الفصل الخامس

نيماتودا الجنس *Ditylenchus*

Ditylenchus species

R.A. Plowright[1], G. Caubel[2] and K.A. Mizen[3]
[1]*CABI Bioscience, Bekham Lane, Egham, Surry TW20 9TY, UK;*
[2]*INRA, 35653 Le Rheu Cedex, France;*
[3]*Institute of Grassland and Environmental Research, Aberystwyth SY23 3EB, Wales, UK.*

يحتوي الجنس *Ditylenchus* على العديد من الأنواع، ولكن أربعة منها فقط تعد آفات هامة للمحاصيل النباتية وهي: *D. dipsaci* (Kuhn) Filipjev، *D. destructor* Thorne 1945، و*D. angustus* (Butler 1913) Filipjev, 1936، و*D. africanus* Wendt *et al.*, 1995. ويوجد النوع *D. dipsaci* الذي يعرف بنيماتودا السيقان والأبصال في مدى واسع من الظروف البيئية ودرجات الحرارة في المناطق المدارية وتحت المدارية، حيث تساعد الرطوبة الجوية المتوفرة في حدوث الإصابة بالنيماتودا، كما تساعد أيضاً في تكاثر وانتشار النيماتودا. وتعد نيماتودا السيقان والأبصال *D. dipsaci* آفة هامة على كل من: البرسيم الحجازى *Medicago sativa*، والبرسيم الأحمر *Trifolium pratense*، والبرسيم الأبيض *T. repens*، والبازلاء *Pisum sativum*، والفول *Vicia faba*، وبعض أنواع الأبصال من العائلة Liliaceae مثل: الثوم *Allium sativum*، والبصل *A. cepa*، والتيوليب *Tulipa* spp.، والنرجس *Narcissus* spp.. وتشكل نيماتودا السيقان والأبصال *D. dipsaci* أهمية اقتصادية أيضاً لبعض محاصيل الحبوب، وخاصة الشوفان *Avena* spp.، والشيلم *Secale cereale*. ولهذه النيماتودا العديد من السلالات والعشائر التي وصفت كمعقد نوعي Species complex (Sturhan, 1971). وتلعب الأصناف المقاومة دوراً هاماً في إدارة هذه النيماتودا حيث إن المكافحة الكيميائية دائماً غير اقتصادية، أما معاملة البذور فهي ليست دائماً فعالة، كما أن الدورة الزراعية كثيراً ما يصادفها بعض التعقيدات بسبب المدى العوائلي الواسع للنيماتودا. وهناك بعض المصادر المتاحة للمقاومة، وقد تم بالفعل تطوير أصناف مقاومة من كل من: البرسيم الحجازي، والبرسيم الأبيض، والبرسيم الأحمر، والشوفان، والثوم، والفراولة (*Fragaria* × *ananassa*)، والبطاطا الحلوة *Ipomoea batatas*.

تنتشر نيماتودا تعفن درنات البطاطس *D. destructor* في العديد من مناطق العالم، ولها أهمية اقتصادية في البعض منها. ومن الناحية التاريخية، ظهرت هذه النيماتودا كآفة على البطاطس في أمريكا وأوروبا ولكنها الآن لم

obeikandi.com

تعد تشكل خطورة هناك إلا في أوروبا الشرقية حيث تسبب خسائر اقتصادية في محصول البطاطس (Sturhan and Brezeski, 1991). كما تسبب نيماتودا تعفن درنات البطاطس *D. destructor* مشاكل خطيرة أيضاً لمحصول البطاطا الحلوة في الصين (Lin *et al.*, 1993 ,1996). وقد توصلت بعض الأبحاث هناك إلى مصادر للمقاومة، بينما يتم التركيز أساساً على سبل المكافحة المتكاملة IPM (Anon, 1992).

تعد نيماتودا سيقان الأرز *D. angustus* التي تسبب المرض المعروف باسم مرض "أوفرا" Ufra disease في الأرز (اللوحة الملونة رقم ٧) آفة هامة في حقول الأرز *Oryza sativa* عميق المياه في جنوب آسيا وجنوب شرقيها. ولكن أهميتها بدأت في الانخفاض بتضاؤل مساحات الأرز عميق المياه في الوقت الحالي. تنتشر هذه النيماتودا أيضاً في حقول الأرز المنخفضة في جنوب بنجلاديش وجنوب غربيها حيث تتسبب في فشل هذا المحصول في كل من الأراضي المروية وتلك التي تروى بماء المطر على حد سواء. وهناك مصادر جيدة للمقاومة تجاه هذه النيماتودا، وهي متوفرة الآن وجاهزة للتطوير إلى أصناف مقاومة مناسبة لكل من أرز الأراضي المنخفضة و أرز الأراضي عميقة المياه.

تصيب نيماتودا النوع *D. africanus* الفول السوداني *Arachis hypogaea* (Jones and Waele, 1988) وتنتشر أساساً في جنوب إفريقيا. وتخفض هذه النيماتودا من القيمة التسويقية لمحصول الفول السوداني، وفي بعض الأحيان، قد تؤثر على إنتاجية المحصول (Venter *et al.*, 1991, 1993). ولسوء الحظ، جميع أصناف الفول السوداني التي تم اختبارها حتى الآن وجدت قابلة للإصابة بهذه النيماتودا، وقد يكون الصنف "Kwarts" متحملاً فقط للإصابة (Venter *et al.*, 1993).

اعتبارات عامة في اختبارات المقاومة
General Considerations in Screening

تعريف الأنواع Species identification

يعدُّ التعريف الدقيق للنوع المستهدف من النيماتودا، والفهم الشامل للتغير في قدرته الإمراضية التي قد تختلف من عشيرة حقلية إلى أخرى في غاية الأهمية بالنسبة لمربي النباتات المقاومة، ومن ثم لاستنباط الأصناف المقاومة، ولا يستثنى من ذلك بالطبع نيماتودا الجنس *Ditylenchus*.

وقد يكون من الصعب التفريق بين أنواع الجنس *Ditylenchus* مورفولوجيا، ولكن التعريف المورفوجي يظل، من الناحية العملية، هو الخطوة الأولى في التعريف. وقد يساعد كل من التعريف المورفولوجي، والمدى العوائلي للنيماتودا، وتاريخ الموقع، ومكان الإصابة (جذور، أو سيقان، أو درنات، أو بذور)، والأعراض المرضية على النبات، والتوزيع الجغرافي مجتمعين في عملية تعريف النوع. وهناك عدد من المؤسسات التي تعرض خدمات تعريف الأنواع للمساعدة في هذه الخطوات الهامة.

لا يوجد (حتى الآن) اختلافات داخل النوع في أي من نيماتودا تعفن درنات البطاطس *D. destructor*، أو نيماتودا سيقان الأرز *D. angustus*، أو نيماتودا النوع *D. africanus*، في حين يوجد ٣٠ سلالة بيولوجية أو أكثر للنوع *D. dipsaci* (Janssen, 1994). وقد تم حديثاً التعرف على طرز إمراضية من النيماتودا يمكنها كسر صفة المقاومة في النباتات المقاومة. كما وجدت بعض السلالات المتخصصة عوائلياً من النوع *D. dipsaci*، وخاصة تلك التي تصيب البقوليات العشبية ونباتات العائلة الزنبقية Liliaceae. وتختلف هذه السلالات كثيراً فيما بينها من حيث المدى العوائلي لكل منها، وقد تكون فائدة اختبارات المدى العوائلي في تحديد السلالات النيماتودية محل جدل، ولكننا من الناحية العملية نحتاج إلى حسم عملية تحديد السلالة أو الطراز الإمراضي للعشائر الحقلية الموجودة من النيماتودا بدقة. وقد تساعدنا معرفة المدى العوائلي فقط في اتخاذ القرار الصحيح للمكافحة، كما يجب الأخذ في الاعتبار أيضاً إمكانية وجود خليط من السلالات (اختلافات داخل النوع) في العشائر الحقلية داخل الحقل الواحد.

أجريت بعض المحاولات البحثية للتفريق بين أنواع الجنس *Ditylenchus* باستخدام الحامض النووي DNA (Palmer *et al.*, 1992)، أو باستخدام تقنية تقطيع الحامض النووي DNA باستخدام إنزيمات القطع المقيد Restriction fragment length polymorphism (RFLP) ضمن تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)، أو باستخدام تقنية تتابع الريبوسومات المتضاعفة Amplified ribosomal sequences (Wendt *et al.*, 1994). ولكن هذه التقنيات لم يمكنها حتى وقتنا الحالي أن تميز بين السلالات باستثناء تمييزها بين السلالة العملاقة Giant race والسلالات العادية التي يمكن إجراؤها أساساً بالاعتماد على حجم الإناث. وقد أمكن إحراز بعض التقدم في تطوير تقنية التضاعف العشوائي لقطع الحامض النووي DNA متباينة الأطوال Random amplified polymorphic DNA (RAPD)، وذلك فيما يتعلق بالتفريق بين سلالات عوائلية أخرى من النوع *D. dipsaci* (Esquibet *et al.*, 1988). ولكن هذا أيضاً، كان ناجحاً جداً في التمييز بين السلالة العملاقة والسلالات الأخرى. وداخل هاتين المجموعتين؛ العملاقة والعادية، كانت السلالات متماثلة جداً. وقد تعيق المشاكل المتعلقة بتكرار تقنية التضاعف العشوائي لقطع الحامض النووي DNA متباينة الأطوال Random amplified polymorphic DNA (RAPD) من استخدام تلك الطرق في التمييز بين السلالات الحقلية، وخاصة حيث توجد السلالات المختلطة في حقل واحد.

اللقاح Inoculum

اختيار العزلات Selection of isolates

يجب أن تكون العزلات النيماتودية المستخدمة في اختبارات المقاومة ممثلة للعشائر النيماتودية الموجودة في المنطقة الجغرافية تحت الدراسة. ويمكن تربية نيماتودا الجنس *Ditylenchus* في مزارع أحادية (وحيدة نوع النيماتودا)

Monoxenic culture على عائل معين أو مادة Substrate معينة (وسيأتي تفصيل ذلك فيما بعد). وإذا سمحت قوانين الحجر الزراعي، فإن هذه الطريقة سوف تساهم في تطوير ونشوء العزلات النيماتودية. وقد تصبح هذه العزلات فيما بعد سلالات أو طرزاً إمراضية مختلفة من النوع *D. dipsaci*، أو عشائر معزولة جغرافياً من أنواع أخرى. ويجب أن تنمى العزلات النيماتودية مستقل بعضها عن بعض، على الرغم من تفضيل البعض للعزلات المختلطة عند إجراء تجارب التقييم لصفة المقاومة (Alcaniz *et al.*, 1996 ؛ Whitehead, 1992).

جمع العينات Population samples

عندما تستخلص النيماتودا من النباتات في الحقل لأغراض التربية فلابد من اختيار التركيبات الوراثية المطلوبة من النيماتودا الموجودة في الحقل دون غيرها، وتجنب غير المرغوب منها. ومن الناحية العملية، يجب أن تنشأ المزارع النيماتودية من عدد محدود من الأفراد أو حتى أنثى واحدة Single female. ويفيد ذلك، على سبيل المثال، في تحليل التغيرات الوراثية فيما بين عشائر النيماتودا داخل الحقل الواحد فيما يتعلق بالقدرة الإمراضية لكل منها. ومع ذلك، نجد أن مثل هذا الاختبار لا يكون مرغوباً في أغلب اختبارات التقييم لصفة الشراسة الإمراضية. وقد يجمع اللقاح المستخدم في اختبارات التقييم من الحقل مباشرة، أو تتم تربيته على نباتات في أحواض تجريبية صغيرة أو في أصص. وبالنسبة لنيماتودا السيقان والأبصال *D. dipsaci* تتم تربيتها على نباتات البرسيم الأبيض أو الفول *Vicia faba*. ويمكن الحصول على الأنسجة المصابة حينئذ لاستخدامها مباشرة في عملية العدوى، أو – كما في حالة الفول– تجفف تلك الأنسجة بالهواء وتخزن لاستخدامها فيما بعد. وعندما يجمع اللقاح من أكثر من مصدر (حقل)، يجب أن تختار عندئذ الحقول ذات التعاقب المحصولي المتماثل. وبالمثل، يمكن الحصول على الأنواع الأخرى من النيماتودا من الأنسجة النباتية المصابة. فعلى سبيل المثال ؛ تجمع نيماتودا سيقان الأرز *D. angustus* من سيقان الأرز الغضة سواء كانت نامية في أصص أو في أحواض صغيرة، كما تجمع نيماتودا العفن الجاف في درنات البطاطس *D. destructor* من قشور درنات البطاطس، وتجمع نيماتودا *D. africanus* من بذور أو قشور قرون الفول السوداني. ومع ذلك، قد تكون المصادر النباتية للقاح كافية، أو لا يمكن التعويل عليها بمفردها، وذلك لأنها قد لا تكون متوفرة طوال الوقت، أو عند الحاجة إليها، أو لأنها قد تكون مصابة بأكثر من نوع نيماتودي في نفس الوقت بخلاف النوع المطلوب استخدامه في اللقاح تبعاً لبرامج المكافحة المستخدمة في إدارة الآفات، والوقت من الموسم. ومن الصعب عادةً الحصول على كميات كافية من لقاح النيماتودا *D. dipsaci* من الحقل عند الرغبة في ذلك. وحتى في حالة ظهور أعراض الإصابة واضحة على النباتات، وخاصة في حالة الإصابة الحديثة، نجد أن أعداد النيماتودا الموجودة قد تكون قليلة، كما قد نجد في حالات الإصابات الأقدم عمراً أن النيماتودا ربما تكون ملوثة ببعض

البكتيريا المتطفلة أو المتغذية على النيماتودا، كما قد تهاجر بعض الأنواع مثل النوع *D. dipsaci* من الأنسجة النباتية التالفة.

قدرة النيماتودا على إحداث العدوى Nematode infectivity

من بين أنواع النيماتودا التي نوليها الاعتبار في هذا الكتاب كل من النوعين: *D. dipsaci*، و*D. africanus*، حيث يمكن لكلا النوعين البقاء والحياة تحت ظروف الجفاف الخفيف داخل الأنسجة والبذور النباتية في صورة أطوار كامنة. وتستخلص نيماتودا النوع *D. dipsaci* بعد ترطيب الأنسجة أو البذور النباتية الجافة، وفي هذه الحالة تكون النيماتودا في الطور اليرقي الرابع وهو طور البقاء Survival stage فيها. أما إذا كانت الأنسجة النباتية في حالتها الغضة فإنها من المحتمل أن تحتوي على جميع أطوار النيماتودا في آن واحد، وكلما تقدمت الأنسجة النباتية في العمر واتجهت نحو طور الشيخوخة، اتجهت النيماتودا أيضاً إلى زيادة أعداد يرقات الطور الرابع القادر على الحياة في الظروف غير الملائمة (طور البقاء). أما نيماتودا النوع *D. africanus* فيمكنها البقاء في البذور الجافة في صورة بيض وقليل من الأطوار الساكنة الجافة Anhydrobiotic nematodes (Venter *et al.*, 1995).

ولأغراض برامج التقييم، عندما يوضع اللقاح مباشرة على نبات ينمو في ظروف عالية الرطوبة النسبية، فإن قدرة الأطوار المختلفة لنيماتودا الجنس *Ditylenchus* في إحداث العدوى تتساوى، سواء كانت هذه الأطوار يرقات داخل البيض، أو يرقات حرة، أو حتى أطواراً كاملة. ومن ثمَ، فإنه عند تقدير كثافة اللقاح يجب عدّ جميع الأطوار الموجودة. وعلى العكس من ذلك، عندما يوضع اللقاح في التربة، أو في معلق مائي بالقرب من النبات فإن القدرة النسبية للأطوار المختلفة في اختراق النبات تحدد الأعداد التي ستكون قادرة منها على الاختراق.

وفي النوع *D. africanus* على سبيل المثال، وجد بلاورايت وجيل Plowright and Gill (1994) أن يرقات الطور الثاني (J_2) – ومن ثم البيض – ليست لديها القدرة على عدوى النباتات عندما استخدمت في ظروف عدوى صناعية تحاكي الظروف الطبيعية (انظر فيما بعد). ويمكن تفهم مثل تلك المسائل جيداً عن طريق تثبيت الطرق المستخدمة، وخاصة فيما يتعلق بمصدر اللقاح وعمر المزرعة التي يؤخذ منها اللقاح. وقد وجد بلاورايت وجل Plowright and Gill (1994) أن عشائر نيماتودا النوع *D. angustus* قد حققت معدلات ثابتة بعد ٦٠ يوماً من العدوى. وقد استخدمت المزارع بهذا العمر (٦٠ يوماً) للحصول على اللقاح المستخدم في تجارب التقييم لصفة المقاومة. ويمكن تفسير بعض الصعوبات التي واجهت وايتهيد وآخرون Whitehead *et al* وآخرون (1987) عند محاولتهم نقل عدوى النباتات إلى المصادر المتعددة للقاح التي استخدموها، والتي شملت مزارع الكالس Callus cultures، والأنسجة النباتية الغضة والجافة، وربما أيضاً إلى موت بعض عشائر النيماتودا على أوراق الترشيح.

وبغض النظر عن مصدر اللقاح النيماتودي، يجب جمع النيماتودا من معلق الاستخلاص يومياً واستخدامها في التلقيح مباشرةً بأسرع ما يمكن بعد جمعها. وإذا لزم الأمر، يمكن حفظ النيماتودا في كمية قليلة من الماء (لايزيد عمقها عن ٥ مم، في أطباق على درجة حرارة ٢–٥ °م لمدة أسبوع إلى أسبوعين)، وتظل النيماتودا بذلك محتفظة بقدرتها على العدوى. وقد تجنب كوك وإيفانز Cook and Evans (1988) مشاكل الاستخلاص بأن استخدما معلقاً مائياً من أنسجة البرسيم الأبيض الملوثة بالنيماتودا. وقد استخدمت نفس الطريقة مع نيماتودا النوع *D. angustus* (سيأتي ذكر ذلك فيما بعد). وعند استخلاص النيماتودا من الأنسجة النباتية الغضة، يجب غسل تلك النيماتودا بتمريرها عدة مرات تحت ماء معقم، وذلك للتخلص من آثار المواد الفينولية النباتية السامة والكلوروفيل التي تؤثر على قدرتها في إحداث العدوى.

