الفصل الثالث

نيماتودا تعقد الجذور

Root-Knot Nematodes
Meloidogyne species

R.S. Hussey[1] and G.J.W. Janssen[2]
[1]Department of Plant Pathology, University of Georgia, Athens, GA 30602-7274, USA;
[2]Novartis Seeds AB, PO Box 302, S-261 23, Landskrona, Sweden

تعد نيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne* spp. أهم مجموعة من النيماتودا المتطفلة على النباتات من الناحية الاقتصادية على مستوى العالم، فهي تصيب تقريباً كافة المحاصيل المزروعة (Sasser and Freckman, 1987). ويؤدي الانتشار الواسع لهذه المجموعة من النيماتودا، والمدى العوائلي الضخم لها، وتداخلها مع الكائنات المرضية الأخرى لتكوين معقدات مرضية خطيرة إلى وضعها ضمن أوائل الممرضات النباتية التي تؤثر على الإنتاج الغذائي العالمي (Sasser, 1980). وهناك أربعة أنواع من الجنس *Meloidogyne* هي: *M. incognita*، و*M. javanica*، و*M. arenaria*، و*M. hapla* تمثل حوالي ٩٥٪ من مجموع أنواع نيماتودا تعقد الجذور في الأراضي الزراعية، ويعد النوع *M. incognita* أهم تلك الأنواع من الناحية الاقتصادية. وتسبب هذه الأنواع الأربعة فقداً عالمياً في إنتاج المحاصيل يقدر بحوالي ٥٪، وتشكل بذلك واحدة من المصاعب الكبرى التي تواجه الإنتاج الغذائي في الدول النامية.

وتعد نيماتودا تعقد الجذور وهي من نوع الطفيليات الداخلية الساكنة واحدة من أنجح الطفيليات في الطبيعة. فهذه الطفيليات المتعددة مصادر التغذية، التي تصيب أكثر من ألفي نوع نباتي، قد طورت علاقات غذائية متخصصة ومعقدة مع عوائلها. وتتطلب العلاقة الغذائية الناجمة بين الطفيل والعائل أن تقوم نيماتودا تعقد الجذور بتحوير بعض الخلايا داخل الجذر وتحويلها إلى خلايا مغذية خاصة بها لكي تحصل منها على المواد الغذائية الضرورية لمراحل تطورها وتكاثرها (Hussey, 1985). تتحرك يرقات الطور الثاني لهذه النيماتودا في التربة وتنجذب إلى قمم جذور النبات العائل حيث تقوم باختراقها خلف قلنسوة الجذر مباشرة. تتحرك تلك اليرقات بعد ذلك بين الخلايا في نسيج القشرة بالجذر حتى تصل إلى المنطقة التي ستتشكل فيها الأسطوانة الوعائية. تقوم اليرقات بعد ذلك بإفراز وحقن بعض الإفرازات البروتينية التي أنتجتها داخل خلايا غدد المريء، وذلك من خلال رمحها إلى حوالي

٥- ٧ خلايا من الخلايا الابتدائية لنسيج الكامبيوم الذي لم يتشكل بعد، لكي تحول هذه الخلايا إلى خلايا تغذية متخصصة جداً تسمى الخلايا العملاقة Giant cells، وهي التي تصبح بعد ذلك مناطق تغذية دائمة لهذه اليرقات طوال دورة حياتها بمراحلها المختلفة (Hussey *et al.*, 1994). ويعد تكوين الخلايا العملاقة واحدا من أكثر ردود أفعال النسيج النباتي تعقيداً تجاه أي طفيل أياً كان نوعه. تصبح الخلايا العملاقة بعد فترة من بدء تكوينها خلايا متعددة الأنوية Multinucleate، وذلك بعد مرور أنويتها بانقسامات متكررة متتالية Karyokinesis، دون أن يتبع ذلك انقساماً لسيتوبلازم الخلية نفسها Cytokinesis. تكبر الخلايا العملاقة بعد ذلك في الحجم، كما تتحول الفجوة العصارية كبيرة الحجم المتمركزة في وسط الخلية إلى فجوة صغيرة الحجم، ويزداد السيتوبلازم في الحجم والكثافة ويصبح كثيفاً محبباً، ويتغير أيضاً شكل الجدار الخلوي فيصبح غير منتظم السمك على محيط الخلية، كما تظهر منه بعض التحورات الداخلية. وتصبح النموات والامتدادات الداخلية للجذر مناطق تتدفق منها العناصر الذائبة المجهزة بواسطة الخلية لتواجه بها متطلبات النيماتودا من المغذيات (Hussey and Grundler, 1998). وتتشكل هذه الخلايا العملاقة بصفة عامة فقط في جذور النباتات القابلة للإصابة نتيجة لنشاط النيماتودا. تتطور يرقات الطورالثاني بعد التغذية على الخلايا العملاقة وتتحول بعد مرورها بثلاثة انسلاخات إلى طور الإناث الكاملة كمثرية الشكل التي تضع بيضها خارج الجسم في كتل جيلاتينية على سطح العقد الجذرية من الخارج. وهذه العلاقة الخصوصية جداً بين نيماتودا تعقد الجذور وعوائلها هي علاقة يحكمها التركيب الوراثي لكل من العائل والطفيل، وقد ينتج عنها في كثير من الأحوال تطور جينات المقاومة في العديد من أنواع المحاصيل (Sidhu and Webster, 1981). ونظراً لأن حساسية (تحمل) العوائل لنيماتودا تعقد الجذور لم يمكن توثيقها حتى الآن (Hussey and Boerma, 1992) فإنه لم يتم مناقشتها في هذا الفصل.

مصادر المقاومة

Sources of Resistance

بالرغم من توفر صفة المقاومة تجاه نيماتودا تعقد الجذور في عدة أنواع من المحاصيل، إلا أن هناك حاجة للبحث عن المزيد من مصادر المقاومة في تلك الأنواع لكي ترتفع مستويات المقاومة تجاه نيماتودا تعقد الجذور، وخاصة أنه لم يتم تعريف جينات المقاومة في المادة الوراثية لكثير من الأنواع النباتية. ويعد نقل صفة المقاومة إلى صنف تجاري قابل للإصابة أمراً بسيطاً جداً إذا وجدت صفة المقاومة في صنف محوّر أو في سلالة أو عشيرة من النباتات الناتجة من برامج التربية المتطورة. وقد أوصى فير Fehr (1987) بالبحث عن جينات المقاومة في أنواع المحاصيل طبقاً للترتيب الآتي: ١) الأصناف التجارية ذاتية التلقيح، وآباء الأصناف الهجين، وآباء الأصناف

التركيبية، ٢) السلالات المختارة في برامج التربية التي أوشكت أن تصبح أصنافاً، ٣) السلالات المقبولة في برامج التربية التي تحمل صفة أو عدة صفات متفوقة، ٤) المدخلات النباتية بين الأصناف المزروعة.

إذا لم ينجح البحث عن صفة المقاومة داخل نوع معين من المحاصيل، أو إذا كانت مستويات المقاومة التي تم تعريفها تجاه نيماتودا تعقد الجذورغير كافية، فإنه يتم البحث في الآباء البرية القريبة من نوع المحصول الذي لم توجد فيه صفة المقاومة (Boerma and Hussey, 1992). ولكنه من الصعب عادة أن يتم التهجين بين الأنواع البرية القريبة مع المحصول القريب لها، وعادة ما تؤدي مثل هذه التهجينات إلى انتقال صفات غير متوقعة مع صفة المقاومة تجاه النيماتودا إلى النسل الناتج من التهجين. والمثال التقليدي للتهجين بين نوع ما وأقربائه البرية هو نقل صفة المقاومة تجاه نيماتودا تعقد الجذور إلى نوع الطماطم *Lycopersicom esculentum* المستزرع من قريبه البري *L. peruvianum*. وقد كان هناك احتياج بالطبع إلى مزارع الأجنة لإنتاج الهجين الأول (Smith, 1944)، وإجراء وتكرار التهجينات الرجعية Backcrosses مع صنف الطماطم المستزرع للحصول على النوعية والإنتاجية المرغوبتين.

الاعتبارات العامة في اختبارات البحث عن صفة المقاومة تجاه نيماتودا تعقد الجذور

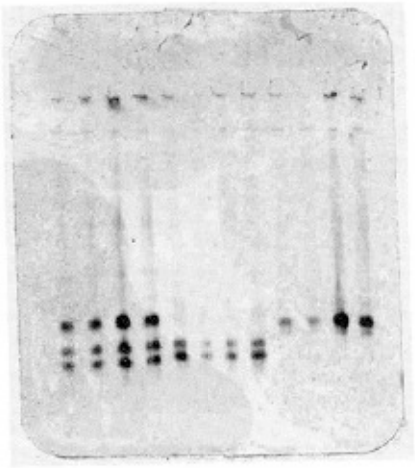
General Considerations for Screening for Root-Knot Resistance

تعريف نوع نيماتودا تعقد الجذور Identification of Root-Knot Nematode Species

يتم عمل مزارع نيماتودا تعقد الجذور من كتل بيض مفردة Single egg masses أو من عشيرة حقلية من النيماتودا. وتضمن مزارع كتل البيض المفردة الحصول على نوع واحد من النيماتودا، ولكنها تقلل فرص التنوع الوراثي الذي يكون موجوداً عادة في مزارع العشائر الحقلية (Roberts and Thomason, 1989). وبمجرد استقرار المزرعة النيماتودية، يصبح من الضروري إعادة تعريف وتوثيق النوع النيماتودي. وقد يكون التعريف الدقيق لنوع نيماتودا تعقد الجذور واكتشاف الأنواع الخليطة في مزارع النيماتودا التي تقام داخل البيوت الزجاجية من الأمور الصعبة. وعموماً هناك أربع طرق يمكن استخدامها لتعريف أنواع نيماتودا تعقد الجذور أو التحقق من نقاء المزرعة في الأصل وهي: ١) طرز المشابهات الإنزيمية لإناث النيماتودا، ٢) اختبار جامعة ولاية كارولينا الشمالية للعوائل المفرقة North Carolina differential host test، ٣) الشكل المورفولوجي للنمط العجاني للإناث الكاملة، ٤) التعريف الجزيئي. وتعد طريقة اختبار طرز المشابهات الإنزيمية للإناث باستخدام طريقة التفريد الكهربي بجل البولي أكريلاميد Polyacrylamide gel electrophoresis من أكثر الطرق المستخدمة مصداقية وانتشاراً (Eisenback and Triantaphyllou, 1985؛ Eisenback and Triantaphyllou, 1986). فطرز المشابهات الإنزيمية ثابتة داخل النوع الواحد حتى لو كانت من عزلات تم جمعها من مناطق مختلفة بالعالم، وهو الأمر الذي يجعل عملية تعريف النوع باستخدام هذه التقنية الحساسة أمراً في غاية المصداقية والثقة. وتعد طرز إنزيمي الإستريز Esterase والماليت ديهيدروجينيز Malate

dehydrogenase (الشكل رقم ٣,١) التي تعزل من أنثى مفردة من النيماتودا من الطرق التشخيصية لأغلب أنواع نيماتودا تعقد الجذور. كما يوصى باستخدام الطريقتين (الطرازين) معاً عند تعريف عشيرة حقلية مجهولة من النيماتودا. هذا، وقد سهل نظام التفريد الكهربي المميكن Automated electrophoresis system المعروف باسم PostSystem™ الذي تم تطويره بواسطة شركة Amersham Pharmacia Biotech الأمريكية (Piscataway, New Jersey, USA) كثيراً من عملية التحليل بالتفريد الكهربي، وجعل من عملية اختيار طرز المشابهات الإنزيمية للأنثى الكاملة المفردة أمراً عملياً يمكن تطبيقه بسهولة (Esbenshade and Triantaphyllou, 1990). أما اختبار العوائل المفرقة فيستخدم فقط للأنواع الأربعة الأكثر شيوعاً من نيماتودا تعقد الجذور(*M. incognita*، و*M. javanica*، و*M. arenaria*، و*M. hapla*) (Hartman and Sasser, 1985). وتتميز العوائل المفرقة المستخدمة في هذا الاختبار- وهي: القطن، والتبغ المقاوم للنوع *M. incognita*، والفلفل، والبطيخ، والفول السودانى والطماطم- باختلاف ردود أفعالها تجاه تلك الأنواع الأربعة من نيماتودا تعقد الجذور، بل ولسلالات النوعين؛ *M. incognita* و*M. arenaria*. ومن ثمَ يمكن استخدامها لتعريف هذه الأنواع الأربعة والسلالات التابعة لها واكتشاف الأنواع المختلطة منها في المزارع الأصل Stock cultures. ويمكن الاطلاع على إرشادات إجراء اختبار العوائل المفرقة التي وصفها Hartman and Sasser (1985). وقد تحتاج نتائج اختبار العوائل المفرقة إلى توثيقها باختبار النمط العجاني للإناث الكاملة (Taylor and Sasser, 1978؛ Eisenback and Triantaphyllou,1991). ويعد اختبار النمط العجاني الذي يتضمن فحص التخطيط الكيوتيكلي للمنطقة الخلفية للأنثى الكاملة أفضل صفة تشخيصية يمكن بواسطتها تعريف النوع. ولكن هذه الصفة المورفولوجية تكون متباينة داخل النوع الواحد ويتطلب ذلك تفسيراً متأنياً حتى يمكن الحصول على تعريف دقيق (Taylor *et al*., 1955). وقد تم وصف طريقة إعداد النمط العجاني بواسطة Hartman and Sasser (1985).

وفي الآونة الأخيرة، تم تطوير تقنيات البيولوجيا الجزيئية لتعريف أنواع نيماتودا تعقد الجذور باستخدام الحامض النووي DNA، وذلك باستخدام تقنية اختبار البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction (PCR)، الذي يسمح بإجراء التعريف باستخدام يرقة واحدة من النيماتودا. وقد أفاد هذا الاختبار في تعريف الأنواع: *M. chitwoodi*، و*M. fallax*، و*M. hapla* باستخدام حامض DNA الريبوسومي Ribosomal DNA (Zijlstra *et al*., 1995؛ Castagnone-Sereno *et al*., 1999). كما يمكن أيضاً تعريف الأنواع الأربعة الأكثر شيوعاً من نيماتودا تعقد الجذور باستخدام نفس الاختبار، وذلك بتكبير وفصل الحامض النووي DNA الميتوكوندري Mitochondrial DNA (Powers and Harris, 1993). وسوف يؤدي تحسين تقنيات البيولوجيا الجزيئية بدون شك إلى توسيع قاعدة استخدامها في تعريف أنواع نيماتودا تعقد الجذور في المستقبل.



