

## بعض الطرق العملية لدراسة النيماتودا Methods and Techniques

### مقدمة

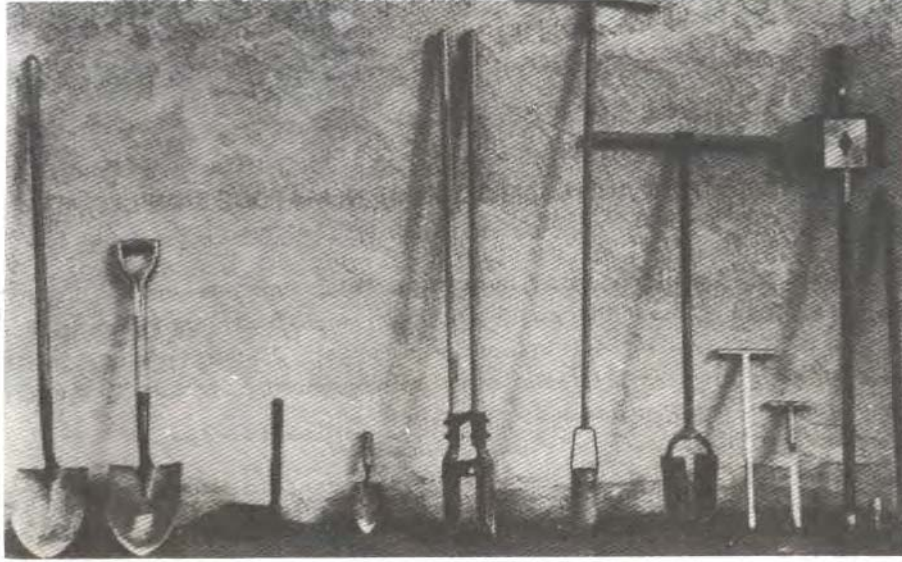
يختص هذا الفصل بتناول بعض الطرق العملية الشائعة الاستخدام لدراسة النيماتودا، ويهدف إلى تدريب الطلاب (والمدرّبين عمومًا) لاكتساب المهارة الفنية والخبرة العملية الضرورية لدراسة نيماتودا النبات والتعامل معها. وقد استبعدت الكثير من الطرق ذات الهدف والطبيعة الخاصة، إذ يمكن الرجوع إليها في المراجع المتخصصة عند الحاجة، وتم فقط اختيار الطرق العامة والضرورية التي لا بد للطلاب من الإلمام بها والتدريب عليها. وقد روعي عند اختيار هذه الطرق عدد من العوامل لعل أهمها: أنها تخدم غرضًا رئيسًا عامًا، وتعرض بعض الأسس والقواعد الرئيسية لسلوك وصفات النيماتودا، وسهولة أجزائها وكذلك توافر المواد والأدوات اللازمة لها في معظم مختبرات النيماتودا. كما أنني استفدت كثيرًا من تجربة تدريس مقرر النيماتولوجي العملي لأكثر من ستة عشر فصلًا دراسيًا، وحاولت هنا - بقدر الإمكان - تجنب الكثير من الأسس النظرية للطرق العملية، والتركيز مباشرة على التدريب على إجراء الطريقة. ومع ذلك فإنني أرى أن يقوم الأستاذ المسؤول عن التدريب العملي باختيار التدريبات أو الطرق المناسبة - بالحذف أو الإضافة - بحيث يتلاءم ذلك مع هدف ومستوى التدريب المطلوب والظروف المحيطة، كتوافر المواد والأدوات والوقت المخصص للتدريب.

حاولت في هذا الفصل أن أقدم التدريبات وفق ترتيب معين متسلسل، يبدأ بطرق أخذ العينات من التربة، واستخلاص النيماتودا، ثم عمل التحضيرات المجهرية لها. يتبع ذلك دراسة لأهم الصفات الظاهرية (المورفولوجية) والتشريحية للنيماتودا، خاصة تلك التي تفيد في التمييز بين الأجناس، أو على الأقل، بين المجاميع المختلفة للنيماتودا، ويعقب ذلك التدريب على استعمال مفتاح مبسط لتعريف أهم أجناس نيماتودا النبات الشائعة في معظم الحقول الزراعية. وسوف يقتصر التدريب في مجال الأمراض على التعرف على أهم الأعراض المرضية الظاهرية، وعرض بعض التحضيرات عن الأعراض التشريحية، ثم طريقة صبغ الأنسجة والتعرف على دورة الحياة لأحد أنواع النيماتودا المناسبة. وأخيراً يتدرب الطلاب على كيفية إجراء بعض التجارب البسيطة لإيضاح بعض المفاهيم والأسس العملية العامة.