وقد يؤثر طول عمر مزرعة نيماتودا السيقان والأبصال المنماة على نسيج الكالس أو أي عائل آخر على قدرة النيماتودا في التكاثر على الأنواع النباتية الموجودة في الحقل، حيث تم تسجيل مثل ذلك لنيماتودا سيقان الأرز *D. angustus* (Ali and Ishibashi, 1997). ولهذا السبب، فإنه يجب اختبار قدرة نيماتودا السيقان والأبصال المنماة في مزارع نقية على عدوى نباتات الحقل. وعلى عكس ذلك، تظل سلالة البرسيم الحجازي من نيماتودا السيقان *D. dipsaci* المنماة على نسيج الكالس محتفظة بقدرتها الإمراضية وتخصصها العوائلي وإحداثها لنفس الأعراض المرضية على نباتات البرسيم الحجازي القابلة للإصابة لمدة عشر سنوات رغم تكرار نقلها وتجديدها (Eriksson, 1972).

تربية اللقاح Rearing inoculums

يمكن لمزارع نيماتودا السيقان *Ditylenchus* spp. المنماة على عائل وحيد – في حالة صيانتها جيداً – أن تكون مصدراً معقولاً من اللقاح كماً ونوعاً. كما يمكن لهذه المزارع أيضاً أن تخفض من مخاطر تعرض النيماتودا للجفاف.

المزارع الأحادية لنيماتودا النوع *Ditylenchus dipsaci*: تم استخدام وتطوير طريقة المزارع الأحادية (وحيدة النوع النيماتودي) Monoxenic cultures بالنسبة لنيماتودا النوع *D. dipsaci* بواسطة Hooper (1986)، وتعد هذه الطريقة طريقة نموذجية للحصول على الكميات الكبيرة من اللقاح المطلوب لإجراء تجارب التقييم لصفة المقاومة. ومن أفضل هذه الطرق أن تُربى هذه النيماتودا على مزارع كالس البرسيم الحجازي. وليست كل أنواع الكالس دائماً مناسبة لتكاثر النيماتودا، فمن الحقيقي أن صفة المقاومة أو القابلية للإصابة الموجودة في نبات ما لا تعني بالضرورة أن تتوفر أيضاً في الكالس الناتج من هذا النبات. إذا يجب أن نختار من بين جميع أنواع الكالس المشتقة من نباتات البرسيم الحجازي تلك التي تتضح مناسبتها تماماً لتكاثر النيماتودا. ويجب كذلك أن تخضع النيماتودا التي يتم تجميعها من التربة أو الأجزاء النباتية إلى عمليات الاستخلاص والتعريف والتنظيف والتطهير السطحي قبل استخدامها في عدوى نسيج الكالس. وعند جمع نيماتودا النوع *D. dipsaci* من النباتات الكاملة في الحقل، فإنه يجب أولاً تعريفها، وذلك بعد التقاطها من المعلق باستخدام إبر خاصة أو ماصات دقيقة.

Obeikandl.com

وعند تجديد المزارع، من المهم جداً أن تُختار نيماتودا النوع *D. dipsaci* فقط دون غيرها، وذلك لضمان ألا تحتوي المزرعة إلا على نوع نيماتودي واحد فقط Monoxenic culture. ويمكن فصل النيماتودا عن الشوائب بتمرير المعلق الذي يحويهما على أنسجة الاستخلاص الورقية المعروفة واستقبال الناتج في الأواني ضمن الطريقة التي وصفها وايتهيد وهيمينج Whitehead and Hemming (1965)، أو على المرشح السليولوزي الإسفنجي ذي العمق ٥ مم المجهز بشكل يناسب وضعه في قمع بيرمان. وفي كلتا الحالتين، تجمع النيماتودا بعد ذلك في ماء نظيف أو في محلول يحتوي على مضاد حيوي فطري/بكتيري. وقد يكون المحلول المناسب لذلك الذي يقوم بعملية تطهير سطحي جيدة للنيماتودا هو: بنسلين ج صوديوم Pinicillin G sodium (٣٠٠ وحدة/مل)، أو كبريتات الإستربتومايسين Streptomycin sulphate (٣٠٠ ميكروجرام/مل)، أو أمفوتيريسين ب Amphotericin B (٠,٧٥ ميكروجرام/مل). وهناك عدة طرق تستخدم في التطهير السطحي للنيماتودا بخلاف ذلك. بعد ذلك، يمكن نقل النيماتودا سريعاً على عدة دفعات، تحتوي كل دفعة منها على ١ – ١٠ أفراد من النيماتودا في كل مرة، وذلك باستخدام دبوس تثبيت الحشرات الدقيق، أو إبرة تلقيط دقيقة، إلى شرائح زجاجية مجوفة معقمة يحتوي تجويفها على عدة نقط من صبغة الملاكايت الأخضر Malachite green (٠,١٪ وزن: حجم) وتترك كذلك لمدة ١٥ ق. تنقل النيماتودا بعد ذلك ويسرعة إلى ماء مقطر معقم في قالب زجاجي مجوف معقم. وبمجرد أن يصبح عدد النيماتودا في هذا القالب كافياً (٣٠ – ٥٠ فرداً)، تنقل النيماتودا مباشرة إلى نسيج الكالس في قطرة (٥ – ١٠ ميكروليترات) من الماء المقطر المعقم. وإذا لم يتيسر فعل ذلك، فإن الطريق البديل هو أن تشطف النيماتودا عدة مرات في ماء مقطر معقم، ثم – تبعاً لمستوى التلوث – تنقع النيماتودا في مادة الهيبيتان Hibitane (٠,٥ – ١٪) وهي عبارة عن جلوكونات كلوروهكيسيدين Chlorihexidine gluconate (٢٠٪ وزناً: وزن) لمدة أقصاها ثلاث ساعات على درجة حرارة الغرفة، أو طوال الليل على درجة حرارة ٢ – ٥ °م. وبعد المعاملة، تغسل النيماتودا في ماء مقطر معقم، ثم توضع في قالب زجاجي، ثم يلقح بها الكالس في ٥– ١٠ ميكروليترات من الماء المقطر المعقم. ويعد القالب الزجاجي المجوف وعاءً جيداً لاستقبال أعداد كبيرة من النيماتودا المعقمة سطحياً. وبتحريك القالب حركة دائرية خفيفة تتجمع النيماتودا الموجودة في الماء المعقم أو المحلول المطهر بينما هي تركد تجاه القاع. بعد ذلك يمكن سحب الجزء العلوي من السائل (الماء أو المحلول) وذلك باستخدام ماصة دقيقة، وتبقى النيماتودا حينئذ في حجم صغير من السائل، حيث يمكن غسلها مرة أخرى، أو استخدامها في التلقيح. يمكن أيضاً إجراء مثل هذه الإجراءات في أنابيب طرد مركزي معقمة (مثل أنابيب إبندورف ١,٥ مل) حيث يعمل الطرد المركزي على ترسيب النيماتودا في قاع الأنابيب.

obeikandl.com

طريقة تربية نيماتودا السيقان والأبصال على الكالس

Protocol for culturing *Ditylenchus dipsaci* on callus

تصف البروتوكولات التالية طرق الخربشة والتعقيم السطحي التي تجري لبذور البرسيم الحجازي أو البرسيم العادي، واستخدامها في إنتاج الكالس، وكذلك طرق تربية نيماتودا السيقان على الكالس.

احتياطات عامة General Precautions

١- لبس القفازات واتباع الإرشادات المعملية للعمل داخل المختبر.

٢- ضمان التخلص من حامض الكبريتيك قبل نقع البذور في الماء (لكي تبرد البذور).

٣- يوضع الحامض المركز في وعاء مستقل، ويتم تخفيفه عند الحاجة بإضافة الحامض إلى الماء تدريجياً وببطء تحت غرفة التحضير ذات التدفق الهوائي.

٤- عند تلامس كلوريد الزئبقيك مع الإيثانول تتصاعد أبخرة الزئبق، ولذلك يجب أن يتم العمل تحت غرفة التحضير ذات التدفق الهوائي.

٥- يفضل العمل دائماً تحت غرفة التحضير ذات التدفق الهوائي Laminar flow hood، وتحت ظروف معقمة.

طريقة: خربشة البذور، وتعقيمها، وإنباتها

Method: seed scarification, sterilization and germination

١- توضع البذور في دورق زجاجي سعة ١٠٠ مل.

٢- يضاف حامض الكبريتيك المركز حتى يغطي البذور.

٣- تحرك البذور في الحامض بواسطة مقلب زجاجي، ثم تترك لمدة ٥ - ١٠ ق اعتماداً على حجم البذور وصلابتها.

٤- يتم التخلص من الحامض الزائد.

٥- تنقع البذور في ماء مقطر معقم لخفض درجة الحرارة الناتجة من المعاملة بحامض الكبريتيك.

٦- تكرر عملية نقع البذور في الماء المقطر المعقم أربع مرات.

٧- يملأ الدورق الزجاجي بمحلول كلوريد زئبقيك ١٠٠٠ جزء في المليون في ٣٠٪ إيثانول.

٨- يوضع الدورق في غرفة التحضير ذات التدفق الهوائي لمدة ١٥ ق.

٩- يتم التخلص من كلوريد الزئبقيك الزائد.

١٠- تنقع البذور في ماء مقطر معقم، وتكرر العملية أربع مرات.

١١- يوضع الدورق في غرفة التحضير ذات التدفق الهوائي لمدة ١٥ ق.

obeikandi.com

١٢- توضع البذور في الماء المقطر المعقم تحت غرفة التحضير ذات التدفق الهوائي لمدة ٢ - ٣ ساعات حتى تتشرب الماء.

١٣- يصب الماء الزائد ويضاف ماء مقطر معقم جديد حتى يمكن التخلص من المواد التانينية.

١٤- تنقل البذور إلى أطباق بتري تحتوي على آجار مغذٍ وتترك للإنبات لمدة يومين على درجة حرارة ١٥-٢٠ °م.

١٥- يتم التخلص من أية بادرات تبدو ملوثة، وتنقل البادرات السليمة إلى أنابيب سعة ٣٠ مل تحتوي على آجار لتنمو على درجة حرارة ٢٠ °م و١٦ ساعة إضاءة/٨ ساعات ظلام.

طريقة: إنتاج الكالس والتلقيح وتجميع النيماتودا

Method: Callus production, inoculation and nematode collection

١- تقطع بادرات البرسيم الحجازي أو البرسيم الأبيض أو الأحمر ذات الثلاث أو الأربع ورقات مركبة عند منطقة السويقة الجنينية السفلى وتعقم، وتنقل إلى بيئة نمو الكالس (B51)، وهي عبارة عن بيئة B5 ذات درجة حموضة pH = ٥,٨، والمضاف إليها 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) (٢ مجم/لتر) + كينيتين (٠,٥ مجم/لتر) + سكروز (٢٪ وزن/حجم) + آجار (٨ جم/لتر). يتم مسك البادرة بواسطة ملقط، وتخزق البادرة في عدة مواضع على طول ساقها لإحداث نقط جرحية متعددة، ثم توضع البادرة بجزئها المقطوع عند السويقة الجنينية السفلى في الآجار بينما تترك بقية البادرة تتمدد على سطح الآجار. توضع ثلاث إلى أربع بادرات في كل طبق، وتوضع الأطباق في الظلام لمدة سبعة أيام. يبدأ تكون الكالس من كل نقطة جرحية، ويمكن تنميته بعد ذلك واستزراعه وتلقيحه بالنيماتودا بعد ٢ - ٣ أسابيع. تتم عدوى الكالس بحوالي ١٠٠ - ٢٠٠ نيماتودا معقمة سطحياً في ٥ - ١٠ ميكروليترات من الماء باستخدام ماصة دقيقة. وتتم عادةً عدوى أنسجة الكالس صغيرة العمر نشيطة النمو، أما عدوى البادرات فقد تكون أصعب من ذلك. وعموماً يمكن عمل تلك المزارع بتلقيح البادرات المعقمة بالنيماتودا فيما بين الوريقات الفلقية للبادرات، أو في محور الورقة بعد يوم أو يومين من نقل البادرة إلى بيئة الكالس. ويمكن للنيماتودا حينئذ أن تخترق البادرة، وتتطور في نفس الوقت الذي يبدأ فيه نسيج الكالس في التكشف والنمو.

٢- تحفظ المزارع المنماة في الظلام، ويفضل أن يكون ذلك في حضانات على درجة حرارة ٢٠ °م. واعتماداً على كثافة اللقاح الابتدائي للنيماتودا، ومعدل تكاثر النيماتودا، يحتاج الكالس إلى التجديد بعد ٤٠ - ٩٠ يوماً. ويلاحظ أن نسيج الكالس ذا الكثافة العالية من النيماتودا يتغير لونه ويبدو مشبعاً بالماء ظاهرياً. يتم تجديد الكالس تحت ظروف معقمة بنقل أجزاء من الآجار والكالس تحتوي على النيماتودا إلى أنسجة كالس جديدة نشطة النمو.

٣- تجمع النيماتودا من الكالس بتقطيع الكالس أو الآجار بواسطة ملقط معقم، ووضع القطع التي تحتوي النيماتودا وكل ما يتم غسيله من الطبق مع النيماتودا في قمع بيرمان معقم أو أي جهاز مماثل لاستخلاص النيماتودا النشطة. تجمع النيماتودا بانتظام في أطباق بتري معقمة ويمكن التخلص من بقايا مادة 2,4-D من معلق النيماتودا بتمرير المعلق في ثلاث أو أربع دورات من النقع (الشطف) كتلك التي ذكرت من قبل، ثم تخزن النيماتودا النظيفة على درجة حرارة ٢-٤ °م حتى يحين موعد استخدامها. ويمكن أيضاً جمع بعض النيماتودا من القطرات المكثفة على غطاء طبق بتري حيث تكون تلك النيماتودا قد غادرت الكالس إلى تلك القطرات. وتمرر هذه النيماتودا أيضاً من خلال نظام مرشحات (فلاتر) معقمة.

طرق مزرعية بديلة خاصة بالنوع *Ditylenchus dipsaci*

***Ditylenchus dipsaci*: Alternative Culture Methods**

يمكن تربية نيماتودا السيقان والأبصال *Ditylenchus dipsaci* بشكل واسع على نباتات الكوسة courgettes (Hooper and Cowland, 1988) أو البصل بالنسبة لبعض السلالات ومنها السلالة العملاقة. وقد وجد تينيتي وإيفانز Tenete and Evans (1992) أن سلالات البرسيم الأحمر من هذه النيماتودا تتكاثر جيداً على الكوسة بعكس سلالات الفاصوليا والشوفان والبرسيم الحجازي التي فشلت في التكاثر عليها. ولذلك يجب أن تنمى هذه السلالات على الكوسة بأن تحقن في الأنسجة في ٥ - ١٠ ميكروليترات من الماء المقطر باستخدام إبرة حقن تحت البشرة، ثم تغطية مكان الحقن بواسطة شمع منصهر. وقد تمثل البكتيريا الموجودة داخل هذه الأنسجة - في حالة وجودها- مشكلة، إذْ إنها قد تؤدي إلى تعفن الأنسجة قبل أن تتمكن النيماتودا من تكملة دورة حياتها.

ويمكن استخلاص نيماتودا السيقان والأبصال *D. dipsaci* من الأنسجة النباتية الغضة أو الجافة على حد سواء، ولكن الأنسجة الجافة هي الأفضل عند الرغبة في استخلاص هذه النيماتودا من أنسجة الفول *Vicia faba*. وتعني قدرة هذه النيماتودا على البقاء حية في حالات الجفاف أنه يمكن تخزين الأنسجة الجافة في مجموعات كبيرة للحصول منها على أعداد كبيرة من النيماتودا فيما بعد. وتقطع الأنسجة النباتية سواء كانت غضة أو جافة إلى قطع صغيرة بطول ١سم، ثم توضع في قمع بيرمان في كمية ضحلة من المياه، أو تحت غرفة رذاذ ذات تحكم أوتوماتيكي. وتكون النيماتودا المستخلصة من الأنسجة الجافة عادة في الطور اليرقي الرابع، بينما تحتوي النيماتودا المستخلصة من الأنسجة الغضة على البيض وجميع الأطوار اليرقية للنيماتودا. وكلما اتجهت الأنسجة الغضة إلى الشيخوخة، زادت فيها أعداد الطور اليرقي الرابع من النيماتودا، إذ إنه الطور القادر على البقاء.

المزارع الأحادية لنيماتودا العفن الجاف *Ditylenchus destructor*

Ditylenchus destructor Monoxenic Culture

تتغذى نيماتودا العفن الجاف وتتكاثر على عدد كبير من العوائل التي تشمل: فطريات، وأنسجة كالس من الجزر، والبرسيم، والبطاطس، والتبغ (Hooper, 1986 ؛ Faulkner and Darling, 1961). وقد قام ماك جودوين وسلاك MacGuidwin and Slack (1991) بتربية نيماتودا العفن الجاف في درنات البطاطس على فطر *Fusarium roseum* المنمى على بيئة آجار دكستروز البطاطس PDA. ولأغراض تجارب التقييم لصفة المقاومة، فمن الأفضل أن تتم تربية النيماتودا على الأنسجة النباتية للتقليل من مخاطر انتقال الجراثيم الفطرية مع النيماتودا المستخدمة في التلقيح فيما بعد. ولهذا الغرض، يكون من الأنسب استخدام نسيج كالس البطاطس على درجة حرارة ٢٥ °م. ويمكن إنشاء هذا الكالس من سلاميات سيقان البطاطس المشطوفة في كحول الإيثايل (٧٠٪ حجم : حجم)، أو من نباتات البطاطس المنتجة في ظروف مزارع الأنسجة المعقمة. كما قام وايلي وآخرون De Waele *et al.* (1991) بإكثار الكالس على بيئة Murashige and Skoog´s (1962) المضاف إليها مادة 2,4-D (٣ مجم/لتر) والكينيتين (٠,٢ مجم/لتر). ويمكن تعقيم يرقات نيماتودا العفن الجاف في درنات البطاطس سطحياً باستخدام بعض الطرق السابق وصفها في الحديث عن نيماتودا السيقان والأبصال *D. dipsaci*. ويمكن أيضاً صيانة المزارع بنقل قطع صغيرة من الكالس المصاب إلى مزارع كالس جديدة.

