

المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية 27
الملحق 8



المعايير الدولية لتدابير الصحة النباتية

المعيار الدولي 27: بروتوكولات تشخيص

بروتوكول التشخيص: 8

آفة *Ditylenchus dipsaci* وآفة *Ditylenchus destructor*

تم اعتماده عام 2015 ونُشر عام 2015

المحتويات

1- معلومات عن الآفة.....	4
1-1 آفة <i>Ditylenchus dipsaci</i>	4
2-1 آفة <i>Ditylenchus destructor</i>	5
2- المعلومات التصنيفية.....	6
3- كيفية الكشف عن الآفة.....	6
3-1 العوائل والأعراض.....	7
3-1-1 آفة <i>Ditylenchus dipsaci</i>	7
3-1-1-1 الأعراض الخاصة بالنجيليات.....	8
3-1-1-2 الأعراض الخاصة بالزنبقيات.....	8
3-1-1-3 الأعراض الخاصة بالنجيليات.....	9
3-1-1-4 الأعراض الخاصة بالباذنجانيات.....	10

Solanum tuberosum. تنتج آفة *D. dipsaci* عفناً بشكل قمع يمتد باتجاه الدرنة أكثر من العفن السطحي الذي تسببه آفة *D. destructor*. وتغزو النيماتود السيقان والأوراق، مما يؤدي إلى تقزم نموذجي للنباتات يرافقه تشوه حاد في السيقان والسويقات (Trudgill و Evans، 1992). 10

- 10-1-3-5 الأعراض الخاصة بالصليبيات..... 10
- 10-1-3-6 الأعراض الخاصة بالنرجسيات..... 10
- 10-1-3-7 الأعراض الخاصة بعوائل أخرى..... 10
- 11-2-3-1 *Ditylenchus destructor*..... 11
- 12-2-3-2 استخراج النيماتود..... 12
- 12-2-3-1 استخراج النيماتود من البصيلات والثوم..... 12
- 12-2-3-2 استخراج النيماتود من التربة والمواد النباتية..... 12
- 4- التحديد..... 14
- 14-1-4 التحديد المورفولوجي..... 14
- 15-1-4 إعداد العينات..... 15
- 15-2-4 خصائص التشخيص المورفولوجي..... 15
- 17-2-1-4 وصف آفة *Ditylenchus dipsaci*..... 17
- 18-2-1-4 وصف آفة *Ditylenchus destructor*..... 18
- 21-2-4 التحديد الجزيئي..... 21
- 21-2-4 آفة *Ditylenchus dipsaci*..... 21
- 21-2-4 آفة *Ditylenchus destructor*..... 21
- 22-2-4 استخراج الحمض النووي..... 22
- 4-2-4 اختبار تتابع مبادئ النسخ الداخلي - الحمض النووي الريبي - تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل - تعدد الأشكال لطول جزء القطع لآفتي *D. dipsaci* و *D. destructor*..... 22
- 5-2-4 اختبار تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل القائم على منطقة التضخيم المتتالي لآفة *D. dipsaci*..... 23
- 6-2-4 اختبار S18 واختبار تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل الخاص بمبادئ النسخ الداخلي 1 لآفة *D. dipsaci*..... 24
- 7-2-4 اختبار تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل الخاص بالحمض النووي الريبي 8S5 لآفة *D. dipsaci*..... 25

- 8-2-4 اختبار تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل الخاص بالحمض النووي الريبي 8S5. ومباعد الذسخ الداخلي
 26..... *D. dipsaci* لآفة
- 9-2-4 اختبار تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل القائم على منطقة التضخيم المتتالي لآفة *D. dipsaci*..... 27
- 10-2-4 الشواهد الخاصة بالاختبار الجزيئي..... 27
- 11-2-4 تفسير نتائج تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل التقليدي 28
- 5- السجلات 28
- 6- جهات الاتصال للحصول على معلومات إضافية..... 28
- 7- شكر وتقدير 29
- 8- المراجع 30
- 9- الأشكال 38

1- معلومات عن الآفة

تتوزع الأنواع ضمن جنس *Ditylenchus* الواسع (Filipjev، 1936) في كافة أنحاء العالم، ومعظم الأنواع فطرية التغذية. غير أن هذا الجنس يتضمن بعض الأنواع التي تتسم بأهمية كبيرة بوصفها آفات تطال نباتات أعلى (Sturhan و Brzeski، 1991). وتجدر الإشارة إلى أنه رغم تأثر بعض النباتات (مثل الشمندر، والبرسيم، والنفل) بالآفتين *Ditylenchus dipsaci* و *Ditylenchus destructor*، نادراً ما يتواجد هذان النوعان في الوقت ذاته في النبات ذاته (Andrássy و Farkas، 1988).

1-1 آفة *Ditylenchus dipsaci*

تهاجم آفة *D. dipsaci sensu lato (s.l.)*، أو نيماتود الساق، أكثر من 200 نوع من النباتات البرية والمستزرعة. كما أن العديد من الأعشاب والحشائش هي عوائل للنيماتود وقد تؤدي دوراً هاماً في بقائه في غياب نباتات مستزرعة. وقد أشارت تحليلات مورفولوجية وبيوكيميائية وجزيئية ونواتية لأعداد وأنواع مختلفة من آفة *D. dipsaci s.l.* إلى أنه مركب يضم 30 جنساً من العوائل على الأقل، ذات نطاق محدود من عوائل الآفة. وقد قسّم Jeszke وآخرون (2013) هذا المركب إلى مجموعتين، تضم الأولى أعداد الصيغة الصبغية الثنائية التي تتميز بحجمها "العادي" والمسماة *D. dipsaci sensu stricto (s.s.)*، وتشمل هذه المجموعة معظم الأعداد المسجلة حتى الآن. وأمّا المجموعة الثانية فهي تتألف من الأصناف المتضاعفة الصبغيات وتضم حالياً *Ditylenchus gigas*، Vovlas وآخرون 2011 ("الصفة العملاق" من *D. dipsaci* الذي يتطفل على *Vicia faba* (الفاصولياء العريضة))؛ *D. weischeri* Chizhov وآخرون، 2010 (المتطفل على *Cirsium arvense* (النباتات الشوكية الزاحفة))؛ وثلاث آفات غير موصوفة من نوع *Ditylenchus* spp تُسمّى دال، وهاء وواو وترتبط بأنواع الذبذبات Fabaceae، و Asteraceae و Plantaginaceae على التوالي (Jeszke وآخرون، 2013). ومن بين كل هذه الأنواع، وحدها آفة *D. dipsaci s.s.* وأحد متغيراتها المورفولوجية الكبيرة *D. gigas* هما من الآفات النباتية التي تتسم بأهمية اقتصادية. ويتضمن هذا البروتوكول معلومات تسمح التمييز بين *D. gigas* و *D. dipsaci s.s.*.

وتعيش آفة *D. dipsaci* في معظم الأوقات كطفيليات خارجية في الأجزاء الهوائية من الذبذبات (السيقان، والأوراق والأزهار)، إنما أيضاً البصلات، والدرنات والريزومات). وهذا النيماتود منقول بواسطة البذور في *V. Faba*، و *Medicago sativa* (البرسيم/ألفافا)، و *Allium cepa* (البصل)، و *Trifolium* spp. (النفل)، و *Dipsacus* spp. (المشط) و *Cucumis melo* (الشمام) (Sousa وآخرون، 2005). ومن الأهمية بمكان الإشارة إلى أنه بإمكان صغار المرحلة الرابعة تحمّل الجفاف لمدة طويلة من 20 سنة أو أكثر (Lucas و Barker، 1984). وتتجمّع هذه النيماتودات في حالة خفية وتشكّل "صوف النيماتود" حين تبدأ أنسجة النباتات بالجفاف (الشكل 1). وغالباً ما يظهر الصوف على البذور في القرون المصابة جداً بالآفات وفي بقايا النباتات الجافة (أي ما يبقى في الحقل بعد الحصاد). كما أن وجود صغار الآفات المعديّة من المرحلة الرابعة في البذور ومواد النباتات الجافة هام في الانتشار السالب لهذه الديدان على مسافات طويلة. ويمكن أن تبقى النيماتود حيّة بحالتها الجافة بعد انتقالها من خلال الخنازير والقطعان إلى بذور مصابة أو داخل هذه البذور (Palmisano وآخرون، 1971).

ورغم أن *D. dipsaci* تُعتبر آفة في نباتات أعلى، أشار Viglierchio (1971) إلى أنه بإمكان مجتمع كاليفورني من *D. dipsaci* في *Allium sativum* (الثوم) أن يتكاثر على فطر التربة (*Cladosporium* و *Verticilium*) في ظروف مخبرية. ومن المعروف أن آفة *D. dipsaci* تنقل ممرضات نباتية بكتيرية من الجهة الخارجية (مثل *Clavibacter* *Corynebacterium*، *Clavibacter michiganensis* subsp. *Insidiosum* syn *michiganensis* subsp. *insidiosus*)، ما يسبب ذبول الألفالفا.

ووفقاً لمنظمة وقاية النباتات في أوروبا (2013 ألف)، تتواجد آفة *D. dipsaci* في الأقاليم التالية (باستثناء الاعتراضات): أوروبا، وآسيا، وأفريقيا، وأمريكا الشمالية، وأمريكا الوسطى والبحر الكاريبي، وأمريكا الجنوبية، أوسيانيا.

2-1 آفة *Ditylenchus destructor*

تهاجم آفة *D. destructor*، أو دودة تعفن البطاطا، بصورة حصرية تقريباً الأجزاء تحت الأرضية من النباتات (مثل الدرنات، والريزومات والأجزاء تحت الأرض المشابهة للسيقان). وهي أنواع شبيهة عالمية شائعة في الأقاليم المعتدلة، ومسؤولة عن خسارات حادة في إنتاج البطاطا وحشيشة الدينار (منظمة وقاية النباتات في أوروبا، 2013 ألف). كما أن نطاق الكائنات المعيلة للنيماتود واسع جداً، إذ يضم أكثر من 90 نوعاً نباتياً يشمل نباتات الزينة، والنباتات المحصولية والأعشاب الضارة. ويشكل *Solanum tuberosum* (البطاطا) المعيل الأساسي، حيث يظهر في الدرنات عفن رطب أو جاف ينتقل إلى درنات أخرى في التخزين. وفي بعض الظروف، قد تتسبب كائنات التعفن الرطب بتعفن الدرنات إلى حد بعيد، إنما قد تقتل أيضاً النيماتودات. وقد وجد Ciurea و Rojankovski (1986) 55 نوعاً من البكتيريا والفطريات المتصلة بآفة *D. destructor* في درنات *S. tuberosum*، حيث أن الفطريات المغزلية *Fusarium* spp. هي الأكثر شيوعاً.

والعوائل الشائعة الأخرى هي *Ipomoea batatas* (البطاطا الحلوة)، والزنبق البصلي (أصناف مهجنة ومختارة مشتقة من *Iris xiphoides* و *Iris xiphium*)، و *Taraxacum officinale* (الهندباء)، و *Humulus lupulus* (حشيشة الدينار)، و *Tulipa* spp. (التوليب)، و *Leopoldia comosa* (لبلاب عنب)، و *Hyacinthus orientalis* (اللبلاب)، و *Gladiolus* spp. (الزنبق)، و *Dahlia* spp. (الداليا)، و *Coronilla varia* و *Anthyllis vulneraria* (البيقية)، و *Beta vulgaris* (الشمندر السكري، وشمندر العلف، والشمندر)، و *Calendula officinalis* (الزهرة المخملية)، و *Daucus carota* (الجزر)، و *Petroselinum crispum* (البقدونس)، و *Trifolium* spp. (البرسيم الأحمر والأبيض والبرسيم السويدي) (Sturhan و Brzeski، 1991). وفي غياب نباتات أعلى، تتكاثر آفة *D. destructor* بسرعة على أفطوريات حوالي 70 نوعاً من الفطريات، ومن المعروف أنها تدمر الخيط الفطري في الفطر المستزرع (Sturhan و Brzeski، 1991). وبإمكان هذا النوع أن يقاوم الجفاف ودرجات الحرارة المتدنية، إنما لا يشكل صوف النيماتود كما تفعل آفة *D. dipsaci* (Kühn، 1857، Filipjev، 1936). غير أن هذا النوع يزدهر في الشتاء كبيض، ما يجعل البيض في *D. destructor* أكثر حيوية مما هو عليه في *D. dipsaci*. كذلك، إن آفة *D. destructor* في بذور البطاطا وبصلات الزهور هي آفة خاضعة للوائح في بلدان عديدة (Sturhan و Brzeski، 1991). كذلك، أشارت التقارير إلى وجود آفة *D. destructor* على *Arachis hypogaea* (الفول السوداني/الفسق) في جنوب أفريقيا، إنما باتت هذه السجلات تُعتبر أنوعاً منفصلة، *Ditylenchus africanus* (Wendt، Swart، Vrain و Webster، 1995)، قريبة من الناحية المورفولوجية ومن ناحية القياس المورفولوجي لآفة *D. destructor*.

ووفقاً لمنظمة وقاية الذبذبات في أوروبا (2013 ألف)، تتواجد آفة *D. destructor* في الأقاليم التالية (باستثناء الاعتراضات): أوروبا، وآسيا، وأفريقيا الجنوبية، وأمريكا الشمالية، وأمريكا الجنوبية، أوسيانيا.

2- المعلومات التصنيفية

الإسم: *Ditylenchus dipsaci* (Kühn، 1857، Filipjev، 1936)

المرادفات: ترد مرادفات أنواع آفة *Ditylenchus dipsaci* (Kühn، 1857، Filipjev، 1936 في وثيقة Siddiqi (2000)

الوضع التصنيفي: النيماتودا، Secernentea، Diplogasteria، Tylenchida، Tylenchina، Tylenchoidea، Anguinidae.

الأسماء الشائعة: نيماتودا الساق، والديدان المستطيلة في السيقان والبصلات (بالإنكليزية) (Brzeski و Sturhan، 1991).

ملاحظة: تُعتبر الآن آفة *D. dipsaci* مركّب من الأنواع يتألف من عدد كبير من الأصناف والمجتمعات البيولوجية التي تختلف بصورة خاصة في أفضليات العائل. بالتالي، وردت مرادفات لما مجموعه 13 نوعاً إسمياً من *D. dipsaci* كما تمّ التعرف إلى 30 صنفاً بيولوجياً، يجري التمييز بينها بصورة رئيسية حسب نطاق العوائل وتُسمّى عامةً باسم النباتات الرئيسية المعيلة لها.

الإسم: *Ditylenchus destructor* Thorne، 1945

المرادفات: غير متوفرة

الوضع التصنيفي: النيماتودا، Secernentea، Diplogasteria، Tylenchida، Tylenchina، Tylenchoidea، Anguinidae.

الأسماء الشائعة: الدودة المستطيلة في عفن الدرنات، الدودة الأسطوانية لتعفن البطاطا (بالإنكليزية) (Sturhan و Brzeski، 1991)

وضع Blaxter و De Ley (2003) نظام التصنيف الأحدث، الذي يجمع بين الملاحظات المورفولوجية، والاستنتاجات الجزيئية وتحليلات التصنيف الفرعي الحيوي.

3- كيفية الكشف عن الآفة

تحمل كل من الجرثومتين *D. dipsaci* و *D. destructor* الأعراض المشتركة التالية التي تسمح بالكشف عنهما: التورم، والتشوّ وزوال اللون والتقرّم في الأجزاء الموجودة تحت الأرض من النباتات، والنخر أو التعفن في البصيلات والدرنات (Thorne، 1945).

آفة *Ditylenchus dipsaci*

تُظهر آفة *D. dipsaci* تأقلاً مع الطفيليات من حيث قدرتها على غزو النسيج الكبدي الصلب عقب التحلل الأنزيمي للطبقة الرقيقة البكتينية أو الوسطى الموجودة بين الجدران المتاخمة في الخلية، ما يؤدي إلى فصل الخلايا وتقريبها. وهذا يؤدي إلى المظهر اللامع النموذجي أو إلى الملمس المنقّط في الأنسجة المصابة بما يذكر بلبّ تفاحة ناضجة أكثر من اللازم (Southey، 1993).

وبحسب Vovlas وآخرين (2011)، تسبّب إصابة *V. faba* بآفة *D. gigas* (دودة اسطوانية عملاقة في الساق والبصيلة) التورّم وتشوّه أنسجة السيقان أو تقرّحات تتحوّل إلى لون بني أحمر ثم اسود. وفي الإصابات الحادة، تبدو البذور سوداء، ومشوّهة وأصغر حجماً من البذور غير المصابة بالآفة، كما تظهر بقع أشبه باللطخات على سطحها. وأمّا العوائل غير *V. faba* فهي *Lamium purpureum*، *Lamium album*، *Lamium amplexicaule*، *Ranunculus arvensis*، *Avena sterilis* و *Convolvulus arvensis*.

