبغة، مواد التعقيم وغيرها.

13- الزجاجيات: أنابيب اختبار، أطباق بتري، ماصات، شرائح وساترات، كؤوس، أقماع، دوارق مخروطية وغيرها.

14- أدوات أخرى: المكبرات، موازين الحرارة والضغط والرطوبة، أجهزة التصوير، ورق الترشيح والألمنيوم، ورق عباد الشمس، حوامل أنابيب الاختبار، مصباح لهب، أدوات التشريح، قطن وغيرها.

ثانياً ـ جمع العينات النباتية في الحقل وطرائق حفظها:

ـ يفضل جمع العينات من قبل مختصين في أمراض النبات بعد تجوالهم في الحقل، والتعرف على المرض وتوزّعه.

ـ يجب اصطحاب بعض الأدوات التي تساعد في عملية جمع العينات مثل: مكبرة، سكين حادة لعمل مقاطع في النبات المصاب، منشار أو مقص تقليم للأجزاء النباتية الكبيرة، فأس ورفش صغيران لفحص الجذور، أكياس نايلون مثقبة لحفظ العينات، أوراق خاصة لتدوين المعلومات، حقيبة حافظة للعينات، آلة تصوير حديثة لتوثيق الإصابة في الحقل وعلى النبات المصاب.

ـ يتم الكشف الحقلي قبل عملية جمع العينات للتعرف على كيفية توزّع المرض وانتشاره في الحقل المصاب وعلى النباتات المصابة.

يراعى عند جمع العينات النقاط التالية:

ـ جمع عينات نباتية في مراحل مختلفة من الإصابة (خفيفة، متوسطة، متقدّمة).

ـ عند توضع الإصابة على المجموع الجذري: يقلع النبات المصاب بالكامل إذا كان حولياً، أما في حال الأشجار تفحص أجزاء من الجذر على أعماق مختلفة.

- حفظ العينات في أكياس نايلون مثقبة لمنع تعفنها، مع وضع قصاصة من الورق المقوى يكتب عليها المعلومات المتعلقة بالعينة.
- أخذ نباتات سليمة لاستعمالها كشاهد في المختبر.
- فحص العينات في المختبر مباشرةً، وفي حال التعذر توضع في البراد لفترة قصيرة.
- تحضّن العينات التي لم يتكشّف فيها المرض بشكلٍ جيد في أطباق بتري تحتوي ورق ترشيح مبلل بالماء على درجة حرارة 20 - 22°م في الحاضنة لمدة 2 - 3 أيام.

- البيانات الواجب تسجيلها عن الأمراض النباتية أثناء الجولة الحقلية:

تساعد البيانات المسجّلة على تشخيص المرض بشكل صحيح وتدوّن ضمن استمارة خاصة تشمل: معلومات عن اسم المزارع والمنطقة، معلومات عن المحصول المصاب (الصنف، المساحة، عمق الزراعة، موعد الزراعة)، الأجزاء النباتية المصابة، الأعراض الظاهرية، تاريخ بدء الإصابة والظروف البيئية المرافقة، عمليات الخدمة الزراعية المقدّمة مثل: الريّ، التسميد، المكافحة وغيرها.

- طرائق حفظ العينات النباتية المصابة:

تحفظ العينات النباتية المصابة لاستخدامها كوسائل إيضاح للأعراض الظاهرية التي يبديها المسبب المرضي على النباتات المصابة، **ومن الطرائق المستخدمة:**