طرق مزرعية بديلة للنوع *Ditylenchus destructor*

Ditylenchus destructor: Alternative Methods

يمكن تربية نيماتودا العفن الجاف في درنات البطاطس على درنات البطاطس الكاملة. ويوضع اللقاح المستخدم في تلقيح هذه الدرنات في محلول كاربوكسي ميثايل سليولوز Carboxymethyl cellulose (٢٪ وزن : حجم) في فجوة سطحية صغيرة (بعمق ٥ مم) على سطح الدرنة يمكن إحداثها باستخدام ثاقب فلين قطره ٣ مم، ثم تغطى الفجوة بالشمع المنصهر (فضلاً: انظر Hooper, 1986).

المزارع الأحادية لنيماتودا سيقان الأرز *Ditylenchus angustus*

Ditylenchus angustus: Monoxenic Culture

تم إجراء أغلب تجارب التقييم لصفة المقاومة تجاه نيماتودا سيقان الأرز *D. angustus* في الحقل في قطع تجريبية صغيرة Microplots تم تلويثها بقطع صغيرة من سيقان الأرز المصابة المأخوذة من نباتات تمت تربيتها في قطع تجريبية صغيرة أو أصص. وتتشابه طرق التلقيح المستخدمة في تربية النيماتودا *D. angustus* تماماً سواء في الأصص أو القطع التجريبية الصغيرة أو الحقل. ويمكن تربية نيماتودا سيقان الأرز *D. angustus* بشكل جيد على نباتات الأرز النامية في الأصص بطريقة مزارع النوع النيماتودي الواحد والعائل الواحد Monoxenic culture (Plowright and Akehurst, 1992). وهناك بعض الاقتراحات التي تفضي بأن بعض أنواع الفطريات تصلح أيضاً لتكاثر هذه النيماتودا (Latif and Main,

Obeikandi.com

1992). وعلى عكس الدراسة السابقة التي قام بها بلاورايت وإكهورست Plowright and Akehurst (1992)، فقد وجد علي والشيباشي Ali and Ishibashi (1997) أن نيماتودا سيقان الأرز *D. angustus* يمكنها أن تتكاثر على الفطر *Botrytis cinerea*. وقد تكون خصوبة النيماتودا دائماً أعلى عند تربيتها على المزارع النباتية، ولكن هناك أيضاً اقتراح مفاده أن النيماتودا يمكنها أن تتحور وتتأقلم لتصبح أكثر خصوبة عند تنميتها على مزارع الفطر *B. cinerea*.

ولكي نعدّ مزرعة نباتية من الأرز لتربية نيماتودا سيقان الأرز، تعقم حبوب الأرز المقشرة تعقيماً سطحياً بتغطيسها في محلول كلوريد الزئبقيك (٠,١٪ وزن: حجم) لمدة ٣٠ ق، ثم تغسل هذه الحبوب خمس مرات في ماء مقطر معقم، وتنقل بعد ذلك إلى بيئة Gamborgs B5 المضاف إليها السكروز بنسبة ٢٪، والمصلبة بواسطة الآجار ١٪، وتوضع في أطباق بتري معقمة ذات قطر ٩ سم. وبعد ٣٠ يوماً، تلقح قاعدة الورقة المجاورة لأحدث الأوراق بزوغاً في نبات الأرز بحوالي ٣٠ نيماتودا (طور كامل) في ٥ ميكروليترات من الماء المقطر المعقم. يغلف الطبق بعد ذلك بواسطة شريط مطاطي من مادة PVC أو مادة البارافيلم ويحفظ على درجة حرارة ٢٥ °م، و١٢ ساعة إضاءة: ١٢ ساعة ظلام. تهاجر النيماتودا من الأنسجة وتتحرك خلال الطبق كلما زادت أعدادها. وقد تتكون قطرات رطوبية على السطح الداخلي لغطاء الطبق، وخاصة في حالة تذبذب درجات الحرارة بعدة درجات نهاراً. وقد تصطاد هذه القطرات النيماتودا ومن ثم تجوع النيماتودا وقد تموت. وعند استخلاص النيماتودا من مثل هذه المزارع، فيجب اتخاذ الحذر الكامل لتجنب استخلاص النيماتودا التي قد تكون ضعيفة أو ميتة ضمن النيماتودا المراد استخدامها كلقاح. ويمكن تجميع النيماتودا المهاجرة إلى السطح الداخلي للغطاء (غير المرغوب فيها) بسهولة في حجم صغير من الماء المقطر المعقم (أقل من ١مل). بعد ذلك تجمع النيماتودا المرغوبة لاستخدامها كلقاح وتركز في أنبوبة من أنابيب جهاز الطرد المركزي، بحيث يكون لدينا كثافة من اللقاح تساوي ٦ نيماتودا/ميكروليتر من ماء مقطر معقم. ويمكن دائماً الحفاظ على نوعية ثابتة من اللقاح لأغراض التقييم عن طريق الحفاظ على عمر قياسي ثابت للمزارع.

المزارع الأحادية لنيماتودا النوع *Ditylenchus africanus*

Ditylenchus africanus: Monoxenic Culture

يمكن تربية نيماتودا النوع *D. africanus* على كالس أوراق الفول السوداني (Van der Walt and De Waele, 1989). وتبدأ خطوات إعداد هذا الكالس بأن تعقم أوراق نباتات الفول السوداني ذات العمر أربعة أسابيع تعقيماً سطحياً باستخدام كحول الإيثايل (٧٠٪ حجم : حجم) لمدة ٣٠ ثانية، ثم بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم (٠,٥٪ حجم : حجم) الذي يحتوي على توين ٢٠ Tween 20 لمدة ١٥ ق، ثم تغسل خمس مرات بماء مقطر معقم.

تقطع الأوراق بعد ذلك إلى قطع صغيرة (١ سم٢) ثم توضع على بيئة Murashige and Skoog's (1962) ذات درجة حموضة pH = ٥,٧. تتم عدوى الكالس نشط النمو الناتج بعد أربعة أسابيع من بدء نموه. قد يظهر بعض التغير في اللون على الكالس الملقح بالنيماتودا كما يحتاج هذا الكالس إلى التجديد بعد خمسة أسابيع. وعند التجديد، تتبع نفس الإجراءات التي تم وصفها عند الحديث عن نيماتودا النوع *D. dipsaci* فيما قبل.

تلقيح النباتات

Inoculating Plants

تم تطوير العديد من الطرق التي يمكن بواسطتها تلقيح النباتات بنيماتودا السيقان والأبصال. ومن الممكن تلقيح النباتات بتلك النيماتودا مباشرةً أو –وبناءً على نوع النيماتودا نفسها– يتم وضع النيماتودا في التربة أو الماء بجوار النباتات. ويمكن وضع اللقاح النيماتودي نفسه عند التلقيح في معلق مائي مع أو بدون مادة لزجة مثل: الآجار أو الكاربوكسي ميثايل سليولوز، أو حتى باستخدام أجزاء نباتية مصابة سواء كانت غضة أو جافة. وبالمثل، يمكن استخدام مدى واسع من كثافة اللقاح الابتدائي النيماتودي.

نيماتودا السيقان والأبصال *D. dipsaci*

تلقيح النباتات في الحقل Inoculating plants in the field

كما هو الحال مع أغلب أنواع النيماتودا المتطفلة على النباتات، يتم اختيار موقع في الحقل ملوث بنيماتودا السيقان والأبصال *D. dipsaci*، ثم يتم الحفاظ عليه لإجراء اختبارات التقييم به. وعلى سبيل المثال، قام كوك وإيفانز Cook and Evans (1988) بنقل نباتات عدة أصناف من البرسيم الأبيض سبق تنميتها في الأصص إلى حقل ملوث بالنيماتودا يزرع بالبرسيم الأبيض دائماً كمحصول وحيد، وذلك لاختبار قابلية أو مقاومة تلك الأصناف للنيماتودا. أيضاً، قام كل من ريفوال وآخرون Rivoal *et al.* (1978)، وسانتون وآخرون Santon *et al.* (1984) باختبارات مماثلة لاختبار بعض أصناف محاصيل الحبوب تجاه نفس النيماتودا (*D. dipsaci*). وتتأثر أعداد عشائر النيماتودا *D. dipsaci* عادة بشدة تبعاً للظروف البيئية، وخاصة الرطوبة النسبية ودرجة الحرارة. ومن ثم، فإن نتائج الاختبارات الحقلية تختلف تبعاً لذلك من عام لآخر باختلاف الظروف البيئية السائدة. وإضافة إلى ذلك، من المعروف أن توزيع النيماتودا في التربة يكون غير متماثل. ويتطلب هذا الأمر أن يشمل تصميم التجربة على تكرار لمعاملاتها، كما يجب أن تتضمن الأصناف المختبرة صنفين معلومين؛ أحدهما قابل للإصابة، والآخر مقاوم. أما فيما يخص العمل مع الفول *Vicia faba*، فقد تمكن حانونيك وآخرون Hanounik *et al.* (1986) من التغلب على

مشكلة عدم تماثل كثافة اللقاح النيماتودي في الحقل بزراعة البذور في خطوط بطول ١م تحتوي على تربة ملوثة بالنيماتودا حتى عمق ١٥ سم، ويبعد كل خط عن الآخر بمسافة ٥٠ سم. وقد تم تجهيز التربة الملوثة بالنيماتودا بخلطها بكميات كبيرة من سيقان النباتات المصابة بالنيماتودا مقطعة إلى قطع صغيرة بطول ٢سم. وقد تم ترطيب هذه التربة بشكل يومي، وتم تخفيفها بتربة غير ملوثة بالنيماتودا بعد أسبوعين، للحصول على الكثافة المطلوبة من اللقاح (٣٠٠ يرقة طور رابع/ديسميتر^{3} من التربة).

تلقيح النباتات والبادرات في الحاويات النباتية

Inoculating plants and seedlings in containers

يمكن الحد من مشكلة هروب النباتات من الإصابة لأسباب لا تتعلق بمقاومة العائل، ولكن نادراً ما يمكن منعها، وذلك بتلقيح النباتات أو البادرات بالطور المعدي النشط من النيماتودا. فإذا ما تم ذلك في ظروف مواتية لحدوث العدوى، يمكن حينئذ تحديد ومقارنة استجابة كل نبات للعدوى. وهناك العديد من الطرق التي تستخدم في تلقيح النباتات بنيماتودا السيقان والأبصال. وقد تقوم المختبرات المختلفة بتطبيق بعض من هذه الطرق القياسية في آن واحد. ومع ذلك، فهناك بعض الأسس المرشدة التي يجب اتباعها، كما هو موضح فيما بعد.

كثافة اللقاح Inoculum density

يجب أن تتراوح كثافة اللقاح بين ٣٠ و١٠٠ فرد نيماتودا لكل نبات أو بادرة. ويفضل إلجين Elgin (1984) استخدام ٢٠٠ فرد، ولكنه يعتبر أن ١٠٠ فرد قد تكون كافية. أما هوبر Hooper (1984) فقد استخدم ٥٠٠٠٠ - ١٠٠٠٠٠ نيماتودا/أصيص عند تلقيح نباتات الفاصوليا، إلا أن هذه الكمية من اللقاح تعتبر كمية مفرطة، أي زائدة عن الحد المطلوب. أما بالنسبة للبرسيم الأبيض، فقد وجد كوك وإيفانز Cook and Evans (1988) أنه لا توجد فروق بين العدوى بكثافة لقاح ٣٤ أو ٦١ نيماتودا/أصيص. وقد كانت هناك بعض الدراسات حول مصير هذه النيماتودا المستخدمة في التلقيح، حيث يعتقد أنه يُفقد جزءٌ منها وهو الجزء الذي لا يمكنه اختراق النباتات، والذي يعتقد بأنه يشكل عدداً كبيراً من النيماتودا المستخدمة في التلقيح. وقد أوضح بلاورايت وجيل Plowright and Gill (1994) أن أكثر من ٧٥٪ من لقاح النيماتودا *D. angustus* قد يفقد، بينما قدر ميرسر وجرانت Mercer and Grant (1995) أن نسبة الفقد في لقاح النيماتودا *D. dipsaci* قد تراوح بين ٦٧ و٩٣٪.

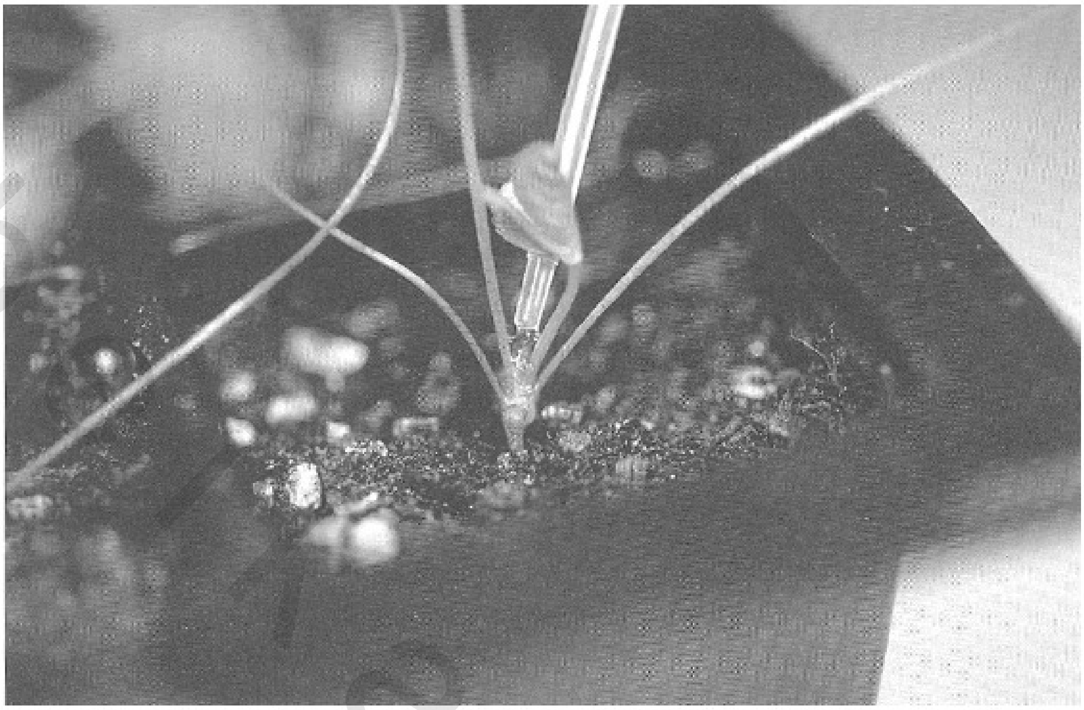
وضع اللقاح Inoculum delivery

في كل طرق وضع اللقاح، سواء كانت النيماتودا توضع في التربة أو مباشرة على النبات، من الضروري أن يتم الحفاظ على معدل عال من الرطوبة النسبية في فترة ما بعد التلقيح مباشرة. وتعد الفترة التي تمتد ٢ - ٣ أيام بعد التلقيح بصفة خاصة فترة حرجة. وتختلف تفاصيل الظروف المثلى للتلقيح بصفة عامة باختلاف العائل النباتي، ولكن في جميع الأحوال، يجب أن يكون معدل النمو النباتي بطيئاً في فترة الأسبوع إلى الأسبوعين الأولين بعد التلقيح، وذلك للسماح للنيماتودا بأن تستوطن مكاناً معيناً للعدوى. فالنباتات سريعة النمو قد تهرب من الإصابة،

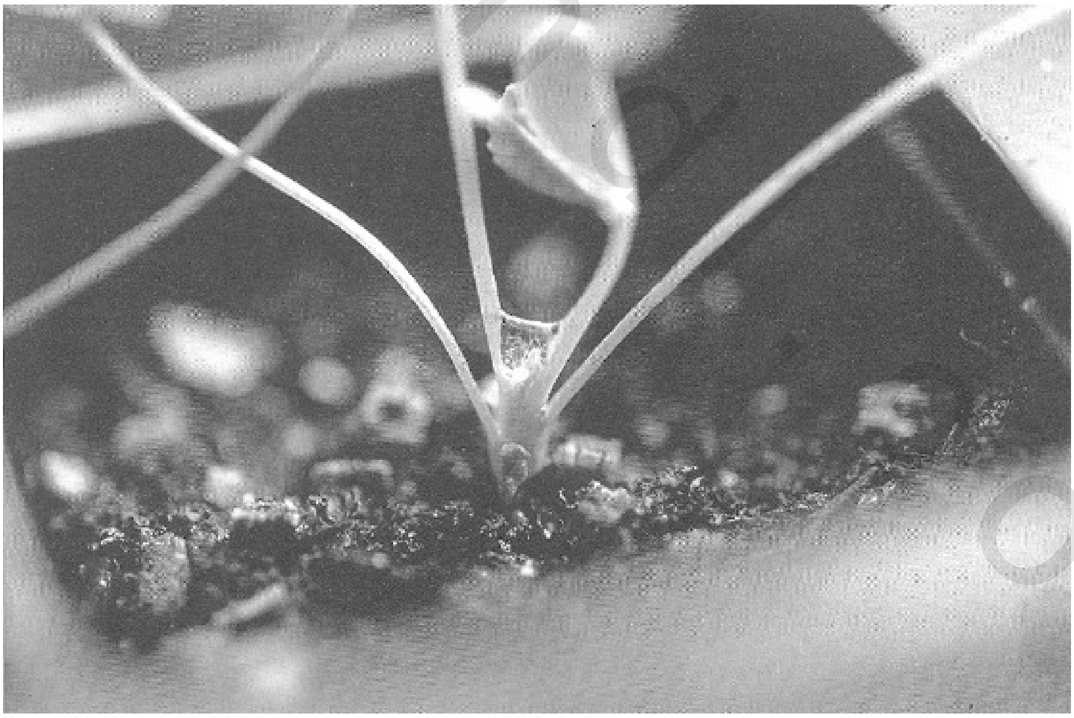
حيث يمكن لأنسجة النمو الثانوي السميكة للنباتات أن تصطاد النيماتودا بداخلها، وتمنع بذلك أو تخفض تطور الأعراض وتكشفها. كما ينصح أيضاً بإعادة تلقيح النباتات بعد أسبوع أو أسبوعين من التلقيح الأول لخفض فرصة هروب النباتات من الإصابة، وخاصة عندما تتم العدوى بالنيماتودا في معلق مائي.