### طرق جمع العينات Sampling Methods

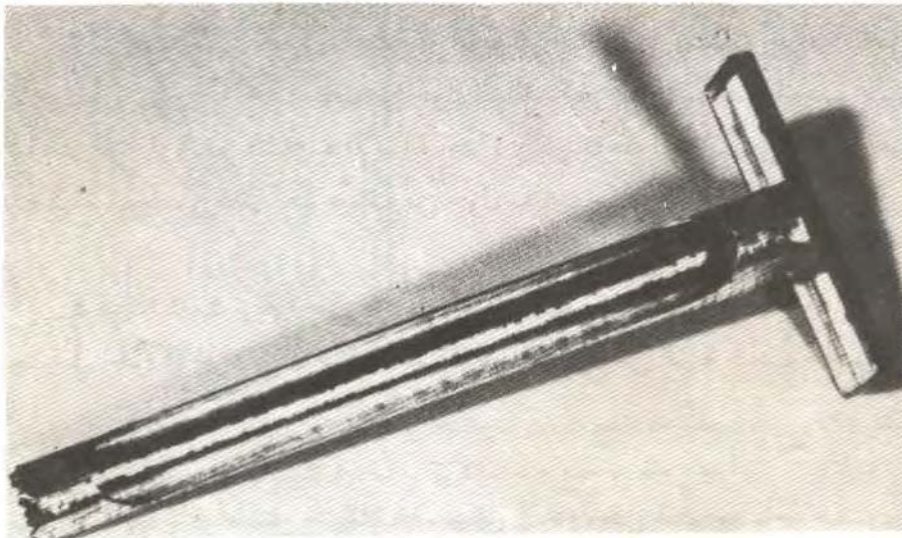
هناك عدة طرق لجمع العينات من التربة، تختلف باختلاف الهدف من جمع العينة (مسح عام، تشخيص، خدمات إرشادية، تجارب)، وحالة الحقل (بور، مزروع بمحاصيل حولية أو معمرة)، وكذلك نوع النيماتودا (طبيعة التطفل والتكاثر والانتشار في التربة). ومهما اختلفت طرق جمع العينات فلا بد أن تكون العينة المأخوذة ممثلة تماماً لكثافة النيماتودا في الحقل وقت جمع العينة.

يستخدم لجمع العينات من التربة أنواع مختلفة من الأدوات (الشكل رقم ٩٧) يستخدمها أخصائيو التربة، ويمكن كذلك استخدامها في مجال النيماتودا، لكن يعتبر النوع الأنبوبي التقليدي - ذو الشكل الأسطواني cylindrical, tube-type sampler - هو الأكثر استخداماً بواسطة أخصائيي النيماتودا. وتعرف هذه الأداة بأسطوانة جمع العينات sampling tube، وهي عبارة عن أنبوبة أسطوانية (الشكل رقم ٩٨)، طولها ٣٨ سم وقطرها ٥, ٢ سم (القطر الداخلي ٢ سم)، مفتوحة من جانب واحد، ويعملوها مقبض يدوي، وطرفها الأسفل دائري حاد لتسهيل اختراقها للتربة إلى عمق ٢٠ سم



شكل (٩٧). أدوات مختلفة لجمع عيّنات التربة.

(عن Ayoub, 1980).



شكل (٩٨). أسطوانة جمع العيّنات sampling tube من التربة.

(عن Dropkin, 1980).



عادة . وباستخدام هذه الأسطوانة يمكن الحصول على حوالي ٦٢٩ سم<sup>٣</sup> من التربة core ، وعادة ما يتخلص من الجزء العلوي للعيننة (٥ سم العليا من الأسطوانة) لاحتوائه على بعض الحشائش وبقايا المواد العضوية المتساقطة على سطح التربة . تتكون العيننة عادة من عيننة مركبة تؤخذ بإدخال أسطوانة جمع العينات في التربة ١٠ - ١٥ مرة في منطقة أخذ العينات وبطريقة منتظمة ، بحيث يبلغ حجم العيننة ٥٠٠ - ٦٠٠ سم<sup>٣</sup> من التربة .