الشكل رقم (٣,١). طرز إنزيم الإستريز المعزولة من إناث ناضجة مفردة لنيماتودا تعقد الجذور. (الأعمدة ١ – ٤ من اليسار إلى اليمين: *Melodogyne javanica*، الأعمدة ٥ – ٨: *M. arenaria*، الأعمدة ٩ – ١٢: *M. incognita*).

وتعد طريقة اختبار العوائل المفرقة أفضل طريقة لاكتشاف العشائر الخليطة من النيماتودا حيث يستخدم في هذا الاختبار بضعة آلاف من البيض في عدوى النباتات، كما توفر هذه الطريقة أيضاً ميزة فضلى في التفريق بين الأنواع الخليطة، حيث إن استخدام ١٠ – ٢٠ أنثى بالغة فقط في اختبار العوائل المفرقة أو اختبار طرق المشابهات الإنزيمية لايعطي الفرصة الكاملة لاكتشاف الأنواع الخليطة. وعند اختيار أنثى نيماتودا لإجراء اختبار النمط العجاني أو طرق المشابهات الإنزيمية، يجب جمع هذه الإناث من مواضع مختلفة على المجموع الجذري للنبات المصاب، وذلك حتى تزيد احتمالية اكتشاف الأنواع المختلطة. وتبدأ عملية إنشاء المزارع النقية متخصصة النوع Species specific culture بعزل إناث كاملة مع ما يصاحب كل منها من كتل البيض. ثم تستخدم فقط كتل البيض التي تم عزلها من إناث سبق تعريفها بطريقة تحليل المشابهات الإنزيمية لتلقيح نباتات المزارع النقية المزمع إقامتها.

إكثار وإعداد اللقاح Rearing and Preparation of Inoculum

اختيار العزلات Selection of isolates

تعد عملية اختيارعشائر نيماتودا تعقد الجذور لاستخدامها كلقاح خطوة حرجة جدا في برامج التقييم لصفة المقاومة. ويراعى أن استخدام عزلة شرسة من نيماتودا تعقد الجذور سوف يسمح باكتشاف التراكيب الوراثية النباتية التي تمتلك أعلى مستويات المقاومة. وإضافة إلى ذلك، يعد استخدام خليط من عشائر لنفس النوع تم جمعها من مناطق جغرافية متباعدة كلقاح طريقاً لاصطياد التنوع الوراثي في أنواع نيماتودا تعقد الجذور المستخدمة في أغراض التقييم. كما سوف يؤدي استخدام عشائر مختلطة شرسة إمراضياً إلى خفض درجة الاختلافات في النتائج بين

الاختبارات. والأكثر أهمية من ذلك، هو أنه سوف يسهل تعريف سلالات التربية التي تمتلك مقاومة عريضة يمكن استخدامها في رقعة جغرافية واسعة (Hussey and Boerman, 1981).

المحافظة على المزراع النقية الأساسية Maintaining pure stock cultures

يعد الحفاظ على المزارع النقية الأساسية أمراً ضرورياً جداً ومحدداً لنجاح أي برنامج تقييم. ويمكن استخدام عدة إستراتيجيات لمنع تلوث تلك المزارع داخل البيوت الزجاجية واختلاطها بعزلات نيماتودية أخرى. فمثلاً، يجب استخدام أصص ملونة بحيث يخصص كل لون من الأصص لنوع أو عزلة معينة بصفة دائمة. وهذا من شأنه أن يمنع التلوث الذي ينتج عن استخدام نفس الأصص لأكثر من مرة مهما كانت درجة نظافتها. أيضاً يجب أن تصنع الطاولات أو البنشات بشكل شبكي من الأسلاك المتعامدة المتينة التي توجد بينها ثقوب، كما يجب وضع حواجز بين العزلات لمنع التلوث. ويمنع أيضاً أي تلامس أو احتكاك مع أصص المزارع أثناء التعامل معها أو ريها. فمثلاً من السهل جداً أن تتلوث فوهة الخرطوم أو رشاش الري بالتربة من أصيص ما ثم تنتشر هذه التربة بسهولة إلى أصص أخرى. وفي كل مرة يتم فيها إكثار للمزرعة الأصل إلى مزارع تحت أصلية Subcultures، يجب تدوين كل التفاصيل التي تتعلق بمصدر اللقاح وتاريخ التجديد. وإذا ما حدث وتلوثت مزرعة ما بعزلة أخرى من النيماتودا، فإنه يتم الرجوع إلى المصدر الذي جاء منه هذا التلوث، وتُراجع المعلومات التي في ضوئها يتم تحديد ما إذا كنا بحاجة لإعادة أية اختبارات تقييم تم إجراؤها باستخدام لقاح من هذه المزارع الملوثة من عدمه. كما يجب التفتيش الدوري المنتظم للمزارع الأصلية لضمان نقائها وعدم تلوثها. ويجرى ذلك كل ستة أشهر باستخدام واحد من الإجراءات التي تمت مناقشتها فيما سبق. وإضافة إلى ذلك، من الممكن استخدام نباتات كشافة تزرع في المزارع تحت الأصلية Subcultures في كل مرة تنشأ فيها هذه المزارع للكشف عن أية أنواع نيماتودية مع نوع النيماتودا المستخدم في المزرعة الأصلية. فمثلاً، يمكن انتقال عدوى صنف تبغ مقاوم لنيماتودا تعقد الجذور *M. incognita* عند عمل مزارع جديدة من النوع *M. incognita*، فإذا تكونت عقد على جذور هذا الصنف دلّ ذلك على تلوث المزرعة بنوع آخر. وتساعد أيضاً الدورة الزراعية القياسية في المحافظة على نظافة وشراسة العشيرة النيماتودية. ففي حالة عزلات النوعين *M. chitwoodi* و*M. fallax* مثلاً، يمكن استخدام دورة تشمل؛ البطاطس، والطماطم، والقمح بينما في حالة النوع *M. hapla* يتم استخدام نفس الدورة مع استبدال القمح بالبرسيم الحجازي.

من المهم أيضاً الحفاظ على القدرة الإمراضية وصفة الشراسة الإمراضية لعشائر نيماتودا تعقد الجذور، ويمكن إنجاز ذلك بعمل مزارع لنوع أو عشيرة النيماتودا على عائل نباتي قادر على ممارسة صفة الضغط الانتخابي على هذا النوع أو هذه العشيرة. ولدفع النيماتودا إلى أقصى إنتاج من أكياس البيض للحصول على اللقاح، يتم تنمية النيماتودا على عائل شديد القابلية للإصابة مثل الطماطم أو الباذنجان. وقد يكون من الضروري أيضاً أن تُنمى بعض العشائر النيماتودية على عائل له القدرة على ممارسة الضغط الانتخابي على تلك العشائر. فمثلاً، لا يعد فول

الصويا عائلاً جيداً لنيماتودا تعقد الجذور *M. incognita*. وبعد تنمية عشيرة نيماتودية شرسة ومتخصصة على فول الصويا لفترة من الوقت على نباتات طماطم، يتم إعادة تنمية هذه العشيرة مرة أخرى على فول الصويا لضمان بقاء شراستها على هذا النبات حتى يمكن استخدامها فيما بعد في برامج التقييم لقابلية تراكيب وراثية من فول الصويا للإصابة بنيماتودا تعقد الجذور.

الاعتبارات الخاصة باللقاح Inoculum considerations

يمكن المحافظة على المزارع الأصل لنيماتودا تعقد الجذور على عوائلها النباتية في البيوت الزجاجية. ويمكن الحصول من هذه المزارع على يرقات الطور الثاني، أو كتل البيض، أو معلق البيض لاستخدامها كلقاح. وتعد طريقة هيبوكلوريت الصوديوم لاستخلاص البيض في معلق (حيث يذيب هيبوكلوريت الصوديوم المادة الجيلاتينية المطمور فيها البيض ليحرره) الطريقة الأكثر استخداماً لاستخلاص بيض نيماتودا تعقد الجذور (Hussey and Barker, 1973) نظراً لمزاياها الكثيرة التي يمكن إيجازها فيما يأتي: ١) طريقة بسيطة وسريعة لاستخلاص كميات كبيرة من اللقاح، ٢) سهولة إعداد تركيزات مختلفة من البيض في المعلق (مستويات لقاح مختلفة)، ٣) سهولة توزيع اللقاح بطريقة متجانسة حول المجموع الجذري للنبات، ٤) البيض الناتج من هذه الطريقة يكون معقماً سطحياً بفعل هيبوكلوريت الصوديوم، ٥) لايتأثر البيض في المعلق بطريقة العمل. وبالإضافة إلى ذلك، يمكن أيضاً استخدام يرقات الطور الثاني أو كتل البيض كلقاح. وتتميز طريقة استخدام اليرقات بإمكانية التنبؤ الدقيق لوقت ومستوى حدوث العدوى. وقد تكون هذه الطريقة هي الطريقة المفضلة في الدراسات المتقدمة لصفة المقاومة، ولكن يعيبها أن اليرقات تكون حساسة عادة لطريقة العمل مقارنة بالبيض، وربما تفقد قدرتها على اختراق الجذور سريعاً بسبب التخزين. أما كتل البيض، فبالإضافة إلى صعوبة تجميعها، فإنها أيضاً لا تسمح بعمل تركيزات (مستويات لقاح) متساوية، ولا يمكن نشر اللقاح المستخدم منها بتجانس في التربة، كما أنه من الممكن أن توجد معها كائنات دقيقة ممرضة لم تكن موجودة في التربة من قبل.

جمع بيض نيماتودا تعقد الجذور لاستخدامه في التلقيح

Collecting root-knot nematode eggs for inoculum

١- بعد ٤٥ يوماً من تلقيح النباتات بالنيماتودا في المزرعة الأصل (وربما أطول من ذلك قليلاً في أشهر الشتاء)، يتم تحرير جذور النباتات من الأصص برفق، وغسيلها بالماء الجاري من حبيبات التربة الملتصقة بها. ويلاحظ أن تحديد عمر النباتات عند استخلاص البيض منها يتوقف أيضاً بل كثيراً على درجة الحرارة السائدة في البيت الزجاجي. ولا تعد النباتات كبيرة العمر ذات الجذور المتحللة مصدراً جيداً لاستخلاص اللقاح.

٢- تقطع الجذور إلى قطع صغيرة وتغسل مرة أخرى بالماء الجاري، وكلما كانت الجذور نظيفة سهلت عملية استخلاص البيض منها بواسطة المناخل.

openkan.com

٣- يجهز محلول هيبوكلوريت الصوديوم NaOCl تركيزه ٠,٥٢٥٪ (وهو مايعادل ٠,٢٣٪ كلور). ويلاحظ أن التركيزات الأعلى من ذلك سوف تؤدي إلى نقص حيوية البيض (Hussey and Barker, 1973).

٤- توضع قطع الجذور النظيفة في وعاء سعة لتر، ويضاف إليها ٢٠٠ مل من هيبوكلوريت الصوديوم NaOCl ٠,٥٢٥٪ وتغلق فوهة الوعاء. يتم رج الوعاء يدوياً بعد ذلك بقوة لمدة ثلاث دقائق ونصف. ويلاحظ عدم تعريض البيض لمادة هيبوكلوريت الصوديوم لأكثر من أربع دقائق مطلقاً لأن ذلك سوف يخفض كثيراً من حيويته.

٥- بعد الرج لمدة ثلاث دقائق ونصف، يمرر معلق هيبوكلوريت الصوديوم الذى يحوي بيض النيماتودا على منخلين متراكبين فوق بعضهما، العلوي منهما ٢٠٠ ثقب/بوصة (قطر الثقب= ٧٥ ميكروميتراً)، والسفلي ٥٠٠ ثقب/بوصة (قطر الثقب= ٢٥ ميكروميتر). يملأ الوعاء الذي يحتوي على الجذور بالماء ويوضع جانباً حتى العودة إليه مرة أخرى. يوضع المنخل العلوي (٢٠٠ ثقب/بوصة) جانباً أيضاً حتى يتم تنظيفه، وبسرعة يوضع المنخل ٥٠٠ ثقب/بوصة الذي يحتوي على البيض تحت تيار هين مستمر من الماء الجاري حتى يتم التخلص من متبقيات محلول هيبوكلوريت الصوديوم تماماً لكيلا تتأثر حيوية البيض. يُنقل البيض بعد ذلك في معلق من الماء إلى وعاء سعة لتر أو أكثر حسب الحاجة.

٦- ينظف المنخل ٢٠٠ ثقب/بوصة، ثم يعاد تركيب المنخلين فوق بعضهما كما سبق، ويصب الماء الموجود في الوعاء الأول فوق المنخلين بنفس الطريقة السابقة. يضاف الماء مرة أخرى إلى الوعاء ويكرر تمرير ما به من معلق على المنخلين. يوضع المنخل ٢٠٠ ثقب/بوصة جانباً، ثم يجمع البيض الموجود في المنخل ٥٠٠ ثقب/بوصة ويضاف إلى معلق البيض السابق. إذا أريد تكرار نفس الطريقة لاستخلاص بيض عشيرة نيماتودية أخرى، تغسل جميع الأدوات والمناخل وتنقع في ماء حار (<٥٠ °م) لمدة ١٥ ق ثم يستأنف العمل، وهكذا الأمر بين كل نوع وآخر، أو عشيرة وأخرى.

٧- يتم تقدير عدد البيض في المعلق، وذلك بأخذ ثلاث عينات كل منها ١ مل بعد التقليب الجيد للمعلق فوق مقلب مغناطيسي، وتوضع كل عينة (١ مل) فوق شريحة عدّ النيماتودا، ويتم العدّ تحت المجهر المركب أو البسيط إذا أمكن ذلك، ثم يحسب متوسط عدد البيض في كل شريحة، ومنه يتم حساب عدد البيض في كل ١مل من المعلق الأساسي ثم يضبط عدد البيض ليكون ١٠٠٠ بيضة/مل لاستخدامه في التلقيح.

