

إعداد وتجهيز مختبر أمراض النبات

أولاً- توجيهات عامة:

يجب توخي الدقة والحذر للوصول إلى النتائج المرغوبة و تفادي حدوث الأخطاء والأخطار الممكنة، ولتحقيق ذلك لابد من مراعاة الأمور التالية:

- 1- الالتزام بمواعيد الجلسات العملية.
- 2- ارتداء المعطف الأبيض قبل الدخول إلى المختبر.
- 3- إحضار الأدوات اللازمة للعمل.
- 4- الجلوس في الأماكن المحددة لكل طالب.
- 5- الانتباه التام واليقظة والهدوء والعمل بانتظام وعدم التزاحم و بخاصة قرب اللهب.
- 6- العودة إلى المشرف على الجلسة عند حدوث أي طارئ.
- 7- عدم وضع الأقلام و الأصابع في الفم، كما يمنع الأكل و التدخين في المختبر.
- 8- الانتباه التام للتوجيهات العملية و فهم كيفية القيام بالعمل المطلوب بدقة.
- 9- تنظيف المجهر ومكان العمل عند الانتهاء.
- 10- عدم لمس أو استخدام أي مادة أو أداة إلا بعد التعرف عليها و فهم كيفية عملها.
- 11- غسل اليدين بالماء و الصابون قبل الخروج من المختبر.
- 12- التأكد من إغلاق الغاز و صنابير الماء بعد الانتهاء من استعمالها.
- 13- عدم إخراج أي مادة من المختبر غير الأدوات الخاصة بالطالب.

ثانياً: الأدوات الواجب إحضارها إلى مختبر أمراض النبات:

- 1- معطف أبيض.
- 2- دفتر للكتابة ورسم العينات.
- 3- علبة لحفظ الشرائح.
- 4- علبة تشريح.
- 5- أقلام كتابة و رسم.
- 6- شرائح و ساترات.
- 7- علبة شفرات لعمل مقاطع في العينة.

8- قلم خاص للكتابة على الزجاج أو قطع ورقية لاصقة لتعريف المحضرات.

9- ورق سجائر لمسح عدسات المجهر و مناديل ورقية.

10- طلاء أظافر شفاف (للصق حواف الساترات على الشرائح).

ثالثاً: إعداد و تجهيز مختبر أمراض النبات:

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

(أ) الموقع: يفضل أن يتم إنشاء مختبر أمراض النبات ضمن الأبنية حيث تقل التيارات الهوائية و الأتربة.

(ب) البناء: يجب أن يتسم بالمواصفات التالية:

1- يجب أن تكون جدرانه سميكة لتحقيق العزل الكافي.

2- الإنارة الجيدة الموزعة بشكل كاف في المختبر.

3- التهوية الجيدة حيث يزود المختبر بنظام تهوية وتخلية مع تجنب التيارات الهوائية المباشرة.

4- النظافة التامة للجدران والأرض والحرص على عدم وجود تشققات في جدرانه حتى لا تكون مأوى للملوثات المختلفة.

5- توافر منابع غاز ومأخذ كهرباء وصنابير ماء وموزعة توزيعاً ملائماً للعمل.

رابعاً: تجهيزات مختبر أمراض النبات:

(1)- غرفة العزل: Isolation cabinet

تؤمن غرفة العزل جواً معقماً يمكن فيه التعامل مع الكائنات الحية الدقيقة في كل ما يتعلق بعمليات العزل و التنقية و العدوى و ذلك قرب اللهب، ويجب أن يكون ارتفاع طاولة غرفة العزل 85 سم بحيث يكون مناسباً للعمل وقوفاً و جلوساً و في كل الحالات يتم التعقيم ضمنها بواسطة مصابيح الأشعة فوق البنفسجية مع ضرورة الانتباه إلى خطر هذه الأشعة على صحة الإنسان و بالأخص على العيون، لذا يحظر العمل في غرفة العزل عند تشغيل هذه المصابيح.

- يجب أن تحتوي غرفة العزل على مصدر للغاز و الكهرباء و أن تكون مزودة بمصاف لتنتقية الهواء الداخل، وهذه المصافي مصنوعة من ألياف زجاجية لا تسمح بمرور أجسام أكبر من 0.3 ميكرون كالبكتريا و أبواغ الفطر و بنياته الأخرى.

يجري العمل في غرفة العزل وفق الخطوات التالية:

(أ) تضاء مصابيح الأشعة فوق البنفسجية قبل 24 ساعة من بدء العمل و تطفأ عند بدء العمل في غرفة العزل.