آفة *Ditylenchus destructor*

تصيب آفة *D. destructor* عادةً الأجزاء تحت الأرض من النباتات (الدرنات وسيقان البطاطا، وريوزمات النعناع، وجذور حشيشة الدينار والليلك)، ما يسبّب زوال اللون وتغيّر أنسجة النباتات. وتكون أحياناً الأجزاء فوق الأرض من النباتات مصابة أيضاً بالآفة، ما يسبّب تقزّم الساق وتتحننها وتفرّعها إضافةً إلى تقزّم الأوراق، وتغضنها وزوال لونها (كما في البطاطا) (Sturhan و Brzeski، 1991). إنما في أغلب الأحيان، لا تظهر أي أعراض الإصابة بالآفة في الأجزاء فوق الأرض من النباتات.

3-1 العوائل والأعراض**3-1-1 آفة *Ditylenchus dipsaci***

يشير Sturhan و Brzeski (1991) إلى أن العوائل الرئيسية لآفة *D. dipsaci* هي النجيليات: *Avena sativa* (الشوفان)، و *Secale cereale* (الجاودان)، و *Zea mays* (الذرة)، و *Triticum aestivum* (القمح)؛ والزنبقيات: *A. cepa*، و *A. sativum*، و *Tulipa spp.*؛ والقرنيات: *M. sativa*، و *Vicia spp.*، و *Pisum sativum*، و *Trifolium spp.*؛ والباذنجانيات: *S. tuberosum*، و *Nicotiana spp.*؛ والصليبيات: *Brassica campestris*؛ والزرجسيات: *Narcissus spp.* كذلك، تضمّ عوائل أخرى *D. carota*، و *Fragaria spp.* (الفراولة)، و *B. vulgaris*، و *H. orientalis*، و *Allium ampeloprasum* (الكرات)، و *Phlox drummondii*، و *Phlox paniculata*، و *Dianthus spp.* (القرنفل)، و *Apium graveolens* (الكرفس)، و *Hydrangea spp.*، و *Lens culinaris* (العدس)، و *Brassica napus* (اللفت)، و *Petroselinum crispum* و *Helianthus annuus* (دوّار الشمس).

قد تتواجد أجيال مختلفة من آفة *D. dipsaci* في نباتات عائلة خلال موسم معيّن، تتبع بعضها البعض. وفي حال ماتت الأجزاء المصابة من النباتات بسبب الآفة، تترك النيماتودات العائل قبل أن تموت بالكامل. وفي غياب نباتات عائلة، بإمكان هذه الديدان أن تدخل إلى نباتات غير عائلة وتتغذى منها لبعض الوقت، رغم أنها غير قادرة على التكاثر في هذه النباتات غير العائلة (Farkas و Andrassy، 1988). وتتمثل الأعراض الأكثر شيوعاً للإصابة بآفة *D. dipsaci* في تقزّم

النباتات واصفرارها؛ وتتخذ السيقان والسويقات والأزهار، وتقرّمها، واحتوائها على العفصة وتشوّهها؛ وتقرّحات نخريّة في البصيلات والريزومات وتعفّنها، غالباً ما تظهر بشكل حلقات بنيّة اللون حين تكون البصيلات مقطّعة. وقد تصيب آفة *D. dipsaci* البذور أيضاً من *Phaseolus vulgaris* (الفاصوليا القزمية، أو اللوبياء، أو الفاصوليا الخضراء) مثلاً، و *V. faba*، و *Allium spp.* و *M. sativa*. وعادةً لا تبدي البذور الصغيرة أعراضاً ظاهرة للإصابة بالآفة في حين تنكش قشرة البذور الكبيرة وتظهر بقعاً ملوّنة عليها.

1-1-1-3 الأعراض الخاصة بالنجيليات

Avena sativa و **Secale cereale** (Nicol و McDonald، 2005). تصبح الأوراق مشوّهة، وتتخذ السيقان، ويظهر عدد غير اعتيادي من الغصينات، وتكون النباتات قصيرة وكثيفة ومتقزمة. وفي زراعة *S. cereale*، تظهر آفة *D. dipsaci* بصورة خاصة في التربة الخفيفة التي تحتوي على كميات قليلة من الدبال، وبصورة طبيعية في المناطق حيث يُزرع الشليم. ويمكن ملاحظة العلامات الأولى للإصابة بالآفة في أواخر فصل الخريف، إنما تصبح أكثر وضوحاً في الربيع. كذلك، تشير بقع عديدة على النباتات ذات النمو المتأخر في حقل الشليم إلى تلف بفعل الآفة. وفيما تنمو نباتات *A. sativa* المصابة بالآفة بوتيرة أبطأ، تظهر بوضوح في المحصول المائل إلى الإصفرار من خلال لونها الأخضر. وتحمل نباتات *T. aestivum* المصابة الأعراض ذاتها التي تظهر في حبوب أخرى، وتتعرّض إلى هجوم آفة *D. dipsaci* في أوروبا الوسطى والشرقية فقط (Cook و Rivoal، 1993).

وأما نباتات *Zea mays* فهي لا تشكل عوائل جيدة لآفة *D. dipsaci*، إنما قد يؤدي غزو أُنسجة السيقان في النباتات الفتية إلى نخر في هذه الأنسجة، ويتسبّب بموت نباتات الذرة أو سقوطها قبل الحصاد (Cook و Rivoal، 1993). كما أن أوراق النباتات المصابة متغصّنة وملتوية كفتّاحة سدادات. كذلك، تكون الفواصل العقدية أقصر فيما يصبح الجزء الأسفل من الساق فارغاً في حين تنكسر النباتات الأكبر حجماً وتسقط.

2-1-1-3 الأعراض الخاصة بالزنبقيات

Allium cepa، و **Allium sativum**، و **Allium cepa var. aggregatum** (الكراث). تتمثل إحدى خصائص معظم نباتات *Allium spp.* بأن الأوراق والبصيلات فيها تشوّه بفعل الإصابة بآفة *D. dipsaci* (الشكال 2، و3 و4). كذلك، تصبح قاعدة النباتات الفتية منتفخةً والأوراق مشوّهة. وأما البصيلات المصابة الأخرى فيظهر عليها تورّم (انتفاخ) للقشرة وتشققات مفتوحة غالباً ما تحصل عند الجذر الأسطواني للبصيلات (Potter و Olthof، 1993). ويبدو مظهر نباتات *A. cepa* التي تتعرض إلى هجوم آفة *D. dipsaci* جامداً بفعل ذوبان الخلايا الناجم عن تغذية الديدان الأسطوانية (Ferris و Ferris، 1998). وتميل البصيلات المصابة إلى التعفّن بسرعة في التخزين (Bridge و Hunt، 1986)، كما أن القشور الداخلية في البصلة تتعرض عادةً إلى هجوم أكثر حدّة من القشور الخارجية. ومع تقدّم الموسم، تصبح البصيلات ليّنة ويظهر لدى قطعها قشر بني اللون بشكل دوائر متحدة المركز. وعلى العكس، لا تؤدي آفة *D. dipsaci* إلى تشوّه الأوراق أو تورّم في نباتات *A. sativum*، إنما تسبّب اصفرار الأوراق وموتها (Netscher و Sikora، 1990). كذلك، أفاد Mollov وآخرون (2012) عن ظهور آفة *D. dipsaci* للمرة الأولى في نباتات *A. sativum* في منيسوتا، الولايات المتحدة الأمريكية. وتمثلت الأعراض التي ظهرت في النباتات تحت الأرض في التقرّم واليرقان، في حين كانت الأعراض

في البصيلات هي النخر، والنمو بمستوى غير كافٍ والتشوه. وقد تبدو نقاط على أوراق نباتات *Allium spp.* (تورّمات شبيهة بالبثور على الأوراق). ولا تُلاحظ أي أعراض للإصابة في بذور النباتات المصابة.

Tulipa spp. (Southey، 1993). تختلف الأعراض الناجمة عن مهاجمة آفة *D. dipsaci* لأزهار اللعلع، في النباتات النامية والبصيلات على السواء، عن تلك التي تظهر على نباتات *Narcissus spp.* ففي الحقل، يشكّل الإزهار الفترة الأفضل للكشف عن الإصابة بالآفة. والإشارة الأولى هي إصابة شاحبة أو أرجوانية اللون تظهر على جانب واحد من الساق مباشرة تحت الزهرة التي تنحني باتجاه الإصابة. وتزداد هذه الإصابة حجماً، وتنقسم القشرة - بما يكشف عن النسيج الرخو النموذجي تحتها - وينتشر التلف باتجاه الأسفل والأعلى في أغلب الأحيان وصولاً إلى البتلات. وفي الهجومات الأكثر حدة، تمتد إصابات مماثلة إلى الجزء الأسفل من الساق بدءاً من الأوراق ويحدث خلل في النمو. تبدأ الإصابات عند قاعدة البصيلات الجديدة حيث تظهر بشكل براعم مقابلة جانبية عند قاعدة السيقان السابقة. يمكن رؤية الإصابة والشعور بها لدى إزالة القشور الخارجية البنية اللون، بشكل لطخات لينة رمادية أو بنية اللون على القشور اللحمية الخارجية. ولا تظهر على البصيلات المصابة حلقات بنية اللون كالتي نراها في نباتات النرجس والياقوتية.

3-1-1-3 الأعراض الخاصة بالنجيليات

Medicago sativa. تشكل آفة الديدان الأسطوانية الأكبر التي تصيب نباتات *M. sativa*. وتحصل الإصابة بسرعة في التربة الثقيلة وخلال أوقات هطول الأمطار الكثيفة أو في المناطق المروية بالرش. وغالباً ما يكون "الذبول الأبيض" المرتبط بخسارة الكلوروفيل في الورق إحدى خصائص المحاصيل المصابة في حالة من الإجهاد الرطوبي (Griffin، 1985). وأحياناً تظهر في الحقول المصابة مساحات غير منتظمة من النباتات المزروعة المبعثرة. وتشمل أعراض هجوم الديدان الأسطوانية التورّم، والتقرّم والالتواء في السيقان والأوراق، وقصر الفواصل العقدية، وتشكّل العديد من البراعم الإبطية، وإنتاج عدد غير اعتيادي من الغصينات التي تعطي النباتات مظهراً كثيفاً (McDonald و Nicol، 2005). ولا تنمو النباتات المصابة بما فيه الكفاية لتشكل هشيماً (Ferris و Ferris، 1998)، وغالباً ما لا تتمكن من إنتاج أشواك الأزهار (McDonald و Nicol، 2005). كذلك، تعرّض آفة *D. dipsaci* نبات البرسيم إلى *Phytophthora megasperma*. ويتفاقم التلف الذي تسببه آفة *D. dipsaci* بفعل كائنات سبروفاج أخرى (أنواع *Rhizoctonia*، و *Cephalobus*، و *Panagrolaimus*) في نباتات مريضة ومكسورة، وهو أمر يسرّع أيضاً موت النباتات (Andrássy و Farkas، 1988). ولا تُلاحظ أعراض في بذور نباتات *Medicago* المصابة.

Trifolium spp. (Cook و Yeates، 1993). الأعراض مشابهة جداً للأعراض التي سبق وصفها في نباتات *M. sativa*، باستثناء النفل الأحمر والأبيض اللون. تغزو الآفة النفل الأحمر وبخاصة في الطقس البارد والمطر. وتظهر مساحات كبيرة ومستديرة من النباتات المريضة في الحقل، حيث تتواجد النباتات الأكثر إصابة بالمرض باتجاه المنطقة الداخلية وتبدو ذابلة في وسطها. كما أن قواعد النباتات تبدو متورّمة مثل البصيلات، والأوراق متجعدة ومتغضنة تظهر عليها بوضوح عروق سميكة. وأمّا براعم الأزهار فهي متورّمة كالعفص، وقد يحتوي عفس زهرة واحدة على 5 آلاف دودة أسطوانية (Courtney، 1962). كذلك، تكون سيقان النفل الأبيض المصابة بآفة *D. dipsaci* قصيرة ومتورمة، وتبدو براعمها متخضلة، وتصبح الأجزاء المصابة

بنية اللون في الصيف أو الخريف. وأما الأوراق فهي أضيق مما في الحالات العادية، غير أن سويقاتها أكثر سماكة وقصراً. ويراعم الأزهار متورمة عند قواعدها (Farkas و Andrassy، 1988).

3-1-1-4 الأعراض الخاصة بالباذنجانيات

Solanum tuberosum تنتج آفة **D. dipsaci** عفناً بشكل قمع يمتد باتجاه الدرنه أكثر من العفن السطحي الذي تسببه آفة **D. destructor**. وتغزو النيماتود السيقان والأوراق، مما يؤدي إلى تقزم نموذجي للنباتات يرافقه تشوه حاد في السيقان والسويقات (Trudgill و Evans، 1992).

Nicotiana spp. (Johnson، 1998). تدخل صغار الآفات (المرحلة الرابعة) إلى أوراق وسيقان شتلات التبغ في الطقس الرطب، وتؤدي إلى تورمات صغيرة وصفراء اللون (العفص) قد تمتد على ارتفاع 40 سم أو أكثر فوق التربة. وفيما يزداد عدد العفصات، تبدأ أنسجة النباتات بالموت قبل أوانها. وقد تسقط الأوراق السفلى فيما تميل الأوراق العليا إلى الإصفرار بعدها، تتعفن العفصات وتوقف نمو النباتات المصابة وفي النهاية، لا سيما في الطقس الدافئ والرطب وفي التربة الثقيلة، تنكسر السيقان المصابة وتسقط النباتات أرضاً.

3-1-1-5 الأعراض الخاصة بالصليبيات

قد يظهر عفن تاجي حاد في نبات **B. campestris** الناضج المصاب بآفة **D. dipsaci**.

3-1-1-6 الأعراض الخاصة بالنرجسيات

Narcissus spp. (Southey، 1993). تتمثل الأعراض النمطية في وجود تورمات من اللون الأصفر الفاتح أشبه بالبقثر على الأوراق (نقاط) وحلقات بنية اللون ومتحدة المركز يمكن رؤيتها حين تقطع البصيلات بالعرض (الشكلان 5 و 6). إنما حين تقطع البصيلات بالطول، يُلاحظ أن النخر يبدأ عند العنق ويمتد باتجاه الأسفل. كما أن التورمات تظهر بوضوح في فترة الإزهار حين تنمو الأوراق بشكل ناشط. وفي الهجومات المعتدلة، يمكن الشعور بالتورمات على النحو الأفضل أكثر من رؤيتها، بين السبابة والإبهام. ويمكن الكشف عن وجود آفة **D. dipsaci** في البصيلات الجافة التي تعاني من تلف ضئيل، من خلال قطعها مباشرة تحت العنق. ويبين الفحص المتأني في المراحل الأولى من الإصابة بقعاً براقاً وإسفنجية حيث تكون الخلايا قد انفصلت عن بعضها. ويستتبع ذلك ظهور سريع لنخر بني اللون.

3-1-1-7 الأعراض الخاصة بعوائل أخرى

Fragaria spp. تشكل آفة **D. dipsaci** النوع الوحيد من **Ditylenchus** الذي يُعتبر مسبباً مرضياً في الفراولة (Brown وآخرون، 1993). ويُلاحظ التلف في الأوراق الصغيرة والمشوهة وفي السويقات القصيرة والسميكة والملتوية.

عائلة الهليونيات، والعائلة الفرعية لذباتات **Sciloideae** (الياقوتيات) وبصيلات أخرى (Southey، 1993). أعراض البصيلات هي ذاتها التي تظهر في نباتات **Narcissus spp**، إنما لا تُلاحظ عادة تورمات محددة على أوراق النباتات. إنما قد تبدو على الأوراق أثلام وتشوهات وأحياناً، تورمات طفيفة. كذلك، تظهر عادة على بصيلات زنبقيات أخرى الأعراض ذاتها التي تظهر على الياقوتيات. كما أن أعراض الإصابة في النرجسيات مشابهة لتلك التي تظهر في نباتات **Narcissus spp**؛ إذ تبدو مثلاً على أوراق نباتات **Galanthus spp.** و **Nerine spp.** تورمات، إضافةً إلى حلقات بنية اللون ومتحدة المركز في البصيلات.

Beta vulgaris and *Daucus carota* (Cooke, 1993). تؤدي تغذية *D. dipsaci* إلى موت نقطة النمو في الشتلات (بما يفضي إلى تشكّل تيجان عديدة)؛ وقد تصبح الفلقات والأوراق ملتويةً، ومتورمة ومشوهة؛ كما قد تظهر نقاط على الأوراق أو السويقات في النباتات الأقدم. وفي وقت لاحق من الموسم، قد تسبّب الآفة في التاج عفنًا يُعرف باسم تقرّج التاج، أو عفن التاج أو عفن العنق. وتظهر هذه الإشارة أولاً بشكل بثرات بارزة ورمادية اللون بين نذب الأوراق عادةً. ثم، ينمو العفن باتجاه الجانب الخارجي والسفلي، ويمتد إلى ما بعد كتف النباتات، ما يسمح للتاج بالانفصال حين يتمّ سحبه. وفي نباتات *D. carota*، قد تشمل أعراض أخرى تفحّج الأوراق وزوال لون رأس الجذر الرئيسي. وتظهر الأعراض بصورة رئيسية على جذر وساق النباتات عند 2 إلى 4 سنتيمتر تحت مستوى الأرض وفوقه. وتسبّب الإصابة الحادة موت الأوراق وتعفن التاج، وبخاصة في فصل الخريف (الشكل 7).