1- **طريقة حفظ العينات بالتجفيف:** توضع الأوراق النباتية المصابة بشكل مستو بين أوراق الجرائد أو الترشيح، مع الضغط الخفيف عليها بواسطة كتاب مثلاً، مع تبديل الأوراق كلّ يومين على الأقل حتى لا تتعفن العينات. عند تمام جفاف العينات تثبّت على ورق مقوى ويكتب اسم المرض واسم العامل الممرض وتصنيفه واسم جامع العينة ومكان الجمع وتاريخه، ثم تغلّف بالنايلون.
2- **طريقة حفظ العينات بالمحاليل:** تستخدم لحفظ الثمار المتعفنة والدرنات، وتحفظ في محاليل خاصة ضمن أوعية زجاجية محكمة الإغلاق، يكتب عليها المعلومات الخاصة بالعينة والمسبب المرضي، **ومن المحاليل المستخدمة:**
   - محلول يتكوّن من حمض الخل 2.5 مل + فورم ألدهيد 6.5 مل + 100 مل ماء مقطر.
   - الكحول الإيتيلي تركيز 70 %.
   - الفورمالين تركيز 5 %.
   - الفورم ألدهيد 25 مل + كحول إيتيلي 150 مل + 1000 مل ماء مقطر.
- يجب تبديل سائل حفظ العينات عند تعكّره.
- عندما نريد فحص جزء نباتي مجفف مجهرياً، يفضل نقعه في محلول ماءات البوتاسيوم تركيز 1 % الذي يعمل على إعادة انتباج الخلايا مرة ثانية، ويجب الحذر من ملامسة هذا المحلول لعدسات المجهر لفعله المخرّش.

المستنبتات الغذائية:

المستنبت الغذائي: هو الوسط الذي تنمو عليه أو ضمنه الكائنات الحية الدقيقة (فطور- بكتيريا) وتحصل منه على احتياجاتها. يشترط عند تحضير المستنبتات الغذائية تزويدها بمصدر للطاقة (السكريات) والكربون والآزوت والأملاح المعدنية والماء، في درجة حموضة PH مناسبة.

تفضل **الفطور** الأوساط المائلة إلى الحموضة (تتراوح قيمة PH بين 6 - 6.5)، أما **البكتيريا** فتفضل الأوساط المائلة إلى القلوية (تتراوح قيمة PH بين 7 - 7.4).

أولاً - أنواع المستنبتات الغذائية:

يمكن تقسيم المستنبتات الغذائية تبعاً لعدة اعتبارات منها:

- **منشأها**: طبيعية، اصطناعية.
- **استعمالاتها**: **عامة:** تنمى عليها كثير من الكائنات الدقيقة، **خاصة:** تنمى عليها أنواع محدّدة من الكائنات.
- **عملها**: **اختيارية:** يمكن التحكم بأحد مكوناتها، **لا اختيارية:** لا يمكن التحكم بأحد مكوناتها.
- **الطبيعة الكيميائية لمكوناتها**: **عضوية:** تركيبها مواد عضوية، **معدنية:** تخلو من المواد العضوية.
- **تركيبها**: **محدّدة:** تعرف كمية ونسبة كل مكوناتها، **غير محدّدة:** لا يعرف كمية أو نسبة مكوناتها.
- **قوامها**: **صلبة:** يضاف لها مواد مصلّبة كالآغار أو الجيلاتين، **نصف صلبة:** يضاف لها كمية قليلة من المادة المصلّبة، **سائلة:** لا يضاف لها مادة مصلّبة.

ثانياً ـ أشكال المستنبتات الغذائية:

ـ **مستنبتات سائلة:** لا تحتوي على مادة مصلّبة، تستخدم في دراسة زيادة أو نقص أحد العناصر في نمو الكائن الدقيق، وفي إنتاج الأنزيمات والتوكسينات.

ـ **مستنبتات صلبة:** تحتوي على مادة مصلّبة كالآغار، تستخدم في الدراسات المورفولوجية للمستعمرات المكوّنة من قبل الكائنات الدقيقة، وفي حفظ المستعمرات والمزارع في المختبر.

ـ **أجزاء نباتية:** مثل قطع البطاطا أو الجزر وأغصان التفاح ... إلخ.

ثالثاً ـ تحضير المستنبتات الغذائية:

يُراعى عند تحضير المستنبتات الغذائية (بعد إضافة مكونات المستنبت إلى الماء المقطر وتسخينها) **النقاط التالية:**

ـ قياس درجة حموضة المستنبت بواسطة جهاز قياس درجة الحموضة، أو ورق عباد الشمس، وضبطها بما يتناسب مع الكائنات الدقيقة المدروسة، بإضافة مادة حامضية كحمض كلور الماء 0.1 نظامي، أو مادة قلوية مثل ماءات الصوديوم 0.1 نظامي.