#### أولاً : المتطلبات العامة لأخذ العينات من التربة

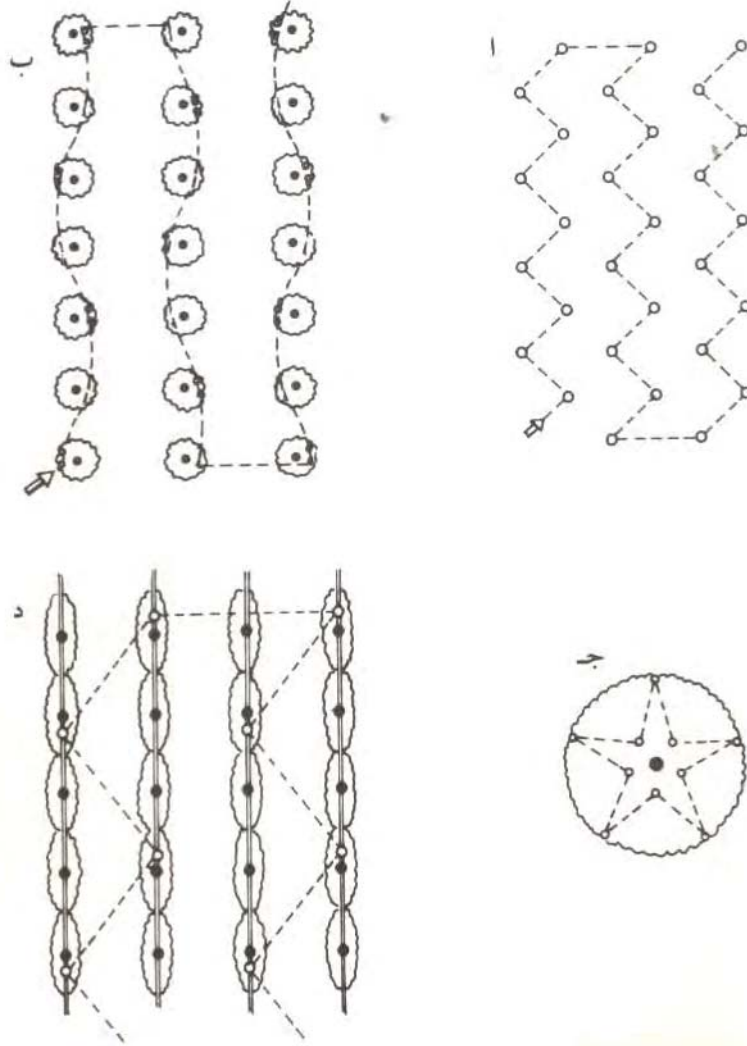
١ - تستخدم عادة أسطوانة جمع العينات ، وإن تعذر ذلك يستخدم جاروف أو أية أداة مناسبة لأخذ العينات .

٢ - تؤخذ العيننة عندما تكون رطوبة الحقل مناسبة (أقل بقليل من ٦٠٪ من السعة الحقلية) مع تجنب المناطق الغدقة أو الجافة جداً .

٣ - يجب تجنب المناطق الصلبة أو الموبوءة بالحشائش ، وكذلك أطراف الحقل والأحواض . وفي حالة أخذ عينات من حول النباتات بغرض التشخيص فيجب تجنب النباتات الميتة أو البقع الشديدة الإصابة جداً ، ولكن تؤخذ العينات من على حواف هذه البقع ، ويفضل دائماً أخذ عينات من حول نباتات سليمة للمقارنة .

٤ - إذا كانت تربة الحقل غير متجانسة - كأن تكون طينية في جزء من الحقل ورملية في الجزء الآخر - يؤخذ عينات مستقلة من كل نوع من التربة حسب حجم كل جزء .

٥ - إذا كان الحقل متماثلاً فيقسم إلى أقسام ، كل قسم بمساحة هكتارين تقريباً ، ويؤخذ عيننة من كل قسم وعلى عمق حوالي ١٥ - ٢٠ سم وبطريقة منتظمة متعاقبة zig-zag (الشكل رقم ٩٩أ) .