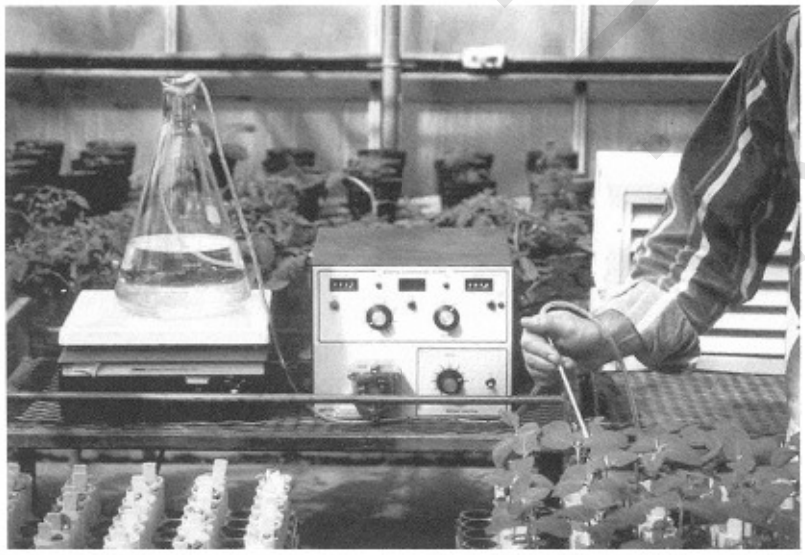
تلقيح النباتات Inoculating Plants

يعتمد عدد بيض نيماتودا تعقد الجذور المستخدم كلقاح على كل من: حجم الأصيص المزروع فيه النبات، وملاءمة النبات المختبر كعائل للنيماتودا، والظروف البيئية، وربما عوامل أخرى أيضاً. ولهذه الأسباب جميعاً، فإنه من الضروري إجراء اختبارات أولية لتقدير كمية اللقاح المثلى لكل توليفة من العائل والنوع النيماتودي

(Hussey and Boerma, 1981). ويبنى تركيز اللقاح المستخدم من بيض نيماتودا تعقد الجذور المستخلص بطريقة هيبوكلوريت الصوديوم ٠,٥٢٥٪ على أساس أن نسبة فقس البيض المستخلص بهذه الطريقة دائماً تتراوح بين ٢٠ و٢٥٪ برغم أنه قد تفقس كمية من البيض أكبر من ذلك فى الحقيقة. فنسبة الفقس تزداد عادة إذا كانت كتل البيض التي تم استخلاص البيض منها كبيرة العمر، وقد تطورت نسبة كبيرة من البيض داخلها إلى مراحل جنينية متقدمة (Ehwaeti *et al.*, 1998). أما بالنسبة لاستخدام اليرقات كلقاح فإن تركيزاً من اللقاح يساوي يرقة واحدة أو اثنتين/سم^{3} من التربة يعد كافياً لذلك.

وفيما يتعلق بالاختبارات الصغيرة، فإن البيض يمكن توزيعه بالتساوي على نباتات الاختبار بسهولة، وذلك باستخدام قنينة توزيع معايرة (١٠ مل) مثبتة على فوهة زجاجة سعة لترين. أما بالنسبة للاختبارات الكبيرة، فإن مضخة التوزيع الرقمية تكون أكثر واقعية وعملية (الشكل رقم ٣,٢). ويجب تقليب معلق اللقاح الأساسي Stock inoculums للمحافظة على تجانس توزيع البيض في المعلق. أما في حالة المضخة الرقمية فيتم المحافظة على تجانس توزيع البيض في المعلق بالاستعانة بمقلب مغناطيسي أو مضخة هواء.

عند التلقيح، يضاف البيض ويقلب مع التربة وقت شتل النباتات أو الأجزاء التكاثرية. أما النباتات التي تزرع بالبذور فيضاف البيض في حفرتين أو ثلاث حفرات في التربة حول ساق البادرة. ومن الممكن أن يتوزع البيض بعد ذلك في التربة عند ري النباتات. أما التلقيح باليرقات فيتم بعد أسبوعين من شتل النباتات أو زراعة البذور حتى تكون هناك كمية كافية من الجذور لاستقبال اليرقات. وأخيراً، يجب تجنب الري الزائد في الأيام القلائل الأولى بعد التلقيح سواء كان التلقيح بالبيض أو اليرقات.



الشكل رقم (٣,٢). مضخة التوزيع الرقمية المستخدمة في تلقيح النباتات ببيض نيماتودا تعقد الجذور المجهز في صورة معلق مـــائي في دورق سعة لترين مزود بمقلب مغناطيسي.

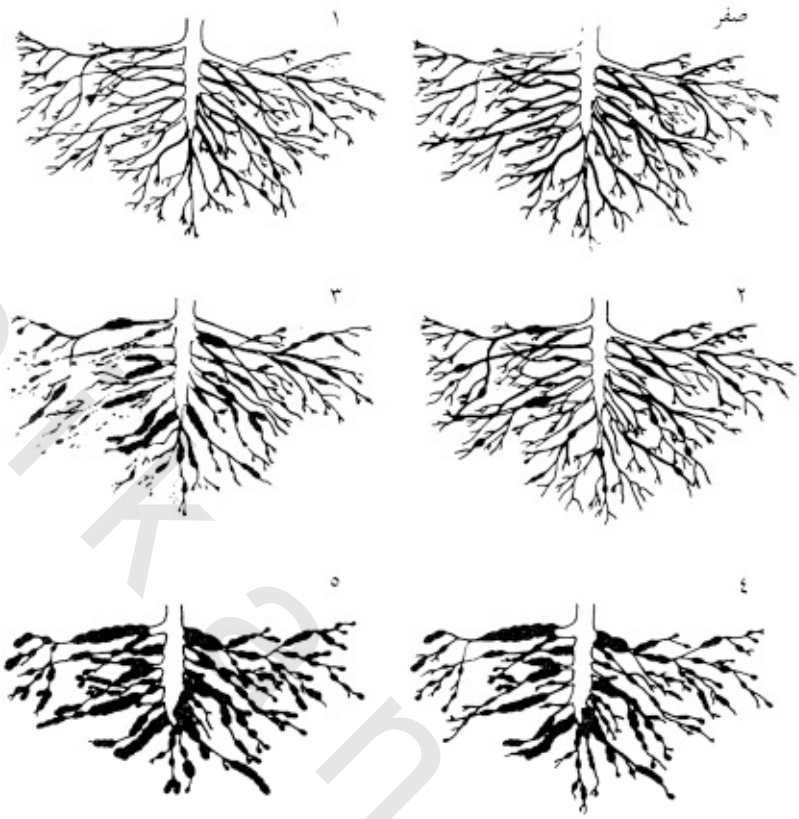
تقييم التراكيب الوراثية لصفة المقاومة تجاه نيماتودا تعقد الجذور

Evaluating Genotypes for Root-Knot Resistance

تعني المقاومة قدرة النبات على إيقاف تطور وتكاثر النيماتودا (انظر الفصل الثاني). وعلى العكس من ذلك، النبات القابل للإصابة هو ذلك النبات الذى يسمح بتكاثر النيماتودا عليه بحرية. وفي الواقع العملي، نجد أن صفة المقاومة هي نظرية نسبية تشتق من المقارنة بين التراكيب الوراثية، وتحتوي عادة على دلالة لمستويات من المقاومة داخل إطار التداخل بين العائل والنيماتودا، فالتركيب الوراثي شديد المقاومة لا يسمح إلا بمعدل تكاثر بسيط للنيماتودا (أقل من ١٠٪ مما يسمح به التركيب الوراثي القابل للإصابة)، بينما التركيب الوراثي المقاوم جزئياً يسمح بمستويات متوسطة من النيماتودا مقارنة بالتركيب الوراثي القابل للإصابة.

يمكن أيضاً تقييم مقاومة التراكيب الوراثية لنيماتودا تعقد الجذور على أساس معدل التعقد الجذري، وعدد كتل بيض النيماتودا أو العدد النهائي للبيض على المجموع الجذري. ولكن قد لا يكون معدل التعقد الجذري لبعض المحاصيل دليلاً مُرضياً للدلالة على مقاومة النيماتودا، ولذلك يجب أن يقترن هذا المقياس مع مقياس عامل تكاثر النيماتودا لتحديد درجة الارتباط والعلاقة بين المقياسين (Hussey and Boerma, 1981). ولتقدير مقياس معدل التعقد الجذري وعدد كتل البيض، يستخدم دليل خاص على مقياس من صفر إلى خمسة عادة كما هو موضح في الشكل رقم (٣,٣).

وبالنسبة للسلالات النباتية المتقدمة، فإن الحصول على بيانات كمية لعدد بيض النيماتودا المتكون على جذور تلك السلالات يعد أكثر فائدة في تحديد المقاومة تجاه نيماتودا تعقد الجذور من مقياس معدل التعقد الجذري أو عدد كتل البيض (Luzzi *et al.*, 1987). ويمكن استخدام طريقة هيبوكلوريت الصوديوم أيضاً التي سبق وصفها للحصول على بيض النيماتودا من الجذور لتقدير عدد البيض على المجموع الجذري ككل أو في الجرام الواحد من الجذور، مع اختلاف بسيط، وهو أنه عند الرغبة في استخدام هيبوكلوريت الصوديوم لاستخلاص البيض من الجذور لتقدير العدد النهائي للبيض في المجموع الجذري يستخدم تركيز من هيبوكلوريت الصوديوم قدره ١,٠٥٪ بدلاً من ٠,٥٢٥٪ وذلك لزيادة كفاءة الاستخلاص، حيث إن حيوية البيض غير مهمة في تلك الحالة. ويجب تقدير الوزن الرطب للجذور قبل استخلاص البيض منها بهذه الطريقة حتى يمكن أن ننسب عدد البيض إلى وزن الجذر للحصول على عدد البيض بكل جرام من الجذور الطازجة عند الرغبة في ذلك. ويمكن استخدام بيانات عدد البيض في تطوير دليل للمقاومة (عدد البيض/نبات ÷ عدد البيض/نبات قياسي قابل للإصابة)، ويمكن استخدام هذا الدليل في المقارنة بين التراكيب الوراثية المراد تقييمها.



الشكل رقم (٣,٣). شكل تخطيطي يوضح دليل التعقد الجذري على المقياس (صفر – ٥)، حيث: صفر= عدم وجود عقد، ١= بضع عقد صغيرة الحجم على المجموع الجذري، ٢= أقل من ٢٥ ٪ من المجموع الجذري تظهر عليه العقد، ٣= ٢٥ – ٥٠ ٪ من المجموع الجذري تظهر عليه العقد ، ٤= ٥١ – ٧٥ ٪ من المجموع الجذري تظهر عليه العقد ، ٥= أكثر من ٧٥ ٪ من المجموع الجذري تظهر عليه العقد (إهداء من: K.R. Barker).

قد تضع النيماتودا بعض البيض داخل أنسجة الجذور، وذلك في بعض الأنواع من النيماتودا أو في بعض الحالات من التداخل بين العائل والنيماتودا، مما قد يسبب مشكلة في استخلاص هذا البيض بطريقة هيبوكلوريت الصوديوم. وفي هذه الحالة، يمكن استخلاص البيض بتمزيق أنسجة الجذر في هيبوكلوريت الصوديوم ١,٠٥٪ داخل خلاط، ثم استقبال معلق البيض الناتج على المناخل كما سبق وصفه (Vermis and Roberts, 1996b). ونظراً لأن بعض الأنسجة النباتية قد تمر مع البيض من المناخل، فإنه يمكن صبغ البيض في العينة التي سبق عدّ البيض فيها بواسطة صبغة الفوكسين الحامضي لتسهيل رؤية وتمييز هذا البيض تحت المجهر. ويجرى ذلك على النحو الآتي: تؤخذ تحت عينة ممثلة Subsample من البيض وتنقل إلى دورق صغير يحتوي على ٣٠ مل من الماء، ويضاف إليها نقطتان من محلول الصبغة (٣,٥ جم فوكسين حامضى +٢٥٠ مل حامض لاكتيك +٧٥٠ مل ماء)، ثم يسخن

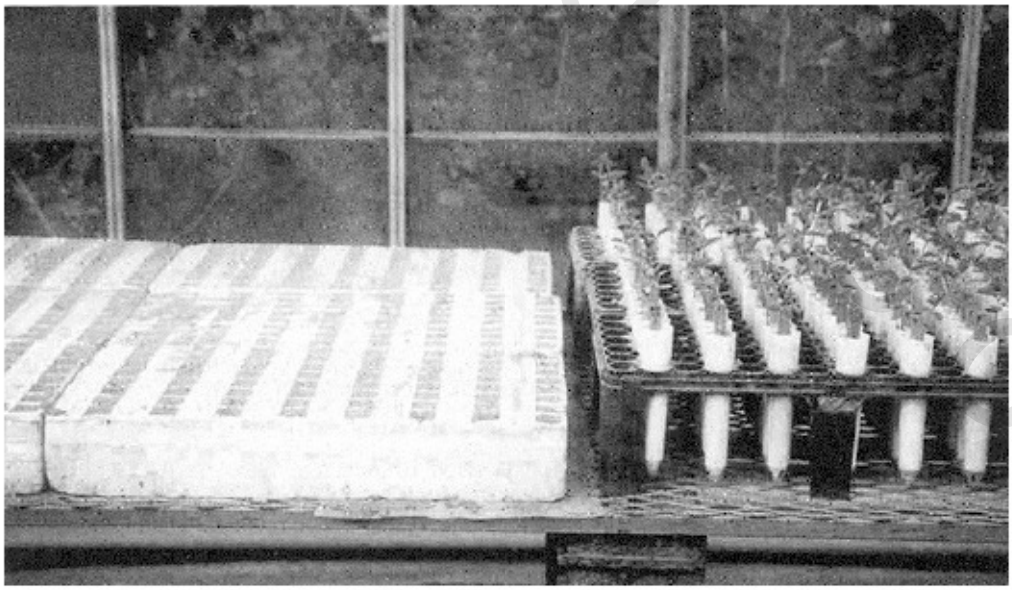
الدورق حتى غليان محتوياته (Byrd *et al*., 1972). هذا، ويعدّ طول فترة نمو النبات، ودرجة الحرارة السائدة أثناء النمو من العوامل الحرجة عند الرغبة في تقدير عامل تكاثر النيماتودا على النبات الذي يعتمد على عدد البيض النيماتودي/نبات. ولذلك، يجب أن تحصد النباتات بعد ٤٠ – ٤٥ يوماً من تلقيحها بالنيماتودا ونموها في مدى من درجات الحرارة يتراوح بين ٢٥ و٣٠ °م. وهنا يفضل أخذ نبات مكرر واحد من مكررات التركيب الوراثي القياسي القابل للإصابة في الاختبار، وذلك للكشف عن مدى تطور كتل البيض على النباتات وتقدير الوقت الذي يجب عنده إنهاء التجربة. ومما يسهل من ذلك، أن كتل البيض جيدة التطور تكون كبيرة الحجم ويمكن مشاهدتها بسهولة (انظر اللوحة رقم ١ في اللوحات الملونة) بعد صبغها بوضع المجموع الجذري في محلول مائي من صبغة الفلوكسين ب Phloxin B (٠,١٥ جم/ لتر ماء) (Dickson and Strubble, 1965). بعد ذلك ينقع المجموع الجذري في الماء العادي لإزالة بقايا الصبغة من الجذور، بينما تبقى كتل البيض مصبوغة باللون الوردي (اللوحة الملونة رقم ١). أما إن كان هناك كتل بيض ناضجة ولم تصبغ بصبغة الفلوكسين ب فإنها تظهر بلون بني خفيف.