ـ صبّ المستنبت في أطباق بتري بمعدل 10 ـ 15 مل، وتحريكه حركة رحوية لتوزيعه بشكل متجانس (أو في أنابيب اختبار مغلقة بسدادة قطنية بمعدل 5 مل وبعد التعقيم وضعها بشل مائل لزيادة السطح المستفاد منه من قبل الكائنات الدقيقة، أو في دوارق زجاجية خاصة مغلقة). ثم التعقيم في الأوتوكلاف عند درجة حرارة 120˚م لمدة 20 دقيقة.

ومن بعض الأمثلة عن طرائق تحضير المستنبتات الغذائية:

ـ مستنبت البطاطا ديكستروز آغار PDA الأكثر استخداماً في تنمية الفطور:

يسلق 250 غ بطاطا مقشورة ومقطّعة على نار هادئة لمدة 20 دقيقة في 400 مل ماء مقطر، تؤخذ الرشاحة وتكمّل إلى 1 لتر، ثم يضاف 20 غ ديكستروز، و20 غ آغار على التسلسل، ومن ثم تتبع نفس خطوات تحضير المستنبت المذكورة سابقاً.

ـ مستنبت الآغار المغذي والمرق الأكثر استخداماً في تنمية البكتيريا:

يذاب 20 غ من الآغار في 500 مل ماء مقطر، ويذاب 3 غ مستخلص لحم + 10 غ ببتون في 500 مل ماء مقطر، تسخن حتى تمام الذوبان، ثم يخلط المزيجان ويكمّل الحجم إلى 1 لتر، ومن ثم تتبع نفس خطوات تحضير المستنبت المذكورة سابقاً.

طرائق عزل الكائنات الحيّة الدقيقة والحصول على مزارع نقيّة:

تستعمل هذه الطرائق في عزل المسبب المرضي **إجباري الترمم، أو اختياري التطفل والترمم،** والتأكد أنه المسبب الفعلي للمرض النباتي. **من أهم طرائق العزل:**

أولاً ـ عزل الكائنات الحيّة الدقيقة من التربة:

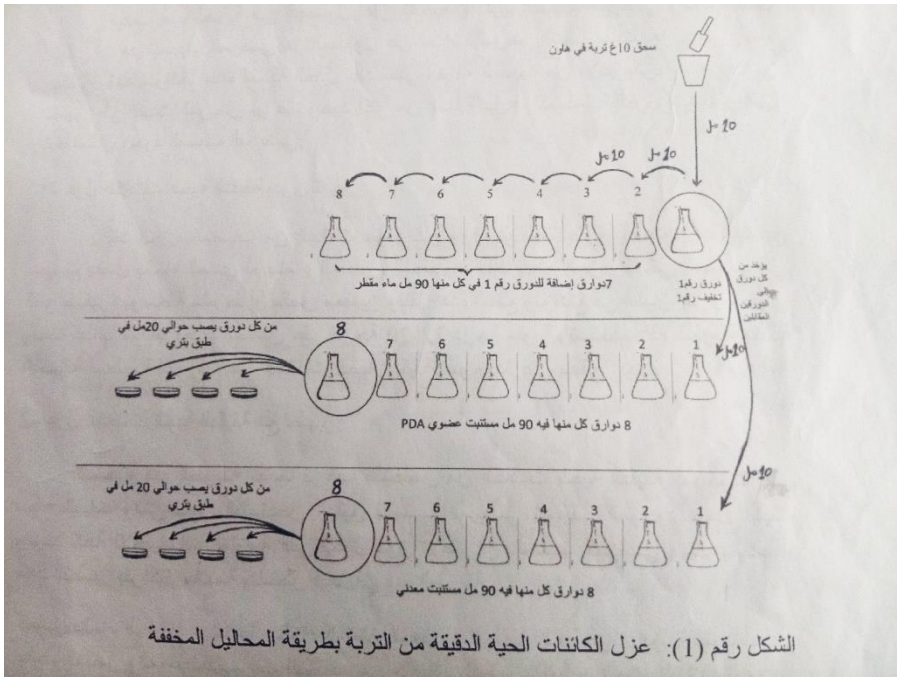
تؤخذ العينات من الطبقة السطحية للتربة على عمق 10 ـ 15 سم، لغناها بالحمولة الميكروبية التي من الضروري التعرف عليها قبل القيام بالزراعة، أو أثناء نمو النبات في حال ظهور أعراض مرضية على النباتات المزروعة. ويفيد ذلك في انتقاء محاصيل مقاومة أو متحمّلة لبعض المسببات المرضية الموجودة في التربة.