(ب) تشغل مضخات سحب الهواء إلى داخل غرفة العزل عبر المصافي.

(ت) تضاء مصابيح الإنارة.

(ث) تجري عمليات الصب و العزل و التنقية للكائنات الحية الدقيقة في غرفة العزل قرب اللهب.

(2) الأفران (Ovens):

تستخدم لتعقيم الزجاجيات المختلفة مثل أطباق بترى و أنابيب الاختبار و الدوارق و الماصات بالهواء الساخن الجاف على درجة 160-180 درجة مئوية لمدة 2-3 ساعة، وذلك بعد تنظيف هذه الزجاجيات من بقايا المواد و تغليفها بورق الألمنيوم أو الجرائد للحفاظ عليها معقمة و تفضل الأفران ذات المروحة الداخلية التي تحقق تجانساً لدرجة الحرارة في كافة أرجاء الفرن و تكون هذه الأفران مزودة بميزان حرارة و منظم لضبط الحرارة و التحكم بها. يحسب زمن التعقيم من اللحظة التي تصل فيها درجة الحرارة إلى درجة الحرارة المستخدمة في التعقيم.

(3) الصاد الموصل (Autoclave):

للتعقيم بالحرارة الرطبة تحت ضغط و تفريغ على درجة حرارة 120 درجة مئوية لمدة 20-30 دقيقة و ضغط 1.1 ضغط جوي.

1- يستخدم لتعقيم المستنبتات الغذائية المقساء بالأغار بالحرارة الرطبة.

2- قتل المزارع الفطرية القديمة.

3- تمبيع المستنبتات الغذائية المقساء بالأغار.

هناك عدة نماذج للمعقم منها الآلي الكهربائي ومنها اليدوي (طنجرة الضغط) وفي كافة الحالات يجب الحذر عند التعامل مع هذا الجهاز لعدم الوقوع في خطأ قد يؤدي إلى ضرر كبير للعامل والمواد المعقمة والجهاز نفسه علماً أن المعقم الآلي الكهربائي أكثر أماناً فهو مجهز بمؤقت ومقياس للضغط والحرارة وجهاز إنذار صوتي أما المعقم اليدوي فهو يعمل على الغاز ومجهز بمقياس ضغط وحرارة.

يحدد الزمن المطلوب للتعقيم من قبل القائم على العمل حيث يحسب زمن التعقيم من اللحظة التي تصل فيه درجة الحرارة إلى درجة حرارة التعقيم.

ويتم استخدام المعقم وفق الخطوات التالية :

1- يجب التأكد من وجود كمية كافية من الماء المقطر (لمنع التكلس وانسداد أنبوبة خروج البخار) في المعقم، ثم وضع المواد المراد تعقيمها داخله بعد إحكام إغلاق الأواني المحتوية على هذه المواد بسدادات قماشية قطنية خاصة.

2- إغلاق الغطاء الخاص به بإحكام.

3- فتح صمام البخار وإشعال الغاز أو وصل التيار الكهربائي.

4- ترك البخار يخرج لمدة خمس دقائق لطرد الهواء بالكامل.

5- إغلاق الصمام.

6- حساب الزمن من اللحظة التي تصل فيها درجة الحرارة إلى درجة حرارة التعقيم.

7- توقيف الجهاز عند انتهاء فترة التعقيم.

8- فتح صمام البخار ببطء حتى انخفاض الضغط إلى الضغط الجوي العادي.

9- الانتظار مدة خمس دقائق ثم فتح المعقم بحذر وإخراج المواد المعقمة.

4) الحاضنات (Incubators):

تستخدم الحاضنات لتوفير درجة الحرارة المناسبة لنمو الكائنات الحية الدقيقة (فطور، بكتيريا)، وتختلف درجة الحرارة المستخدمة للتحصين فهي تتراوح من 22-25 درجة مئوية للفطور، ومن 30-37 درجة مئوية للبكتيريا، وتتصف الحاضنات بإمكانية التحكم بدرجة الحرارة

وامتلاكها مروحة داخلية تضمن توزع الحرارة بشكل جيد في أرجاء الحاضنة كافة كما تزود بعض الحاضنات بالإضاءة.

(5) جهاز قياس الحموضة: PH Meter

يستخدم لضبط درجة حموضة المستنبتات الغذائية، والمحاليل المستخدمة في دراسة الكائنات الحية الدقيقة. ويمكن استخدام الأوراق الكاشفة في حال عدم توافر أجهزة متخصصة لقياس درجة الحموضة.