ويمكن تلقيح بادرات البرسيم الحجازي والفول والبرسيم العادي والبازلاء بالنيماتودا *D. dipsaci* في قطرة من الكاربوكسي ميثايل سليولوز CMC (١- ٢٪ وزن : حجم) توضع في محور الورقة الأولى للبادرة بالقرب من الطرف المرستيمي (الشكلان رقما ٥,١ و٥,٢). ويمكن استخدام هذه الطريقة أيضاً لتلقيح البادرات الأكبر عمراً في الأصص، أو تحويرها لتستخدم في البرتوكول المسمى بالدمية القماشية Rag-doll (سيأتي ذكره فيما بعد). وقد قام إلجين Elgin (1984) بتلقيح بادرات البرسيم الحجازى المناة في الصواني بعد أسبوعين من إنباتها بالنيماتودا موضوعة إما في قطرات من الماء أو في نظام للرش، وذلك بمعدل ١٠٠ نيماتودا/نبات. كما استخدم ميرسر وجرانت Mercer and Grant (1995) تقنية خاصة لتلقيح نباتات البرسيم تماثل تماماً تلك التقنية التي استخدمها هاسي وكروسبرج Hussey and Krusberg (1968) لتلقيح نباتات البازلاء التي يتم فيها تلقيح بادرات البرسيم ذات العمر ثلاثة أيام، أو البذور النابتة بمعلق من النيماتودا. كما قام كوك وإيفانز Cook and Evans (1988) بتلقيح قمم قطع الساق المدادة لنباتات البرسيم الأبيض بمعلق مائي من أنسجة البرسيم الأبيض الممزقة المصابة بالنيماتودا يحتوي على ١٠٠ نيماتودا يضاف إلى سطح التربة بالقرب من البراعم. ويمكن حقن نباتات البرسيم بمعلق من النيماتودا باستخدام محقن تحت البشرة (Dijkstra, 1957 ؛ Cook and Evans, 1988). كما يمكن أيضاً حقن بادرات محاصيل الحبوب بنفس الطريقة (Seinhorst, 1952)، ولكن ما دام أنه من الصعب حقن حتى الكميات صغيرة الحجم من اللقاح في النباتات فإن حجم المعلق الذي يحقن داخل النبات يجب ألا يزيد عن ٥ ميكروليترات (Cameron, 1963).

وتقوم مادة الكاربوكسي ميثايل سليولوز بعدة وظائف فضلاً عن أنها حامل للقاح. فهي تسهل عملية التصاق اللقاح بسطح النبات، وتخفض من ظاهرة التوتر السطحي فتمكن نقطة المعلق التي تحتوي على اللقاح من الاستقرار على محور الورقة، كما يجعلها أيضاً لا تجف سريعاً كما في حالة نقطة الماء، بل تجف تدريجياً بمعدل أبطأ. كما أنها تفيد أيضاً في الحفاظ على النيماتودا *D. dipsaci* في المعلق متجانسة التوزيع، بالرغم من أن نيماتودا النوع *D. angustus* الأكثر نشاطاً قد تتجمع في تكتلات يصعب توزيعها. وعموماً، يمكن الآن استخدام الماصات الأوتوماتيكية الدقيقة للتعامل بدقة مع الأحجام الصغيرة التي تصل إلى ميكروليترات قليلة، ويمكن بواسطتها نقل النيماتودا في كميات صغيرة جداً من المحلول أو المعلق. وتضمن الكمية الصغيرة من المعلق في شكل قطرات ٥ - ١٠ ميكروليترات سلامة اللقاح، كما تمكن من وضع اللقاح ملاصقاً للمنطقة المراد تلقيحها، على الرغم من أن مثل هذه القطرات الصغيرة قد تتعرض للجفاف سريعاً ولا تترسب سريعاً على محور الورقة. وقد وجد ميرسر وجرانت Mercer and Grant (1995) أن العدوى باستخدام قطرات صغيرة من المعلق كانت طريقة فقيرة جداً، ولكن ذلك قد يكون بسبب الحجم الكبير للقطرات (٣٠ ميكروليتراً).



الشكل رقم (٥,١). نبات برسيم أبيض ملقح بنيماتودا السيقان *Ditylenchus dipsaci* في اختبار تقييم تحت ظروف متحكم بها.



الشكل رقم (٥,٢). نبات برسيم أبيض بعد تلقيحه مباشرة بنيماتودا السيقان *Ditylenchus dipsaci*، وتظهر قطرة التلقيح التي تحتوي النيماتودا.

obeikandi.com

وقد يكون تلقيح التربة أو البادرات الصغيرة مشابهاً كثيراً لطرق العدوى الطبيعية في الحقل، ولكن بما أنه يعتقد أن ميكانيكيات المقاومة تبدأ فعلها عادة بعد العدوى، فإن جميع طرق التلقيح المباشرة تكون كلها متساوية. ويمكن التحكم جيداً في عدد النيماتودا التي يمكن بها تلقيح النباتات عن طريق عدوى كل نبات على حدة، وكذلك بالتحكم الجيد في عملية تجانس اللقاح عن طريق التأكد والمراجعة المستمرة لكثافة النيماتودا في المعلق بفحص قطرات منه على شرائح زجاجية بصفة مستمرة. وتعد طرق التلقيح بالرش أو الرذاذ التي يستخدمها الكثيرون من الطرق الأسرع، ولكنها تضحي بالدقة ما لم يتم تكرار التلقيح. وقد وجد كوك وإيفانز Cook and Evans (1988) أن الطرق المختلفة التي استخدمت في تلقيح النباتات قد أدت إلى مستويات مختلفة من القابلية للإصابة في النباتات بشكل عام في بعض الاختبارات، ولكن كان هناك اتفاقاً عاماً فيما يتعلق بترتيب أصناف البرسيم من حيث قابليتها للإصابة في الاختبارات المختلفة، وهذا قد يؤدي إلى اقتراح يفضي بأن عددا قليلاً نسبياً من النيماتودا هو المطلوب لإجراء العدوى اللازمة لترتيب الأصناف النباتية من حيث درجة مقاومتها أو قابليتها للإصابة.

نيماتودا سيقان الأرز *Ditylenchus angustus*

تلقيح النباتات في الحقل Inoculating plants in the field

تعد العدوى الطبيعية بنيماتودا سيقان الأرز *D. angustus* متقطعة جداً Sporadic، ولا يمكن الاستناد عليها في أغراض تجارب التقييم. فالنيماتودا ليست لديها القدرة الكافية للبقاء في ظروف الجفاف (Ibrahim and Perry, 1993)، كما أن الكثافة العددية للنيماتودا في التربة تكون تقريباً تحت المستوى المطلوب لاكتشافها عندما يعقب موسم الأرز موسم جاف أو محصول غير مروي. ويمكن الحصول على قطع تجريبية ملوثة في الحقل -بعد صرف المياه منه، وترك التربة لتجف- وذلك بإضافة أجزاء نباتية مصابة بالنيماتودا إلى تربة هذه القطع.

يمكن تلويث القطع التجريبية الصغيرة المزروعة بالأرز بواسطة تعويم قطع صغيرة من سيقان الأرز المصابة بالنيماتودا فوق سطح الماء حول بادرات الأرز. وفي هذه الحالة، يجب إضافة كمية كافية من اللقاح النيماتودي لا تقل عن ١٠٠ فرد من الطور المعدي للنيماتودا (طور يرقي رابع أو طور كامل) لكل بادرة (Anon, 1985). ويعد عمق الماء بالنسبة لارتفاع البادرة عاملاً هاماً في نجاح عملية التلقيح (انظر البروتوكول والشكل رقم ٥,٧).

تلقيح النباتات في الأصص Inoculating plants in pots

تم تطوير عملية تلقيح أغمدة أوراق نباتات الأرز في فيتنام (Kinh and Nghiem, 1982)، وذلك بوضع عشرة أفراد من النيماتودا في قطرة من الماء على حبة الأرز النابتة، وحفظها في جو مشبع بالرطوبة لمدة ٤٨ ساعة على درجة حرارة ٢٨-٣٠ °م. بعد ذلك ترفع البادرات المصابة من الأصص وتحفظ في غرفة مظللة من الشاش أو النسيج المثقب على درجة رطوبة نسبية ٨٠-٩٠٪. وقد قام بلاورايت Plowright (بيانات غير منشورة) بتطوير طريقة الدمية القماشية Rag doll حيث قام بتلقيح نباتات الأرز بالنيماتودا *D. angustus* في ٢٪ كاربوكسي ميثايل سليولوز CMC

داخل لفافات من ورق الكروماتوجرافي، ولكنه وجدها طريقة غير مقبولة. فنيماتودا سيقان الأرز *D. angustus* هي نيماتودا نشطة للغاية وتميل إلى التجمع في المحاليل، ويمكن فك هذه التجمعات بإثارة الماء أو المحلول الذي توجد فيه النيماتودا، ولكن من الصعب فعل ذلك في محلول كاربوكسي ميثايل سليولوز CMC.

قام رحمان Rahman (1987) بتلقيح نباتات أرز عمرها ٣-٤ أسابيع في الأصص بوضع النيماتودا مباشرة في ماء حول النباتات بمعدل ١٠٠ نيماتودا/نبات. وفي اختبارات التقييم الروتينية، قام بلاورايت وجيل Plowright and Gill (1994) بتلقيح بادرات الأرز بمعدل ٣٠٠ - ٥٠٠ نيماتودا/بادرة، وذلك بأن توضع البادرة في أنبوبة بلاستيكية، وتوضع النيماتودا في كمية من الماء حول البادرة وذلك للحفاظ على النيماتودا محصورة حول البادرة (الشكل رقم ٥,٣). وتضمن عملية حصر وجود النيماتودا بجوار البادرة حدوث عدوى متماثلة للنباتات، وعدم هروب النيماتودا أو هروب النباتات من الإصابة، وذلك مقارنة بوضع اللقاح في صينية واحدة تحتوي ٢٤ نباتاً معاً، حتى لو استخدم نفس المعدل من اللقاح (Plowright and Gill, 1994). وتحاكي هذه الطرق طرق العدوى الطبيعية باستخدام الماء التي تحدث عند مستوى سطح الماء الملاصق للنباتات، وقد كان من المفترض أنه باستخدام مثل هذه الطرق لن تزيد نسبة النيماتودا التي تنجح في الاختراق وإحداث العدوى عن ١٠٪ من النيماتودا المستخدمة في اللقاح. أيضاً قام رحمان وإيفانز Rahman and Evans (1987) بحقن النيماتودا في التربة أو وضعها عند قاعدة نباتات الأرز ذات العمر عشرة أيام في الماء. وقد أعطت الطريقة الأخيرة أعلى نسبة من النباتات المصابة، ولكن نسبة النيماتودا التي نجحت في إحداث العدوى لم تتعد أيضاً نسبة العشرة بالمائة من مجموع النيماتودا المستخدمة في اللقاح.

نيماتودا العفن الجاف في درنات البطاطس *Ditylenchus destructor* ونيماتودا النوع *D. africanus*
Ditylenchus destructor and *D. africanus*

هناك القيل جداً من المعلومات المتوفرة حول التقنيات المستخدمة في التلقيح بأي من نيماتودا العفن الجاف في درنات البطاطس *D. destructor* أو نيماتودا النوع *D. africanus*. وكلا النوعين المذكورين من النيماتودا يخترق أنسجة النباتات العائلة تحت سطح التربة، ويمكن إجراء التلقيح بهما بوضعهما في معلق مائي يضاف إلى التربة حول النباتات المزروعة. وعلى سبيل المثال، قام فينتر وآخرون Venter *et al.* (1993) بتلقيح النباتات بنيماتودا النوع *D. africanus* بمعدل ١٠٠ أو ١٠٠٠ فرد من أطوار مختلفة من النيماتودا/نبات بعمر خمسة أسابيع. وقد أثبتوا أن للكثافة الابتدائية من النيماتودا (Pi) تأثيراً ضئيلاً جداً على الحالة العوائلية النسبية لأصناف الفول السوداني. وتنطبق أغلب الاعتبارات والمعايير المتعلقة بالنيماتودا داخلية التطفل المتجولة Migratory endoparasites على التلقيح بتلك النيماتودا أيضاً (انظر الفصل الثامن). ويمكن لنيماتودا النوع *D. africanus* أن تصيب جذور الفول السوداني وتتكاثر بداخلها، ومن ثمَ يكون التلقيح قبل مرحلة تكوين القرون. وبالمثل، تتغذى نيماتودا العفن الجاف في درنات البطاطس على أنسجة السيقان الأرضية لنباتات البطاطس قبل تطور ونمو الدرنة الساقية في البطاطس، أو الجذور المتدرنة في البطاطا الحلوة.

الشكل رقم (٥,٣). نباتات برسيم أبيض بعد تلقيحها مباشرة بنيماتودا السيقان *Ditylenchus dipsaci*، الأنابيب البلاستيكية حول قاعدة البادرات لتركيز اللقاح النيماتودي. (لاحظ استجابة النباتات العائلة في المقدمة).

وتستلزم الطرق المخبرية لتقييم الجذور الدرنية في البطاطا الحلوة (Anon, 1992) نفس الاعتبارات التي تتخذ عند إنشاء مزارع تربية نيماتودا العفن الجاف *D. destructor* على درنات البطاطس (انظر ما سبق، وكذلك انظر المرجع Hooper, 1986). ويلعب سُمك طبقة البشرة المحيطية (البريديرم) Periderm في الجذور دوراً هاماً في عملية المقاومة، ويهيئ الضرر الميكانيكي الحادث في هذه الطبقة الدرنة للإصابة بالنيماتودا. وقد تسهل عملية تلقيح النيماتودا خلال طبقة البشرة المحيطية (كنوع من التحايل على هذا الحاجز) من عملية تشكل النباتات المستنسخة Clones اعتماداً على معدل (دليل) التعفن (Anon, 1992).

تقييم التراكيب الوراثية لصفة المقاومة
Evaluating Genotypes for Resistance

تفسر المقاومة بأنها قدرة بعض الأصناف النباتية على خفض قدرة النيماتودا على التكاثر عليها، بعكس النباتات القابلة للإصابة التي تدعم هذا التكاثر. وتظهر الأعراض المرضية على النباتات كانعكاس لرد فعل النبات تجاه الغزو بالنيماتودا و/أو تكاثرها وتطورها عليه. ويعد كل من نوعية العرض وشدة تعبيره بوجه عام من الدلائل

الجيدة للمقاومة أو القابلية للإصابة بنيماتودا السيقان والأبصال *Ditylenchus* spp. (اللوحة الملونة رقم ٨)، على الرغم من أنه يجب توخي الحذر دائماً عند تصنيف النباتات التي لا تظهر عليها الأعراض والتي قد تكون قد هربت من الإصابة أو أنها بالفعل مقاومة.

نيماتودا السيقان والأبصال *Ditylenchus dipsaci*

تتغذى نيماتودا السيقان والأبصال *D. dipsaci* على الأنسجة البرانشيمية للعوائل القابلة للإصابة مسببة حدوث تضخم في حجم خلاياها Hypertrophy وزيادة في سرعة انقسامها Hyperplasla. وتظهر على الأعضاء النباتية التي تحتوي أنسجتها على أفراد متكاثرة من النيماتودا أعراض التقزم والانتفاخ والتشوه (اللوحة الملونة رقم ٨). وقد تظهر على النبات الواحد المصاب كل أعراض الإصابة النموذجية، أو بعضها على الأقل. وفي البرسيم الأبيض، على سبيل المثال، يعتمد تطور أعراض الإصابة على التوازن بين نمو أعداد النيماتودا واستطالة سلاميات النبات المصاب، وهو توازن يعتمد هو الآخر في الأساس على درجة الحرارة السائدة (Griffith *et al.* 1996). وليس من الضروري أن يكون هناك تلازم بين الإصابات النيماتودية تحت البشرة وظهور الأعراض. وقد تتكشف الإصابات الناتجة عن الإصابة بالنيماتودا خارجية التطفل وتكثر في محور الورقة دون أن تظهر أعراض الإصابة النموذجية على الأوراق، كما في حالة إصابة البرسيم الحجازي والبرسيم الأبيض (Griffith *et al.* 1997). أما النباتات المقاومة فلا تظهر عليها أعراض الإصابة، أو تكون أقل انتفاخاً من النباتات القابلة للإصابة، أو قد تظهر عليها أعراض الموت الموضعي المحدود Localized necrosis. وعلى سبيل المثال، تسبب السلالة العملاقة موتاً موضعياً محدوداً على النباتات المقاومة، ولكنها لا تكون مطلقاً ذلك الانتفاخ الشديد الذي تكونه على النباتات القابلة للإصابة (Caubel and Leclercq, 1989). ومن ثمَ، فإنه من الممكن تقييم رد فعل النباتات بعد الإصابة عن طريق ملاحظة الأجزاء الهوائية من النبات. ونموذجياً، لابد من تدعيم عملية التعبير المرضي بواسطة الأعراض المرضية عن طريق تقدير معدل تكاثر النيماتودا. ومن الممكن تقدير ذلك عن طريق تحليل التربة أو عن طريق عدّ النيماتودا في النبات. وتحت الظروف الحقلية، نجد أن هذه العملية هي عملية مستغرقة للوقت، كما أن توزيع الإصابة في الحقل لا يكون أبداً متجانساً بأي حال من الأحوال.

أما تقييم الأعراض في البادرات فهو يسهل عملية اختبار وتقييم الأعداد الكبيرة من النباتات والأصناف. وعادة، يكون رد فعل البادرة، على سبيل المثال، في البرسيم الأحمر أو البرسيم الحجازي متلازماً تلازماً جيداً مع ملاءمة العائل لتكاثر النيماتودا (Caubel *et al.*, 1977 ؛ Lundin and Jonsson, 1975 ؛ Bingefors, 1970). ومن الممكن الاعتماد على التقدير المبكر، بعد ٢-٤ أيام من التلقيح، لتقدير رد فعل العائل تجاه الغزو بالنيماتودا. وقد حاول إلجين وآخرون Elgin *et al.* (1975) في ذلك الأمر وأفادوا بأنه من الواجب الحكم على استجابة العائل للعدوى

بالنيماتودا بعد أسابيع من التلقيح، بينما رأى وايتهيد Whitehead (1992) أنه من الضروري تقييم هذه الاستجابة في مرحلة التزهير وتكون الحبوب، أي بعد ذلك بعدة أشهر. أما كوك إيفانز Cook and Evans (1988) فقد أفادا بأن كثيراً من النباتات التي صنفت كنباتات مقاومة في مبدأ الأمر قد اتضحت قابليتها للإصابة عندما تم التقييم متأخراً. وهذا يثبت أن النيماتودا يمكنها البقاء حية في الأنسجة النباتية دون تكشف أية أعراض مرضية.