يتم عمل مقاطع في التربة على العمق المراد أخذ العينة منه، يوضع أنبوب الاختبار على المقطع في العمق المطلوب، ويضغط على التراب، فيدخل جزء منه إلى الأنبوب، يغلق الأنبوب بعد تعقيم فوهته، وتسجّل عليه البيانات، ثم ينقل إلى المختبر، تجري عملية العزل بطرائق مختلفة:

1 ـ طريقة المحاليل المخففة: تعتمد مبدأ التخفيف عدة مرات لتأمين العزل الجيد للكائنات الدقيقة في التربة وتقديرها كمياً.

يؤخذ 10 غ تربة في هاون معقم وتسحق العينة بلطف حتى لا تتخرب بنى الفطر، يضاف 10 مل ماء مقطر من الدورق المخروطي رقم (1) الحاوي على 90 مل **ماء مقطر**، يتكوّن معلق نحركه ونعيده إلى الدورق رقم (1) فنحصل على **التخفيف رقم (1)**، الذي يؤخذ منه 10 مل إلى كل من الدورق المخروطي رقم (1) الحاوي على 90 مل **مستنبت معدني**، وإلى الدورق المخروطي رقم (1) الحاوي على 90 مل **مستنبت عضوي**، يرج المحلول لمدة 30 دقيقة لفصل الكائنات الدقيقة عن التربة وجعلها في المعلق، من ثم يؤخذ 10 مل من **التخفيف رقم (1)** ويضاف إلى الدورق رقم (2) الحاوي على 90 مل **ماء مقطر** فنحصل على **التخفيف رقم (2)**، تكرر عملية الرّج والنقل السابقة (إلى الدوارق المخروطية رقم 2 و 3 ... 8 الحاوية على **مستنبتات معدنية وعضوية**) وفق الشكل رقم (1)، حتى نحصل على التخفيفات المطلوبة.

بعدها يتم صبّ هذه المستنبتات الغذائية في أطباق بتري معقمة بمعدل 20 مل، تحضّن على درجة حرارة 20 ـ 22˚م، وبعد 4 ـ 5 أيام تفحص المستعمرات النامية، يتم العزل من طرف المستعمرة بواسطة إبرة تلقيح وتوضع في أنبوب اختبار يحوي مستنبت غذائي وتكتب عليه كافة البيانات.



الشكل رقم (1): عزل الكائنات الحية الدقيقة من التربة بطريقة المحاليل المخففة

2- طريقة Johnson: يتم وضع وزن معلوم من التربة على منخل معدني ويغسل 40 مرة متتالية بكمية معلومة من الماء المقطر، يمثّل كلّ غسيل للتربة تركيزاً جديداً، يستخدم جزء منه في الزراعة على وسط مغذي، أما الأجزاء المتبقية من التربة فتوزّع على أطباق بتري معقمة، ويصب عليها مستنبت غذائي مناسب.

3- طريقة النباتات الصائدة: تستخدم لعزل الكائنات المجبرة على التطفل والكائنات ضيقة التطفل، بزراعة نباتات حساسة في التربة المراد دراستها، وعند إصابة هذه النباتات يعزل المسبب المرضي.