(6) الحمامات المائية :

تستخدم الحمامات المائية لأغراض عديدة في مختبر أمراض النبات وتكون مزودة بمنظم لتأمين درجة حرارة معينة للماء والمحافظة عليها. ومن بعض استخداماتها الإبقاء على المستنبتات الغذائية المقساء بالآغار سائلة لحين صبها في أطباق بتري أو أنابيب الاختبار.

(7) جهاز تقطير الماء :

تختلف أجهزة التقطير في طاقتها الإنتاجية فمنها كبير الحجم ذات الطاقة الكبيرة، ومنها الصغيرة التي تكفي لتأمين حاجة المختبر من الماء المقطر الذي لا يستغنى عنه في الأعمال المخبرية.

(8) المجاهر (Microscopes):

هي أهم تجهيزات مخبر أمراض النبات وتستخدم لدراسة المقاطع والمحضرات وللتعرف على التغييرات التي تحصل على النبات كما تستخدم في عملية القياس المجهرية.

المجهر الضوئي: 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 تكفي لرؤية التفاصيل 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 ومثبت على الجزء العلوي من الذراع أنبوبة يمكن تحريكها حركة رأسية بواسطة ضابطين :

أ - ضابط تقريبي

ب- ضابط دقيق

وتعتبر أنبوبة المجهر هي الجزء الرئيسي فيه ، حيث يثبت في طرفها العلوي العدسات العينية Ocular lens ذات قوة التكبير 10 مرات عادة (10 X) ، 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 (10 X)

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

الثالثة : تكبيرها 100 مرة (100 X) وتعرف بالعدسة الزيتية

تركب العدسات الشيئية على قرص يعرف 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 فيوجد على الجزء السفلي من الذراع ، 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 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

(9) المكبرة (Binocular) :

تستعمل لدراسة الأعراض الظاهرية للمرض حيث يمكن تكبير المادة النباتية المدروسة حتى مئة مرة.

(10) الموازين الحساسة والعادية :

تستخدم الأولى لتحضير الأوزان الصغيرة جداً حيث يمكن بوساطتها وزن أجزاء من عشرة آلاف جزء من الغرام وذلك عند تحضير الأوساط الغذائية والمحاليل المختلفة التي تستعمل في التجارب، أما الموازين العادية فتستخدم لتحضير وزنات كبيرة حسب الحاجة.

(11) جهاز عمل المقاطع الرقيقة (Microtome) :

منه اليدوي ومنه الآلي وهو يستخدم لعمل مقاطع غاية في الرقة تتراوح سماكتها بين 0.5 - 60 ميكرون. حيث تؤمن السماكات الرقيقة للمقاطع الرقيقة الناتجة عن الميكروتوم رؤية أجزاء الخلية النباتية بالكامل بما في ذلك الفيروس الموجود ضمنها حيث يتم الفحص بواسطة المجهر الإلكتروني. ومن فوائد هذه الطريقة أيضاً التعرف على كيفية تغلغل الفطر داخل النسيج النباتي وأي نسيج يصيبه وذلك عن طريق عمل مقاطع متتالية لمراحل الإصابة المختلفة. أما عمل المقاطع بواسطة الميكروتوم فهي طويلة ومعقدة لا مجال لذكرها كونها ذكرت في مقررات سابقة (النبات العام). ويلحق بالميكروتوم جهاز متمم يدعى حاضنات البارافين (جهاز صب الشمع) ويستخدم في تجهيز العينات قبل القيام بعمل المقاطع بواسطة الميكروتوم.

(12) البراد:

يمكن أن يكون بمقاسات مختلفة لحفظ العينات النباتية المريضة لفترة محدودة (أسبوع أو أكثر) لحين فحصها ولحفظ المستنبتات الغذائية والمزارع المختلفة.

(13) أدوات زجاجية مختلفة :

تشمل أنابيب اختبار - أطباق بتري - كؤوس وأقماع - دوارق مخروطية - حوكلات عيارية - ماصات - شرائح - ساترات وغيرها.

(14) مواد كيميائية :

تشمل مواداً لتحضير المستنبتات الغذائية وأخرى لتحضير الأصبغة ومواد التعقيم ومواد ذات استعمالات أخرى.

(15) أدوات أخرى:

مثل مقصات، مشارط، إبر تلقح، أدوات حادة مطوية، ورق ترشيح، قطن، ورق عباد الشمس، حاملات أنابيب اختبار، مصباح لهب.