تعد المقاومة لنيماتودا السيقان والأبصال *D. dipsaci* في كل من: الفول، والبرسيم الحجازي، والبرسيم الأحمر، والبرسيم الأبيض وظيفة لرد فعل النباتات الفردية تبدأ أساساً من البذرة، علماً بأن رد فعل الصنف يكون محكوماً بنسبة النباتات المقاومة في عشيرة نباتية معينة (Caubel and Leclercq, 1989). ويبلغ معدل تكاثر نيماتودا السيقان والأبصال *D. dipsaci* أوجه في النباتات التي تتضخم خلايا أنسجتها Hypertrophied tissues في مناطق الإصابة. ويبدو أن ذلك يكون انعكاساً أيضاً لحالة التوازن بين معدل تكاثر النيماتودا ونمو وتشكل النبات. وعلى ذلك، نجد أنه في نباتات الشوفان التي تزرع في فصل الربيع، تنمو السيقان سريعاً وتظهر عليها علامات التغليظ الثانوي (اللوحة الملونة رقم ٩). وفي الأصناف القابلة للإصابة مبكرة النضج، نجد أنه نادراً ما تنجح نيماتودا السيقان والأبصال في إحداث تضخم الخلايا Hypertrophy، ولا تتكاثر مقارنة بما يحدث في الأصناف الشتوية القابلة للإصابة التي تبقى فيها الأنسجة المرستيمية غضة ونشطة لفترات طويلة. ويسبب الغزو النيماتودي بوجه عام ظهور كتل الخلايا متضخمة الحجم، وظهور الأعراض المرضية التي تشمل أيضاً غزو الأنسجة المرستيمية قبل أن تدخل الأنسجة في مرحلتي اللجننة Lignification والاستطالة Elongation.

نيماتودا سيقان الأرز *Ditylenchus angustus*

تتغذى نيماتودا سيقان الأرز *D. angustus* خارجياً على أوراق الأرز حديثة العمر داخل غلاف الورقة. ويمكن تصنيف التراكيب الوراثية للأرز تبعاً لنوع العرض المرضي الذي يظهر على الأوراق حديثة التكوين بعد العدوى. وتظهر الأعراض المرضية على النباتات القابلة للإصابة بشكل بقع بيضاء صغيرة على الأوراق، وتتجمع وتلتحم عند قاعدة نصل الورقة (اللوحة الملونة رقم ٧). وقد يكون ذلك مصحوباً بتجعد سطح الورقة المصابة، وتشوه في العرق الوسطي. وفي حالة الإصابة الشديدة، تبيض الورقة بكاملها. وقد طور بلاورايت وجيل Plowright and Gill (1994) طريقة لتقييم شدة الأعراض على الأوراق المصابة وأثبتا وجود علاقة تلازم قوية بين شدة الأعراض وعدد النيماتودا في كل نبات (الشكل رقم ٥،٤). وقد لا تظهر على النباتات المقاومة أية أعراض مرضية، أو تظهر عليها أعراض التلون البني السريع نتيجة لتغذية النيماتودا عليها. وقد يظهر هذا التلون البني على العرق الوسطي للورقة، أو داخل حفر صفراء صغيرة على النصل. وقد يظهر التلون البني أيضاً على النباتات القابلة للإصابة ولكنه يكون بطيئاً في ظهوره، بسبب تدهور الأنسجة المصابة. ويُتخذ من رد الفعل المقاوم المختلف في نوعيته عادة قاعدة يُبنى عليها الاختيار الوراثي. كما وجد بلاورايت وجيل Plowright and Gill (1994) أيضاً تغيراً كمياً في القابلية للإصابة بنيماتودا سيقان الأرز *D. angustus*.

obeikandl.com

الشكل رقم (٥,٤). مقياس لتسجيل شدة أعراض الإصابة بمرض "أوفرا Ofra" على نباتات الأرز القابلة للإصابة بنيماتودا سيقان الأرز *Ditylenchus angustus*.

نيماتودا النوع *Ditylenchus africanus*

لم ترد تقارير حول مقاومة النباتات لنيماتودا النوع *D. africanus*، برغم الحديث عن بعض الأصناف المتحملة (Venter *et al.*, 1993). ويعتمد توصيف أصناف الفول السوداني على شدة الأعراض التي تظهر على القرون والبذور عند الحصاد. ويمكن تدريج شدة المرض على القرون على مقياس صفر – ١٠، وتقدير نسبة ظهور الأعراض (التلون) على سطح القرون المصابة، بينما تكون شدة المرض على البذور عبارة عن نسبة البذور الملطخة Blemished seeds (Venter *et al.*, 1991).

نيماتودا العفن الجاف في درنات البطاطس *Ditylenchus destructor*

يتم تقييم مقاومة التراكيب الوراثية للبطاطا الحلوة تجاه نيماتودا العفن الجاف في درنات البطاطس *D. destructor* في الصين تبعاً لدرجة تلون درنات البطاطا بدايةً من نقطة التلقيح أو العدوى (Anon., 1992).

قواعد التقييم
Screening Protocols

تقييم مقاومة البرسيم الأبيض والبرسيم الأحمر والبرسيم الحجازي لنيماتودا السيقان والأبصال *D. dipsaci* تحت الظروف المتحكم بها/البيت الزجاجي

Screening white clover, red clover and Lucern (alfalaf) in comtrolled environment/glasshouse.

تجرى اختبارات التقييم على أفضل صورة تحت الظروف المتحكم بها التي توفر درجة حرارة ١٢/١٥ °م (نهار/ليل) و٨/١٦ ساعة (ضوء/ظلام). وإذا لم يتوفر ذلك فإن البديل يكون صوبة زجاجية باردة، أو يجرى

الاختبار تحت الظروف الحقلية (وذلك إذا توفرت ظروف الحماية من الظروف غير الملائمة مثل الصقيع والشمس). إذاً فمن الممكن إجراء اختبار التقييم تحت الظروف الحقلية، ولكن وبسبب التغير في الظروف الجوية من ناحية، وصعوبة التلقيح بالنيماتودا من ناحية أخرى، فمن المتوقع أن يهرب عدد كبير من النباتات من الإصابة ومن ثم يتحتم زيادة عدد المكررات.

١- توضع صينية إنبات متعددة الفجوات البلاستيكية (٨ صفوف × ٥ أعمدة)، وسعة كل فجوة ٥٠ سم^{3} تربة في صينية أكبر للإكثار تحتوي قاعدتها على ثقوب للصرف، ثم تملأ الفجوات (الأصص) بخليط (١ : ٣ حجم/حجم) من الكومبوست والفيرميكيولايت الزراعي. بعد ذلك توضع الصواني في الماء ليتشرب الكومبوست بالماء، وبعد الصرف توضع كل صينية على حدة في صينية أخرى مماثلة في الحجم غير مثقبة وتغطى بغطاء شفاف نظيف.

٢- توضع البذور النابتة في الفجوات (الأصص) بمعدل بذرة/أصيص، وخمس بذور (خمس مكررات) لكل صنف في كل عمود. ويجب أن تحتوي كل صينية على ستة أعمدة للأصناف المختبرة وعمود واحد لصنف معلوم المقاومة، وعمود أخير لصنف معروف بقابليته للإصابة.

٣- تترك البادرات لتنمو لمدة ثلاثة أسابيع على درجة حرارة ١٢/١٥ °م (نهار/ليل) و٨/١٦ ساعة (ضوء/ظلام)، أو حتى ظهور أول ورقة ثلاثية مركبة حيث تصبح البادرات جاهزة للعدوى حينئذ.

٤- يستخلص اللقاح من النباتات المصابة أو من المزارع النيماتودية خارج الأنسجة الحية *In vitro* كما يأتي:

الاستخلاص من النباتات المصابة Infected plants: تجمع البراعم المصابة والمدادات التي تظهر عليها أعراض الإصابة سواء من الحقل أو من الأصص، وتقطع الأوراق والجذور وأي أنسجة تظهر عليها أعراض الموت أو التعفن (لكي يتم التخلص من الفينولات والكلوروفيل). بعد ذلك، تغسل الأجزاء النباتية على منخل سعة ثقوبه ١ – ٢ مم لكي يتم التخلص من الكومبوست، والمتطفلات الخارجية وحبيبات التربة. ثم تقطع الأجزاء النباتية إلى قطع صغيرة بطول ٥ مم، وتستخلص النيماتودا منها بطريقة طبق وايتهيد Whitehead tray المحورة، أو بطريقة غرفة الرذاذ Mist extraction chamber.

الاستخلاص من المزارع النيماتودية خارج الأنسجة الحية In vitro cultures: تختار أطباق بتري لأنسجة الكالس المصابة التي تحتوي النيماتودا الحية النشطة الموجودة في غطاء الطبق وبيئة الآجار. تقطع أنسجة الكالس والآجار بواسطة ملقط وتستخلص النيماتودا منها وكذلك تجمع النيماتودا من أغطية الأطباق في طريقة طبق وايتهيد Whitehead tray المحورة أو في غرفة الرذاذ.

٥- تجمع النيماتودا بعد ٢، و٢٤، و٤٨ ساعة. وفي كل مرة (توقيت)، ترسب النيماتودا التي تم جمعها على درجة حرارة ٢ – ٤ °م ويتم التخلص من الجزء الرائق supernatant ثم يعاد إضافة ماء جديد. وبهذه الطريقة يتم التخلص من الفينولات النباتية والكلوروفيل التي من الممكن أن تتسبب في إضعاف نشاط النيماتودا.

obeikandi.com

٦- توضع النيماتودا بكاملها في حجم معلوم، ويتم تهويتها، وتقسم إلى عينات صغيرة يتم فيها عدّ النيماتودا، ومنها يتم حساب العدد النهائي من النيماتودا.

٧- يخفض الحجم النهائي للنيماتودا ويضبط بحيث يتم الحصول على كثافة لقاح قدرها ١٠٠٠٠ نيماتودا/مل تقريباً (١٠ نيماتودا/ميكروليتر). يتم تهوية النيماتودا، ثم ترسب على درجة حرارة ٢ - ٤ °م ، ثم تزال نصف كمية المعلق ويضاف عوضاً عنها كمية مساوية من الكاربوكسي ميثايل سليولوز ٢٪.

٨- يتم تلقيح البادرات بواسطة قطرة من المعلق النيماتودي حجمها ١٠ ميكروليترات توضع على النسيج المرستيمي الابتدائي على محور الورقة الثلاثية (الشكل رقم ٥,٢). وهكذا، حتى يتم تلقيح البادرات جميعاً. ويلاحظ تحريك المعلق النيماتودي باستمرار لضمان التوزيع المتساوي للنيماتودا فيه. تغطى كل صينية بعد ذلك بغطاء نظيف شفاف لضمان بقاء نسبة عالية من الرطوبة.

٩- تؤخذ قطرات (عينات) من بداية ونهاية كل صينية، وتعدّ فيها النيماتودا لضمان تجانس النيماتودا في اللقاح.

١٠- تتم إعادة تلقيح البادرات كما سبق بعد ٢ - ٧ أيام من التلقيح الأول، ولكن بطريقة عكسية، فيبدأ التلقيح من آخر بادرة لقحت في الاختبار الأول ويستمر راجعاً حتى أول بادرة تم تلقيحها في هذا الاختبار، وذلك لخفض فرص حدوث هروب أية بادرة من الإصابة.

١١- ترفع البادرات بعد ذلك بحوالي أسبوع وتصبغ كلياً بطريقة الفوكسين الحامضي (Byrd *et al.*, 1983) لتحديد الأطوار النيماتودية داخل البادرة، وكذلك أول ظهور للإناث واضعة البيض. ويمكن رؤية تطور الأعراض بعد ٣ و٦ أسابيع من العدوى، ويتم تسجيل حدوث أي تضخم في حجم الخلايا Hypertrophy، أو سرعة في انقسامها Hyperplasia، أو انتفاخات أو تقزم في الأنسجة المرستيمية والأوراق وأعناقها.

١٢- يمكن تقدير عشائر الجيل الثاني من النيماتودا بعد ٤-٦ أسابيع من العدوى، وذلك بعدّ الأطوار الحية من النيماتودا المستخلصة من البادرات.

تقييم مقاومة أصناف الفول لنيماتودا السيقان والأبصال *Ditylenchus dipsaci*

Screening field beans for resistance to *Ditylenchus dipsaci*

تم تطوير عدة طرق مختلفة لتقييم مقاومة أصناف الفول لنيماتودا السيقان والأبصال *D. dipsaci*، سواء تحت الظروف الحقلية أو البيت الزجاجي أو المختبر، وذلك باستخدام تربة ملوثة طبيعياً أو صناعياً بالنيماتودا، أو بإجراء العدوى المباشرة للنباتات محل الاختبار.

التقييم الحقلي Field evaluation

١- تجمع كميات كبيرة من السيقان النباتية المصابة من الحقول، وتقطع إلى قطع صغيرة بطول ٢ سم، وتخلط جيداً مع التربة لتعطي كثافة نيماتودية قدرها ٣٠٠ نيماتودا/سم^3 تربة.

٢- تنبت البذور في حفر مفتوحة، طولها ١م، وتبعد عن بعضها بمسافات ٥٠ سم، ويلاحظ زراعة صنف قابل للإصابة مع كل خمسة أصناف مختبرة. تغطى جميع البذور بطبقة ارتفاعها ١٥ سم من التربة الملوثة بالنيماتودا، ويتم الري مباشرةً. وقد استخدم عباد وآخرون .Abbad *et al* (1990) معلقاً مائياً يحتوي على ٣٠٠ نيماتودا/بادرة عمرها شهر واحد.

٣- تسجل الأعراض المرضية عندما تخرج ٨٠٪ من القرون، حيث تكون الأعراض قد تكشفت بوضوح على الصنف المقارن القابل للإصابة، ويتم التسجيل بناءً على وجود وطبيعة العرض (Hanounik *et al*., 1986).

اختبارات الأصص Pot tests

١- توضع البذور على سيليكا طمية (Vermex M®, Effisol, France) على درجة حرارة ٢٣ °م. ثم تنقل بعد ٤-٥ أيام إلى أصص بواقع بذرة/أصيص يحتوي على كومبوست عضوي معقم بالبخار تحت ضغط، وذلك بمعدل ٣٠ أصيص/صينية، ثم تنقل الصواني إلى غرفة نمو متحكم بها على درجة حرارة ١٥ °م ، و١٦ ساعة ضوء.

٢- يستخلص اللقاح من الأنسجة الجافة لنباتات مصابة حتى يمكن الحصول على الأطوار ما قبل الكاملة من النيماتودا، ثم تقطع الأنسجة الجافة على منخل سعة ثقوبه ٢٠ ميكروميتراً وتنقع في الماء. تجمع بعد ذلك النيماتودا كل ساعتين، ويرسب كل مستخلص على درجة حرارة ٢ - ٤ °م. ويتم التخلص من المعلق ويضاف عوضاً عنه ماء نظيف.

٣- توضع النيماتودا المستخلصة في حجم معلوم من الماء ويتم تهويته، ثم يؤخذ منها عينات تعدّ فيها النيماتودا، ويحسب العدد النهائي للنيماتودا. بعد ذلك يخفض حجم المعلق، وذلك بترسيب النيماتودا وإنقاص حجم الماء للحصول على كثافة لقاح تساوي ٢٠٠ نيماتودا/١٥ ميكروليتر ماء.

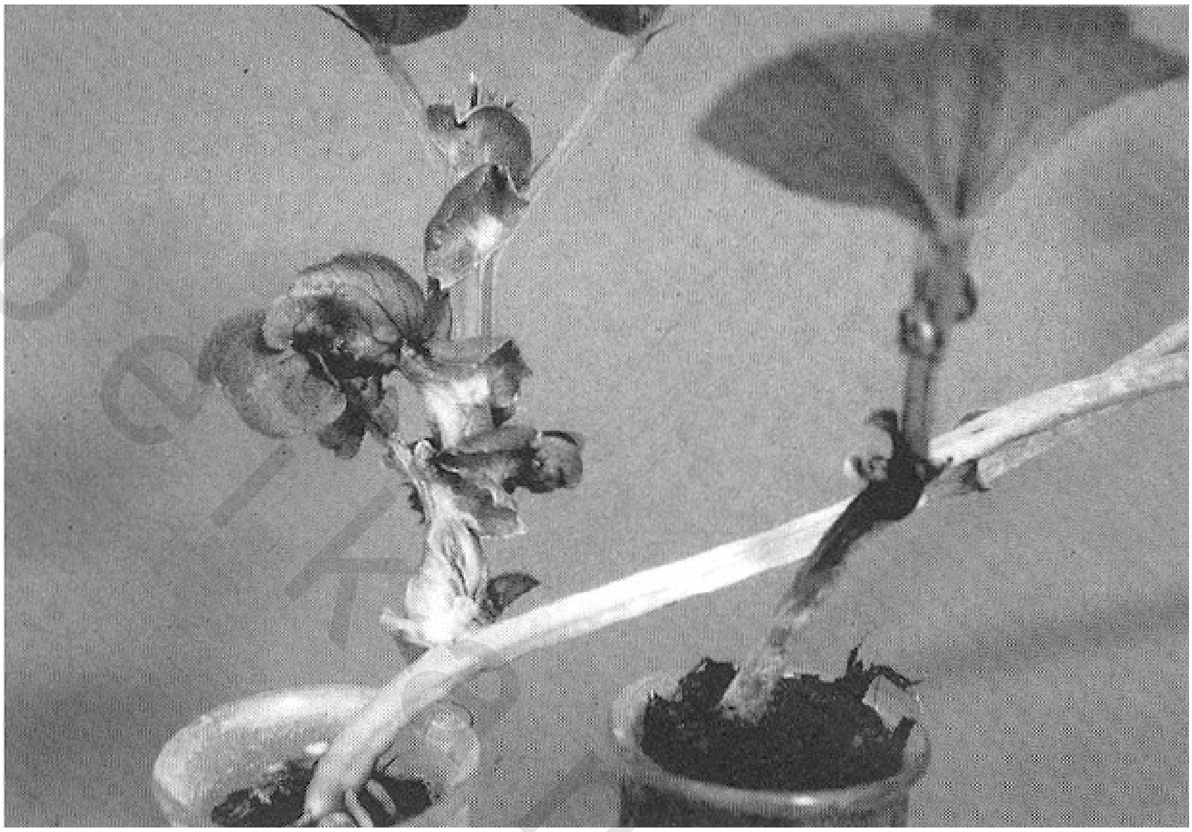
٤- يضاف حجم مساو من الكاربوكسي ميثايل سليولوز ٢٪ للحصول على ١٠٠ نيماتودا/١٥ ميكروليتر/قطرة، ويوفر هذا المحلول التصاقاً جيداً على النبات مما يسمح بزيادة نسبة اختراق النيماتودا للنبات.