ثانياً ـ عزل الكائنات الحيّة الدقيقة من الأجزاء الخضرية:

يلجأ لعملية العزل عند تعذّر معرفة المسبب المرضي من الأعراض الظاهرية التي تظهر على النبات المصاب، أو عند وجود أكثر من إصابة عليه. تتم عملية العزل تبعاً **لمكان وجود المسبب المرضي**:

1- عزل الكائنات الحية الدقيقة دون تطهير:

تستخدم في **عزل** الكائنات الدقيقة الموجودة على سطح النبات، حيث يغسل الجزء المصاب من النبات بالماء العادي، ثم بالماء المقطر المعقم، بعد ذلك يقطّع إلى قطع صغيرة بواسطة مشرط أو مقص معقمين، توضع هذه القطع في أطباق بتري تحوي مستنبتاً غذائياً، ثم تحضّن على درجة حرارة 20 - 22ْم.

2- عزل الكائنات الحية الدقيقة مع التطهير:

تستخدم **للتخلص** من الكائنات الدقيقة الموجودة على سطح النبات، يغسل الجزء المصاب من النبات بالماء العادي، ثم بالماء المقطر المعقم، ويتم التطهير السطحي (من أهم المحاليل المستخدمة في التطهير: الكحول الإيتيلي تركيز 70 - 80 %، تمسح سطوح الأجزاء النباتية المصابة بواسطة قطع قطنية مبللة بالكحول)، ثم الغسيل عدة مرات بالماء المقطر المعقم، بعد ذلك يقطّع إلى قطع صغيرة بواسطة مشرط أو مقص معقمين، توضع هذه القطع في أطباق بتري تحوي مستنبتاً غذائياً، ثم تحضّن على درجة حرارة 20 - 22ْم.

ثالثاً ـ عزل الكائنات الحيّة الدقيقة من الجذور:

تغسل الجذور المراد فحصها بالماء العادي، ثم بالماء المقطر المعقم، بعد ذلك تطهّر الجذور سطحياً بنقعها في محلول هيبوكلوريد الصوديوم، ثم غسلها بالماء المقطر المعقم عدة مرات، وتجفف على ورق ترشيح. تقطّع إلى قطع صغيرة بواسطة مشرط أو مقص معقمين، توضع هذه القطع في أطباق بتري تحوي مستنبتاً غذائياً، وتحضّن على درجة حرارة 20 - 22ْم. تظهر نموات بعض الفطور مثل: Fusarium, Rhizoctonia, Alternaria.

رابعاً ـ عزل الكائنات الحيّة الدقيقة من الثمار المتعفنة:

توضع قطع صغيرة من الجزر أو البطاطا بعد تعقيمها في الأوتوكلاف في أطباق بتري، ينقل إليها جزء من النسيج الثمري المتعفن بواسطة حربة أو إبرة تلقيح معقمتين، ثم التحضين في درجة حرارة مناسبة. في حال الرغبة في الحصول فقط على الفطور تعامل هذه القطع النباتية بالمضادات الحيوية، أو بإضافة قطرات من حمض اللبن.

خامساً ـ عزل الكائنات الحيّة الدقيقة من البذور:

1ـ عزل الكائنات الحية الدقيقة دون تطهير:
تستخدم في **عزل** الكائنات الدقيقة الموجودة على سطح البذور، يتم وضع وزن معلوم من البذور في حوجلة فيها ماء مقطر معقم، تزّج للحصول على **معلق**، يزرع هذا المعلق على مستنبت غذائي مناسب، ثم يحضّن على درجة حرارة 20 - 22 ْم.
تفحص مجهرياً الإصابات بأمراض التفحم مباشرة من **المعلق** لأنها إجبارية التطفل (لا تنمو على مستنبت غذائي).