شكل (٩٩). طرق مقترحة لجمع عينات التربة لتقدير كثافة النباتات.

(أ) نموذج مقترح لجمع عينات التربة من الحقول البور أو المزرعة بمحاصيل حقلية أو بمحاصيل مزرعة في خطوط. (ب) نموذج مقترح لجمع عينات التربة من الحقول المزرعة بالنباتات المعمرة كالأشجار والشجيرات. (ج) جمع عينات التربة من حول نبات واحد. (د) نموذج مقترح لجمع عينات من التربة من كروم العنب. (أ، ب، ج، د عن Barker, 1985 ، د عن Ferris et al., 1981).

٦ - إذا كان الحقل مزروعاً في السابق بمحصول واحد، وسيزرع بمحصول واحد، فتؤخذ العينات كما في (٥) أعلاه، أما إذا كان سيزرع بمحصولين - أو أكثر - فتؤخذ عينات من كل قسم على حدة وكما في (٥) أعلاه.

٧ - يجب أن تحتوي العينة على جزء من الجذور كلما أمكن ذلك.

٨ - عند أخذ العينات تخلط كل عينة مركبة وتوضع في كيس من البلاستيك، يرفق به جميع المعلومات الضرورية.

٩ - يجب ألا تتعرض العينات إلى الشمس مباشرة، أو لحرارة أكثر من ٣٠°م، ولذلك يجب وضع العينات في صناديق عازلة insulated chest وتنقل مباشرة إلى المختبر.

١٠ - يفضل استخلاص النيماتودا من العينات خلال يومين، وإن تعذر ذلك فتحفظ مبردة عند حرارة ١٠ - ١٥°م لإبقاء النيماتودا حية فسيولوجياً. ويلاحظ أن انخفاض حرارة التخزين عن هذا المعدل قد يضر بالنيماتودا، كما أن الحرارة العالية قد تؤدي إلى فقس البيض وسرعة فقد نشاط النيماتودا المتحركة، وإذا تعذر وجود مبرد فيمكن حفظ العينات على درجة حرارة الغرفة مدة لا تزيد على ٢ - ٣ أسابيع.

ثانياً: أخذ عينات من النباتات المزروعة

١ - المحاصيل الحولية

تؤخذ العينات من خطوط النباتات وعلى بعد حوالي ٥ - ١٢ سم من السيقان، وبعمق الجذور (حوالي ١٥ - ٢٠ سم)، وبطريقة منتظمة تعاقبية (الشكل رقم ١٩٩).

٢ - الأشجار والشجيرات

يمكن أن تؤخذ العينات في أي وقت، بشرط أن تكون النباتات في حالة نمو، والتربة بحالة جيدة. وتؤخذ العينات في منطقة محيط النمو الخصري للشجرة

drip-line ، ويعمق منطقة الجذور الشعرية (تختلف باختلاف النبات)، وفي نظام متعاقب (الشكل رقم ٩٩ب). وتؤخذ العينات في حالة كروم العنب في خط زراعة الشجيرات بالقرب من السيقان، وبعيداً عن مناطق الحراثة والعمليات الزراعية الأخرى (الشكل رقم ٩٩د).

### ٣ - المسطحات الخضراء

تؤخذ العينات على عمق ٨ - ١٢ سم على حواف المناطق المصابة وتتجنب المناطق الميئة.

### طرق استخلاص النيماتودا

#### Extraction of Nematodes

تستخلص النيماتودا من التربة والأنسجة النباتية بعدة طرق، ويعتمد اختيار الطريقة المناسبة على نوع وبيولوجية وطبيعة تطفل النيماتودا، والعائل، وطبيعة وحالة العينة (قوام التربة)، ووقت أخذ العينة، والهدف من الاستخلاص، وأخيراً مدى توافر الأدوات والأجهزة الخاصة وكذلك الوقت اللازم للاستخلاص.

وحيث إن الهدف هنا هو التدريب، فسنتصر على تناول بعض الطرق الشائعة الاستعمال في كثير من مختبرات النيماتودا، وسنتجنب الطرق التي تحتاج إلى أجهزة قد لا تتوفر في كثير من المختبرات.