Phlox paniculata وغيرها من نباتات الزينة (Southey, 1993). تبيّن نباتات الفلوكس المصابة تثخناً وهشاشة في السيقان إضافةً إلى قصر الفواصل العقدية التي تميل إلى الانفصال. وتتمثل الميزة الفريدة لهذه العوائل في تجعد وتقلص صفائح الأوراق العليا، والتي قد ينكمش الجزء الأعلى منها ليتحول إلى خيوط ضئيلة. ومن بين النباتات التي تُعتبر عوائل وتعاني تشوهاً في النمو وتورماً وما إليه من الأعراض، هناك أنواع وأصناف من *Anemone*، و*Calceolaria*، و*Cheiranthus*، و*Gypsophila*، و*Helenium*، و*Heuchera*، و*Lychnis*، و*Lysimachia*، و*Penstemon* (Roberts, 1981). وأفاد Edwards (1937) عن تقرّج، وتشوّه للأوراق، وعفن وعجز عن الإزهار في نباتات *Primula spp*. وأمّا النباتات الخشبية فهي غالباً ما لا تتعرض للهجوم، إنما قد تُصاب نباتات *Hydrangea* بآفة *D. dipsaci*، ما يسبّب خللاً في الأضلاع غير الخشبية، وتورماً في السويقات والعروق الرئيسية، وزيادة في تجعد صفائح الأوراق. وتشكّل عادةً الأوراق المتجعدة العلامة الأولى عن الإصابة. ويظهر على نباتات خشبية أخرى، *Yucca smaliana*، خللٌ في الأوراق وتورّمات شبيهة بالبتور.

2-1-3 *Ditylenchus destructor*

بحسب Brzeski و Sturhan (1991)، تتطفل آفة *D. destructor* بصورة خاصة على الدرنات (مثل البطاطا والداليا)، والبصيلات (مثل السوسن البصلي، والتوليب والدليوث) والمحاويل الجذرية (مثل الشمندر السكري والجزر). وهي قادرة على تدمير الخيط الفطري في *Agaricus hortensis* (الفطر المستزرع). وتشمل عوائل أخرى *I. batatas*، و*A. sativum*، و*P. vulgaris*، و*Angelica sinensis* ("dong quai" أو الجينسنغ)، و*Panax ginseng* (الجينسنغ)، و*Taraxacum officinale*، و*Begonia spp.* وبصيلات *Erytronium denscanis* (dog's tooth violet).

Solanum tuberosum و *Dahlia spp* لا تظهر أي أعراض خلال فترة النمو. فالنيماتود تدخل إلى درنات البطاطا عبر السيقان، وتتواجد معظم هذه الديدان عند أطراف الأجزاء البنية اللون وغير التالفة. ولو أُخذت عيّنة صغيرة من هذا الجزء من الدرنّة ووُضعت تحت الماء، تبدو كتلة الديدان الصغيرة واضحةً حتى تحت زجاج مكبر بسيط. وتتمثل الأعراض الأولى للإصابة بآفة *D. destructor* في بقع صغيرة بيضاء طباشيرية أو طفيفة اللون يمكن ملاحظتها تحت قشرة الدرنّة (Brodie, 1998). ولاحقاً، تصبح هذه البقع أكبر حجماً وأعمق لوناً تدريجياً (تمر باللون الرمادي، والبنّي اللون والأسود)، وتكتسب ملمساً إسفنجياً (الشكل 8). وهذا ينجم بصورة خاصة عن غزو ثانوي للبكتيريا والفطريات والديدان الأسطوانية الرمامة (Brodie, 1998). وأمّا في الدرنات التي تعاني إصابةً حادة، تظهر عادةً مواقع مقوّرة ذات قشرة متشققة، ومتجعدة وشبيهة بالورق. لا تتعرض القشرة إلى الهجوم بل تصبح رقيقةً وتتشقق سيما أن الأذسجة المصابة

السفلية تجفّ وتنكمش (Brodie، 1998). أخيراً، قد تتحطّط الدرنات بكاملها، وهذه الدرنات التالفة بالكامل تعوم على سطح المياه (الشكل 9). وعلى العكس، لا تظهر تشققات على قشرة *S. tuberosum* المصابة بآفة *D. dipsaci*. وتستمر الديدان الأسطوانية بالتكاثر داخل الدرنات بعد الحصاد، ويمكن أن تصل إلى أعداد كبيرة. وقد تكون الأعراض أكثر وضوحاً بعد التخزين، لكن الإصابات الثانوية بالفطريات والبكتيريا والديدان الحرّة تحصل في الدرنات المصابة.

Beta vulgaris. تؤدي الإصابة إلى كلوم نخرية في الجذور والريزومات. وأفاد Thorne وDallimore (1951) عن أعراض مماثلة للتقرّح التاجي. وفي الشمندر السكري، ينخفض أيضاً محتواه من السكر إضافةً إلى خسارة الغلّة.

Daucus carota. تؤدي الإصابة إلى شقوق عرضية في قشرة الجزر إضافةً إلى لطخات بيضاء في النسيج القشري. وأمّا الإصابات الثانوية في هذه المواقع بفعل الفطريات والبكتيريا فقد تؤدي أيضاً إلى التحلّل. ويمكن ملاحظة هذا التلف بسهولة في تقطيع عرضي للجزر. فالديدان الأسطوانية تواصل نشاطها التدميري خلال التخزين في فصل الشتاء ويصبح الجزر غير ملائم للاستهلاك.

Tulipa spp و *Iris spp.* (Southey، 1993). تؤدي الإصابات إلى علامات خطية رمادية اللون تمتد باتجاه الأعلى بدءاً من الطبقة القاعدية على القشور اللحمية الخارجية. وفيما تتقدم الإصابة، ينتشر التلف عبر نسيج البصيلة بكامله ويسبب جفافاً ثانوياً، وعفنًا في الألياف بما يؤدي إلى سقوط البصيلة. وتبدو البقع البنية اللون بشكل دوائر واضحة حين تُقطع بصيلة مصابة بالعرض. كذلك، يشكل اصفرار الأوراق وموتها أعراضاً ثانوية يسببها تلف في البصيلة وتوقف ممكن لعمل الجذور.

وأظهرت إصابة الجذور الدرنية في نباتات الزينة *Liatris spicata* ("Gayflower")، "Blazing Star" أو "Button Snakeroot" بآفة *D. destructor* في التخزين البارد في جنوب أفريقيا عفنًا مائلًا إلى السواد حيث تعيش ديدان أسطوانية في أنسجة متاخمة للمواقع المتحللة (Daiber و Van der Vegte، 1983).

2-3 استخراج النيماتود

1-2-3 استخراج النيماتود من البصيلات والثوم

بهدف استخراج النيماتود، يتمّ قطع القشور المتضررة في البصيلات (وبخاصة القشور الداخلية) أو فصوص الثوم إلى أجزاء صغيرة ووضعها في وعاء (مثل صحيفة بتري) مع مياه الصنبور في درجة حرارة الغرفة. وللحصول على معلق نقي، يمكن أن توضع الأجزاء على منخل بفتحات بين 200 و250 ميكرونًا مغطى بورق ترشيح بوصفه دعامة (تقنية صحن Oostenbrink). وبعد ساعة أو أكثر، يمكن رؤية النيماتودات بواسطة مجهر مجسّم (تكبير 40 مرة على الأقل).

2-2-3 استخراج النيماتود من التربة والمواد النباتية

تشكّل طريقة قمع Baermann تقنية مرجعية لاستخراج النيماتود من التربة والمواد النباتية (البصيلات، والجذور، وقشور وبذور البطاطا). والقمع مزوّد بأنبوب مطاطي مربوط بساقه ومغلق برفّاص أو بملقط ملولب. يوضع القمع في دعامة ويُمَلَأ كله تقريباً بماء الصنبور. ثم، توضع أنسجة التربة أو النباتات المقطّعة إلى أجزاء صغيرة في شاش أو محرمة يتمّ ثنيها بحيث تحتجز المواد، وتغطيسها بلطف في الماء داخل القمع. عندها، تمر النيماتودات الناشطة عبر القماش وترقد

في أسفل ساق القمع. وبعد بضع ساعات، أو بعد مرور ليلة، تنساب كمية صغيرة من المياه التي تتواجد فيها هذه الديدان وتُفحص تحت المجهر (Hooper و Flegg، 1970).

وفي تقنية مختلفة قليلاً، يتم استبدال القمع بصحن وتفتيت كتل التربة وإزالة بقايا الحجارة والنباتات. ثم، يجري بسط التربة (50 ملم) بشكل متساوٍ على دائرة من منشفة ورقية ذات ثنية واحدة توضع على شاشة بلاستيكية واسعة الشبيكات وموجودة في حاوية بلاستيكية. بعدها، يُسكب الماء في الوعاء حتى تصبح التربة رطبة بكاملها إنما من دون أن تغمرها الماء. يُعطى الوعاء بعدها بصحفة بترية كبيرة للتقليل من تبخر الماء. تُترك هذه الوضعية لمدة 24 ساعة على الأقل، وبعدها توضع التربة جانباً ويُسكب المستعلق الذي يحتوي على النيماتود من الوعاء إلى الصحن لفحصها بواسطة مجهر تشريحي. يمكن استبدال التربة بأنسجة نباتية مقطّعة إلى أجزاء صغيرة (Kleynhans، 1997).

وأما تقنية Seinhorst للغشاوة التي تُستخدم في البصيلات والجذريات، فتختلف عن طريقة القمع لدى Baermann سيما أن عصارة النباتات ومنتجات الانحلال السام تُغسل بالماء. ومن الأفضل استخدام هذه الطريقة، مقارنة بطريقة القمع لدى Baermann، في نباتات من فصيلة *Narcissus spp* مثلاً. وفي هذه الطريقة، يوضع قمع Baermann أو صحن Oostenbrink في غشاوة أو ضباب من الماء لتلافي استنفاد الأكسجين. وتنتج هذه الغشاوة عن خراطيم ترش المياه على المواد النباتية، أو باتجاه الأعلى بحيث تعود وتسقط قطرات صغيرة بلطف على المواد النباتية. عندها، تترك النيماتود الحية الأنسجة النباتية وتحملها المياه إلى القمع أو الصحن حيث تترسب. ثم يتم جمع هذه الديدان كل 24 إلى 48 ساعة في إناء زجاجي بفتح الملقط الملولب على ساق القمع أو بجمع عينات على منخل قياس 20-25 ميكرونًا. يمكن مواصلة الاستخراج إلى حد أربعة أسابيع، وهي تقنية يصفها Hooper (1986).

وقد تمّ تكييف طريقة أخرى لاستخراج آفة *Ditylenchus spp* من المواد النباتية تبعاً لوصف Oliveira وآخرين (2013). تُقطع المواد النباتية إلى أجزاء من سنتيمتر واحد وتوضع في أوعية بسعة 500 ملم مملوءة بمياه الصنبور. يُحدث ثقبان في أغطية هذه الأوعية، يسمح الأول بالوصول إلى أنبوب مضخة حوض مائي ويكون الثاني بمثابة منفذ للهواء. يتم الإبقاء على هذه المواد لمدة 72 ساعة في تهوية مستمرة من المضخة. ثم يُسكب المستعلق الذي ينشأ عبر منخل قياس 1000 ميكرون لإزالة بقايا النباتات، ثم عبر منخل قياس 38 ميكرونًا لاستخراج النيماتود من المستعلق. وهذه الطريقة في التهوية تحول دون تعفن المواد النباتية بحيث تحصل زيادة دنيا في العناصر التي تتغذى من البكتيريا والفطريات، ويبقى عدد كبير من النيماتود حياً. وعند خض الوعاء خلال تهوية المستعلق الذي يحتوي على المواد النباتية، يخرج المزيد من هذه الديدان من الأنسجة الجذرية وبالتالي، هذا يسمح بتقدير مدى إصابة المواد النباتية بالآفة على نحو أكثر دقة.

يمكن أيضاً استخراج النيماتود من المواد النباتية باستخدام طريقة Coolen و D'Herde (1972). تُغسل المواد النباتية، وتُقطع إلى أجزاء بحجم 0.5 سم تقريباً، وتُنقع أجزاء من 5 غرامات في 50 مل من مياه الصنبور في خلاط منزلي بالسرعة الأدنى لمدة دقيقة واحدة. من بين مساوئ هذه الطريقة أن عينات كبيرة من النيماتود، مثل آفات *D. dipsaci* البالغة، قد تُقطع إلى إرب في الخلاط. ثم يُغسل المستعلق الذي يحتوي على النيماتود وبقايا الأنسجة عبر منخل قياس 750 ميكرونًا يوضع فوق منخل قياس 45 ميكرونًا. ثم، تُجمع المخلفات على المنخل قياس 45 ميكرونًا وتُسكب داخل أنابيب للطرز المركزي بسعة 50 ملم. ويُضاف حوالي ملم واحد من الكاولين إلى كل أنبوب، ثم يُمزج الخليط بشكل جيد ويخضع للطرز المركزي بسرعة تبلغ 3 000 دورة في الدقيقة الواحدة لمدة 5 دقائق. تُصب المادة الطافية ويُضاف محلول السكر (بكتافة 1.13 غ/سم) إلى الأنابيب. ويُمزج الخليط بعدها جيداً ويخضع للطرز المركزي بسرعة 1 750 دورة

في الدقيقة لمدة دقيقة واحدة. بعدها، تُغسل المادة الطافية عبر منخل قياس 45 ميكرونًا، ثم يتم جمع المخلفات ودراسة النيماتود.

وأما فحص الخضار المجففة وغيرها من المحاصيل البقولية للكشف عن وجود آفة *D. dipsaci* فيها فهو إجراء من خطوتين تتمثلان في (1) نقع كمية من البذور في مياه مهوأة خلال الليل، و(2) استخراج جزء من البذور المنقوعة في الغشاوة لمدة ثلاثة أيام. ويمكن تحديد وجود النيماتود في مياه النقع ومستخرج الضباب من خلال غربلة الأجزاء المائية الناجمة عن كل من الخطوتين على أن تخضع للفحص المجهرى لغرض التعرف إليها. وتستغرق هذه العملية سبعة أيام تقريباً، إنما يمكن تقصير هذه المدة إلى ثلاثة أيام بإلغاء الإجراء (2) (أي الاستخراج في الضباب). ويقضي الإجراء المعدل بنقع البقوليات خلال الليل في ماء مهوئ، ثم غربلتها وفحصها تحت المجهر للتعرف إليها.

ولاستخراج النيماتود من التربة، يمكن استخدام الطريقة التالية (بعد Kleynhans، 1997). تُغسل التربة (250 مل) عبر منخل واسع الشبيكات (2 مم) في سطل بسعة 5 لترات. وتُضاف ماء الصنبور بحيث تصبح السعة 5 لترات. ثم يُخلط المستعلق ويُترك ليرقد لمدة 30 ثانية قبل أن يُسكب عبر منخل قياس 45 ميكرونًا. ويُكرر هذا الإجراء بوضع تربة في السطل مرتين، إنما تُقصر أوقات الترسيب إلى 20 ثانية ثم إلى 10 ثوان. وتُنقل بعدها المخلفات من منخل قياس 45 ميكرونًا إلى أنابيب للطرز المركزي من 50 مل. وإذا كان المحلول في الأنابيب رملياً جداً، يمكن إضافة 5 مل من الكاولين في الأنابيب (ويُمزج جيداً) للمساعدة في ترسب النيماتود. ثم تخضع الأنابيب للطرز المركزي بسرعة 1750 دورة في الدقيقة لمدة 7 دقائق. وتُصب المادة الطافية من كل أنبوب ويتم التخلص منها. كما يُضاف محلول من السكر (450 غ/لتر من الماء) إلى الأنابيب، ويُخلط هذا المزيج من السكر والتربة جيداً قبل إخضاعه مرة أخرى للطرز المركزي بسرعة 1750 دورة في الدقيقة لمدة 3 دقائق. ثم تُسكب المادة الطافية عبر منخل قياس 45 ميكرونًا، وتُجمع المخلفات، التي تحتوي على النيماتود، في إناء لفحصها. هذه تقنية أساسية، وحسب مهارات التقني ونوع التربة؛ يمكن خسارة إلى حد 40 في المائة من النيماتود. وتشمل طرق أخرى يمكن استخدامها لاستخراج هذه الديدان من التربة تقنية Flegg المعدلة بتقنية Cobb، وطريقة Oostenbrink للتصنيف (المنظمة الأوروبية لوقاية النباتات، 2013 ج). ويصف Hooper وآخرون (2005) طرق استخراج مختلفة جرى تكييفها للاستفادة من حجم النيماتود، وكثافتها وحركتها.