٥- تلقح البادرات عمر عشرة أيام، وذلك بوضع قطرة (١٥ ميكروليتراً) على الأذينة Stipule الأولى. بعد ذلك تغطى كل صينية لتوفير الرطوبة عدة أيام.

٦- تؤخذ قطرات (عينات) عند بداية ونهاية كل صينية لتقدير تجانس اللقاح.

٧- يتم تقدير تطور الأعراض بعد شهرين من التلقيح، وتسجل أعراض الانتفاخ والتقزم والموت الموضعي في السيقان والأوراق (الشكل رقم ٥،٥).

٨- يتم تقدير معدل تكاثر النيماتودا في كل نبات؛ وذلك بتمزيق الأنسجة النباتية في خلاط، ويركز أو يخفف المعلق وتعدّ النيماتودا في عينات لتقدير العدد الكلي للنيماتودا/نبات. بعد ذلك يتم حساب معدل تكاثر النيماتودا (= الكثافة النهائية للنيماتودا ÷ ١٠٠) الذي يتناسب مع معدل ظهور الأعراض.



الشكل رقم (٥,٥). نباتات فول *Vicia faba* بعد تلقيحها بالسلالة العملاقة من النيماتودا *Ditylenchus dipsaci*. إلى اليسار: نبات قابل للإصابة، وإلى اليمين: نبات مقاوم.

تقييم مقاومة أصناف محاصيل الحبوب لنيماتودا السيقان والأبصال *Ditylenchus dipsaci*

Screening cereals for resistance to *Ditylenchus dipsaci*

يتم تقييم أصناف محاصيل الحبوب في البيوت الزجاجية بأفضل فاعلية ممكنة أثناء الموسم الطبيعي لحدوث العدوى في الحقول (أي في فصل الشتاء أو أوائل الربيع). وإذا لم تتوفر تلك الظروف، فإن الظروف المتحكم بها تكون هي البديل المناسب، بحيث تتم محاكاة الظروف الموسمية للمحصول المراد اختباره. وكلما طالت فترة نمو النباتات بعد التلقيح، سمح ذلك للنيماتودا بالتكاثر، وللأعراض المرضية بالتكشف قبل أن تدخل النباتات في مرحلة التكشف والاستطالة.

١- تزرع ٨ - ١٠ بذور نابتة من كل صنف في دائرة يبعد محيطها ٢ سم إلى الداخل من المحيط الخارجي للأصص ذات القطر ١٥ سم التي تحتوي على تربة عضوية أساسها الكومبوست. يوضع كل أصيص في صينية صغيرة لكي يتم الري بعد ذلك من أسفل، وترتب الأصص في ترتيب عشوائي. ويجب أن يحتوي كل عمود من الأصص على جميع الأصناف المختبرة وكذلك صنفي مقارنة، أحدهما مقاوم والآخر قابل للإصابة.

٢- تتم عدوى البادرات بمجرد ظهور الريشة Coleoptile.

٣- يجمع القش الجاف من النباتات المصابة، وتنقع ٣-٤ خلفات نباتية في الماء العادي لمدة ساعتين (وذلك لمنع حدوث أية أضرار للنيماتودا عند استخلاصها)، ثم تشق كل قشة طولياً تحت مجهر التشريح وتوضع في طبق وايتهيد Whitehead tray المحوَّر لاستخلاص النيماتودا منها طوال الليل Overnight. يتم بعد ذلك عدّ النيماتودا المستخلصة، ويحسب العدد المطلوب من الخلفات النباتية للحصول على كثافة لقاح ابتدائي = ١٠٠ - ٢٠٠ نيماتودا/بادرة. تستخلص النيماتودا (انظر بروتوكول البقوليات) وتعدّ مرتين يومياً لمدة ٤٨ ساعة. وفي كل مرة، ترسب النيماتودا على درجة حرارة ٢ - ٤ °م قبل التخلص من المعلق الزائد وإضافة ماء نظيف للتخلص من الفينولات النباتية التي قد تضر بنشاط النيماتودا.

٤- تجمع النيماتودا جميعها بعد ذلك في حجم معلوم من الماء وتؤخذ عينات للعدّ وحساب العدد النهائي من النيماتودا في هذا الحجم، ثم يخفض الحجم بعد ذلك ليعطي كثافة نهائية من النيماتودا قدرها ١٠ - ٢٠ نيماتودا/ميكروليتر. تترك النيماتودا لترسب، ثم يشفط نصف المعلق، ويضاف عوضاً عنه كمية مساوية من الكاربوكسي ميثايل سليولوز ٢٪ ويخلط الجميع.

٥- يتم تلقيح البادرات بوضع قطرة حجمها ٥ - ١٠ ميكروليترات من المعلق (١٠٠-٢٠٠ نيماتودا) مباشرةً داخل الريشة. ويتم ذلك باستخدام محقن تحت البشرة أو ماصة دقيقة. ويبدأ العمل بإزاحة جزء من الكومبوست حول قاعدة البادرة التي سيتم تلقيحها، ثم يتم عمل أي من الإجراءين التاليين:

أ) يملأ محقن تحت البشرة بمعلق جيد الخلط من النيماتودا، ثم تدخل إبرة المحقن في قاعدة الريشة بزاوية ٤٥ درجة، ويدفع اللقاح مباشرة في الغلاف. وقد يشعر القائم بالعمل ببعض المقاومة عند دخول المعلق في الغلاف، وقد تظهر قطرة صغيرة من المعلق عند قمة الريشة. ويجب الحذر عند إجراء الحقن فلا يسمح لإبرة المحقن بالدخول مستقيمة في الريشة، بل مائلة بزاوية ٤٥ درجة. وتتطلب هذه العملية التمرين المستمر حتى يتم إتقانها تماماً. ويجب أن تكون هناك كمية زائدة من اللقاح دائماً حيث تنسد إبرة المحقن أحياناً وتحتاج إلى استبدالها. كما يجب ملاحظة أن المحافظة على توزيع النيماتودا في المعلق في هذه الطريقة يكون دائماً أمراً صعباً، ومن ثم تتغير كثافة اللقاح وكميته التي تحقن داخل النبات دائماً.

ب) وهي طريقة بديلة لتلك التي ذكرت في (أ) وتجرى باستخدام مشرط لعمل شق طولي في قاعدة الريشة، وفيه يوضع اللقاح باستخدام ماصة دقيقة (يجب الحذر من فقد اللقاح وذلك بالتأكد من أنه قد وضع بالكامل داخل الأنسجة الحديثة للورقة داخل الريشة).

٦- تعاد كمية الكومبوست التي تمت إزالتها من حول قاعدة الريشة في البداية إلى مكانها، ويجب التأكد من توفر كمية مناسبة من الرطوبة وذلك بتغطية كل أصيص بواسطة كيس من البلاستيك لمدة أسبوع بعد التلقيح.

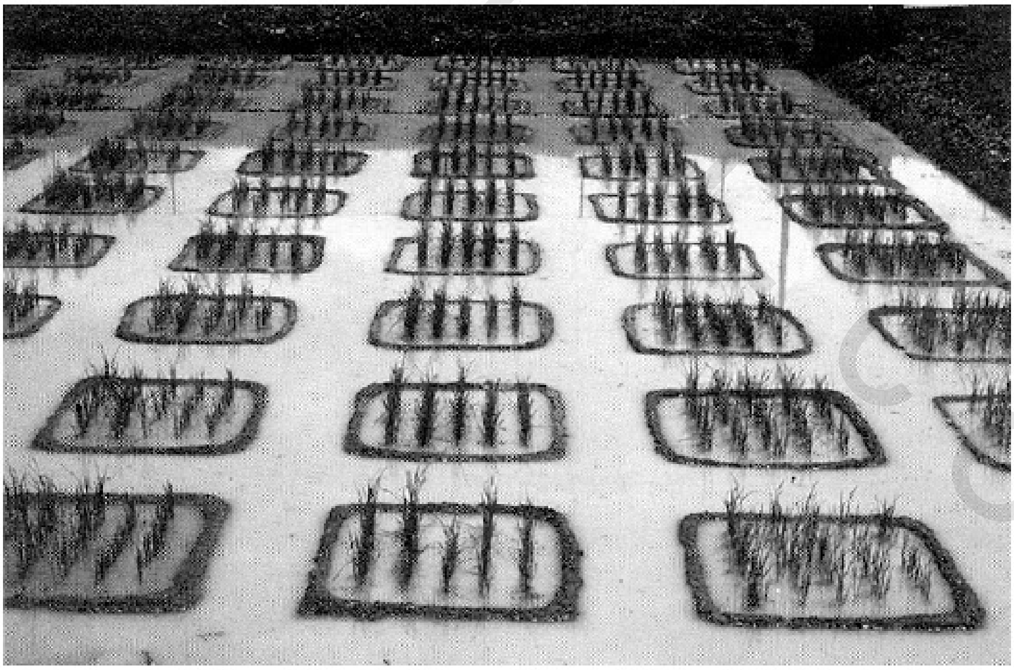
٧- يتم التأكد من حدوث الاختراق والعدوى، وذلك بصبغ عدد إضافي من البادرات بوضعه في كلوركس/فوكسين حامضي (Byrd *et al.*, 1983)، وذلك بعد أسبوعين من العدوى. تسجل الأعراض المرئية على النباتات بعد حوالي ٤ – ٦ أسابيع (بالقياس إلى نباتات المقارنة). تتم حساب الكثافة النهائية للنيماتودا في النباتات، وذلك بشق الخلفات النباتية طولياً حتى القاعدة، واستخلاص النيماتودا منها بطريقة طبق وايتهيد المحوَّرة Whitehead tray، ثم يتم عدّ البيض والأطوار اليرقية للنيماتودا.

تقييم مقاومة الأرز لنيماتودا سيقان الأرز

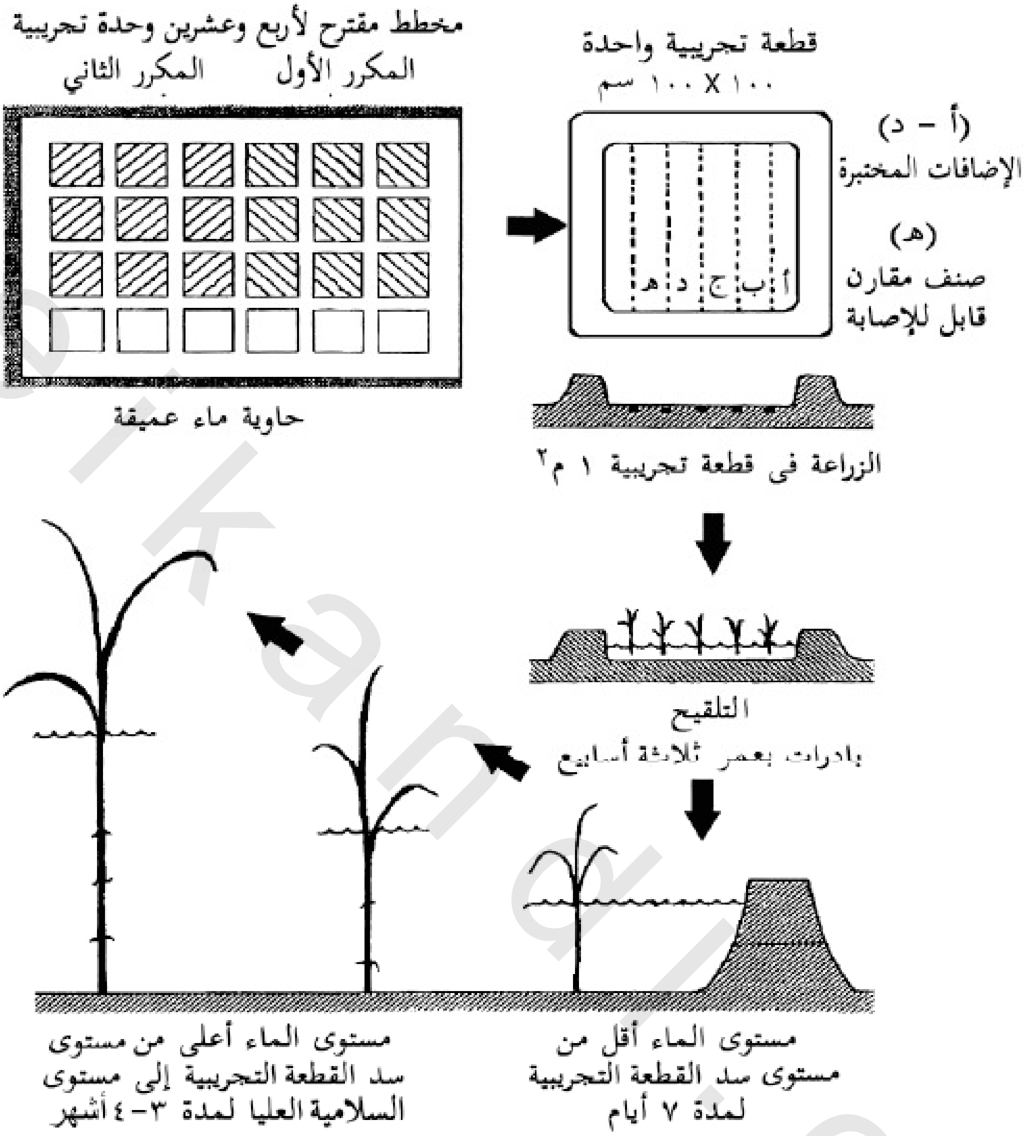
Screening rice for resistance to *Ditylenchus angustus*

الاختبارات الحقلية Field tests

تتطلب الاختبارات الحقلية لصفة المقاومة في حقول الأرز المروي بناء أحواض كبيرة يمكن ملؤها بالماء بطريقة متحكم بها حتى عمق ٢ – ٣ م (الشكل رقم ٥,٦). أما اختبارات المقاومة في حقول أرز المنخفضات فتتطلب فقط صناديق عادية تملأ حتى ارتفاع ٣٠ – ٤٠ سم. ويجب ألا يتم الاختبار في غير وقت الموسم الطبيعي (فعلى سبيل المثال، لا يتم اختبار المقاومة في الأرز المروي خلال الموسم الجاف بسبب حساسية ديناميكية عشائر النيماتودا للرطوبة الجوية). وقد تم تحوير هذا البروتوكول بواسطة رحمان Rahman (1982)، و Anon (1985).



الشكل رقم (٥,٦). أحواض حقلية لاختبار مقاومة أصناف الأرز عميق المياه لمرض "أوفرا Ofra" الذي تسببه نيماتودا سيقان الأرز *Ditylenchus angustus* (أخذت الصورة في مرحلة تلقيح النباتات، انظر أيضاً الشكل رقم ٥,٧).



الشكل رقم (٥,٧). شكل تخطيطي لبروتوكول اختبار صفة المقاومة تجاه نيماتودا سيقان الأرز *Ditylenchus angustus* في الأرز المروي عميق المياه، انظر أيضاً الشكل رقم (٥,٦).

١- يقسم الحوض الكبير إلى قطع تجريبية plots بمساحة ١ م^2، ويوضع فيها الطين بارتفاع ١٥ – ٢٠ سم. ويجب أن تكون هناك ممرات بعرض ١ م بين القطع التجريبية.

٢- تزرع بذور أصناف الأرز في صفوف على مسافات ٢٠ سم، تخفف إلى ٢٠ بادرة/ صف. ويجب أن تحتوي كل قطعة تجريبية على صنفي مقارنة، أحدهما مقاوم والآخر قابل للإصابة، وثلاثة أصناف اختبار.

obeikandl.com

٣- تلقح البادرات بنيماتودا سيقان الأرز *D. angustus* بعد ٢ – ٣ أسابيع من الزراعة أو عندما تكون ياقة غمد الورقة على ارتفاع ١٠ – ١٥ سم من سطح التربة.

٤- يرفع مستوى الماء في القطع التجريبية إلى حوالي ١٠ سم قبل إجراء التلقيح، ومن المهم ألا تكون النباتات غاطسة بكاملها في الماء.

٥- تجمع كمية كافية من النباتات من المزارع النيماتودية تكفي للحصول على كمية كافية من اللقاح لإجراء التقييم. تقطع أغماد الأوراق فوق أعلى عقدة من الساق في النباتات المصابة إلى قطع عرضية بطول ٣ سم وتخلط خلطاً جيداً. تؤخذ عينة بعد الخلط، وتمزق أنسجة النباتات طولياً في الماء وتترك لاستخلاص النيماتودا طوال الليل Overnight. يحسب عدد النيماتودا في كل قطاع عرضي من الساق، ومنها يمكن حساب عدد القطع الساقية المطلوبة للحصول على كثافة لقاح = ١٠٠ نيماتودا/بادرة (=١٠٠٠٠ نيماتودا لكل قطعة تجريبية).

٦- يقطع العدد المطلوب من السيقان النباتية المصابة إلى قطع صغيرة، ثم تشق هذه القطع طولياً وتعوّم على سطح الماء في القطع التجريبية.

٧- بعد التلقيح، يتم الحفاظ على مستوى الماء في القطع التجريبة تحت مستوى ياقة البادرة Seedling collar بحوالي ٢ سم لمدة سبعة أيام. وإذا تأخر التلقيح، فإن مثل هذه النباتات تستطيل، ومن ثم يرتفع مستوى العقدة المرستيمية فوق الماء، ولا تتم العدوى.

٨- بعد سبعة أيام من حدوث الاختراق للنباتات المختبرة بواسطة النيماتودا، يجب أن يرتفع مستوى الماء كلما ارتفعت أطوال النباتات فوق مستوى القطع التجريبية، وذلك للحفاظ على مستوى الماء عند نفس الموقع النسبي فوق مستوى أعلى عقدة مرستيمية.