قواعد اختبارات التقييم
Screening Protocols

متطلبات اختبارات التقييم Requirements for screening

يجب أن يكون البروتوكول المستخدم لتعريف السلالات المقاومة لنيماتودا تعقد الجذور قادراً على تقييم الآلاف من التراكيب الوراثية في برنامج التربية (Boerma and Hussey, 1992). ويتم ذلك عادة تحت ظروف البيت الزجاجي الذي يسمح بإجراء العديد من الاختبارات على مدار السنة الواحدة. وبالرغم من أنه يتم تقييم السلالات عادة في الحقول الملوثة طبيعياً بالنيماتودا، إلا أن عدم تجانس التلوث بنيماتودا تعقد الجذور في كافة أرجاء الحقل، والمعوقات الموسمية، وعشائر النيماتودا متعددة العوائل الموجودة في الحقل، تجعل من هذا التقييم تقييماً معيباً لا يمكن الاعتماد عليه. وبالرغم أيضاً من أنه يمكن استخدام التربة الملوثة طبيعياً بنيماتودا تعقد الجذور في اختبارات البيت الزجاجي، إلا أن عدم تجانس اللقاح، وإمكانية تلوث الأصص بكائنات أخرى (قد يكون من بينها أنواع أخرى من النيماتودا أيضاً) في مثل هذه الاختبارات يجعل من مصادر لقاح نيماتودا تعقد الجذور التي أخذت من مزارع تمت تربيتها في البيت الزجاجي أمثل وأفضل مصادر اللقاح. وهناك فوائد أخرى لاستخدام مزارع البيوت الزجاجية كمصدر للقاح ومنها: التحكم في مستويات العدوى باللقاح، والتوزيع المتجانس للقاح، وإجراء اختبارات التقييم لصفة المقاومة باستخدام لقاح نيماتودي وعوائل نباتية في غير أماكنها الأصلية، والتغلب على المعوقات الموسمية (Hussey and Boerma, 1981). وتستخدم الأصص ذات القطر ١٥سم في إجراء اختبارات التقييم

لصفة المقاومة في البيوت الزجاجية، على الرغم من أن حجمها قد يحد من عدد التراكيب الوراثية التي يتم اختبارها في المرة الواحدة ويسمح بنمو أكبر للمجموع الجذري لنباتات الاختبار . ومن المعلوم أن اختبارات التقييم تكون أسهل كثيراً عندما يكون المجموع الجذري للنباتات صغيراً فيسهل عدّ العقد الجذرية فيه، وكذلك تسهل عملية استخلاص البيض منه. وهناك بعض الأواني التي يمكن استخدامها لتؤدي هذا الغرض مثل: خلايا الزراعة المعروفة باسم Polystrene Todd Planter Flats موديل (١٥٠ – ٥) التي تصنعها شركة Speedling Inc. بمدينة Sun City بولاية فلوريدا الأمريكية. وتحتوي الواحدة منها على ١٢٨ خلية على شكل هرم مقلوب، سعة كل منها ٧٠ سم^{٣} وطولها ١١,٢٥ سم، ومفتوحة القاع لصرف ماء الري الزائد، وكذلك أوعية الزراعة المعروفة باسم Ray Leach Single cell Cone-tainer^{Tm} موديل (LD-UV Sc-10) التي تصنعها شركة Stuewe LoSons Inc. بمدينة كورفاليز Corvallis بولاية أوريجون الأمريكية، وتحتوي الواحدة منها على ١٥٠ أنبوبة بلاستيكية سعة ٢٥٠ سم^{٣} وطولها ٢٠,٦ سم ومفتوحة القاع، وهي أوعية ممتازة لإجراء اختبارات التقييم لعدد كبير من التراكيب الوراثية تجاه نيماتودا تعقد الجذور (الشكل رقم ٣,٤). كما تتميز هذه الخلايا والأوعية بأن جذور النباتات التي تنمو فيها تكون محدودة الحجم نظراً لقلة التهوية في الأنابيب، ومن ثم يسهل التعامل معها عند التقييم الحيوي للإصابة بالنيماتودا. كما أن العمق الكبير للأوعية من النوع Cone-tainer^{Tm} يسمح بتعرض أغلب الجذور للقاح النيماتودي، وبذلك يزداد معدل إصابتها بالنيماتودا (الشكل رقم ٣,٤).



الشكل رقم (٣,٤). أطباق Todd الزراعية المصنوعة من البولي إستيرين، وخلايا Ray الراشحية المفردة (نظام Cone-tainer^{TM}) المستخدمة في تقييم مقاومة النباتات لنيماتودا تعقد الجذور.

قد تتغير الظروف البيئية وكثافة الإضاءة ودرجة الحرارة في البيوت الزجاجية المختلفة، ومن ثمَ يؤثر ذلك معنوياً في رد فعل نباتات الاختبار لنيماتودا تعقد الجذور. وتؤدي درجات الحرارة المنخفضة إلى خفض معدل تطور النيماتودا، ومن ثمَ يقل ظهور العقد النيماتودية. وعلى العكس من ذلك، قد تغير درجات الحرارة المرتفعة من استجابة الأصناف المقاومة. لذا فإنه من المهم جداً إدخال صنف معروف بقابليته للإصابة بنيماتودا تعقد الجذور وصنف آخر مقاوم ضمن التراكيب الوراثية المراد اختبارها تجاه نيماتودا تعقد الجذور كأصناف اختبار قياسية يمكن بواسطتها معرفة أية تغيرات قد تحدث في ظروف الاختبار (Hussey and Boerma, 1981). كما يفيد صنف الاختبار القابل للإصابة القياسي في تحديد وقت إنهاء التجربة الذي يكون عادة عند ظهور أكبر عدد من العقد الجذرية وكتل البيض على هذا الصنف. ومادام أن المقاومة هي مقياس نسبي يمكن اشتقاقه من المقارنة بين التراكيب الوراثية المختلفة، فإن أصناف المقارنة القياسية تكون ضرورية في كل اختبارات التقييم لصفة المقاومة. وإضافة إلى ذلك، يسهل الصنف المقاوم القياسي تعريف التراكيب الوراثية ذات المستويات الفائقة من المقاومة تجاه نيماتودا تعقد الجذور (التي تحتوي على مستويات من المقاومة أعلى من تلك الموجودة في الصنف القياسي). وأخيراً، يجب إعادة اختبار السلالات التي تظهر صفة المقاومة تجاه نيماتودا تعقد الجذور في البيت الزجاجي مرة أخرى في حقول ملوثة طبيعياً بتلك النيماتودا وفي ظروف بيئية مختلفة.

المختبر وغرفة النمو Laboratory and Growth Chamber

بالرغم من إمكانية التعرف على التراكيب الوراثية المقاومة تحت الظروف التجريبية في المختبر، فإن هذه الاختبارات تتطلب عمالة مكلفة، كما أنها تحد من عدد التراكيب الوراثية التي تدخل في الاختبار. ولذلك، اقترحت طريقة بديلة للتغلب على تلك العيوب، وهي طريقة استزراع القطع الجذرية على البيئات الصناعية Root explant culture (Haroon *et al*., 1993). أما طريقة التقييم تجاه نيماتودا تعقد الجذور باستخدام مزارع الأنسجة، فالبرغم من أنها لا تتطلب حيزاً كبيراً كما هو الحال في اختبارات البيوت الزجاجية، إلا أنها طريقة غير عملية في حالة برامج التربية التي تتطلب اختبار عدد كبير من التراكيب الوراثية. وللتغلب على تلك المشكلة، يمكن إجراء اختبار التراكيب الوراثية لصفة المقاومة في أكياس بلاستيكية شفافة Transparent growth pouches (Fassuliotis and Omwega *et al*., 1988 ؛ Corley, 1967) وتسمح هذه الطريقة بتقييم تكاثر النيماتودا على النباتات بطريقة غير مدمرة للجذر، ومن ثمَ تسمح بتنمية وإكثار النباتات المقاومة بعد التأكد من مقاومتها. وتنمو النباتات في الأكياس البلاستيكية الشفافة في غرف النمو تحت ظروف متحكم بها، وتصبغ أكياس البيض على الجذور بصبغة الإيريوجلايوسين Erioglaucine ليسهل عدّها.

قواعد التقييم في البيوت الزجاجية Glasshouse Screening Protocols

قواعد جامعة جورجيا لتقييم فول الصويا

University of Georgia soybean screening protocols

تم تطوير برنامج تحسين فول الصويا في جامعة جورجيا الأمريكية ليكون قادراً على اختبار أكثر من ١٣٠٠ تركيباً وراثياً تجاه نيماتودا تعقد الجذور على مدار عام واحد تحت ظروف البيت الزجاجي. وفي هذا الاختبار، يتم زراعة ثلاث بذور من كل تركيب وراثي في أوعية الزراعة Cone-tainer™ موديل (LD-UV Sc-10) بعد ملئها إلى ما قبل حافتها بحوالي ٥ سم بتربة طينية رملية معاملة بمبيد مدخن، ثم تغطية كل وعاء بحوالي ٢,٥ سم من الرمل المعامل بمبيد مدخن. وفي نفس الاختبار، يتم زراعة عشرة أوعية Cone-tainer™ بصنف قابل للإصابة قياسي، وعشرة أخرى بصنف مقاوم قياسي. تسع الصينية RL-98 tray ٤٩ وعاءً في صفوف، وتتم الزراعة في صف من الأوعية، ويترك الصف الآخر. توضع الصواني (٤٥ صينية) على طاولة داخل البيت المحمي تحت مصدر إضاءة مزود بمصابيح هالوجينية بقدرة ٤٠٠ واط، وتروى بنظام ري أوتوماتيكي. وبعد سبعة إلى عشرة أيام من الزراعة، يتم تخفيف البادرات إلى بادرة واحدة بكل وعاء، ثم يتم التلقيح بنيماتودا تعقد الجذور بواقع ٣٠٠٠ بيضة من البيض المستخلص بطريقة هيبوكلوريت الصوديوم ٠,٥٢٥٪، وذلك بإضافة ٣ – ٥ مل من معلق البيض (تبعا لتركيز معلق البيض المطلوب) في حفرتين أو ثلاث حفرات في التربة حول ساق النبات باستخدام مضخة التوزيع الرقمية (الشكل رقم ٣,٢). تروى النباتات يدوياً رياً خفيفاً لمدة يوم أو يومين بعد العدوى قبل استخدام نظام الري الأوتوماتيكي.

وبعد ٣٠ يوماً من العدوى، يؤخذ المجموع الجذري لنباتين من كل من الصنفين المقاوم والقابل للإصابة القياسيين، ويتم فحصهما لتحديد وقت إنهاء التجربة. وعند التقييم للمقاومة أو القابلية للإصابة، يتم قطع المجموع الخضري للنباتات، وترفع الجذور برفق من أوعية الزراعة، وتغسل من التربة. أما إذا كانت هناك رغبة في تنمية التراكيب الوراثية فائقة المقاومة لاستخدامها في إنتاج البذور أو التهجينات، فإنه يتم الحفاظ على المجموع الخضري دون قطعه، وتنقل تلك النباتات إلى أصص أكبر حجماً بعد تسجيل عدد وحجم العقد الجذرية على جذورها. بعد ذلك يتم الاستمرار في تقييم الاختبار، وذلك بعدِّ العقد النيماتودية على الجذور وتقدير دليل العقد الجذرية على المقياس ١ – ٥، حيث : ١= أقل من عشر عقد/نبات، و٥= أكثر من ٩٠ عقدة/نبات). أيضاً يتم اختبار النسل الناتج من التهجينات الحديثة كل عام في ثلاث دورات من الاختبارات. ويتم أيضاً إعادة اختبار مقاومة أجيال الانعزالات الأولى من التهجينات لنيماتودا تعقد الجذور. وفي هذه الحالة، يكفي استخدام مكررين من كل صنف. وبعد دورتين من الاختبارات يتم استبعاد التراكيب الوراثية القابلة للإصابة، ويتم إعادة اختبار مقاومة التراكيب الوراثية التي أظهرت مقاومة لنيماتودا تعقد الجذور في أصص بواقع ثلاث مكررات لكل تركيب وراثي، كما يتم اختبارها في الحقل كذلك. وفي نفس الوقت، يتم تقييم الأداء المحصولي لهذه السلالات في الحقل.

قواعد اختبار أصناف البطاطس الهولندي (CPRO-DLO)

CPRO-DLO Wageningen, the Netherlands, potato screening protocol

يركز برنامج اختبار المقاومة في أصناف البطاطس لنيماتودا تعقد الجذور *M. chitwoodi*، و*M. fallax*، و*M. hapla* بصفة أساسية على اختبار عدد كبير من نباتات البطاطس المأخوذة من آباء برية على مدار عام في البيت الزجاجي (Janssen *et al.*, 1996). ونظراً لأن هذه الأنواع من نيماتودا تعقد الجذور تكون عقداً صغيرة جداً على جذور البطاطس أو لا تكونها بالمرة، فإن التقييم يعتمد أساساً على عدد كتل البيض على الجذور. وللحصول على توقيت دقيق ومستوى كافٍ للعدوى، تستخدم يرقات الطور الثاني للنيماتودا كلقاح بدلاً من البيض. وتزرع البذور في تربة إنبات Germination soil (خليط من التربة والرمل الفضي Silver sand)، ثم تشتل البادرات بعد أسبوع من الإنبات إلى سلسلة من الأنابيب البلاستيكية ذات الأبعاد ٤×٤×١٥ سم (٢٤٠ سم^3) المملوءة برمل فضي رطب يضاف إليه عناصر سمادية من النيتروجين والفوسفور والبوتاسيوم NPK (إنتاج شركة Osmocote; Scott-Sierra Horticutlural Products Co. بمدينة ماريزفيل Marysville بولاية أوهايو الأمريكية). توضع الأنابيب بعد ذلك في أوعية على الطاولات في بيت زجاجي مضبوط درجة الحرارة (٢٢±٢°م). ويجب أن يحتوي كل اختبار أيضاً على صنفين؛ أحدهما مقاوم، والآخر قابل للإصابة، قياسيان. بعد نمو النباتات واشتداد عودها (بعد ٢–٣ أسابيع عادة)، يتم تلقيحها بحوالي ١ مل من معلق يحتوي ٤٠٠ يرقة طور ثانٍ حديثة الفقس/نبات، توضع في التربة حول قاعدة ساق النبات بواسطة محقن أوتوماتيكي. ونظراً لحساسية كل من النبات والنيماتودا للري الزائد، فإنه يجب الانتباه والاعتدال في الري في الأسبوعين الأولين بعد التلقيح.