4- التحديد

ويقتصر تحديد آفة *Ditylenchus* spp. بوسائل مورفولوجية على العينات البالغة، ومن الأفضل أن يجري فحص النيماتود من الذكور والإناث من نوع محدد تحت مجهر عالي القدرة. ومن شأن إعداد شرائح رفيعة الجودة أن تسمح بالتعرف إلى آفتي *D. destructor* و *D. dipsaci* بكل تأكيد من خلال الفحص المورفولوجي وحده. وينبغي اللجوء إلى التحديد المورفولوجي لصغار *Ditylenchus* في عينة بهدف التأكيد فقط على وجود النوع المعني في العينة. ونظراً إلى أن آفة *Ditylenchus* spp. الفطرية تلوث في الكثير من الأحيان المواد النباتية البالية، ينبغي التأني في تحديد العينات في النباتات والتربة على السواء.

1-4 التحديد المورفولوجي

من الأفضل أن يستند تحديد آفتي *D. destructor* و *D. dipsaci* إلى طرق مورفولوجية. ويمكن استخدام الطرق الجزيئية لتحديد هذين النوعين في مستويات الإصابة المتدنية أو في وجود صغار العينات فقط. ويمكن تطبيق الطرق الجزيئية على

العينات البالغة التالفة وغير العادية، وفي جميع مراحل الحياة، بما في ذلك المراحل الأولى من النمو، حين يتعذر التوصل إلى تحديد مورفولوجي للأنواع.

1-1-4 إعداد العينات

يتم الإعداد للتحضيرات المؤقتة من أجل تحديد سريع أو دراسة الخصائص التي تُلاحظ جيداً في العينات غير المثبتة على النحو التالي (Kleynhans، 1997):

- تُنقل العينات الحية إلى قطرة صغيرة من المياه على شريحة زجاجية.
- يتم تسخين الشريحة لفترة وجيزة فوق نار خافتة، والتحقق من حركة النيماتود من حين إلى آخر. يجب التوقف عن التسخين حالما تتوقف عن الانتفاخ.
- توضع ساترة وتُغلق بإحكام حول الأطراف بطلاء للأظافر. وحين يجفّ الطلاء، تصبح الشريحة مع العينات جاهزة للدراسة.

وفي الفحص المجهرى الخفيف، يتم استخراج النيماتود الحية من التربة أو من المواد النباتية، وتُقتل على حرارة متدنية (65-70 درجة مئوية)، مثبتة في FAA (35 في المائة مياه مقطرة، و10 في المائة من 40 في المائة فورمالين، 5 في المائة حمض الخلّ الثلجي، 50 في المائة من 95 في المائة كحول) (Andrássy، 1984) وتُنقل إلى الغليسيرول (Hooper وآخرون، 2005) وتوضع في الغليسيرين اللامائي بين شرائح الساترة طبقاً لوصف Seinhorst (1959) وGoodey (1963).

ولعملية التحديد في الفحص المجهرى الخفيف، يوصى التكبير من 500 إلى 1 000 مرة (عدسة الغمر بالزيت) إضافةً إلى فحص مجهرى لتباين فروق التداخل.

2-1-4 خصائص التشخيص المورفولوجي

يمكن إيجاد مفاتيح الرموز لأنواع *Ditylenchus* في مؤلف Viscardi وBrzeski (1993) وBrzeski (1998). ويرد في الجدول 1 أدناه مفتاح الرموز للتمييز بين آفة *Ditylenchus spp.* وأنواع أخرى من tylenchid وaphelenchid.

الجدول 1- مفتاح الرموز للتمييز بين آفة *Ditylenchus spp.* وأنواع أخرى من *tylenchid* و *aphelenchid*.

Tylenchida – 2	مخرج غدة الحلق الظهري قرب قاعدة القلم؛ البصيلة الوسطى مستديرة أو بيضاوية الشكل أو غير موجودة.	1
Aphelenchida	مخرج غدة الحلق الظهري في البصيلة الوسطى؛ تكون البصيلة الوسطى مميزة بارزة، ومستطيلة الشكل عادةً	
3	الجزء الأمامي من المريء والبصيلة الوسطى متحدان ضمن وحدة واحدة؛ القلم ليس طويلاً إلا في حالات استثنائية.	2
أنواع أخرى	الجزء الأمامي من المريء يتسع بصورة تدريجية ويندمج مع البصيلة الوسطى؛ القلم طويل جداً، وغالباً ما تتواجد قاعدته في الجزء الأمامي من البصيلة الوسطى.	
4	أنثى بالغة دودية الشكل	3
أنواع أخرى	أنثى بالغة من الطفيليات اللاعنقية والكيسية أو الكمثرية الشكل على الجذور.	
5	بصيلة وسطى صمامية	4
أنواع أخرى	بصيلة وسطى من دون صمام ¹	
6	غدد الحلق الموجودة داخل البصيلة القاعدية، لا تتداخل مع الأمعاء أو تتداخل معها بشكل طفيف؛ نادراً ما يكون الإطار الرأسي ظاهراً؛ القلم ضعيف إلى قوي بصورة معتدلة	5
أنواع أخرى	غدد الحلق بشكل فلقة، تتداخل معها الأمعاء؛ الإطار الرأسي قوي؛ القلم ضخم	
7	مبيض واحد؛ فرج خلفي	6
أنواع أخرى	مبيضان؛ الفرع خلف المحور الاستوائي	

<i>Ditylenchus</i>	الأنثى غير متورمة؛ الجلبة في الأنثى بشكل عميد رباعي مع أربعة صفوف يتألف كل منها من أربع خلايا؛ الجراب لدى الذكور يغطي ثلث الذنب أو أكثر	7
أنواع أخرى	الأنثى متورمة؛ تتألف الجلبة من أكثر من 20 خلية	

المصدر: مقتبس من Heyns (1971) و Siddiqi (2000)

¹ بعض أنواع الطفيليات غير النباتية من آفة *Ditylenchus* ليس فيها بصيلة وسطى صمامية.

تتشابه *D. africanus*، و *D. destructor*، و *D. dipsaci*، و *D. gigas*، و *D. myceliophagus* من حيث المورفولوجيا والقياس، إنما تتمايز عن بعضها بما يلي (الجدول 2)، شرط إمكانية قياس ودراسة العينات من الذكور والإناث.

1-2-1-4 وصف آفة *Ditylenchus dipsaci*

حسب Sturhan و Brzeski (1991)، و Wendt وآخرين (1995) و Brzeski (1998). ترد في الشكل 10 التفاصيل ووجهات النظر.

//القياسات (المعايير موصوفة في المنظمة الأوروبية لوقاية النباتات (2013 بء)). (مثل الشوفان، و *Avena sativa* L، حسب Blake، 1962، في Hooper، 1972):

(n = 48 ♀♀): L = 1.3 mm ± 0.009; a = 62 ± 5.6; b = 15 ± 1.4; c = 14 ± 2.1; V = 80 ± 1.5.

(n = 23 ♂♂): L = 1.3 mm ± 0.017; a = 63 ± 11.3; b = 15 ± 1.7; c = 14 ± 2.1; T = 72.

//المورفولوجيا العامة. الجسم مستقيم أو تقريباً مستقيم لدى الاسترخاء. الحقل الجانبي ذو أربعة قواطع. الرأس متواصل مع الجسم المتأخم (الشكل 10 بء). يبلغ طول القلم بين 10 و 13 ميكرونًا لدى الإناث، وبين 10 و 12 ميكرونًا لدى الذكور. يمتد مخروط القلم على نصف طول القلم تقريباً، والعقد مدوّرة ونامية جيداً. البصيلة الوسطى عضلية ويبلغ طول تثخينات جدران اللعة بين 4 و 5 ميكرون (الشكل 10 أ). إنحراف البصيلة القاعدية أو الأمعاء المتداخلة لبعض الميكرومتر. المسمّ الإفراغي مقابل الجزء الخلفي من البرزخ أو البصيلة الغدية. يشغل الجزء الفرجي الخلفي من الكيس الرحمي حوالي نصف المسافة أو أكثر بقليل بين الفرج والشرح (الشكل 10 دال). ويغطي الجراب ثلاثة أرباع الذنب لدى الذكور. يتراوح طول الشويكات بين 23 و 28 ميكرونًا، كما أن الذنب لدى الجنسين مخروطي الشكل ومستدق الرأس.

خصائص التشخيص المورفولوجي. القواطع الجانبية (أربعة) (الشكل 10 واو)، القلم الطويل نسبياً، وطول الكيس الفرجي الخلفي والذنب المروّس (الشكل 10 دال) هي الخصائص المميزة لهذه الأنواع (Andrássy، 2007). يمكن تمييز آفة *D. dipsaci* عن آفة *D. gigas* من حيث الجسم الأقصر لدى الإناث (1.0–1.7 مقابل 1.6–2.2 ملم)، والمسافة الأطول بين الفرج والشرح (202–206 مقابل 132–188 ميكرونًا) (Vovlas وآخرون، 2011). ولدى فحص الشويكات من الجهة الجانبية، تبدو أكثر تقوساً في آفة *D. dipsaci* ممّا هي عليه في *D. destructor* (الشكل 10 جيم). أنظر Willemssen و Karssen (2010) لمزيد من المعلومات عن الشويكات واستخدامها في تحديد آفتي *D. dipsaci* و *D. destructor*. تجدر الإشارة إلى أن بذور *V. faba* تتضمن بصورة خاصة يرقات من المرحلة الرابعة.

4-2-1-2 وصف آفة *Ditylenchus destructor*

حسب Sturhan و Brzeski (1991). ترد التفاصيل والآراء في الشكل 11.

القياسات (حسب Goodey، 1952، من عوائل نباتية عالية متنوعة).

($n = 237 \text{♀♀}$): $L = 1.07 (0.69-1.89) \text{ mm}$; $a = 32 (18-49)$; $b = 7 (4-12)$; $c = 17 (9-30)$; $V = 80 (73-90)$.
($n = 231 \text{♂♂}$): $L = 0.96 (0.76-1.35) \text{ mm}$; $a = 35 (24-50)$; $b = 7 (4-11)$; $c = 14 (11-21)$; $T = 65 (40-84)$.

المورفولوجيا العامة. العينات البالغة من آفة *D. destructor* هي حيوانات دقيقة أشبه بالديدان، يتراوح طولها بين 0.8 و 1.4 ملم فيما يبلغ عرضها بين 23 و 47 ميكرونًا، كما أنها مقوسة قليلاً عند البطن. وتُلاحظ اختلافات كبيرة لدى العينات البالغة من حيث قياسها وفقاً لعوائلها وعمرها. كذلك، يتشابه الذكور والإناث من حيث المظهر العام. يضم المجال الجانبي ستة قواطع (الشكل 11 واو)، وينخفض عددها إلى قاطعين في منطقة العنق والذنب. الحلقة الجليدية وحلقة الرأس دقيقة، وغالباً ما يكون الرأس أضيق من الجسم المتاحم، ويمكن تحديد أربعة حلقات في الرأس من خلال فحص مجهرى بالالكترن (Wendt وآخرون، 1995). يتراوح طول القلم بين 10 و 12 ميكرونًا، وقد لوحظ من حين إلى آخر وجود عينات يبلغ طول القلم فيها 14 ميكرونًا. يشكل مخروط القلم نسبة 45 إلى 50 في المائة من طول القلم، كما أن المقابض واضحة ومدوّرة ومنحدرة إلى الخلف. البصيلة الوسطى عضلية، ويبلغ طول تثخينات جدران اللعة (أو الصمّام) 3 ميكرونات تقريباً. تتداخل البصيلة الخلفية مع الأمعاء على مسافة قصيرة على الجانب الظهري من الجسم، رغم إمكانية ملاحظة انحراف في البصيلة الغدية في بعض العينات من حين إلى آخر (الشكل 11 ألف). يتواجد المسم الإفرافي مقابل غدد المريء، كما يمتد الكيس الفرجي الخلفي على ثلاثة أرباع المسافة بين الفرج والشرح (الشكل 11 هاء). ويكون طول البيض ضعف عرضها (Andrássy، 2007). الشفاه في الفرج سميكة وناثئة (الشكل 11 باء) والمبيض الأممي ممدد ويصل أحياناً إلى منطقة المريء. يشغل الجزء الفرجي الخلفي من الكيس الرحمي حوالي 40 إلى 98 في المائة من المسافة بين الفرج والشرح، (الشكل 11 هاء). ويحيط الجراب الذكري ما بين 50 و 90 في المائة من طول الذنب، ويبلغ طول الشويكات بين 24 و 27 ميكرونًا. يختلف شكل الشويكات في آفة *D. dipsaci* عن شكلها في آفة *D. destructor* إذ نلاحظ فيها قبة بطنية (الشكل 12) (Willemsen و Karssen، 2010). تمتد الخصية وصولاً إلى قاعدة المريء، والذنب لدى الجنسين مخروطي الشكل، يبلغ طوله ما بين ثلاثة إلى خمسة أعراض الجسم الشرجي، وهو مقوس عادة من ناحية البطن ومدور عند طرفه.

خصائص التشخيص المورفولوجي. إن آفة *D. destructor* مشابهة لآفة *D. dipsaci*، إنما تختلف عن هذا النوع من حيث المجال الجانبي الذي تظهر فيه ستة قواطع (الشكل 11 واو)، والكيس الفرجي الخلفي الأطول وطرف الذنب المدور على نحو رقيق (الشكل 11 دال). وتختلف مورفولوجيا *D. destructor* عن *D. africanus* بصورة خاصة من حيث طول القلم الذي قد يتداخل بشكل طفيف، وطول الشويكات، ما يحتم وجود ذكور في أعداد هذه الجراثيم. وتتميز تكنولوجيا تفاعل البلمرة المتسلسل بحساسية كافية لحلّ الفروقات بين الأصناف المتصلة ببعضها بشكل وثيق. لقد استخدم Wendt وآخرون (1995) تعدد الأشكال لطول جزء القطع لفصل *D. destructor* عن *D. africanus*. ولدى فحص الآفة من الناحية الجانبية، تكون الشويكة أقل تقوساً في *D. dipsaci* مما هي عليه في *D. destructor* (الشكل 11 جيم).

ملاحظات : قد تختلف الخصائص المذكورة أعلاه ويكاد يكون من المستحيل تحديد عيّنة واحدة في مستوى النوع. يوصى بفحص عيّنة واحدة على الأقل من الذكور والإناث. ويمكن أن تنخفض القواطع الجانبية لدى الذكر مثلاً إلى أربعة قرب الذنب، ما يشكّل نمطاً مشابهاً للنمط في *D. dipsaci*.

الجدول 2- المقارنة بين خصائص التشخيص في *Ditylenchus africanus*، و *Ditylenchus destructor*، و *Ditylenchus dipsaci*، و *Ditylenchus myceliophagus*، و *Ditylenchus gigas*

الخصائص	<i>D. destructor</i> (حسب ،Hooper (1973	<i>D. africanus</i> (حسب Wendt وآخريين، (1995	<i>D. myceliophagus</i> (حسب Hesling، (1974	<i>D. gigas</i> (حسب Vovlas وآخريين، (2011	<i>D. dipsaci</i> (حسب ،Hooper (1972
طول الجسم لدى الإناث (مم)	1.9 – 0.8	1.1 – 0.7	1.4 – 0.6	2.2 – 1.6	1.7 – 1.0
عدد الخطوط الجانبية	6	15–6	6	4	4
شكل طرف الذنب	مدور	مدور	مدور	مدور إلى مدور بشكل رفيع	مدور
c (طول الجسم/طول الذنب) لدى الأنثى	20–14	16.9 – 8.8	17 – 8.2	27.6 – 15.7	20–11
البصيلة الخلفية	قصيرة، متداخلة من ناحية الظهر	قصيرة، متداخلة من ناحية الظهر	قصيرة، متداخلة من ناحية الظهر	متداخلة بشكل طفيف	غير متداخلة
طول القلم (ميكرون) لدى الأنثى	14–10	10–8	8–7	13–10.5	12–10
الجزء الفرجي الخلفي من الكيس الرحمي (PUS)/ المسافة بين الفرج والشرح (٪) (1)	90–53	85–37	69–30	حوالي 50 (2)	70–40
طول الشويكات (ميكرون)	27–24	21–17	20–15	28–23.5	28–23
طول الجراب (كنسبة مئوية من طول الذنب)	70–50	66–48	55–20	76–72	70–40
أفضلية العوائل (3)	نباتات أعلى وغصينات فطرية	القول السوداني والفطر	غصينات فطرية	النباتات الأعلى	النباتات الأعلى والفطريات

(1) PUS — الجزء الفرجي الخلفي من الكيس الرحمي

(2) محتسبة من وصف النوع

(3) مفيد في حال وجود معايير مورفولوجية محيرة

2-4 التحديد الجزيئي

عند الضرورة، يمكن إجراء تحديد جزيئي لنوعي *D. dipsaci* أو *D. destructor*، وبخاصة حين تكون الأنواع محيرة (مثل *D. myceliophagus*، أو *D. africanus*، أو *D. gigas*)، ولا يمكن تمييزها بشكل حاسم عن الأنواع المستهدفة مورفولوجياً.