٩- وبعد ٣-٤ أشهر -ولكن قبل التزهير- يتم تسجيل الأعراض على أحدث ورقة نباتية في جميع الخلفات النباتية في كل صف row (الشكل رقم ٥,٤). ترفع عشرة نباتات بطريقة عشوائية وتقطع الخلفة الرئيسية عند مستوى الورقة الوسطية. بحيث يتم الحصول على قطع طولها ١٠ سم من كل خلفة فوق مستوى العقدة القمية. تقطع هذه القطع، وتمزق أنسجتها في الماء، وتترك لاستخلاص النيماتودا منها طوال الليل.

١٠- يتم تقدير نسبة الخلفات المصابة بكل تركيب نباتي Entry، وكذلك عدد النيماتودا/خلفة.

اختبارات البيوت الزجاجية Glasshouse or screenhouse tests

تم تحوير هذا البروتوكول عن بلاورايت وجيل Plowright and Gill (1994).

١- تزرع البذور في أصص صغيرة مستطيلة (١٠٠ سم^{3}) موضوعة في صينية عميقة بدون ثقوب للصرف تسمح بوجود الماء فيها حتى ارتفاع ١٠ سم فوق مستوى سطح التربة في الأصص. تخف البادرات بعد الإنبات إلى

obeikandi.com

بادرة/أصيص (وفي كل صينية تحتوي ٢٠ أصيص، تخصص أربعة أصص لصنف مقاوم معروف، وأربعة أخرى لصنف قابل للإصابة معروف).

٢- بعد ١٢ يوماً من الزراعة، أو عندما يبلغ ارتفاع ياقة البادرة ١٠ سم، يُرفع مستوى الماء إلى ٨ سم. وإذا كان الماء المستخدم بارداً، يترك ٢٤ ساعة لمعادلة درجة حرارته قبل إجراء التلقيح.

٣- تستخلص النيماتودا من مزرعة وحيدة نوع النيماتودا Monoxenic culture. ويمكن الحصول على النيماتودا *D. angustus* أيضاً من غطاء طبق بتري الذي يحتوي مزرعة لهذه النيماتودا، أو من على سطح الآجار، ويتم جمع هذه المحتويات في قمع بيرمان المحوَّر لاستخلاص النيماتودا (Hooper, 1986). وبعد الاستخلاص، يخفف معلق النيماتودا للحصول على حجم من اللقاح قدره ١ مل، ويحتاج هذا المعلق إلى التحريك الدائم لعدم تجمع النيماتودا.

٤- توضع أنبوبة قطرها ١ – ٣ سم حول كل بادرة في الصينية وتثبت الأنابيب بسلك أو خلافه مما يمكن إزالته بعد ذلك، وتلقح كل بادرة داخل الأنبوبة بحوالى ٣٠٠ – ٥٠٠ يرقة طور ثالث أو رابع أو طور كامل (الشكل رقم ٥,٣).

٥- بعد سبعة أيام من التلقيح، تزال الأنابيب المحيطة بالبادرات المصابة بالعدوى.

٦- يمكن تسجيل نوع وشدة الأعراض (الشكل رقم ٥,٤) التي تظهر على النباتات المصابة بالعدوى بعد سبعة أيام من التلقيح، وتكرر هذه الخطوة للتأكيد بعد سبعة أيام أخرى.

٧- عند الحاجة لعدّ النيماتودا في النباتات، تقطع النباتات عند مستوى سطح التربة بعد ٢٨ يوماً من العدوى، وتزال أوراقها، وترقم، وتحفظ إما بالتجميد، أو في فورمالدهيد (٤٪ حجم : حجم). وإذا تم الحفظ في الفورمالدهيد يجب تغطيس النباتات في ماء مغلي لمدة دقيقة واحدة قبل الحفظ في الفورمالدهيد.

٨- ولعدّ النيماتودا، تصبغ النباتات في فوكسين حامضي بارد (٠,٠١٪ وزن : حجم) طوال الليل Overnight، ثم توضع في خليط من حامض اللاكتيك والجليسرول والماء المقطر (١ : ١ : ١). بعد ذلك تمزق الأنسجة النباتية عند أغماد الأوراق أو بضربها في الخلاط، وذلك لتحرير النيماتودا. ونظراً لأن النيماتودا *D. angustus* هي متطفلات خارجية، فإنه يفضل دائماً استخدام طرق تمزيق الأنسجة حيث يحتوي معلق النيماتودا الناتج منها على بيض وأطوار نيماتودية نظيفة يمكن عدها بسهولة.

الشراسة الإمراضية للنيماتودا
Nematode Virulence

ورد الحديث عن وجود سلالات داخل نوع نيماتودا السيقان والأبصال *D. dipsaci*، كما ورد الحديث أيضاً عن الأداء المحصولي الجيد لبعض الأصناف في تربة ملوثة بتلك النيماتودا. أما الدليل عن وجود طرز إمراضية

من النيماتودا *D. dipsaci* فقد ظهر في الخمسين سنة الماضية، وبطريقة لا تقبل الشك في بعض الحالات. ولذلك، فإنه يجب التحقق من وجود الطرز الإمراضية، وذلك عن طريق إجراء اختبارات التقييم لعدد كبير من العشائر النيماتودية.

وردت أيضاً بعض التقارير حول صفة الشراسة الإمراضية في سلالات البرسيم الأبيض من النيماتودا. وقد كانت السلالات النباتية من البرسيم الأبيض المختبرة هي الجيل السادس من سلالات داخلية التربية Inbreds تقترب من درجة السلالات المتماثلة Isogenic lines، وتختلف فيما بينها فقط في درجة مقاومتها أو قابليتها للإصابة، وتتشابه مظهرياً Phenotypically مع الهجين الأول F1 لسلالات مقاومة وأخرى قابلة للإصابة نتجت من آباء تم اختيارها بدقة. وقد كانت صفة المقاومة في كلا المجموعتين من البرسيم الأبيض فعالة تجاه عشائر النيماتودا التي تم جمعها من بريطانيا، وفرنسا، ونيوزيلاندة، ولكنها كانت غير فعالة بالكلية تجاه العشائر السويسرية (اتصالات شخصية مع مايزن K. A. Mizen, 1999). وقد كان وجود الطرز الإمراضية Pathotypes واضحاً أيضاً في حالة أخرى، هي تكاثر عشيرة حقلية من النيماتودا *D. dipsaci* على سلالة متماثلة الزيجوت Homozygous عالية المقاومة من الفول *Vicia faba* هي السلالة "INRA 29H". وقد تم تسجيل هذه الشراسة الإمراضية أيضاً في عشيرة حقلية مفردة من النيماتودا *D. dipsaci* في المغرب تسبب انتفاخات شديدة ومعدل عالٍ من التكاثر على البرسيم الأبيض.

تم وصف طراز إمراضي قادر على كسر صفة المقاومة في نباتات البرسيم الحجازي من كل من: سلالة البرسيم الحجازي للنيماتودا *D. dipsaci* (Smith, 1951 ؛ Grundbacher and Stanford, 1962 ؛ Whitehead, 1984)، وكذلك السلالة العملاقة (Sturhan, 1965). كما وجد وايتهيد Whitehead (1984 ؛ 1992)، ووايتهيد وآخرون Whitehead *et. al.* (1987) أن الأصناف المفترض أنها أصناف مقارنة كانت في الواقع قابلة للإصابة ببعض العزلات الأوروبية من النيماتودا *D. dipsaci*، واستخلصوا من ذلك أن هناك تغيرات يمكن تفسيرها بأنها تعود إلى وجود طرز إمراضية مختلفة داخل سلالات نيماتودا السيقان *D. dipsaci*. إلا أن المشكلة في هذا الاستنتاج هي أنهم لم يستبعدوا مصدرين هامين من التغير يمثلان شكاً حول هذه الطرز الإمراضية. المصدر الأول منهما هو أن الأصناف التي شملها الاختبار كانت متباينة الزيجوت Heterozygous، والثاني هو الخطأ في تصنيف النباتات إلى مقاوم وقابل للإصابة، حيث هربت بعض النباتات من الإصابة بسبب عدم نجاح عملية تلقيحها بالنيماتودا. وقد تؤدي النسب العالية من هروب النباتات من الإصابة في الاختبارات الأولية إلى فقد ظاهر في المقاومة في الاختبارات التالية التي تكون نسبة الهروب فيها قليلة. وعادة ما تكون أصناف البرسيم الحجازي متباينة الزيجوت وتحتوي تراكيب وراثية مقاومة وأخرى قابلة للإصابة، ومن هنا يجب أن يكون عدد النباتات المختبرة كافياً ليعكس هذا التغير. وإضافة إلى ذلك، وجد وايتهيد وآخرون Whitehead *et al.* (1987) أنه من الصعب تلقيح النباتات وتكاثر النيماتودا على الأصناف المعروفة بقابليتها للإصابة حيث كانت النتائج متغيرة. ومن بين العشائر

النيماتودية الأخرى، وجد وايتهيد Whitehead (1992) الدليل من خلال بعض تجارب الأصص حول تغير الطرز الإمراضية للنوع *D. dipsaci* التي جمعها من حقلين مختلفين في مزرعة واحدة في جنوب إنجلترا. وبالرغم من أن إدارة النيماتودا في هذين الحقلين لم تخضع للمناقشة إلا أنه يبدو أنهما يحتويان طرزاً إمراضية مختلفة.

تعد ظاهرتا التغير داخل النوع Intraspecific variation، والتنوع الوراثي Genetic polymorphism من الظواهر المعروفة في النوع *D. dipsaci*. وقد وجد باركر وساسر Barker and Sasser (1959)، وشتيران Sturhan (1975) تداخلات بين عشيرة النيماتودا والصنف النباتي لكل من ؛ البازلاء، والفول البلدي، والفول الرومي. كما وصف شتيران Sturhan (1975) اختلافات واضحة في القدرة الإمراضية pathogenicity والشراسة الإمراضية Virulence بين العشائر النيماتودية. وقد وجدت بعض التغيرات في عشائر نيماتودا السيقان الأمريكية على النباتات القابلة للإصابة ولكنها لم تتغلب على صفة المقاومة في الأصناف التي اشتقت مقاومتها من الصنف "Lahontan" (Elgin *et al.*, 1977). كما أن هناك درجات مختلفة من القابلية للإصابة بنيماتودا السيقان في الثوم (Shubina, 1987). وليس هناك دليل على وجود طرز إمراضية قادرة على كسر صفة المقاومة من بين عشائر النوع *D. angustus* (اتصالات شخصية مع بلاورايت R.A. Plowright, 1999). وقد تظهر اختلافات في القدرة التكاثرية لعشائر النيماتودا على أصناف الأرز القابلة للإصابة، ولكنها نادراً ما تكون ثابتة عند تكرار التجارب. ويعود مصدر مثل هذه الاختلافات عادة إلى الاختلافات العملية المتعلقة بالمزرعة وإعداد اللقاح وطرق تطبيقه.

وراثة المقاومة والتراكيب الوراثية
Genetics of Resistance and Germplasm

تستمد بعض أصناف الشوفان البريطانية الشتوية مقاومتها من السلالة المحلية Grey Winter. وفي أصناف أخرى من الشوفان قد تستمد صفة المقاومة من السلالات المحلية والأوروجوية، ولكن في النهاية، كلا المصدرين من المقاومة قد نشأ من أنواع الشوفان البرية (Goody and Hooper, 1962 ؛ Griffiths *et al.*, 1957). وفي الأصناف التي تشتق مقاومتها من الصنف "Grey Winter"، تتوارث صفة المقاومة من خلال جين مفرد سائد، وقد أمكن إدخال هذه الصفة إلى العديد من أصناف الشوفان الشتوية في معهد IGER بويلز في بريطانيا. أما الشوفان البري *Avena indoviciana* فإنه يحتوي على أكثر من جين للمقاومة. وهناك عدد آخر من أصناف الشوفان التي وردت مقاومتها لنيماتودا السيقان (الجدول رقم ٥,١ ، Whitehead, 1997)، ولكن معظم هذه الأصناف كانت مقاومة جزئياً أو متحملة. وبالرغم من أن هذه التفاعلات قد تمثل تحكماً وراثياً مختلفاً، فإنه من الضروري إعادة اختبار هذه المصادر للمقاومة قبل استخدامها في أي منطقة جديدة.

تعد صفة المقاومة في البرسيم الحجازي صفة بسيطة التوراث، وتزداد بالانتخاب داخل أصناف البرسيم الحجازي متباينة الزيجوت. كما أنها تنتقل بسهولة بواسطة التهجينات الرجعية Back crosses، والانتخاب Selection. ويبدو أن هناك أيضاً جيناً سائداً يتحكم في صفة المقاومة في بعض الأصناف ويتوارث رباعياً Tetrasomically، بمعنى أن النبات قد يحتوي أليلاً أو اثنين أو ثلاثة أو أربعة أليلات للمقاومة. أما مصدر المقاومة المستخدم في برامج التربية الأمريكية فقد نشأ من عشائر البرسيم الحجازي في تركستان التي يتم تربيتها في ولاية يوتا Utah الأمريكية، وقد نتج الصنف "Nemastan" من الانتخابات المتكررة التي تمت أثناء ذلك، واستخدم فيما بعد كمصدر للنباتات الأموية للصنف "Lahontan" الذي يعطى ٥٠ – ٦٠٪ نباتات مقاومة. وفي السويد نشأ الصنف "Alfa II" (٧٠٪ من نباتاته مقاومة) من ٥٠٠ نبات مقاوم تم تعريفها من بين ٢٥٠٠٠ بادرة من العشائر الأبوية. وتعد صفة المقاومة المتوفرة في الصنفين؛ "Lahontan"، و"Vertus" صفة فعالة تجاه عشائر نيماتودا السيقان في العالم. أما صفة المقاومة في البرسيم الأحمر فقد تم انتخابها من الأصناف التجارية القديمة. ويبدو أن هذه الصفة فعالة تجاه جميع عشائر سلالة البرسيم الأحمر من هذه النيماتودا. وبالرغم من إمكانية وجود عزلات نيماتودية ذات مستويات مختلفة من التكاثر على أصناف البرسيم الأحمر، إلا أنه لا يوجد أى دليل ملموس يشير إلى إمكانية تغلب أي من عشائر النيماتودا على التراكيب الوراثية المقاومة من البرسيم الأحمر، برغم الضغوط الانتخابية المتكررة التي تتعرض لها تلك العشائر (Cook and Yeats, 1993). ويبدو أن صفة المقاومة في أصناف البرسيم الأحمر السويدية تتوارث عن طريق جينيين سائدين (Nordenskiold, 1971). وقد استخدمت بعض برامج التربية مصادر من البرسيم الحجازي والبرسيم الأحمر لإنتاج أصناف مقاومة (الجدول رقم ٥,١ ؛ Cook and Yeats, 1993 ؛ Whitehead, 1997).

ويبدو أن مقاومة البرسيم الأبيض لنيماتودا السيقان صفة بسيطة نسبياً، حيث تزداد نسبة النباتات المقاومة بعد جيلين من الانتخاب وتنتج التهجينات بين نباتات الآباء جيلاً أولاً F1 تكون معظم نباتاته مقاومة، مما يدل على سيادة صفة المقاومة. وتحتوي العديد من الأصناف على نسبة من النباتات المقاومة على الرغم من أن بعض هذه الأصناف يوصف بأنه كامل المقاومة. ويحتوي الجدول رقم (٥,١) على قائمة بالأصناف التي تتميز ببعض الدرجات من المقاومة، والتي أوردها كوك وييتز Cook and Yeats (1993) و وايتهيد Whitehead (1997). ومثل هذه الأصناف – كأصناف البرسيم الحجازي والبرسيم الأحمر – هي أصناف متباينة الزيجوت وتتطلب الانتخاب المستمر أثناء دورات إنتاج البرسيم للمحافظة على مستوى المقاومة بها.

obeikandl.com

الجدول رقم (٥,١). الأصناف المحصولية والتراكيب الوراثية المقاومة لنيماتودا السيقان والأبصال *Ditylenchus dipsaci*.

المحصول	الاسم العلمي	الصنف/التركيب الوراثي	البلد	المرجع
برسيم حجازي	*Medicago sativa*	"Vertus"	السويد	Cook and Yeates (1993)
		"Nova"	أستراليا	
		"Washoe Lahontan"	أمريكا	
		"Resistador II"		
برسيم أبيض	*Trifolium repens*	"Line G49"	نيوزيلاندة	Mercer and Grant (1995)
	متحمل	"Sabeda"	نيوزيلاندة	West and Steele (1986)
		"Katrina"		
		"Alice"	بريطانيا	Cook and Evans (1988)
		"Donna"		
		"Aran"		
		"Pronitro"		
شيلم	*Secale cereale*	"Ottersum (land race) Heentvelder"	هولندا	Ritzema-bos (1922)
فول	*Vicia faba*	"INRA 29H"	فرنسا	Caubel and Le Guen (1983)
		"Several"		Castel (1990)
				Hanounik *et al.* (1977)
		"Souk el Arba"	المغرب	Schreiber (1977)
		"Pharb (land race)"		
برسيم أحمر	*Trifolium pratense*	"Sabtoron"	بريطانيا	
		"Norseman"		
شوفان	*Avena sativa*	"Grey Winter"		
		"Peniarth"		
		"Anita"	بلجيكا	Calmort (1985)
		"Bettong"	أستراليا	MacDaniel and Barr (1994)
	A. ludoviciana	"Cc 4346"	بريطانيا	Griffiths et al. (1957)

obeikandl.com

وفي الفول *Vicia faba*، يبدو أن المستوى العالي من المقاومة في السلالة "INRA 29H" (Rinal × Côtesd'Or) يتحكم فيه عدد من الجينات Polygenic وينتقل جزئياً أيضاً عن طريق السيتوبلازم. وقد استخدمت الأصناف المقاومة من الفول البلدى (الجدول رقم ٥،١) في فرنسا لتطوير أصناف مقاومة تستخدم في شمال إفريقيا. ويوصف صنفا البازلاء *Pisum sativum*؛ "Alma"، و"Glenroy" بأنهما صنفان متحملان لنيماتودا السيقان *D. dipsaci* في أستراليا (Scurrah *et al*., 1997). أما الصنف "Wando" فقد كان مقاوماً لإحدى عشائر النيماتودا *D. dipsaci* في ولاية كارولينا الشمالية الأمريكية، ولكنه قابل للإصابة بعشيرة أخرى (Barker and Sasser, 1959).