بدءاً من الأسبوع السابع بعد العدوى، يتم تحرير الجذور من التربة وتغسل برفق، ثم يتم صبغ كتل البيض على الجذور بواسطة محلول صبغة الفلوكسين ب. يتم عادة اختبار النباتات المقاومة باستخدام الشتلات مباشرةً أو بتنمية الشتلات لإنتاج الدرنات، ثم يعاد اختبار النباتات الناتجة من الدرنات بنفس الطريقة، وذلك بأخذ قطع صغيرة من الدرنات تحتوي على العيون وزراعتها مباشرة في الأنابيب. وقد أثبت اختبار الأنابيب المربعة فائدته في توفير المساحات، ولكن من عيوبه أن المدادات Stolons تنمو من الأنبوبة إلى الأنابيب المجاورة، الأمر الذي يؤدي إلى تلوث تلك الأنابيب.

الحقل Field

يمكن أيضاً اختبار مقاومة السلالات في قطع التجارب الحقلية Field plots، ولهذه الطريقة أيضاً مميزاتها وعيوبها. وقد يكون الاختبار الحقلي مناسباً لتقييم السلالات المتطورة ولكن ليس للاختبارات الأولية لتعريف مصادر المقاومة، حيث تكون الكثافة العددية للنيماتودا في التربة غير متساوية في الحقل. ولكن اختبارات الحقل قد تكون مفيدة في إمكانية الحصول على النتائج المحصولية ومؤشرات النمو النباتية. ويمكن العمل على توزيع التلوث

بنيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne* spp. في الحقل بطريقة أكثر تجانساً، وذلك بزراعة صنف قابل للإصابة لمدة موسم أو موسمين قبل إجراء الاختبار المطلوب. أما بالنسبة للاختبارات التي تحتاج إلى مساحات صغيرة (٠,١ — ٠,٥ هكتار) فمن الممكن أن تجرى العدوى الصناعية للتربة بمستوى اللقاح المطلوب. ومن التجارب الناجحة في ذلك، ما تم في أحد برامج اختبار أصناف القطن تجاه نيماتودا تعقد الجذور التي أجراها ستار J.L. Starr بجامعة Texas A&M بأمريكا، حيث تمت إضافة تربة شديدة التلوث بالنيماتودا وقطع جذور نباتية مصابة، تم جمعها من مزارع بيوت زجاجية، إلى خطوط الزراعة بالحقل. وقد تمت هذه الإضافة بطريقة يدوية، ثم تم خلطها في الطبقة السطحية من التربة حتى عمق ١٥ سم بواسطة جهاز محراث دوار قبل الزراعة مباشرةً. ويمكن أيضاً أن تستخدم طريقة أخرى عوضاً عن ذلك، وهي أن يستخلص بيض نيماتودا تعقد الجذور من مزارع البيوت الزجاجية كما تم وصفه سابقاً، ثم إضافة هذا البيض إلى بيئة آجار ٠,١٪ وإضافته إلى خطوط الزراعة (قبل أو بعد الزراعة) باستخدام جهاز إضافة الأسمدة السائلة بالطبقة السطحية من التربة حتى عمق ١٥ سم. ويساعد الآجار ٠,١٪ على بقاء بيض النيماتودا معلقاً وعدم الاحتياج إلى تقليبه أثناء عملية التلقيح. وهذه الطريقة تشابه تماماً عملية حقن المبيدات المدخنة. وفي كلتا الطريقتين السابقتين، تتم إضافة ٤٠٠٠ بيضة نيماتودا لكل متر من الخطوط باستخدام جهاز إضافة الأسمدة.

وتعد طريقة الزراعة في مجاميع Hill planting بحيث توضع البذور في مجاميع بدلاً من وضعها في صفوف أو خطوط، طريقة فعالة وجيدة لاختبارات التقييم الحقلية. وتتفاوت مسافات الزراعة بين المجاميع تبعاً لطبيعة نمو النبات. وكما في اختبارات البيوت الزجاجية، يجب أيضاً أن يتضمن الاختبار صنفين قياسيين أحدهما مقاوم والآخر قابل للإصابة. ويتم تقييم مقاومة الأصناف لنيماتودا تعقد الجذور باستخدام دليل التعقد Gall index (الشكل رقم ٣,٣) و/أو المقارنة بين الأعداد النهائية للنيماتودا.

وبسبب التغير في الكثافة العددية الابتدائية للنيماتودا في الحقل، نجد أنه من الصعب أن يكون لدينا معاملة للمقارنة Control أو مكررات متساوية في الكثافة العددية للنيماتودا لكل سلالة نباتية يتم اختبارها. وتعد التصاميم الإحصائية التقليدية مثل: تصميم القطاعات العشوائية الكاملة، والمربع اللاتيني مناسبة جداً لاختبارات التقييم الحقلية. ويساعد التصميم الشبكي Lattice design حيث يمكن تقسيم القطعة التجريبية إلى قطع أصغر، في قياس التغيرات التي تحدث داخل القطع التجريبية نفسها. وقد يكون الحل المميز لمشكلة التغير في الكثافة العددية الابتدائية للنيماتودا في الحقل هو تقسيم السلالات النباتية المراد اختبارها إلى مجموعات تحتوي كل منها على ثماني سلالات بالإضافة إلى صنف مقاوم وآخر قابل للإصابة قياسيين (Kappelman and Bird, 1981)، ثم تكرر هذه المجموعة ذات العشرة تراكيب وراثية أربع أو ست مرات في كل اختبار. وبناءً عليه، فلو أننا نقوم بتقييم ٣٢ سلالة نباتية، فسوف

يكون لدينا أربعة مجموعات، تحتوي كل منها على صنفيها القياسيين. تزرع المجموعات بطريقة عشوائية باستخدام تصميم القطاعات العشوائية الكاملة. وعند تحليل النتائج، يتم تقييم كل مجموعة على حدة. ويضمن هذا الإجراء في الاختبارات الحقلية الكبيرة أن تتم مقارنة كل سلالة تجريبية إلى المقارنات المناسبة التي تمت زراعتها في ظروف طبيعية مقاربة تماماً لظروف هذه السلالة. ومن ثمَ يمكن الحد قدر الإمكان من تأثير التغيرات في الكثافة العددية الابتدائية للنيماتودا بالتربة وكذلك التغيرات في طبيعة التربة.

الانتخاب باستخدام الدلائل الجزيئية Marker-Assisted Selection

دخلت –حديثاً– تقنيات البيولوجيا الجزيئية برامج التربية لصفة المقاومة تجاه نيماتودا تعقد الجذور. ويساعد الانتخاب باستخدام الدلائل الجزيئية في تقليص الوقت الذي تستهلكه عملية إكثار النيماتودا لاستخدامها في التلقيح، والسماح بتحليل الأنسجة النباتية الصغيرة، كما أنه اختبار غير مدمر للنباتات وأكثر فاعلية وواقعية من اختبارات التقييم باستخدام النيماتودا، لكونه طريقة مباشرة لانتخاب الجينات التي تتحكم في صفة المقاومة. وإضافة إلى ذلك، فالانتخاب باستخدام الدلائل الجزيئية يفيد في سرعة وفاعلية إدخال جينات المقاومة من الأنواع النباتية البرية أو غير المستزرعة إلى الأصناف التي يجرى تطويرها أو تحسينها، وكذلك في بناء Pyramiding جينات المقاومة في الأصناف للحصول على مقاومة متعددة ثابتة. وفي الطماطم، يرتبط جين المقاومة *Mi* تجاه نيماتودا تعقد الجذور *M. incognita*، و*M. javanica*، و*M. arenaria* بالموقع الجيني المسؤول عن إنزيم acid phosphatase-1 (*Aps-1*)، وتعرف التراكيب الوراثية المقاومة عن طريق تقييم الأليل المقابل للموقع *Aps-1* كدليل مشابه إنزيمي (Rick and Fabes, 1974). وبذلك قد تكون هذه الطريقة هي أول استخدام عملي للانتخاب باستخدام الدلائل الجزيئية لصفة المقاومة تجاه النيماتودا.

تم أيضاً استثمار ظاهرة تعدد أشكال Polymorphism الحامض النووي DNA في عملية الانتخاب باستخدام الدلائل الجزيئية في برامج التربية لصفة المقاومة تجاه النيماتودا. وقد استخدمت تقنيات البيولوجيا الجزيئية بأنواعها مثل: تقنية تقطيع الحامض النووي DNA باستخدام إنزيمات القطع المقيد (RFLP)، وتقنية التضاعف العشوائي لقطع الحامض النووي DNA متباينة الأطوال (RAPD)، وتقنية تضاعف قطع الحامض النووي DNA متباينة الأطوال (AFLP)، وتقنية التتابعات البسيطة المتكررة SSR (Microsatelite) في توسيع مفهومنا لصفة المقاومة تجاه نيماتودا تعقد الجذور، وتطوير أصناف مقاومة تجاه العديد من أنواع المحاصيل (Staub *et al.*, 1996). وقد تم استبدال دليل المشابه الإنزيمي للموقع *Aps-1* المستخدم في اختبار البحث عن الجين المسؤول عن صفة المقاومة في الطماطم تجاه نيماتودا تعقد الجذور بطريقة التوصيف التتابعي لقطع الحامض النووي DNA المكبرة (SCAR) المشتقة من تقنية

التضاعف العشوائي لقطع الحامض النووي DNA متباينة الأطوال (RAPD)، وذلك لأن تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR التي تستخدم فيها هذه التقنيات هي تقنية سهلة ويمكن إجراؤها باستخدام قطع صغيرة من الأنسجة النباتية (Williamson *et al.*, 1994). وتعد صفة المقاومة تجاه نيماتودا تعقد الجذور في فول الصويا صفة كمية ومحكومة بعدد من الجينات، وقد ساعدت تقنية تقطيع الحامض النووي DNA باستخدام إنزيمات القطع المقيد (RFLP) في تعريف مواقع الصفات الكمية Quantitative trait loci (QTL) التي تمنح صفة المقاومة تجاه نيماتودا تعقد الجذور *M. incognita*، و*M. javanica*، و*M. arenaria* (Tamulonis *et al.*, 1997a,b,c). وتعد تقنية التتابعات البسيطة المتكررة (SSR) طريقة مساعدة يمكن بواسطتها اختبار عدد كبير من التراكيب الوراثية (Staub *et al.*, 1996). وتستخدم تقنية التتابعات البسيطة المتكررة (SSR) المرتبطة مع موقعين من مواقع الصفات الكمية QTL المسؤولة عن صفة المقاومة تجاه نيماتودا تعقد الجذور *M. incognita* في عملية الانتخاب لصفة المقاومة تجاه نيماتودا تعقد الجذور *M. incognita* في فول الصويا، وذلك للإسراع من تطوير أصناف مقاومة لنيماتودا تعقد الجذور (Li *et al.*, 2001). تم أيضاً تعريف دلائل جزيئية مرتبطة بصفة المقاومة تجاه نيماتودا تعقد الجذور في الفول السوداني (Burow *et al.*, 1996 ؛ Garcia *et al.*, 1996 ؛ Church *et al.*, 2000)، والتبغ (Yi *et al.*, 1998)، والقمح (Barloy *et al.*, 2000)، والخوخ (Lu *et al.*,1998)، والبطاطس (Brown *et al.*, 1996 ؛ Van der Voort *et al.*, 1999). وكلما تم تطوير الخرائط الجزيئية للمزيد من المحاصيل، زاد التعرف على دلائل جزيئية للحامض النووى DNA مرتبطة بجينات المقاومة تجاه نيماتودا تعقد الجذور. وسوف يعتمد تحوير تقنيات الدلائل الجزيئية لاختبارات تقييم صفة المقاومة على النطاق الواسع على كل من القيمة النسبية للتكاليف، والوقت الذى تتطلبه كل تقنية. وبتعبير أوضح، كلما أمكن استخدام تقنيات الدلائل الجزيئية للحامض النووى DNA في تقييم أعداد أكبر من التراكيب الوراثية في إطار تكاليف معقولة، أصبح للانتخاب المبني على الأسس الجزيئية دوراً معنوياً في برامج التربية لصفة المقاومة تجاه النيماتودا وتحسين الأصناف المحصولية. وسوف تتم مناقشة دور الانتخاب المبني على الدلائل الجزيئية في برامج تربية أصناف فول صويا مقاومة لنيماتودا حوصلات فول الصويا في الفصل الثاني عشر.

توارث صفة المقاومة تجاه نيماتودا تعقد الجذور
Genetics of Root-Knot Resistance

فول الصويا Soybean

توجد صفة المقاومة تجاه نيماتودا تعقد الجذور *M. incognita*، و *M. javanica*، و*M. arenaria* في العديد من أصناف فول الصويا. وتعد الأصناف شديدة المقاومة للنوع *M. incognita* أكثر عدداً من تلك المقاومة للنوعين *M. javanica* و*M. arenaria*، كما أن هناك عدة أصناف مقاومة للأنواع الثلاثة أو لنوعين منها على الأقل

(Hussey *et al*., 1991). وتُحكم صفة المقاومة الجزئية تجاه النوع *M. incognita* في الصنف "Forrest" بواسطة جين تراكمي مفرد وهو الجين *Rmi1* (Luzzi *et al*., 1994a). وقد تم تعريف مدخلات من فول الصويا ذات مستويات أعلى من المقاومة تجاه الأنواع الثلاثة المذكورة من نيماتودا تعقد الجذور مقارنة بالأصناف المستزرعة المعروفة من التراكيب الوراثية لفول الصويا (Luzzi *et al*., 1987a). وقد تمت دراسة كيفية توارث صفة المقاومة تجاه نيماتودا تعقد الجذور في مدخلين من المدخلات النباتية، ووجد أن هذه الصفة محكومة بجين واحد للمقاومة في كل من المدخلين (Luzzi *et al*., 1994b ،Luzzi *et al*., 1995a ،Luzzi *et al*., 1995b). كما تحتوي معظم المدخلات النباتية على جينات مقاومة متميزة، وهي التي إذا أمكن أهرمتها في أصناف فول الصويا، ربما تعطينا مقاومة أكثر لنيماتودا تعقد الجذور.