وفي هذه الحالة، من الأفضل تخزين المحلول الذي يتضمن النيماتود في ظروف باردة (أي مثلاًجة) إنما ليس لأكثر من بضعة أيام قبل استخراج الحمض النووي.

وفي هذا البروتوكول التشخيصي، يتم وصف الطرق (بما في ذلك الإشارة إلى الأسماء التجارية) حال نشرها حيث أنها تحدد المستوى الأصلي الذي تحقق بالنسبة للحساسية والخصوصية و/أو إمكانية الاستدساخ. إن استخدام أسماء المواد المطهرة، والمواد الكيميائية أو الأجهزة في بروتوكولات التشخيص لا يعني المصادقة عليها واستبعاد بعضها الآخر التي قد تكون مناسبة. ويمكن مواءمة الإجراءات المخبرية الواردة في البروتوكولات للمعايير الخاصة بمختبرات فردية، شريطة أن تكون مجازة تماماً.

1-2-4 آفة *Ditylenchus dipsaci*

وُضعت نهج جزيئية مختلفة لتحديد آفة *D. dipsaci*.

لقد تمّ استخدام التهجين (Wendt وآخرون، 1993) والارتحال الكهربائي (Palazova، 1997، Evans و Tenente، 2002، Baicheva) للتحقق من مفهوم الأصناف داخل فصيلة *D. dipsaci* والتنوع الوراثي بين أنواع *Ditylenchus*. وتمّ التحقق بشكل تفصيلي من النهج الجزيئية من أجل تحديد محدد، وبخاصة بواسطة تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل أو تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل - تعدد الأشكال لطول جزء القطع (PCR-RFLP)، وللكشف عن التقلب في الأعداد من خلال تحليل التتابع (Leal-Bertioli وآخرون، 2000؛ Zouhar وآخرون، 2002).

وقد نُشرت ستة اختبارات جزيئية (تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل أو تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل - تعدد الأشكال لطول جزء القطع) يمكن استخدامها في تحديد آفة *D. dipsaci*؛ ويرد وصفها في الأجزاء 4-2-4 إلى 9-2-4. كذلك، يشمل الوصف دقائق كل اختبار، إضافةً إلى جنس وأنواع النيماتود التي جرى تقييم كل اختبار بشأنها.

وإن التحليل الجزيئي لتسلسلات الحمض النووي الريبسي، بما في ذلك المناطق المختلفة (منطقة تتابع مبادئ النسخ الداخلي 5.8S-ITS21، والجزء D2-D3 من جينات *s8S*، ووحدة S18 الفرعية الصغيرة، والجينات الجزيئية المتقدرة من أجل *cytochrome c oxidase I* (الحمض النووي المتقدري) وتسلسلات الجينات *hsp90* (الحمض النووي)، يميّز بشكل واضح بين *D. dipsaci* s.s. و *D. gigas* (Vovlas وآخرون، 2011).

2-2-4 آفة *Ditylenchus destructor*

يستند التشخيص الجزيئي لآفة *D. destructor* على تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل - تعدد الأشكال لطول جزء القطع أو تسلسل منطقة مبادئ النسخ الداخلي لجينات الحمض النووي الريبسي.

يبيّن Wendt وآخرون (1993) أن تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل – تعدد الأشكال لطول جزء القطع في منطقة مبادئ النسخ الداخلي سمح بتمييز آفة *D. destructor* التي تتطفل على البطاطا عن صنفين من *D. dipsaci* وعن *D. myceliophagus*. وقد نشروا تشخيص ملامح تعدد الأشكال لطول جزء القطع لهذه الأنواع الثلاثة. ويمكن تمييز آفة *D. africanus* عن *D. destructor* من خلال المزج بين الخصائص التالية: تعدد الأشكال لطول جزء القطع التي تولدها سبعة أنزيمات تقييد على منطقة مبادئ النسخ الداخلي لجينات الحمض النووي الريبسي.

حصل Ji وآخرون (2006) على ملامح تعدد الأشكال لطول جزء القطع لعدة مجتمعات *D. destructor* من البطاطا الحلوة، وكشفوا عن بعض الاختلافات في ملامحها المتصلة بتعدد الأشكال لطول جزء القطع.

قام Powers وآخرون (2001) أولاً بترتيب تتابع مبادئ النسخ الداخلي لآفة *D. dipsaci*، إنما تتوفر حالياً في قاعدة بيانات بنك الجينات أكثر من 50 تسلسلاً لأجزاء الحمض النووي الريبسي التي تم الحصول عليها من جراثيم *D. destructor* جرى جمعها من مواقع ونباتات عائل مختلفة.

4-2-3 استخراج الحمض النووي

يُنقل العديد من العينات الصغيرة أو البالغة إلى أنبوب مجهري، ويُستخرج الحمض النووي منها. يقوم Webster وآخرون (1990) بوصف عملية استخراج الحمض النووي.

4-2-4 اختبار تتابع مبادئ النسخ الداخلي – الحمض النووي الريبسي – تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل – تعدد

الأشكال لطول جزء القطع لآفتي *D. destructor* و *D. dipsaci*

وضع Wendt وآخرون هذا الاختبار (1993).

المنهجية

البيانات العامة للحمض النووي الريبسي في مبادئ النسخ الداخلي (الموصوفة في Vrain وآخرون (1992)) المستخدمة في هذا الاختبار هي:

18S: 5'-TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT-3'

26S: 5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3'

الأمبليكونات هي 900 زوج قاعدي لكل من آفتي *D. dipsaci* و *D. myceliophagus*، و 1200 زوج قاعدي لآفة *D. destructor*.

يتم الحصول على التضخيم عقب توصيات المصنّع لرزم تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل التي تحتوي على وحدات من بوليميراز الحمض النووي تاك، ونيوكليوتيد وداريء تفاعل.

تتألف بارامترات تدوير تفاعل البلمرة المتسلسل¹ من دورة أولى لمدة 1.5 دقيقة على حرارة 96 درجة مئوية، و 30 ثانية على حرارة 50 درجة مئوية و 4 دقائق على حرارة 72 درجة مئوية؛ و 40 دورة من 45 ثانية على حرارة 96 درجة

¹ بارامترات تدوير تفاعل البلمرة المتسلسل موصوفة في المقالة الأساسية (Wendt وآخرون، 1993). وقد يؤدي تحسين أجهزة التدوير الحرارية والمواد المطهرة لتفاعل البلمرة المتسلسل إلى مراجعة بارامترات التدوير المذكورة.

مئوية، و30 ثانية على حرارة 50 درجة مئوية و4 دقائق على حرارة 72 درجة مئوية؛ ودورة أخيرة لمدة 45 ثانية بدرجة 96 درجة مئوية، و30 ثانية على حرارة 50 درجة مئوية و10 دقائق على حرارة 72 درجة مئوية. وبعد تضخيم الحمض النووي، يوضع 2 إلى 5 ميكرونات من المنتج على هلام الأغاروس بتركيز 1 في المائة ويُخزّن الباقي على حرارة 20 درجة مئوية تحت الصفر ويستخدم في تعدّد الأشكال لطول جزء القطع. وتكون عدة أنزيمات قطع مفيدة لتمييز آفتي *D. destructor* و *D. dipsaci* عن أنواع أخرى من *Ditylenchus* مثل *HaeIII*، و *HpaII*، و *HinfI* و *RsaI* (Wendt وآخرون، 1993). ويرد في الجدول 3 طول أجزاء القطع الناجمة عن أنزيمات التشخيص هذه.

الجدول 3- الطول التقريبي لأجزاء قطع الحصر ذات التكوين والطول المتعددة في الحمض النووي الريبسي في مبادئ النسخ الداخلي لأنواع *Ditylenchus* الناجمة عن 4 أنزيمات حصر

الأنزيم	<i>D. destructor</i>	<i>D. myceliophagus</i>	<i>D. dipsaci</i>	<i>D. gigas</i> ¹	<i>D. africanus</i>
منتج تفاعل البلمرة المتسلسل غير المحصور	1 200	900	900	900	1 000
<i>HaeIII</i>	450, 170	450, 200	900	800, 200	650, 540
<i>HpaII</i>	1 000	900	320, 200, 180	600, 200	950
<i>HinfI</i>	780, 180	630, 310	440, 350, 150	350, 150	450, 340, 150, 130, 100
<i>RsaI</i>	600, 250, 170	900	450, 250, 140	490, 450	690, 450

المصدر: Wendt وآخرون (1993، 1995).

الأزواج القاعدية؛ مبادئ النسخ الداخلي؛ وتفاعل البلمرة المتسلسل؛ وتعدّد الأشكال لطول جزء القطع؛ والحمض النووي الريبسي.

¹ مسمّاة في الورقة الأساسية بوصفها صنف عملاق من آفة *D. dipsaci*

4-2-5 اختبار تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل القائم على منطقة التضخيم المتتالي لآفة *D. dipsaci*

لقد صُمم اختبار تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل القائم على منطقة التضخيم المتتالي، الذي وضعه Esquibet وآخرون (2003)، على أنه اختبار خاص بالأنواع لآفة *D. dipsaci* مع التمييز بين الأصناف العادية والعملاقة منها. ويجري تقييمها مقارنةً بآفة *D. myceliophagus* (مجتمع واحد)، وصنف واحد من آفة *D. dipsaci* (11 مجتمعاً من عوائل ومواقع مختلفة)، وصنف عملاق من آفة *D. dipsaci*، يصفه Vovlas وآخرون (2011) بأنه *D. gigas* (11 مجتمعاً من مواقع مختلفة معزولة *V. faba*).

المنهجية

البادئات المستخدمة والخاصة بآفة *D. dipsaci* هي :

D. dipsaci (الصف العادي) :

H05: 5'-TCA AGG TAA TCT TTT TCC CCA CT-3'

H06: 5'-CAACTG CTA ATG CGT GCT CT-3'

D. dipsaci صف عملاق، يصفه Vovlas وآخرون (2011) بأنه (*D. Gigas*)

D09: 5'-CAA AGT GTT TGA TCG ACT GGA-3'

D10: 5'-CAT CCC AAA ACA AAG AAA GG-3'

وأما الأمبليكون فهو تقريباً 242 زوجاً قاعدياً لآفة *D. dipsaci* (الصف العادي) و198 زوجاً قاعدياً لآفة *D. dipsaci* (الصف العملاق). ولهاتين المجموعتين من البادئات، لا يُلاحظ أي تضخيم لدى أنواع غير مستهدفة وأصناف غير مستهدفة (Esquibet وآخرون، 2003).

ويتألف خليط تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل البالغ 10 ميكرونات من: 1.5 ميليمولار من كلوريد الماغنيزيوم $MgCl_2$ ، و250 ميكرو متر من ثلاثي فوسفات النيوكلييتيد منقوص الأكسجين (dNTP)، و690 نانومتر عن كل بادئة لتفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل المزدوج (H05-H06) أو (D09-D10) أو 500 نانومتر عن كل بادئة لتفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل المتعدد (H05-H06-D09-D10) و0.5 وحدة من بوليميراز الحمض النووي تاك. وأما بارامترات التدوير فهي: خطوة مسخ أولية لمدة 3 دقائق على حرارة 94 درجة مئوية؛ و30 دورة لمدة دقيقة واحدة على حرارة 94 درجة مئوية، ودقيقة واحدة على حرارة 72 درجة مئوية؛ وخطوة استتالة نهائية لمدة 10 دقائق على حرارة 72 درجة مئوية. ويتم تحليل نواتج تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل بواسطة الارتحال الكهربائي لهلام الأغاروس.

4-2-6 اختبار S18 واختبار تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل الخاص بمباعد النسخ الداخلي 1 لآفة *D. dipsaci*

صُمم هذا الاختبار الذي وضعه Subbotin وآخرون (2005) على أنه اختبار خاص بالأنواع لآفة *D. dipsaci* s.s. (الصف العادي فقط). وجرى تقييمه مقارنة بآفة *D. destructor* (مجتمع واحد)، والصف العادي من آفة *D. dipsaci* (18 مجتمعاً من عوائل ومواقع مختلفة) وآفة *Ditylenchus* sp. (12 مجتمعاً من عوائل ومواقع مختلفة).

المنهجية

البادئات الخاصة بآفة *D. dipsaci* والمستخدم هي :

rDNA2: 5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3' (Vrain وآخرون، 1992)

DitNF1: 5'-TTA TGA CAA ATT CAT GGC GG-3'

يبلغ هذا التضخيم حوالي 263 زوجاً قاعدياً لآفة *D. dipsaci* s.s. (الصف العملاق، المسمى لاحقاً *D. gigas*، غير مشمول). ولا يُلاحظ أي تضخيم لدى الأنواع غير المستهدفة.

يتألف خليط تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل البالغ 25 ميكرونات من: تركيز مرة واحدة من أصل تركيز 10 مرات لداري، تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل بما في ذلك 15 ميليمولار من كلوريد الماغنيزيوم $MgCl_2$ ، و0.2 ميليمولار من كل ثلاثي

فوسفات النيوكلييتيد منقوص الأكسجين (dNTP)، و 60 نانو متر لكل بادئة ووحدة واحدة من بوليميراز الحمض النووي تاك. ويجري تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل باستخدام جهاز تدوير حراري من نوع بيلتييه (Peltier) مجهز ببئر 96 (PTC100، MJ Research²) مع بارامترات التدوير التالية: خطوة مسح أولية لمدة 4 دقائق على حرارة 94 درجة مئوية؛ و 35 دورة من 15 ثانية على حرارة 94 درجة مئوية، و 30 ثانية على حرارة 57 درجة مئوية و 30 ثانية على حرارة 72 درجة مئوية؛ وخطوة استتالة نهائية لمدة 10 دقائق على حرارة 72 درجة مئوية. ويتم تحليل نواتج تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل بواسطة الارتحال الكهربائي لهلام الأغاروس.

4-2-7 اختبار تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل الخاص بالحمض النووي الريبسي 8S5. لآفة *D. dipsaci*

صُمم هذا الاختبار الذي وضعه Marek وآخرون (2005) على أنه اختبار خاص بأنواع آفة *D. dipsaci*. وجرى تقييمه مقارنةً بآفة *D. dipsaci* (ثلاثة مجتمعات أوروبية من عوائل مختلفة) ومجتمعات من الأصناف غير المستهدفة (*Globodera pallida*، *Bursaphelenchus xylophilus*، *Rhabditis* spp.).

المنهجية

وُضعت مجموعتان من البادئات المحددة لتحديد آفة *D. dipsaci*، إنما البادئات الأكثر حساسية (تم الكشف عن 10 pg من الحمض النووي المستهدف) هي:

PF1: 5'-AAC GGC TCT GTT GGC TTC TAT-3'

PR1: 5'-ATT TAC GAC CCT GAG CCA GAT-3'

يبلغ الأمبليكون في هذه المجموعة من البادئات حوالي 327 زوجاً قاعدياً لآفة *D. dipsaci*.

يتألف خليط أنزيم تفاعل البلمرة المتسلسل البالغ 25 ميكروناً من: مادة دائرة تاك مركزة مرة واحدة، و 1.5 ميلليمولار من كلوريد الماغنيزيوم $MgCl_2$ ، و 200 ميكرو ميتر لكل من كل ثلاثي فوسفات النيوكلييتيد منقوص الأكسجين (dNTP)، و 10 pmol لكل بادئة (مجموعة بادئات PF1-PR1) و 1.5 وحدة من بوليميراز الحمض النووي تاك (Fermentas²). وقد وُضع اختبار تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل باستخدام جهاز تدوير حراري من نوع بيلتييه (Peltier) مجهز ببئر 96 (PTC200، MJ Research²) ببارامترات التدوير التالية: 3 دقائق على حرارة 94 درجة مئوية؛ و 30 دورة من دقيقتين على حرارة 94 درجة مئوية، و 30 ثانية على حرارة 62 درجة مئوية ودقيقتين على حرارة 72 درجة مئوية؛ وخطوة استتالة نهائية لمدة 10 دقائق على حرارة 72 درجة مئوية. ويتم تحليل نواتج تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل بواسطة الارتحال الكهربائي لهلام الأغاروس.

² في هذا البروتوكول التشخيصي، يتم وصف الطرق (بما في ذلك الإشارة إلى الأسماء التجارية) حال نشرها حيث إنها تحدد المستوى الأصلي الذي تحقق بالنسبة للحساسية والخصوصية و/أو إمكانية الاستدساخ. وإن استخدام أسماء المواد الكيميائية أو الأجهزة في بروتوكولات التشخيص لا يعني المصادقة عليها واستبعاد بعضها الآخر التي قد تكون مناسبة. ويمكن مواءمة الإجراءات المخبرية الواردة في البروتوكولات للمعايير الخاصة بمختبرات فردية، شريطة أن تكون مجازة تماماً.