أما الدراسات التي أجريت على توارث صفة المقاومة تجاه نيماتودا سيقان الأرز *D. angustus* فقد اقترحت أن صفة المقاومة هي صفة متنحية وقد تكون محكومة بجينين اثنين (Anon., 1996). وفي معهد بحوث الأرز الدولي، ومعهد بحوث الأرز الفلبيني البنجلاديشي في جازيبور ببنجلادش، تم تعريف عدة عائلات نباتية تحتوي على صفة المقاومة، وتشمل أرز المنخفضات "IR63174" عميق المياه، وعدة عائلات من الأرز المروي، وعدداً آخر من الأصناف المقاومة (Rahman, 1994). تم أيضاً اكتشاف أصناف من البطاطس مقاومة لنيماتودا العفن الجاف في درنات البطاطس *D. destructor* في الصين (Anon., 1992 ؛ Lin *et al*., 1996 ؛ Whitehead, 1997).

ومن بين الأصناف والتراكيب الوراثية التي تم ذكرها فيما قبل، وفي الجدول رقم (٥،١)، وفي قائمتي كوك وييتز Cook and Yeates (1993)، ووايتهيد Whitehead (1997) نجد أن معظم هذه الأصناف تحتاج إلى التأكد من صلاحيتها قبل استخدامها كأصناف مقاومة أو آباء، أو أصناف تجارية. وقد يكون ذلك بسبب وجود تغيرات في التفاعلات بين النيماتودا والنبات كما تم وصفه في هذا الفصل. وقد تعود الاختلافات في النتائج أيضاً إلى وجود سلالات مختلفة وأيضاً طرزاً إمراضية مختلفة من النيماتودا. وإضافةً إلى ذلك، فإن العديد من المحاصيل المقاومة هي لأصناف خارجية التربية، وهي تتطلب انتخاباً متكرراً منتظماً للحفاظ على نسبة عالية من النباتات المقاومة أثناء إنتاج البذور. وهناك أيضاً استثناءات كثيرة في حالة البرسيم الحجازي والبرسيم الأحمر. ولكن بسبب ذلك، وربما أيضاً بسبب مقاومة محاصيل أخرى لنيماتودا السيقان *D. dipsaci* أو لأنواع أخرى من الجنس *Ditylenchus*، قد تكون طرق تحوير وتطوير الأصناف المحلية هي المصدر الأفضل للمقاومة. وسوف يسمح الاستخدام الحذر للبروتوكولات المذكورة في هذا الفصل للباحثين بتعريف النباتات (الفردية أو النسل النباتي) التي تحتوي على مقاومة عالية الفاعلية قابلة للتوارث عوضاً عن هذه الاختلافات الكمية.

المراجع

References

Abbad, F.A., Ammati, M. and Alami, R. (1990) Stem nematode in Morocco. Distribution and preliminary screening for resistance. *8th Congress Mediterranean Phytopathological Union*, Agadir, Morocco, pp. 347-349.

Alcaniz, E., Pinochet, J., Fernandez, C., Esmenjaud, D. and Felipe, A. (1996) Evaluation of *Prunus* rootstocks for root-lesion nematode resistance. *HortScience* 31, 1013-1016.

Ali, R. and Ishibashi, N. (1997) Growth and propagation of the rice stem nematode, *Ditylenchus angustus*, on rice seedlings and fungal mat of *Botrytis cinerea*. *Japanese Journal of Nematology* 26, 12-22.

Anon. (1985) The first international rice Ufra screening set (IRUSS). International Rice Research Institute, Philippines.

Anon. (1992) Insect and nematode management. *Annual Report of the International Potato Center*. International Potato Center, Lima, Peru, pp. 81-100.

Anon. (1996) Survey and monitoring of rice diseases. In: *Bangladesh Rice Research Institute, Annual Report for 1993*. Bangladesh Rice Research Institute, Bangladesh, pp. 108-111.

Barker, K.R. and Sasser, J.N. (1959) Biology and control of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*. *Phytopathology* 49, 664-670.

Bingefors, S. (1970) Resistance against stem nematodes, *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn) Filipjev. *European and Mediterranean Plant Protection Organization Publication Series A*. No. 54, 63-75.

Byrd, D.W., Kirkpatrick, T. and Barker, K.R. (1983) An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology* 15, 142-143.

Cameron, D. (1963) *Report of the Scottish Society for Research in Plant Breeding for 1962*. Pentlandfield, Edinburgh, UK.

Caubel, G. and Leclercq, D. (1989) Estimation de la resistance a la race geante de *Ditylenchus dipsaci* par les symptomes chez la feverole (*Vicia faba*, L.). *Nematologica* 35, 216-224.

Caubel, G. and Le Guen, J. (1983) Variability of relationships between *Vicia* bean and stem nematode (*Ditylenchus dipsaci*) characterization of varietal resistance. *First European Conference on Grain Legumes*, Angers, France, pp. 337-338.

Caubel, G., Bossis, M., Genier, G. and Guy, P. (1997) Mise au point d'un test de selection de luzernes resistantes a *Ditylenchus dipsaci*. *Sciences Agronomiques Rennes*, 25-32.

Clamot, G. (1985) Breeding for resistance to the cereal cyst nematode (*Heterodera avenae* Woll.) and to stem nematode (*Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Fil.) in Belgium. *Comptes Rendus des Séances de l'Académie d'Agriculture de France* 71, 751-760.

Cook, R. and Evans, D.R. (1988) Observations on resistance in white clover (*Trifolium repens* L.) to the stem nematode (*Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Fil.). *Journal of Agricultural Science* 110, 145-154.

Cook, R. and Yeates, G.W. (1993) Nematode pests of grassland and forage crops. In: Evans, K., Trudgill, D.L. and Webster, J.M. (eds) *Plant Parasitic Nematodes in Temperate Agriculture*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 305-350.

De Waele, D., Wilken, R. and Lindeque, J.M. (1991) Response of potato cultivars to *Ditylenchus destructor* isolated from groundnut. *Revue de Nématologie* 14, 123-126.

Dijkstra, J. (1957) Symptoms of susceptibility and resistance in seedlings of red clover attacked by the stem eelworm *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev. *Nematologica* 2, 228-237.

Elgin, J.H., Jr. (1984) Standard tests to characterize pest resistance in alfalfa cultivars. Agricultural Research Service, Beltsville, Maryland, 44 pp.

Elgin, J.H., Jr, Evans, D.W. and Faulkner, L.R. (1975) Swelling response of alfalfa seedlings to initial stem nematode infection. *Crop Science* 15, 435-437.

Elgin, J.H., Jr, Evans, D.W. and Faulkner, L.R. (1977) Response of resistant and susceptible alfalfa cultivars to regional isolates of stem nematodes. *Crop Science* 17, 957-959.

Eriksson, K.B. (1972) Studies on *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) with reference to plant resistance. Dr Agr. Thesis, Agricultural College of Sweden, Uppsala, Sweden, 108 pp.

Esquibet, M., Bekal, S., Castagnone-Sereno, P., Gauthier, J.P., Rivoal, R. and Caubel,, G. (1998) Differentiation of normal and giant *Vicia faba* populations of stem nematode *Ditylenchus dipsaci*: agreement between RAPD and phenotypic characteristics. *Heredity* 81, 291-298.

OpenArabic.com

Faulkner, L.R. and Darling, H.M. (1961) Pathological histology, hosts, and culture of the potato rot nematode. *Phytopathology* 51, 778-786.

Gastel, R. (1990) Resistenzprüfung von Ackerbohnene (*Vicia faba*) gegen das Stengelälchen (*Ditylenchus dipsaci*). Dissertation; Universität Hohenheim, Germany, 198 pp.

Goodey, J.B. and Hooper, D.J. (1962) Observations on attack by *Ditylenchus dipasci* on varieties of oats. *Nematologica* 8, 33-38.

Griffith, G.S., Cook, R. and Mizen, K.R. (1996) Effects of temperature on the white clover (*Trifolium repens*)/stem nematode (*Ditylenchus dipsaci*) host pest system. *Aspects of Applied Biology* 45, 239-246.

Griffith, G.S., Cook, R. and Mizen, K.R. (1997) *Ditylenchus dipsaci* infestation of *Trifolium repens*. Dynamics of infestation development. *Journal of Nematology* 29, 356-369.

Griffith, D.J., Holden, J.H.W. and Jones, J.M. (1957) Investigations on resistance of oats to stem eelworm, *Ditylenchus dipsaci* (Kühn). *Annals of Applied of Biology* 45, 709-720.

Grundbacher, F.J. and Stanford, E.H. (1962) Genetic factors conditioning resistance in alfalfa to stem nematode. *Crop Science* 2, 211-217.

Hanounik, S.B., Halila, H. and Harrabi, M. (1986) Resistance in *Vicia faba* to stem nematodes (*Ditylenchus dipsaci*). *FABIS Newsletter* 16, 37-39.

Hooper, D.J. (1984) Observations on stem nematode *Ditylenchus dipsaci* attacking field beans *Vicia faba*. *Rothamsted Experimental Station Report for 1983*, pp. 239-260.

Hooper, D.J. (1986) Culturing nematodes and related experimental techniques. In: Southy, J.F. (ed.) *Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes*. Her Majesty's Stationery Office, London, pp. 133-157.

Hooper, D.J. and Cowland, J.A. (1988) Courgette marrows for the mass culture of some nematodes. *Nematologica* 33, 488-490.

Hussey, R.S. and Krusberg, L.R. (1968) Histopathology of resistant reactions in Alaska pea seedlings to two populations of *Ditylenchus dipsaci*. *Phytopathology* 58, 1305-1310.

Ibrahim, S.K. and Perry, R.N. (1993) Desiccation survival of the rice stems nematode *Ditylenchus angustus*. *Fundamental and Applied Nematology* 16, 31-38.

Janssen, G.J.W. (1994) The relevance of races in *Ditylenchus dipsaci* (Kühn). *Fundamental and Applied Nematology* 17, 469-473.

Jones, B.L. and De Waele, D. (1988) First report of *Ditylenchus destructor* in pods and seeds of peanut. *Plant Disease* 72, 453.

Kinh, Dang-ngoc and Nghiem, Nguyen-thi. (1982) Reaction of rice varieties to stem nematodes in Vietnam. *International Rice Research Newsletter* 7, 6-7.

Latif, M.A. and Main, I.H. (1995) Fungal hosts and gnotobiotic culture of *Ditylenchus angustus*. *Japanese Journal of Nematology* 25, 11-15.

Lin, M.S., Fang, Z.D. and Xie, Y.P. (1993) Responses of sweet potato to exudates of potato rot nematodes (*Ditylenchus destructor*). *Acta Phytopathlogica Sinica* 23, 157-162.

Lin, M.S., He, L.M., Wen, L., Fang, Z.D. and Song, B. (1996) Mechanism of morphological structure of sweet potato resistance to potato rot nematode (*Ditylenchus destructor*). *Scientia Agricultura Sinica* 29, 8-12.

Lundin, P. and Jonsson, H.A. (1975) Weibull's Vertus, a lucerne variety with high resistance to stem nematodes and *Verticillium*-wilt. *Agri Hortique Genetica* 33, 17-32.

MacDaniel, M.E. and Barr, A.R. (1994) Registration of Australian winter cereal cultivars. *Avena sativa* (oats) cv. Bettong. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 34, 701.

MacGuidwin, A.E. and Slack, S.A. (1991) Suitability of alfalfa, corn, oat, red clover, and snapbean as hosts of the potato rot nematode *Ditylenchus destructor*. *Plant Disease* 75, 37-39.

Mercer, C.F. and Grant, J.L. (1995) Resistance of the white clover variety G49 and its parent lines to stem nematode (*Ditylenchus dipsaci*). *New Zealand Journal of Agriculture Research* 38, 495-497.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.

Nordenskiold, H. (1971) The genetic background of the resistance to nematodes (*Ditylenchus dipsaci*) in red clover (*Trifolium pratense*). *Hereditas* 69, 301-302.

Palmer, H.M., Atkinson, H.J. and Perry, R.N. (1992) Monoclonal antibodies (MAbs) specific surface expressed antigens of *Ditylenchus dipsaci*. *Fundamental and Applied Nematology* 15, 511-515.

Plowright, R.A. and Akehurst, T.E. (1992) Monoxenic culture of the Ufra nematode *Ditylenchus angustus*. *Fundamental and Applied Nematology* 15, 327-330.

openandl.com

Plowright, R.A. and Gill, J.R. (1992) Aspects of resistance in deepwater rice to the stem nematode *Ditylenchus angustus*. *Fundamental and Applied Nematology* 17, 357-367.

Rahman, M. L. (1982) Screening for Üfra resistance in deepwater rice. *International Rice Research Newsletter* 7, 12-13.

Rahman, M. L. (1987) Source of Üfra resistant deep water rice. *International Rice Research Newsletter* 12, 8.

Rahman, M. L. (1994) New Üfra resistant rice lines. *International Rice Research Newsletter* 19, 16.

Rahman, M. L. and Evans, A.A.F. (1987) Studies on host-parasite relationships of rice stem nematode *Ditylenchus angustus* (Nematoda: Tylenchida) on rice (*Oryza sativa*, L.). *Nematologica* 33, 451-459.

Ritzema-bos, J. (1922) Het stengelaaltje. *Tijdschrifft Plantenziehten* 28, 159-180.

Rivoal, R., Person, F., Caubel, G. and Scotto la Massese, C. (1978) Methodes d'evaluation de la resistance des cereales au development des nematodes: *Ditylenchus dipsaci*, *Heterodera avenae* et *Pratylenchus* spp. *Annales del l'Amelioration des Plantes* 28, 371-394.

Schreiber, M.L. (1977) Lebenweise, bedeutung und bekämpfungsmöglischkeiten von *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev an ackerbohnen *Vicia faba* L. in Morokko. Dissertation; Technical University, Berlin, Germany.

Scurrah, M., Szot, D. and Ali, M. (1997) Selection for tolerant pea lines to stem nematode. *Third International Food Research Conference*. Adelaide, Australia, p. 173.

Seinhorst, J.W. (1952) Eeen nieuwe methode voor de bepaling van vatbaarheid van roggeeplanten voor aantasting door stengelaaltjes (*Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev). *Netherlands Journal of Plant Pathology* 58, 103-108.

Shubina, L.V. (1987) [Susceptibility of various garlic forms to stem nematode *D. dipsaci*.] *Taksonomiya i boil. Fitogel'minotiv* (1984), 152-156. [in Russian]. *From Referativnyi Zhurnal* (1985) 2.79.353. In: *Helminthological Abstracts* Series B (1987) 56, 877.

Smith, O.F. (1951) Biologic races of *Ditylenchus dipsaci* on alfalfa. *Phytopathology* 41, 189-190.

Stanton, J.M., Fisher, J.M. and Britton, R. (1984) Resistance of cultivars of *Avena sativa* to, and host rang of, an oat-attacking race of *Ditylenchus dipsaci* in South Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry* 24, 267-271.

Sturhan, D. (1965) Verglichende Wirtspflanzen-untersuchungen and Stengelalchen (*Ditylenchus dipsaci*) aus Ruben verschiedener herkunft. *Mededelingen van de Landbouwhogeschool en de Opzoekinggstations van de Staat te Gent* 30, 1468-1474.

Sturhan, D. (1971) Biological races. In: Zuckerman, B.M., Mai, W.F. and Rohde, R.A. (eds) *Plant Parasitic Nematodes*. Academic Press, New York, pp. 51-71.

Sturhan, D. (1975) Untersuchung von *Vicia faba*-sorten auf Resistenz gegenuber Stengelalchen (*Ditylenchus dipsaci*). *Mededelingen van Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent* 40, 443-450.

Sturhan, D. and Brzeski, M. (1991) Stem and bulb nematodes, *Ditylenchus* spp. In: Nickle, W.R. (ed.). *Manual of Agricultural Nematology*. Marcel Dekker, New Yourk, pp. 423-464.

Tenente, R.C.V. and Evans, A.A.F. (1992) Reproducao de *Ditylenchus dipsaci* raca 'teasel' sobre calo de alfalfa (*Medicago sativa*). *Nematologia Brasileira* 16, 19-26.

Van der Walt, P.C.W. and De Waele, D. (1989) Mass cultures of the potato rot nematode *Ditylenchus destructor* on groundnut callus tissue. *Phytopathology* 21, 79-80.

Venter, C., De Waele, D. and Meyer, A.J. (1991) Reproductive and damage potential of *Ditylenchus destructor* of peanut. *Journal of Nematology* 23, 12-19.

Venter, C., De Waele, D. and Meyer, A.J. (1993) Reproductive and damage potential of *Ditylenchus destructor* on six peanut cultivars. *Journal of Nematology* 25, 59-62.

Venter, C., Van Aswegen, G. Meyer, A.J. and De Waele, D. (1995) Histological studies of *Ditylenchus africanus* within peanut pods. *Journal of Nematology* 27, 284-291.

Wendt, K.R., Vrain, T.C. and Webster, J.M. (1994) Separation of three species of *Ditylenchus* and some host races of *D. dipsaci* by restriction fragment length polymorphism. *Journal of Nematology* 25, 555-563.

Wendt, K.R., Swart, A., Vrain, T.C. and Webster, J.M. (1995) *Ditylenchus africanus* sp. n. from South Africa: a morphological and molecular characterization. *Fundamental and Applied Nematology* 18, 241-250.

West, C.P. and Steele, K.W. (1986) Tolerance of clover cultivars to stem nematode (*Ditylenchus dipsaci*). *New Zealand Journal of Agriculture Research* 14, 227-229.

Whitehead, A.G. (1984) Interaction of the three lucerne cultivars, and eleven English isolates of stem nematode (*Ditylenchus dipsaci*), 'lucerne race'. *Plant Pathology* 33, 33-37.

Whitehead, A.G. (1992) Sources of resistance to stem rot nematode, *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev, in species of *Midicago* and *Trifolium*. *Annals of Applied Biology* 120, 73-81.

Whitehead, A.G. (1997). *Plant Nematode Control*. CAB International, Wallingford, UK, 384 pp.

Whitehead, A.G. and Hemming, J.R. (1965) A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. *Annals of Applied Biology* 55, 25-38.

Whitehead, A.G., Fraser, J.E. and Nichols, A.J.F. (1987) Variation in the development of stem nematode, *Ditylenchus dipsaci*, in susceptible and resistant crop plants. *Annals of Applied Biology* 111, 373-383.

obeikandl.com