الطماطم Tomato

يعد الجين *Mi* المسؤول عن صفة المقاومة تجاه نيماتودا تعقد الجذور في الطماطم أكثر جينات المقاومة استخداماً في أبحاث المقاومة تجاه نيماتودا تعقد الجذور. وهذا الجين هو جين مفرد سائد يقع على الكروموسوم رقم ٦ فوق دليل المشابه الإنزيمي *Aps-1*، وقد تم الحصول عليه من نوع الطماطم البري *L. peruvianum*، ويوجد حالياً في العديد من أصناف الطماطم المستحدثة. والجين *Mi* هو جين فعال للمقاومة تجاه نيماتودا تعقد الجذور؛ *M. incognita*، و*M. javanica*، و*M. arenaria*، ولكن مقاومته تنكسر إذا ارتفعت درجة الحرارة عن ٢٨ °م. بل لقد تم العثور على بعض السلالات الحقلية من النيماتودا التي يمكنها أيضاً كسر مقاومة هذا الجين، والتي ظهرت نتيجة للضغط الانتخابي تجاه صفة الشراسة الإمراضية، كما ظهرت بعض السلالات الحقلية من النيماتودا أيضاً التي يمكنها إصابة أصناف تحتوي على الجين *Mi* طبيعياً دون التعرض لأية ضغوط انتخابية (Roberts and Thomason, 1989). ونظراً لذلك، يتم البحث من جديد عن جينات أخرى مقاومة لنيماتودا تعقد الجذور، وحتى الآن لم يتم العثور على أيٍّ من هذه الجينات سوى في مجموعة من الطماطم البرية *L. peruvianum*. وقد تم تسمية الجينات الجديدة من الجين *Mi* بالمسميات *Mi*-2 .... إلى *Mi*-8 التي تعبر عن أطياف مختلفة من الفاعلية تجاه عزلات نيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne* spp. التي تتغلب على الجين *Mi*، وكذلك تجاه الحساسية لدرجات الحرارة المرتفعة (Williamson, 1998 ؛ Vermis and Roberts, 1996b ؛ Vermis and Roberts, 1996a ؛ Yaghoobi *et al*., 1995).

تم استنساخ الجين *Mi* بعد أبحاث وجهود مكثفة بواسطة العديد من المختبرات (Williamson *et al*., 1998)، وهذا الجين يعطي الشفرة لعدد من بروتينات المقاومة النباتية التي تتميز بوجود موقع ارتباط نيوكليوتيدي ومنطقة متكررة غنية بالحامض الأميني ليوسين وذات طرف كربوكسيلي (Williamson, 1998). ولقد اكتشف أن الجين *Mi* يمنح أيضاً صفة المقاومة تجاه حشرة منّ البطاطس (Rossi *et al*., 1998). ويعد ذلك هو الاكتشاف الأول لجين نباتي

يتحكم في صفة المقاومة تجاه آفتين مختلفتين، وسوف تسفر الأبحاث المستقبلية عن بصائر قيمة في ميكانيكية التمييز والاستجابة لصفة المقاومة.

البطاطس Potato

أوضحت الدراسات أن أغلب المشاكل الخطيرة التي تسببها نيماتودا تعقد الجذور لمحصول البطاطس في أمريكا وأوروبا تعود إلى ثلاثة أنواع من هذه النيماتودا هي: *M. chitwoodi*، و*M. fallax*، و*M. hapla*. ويبدو أن صفة المقاومة تجاه هذه الأنواع الثلاثة من النيماتودا غير موجودة في أصناف البطاطس المستزرعة في الوقت الحالي، بينما تم تعريف هذه الصفة في جنس *Solanum* البري (Janssen *et al*., 1996 ؛ Brown *et al*., 1994). وتعتمد صفة المقاومة في النوع *S. bulbocastanum* على جين مفرد سائد هو الجين *Rmc1* الذي يقع على الكروموسوم رقم ١١ (Brown *et al*., 1996)، وهو جين فعال تجاه الأنواع الثلاثة من نيماتودا تعقد الجذور التي تم ذكرها سابقاً. وقد تم تعريف جين مفرد سائد آخر هو الجين *Rmc2* في النوع *S. fendleri*، وهو فعال فقط تجاه النوعين: *M. chitwoodi*، و*M. fallax*. أما الأنواع الأخرى من الجنس *Solanum* مثل: *S. hougasii*، و*S. stoloniferum*، و*S. chacoense* فتحتوي على عدة جينات مقاومة بعدة مستويات مختلفة من المقاومة، وكذلك تختلف في طريقة توارث صفة المقاومة في كل منها (Janssen *et al*., 1997a). وبالرغم من ذلك، فقد لوحظت بعض العزلات للنوعين *M. chitwoodi*، و*M. hapla* تتميز بصفة الشراسة الإمراضية على بعض المصادر المقاومة من الجنس *Solanum*. وبصفة خاصة، هناك عدد من مصادر المقاومة تجاه النوع *M. hapla* وجد أنها تختلف في رد فعلها المقاوم تجاه السلالات المختلفة من هذا النوع (Van de Breek *et al*., 1998 ؛ Janssen *et al*., 1996).

تم أيضاً اكتشاف صفة المقاومة تجاه أنواع نيماتودا تعقد الجذور؛ *M. incognita*، و*M. javanica*، و*M. arenaria* في النوع البرى *S. sparsipilum*، ويبدو أن هذه الصفة تعتمد على بضعة جينات (Gomez *et al*., 1983). وقد وجد أيضاً أن المقاومة التي تم تعريفها تجاه الأنواع *M. chitwoodi* ، و*M. fallax*، و*M. hapla* ليست فعالة تجاه أنواع نيماتودا تعقد الجذور التي توجد في المناطق المدارية.

محاصيل أخرى Other Crops

أوضحت اختبارات التقييم وجود مصادر للمقاومة تجاه نيماتودا تعقد الجذور في العديد من المحاصيل. وقد نجحت عمليات نقل جينات المقاومة من هذه المصادر إلى الأصناف التجارية أو المستزرعة. وإلى جانب الأمثلة التي تم ذكرها من قبل، هناك محاصيل اقتصادية هامة أخرى تمتلك صفة المقاومة تجاه نيماتودا تعقد الجذور

Meloidogyne spp. مثل: البرسيم الحجازى، والفول، والفاصوليا، والجزر، والقطن (انظر اللوحة الملونة رقم ٨) واللوبيا، والفول السودانى (اللوحة الملونة رقم ٣)، والفلفل، والبرقوق، والتبغ، والقمح. وفي مجال تربية النبات، يتجه التفضيل دائماً وبقوة تجاه صفة المقاومة السائدة بسيطة التوارث، وخاصة عندما يكون مصدر المقاومة تركيباً وراثياً لا يمكن تحسينه، أو نوعاً برياً من النباتات يتطلب عدة تهجينات رجعية مع الصنف المزروع حتى يمكن تطويره. أيضاً، فإن صفة المقاومة المتنحية تعقد وتعوق إجراء التهجينات الرجعية. وكمثال على ذلك، وجد أن صفة المقاومة تجاه نيماتودا تعقد الجذور *M. hapla* في الجزر تحكم بجينين متنحيين (Wang and Goldman, 1996). ونظراً لأن كل أصناف الجزر حتى الآن هي في الأساس عبارة عن هجن، فإن برنامج التهجين الرجعي يكون ضرورياً للسلالات داخلية التربية ذات النسل الضخم في كل جيل حتى تصبح صفة المقاومة جاهزة للانتخاب. وقد يعطي البحث عن مصادر مقاومة أخرى نتائج أكثر فاعلية. وهناك تهديد قوي يهدد استخدام صفة المقاومة البسيطة التوارث وهو أن طيف فاعليتها محدود. ومن هنا تنشأ مخاطرة انتخاب عزلات شرسة من النيماتودا. وعموماً، توضح خبرات التعامل مع جينات المقاومة المفردة تجاه نيماتودا تعقد الجذور في البرقوق والطماطم أن صفة المقاومة تبقى مفيدة وفعالة في مساحات كبيرة بالرغم من ظهور بعض العزلات الشرسة في بعض المواقع (Roberts, 1992). وبالمقارنة مع صفة المقاومة وحيدة الجينات تجاه الفطريات التي تصيب المجموع الخضري حيث يكون هذا التهديد شائعاً، فإن المقاومة تجاه النيماتودا تكون عادةً أطول عمراً بسبب طول فترة الجيل والبطؤ في الانتشار. بل إن الفقد في صفة المقاومة تجاه النيماتودا يعود في معظم الحالات إلى الانتخاب داخل العشائر الحقلية أكثر منه إلى عمليات التطفر. ويمثل انتشار التلوث بالعزلات والأنواع الأخرى من نيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne* spp. خطراً آخر لاستخدام صفة المقاومة الثابتة يفوق في خطره عملية الضغط الانتخابى لصفة الشراسة الإمراضية.

الشراسة والقدرة الإمراضية لنيماتودا تعقد الجذور
Root-Knot Nematode Virulence and Pathogenicity

التغير داخل الأنواع Intraspecific Variation

يمكن التعبير عن التغير داخل أنواع نيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne* spp. بالتفاعل الحادث بين النبات والنيماتودا في ثلاث مستويات هي: تفاعل غير عائل Non host، وتفاعل عدواني Aggressiveness، وتفاعل الشراسة الإمراضية Virulence. وفي هذا السياق، يكون النبات إما غير عائل Non-host، أو عائلاً فقيراً Poor host، أو عائلاً جيداً Good host لهذا النوع من النيماتودا، أو لتلك المجموعة من العزلات داخل النوع الواحد من النيماتودا. وقد تم وصف الاختلافات في المدى العوائلي التي تؤدي إلى وجود السلالات بالنسبة للأنواع: *M. incognita*، و*M. arenaria* (Sasser, 1980)، و*M. chitwoodi* (Mojtahedi *et al.*, 1988). أما بالنسبة

للأنواع الأخرى مثل: *M. hapla*، و*M. javanica*، على سبيل المثال، فقد لوحظت اختلافات في مداها العوائلي أيضاً، ولكن هذه الاختلافات لم تؤد إلى تصنيف تحت أقسام محددة. أما صفة العدوانية Aggressiveness فتعكس القدرة التكاثرية للنيماتودا على العوائل القابلة للإصابة سواء الفقيرة أو الجيدة منها، بينما صفة الشراسة الإمراضية Virulence هي القدرة على التكاثر على العائل المقاوم. وترتبط الصفة الأولى ببعض عوامل القدرة العامة، بينما تتعلق الصفة الثانية بالتداخل بين جين الشراسة الإمراضية في الطفيل وجينات المقاومة في العائل. وفي الحقيقة، تتداخل هذه المستويات مع بعضها نتيجة لعدم توفر المعلومات حول الخلفية الوراثية لكل من: النيماتودا، والنبات، ربما في وجود العزلات الخليطة من النيماتودا في الحقل، وعدم اتفاق المعلومات المرجعية.

توراث صفة الشراسة الإمراضية Genetics of Virulence

تتعلق معظم المعلومات المتوفرة حول صفة الشراسة الإمراضية لنيماتودا تعقد الجذور بجين المقاومة *Mi* في الطماطم. وفي الخمسينيات من القرن الماضي، لوحظ ظهور عزلات من أنواع نيماتودا تعقد الجذور؛ *M. incognita*، و *M. javanica*، و*M. arenaria* قادرة على كسر صفة المقاومة في النباتات المقاومة وسميت هذه العزلات بالسلالات ب B-races (Riggs and Winstead, 1959). وإضافة إلى تطور صفة الشراسة الإمراضية تحت الظروف الانتخابية، تظهر طبيعياً العشائر النيماتودية القادرة على كسر صفة المقاومة في الحقل، ويتم اكتشافها حتى لو لم تكن هذه العشائر قد تعرضت لأصناف مقاومة (Roberts and Thomason, 1989).

أوضحت نتائج التجارب الانتخابية التي أجريت تحت الظروف المخبرية أن نسبة النيماتودا ذات صفة الشراسة الإمراضية تزداد عقب كل جيل تمضيه النيماتودا في وجود نباتات طماطم مقاومة (Netscher, 1977). ونظراً لأن نيماتودا تعقد الجذور *M. incognita*، و*M. arenaria* ، و*M. javanica* هي أنواع إجبارية التطفل بكرية التكاثر، فإن هناك ميكانيكيات أخرى بخلاف التوافيق الوراثية Genetic recombination لابد وأنها المسؤولة عن صفة الشراسة الإمراضية في هذه الأنواع. وقد افترضت تريانتافيلو Triantaphyllou (1987) أن زيادة معدل التطفر في الجينات الثانوية يؤثر على صفة الشراسة الإمراضية، في حين افترض كاستاجنون- سيرينو وآخرون Castagnone-Sereno *et al.* (1994a) حدوث نظام تعاظم جيني في المناطق الجينية أو الكروموسومات التي تحمل الأليلات التي تتحكم في صفة الشراسة الإمراضية، ولكنهم افترضوا أيضاً ميكانيكيات مختلفة لاكتساب صفة الانتخابات الحقلية وتلك التي تكتسبها في الانتخابات المخبرية. وأن ذلك يعود إلى الاختلافات الملحوظة في ثبات واتساع صفة الشراسة الإمراضية (Castagnone-Sereno *et al.*, 1994b ؛ Roberts *et al.*, 1990).

وحديثاً جداً، أسفرت الدراسات حول صفة الشراسة الإمراضية لنيماتودا تعقد الجذور *M. chitwoodi* على البطاطس البرية *S. fendleri* المقاومة لتلك النيماتودا عن شيء مخالف لما سبق. فالعزلات التي نشأت من كتل البيض المفردة Single egg masses التي تكونت عرضياً على النباتات المقاومة التي تحتوي الجين *Rmc-2* كانت قادرة على التغلب الكامل على النباتات المقاومة التي تحتوي هذا الجين، وأيضاً النباتات الأخرى القريبة أو غير القريبة من الجنس *Solanum* spp.. ومع ذلك، كانت هناك أيضاً بعض الاختلافات بين السلالات النيماتودية في صفة الشراسة الإمراضية. ويبدو أن صفة الشراسة الإمراضية تجاه الجين *Rmc-2* صفة بسيطة التوارث، ولكن يبدو أيضاً أنه لابد من وجود عدة عوامل أخرى للشراسة الإمراضية ليمكن تفسير الأفعال المتغايرة للعزلات النيماتودية على المصادر النباتية الأخرى المقاومة (Janssen *et al.*, 1998).