4-2-8 اختبار تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل الخاص بالحمض النووي الريبسي 8S5. ومبادئ النسخ الداخلي لآفة *D. dipsaci*

صُمم هذا الاختبار الذي وضعه Kerkoud وآخرون (2007) على أنه اختبار خاص بأنواع آفة *D. dipsaci*. وجرى تقييمه مقارنة بآفة *D. dipsaci* (عشرة مجتمعات من عوائل ومواقع مختلفة)، وآفات *D. africanus*، و *D. destructor*، و *D. myceliophagus*، و *Aphelenchoides ritzemabosi* (مجتمع واحد من كل نوع)، وآفة *Ditylenchus sp.* (وفقاً للورقة والموصوفة الآن بأنها *D. gigas* (10 مجتمعات من عوائل ومواقع مختلفة معزولة عن *V. faba*)).

المنهجية

تُستخدم مجموعتان من البادئات المحددة، الأولى لتحديد آفة *D. dipsaci* وحدها والثانية لتحديد آفة *D. gigas* و *D. dipsaci*. ويسمح استخدام المجموعتين من البادئات الفصل بين آفة *D. gigas* وآفة *D. dipsaci*. والبادئات هي التالية: المجموعة الأولى من البادئات:

DdpS1: 5'-TGG CTG CGT TGA AGA GAA CT-3'

rDNA2: 5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3' (Vrain وآخرون، 1992)

يبلغ الأمبليكون حوالي 517 زوجاً قاعدياً لآفة *D. dipsaci*. ولا يُلاحظ أي أمبليكون لدى أنواع غير مستهدفة، بما في ذلك آفة *D. gigas*.

المجموعة الثانية من البادئات:

DdpS2: 5'-CGA TCA ACC AAA ACA CTA GGA ATT-3'

rDNA2: 5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3' (Vrain وآخرون، 1992)

يبلغ الأمبليكون حوالي 707 زوجاً قاعدياً لآفة *D. dipsaci* و *D. gigas*.

يتألف خليط أنزيم تفاعل البلمرة المتسلسل البالغ 20 ميكروناً من: دارئ تضخيم من 1.5 ميكروميلا مع كلوريد الماغنيزيوم $MgCl_2$ نهائي، وتركيز يبلغ 5 ميكروميلا، و200 ميكروميتر من كل ثلاثي فوسفات النيوكلييتيد منقوص الأكسجين (dNTP)، و0.5 ميكروميتر لكل بادئة (في تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل البسيط مع DdpS1-rDNA2 أو DdpS2-rDNA2؛ وفي تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل المزدوج، يبلغ التركيز النهائي لبادئة DdpS1 0.5 ميكروميتر في حين أنها تبلغ ميكروميتر واحد في بادئتي DdpS2 و rDNA2) ووحدة واحدة من بوليميراز الحمض النووي تاك (MP² Biomedicals). وقد وُضع اختبار تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل باستخدام جهاز تدوير حراري من نوع بيلتييه (Peltier) مجهز ببئر 96 (نظام GeneAmp 9600 PCR، Perkin Elmer)، باعتماد بارامترات التدوير التالية: دقيقة واحدة على حرارة 94 درجة مئوية؛ 40 دورة لمدة 30 ثانية على حرارة 94 درجة مئوية، و30 ثانية على حرارة 60 درجة مئوية و45 ثانية على حرارة 72 درجة مئوية؛ وخطوة استتالة نهائية لمدة 10 دقائق على حرارة 72 درجة مئوية. ويتم تحليل نواتج تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل بواسطة الارتحال الكهربائي لهلام الأغاروس.

4-2-9 اختبار تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل القائم على منطقة التضخيم المتتالي لآفة *D. dipsaci*

صمّم اختبار تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل القائم على منطقة التضخيم المتتالي الذي وضعه Zouhar وآخرون (2007) بوصفه اختباراً خاصاً بالأنواع لآفة *D. dipsaci*. وقد جرى تقييمه مقارنةً بآفة *D. dipsaci* فقط (عشرة مجتمعات أوروبية من عوائل مختلفة).

المنهجية

جرى تصميم مجموعتين من البادئات المحددة لتحديد آفة *D. dipsaci*:

المجموعة الأولى من البادئات:

DIT_2 forward: 5'-GCA ATG CAC AGG TGG ATA AAG-3'

DIT_2 reverse: 5'-CTG TCT GTG ATT TCA CGG TAG AC-3'

يبلغ الأمبليكون في هذه المجموعة من البادئات حوالي 325 زوجاً قاعدياً لآفة *D. dipsaci*.

المجموعة الثانية من البادئات:

DIT_5 forward: 5'-GAA AAC CAA AGA GGC CGT AAC-3'

DIT_5 reverse: 5'-ACC TGA TTC TGT ACG GTG CAA-3'

يبلغ الأمبليكون في هذه المجموعة من البادئات حوالي 245 زوجاً قاعدياً لآفة *D. dipsaci*.

يتألف خليط أنزيم تفاعل البلمرة المتسلسل البالغ 25 ميكروناً من: مادة دائرة من تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل مركّزة مرة واحدة (Fermentas²)، و1.5 مللي مولار من كلوريد الماغنيزيوم $MgCl_2$ ، و200 ميكرو ميتر من كل ثلاثي فوسفات النيوكلييتيد منقوص الأكسجين (dNTP)، و10 pmol لكل بادئة (إما مجموعة البادئة DIT_2 أو DIT_5) و1.5 وحدة من بوليميراز الحمض النووي تاك (Fermentas²)، وحمض نووي بتركيز 50 نانوغرام كنموذج. يجري اختبار تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل باستخدام جهاز تدوير حراري من نوع بيلتييه مجهّز ببئر 96 (PTC200، MJ Research²) ببارامترات التدوير التالية: 3 دقائق على حرارة 94 درجة مئوية؛ و30 دورة من دقيقة واحدة على حرارة 94 درجة مئوية؛ و30 ثانية على حرارة 60 درجة مئوية ودقيقة واحدة على حرارة 72 درجة مئوية؛ وخطوة استطالة نهائية لمدة 10 دقائق على حرارة 72 درجة مئوية. ويتم تحليل نواتج تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل بواسطة الارتحال الكهربائي لهلام الأغاروس.

4-2-10 الشواهد الخاصة بالاختبار الجزيئي

من أجل الركون إلى نتيجة الاختبار، من الضروري وجود الشواهد المناسبة — التي تعتمد على نوع الاختبار المستخدم ومستوى الجزم المطلوب — لكل سلسلة من عمليات عزل الحمض النووي وتضخيم الحمض النووي للآفة المستهدفة أو الحمض النووي المستهدف. كما أن الشاهد الإيجابي للحمض النووي، والشاهد السلبي للتضخيم، وشاهد الاستخراج السلبي هي شواهد الحد الأدنى التي يجب استخدامها.

الشاهد الإيجابي للحمض النووي: يُستخدم هذا الشاهد لرصد كفاءة التضخيم (بعيداً عن الاستخراج). ويمكن استخدام الحمض النووي المعدّ مسبقاً (المخزّن) في النيماتود المستهدفة.

شاهد التضخيم السلبي (بدون شاهد نمونج). هذا الشاهد ضروري في تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل التقليدي من أجل استبعاد النتائج الإيجابية المضللة الناجمة عن التلوث خلال إعداد خليط التفاعل. ويضاف ماء تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل الذي كان قد استعمل من أجل إعداد خليط التفاعل، في مرحلة التضخيم.

شاهد الاستخراج السلبي. يُستخدم هذا الشاهد لرصد التلوث خلال استخراج الحمض النووي. ويضم هذا الشاهد استخراج الحمض النووي والتضخيم اللاحق لدارىء الاستخراج فقط. ويُنصح باستخدام شواهد متعددة حين تكون أعداد كبيرة من العينات الإيجابية متوقعة.

4-2-11 تفسير نتائج تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل التقليدي

يعتبر تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل الخاص بالمرض المحدد صالحاً فقط إذا تم استيفاء المعايير التالية:

- أن ينتج الشاهد الإيجابي أمبليكوناً للآفة من الحجم الصحيح لأنواع النيماطود المستهدفة.
- عدم إنتاج أمبليكونات من الحجم الصحيح لأنواع النيماطود المستهدفة في الشاهد السلبي للاستخراج والشاهد السلبي للتضخيم.

5- السجلات

ينبغي الاحتفاظ بالسجلات والبراهين حسب ما هو مبين في المعيار 27 من المعايير الدولية لتدابير الصحة النباتية (بروتوكولات تشخيص الآفات الخاضعة للوائح).

وينبغي الاحتفاظ بالسجلات والبراهين (خاصة العينات المحفوظة أو الموضوعة على شرائح، وصور الهياكل التصنيفية المميزة، ومستخلصات الحمض النووي وصور المواد الهلامية، حسب الاقتضاء) لمدة عام على الأقل في الحالات التي يمكن فيها أن تتأثر أطراف متعاقدة أخرى بنتائج التشخيص.

6- جهات الاتصال للحصول على معلومات إضافية

يمكن الحصول على مزيد من المعلومات عن هذا البروتوكول من:

Biosystematics Division, ARC-PPRI, Private Bag X134, Queenswood, 0121
جمهورية جنوب أفريقيا
(Antoinette Swart; e-mail: SwartA@arc.agric.za)

Meadowview Road, Sacramento, CA 3294، إدارة كاليفورنيا للأغذية والزراعة،
مركز تشخيص الآفات النباتية،
95832-1448، الولايات المتحدة (Sergei Subbotin; e-mail: subbotin@ucr.edu)

Charlottetown - أمراض البطاطا، الوكالة الكندية لفحص الأغذية، 93 Mount Edward Rd, Charlottetown
مختبر Charlottetown - أمراض البطاطا، الوكالة الكندية لفحص الأغذية، 93 Mount Edward Rd, Charlottetown
PEI, C1A 5T1، كندا (Harvinder Bennypaul; البريد الإلكتروني: bennypaulhs@inspection.gc.ca)

ويمكن تقديم طلب لإعادة النظر في بروتوكول التشخيص من قبل المنظمات القطرية الخاصة بوقاية النباتات والمنظمات الإقليمية لوقاية النباتات أو الأجهزة التابعة لهيئة تدابير الصحة النباتية من خلال أمانة الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات (ippc@fao.org) التي ستقوم بدورها بإحالتها إلى الفريق الفني المعني بوضع بروتوكولات التشخيص.

7- شكر وتقدير

حرّر هذا البروتوكول كلّ من السيدة Antoinette Swart (Nematology Unit, Biosystematics Division, ARC-) السيد Eliseo Jorge Chaves (PPRI، جمهورية جنوب أفريقيا)، والسيد Renata C.V. Tenente (Laboratorio de Nematología، الأرجنتين) والسيدة e Biotecnología (البرازيل).

وجرى وصف التقنيات الجزيئية من جانب السيد Sergei Subbotin (مركز تشخيص الآفات النباتية، إدارة كاليفورنيا للأغذية والزراعة، Meadowview Road, Sacramento, CA 95832-14483294، الولايات المتحدة).

قام أخصائيو النيماطودا التالون بتحسين البروتوكول من خلال تعليقاتهم:

- السيد Harvinder Bennypaul (الوكالة الكندية لفحص الأغذية، كندا)
- السيد Johannes Hallmann (معهد Julius Kühn، ألمانيا)
- السيد Mikhail Pridannikov (مركز الطفيليات، معهد A.N. Severtsov للإيكولوجيا والتطور، روسيا)
- السيد P. Castillo (Instituto Agricultura Sostenible, Consejo Superior de Investigaciones Cientificas، إسبانيا)

8- المراجع

- Andrássy, I.** 1984. Klasse Nematoda (Ordnungen Monhysterida, Desmoscolecida, Araeolaimida, Chromadorida, Rhabditida). In *Bestimmungsbücher zur Bodenfauna Europas*، ص. 24-25. شتوتغارت، ألمانيا، Gustav Fischer Verlag. ص 509
- Andrássy, I.** 2007. النيماتودا الحية الحرة في هنغاريا (Nematoda Errantia) 2. *In Pedazoológica Hungarica*، No. 4، ص 145-154. بودابست، المتحف الهنغاري للتاريخ الطبيعي ومجموعة البحث في علم الحيوان في أكاديمية العلوم الهنغارية، ص 496.
- Andrássy, I. & Farkas, K.** 1988. *Kertészeti növények fonálféreg kártevői*. بودابست، Mezőgazdasági Kiadó، ص 181-198. ص 418.
- Barker, J.R. & Lucas, G.B.** 1984. طفيليات النيماتودا في التبغ. *In W.R. Nickle, ed. Plant and insect nematodes*، ص 213-242. نيويورك، Marcel Dekker Inc.، ص 925.
- Bridge, J. & Hunt, D.** 1986. النيماتودا. *In Pest control in tropical onions*، ص 65-77. لندن. معهد التنمية والبحوث الإيستوائي ومكتب إدارة التنمية الخارجية، المعهد الاستوائي للتنمية والبحوث، ص 109.
- Brodie, B.B.** 1998. البطاطا. *In K.R. Barker, G.A. Pederson & G.L. Windham, eds. Plant and nematode interactions*، ص 567-594. Madison, WI, American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc. and Soil Science Society of America, Inc. ص 772.
- Brown, D.J.F., Dalmasso, A. & Trudgill, D.L.** 1993. آفات النيماتودا في الفاكهة اللينة والكرمة. *In K. Evans, D.L. Trudgill & J.M. Webster, eds. Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*، ص 427-462. Wallingford, UK, CABI. ص 656.
- Brzeski, M.W.** 1998. *Nematodes of Tylenchina in Poland and temperate Europe*. وارسو، متحف ومعهد علم الحيوان، الأكاديمية البولندية للعلوم. ص 397.
- Chizhov, V.N., Borisov, B.A. & Subbotin, S.A.** 2010. A new stem nematode, *Ditylenchus weischeri* sp.n. (Nematoda: Tylenchida), a parasite of *Cirsium arvense* (L) Scop. in the Central Region of the Non-Chernozem Zone of Russia. *المجلة الروسية لعلم النيماتودا*، 95: 18-102.
- Cook, R. & Yeates, G.W.** 1993. آفات النيماتودا في المراعي ومحاصيل العلف. *In K. Evans, D.L. Trudgill & J.M. Webster, eds. Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*، ص 305-350. Wallingford, UK, CABI، ص 656.

Cooke, D. 1993. طفيليات النيماتودا في الشمندر السكري. In K. Evans, D.L. Trudgill and J.M. Webster, eds. *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*, Wallingford, UK, CABI. ص 133-169. ص 656

Coolen, W.A. & D'Herde, C.J. 1972. *A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue*. غانت، بلجيكا، وزارة الزراعة. مركز الدولة للبحوث الزراعية. ص 77

Courtney, W.D. 1962. نيماتودا الساق في النفل الأحمر في شمال غرب المحيط الهادئ. *Bulletin of the Washington State Agricultural Experiment Station* 640: 1-17

Dallimore, C.E. & Thorne, G. 1951. إصابة الشمندر السكري بآفة *Ditylenchus destructor*، Thorne، نيماتودا عفن البطاطا، *Phytopathology*، 872: 41-874

De Ley, P. & Blaxter, M. 2003. نظام جديد للنيماتودا: Combining morphological characters with molecular trees, and translating clades into ranks and taxa. *Nematological Monographs and Perspectives*، 21-2: 1

Edwards, E.E. 1937. On the eelworm disease of primulas caused by *Anguillula dipsaci*, Kühn. *Journal of Helminthology* 221: 15-232

EPPO (المنظمة الأوروبية والمتوسطية لوقاية النباتات). 2013 أ. PQR: EPPO Plant Quarantine Data Retrieval System. Available at <http://www.eppo.org/DATABASES/pqr/pqr.htm>

EPPO (المنظمة الأوروبية والمتوسطية لوقاية النباتات). 2013 ب. *Diagnostic protocols for regulated pests: Pictorial glossary of morphological terms in nematology*. EPPO Technical Document No. 1056 (Rev. 4). متاح على الموقع: http://www.eppo.int/QUARANTINE/diag_activities/EPPO_TD_1056_Glossary.pdf.