2ـ عزل الكائنات الحية الدقيقة مع التطهير:
تستخدم **للتخلص** من الكائنات الدقيقة الموجودة على سطح البذور، تغسل البذور بالماء العادي، ثم بالماء المقطر المعقم، يتم التطهير السطحي، ثم الغسيل عدة مرات بالماء المقطر المعقم، بعد ذلك تزرع البذور مباشرةً في طبق بتري. لتسهيل خروج الفطر يتم فتح البذور ذوات الفلقتين، أما البذور أحادية الفلقة يكون الشق الطولي للحبة ملامساً لسطح المستنبت الغذائي.

سادساً ـ عزل البكتيريا من الأجزاء النباتية:
تتميز البكتيريا بالتطفل **الداخلي**، تهرس أو تطحن العينات النباتية المصابة بعد غسلها بالماء المقطر المعقم، يؤخذ جزء من العصارة النباتية بواسطة إبرة تلقيح معقمة وتزرع على سطح مستنبت غذائي في طبق بتري معقم بطريقة التخطيط أو التشطيب.

سابعاً ـ عزل الفطور من الأجسام الحجرية:
يعزل الفطر من الجسم الحجري عن طريق شقّ الجسم الحجري بعد تطهيره، يؤخذ جزء من الميسليوم الداخلي بواسطة إبرة تلقيح معقمة، ويزرع على مستنبت غذائي في طبق بتري معقم، ثم يحضّن على درجة حرارة 20 - 22 ْم.

ـ طرائق عزل الكائنات الحيّة الدقيقة إجبارية التطفل:
1ـ **طريقة مورل (زراعة الأنسجة):** تعتمد مبدأ الحصول على نبات كامل انطلاقاً من خلية نباتية واحدة أو بزراعة القمة النامية للنبات (الميرستيم)، تستخدم في إنتاج نباتات خالية من الفيروسات.
2ـ **طريقة إجراء العدوى الاصطناعية على النباتات الحساسة:** تستخدم هذه الطريقة بشكل واسع في دراسة الأمراض الفيروسية، كما تستخدم لعزل الفطور إجبارية التطفل مثل فطر البياض الدقيقي.
3ـ **طريقة العزل على أوراق نباتية موضوعة ضمن أوساط معينة:** تتميز هذه الأوساط بتركيب يحتوي على بعض الهرمونات التي تساعد في إبقاء الأجزاء النباتية حيّة لفترة من الزمن تكفي لتنمية الكائنات الحيّة إجبارية التطفل.

ـ طرائق الحصول على مزارع نقية:
1ـ **طريقة التخفيف:** يتم تحضير معلّق من الأبواغ المراد عزلها بصورة نقيّة في ماء مقطر معقم، باستعمال ثلاثة أنابيب اختبار معقمة تحوي مستنبت غذائي رائق مرقّمة من 1 - 3، وثلاثة أطباق بتري معقمة فارغة مرقّمة من 1 - 3. تنقل نقطة من المعلق البوغي إلى الأنبوب الأول ويرّج جيداً، ثم تنقل نقطة منه إلى الأنبوب الثاني ويرّج جيداً، ثم تنقل نقطة من الأنبوب الثاني إلى الأنبوب الثالث ويرّج جيداً، بعدها تصب الأنابيب الثلاثة في الأطباق البتري الموافقة لها، بعد التحضين يمكن ملاحظة مستعمرات منفردة في الطبق الثاني أو الثالث، تفصل أوضح المستعمرات مع قطعة من الآغار التي تحملها وتنقل إلى أنبوب اختبار أو طبق بتري جديد يحوي مستنبت غذائي معقم، بعد التحضين يتم الحصول على مزرعة فطرية نقيّة.
2ـ **طريقة طرف الهيفا:** يتم تحديد طرف الهيفا الفطرية الأكثر حيوية ونمواً بواسطة العدسة الشيئية الصغرى للمجهر أو المكبرة، ثم يتم قطع طرف هيفا وحيد أو مجموعة صغيرة جداً من أطراف الهيفا بواسطة مشرط أو إبرة تلقيح معقمين، تزرع على مستنبت غذائي معقم، وبعد التحضين يتم الحصول على مزرعة فطرية نقيّة.