قواعد اختبارات المقاومة Role in Resistance Screening

هناك عدة اعتبارات يجب الأخذ بها عند اختبار عزلة (أو عزلات) النيماتودا التي سوف تستخدم في اختبار المقاومة، وأولى هذه الاعتبارات هو تحديد المنطقة الزراعية الرئيسية للمحصول أو المنطقة المستهدفة للمقاومة، وثانيها تحديد النوع السائد من نيماتودا تعقد الجذور في هذه المنطقة. ويساعد تحديد كل من هذين العاملين في تحديد الكثافة الابتدائية المثلى لعزلة أو نوع نيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne* spp. التي تستخدم في الاختبار. وفي المرحلة التالية لذلك، يمكن اختبار عزلات أو أنواع أخرى من نيماتودا تعقد الجذور على نباتات مقاومة مختارة كجزء من التقييم. وثالث هذه الاعتبارات هو المعلومات المتاحة حول مصادر المقاومة، ورابعها هو هل توجد محاصيل ذات مقاومة جزئية؟. ويجب ضبط برنامج المقاومة بحيث يمكن اكتشاف النباتات المقاومة للسلالات الشرسة إمراضياً من النيماتودا من بين الأصناف والسلالات المقاومة الموجودة. أما الاعتبار الخامس فهو تحديد هل المقاومة التامة هي المطلوبة أم أن المقاومة الجزئية تكفي؟ وفي محاصيل مثل البطاطس والجزر نجد أن حد الضرر الاقتصادي من النيماتودا منخفض جداً نظراً للتأثير السلبي للنيماتودا على نوعية المحصول قبل التأثير الفعلي في إنتاجيته، وفي هذه الحالة، تكون المقاومة التامة هي المطلوبة.

اختبار المقاومة لخليط من العزلات Screen with Mixture of Isolates

يسمح اختبار المقاومة لخليط من العزلات التي تتبع نوعاً واحداً من نيماتودا تعقد الجذور والتي تم جمعها من مناطق جغرافية مختلفة باكتشاف مدى واسع من المقاومة يمكن استخدامه في نطاق جغرافي واسع. ويفضل هذا الإجراء بصفة خاصة في البرامج الكبرى لاختبار المقاومة، وكذلك عندما لاتتوفر المعلومات حول صفة الشراسة الإمراضية لمجاميع النيماتودا المختبرة إزاء مصادر المقاومة الموجودة. ويجب تجنب خلط العزلات المختلفة للأنواع

المختلفة من نيماتودا تعقد الجذور ما لم تكن هناك رغبة في تطبيق صفة المقاومة تجاه نوع أو نوعين من النيماتودا. وقد استخدم مارول وآخرون Marull *et al.* (1994) خليطاً من عزلات نيماتودا تعقد الجذور ؛ *M. incognita*، و*M. arenaria*، و*M. javanica* ليحصل على مقاومة واسعة تجاه هذه العزلات في أصول البرقوق.

اختبار المقاومة تجاه العزلات عالية القدرة الإمراضية

Screen with Highly Aggressive Isolates

عندما يتم تحديد صفة المقاومة باستخدام خليط من العزلات، فإن تقييم صفة المقاومة يجب أن يتم إنجازه بواسطة عزلات محددة ممرضة من نيماتودا تعقد الجذور. وسوف تكون العزلات عالية القدرة الإمراضية من النيماتودا قادرة على تمييز التراكيب الوراثية النباتية ذات المستويات العالية من المقاومة. ولقد تمت مناقشة الحفاظ على صفتي القدرة الإمراضية Aggressiveness والشراسة الإمراضية Virulence في الجزء الخاص بتداول وإعداد اللقاح.

وفيما يتعلق بالتحليل الوراثي لصفة المقاومة، فإنه من الأفضل استخدام عزلات النيماتودا ذات الأصل الوراثي المحدود، كتلك التي تنشأ من كتل بيض مفردة. ويزداد تعقيد تحليل الانعزال باستخدام خليط من النيماتودا الشرسة وغير الشرسة.

المقاومة النباتية المهندسة وراثياً
Transgenic Plant Resistance

الجينات المهندسة وراثياً والأهداف Transgenic and Targets

هناك عدة إستراتيجيات بيوتكنولوجية لإدخال صفة المقاومة في النباتات كبديل لطرق التربية التقليدية بالتهجينات الرجعية، أو عندما تكون صفة المقاومة مفقودة. ومن هذه الإستراتيجيات: استنساخ Cloning جينات المقاومة الطبيعية ثم نقلها إلى الأصناف مرتفعة القيمة الاقتصادية عن طريق تقنيات الهندسة الوراثية. وحتى الآن، تم استنساخ ثلاثة جينات مقاومة بنجاح وهي: الجين $Hs1^{pro}$ من نبات البنجر البري *Beta procumbens* وهو جين فعال تجاه نيماتودا حوصلات بنجر السكر *Heterodera schachtii* (Cai *et al.*, 1997)، والجين *Gpa2* من البطاطس وهو جين مقاوم لبعض العزلات من نيماتودا حوصلات البطاطس *Globodera pallida* (Van der Vossen *et al.*, 2000)، والجين *Mi* من الطماطم (Williamson, 1999). وأحد أهداف استنساخ جينات المقاومة هو إدخال هذه الجينات في أنواع من المحاصيل التي تتضرر من الإصابة بهذه النيماتودا، ولا تمتلك أية مصادر وراثية للمقاومة (Williamson, 1998). وبالرغم من ذلك، فليس من المؤكد أن الجينات المقاومة سوف تؤدي وظيفتها بفاعلية في الأنواع المحصولية متباينة الزيجوت Heterozygous (Williamson and Hussey, 1996 ؛ Williamson, 1998). كما أن هناك عاملاً محدداً آخر لهذه الإستراتيجية وهو الافتقار إلى الجينات المرشحة لأغراض الاستنساخ. وأخيراً، قد يؤدي

استخدام جينات المقاومة المعلومة إلى الاستغلال المفرط لهذه الجينات، ومن ثمَ إلى ضغط انتخابي قوي لعشائر نيماتودية شرسة كما سبق وصفه.

هناك اقتراح بديل لاستحداث المقاومة وهو إحداث تعارض لعملية استحثاث و/أو تطور مناطق التغذية الضرورية لتطور النيماتودا. ويمكن إنجاز ذلك بتنشيط عمل جينات السمية النباتية التي تثبط إنزيمات مثل: Proteinase وRNase، أو الجينات التي تضعف النشاط الميتابوليزمي بواسطة محفزات عالية التخصص تبدأ عملها بعد العدوى بالنيماتودا (Atkinson *et al*., 1995). وهناك أيضاً إستراتيجية قريبة من ذلك، وهي إنتاج نباتات تحفز جينات عدم الشراسة الإمراضية في الكائن الممرض وجينات المقاومة في النبات نفسه، ويسمى ذلك بالنظام الحساس ذي المكونين، وهو النظام الذي سيكون فعالاً تجاه أي كائن ممرض سواء كان نيماتودا، أو فطراً، أو فيروساً، أو بكتيريا (De Wit, 1992).

هناك أيضاً اقتراح ثالث وهو تزويد النباتات بجينات تعمل على إنتاج مركبات تثبط الطفيل دون أن تؤثر على النبات نفسه. وغالباً ما تكون هذه المركبات بروتينات تتكون في خلايا غدد المريء في النيماتودا، ومن المعروف أن هذه الخلايا تفرز الإفرازات التي تخرج من خلال رمح النيماتودا إلى الأنسجة النباتية أثناء عملية التطفل (Davis *et al*., 2000). ومن أمثلة الجينات التي تستهدف إفرازات النيماتودا تلك الجينات التي تفرز أجساماً مضادة خاصة تنتج سلاسل فردية من الأجسام المضادة لمكونات إفرازات النيماتودا الضرورية جداً للعملية الإمراضية (De Jaegger *et al*., 2000). ويمكن نقل الشفرة التتابعية لبروتينات الجلوبيولينات المسؤولة عن المناعة Immunoglobulins إلى النباتات مما يؤدى إلى تخليق الأجسام النباتية المضادة Plantibodies داخل نسيج النبات العائل وهذه تقوم بمعادلة إفرازات النيماتودا الضرورية لتغذية النيماتودا (Baum *et al*., 1996 ؛ Rosso *et al*., 1996). أما أكثر الإستراتيجيات المضادة للنيماتودا تطوراً حتى الآن فهي استهداف إنزيم بروتينيز الأمعاء Gut protinase بواسطة مثبطات خاصة تعمل على اضطراب الهضم في النيماتودا (Lilley *et al*., 1999). وتستهدف عملية تثبيط إنزيم البروتينيز مكوناً أساسياً في عملية الميتابوليزم الخاصة بالنيماتودا، الأمر الذي يتعارض مع أساسيات التطفل. وكلما تقدمت عملية تعريف جينات التطفل للنيماتودا، أمكن التداخل مع عدة ميكانيكيات أساسية للتطفل في تلك النيماتودا، الأمر الذي يؤدي إلى الحصول على عدة طرق فعالة وثابتة لتطوير نباتات مهندسة وراثياً تحمل صفة المقاومة تجاه النيماتودا (Davis *et al*., 2000).

آمال مستقبلية Prospects

أدت التطورات الحديثة لتقنيات الحامض النووى DNA إلى ظهور طيف واسع من إستراتيجيات المقاومة الحديثة المكملة لطرق الإدارة الوراثية التقليدية لصفة المقاومة. وأكثر هذه الطرق فاعلية هي أهرمة جينات المقاومة تجاه النيماتودا في صنف ما، وهي التي من شأنها أن تعمل على تقليص فرص الانتخاب في النيماتودا تجاه صفة

الشراسة الإمراضية وإنتاج نباتات تمتلك صفة المقاومة العامة تجاه النيماتودا. ولكن، هناك بعض الحواجز الخطيرة التي يجب التغلب عليها قبل استخدام الأصناف المقاومة المهندسة وراثياً في الحقول. وتعتمد بعض إستراتيجيات الدفاع على محفزات عالية التخصص تستطيع التعبير عن نفسها داخل الأنسجة النباتية المصابة بالنيماتودا. كما يجب دراسة التأثيرات البيئية السمية وكافة البنود الأمنية الأخرى قبل السماح لأي صنف مهندس وراثياً بالدخول إلى الأسواق حيث إن العديد من تلك المحاصيل قد أبدت نجاحاً ضئيلاً لعملية التحول الوراثي.

المراجع

References

Atkinson, H.J., Urwin, P.E., Hansen, E. and McPherson, M.J. (1995) Designs for engineered resistance to root-parasitic nematodes. *Trends in Biotechnology* 13, 369-374.

Barloy, D., Lemoine, J., Dredryver, F. and Jahier, J. (2000) Molecular markers linked to the *Aegilops variabilis*-derived root-knot nematode resistance gene *Khn-mn1* in wheat. *Plant Breeding* 119, 169-172.

Baum, T.J., Hiatt, A., Parrot, W.A., Pratt, I.H. and Hussey, R.S. (1996) Expression in tobacco of a functional monoclonal antibody specific to stylet secretion of the root-knot nematode. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9, 382-387.

Boerma, H.R. and Hussey, R.S. (1992) Breeding plants for resistance to nematodes. *Journal of Nematology* 24, 242-252.

Brown, C.R., Mojtahedi, H., Santo, G.S. and Austin-Phillips, S. (1994) Enhancing resistance to root-knot nematodes derived from wild *Solanum* species in potato germplasm. In: Zehnder, G.W., Powelson, M.L., Jansson, R.K. and Raman, K.V. (eds) *Advances in Potato Pest Biology and Management*. APS Press, St Paul, Minnesota, pp. 426-438.

Brown, C.R., Yang, C.P, Mojtahedi, H. and Santo, G.S. (1996) RFLP analysis of resistance to Columbia root-knot nematode derived from *S. bulbocastanum* in a BC_Z population. *Theoretical and Applied Genetics* 92, 572-576.

Burow, M.D., Simpson, C.E., Paterson, A.H. and Starr, J.L. (1996) Identification of peanut (*Arachis hypogaea*, L.) RAPD markers diagnostic of root-knot nematode (*Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood) resistance. *Molecular Breeding* 2, 369-379.

Byrd, D.W., Jr, Ferris, H. and Nusbaum, C.J. (1972) A method for estimating numbers of eggs of *Meloidogyne* spp. in soil. *Journal of Nematology* 3, 378-385.

Cai, D., Kleine, M., Kifle, S., Harloff, H.J., Sandal, N.N., Marcker, K.A., Klein-Lankhorst, R.M., Salentijn, E.M.J., Lange, W., Stiekema, W.J., Wyss, U., Grundler, F.M.W. and Jung, C. (1997) Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugarbeet. *Science* 275, 832-834.

Castagnone-Sereno, P., Wajrberg, E., Bongiovanni, M., Leroy, F. and Dalmasso, A. (1994a) Genetic variation in *Meloidogyne incognita* virulence against the tomato *Mi* resistance gene: evidence from isofemale line selection studies. *Theoretical and Applied Genetics* 88, 749-753.

Castagnone-Sereno, P., Bongiovanni, M. and Dalmasso, A. (1994b) Reproduction of virulent isolates of *Meloidogyne incognita* on susceptible and *Mi*-resistant tomato. *Journal of Nematology* 26, 324-328.

Castagnone-Sereno, P., Leroy, F., Bongiovanni, M., Zijlstra, C. and Abad, P. (1999) Specific diagnosis of two root-knot nematodes, *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*, with satellite DNA probes. *Phytopathology* 89, 380-384.

Church, G.T., Simpson, C.E., Burow, M.D., Paterson, A. H. and Starr, J.L. (2000) Use of RFLP markers for identification of individuals homozygous for resistance to *Meloidogyne arenaria* in peanut. *Nematology* 2, 575-580.

Davis, E.L., Hussey, R.S., Baum, T.J., Bakker, J., Schots, A., Rosso, M.N. and Abad, P. (2000) Nematode parasitism genes. *Annual Review of Phytopathology* 38, 365-396.

De Jaeger, G., De Wilde, C., Eeckhout, D., Fiers, E. and Depicker, A. (2000) The plantibody approach: expression of antibody genes in plants to modulate plant metabolism or to obtain pathogen resistance. *Plant Molecular Biology* 43, 419-428.

De Wit, P.J.G.M. (1992) Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of virulence genes in control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 30, 391-418.