EPPO (المنظمة الأوروبية والمتوسطية لوقاية النباتات). 2013 ج. استخراج النيماتودا. EPPO Standard PM 7/119(1). نشرة المنظمة الأوروبية لوقاية النباتات، 43: 471-485

Esquibet, M., Grenier, E., Plantard, O., Andaloussi, F.A. & Caubel, G. 2003. تعدد أشكال الحمض النووي في ساق النيماتودا *Ditylenchus dipsaci*: وضع واسمات التشخيص للأصناف العادية والعلاقة. *Genome*، 46: 1077-1083

Evans, K. & Trudgill, D.L. 1992. جوانب الآفات في إنتاج البطاطا الجزء 1. آفات النيماتودا في البطاطا. In P.M. Harris, ed. *The potato crop*, 2nd edn. London, Chapman and Hall. ص 438-475. ص 909

Ferris, J.M. & Ferris, V.R. 1998. بيولوجيا النيماتودا الطفيلية النباتية. In K.R. Barker, G.A. Pederson & G.L. Windham, eds. *Plant and nematode interactions*. Madison, WI, American، ص 21-36

Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc. and Soil Science Society of America, Inc. ص 772

Proceedings of the Helminthological Society of Tylenchinae. Filipjev, I.N. بشأن تصنيف آفة Tylenchinae. 1936. 80 : 3-82, Washington

In J.F. Southey, ed. *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*. 1970 Flegg, J.J.M. & Hooper, D.J. استخراج مراحل العيش الحر من التربة. 22-5 ص. لندن، وزارة الزراعة ومصايد الأسماك والأغذية. ص 148

Annals of Applied Biology. 1952 Goodey, J.B. تأثير العائل على الأبعاد في النيماتودا الطفيلية النباتية، *Ditylenchus destructor*. 474-468 : 30

Harpden, UK, Nematology Department, *النيماتودا في التربة، والمياه العذبة*. 1963 Goodey, J.B. Rothamsted Experimental Station, and London, Methuen & Co. Ltd. ص 544

In W.R. Nickle, ed. *Plant and insect nematodes*. 1985 Griffin, G.D. طفيليات النيماتودا في الألفالفا، والحبوب والأعشاب. 322-243 ص. نيويورك. Marcel Dekker Inc. ص 925

Ditylenchus myceliophagus. CIH descriptions of plant-parasitic nematodes, Set 3, 1974 Hesling, J.J. No. 36. St Albans, UK, Commonwealth Institute of Helminthology (CIH). ص 4

1971 Heyns, J. دليل عن نيماتودا النباتات والتربة في جنوب أفريقيا، كايب تاون، A.A. Balkema. ص 233
Ditylenchus dipsaci. CIH descriptions of plant-parasitic nematodes, Set 1, No. 14. 1972 Hooper, D.J. St Albans, UK, Commonwealth Institute of Helminthology (CIH) ص 4

Ditylenchus destructor. CIH descriptions of plant-parasitic nematodes, Set 2, No. 1973 Hooper, D.J. 21. St Albans, UK, Commonwealth Institute of Helminthology (CIH) ص 4

In J.F. Southey, ed. *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*. 1986 Hooper, D.J. استخراج النيماتودا في الأنسجة النباتية. 402، النسخة السادسة، ص 51-58. لندن، وزارة الزراعة ومصايد الأسماك والأغذية، ص 202

2005 Hooper, D.J., Hallmann, J. & Subbotin, S.A. طرق لاستخراج ومعالجة والكشف عن نيماتودا النباتات والتربة. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. 86-53 ص. Wallingford, UK, CABI. ص 871

- Jeszke, A., Budziszewska, M., Dobosz, R., Stachowiak, A., Protasewicz, D., Wieczorek, P. & Obrępańska-Stęplowska, A. 2013. دراسة مقارنة وتاريخية عرقية لآفات *Ditylenchus dipsaci*, *Ditylenchus destructor* and *Ditylenchus gigas* في بولندا. (إعلان قصير). *Journal of Phytopathology*, 67-162:61.
- Ji, L., Wang, J.C., Yang, X.L., Huang, G.M. & Lin, M.S. 2006. [تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل - تعدد الأشكال لطول جزء القطع للتمييز بين الأنواع الثلاثة من آفة *Ditylenchus*]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 39: 29-43 (بالصينية).
- Johnson, C.S. 1998. التنبع. *Plant and nematode interactions*, ص 487-522. Madison, WI, American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc. and Soil Science Society of America, Inc. ص 772.
- Karssen, G. & Willemsen, N.M. 2010. الشويكة: صفة مفيدة أخرى لتحديد آفتي *Ditylenchus dipsaci* و *D. destructor* (النيماتودا: Anguinidae). نشرة المنظمة الأوروبية لوقاية النباتات، 40: 211-212.
- Kerkoud, M., Esquibet, M. & Plantard, O. 2007. تحديد أنواع *Ditylenchus* المرتبطة ببذور القرنيات بالاستناد إلى تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل لمناطق مبادئ النسخ الداخلي في الحمض النووي الريبسي. *European Journal of Plant Pathology*, 118: 323-332.
- Kleynhans, K.P.N. 1997. جمع النيماتودا والمحافظة عليها. دليل دورة عملية في علم النيماتودا من تأليف SAFRINET, the southern African (SADC) LOOP of BioNET-INTERNATIONAL, ARC. معهد بحوث الحماية النباتية، ص 52.
- Kühn, J. 1857. Über das Vorkommen von Anguillulen in erkrankten Blütenköpfen von *Dipsacus fullonum* L. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, 9: 129-137.
- Leal-Bertioli, S.C.M., Tenente, R.C.V. & Bertioli, D.J. 2000. تتابع مبادئ النسخ الداخلي لمجتمعات نيماتودا الطفيليات النباتية *Ditylenchus dipsaci*. *Nematologia Brasileira*, 24: 83-85.
- Marek, M., Zouhar, M., Rysanek, P. & Havranek, P. 2005. تحليل تتابعات مبادئ النسخ الداخلي للحمض النووي الريبسي ووضع تحليل قائم على تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل لتحديد سريع لساق النيماتودا *Ditylenchus dipsaci* (النيماتودا: Anguinidae) في أنسجة النباتات. *Helminthologia*, 42: 49-56.
- McDonald, A.H. & Nicol, J.M. 2005. طفيليات النيماتودا في الحبوب. *Plant parasitic nematodes on subtropical and tropical agriculture*, eds. Luc, R.A. Sikora & J. Bridge, ص 131-192. Wallingford, UK, CABI.

Mollov, D.S., Subbotin, S.A. & Rosen, C. 2012. التقرير الأول عن آفة *Ditylenchus dipsaci* في الثوم في منيسوتا. *الأمراض النباتية*، 96: 1707

D. Eisenback & U. Zunke, eds. *A journal of nematological images*, Vol. 2. 1999 **Nemapix**. Blacksburg, VA, Mactode Publications.

J.D. Eisenback & U. Zunke, eds. *A journal of nematological images*, Vol. 1, 2nd edn. 2000 **Nemapix**. Blacksburg, VA, Mactode Publications.

J.D. Eisenback & U. Zunke, eds. *A journal of nematological images*, Vol. 3. 2002 **Nemapix**. Blacksburg, VA, Mactode Publications.

In M. Luc, R.A. Sikora & J. Bridge, eds. *Plant*. 1990 **Netscher, C. & Sikora, J.W.** *parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*, النسخة الثانية، ص 237-283، Wallingford, UK, CABI. ص 896

Oliveira, R.D.L., Santin, Â.M., Seni, D.J., Dietrich, A., Salazar, L.A., Subbotin, S.A., Mundo- *Ditylenchus gallaeformans* sp.n. 2013 **Ocampo, M., Goldenberg, R. & Barreto, R.W.** (Tylenchida: Anguinidae): A neotropical nematode with biocontrol potential against weedy 196-15:179، *Melastomataceae. Nematology*

Palazova, G. & Baicheva, O. 2002. دراسات التحليل الكهربائي لآفة *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn, 1857) *Experimental Pathology and* . 1936 من عائلين: *Allium cepa* و *Allium sativum*، Filipjev 40-5:39، *Parasitology*

Sopravvivenza di *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) 1971 **Palmisano, A.M., Tacconi, R. & Trotti, G.C.** *Filipjev Nematoda: tylenchidae*) al processo digestive nei suini, equini e bovini. *Redia* 737: 725-52.

Potter, J.W. & Olthof, T.H.A. 1993. آفات النيماتودا في محاصيل الخضار. In K. Evans, D.L. Trudgill & J.M. Webster, eds. *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*، ص 171-208، Wallingford, UK, CABI. ص 656

Powers, T.O., Szalanski, A.L., Mullin, P.G., Harris, T.S., Bertozzi, T. & Griesbach, J.A. 2001. تحديد نيماتودا عفن البذور ذات أهمية زراعية وتنظيمية مع تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل- تعدد الأشكال لطول جزء القطع في مبادئ النسخ الداخلي 1. *Journal of Nematology*، 33: 191-194.

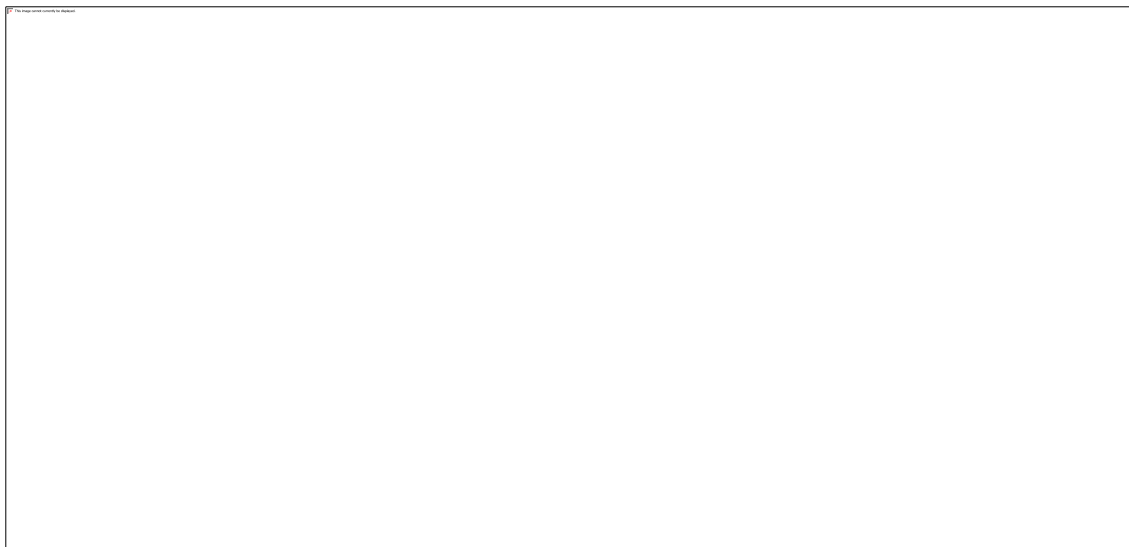
Rivoal, R. & Cook, R. 1993. آفات النيماتودا في الحبوب. In K. Evans, D.L. Trudgill & J.M. Webster, eds. *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*، ص 259-304، Wallingford, UK, CABI. ص 656

- Roberts, H. 1981. سجلات جديدة أو غير اعتيادية للعوائل النباتية لنيماتودا الطفيليات النباتية، 1977-1980. *Plant Pathology*, 30: 182.
- Rojankovski, E. & Ciurea, A. 1986. مساهمات في دراسة التفاعلات بين نيماتودا عفن البطاطا، *Ditylenchus destructor* Thorne والفطر في مرض البطاطا. *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz*, 22: 106-101.
- Seinhorst, J.W. 1959. طريقة سريعة لنقل النيماتودا من غليسرين مثبت إلى غليسرين لامائي، *Nematologica*, 4: 69-67.
- Siddiqi, M.R. 2000. طفيليات *Tylenchida* في النباتات والحشرات، النسخة الثانية. 2nd edn. Wallingford, UK, CABI. ص 864.
- Sikora, R.A., Greco, N. & Silva, J.F.V. 2005. طفيليات النيماتودا في الخضار. In M. Luc, R.A. Sikora & J. Bridge, eds. *Plant parasitic nematodes on subtropical and tropical agriculture*, النسخة الثانية، ص 318-259. Wallingford, UK, CABI. ص 896.
- Sousa, A.I., Gomes, V.F. & Tenente, R.C.V. 2003. Tratamento fisico aplicado as sementes de melao (Cucumis melo L.), importadas da Holanda, na erradicaçao de *Ditylenchus dipsaci* (Khun, 1857) (Filipjev), 1936. *Nematologia Brasileira*, 22: 225-27.
- Southey, J.F. 1993. النيماتودا في نباتات الزينة والمحاصيل البصلية. In K. Evans, D.L. Trudgill & J.M. Webster, eds. *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*, ص 500-463. Wallingford, UK, CABI. ص 656.
- Sturhan, D. & Brzeski, M.W. 1991. نيماتودا السيقان والبصيلات، *Ditylenchus* spp. In W.R. Nickle, ed. *Manual of Agricultural Nematology*, ص 464-423، نيويورك. Marcel Decker Inc. ص 1064.
- Subbotin, S.A., Madani, M., Krall, E., Sturhan, D. & Moens, M. 2005. تشخيص جزيئي، والسمية والتاريخ العرقي لنيماتودا الساق من نوع *Ditylenchus dipsaci* القائم على تتابعات الحمض النووي الريبسي في مبادئ النسخ الداخلي. *Phytopathology*, 95: 1315-1308.
- Tenente, R.C.V. & Evans, A.A.F. 1997. الارتحال الكهربائي للبروتينات من عدة اصناف من *Ditylenchus dipsaci* يتم استرجاعها من أنسجة الكوسا المجففة المصابة. *Nematologia Brasileira*, 21: 91-84.

- Thorne, G. 1945. آفة *Ditylenchus destructor*, n. sp., نيماتودا تعفن البطاطا، وآفة *Ditylenchus dipsaci*, *Proceedings of the* (Kuhn, 1857) Filipjev, 1936، النيماتودا في المشط (نيماتودا: Tylenchidae). *Helminthological Society of Washington*, 12: 27-33.
- Van der Vegte, F.A. & Daiber, K.C. 1983. تقرير أولي عن حدوث آفة *Ditylenchus destructor* في نباتات الزينة *Liatris spicata* والجهود لاستئصال الأخيرة. *Proceedings of the 6th Symposium and General Meeting of the Nematological Society of Southern Africa*.
- Viglierchio, D.R. 1971. تكوّن الصنف في آفة *Ditylenchus dipsaci*. *Nematologica*, 17: 386-392.
- Viscardi, T. & Brzeski, M.W. 1993. DITYL: مفتاح ممكن لتحديد أنواع *Ditylenchus* (النيماتودا: Anguinidae). *Fundamental and Applied Nematology*, 16: 389-392.
- Vovlas, N., Troccoli, A., Palomares-Rius, J.E., De Luca, F., Liébanas, G., Landa, B.B., Subbotin, S.A. & Castillo, P. 2011. آفة *Ditylenchus gigas* n.sp. المتطفلة على الفاصولياء العريضة: نيماتودا جديدة في الساق والتميز عن أنواع *Ditylenchus dipsaci* باستخدام نهج متعدد الأطوار مع تحديد التاريخ العرقي الجزيئي. *Plant Pathology*, 60: 762-775.
- Vrain, T.C., Wakarchuk, A.C., Levesque, A.C. & Hamilton, R.I. 1992. تعدد الأشكال لطول جزء القطع الخاص بالحمض النووي الرببي في مجموعة *Xiphinema americanum*. *Fundamental and Applied Nematology*, 15: 563-573.
- Webster, J.M., Anderson, R.V., Baillie, D.L., Beckenbach, K., Curran, J. & Rutherford, T. 1990. اختبارات الحمض النووي للتمييز بين أنواع نيماتودا خشب الصنوبر. *Revue de Nématologie*, 13: 255-263.
- Wendt, K.R., Swart, A., Vrain, T.C. & Webster, J.M. 1995. آفة *Ditylenchus africanus* sp.n من جنوب أفريقيا: توصيف مورفولوجي وجزيئي. *Fundamental and Applied Nematology*, 18: 241-250.
- Wendt, K.R., Vrain, T.C. & Webster, J.M. 1993. فصل ثلاثة أنواع من آفة *Ditylenchus* وبعض الأصناف العائلة لآفة *D. dipsaci* عبر تعدد الأشكال لطول جزء القطع. *Journal of Nematology*, 25: 555-563.
- Zouhar, M., Marek, M., Douda, O., Mazáková, J. & Ryšánek, P. 2007. تحويل نطاقات منطقة التضخم المتتالي إلى واسمات ذات مردود عالٍ بالاستناد إلى تقنية الحمض النووي متعدد الأشكال والمضخم عشوائياً للكشف عن نيماتودا الساق *Ditylenchus dipsaci* في العوائل النباتية الرئيسية. *Plant Soil and Environment*, 53: 97-104.

2002 Zouhar, M., Marek, M., Licinio, J. & Ryšánek, P. استخدام التحولات في الحمض النووي الريبسي من أجل التمييز بين الأصناف البيولوجية لآفة *Ditylenchus dipsaci* من الجمهورية التشيكية. *Plant Protection Science*، 38 (خاص 2): 360–358.