(16) موازين حرارة وضغط ورطوبة.

(17) أجهزة لتصوير المحضرات المجهرية المدروسة.

جمع العينات في الحقل

لابد للعاملين في مجال الوقاية من جمع العينات النباتية بطريقة سليمة لاجتناب الخطأ الذي قد يتسبب في الحصول على معلومات خاطئة عن حالة الحقول والبساتين المدروسة. لذا يفضل أخذ العينات من قبل مختصين في أمراض النبات بعد تجوالهم في الحقل والتعرف على المرض وتوزعه، ويشترط أن يتم فحص العينات المجموعة عند العودة مباشرة إلى المختبر أو في أسرع وقت ممكن.

أولاً: المعدات والأدوات الواجب اصطحابها عند جمع العينات في الحقل:

- 1- عدسة يدوية مكبرة تساعد على التشخيص الأولي لتوضيح بعض الأعراض الظاهرية.
- 2- سكين حادة لقطع الأجزاء النباتية المصابة ولعمل مقاطع طولية أو عرضية في النبات المصاب.
- 3- منشار أو مقص تقليم لقطع الأجزاء النباتية الكبيرة.
- 4- فأس ورفش صغيران لإزالة التراب عند الحاجة لفحص الأجزاء النباتية الأرضية.
- 5- حقيبة حافظة للعينات تحتوي على ورق نشاف وجرائد لاستخدامها في حفظ العينات.
- 6- أكياس نايلون مثقبة لحفظ العينات مع حلقات مطاطية لربط الأكياس.
- 7- أوراق خاصة لكتابة المعلومات الواجب تدوينها عن المنطقة والظروف المناخية السائدة والنبات العائل وتاريخ الجمع واسم الجامع، جميعها توضع إلى جانب العينة في الكيس.
- 8- آلة تصوير حديثة تسمح بأخذ صور قريبة للأعراض المرضية على النبات المصاب وصور للحقل المصاب.

ثانياً: الفحص الميداني للحقل أو التشخيص الميداني للإصابة:

و هي عملية تسبق عملية جمع العينات و تشمل:

1- فحص المظهر العام للحقل أو النباتات المصابة إذ أن توزع المرض يفيدنا في تحديد أسباب المرض وهنا يلاحظ إن كان المرض موزعاً بصورة عشوائية في الحقل أو أنه يتوزع في الأطراف أو في مناطق منخفضة سيئة الصرف أو رملية.

2- الفحص الدقيق لبعض النباتات المريضة فإن كان النبات حولياً يقلع برفق دون المساس بالأجزاء المصابة ويفحص كل من المجموع الخضري والمجموع الجذري بدقة.

ثالثاً: كيفية جمع العينات:

يراعى عند جمع العينات النقاط التالية:

1- تجمع عينات نباتية لمراحل مختلفة من الإصابة، لهذا تؤخذ العينات في بداية الإصابة وأخرى في مرحلة متوسطة وأيضاً في مرحلة متقدمة.

2- أخذ الجزء النباتي المصاب فعلاً، مثلاً في حالة مرض الذبول يوجد الفطر المسبب في الأوعية الناقلة.

3- عند توضع الإصابة على المجموع الجذري يقلع النبات المصاب بالكامل إن كان حولياً ويغسل الجذر ويفحص في المختبر، أما في حالة الأشجار فتفحص أجزاء من الجذر تؤخذ من أعماق مختلفة.

4- حفظ العينات في أكياس نايلون مثقبة لمنع تعفنها وتجنب تعريضها للحرارة والجفاف.

5- وضع قصاصة من الورق المقوى مع العينة يكتب عليها جميع المعومات المتعلقة بالمكان والزمان والنبات المصاب وغيرها.

6- أخذ نباتات سليمة لاستعمالها كشاهد (Control) في المختبر.

7- تفحص العينات مباشرة عند وصولها إلى المختبر أو يعزل المسبب على مستنبتات غذائية خاصة و في حال تعذر ذلك لوجود أعداد كبيرة من العينات توضع في البراد فترة قصيرة لحين الدراسة.

8- تحضن العينات التي لم يكتشف فيها المرض بشكل جيد على درجة حرارة تتراوح من 20-22 درجة مئوية، حيث توضع في طبق بتري يحوي ورق نشاف (ترشيح) مبلل بالماء و توضع

في الحاضنة لمدة 2-3 يوم مما يدفع المسبب المرضي إلى التكشف على سطح لنبات و بالتالي يسهل تشخيصه.