Dickson, D.W. and Strubble, F.B. (1965) A sieving-staining technique for extraction of egg masses of *Meloidogyne incognita* from soil. *Phytopathology* 55, 497.

Ehwaeti, M.E., Phillips, M.S. and Trudgill, D.L. (1998) The viability of *Meloidogyne incognita* eggs released from masses of different ages using different concentrations of sodium hypochlorite. *Nematologica* 44, 207-217.

Eisenback, J.D. and Triantaphyllou, H.H. (1991) Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. In: Nickle, W.R. (ed.) *Manual of Agricultural Nematology*. Marcel Dekker, New York, pp. 191-274.

Esbenshade, P.R. and Triantaphyllou, A.C. (1985) Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 17, 6-20.

Esbenshade, P.R. and Triantaphyllou, A.C. (1986) Partial characterization of esterase in *Meloidogyne* (Nematoda). *Comparative Biochemistry and Physiology* 83B, 31-88.

Esbenshade, P.R. and Triantaphyllou, A.C. (1990) Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 22, 10-15.

Fassuliotis, G. and Corley, E.L. (1967) Use of seed growth pouches for root-knot nematode resistance tests. *Plant Disease Reporter* 51, 482-486.

Fehr, W.R. (1987) *Principles of Cultivar Development*, Vol. 1, *Theory and Technique*. MacMillan Publishing, New York, 536 pp.

Garcia, G.M., Stalker, H.T., Shroeder, E. and Kochert, G. (1996) Identification of RAPD, SCAR, and RFLP markers tightly linked to nematode resistance genes introgressed from *Arachis cardenasii* into *Arachis hypogaea*. *Genome* 39, 836-845.

Gomez, P.L., Plaisted, R.L. and Brodie, B.B. (1983) Inheritance of resistance to *Meloidogyne incognita, M. javanica*, and *M. arenaria* in potatoes. *American Potato Journal* 60, 339-351.

Haroon, S.A., Baki, A.A. and Huettel, R.N. (1993) An *in vitro* test for temperature sensitivity and resistance to *Meloidogyne incognita* in tomato. *Journal of Nematology* 25, 83-88.

Hartman, K.M. and Sasser, J.N. (1985) Identification of *Meloidogyne* species on basis of different host test and perineal-pattern morphology. In: Barker, K.R., Carter, C.C. and Sasser, J.N. (eds) *An Advanced Treatise on Meloidogyne,* Vol. II, *Methodology*. North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, pp. 69-77.

Hussey, R.S. (1985) Host-parasite relationships and associated physiological changes. In: Sasser, J.N. and Carter, C.C. (eds) *An Advanced Treatise on Meloidogyne,* Vol. I, *Biology and Control*. North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, pp. 143-153.

Hussey, R.S. and Barker, K.R. (1973). A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57, 1025-1028.

Hussey, R.S. and Boerma, H.R. (1981) A greenhouse screening procedure for root-knot nematode resistance in soybean. *Crop Science* 21, 794-796.

Hussey, R.S. and Boerma, H.R. (1992) Tolerance in soybean. In: Riggs, R.D. and Wrather, J.A. (eds) *Biology and Management of the Soybean Cyst Nematode*, APS Press, St Paul, Minnesota, pp. 169-182.

Hussey, R.S. and Grundler, F.M.W. (1998) Nematode parasitism of plants. In: Perry, R.N. and Wright, D.J. (eds) *Physiology and Biochemistry of Free-living and Plant-Parasitic Nematodes*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 213-243.

Hussey, R.S., Boerma, H.R., Raymer, P.L. and Luzzi, B.M. (1991) Resistance in soybean cultivars from maturity groups V-VIII to soybean cyst and root-knot nematodes. *Journal of Nematology* 23, 76-583.

Hussey, R.S., Davis, E.L. and Ray, C. (1994) *Meloidogyne* stylet secretions. In: Lamberti, F., De Giorgi, C. and Bird, D.M. (eds) *Advances in Molecular plant Nematology*. Plenum Press, New York, pp. 233-249.

Janssen, G.J.W., Verkerk-Bakker, B., Van Norel, A. and Janssen, R. (1996) Resistance to *Meloidogyne hapla, M. fallax* and *M. chitwoodi* in wild tuber-bearing *Solanum* spp. *Euphytica* 92, 287-294.

Janssen, G.J.W., Van Norel, A., Janssen, R. and Hoogendoorn, J. (1997a) Dominant and additive resistance to root-knot nematodes *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax* in Central American *Solanum* species. *Theoretical and Applied Genetics* 94, 692-700.

Janssen, G.J.W., Van Norel, A., Verkerk-Bakker, B., Bakker, B. and Janssen, R. (1997b) Intra- and interspecific variation of root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., for resistance from wild tuber-bearing *Solanum* spp. *Fundamental and Applied Nematology* 20, 449-457.

Janssen, G.J.W., Scholten, O.E., Van Norel, A., and Hoogendoorn, J. (1998) Selection of virulence in *Meloidogyne chitwoodi* to resistance in the wild potato *Solanum fendleri*. *European Journal of Plant Pathology* 104, 645-651.

Kappelman, A.J. and Bird, L.S. (1981) Indirect selection for resistance to Fusarium wilt-root-knot nematode complex in cotton. *Crop Science* 21, 66-68.

Li, Z., Jakkula, L.R., Hussey, R.S. and Boerma, H.R. (2001) SSR mapping and confirmation of the QTL from PI96354 conditioning soybean resistance to southern root-knot nematode. *Theoretical and Applied Genetics* (in press).

Lilley, C.J., Urwin, P.E. and Atkinson, H.J. (1999) Characterization of plant nematode genes: identifying targets for a transgenic defense. *Parasitology* 11, S63-S72.

Lu, Z.X., Sosinski, B., reighard, G.L., Baird, W.V. and Abbott, A.G. (1998) Construction of a genetic linkage map and identification of AFLP markers for resistance to root-knot nematodes in peach rootstocks. *Genome* 41, 199-207.

Luzzi, B.M., Boerma, H.R. and Hussey, R.S. (1987) Resistance to three species of root-knot nematodes in soybean. *Crop Science* 27, 258-262.

Luzzi, B.M., Boerma, H.R. and Hussey, R.S. (1994a) A gene for resistance to southern root-knot nematode in soybean. *Journal of Heredity* 85, 484-486.

Luzzi, B.M., Boerma, H.R. and Hussey, R.S. (1994b) Inheritance of resistance to southern root-knot nematode in soybean. *Crop Science* 34, 1240-1243.

Luzzi, B.M., Boerma, H.R. and Hussey, R.S. (1995a) Inheritance of resistance to the peanut root-knot nematode in soybean. *Crop Science* 35, 50-53.

Luzzi, B.M., Tamulonis, J.P., Boerma, H.R. and Hussey, R.S. (1995b) Inheritance of resistance to the Javanese root-knot nematode in soybean. *Crop Science* 35, 1372-1375.

Marull, J., Pinochet, J., Felipe, A. and Cenis, J.L. (1994) Resistance verification in *Prunus* selections to a mixture of thirteen *Meloidogyne* isolates and resistance mechanisms of a peach almond hybrid to *M. javanica*. *Fundamental and Applied Nematology* 17, 85-92.

Mojtahedi, H., Santo, G.S. and Wilson, J.H. (1988) Host tests to differentiate *Meloidogyne chitwood* races 1 and 2 and *M. hapla*. *Journal of Nematology* 20, 468-473.

Netscher, C. (1977) Observations and preliminary studies on the occurrence of resistance breaking biotypes of *Meloidogyne* spp. on tomato. *Cahiers ORSTOM Series Biologie* 11, 173-178.

Omwega, C.O., Thomason, I.J. and Roberts, P.A. (1988) A nondestructive technique for screening bean germplasm for resistance to *Meloidogyne incognita*. *Plant disease* 72, 970-972.

Powers, T.O. and Harris, T.S. (1993) A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 25, 1-6.

Rick, C.M. and Fobes, J. (1974) Association of an allozyme with nematode resistance. *Report of the Tomato Genetics Cooperative* 24, 25.

Riggs, R.D. and Winstead, N.N. (1959) Studies on resistance in tomato to root-knot nematodes and on the occurrence of pathogenic biotypes. *Phytopathology* 49, 716-724.

Roberts, P.A. (1992) Current status of the availability, development, and use of host plant resistance to nematodes. *Journal of Nematology* 24, 213-227.

Roberts, P.A. and Thomason, I.J. (1989) A review of variability in four *Meloidogyne* spp. measured by reproduction on several hosts including *Lycopersicon*. *Agricultural Zoology Review* 3, 225-252.

Roberts, P.A., Dalmasso, A., Cap, G.B. and Castagnone-Sereno, P. (1990) Resistance in *Lycopersicon peruvianum* to isolates of *Mi* gene-compatible *Meloidogyne* populations. *Journal of Nematology* 22, 585-589.

Rossi, M., Milligan, S.B., Goggin, F., Kaloshian, I., Ullman, D. and Williamson, V.M. (1998) The nematode resistance gene *Mi* confers resistance to the potato aphid. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95, 9750-9754.

Rosso, M.N., Schouten, A., Roossien, J., Borst-Vrenssen, T., Hussey, R.S., Gommers, F.J., Bakker, J., Schots, A. and Abad, P. (1996) Expression and functional characterization of a single chain FV antibody directed

against secretions involved in plant nematode infection process. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 220, 225-263.

Sasser, J.N. (1980) Root-knot nematodes: a global menace to crop production. *Plant Disease* 64, 36-41.

Sasser, J.N. and Freckman, D.W. (1987) A word perspective on Nematology: the role of the society. In: Veech, J.A. and Dickson, D.W. (eds) *Vistas on Nematology*. Society of Nematologists, Hyattsville, Maryland, pp. 7-14.

Sidhu, G.S. and Webster, J.M. (1981) The genetics of plant-nematode parasitic systems. *The Botanical Review* 47, 387-419.

Smith, P.G. (1944) Embryo culture of a tomato species hybrid. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science* 44, 413-416.

Staub, J.E., Serquen, F.C. and Gupta, M. (1996) Genetic markers, map construction and their application to plant breeding. *Hortscience* 31, 729-741.

Tamulonis, J.P., Luzzi, B.M., Hussey, R.S., Parrott, W.A. and Boerma, H.R. (1997a) RFLP mapping of resistance to southern root-knot nematode in soybean. *Crop Science* 37, 1903-1909.

Tamulonis, J.P., Luzzi, B.M., Hussey, R.S., Parrott, W.A. and Boerma, H.R. (1997b) DNA markers associated with resistance to Javanese root-knot nematode in soybean. *Crop Science* 37, 783-788.

Tamulonis, J.P., Luzzi, B.M., Hussey, R.S., Parrott, W.A. and Boerma, H.R. (1997c) DNA markers analysis of loci conditioning resistance to peanut root-knot nematode in soybean. *Theoretical and Applied Genetics* 95, 664-670.

Taylor, A.L. and Sasser, J.N. (1978) *Biology, Identification and Control of Root-knot Nematodes (Meloidogyne species)*. North Carolina State University, Raliegh, North Carolina, 111 pp.

Taylor, A.L., Dropkin, V.H. and Martin, G.C. (1955) Perineal patterns of root-knot nematodes. *Phytopathology* 45, 26-34.

Triantaphyllou, A.C. (1987) Genetics of parasitism on plants. In:Veech, J. A. and Dickson, D. W. (eds) *Vistas on Nematology*. Society of Nematologists, Hyattsville, Maryland, pp. 354-363.

van der Beek, J.G., Poleij, L.M., Zijlstra, C., Janssen, R. and Janssen, G.J.W. (1998) Variation in virulence within *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla* on *Solanum* spp. *Phytopathology* 88, 658-665.

van der Voort, J.N.A.M.R., Janssen, G.J.W., Overmars, H., Van Zandvoort, P.M., Van Norel, A., Scholten, O.E., Janssen, R. and Bakker, J. (1999) Development of a PCR-based selection assay for root-knot nematode resistance (*Rmc1*) by a comparative analysis of *Solanum bulbocastanum* and *S. tuberosum* genome. *Euphytica* 106, 187-195.

van der Vossen, E.A.G., van der Voort, J.N.A.M.R., Kanyuka, K., Bendahmane, A., Sandbrink, H., Baulcombe, D.C., Bakker, J., Stiekeman, W.J. and Kelin-Lankhorst, R.M. (2000) Homologues of a single resistance-gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: a virus and nematode. *Plant Journal* 23, 567-576.

Veremis, J.C. and Roberts, P.A. (1996a) Relationships between *Meloidogyne incognita* resistance genes in *Lycopersicon peruvianum* differentiated by heat sensitivity and nematode virulence. *Theoretical and Applied Genetics* 93, 950-959.

Veremis, J.C. and Roberts, P.A. (1996b) Identification of resistance to *Meloidogyne javanica* in *Lycopersicon peruvianum* complex. *Theoretical and Applied Genetics* 93, 894-901.

Wang, M. and Goldman, I.L. (1996) Resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne hapla* Chitwood) in carrot is controlled by two recessive genes. *Journal of Heredity* 87, 119-123.

Williamson, V.M. (1998) Root-knot nematode resistance genes in tomato and their potential for future use. *Annual Review of Phytopathology* 36, 277-293.

Williamson, V.M. (1999) Plant nematode resistance genes. *Current Opinion in Plant Biology* 2, 327-331.

Williamson, V.M. and Hussey, R. S. (1996) Nematode pathogenesis and resistance in Plants. *Plant Cell* 8, 1735-1745.

Williamson, V.M., Ho, J.Y., Wu, F.F., Miller, N. and Kaloshian, I. (1994) A PCR-based marker tightly-linked to the nematode resistance gene *Mi* in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 87, 757-763.

Williamson, V.M., Milligan, S.B., Bodeau, J., Yaghoobi, J., Kaloshian, I. and Zabel, P. (1998) The root-knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *Plant Cell* 10, 1307-1319.

Yaghoobi, J., Kaloshian, I., Wen, Y. and Williamson, V.M. (1995) Mapping a new nematode resistance locus in *Lycopersicon peruvianum*. *Theoretical and Applied Genetics* 91, 457-464.

Yi, H.Y., Rufty, R.C., Wernsman, E.A. and Conkling, M.C. (1998) Mapping the root-knot nematode resistance gene (RK) in tobacco with RAPD markers. *Plant Disease* 82, 1319-1322.

Zijlstra, C., Lever, A.E.M., Uenk, B.J. and Van Silfhout, C.H. (1995) Differences between ITS regions of isolates of root-knot nematodes *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. *Phytopathology* 85, 1231-1237.

obeikandl.com