9- الأشكال



الشكل 1- بذور *Vicia faba* مصابة بآفة *Ditylenchus dipsaci* (ويظهر صوف النيماتودا).
الصورة مقدمة G. Caubel, Nemapix (1999)



الشكل 2- نباتات *Allium sativum* مصابة بآفة *Ditylenchus dipsaci*
الصورة مقدمة G. Caubel, Nemapix (1999)



الشكل 3- نباتات فثية من *Allium cepa* مصابة بآفة *Ditylenchus dipsaci*
الصورة مقدمة *E. Hennig*. مركز الدولة للصحة النباتية وفحص البذور، تورون، بولندا



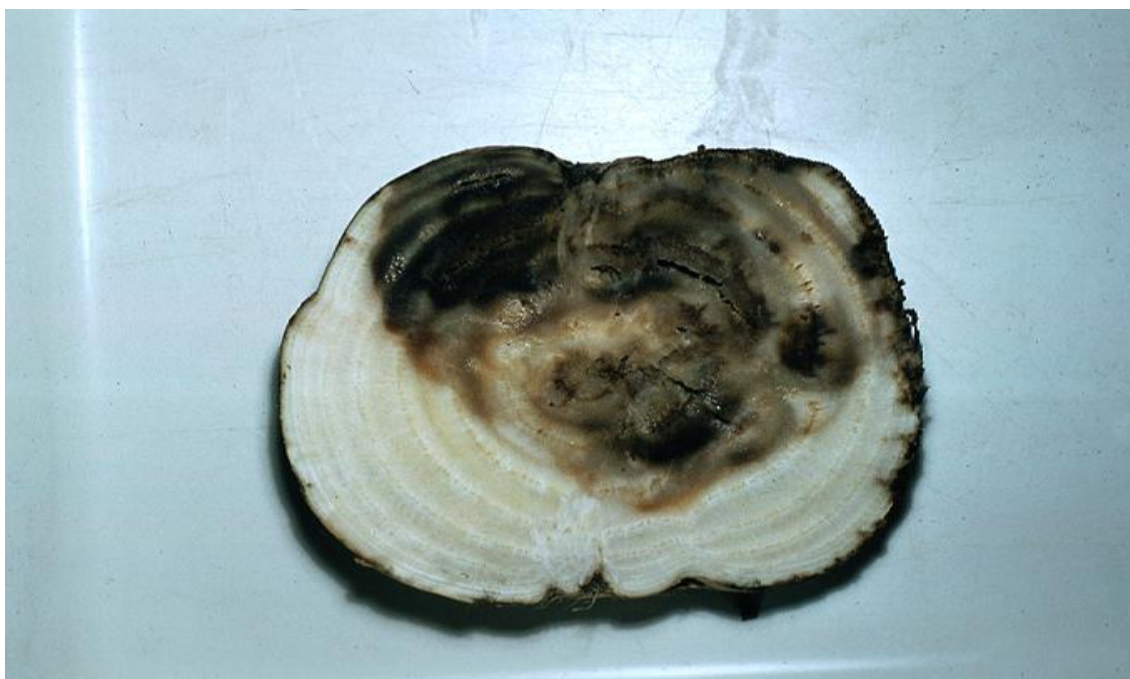
الشكل 4- بصيلة الثوم مصابة بآفة *Ditylenchus dipsaci*
الصورة مقدمة G. Caubel, Nemapix (2002)



الشكل 5- نباتات *Narcissus* spp. مصابة بآفة *Ditylenchus dipsaci*
الصورة مقدمة G. Caubel, Nemapix (1999)



الشكل 6- قطع عرضي لبصيلة *Narcissus* spp. مصابة بآفة *Ditylenchus dipsaci*
الصورة مقدمة C.W. Laughlin, *Nemapix* (2002)



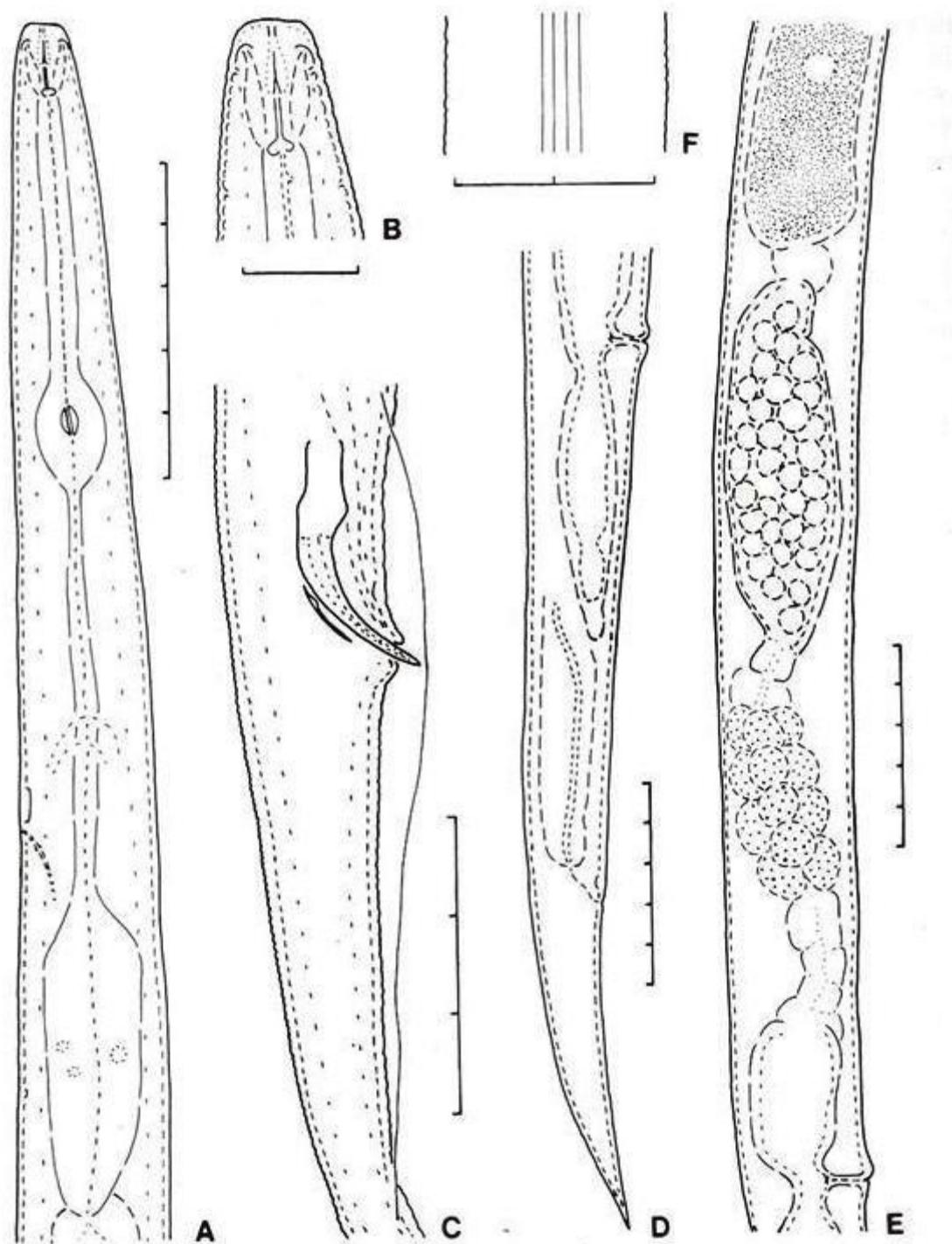
الشكل 7- قطع عرضي لشمندر سكري مصاب بآفة *Ditylenchus dipsaci*
الصورة مقدمة C. Hogger, *Nemapix* (1999)



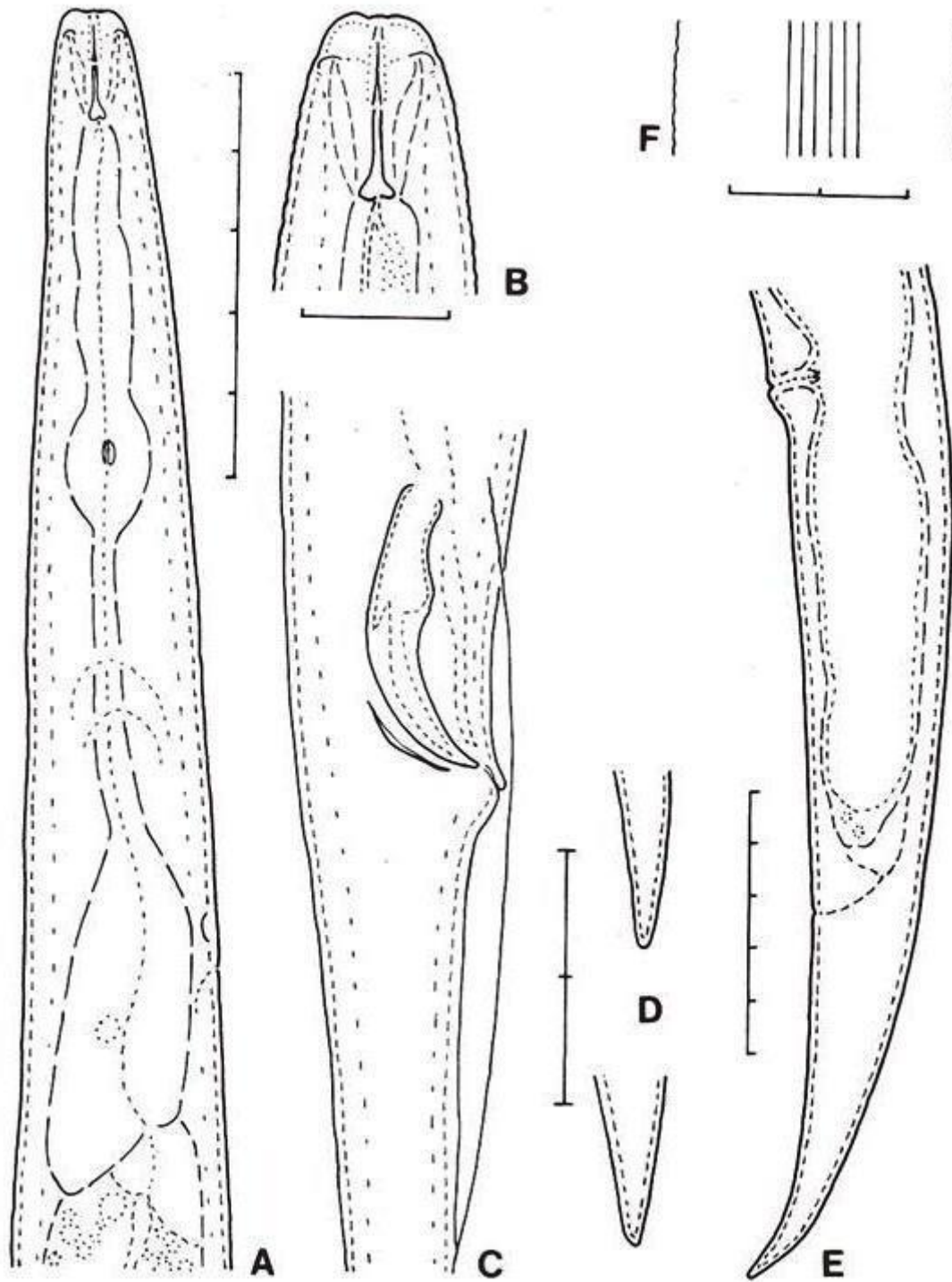
الشكل 8- قطع عرضي لبطاطا مصابة بآفة *Ditylenchus destructor* مقارنة مع بطاطا غير مصابة.
الصورة مقدمة S. Ayoub, Nemapix (2000)



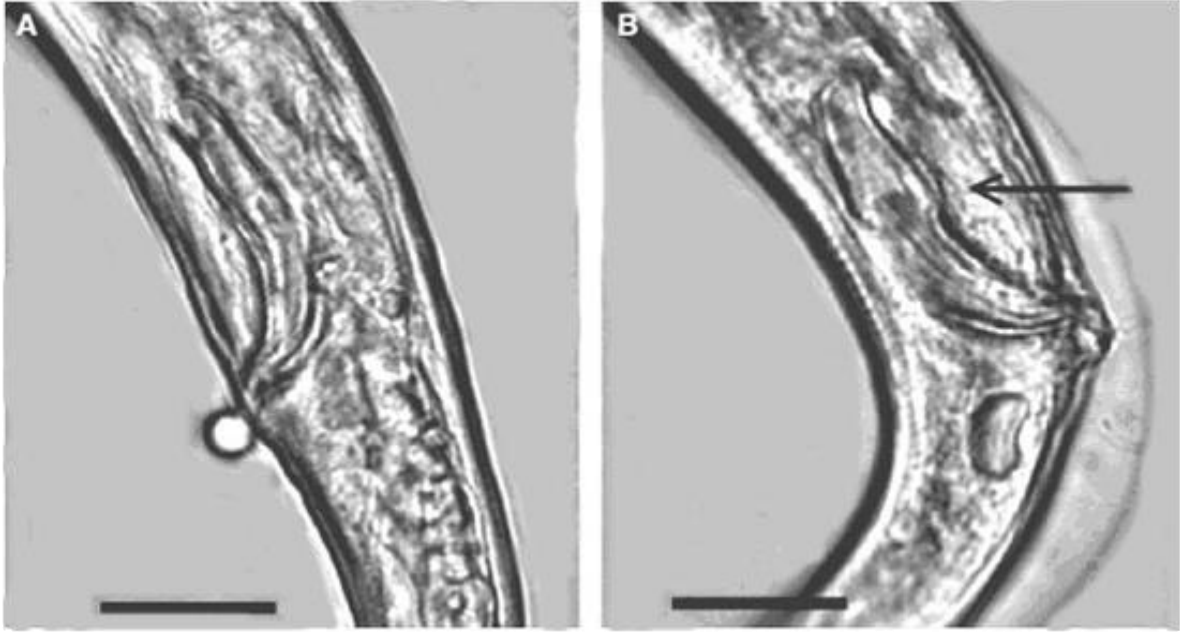
الشكل 9- بطاطا في مستويات مختلفة من الإصابة بآفة *Ditylenchus destructor*
الصورة مقدمة H. Andersen



الشكل 10- آفة *Ditylenchus dipsaci* (Filipjev (Kühn, 1857، 1936 بعد Sturhan و Brzeski، 1991). (ألف) أنثى، منطقة المريء؛ (باء) رأس الأنثى؛ (جيم) ذكر، منطقة الشويكة؛ (دال) أنثى، المنطقة الخلفية؛ (هـ) جزء من الجهاز التناسلي لدى الأنثى؛ (وواو) المجال الجانبي عند منتصف الجسم. كل وحدة موسومة على مقياس الرسم = 10 ميكرون.



الشكل 11- آفة *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945 (بعد Brzeski و Sturhan, 1991). (ألف) أنثى، منطقة المريء؛ (باء) أنثى، الرأس؛ (جيم) ذكر، منطقة الشويكة؛ (دال) طرف الذنب لدى أنثيين؛ (هـ) أنثى، المنطقة الخلفية؛ (واو) المجال الجانبي عند منتصف الجسم. كل وحدة موسومة على مقياس الرسم = 10 ميكرون.



الشكل 12- شويكة *Ditylenchus*: (ألف) *D. dipsaci* و(باء) *D. destructor*. السهم= القبة. مقياس الرسم= 12 ميكرون
الصورة تقدمه Willemsen و Karssen (2010)

تاريخ المطبوع

هذا ليس جزءاً رئيسياً من المعيار

04- 2006 أضافت هيئة تدابير الصحة النباتية موضوعاً إلى برنامج العمل (النيماتود، 2006-2008).

11- 2004 أضافت لجنة المعايير موضوع آفة *Ditylenchus destructor* / *D. dipsaci* (2004-017)

07-2010 قُدمت المسودة إلى اجتماع الفريق الفني المعني ببروتوكولات التشخيص. 04-2013 مشاوره الخبراء.

06-2013 قُدمت المسودة إلى اجتماع الفريق الفني المعني ببروتوكولات التشخيص.

05-2014 صادقت لجنة المعايير على مشاوره الأعضاء (2014_eSC_May_11).

07-2014 مشاوره الأعضاء

04-2015 صادق الفريق الفني المعني ببروتوكولات التشخيص على المسودة لرفعها إلى لجنة المعايير (2015_eTPDP_Apr_03)

06-2015 صادقت لجنة المعايير على فترة الإخطار لبروتوكول التشخيص (2015_eSC_Nov_02)

08-2015 اعتمدت لجنة المعايير بروتوكول تشخيص نيابةً عن هيئة تدابير الصحة النباتية (من دون تلقي اعتراضات رسمية).

المعيار رقم 27 في تدابير الصحة النباتية - الملحق 8. آفة *Ditylenchus dipsaci* و *Ditylenchus destructor* (2015)، روما، الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات، منظمة الأغذية والزراعة.

جرى آخر تعديل على تاريخ المطبوع: 2015-09