رابعاً: المعلومات الحقلية الواجب تسجيلها عن الأمراض النباتية أثناء الجولة الحقلية:

تساعد البيانات المسجلة أثناء الجولة الحقلية على تشخيص المرض بشكل صحيح، ويمكن لهذا الغرض استخدام استمارة خاصة، فيما يلي نموذج عنها:

اسم المزارع: المزرعة أو القرية: المحافظة أو المنطقة:

اسم جامع العينة: تاريخ جمع العينة: المحصول المصاب:

الصنف: المساحة: الأجزاء النباتية المصابة:

الأعراض الظاهرية:

.....

توزع المرض في الحقل:

تاريخ بدء ظهور الأعراض في الحقل:

حالة الطقس خلال الأسبوع السابق للجولة: تاريخ اكتشاف الإصابة:

الدورة الزراعية:

المواد الكيميائية المستعملة و معدلاتها و مواعيد استخدامها:

الأسمدة:

مبيدات الأعشاب:

المبيدات الفطرية:

المبيدات الحشرية:

مواد أخرى:

معلومات إضافية:

تاريخ زراعة الحقل: العمر التقريبي و الحجم:

البستان: عمق الطبقة الزراعية:

الأعراض بالنسبة لمصدر الرياح و الشمس:

برنامج الري المعتمد:

حفظ العينات النباتية المصابة

تحفظ العينات النباتية المريضة في المختبر لاستخدامها كوسائل إيضاح للأعراض الظاهرية التي يبيدها المسبب المرضي على النباتات المصابة، وذلك بمقارنة العينات التي يتم جمعها من الحقول مع عينات مماثلة محفوظة في المختبر.

ويتوقف التشخيص الدقيق للعوامل الممرضة للنبات على أمرين أساسيين :

1- الدراسة المجهرية .

2- مقارنة الأعراض الظاهرية للمسبب المرضي مع عينات مريضة معروفة ومصنفة سابقاً.

ومن الطرائق المستخدمة في حفظ العينات :

1 – طريقة حفظ العينات بالتجفيف :

تتم هذه الطريقة بوضع الأوراق النباتية المصابة بشكل مستو بين أوراق الجرائد أو ورق الترشيح مع الضغط الخفيف عليها بواسطة كتاب مثلاً، ويشترط تبديل الأوراق كل يومين على الأقل حتى لا تتعفن العينات النباتية المراد حفظها، وتستمر هذه العملية حتى تمام جفاف الأوراق أو العينات النباتية.

بعد ذلك تثبت العينات النباتية على ورق مقوى وتغلف بالنايلون ويسبق ذلك كتابة اسم المرض واسم العامل الممرض وتصنيفه واسم الجامع ومكان الجمع وتاريخه.

2 – طريقة حفظ العينات بالمحاليل:

تستخدم هذه الطريقة لحفظ الثمار المتعفنة والدرنات حيث تحفظ هذه الأجزاء النباتية في محاليل خاصة ضمن أوعية زجاجية محكمة الإغلاق يكتب عليها المعلومات الخاصة بالعينة والمسبب المرضي.

ويستخدم في عملية الحفظ عادة المحاليل التالية:

1- محلول يتكون من حمض الخل 2.5 مل + فورم ألدهيد 6.5 مل + ماء مقطر 100 مل.

2- الكحول الإيثيلي تركيز 70 %.

3- الفورمالين تركيز 5 %.

4 - الفورم ألدهيد مع الكحول الإيثيلي : ويتكون من الفورم ألدهيد 25 مل + كحول إيثيلي 150 مل + ماء 1000 مل.

وتجدر الإشارة إلى أنه قد يتعكر سائل الحفظ للعينات لذا يعمل على تبديل السائل بأخر جديد كلما لوحظ ذلك للمحافظة على وضوح العينة بشكل جيد.

وبشكل عام عندما نريد فحص جزء نباتي مجفف مجهرياً يفضل نقعه في محلول ماءات البوتاسيوم تركيز 1% الذي يعمل على إعادة انتاج الخلايا مرة ثانية لأن عملية التجفيف للأجزاء النباتية تؤدي إلى تجدها وتشوه بنيات الفطر غالباً، وذلك بسبب فقدها لجزء كبير من الماء. وتجدر الإشارة إلى أنه عند استعمال محلول ماءات البوتاسيوم يجب الحذر من ملامسة هذا المحلول لعقدسات المجهر لفعله المخرش.