

Lab : 3

عزل المسببات المرضية Isolation of Pathogens

لغرض تشخيص المسببات المرضية والتأكد من العلاقة المرضية يجب عزل المسببات المرضية، وتختلف طرق عزل المسببات المرضية باختلاف هذه المسببات وطرق اصابتها والجزاء النباتية التي تنمو عليها ، وكما مبين ادناه :

عزل الفطريات Isolation of Fungi

1-العزل المباشر Direct Isolation

المواد :

1-ثمار مصابة بالفطريات

2-أدوات تحضير السلايد

3-أدوات تشريح

4-اطباق بتري تحتوي على الوسط الغذائي P.D.A

5-مايكروسكوب

6-بوراكس 10%

7-ماء معقم

العمل:

1-تحضير سلايد من الأجزاء المصابة ثم يشخص الفطر

2-يعقم السطح الخارجي للثمار المصابة

امراض نباتية عملي

م.م. رند سلوان

م.م. محمد سامي

3-تؤخذ أجزاء صغيرة من الثمار المصابة وتوضع لمدة 1-2دقيقة في المادة اليوراكس 10% ثم تغسل بالماء المعقم.

4-تنقل هذه الأجزاء الى اطباق بتري ثم تحضن بالحاضنة على درجة 25م.

5-تنقل الى انابيب اختبار لعدة مرات حتى تحصل على مزرعة نقية من الفطر.

2-عزل الفطريات من التربة

المواد:

1-أدوات تشريح

2-أدوات تحضير السلايد

3-اطباق بتري معقمة تحتوي على الوسط الغذائي P.D.A

4-مايكروسكوب

العمل :

1-تؤخذ أجزاء صغيرة من التربة الزراعية عشوائيا على رأس مشرط معقم ثم توضع اجزاءا منها في كل طبق يحتوي على الوسط الغذائي P.D.A ثم تحضن في الحاضنة من 3-5 أيام.

2-تلاحظ النموات الفطرية ثم تشخص.

3-العزل من الهواء

المواد:

1-اطباق بتري تحتوي على أوساط غذائية

2-أدوات تحضير السلايد

3-مايكروسكوب

4-حاضنة على درجة حرارة 25م

امراض نباتية عملي

م.م. رند سلوان

م.م. محمد سامي

العمل:

- 1- تعرض اطباق بترى التي تحتوي على الأوساط الغذائية على الهواء الجوي مباشرة لمدة ثلاث دقائق
- 2- تحضن هذه الاطباق في الحاضنة تحت درجة 25م
- 3- تفحص هذه الاطباق بعد مرور أسبوع
- 4- تشخص الفطريات التي عزلت من الهواء

عزل البكتريا Isolation of Bacteria

1-العزل من التربة : تتبع نفس الخطوات المذكورة في عزل الفطريات من التربة.

2-العزل المباشر Direct Isolation

المواد:

- 1-أدوات تشريح
- 2-أدوات تحضير السلايد
- 3-كلوراكس 10%
- 4-بايبيت
- 5-اطباق بترى تحتوي على الوسط الغذائي N.A
- 6-كحول
- 7-نباتات مصابة بالبكتريا

العمل:

- 1-تؤخذ أجزاء صغيرة من الأجزاء المصابة ثم تعقم سطحيا بواسطة الكلوراكس بوضعها 1-2دقيقة ثم تغسل بماء مقطر ومعقم.

امراض نباتية عملي

م.م. رند سلوان

م.م. محمد سامي

2-توضع هذه الأجزاء في انبوبة اختبار تحتوي على 10 سم ماء مقطر ومعقم وتترك لمدة كافية لكي تخرج البكتريا الى الماء.

3-يؤخذ جزء صغير بواسطة البايبيت المعقمة pipate ثم تحضر عدة تراكيز من البكتريا بواسطة نقلها الى عدة اطباق.

4-يجهز الوسط الغذائي N.A في اطباق بتري ثم تنقل من هذه التراكيز الى الاطباق وتحفظ في الحاضنات وتترك لمدة 5 أيام.

5-تفحص المستعمرات النامية ويحضر سلايد من هذه المستعمرات لتشخيص البكتريا

عزل الديدان الثعبانية Isolation of Nematoda

بالنظر لكبر حجم الديدان الثعبانية نسبيا تكون عملية عزلها اسهل من عملية عزل البكتريا والفطريات والفايروسات ومن هذه الطرق:

1-العزل المباشر

المواد:

1-اطباق بتري نظيفة

2-أدوات تشريح

3-أجزاء نباتية مصابة بالديدان الثعبانية

4-مايكروسكوب

العمل:

1-تقطع الأجزاء المصابة وتوضع في اطباق بتري الحاوية على ماء نظيف.

2-تمزق هذه الأجزاء بواسطة ابرتين وتترك لبرهة قصيرة.

3-تفحص تحت المايكروسكوب بالقوى الصغرى.

4-ستشاهد الديدان الثعبانية تسبح في الماء ترسم وتشخص.

امراض نباتية عملي

م. م. رند سلوان

م. م. محمد سامي

2-العزل من التربة:

المواد:

1-تربة من حول النباتات المصابة وعلى عمق 8-10 سم

2-مناخل بفتحات تتراوح بين 0.4 – 0.8 ملم.

3-مايكروسكوب

العمل:

1-يؤخذ حجم معين من التربة الموجودة حول النباتات المصابة بالديدان الثعبانية.

2-يخفف الحجم 1-5 في الماء النقي ثم يترك لمدة ثواني.

3-ينقل الماء الصافي الى وعاء اخر نظيف.

4-يمرر هذا الماء خلال سلسلة من المناخل بفتحات تتراوح بين 0.4-0.8ملم.

5-ستلتصق الديدان الثعبانية على مشابك المناخل فتغسل وتفحص تحت المايكروسكوب ، ترسم وتشخص الديدان.

عزل الفايروسات Isolation of Viruses

تعتبر عملية عزل الفايروسات ودراستها في المختبر من العمليات الصعبة ولذلك لصغر حجم الفايروسات وعدم إمكانية رؤيتها الا بواسطة المجهر الالكتروني. كما ان الفايروسات تعتبر من الكائنات اجبارية التطفل والتي لا يمكن انماءها على وسط غذائي صناعي.

وعملية عزل الفايروسات تحتاج الى تكنيك عالي وأجهزة متطورة مثل أجهزة الطرد المركزي بسرعات عالية جدا Ultracentrifuge مما يصعب توفرها في المختبرات الاعتيادية.

لذلك فأنا نستدل على وجود الفايروسات على النباتات عن طريق الاعراض المرضية التي تظهر على النباتات المصابة وللكشف عنها نقوم بنقلها الى نباتات سليمة فاذا ظهرت نفس الاعراض المرضية تأكد لنا بأن السبب المرضي هو فايروس.