### طرق الاستخلاص من التربة:

#### أولاً: طريقة أطباق بيرمان Baermann trays

تعتبر هذه الطريقة تحويراً وتحسيناً لطريقة أقماع بيرمان Baermann funnels التي كانت أوربما ما زالت تستعمل في بعض الحالات الخاصة. وطريقة أطباق بيرمان مفيدة لاستخلاص النيماتودا النشيطة من عينات التربة الصغيرة، وكذلك من أجزاء الجذور المحتوية على بيض ويرقات نيماتودا تعقد الجذور والحوصلات (نيماتودا الحوصلات في فصل الربيع). كما أنها مفيدة في استخلاص النيماتودا الداخلية المتحركة من أجزاء الجذور - الموجودة في عينة التربة - التي يحصل عليها من طرق الاستخلاص الأخرى.



المواد والأدوات اللازمة: شبك screen من البلاستيك أو الفولاذ الذي لا يصدأ stainless steel - من نوع المناخل seives (قطر الفتحة حوالي ١ مم) - قطره حوالي ١٧,٥ سم وعمول على أرجل بارتفاع ٤,٠ سم، مناديل ورقية (تتحمل البلل) أو أية مادة مناسبة كالشاش، منخل (غريبال أو مصفى) بقطر ٢٠ سم ذو فتحات ضيقة جدًا (٢٦ ميكرونًا)، طبق tray (وعاء) من الألمنيوم بقطر ٢٠ سم كالذي يستعمل في المنازل لعمل المعجنات pie pans .

#### الطريقة:

١ ( ) تخلط عينة التربة، ويؤخذ منها حجم ١٠٠ سم<sup>٣</sup> توضع بانتظام على المنديل الورقي بعد وضعه فوق الشبك .

٢ ( ) يوضع الشبك مع التربة في طبق الألمنيوم، ثم يضاف إلى الطبق كمية من الماء تكفي لغمر التربة قليلاً .

٣ ( ) تترك العينات على درجة حرارة الغرفة (حوالي ٢١ - ٢٤°م) مدة ثلاثة أيام، ولمنع تبخر الماء تغطي الأطباق أو توضع فوق بعضها البعض، ويضاف إليها قليل من الماء عند الحاجة .

٤ ( ) تجمع النيماتودا المتجمعة في ماء الطبق بعد ثلاثة أيام، وإذا كان المعلق الناتج غير نظيف يمرر من خلال المنخل (٢٦ ميكرونًا)، حيث تُحجز النيماتودا على المنخل، ثم تنقل بواسطة تيار خفيف من الماء إلى كأس زجاجي . ويمكن الاستمرار في جمع أكبر قدر من النيماتودا وإلى مدة ١٤ يومًا .

#### ثانيًا: طريقة الصب والمناخل Decanting and sieving

تعتبر هذه الطريقة من أبسط الطرق وأقدمها، لكنها تتطلب كثرة تكرار عملية الترويق (التصفية) من خلال المناخل (المصافي)، ولذلك أحيانًا تستعمل مادة



الـ Separan بمعدل ١٢,٥ مجم لكل مل من الماء المستعمل، وإذا تعذر توافر هذه المادة فيمكن اتباع الطريقة بدونها. تفيد هذه الطريقة في استخلاص النيماتودا لاستعمالها كلقاح، وكذلك في عمليات الاستخلاص الروتينية خاصة إذا استعملت معها طريقة أطباق بيرمان السابقة. وتعتمد هذه الطريقة على اختلاف الحجم والوزن النوعي لكل من النيماتودا ومكونات التربة.

يستخدم في هذه الطريقة عدد من المناخل sieves تختلف باختلاف سعة ثقبها، ويسمى المنخل بعدد «المش» mesh، وهو عدد الأسلاك المتقاطعة في البوصة الطولية (عدد الثقوب في البوصة الطولية) فيقال المنخل ١٠ مش أو المنخل ٥٠٠ مش، ليعني المنخل ذو الثقوب سعة ٢٠٠٠ ميكرون أو ٢٦ ميكرونًا على التوالي.

المواد والأدوات اللازمة: اثنان من السطول (جرادل) العادية البلاستيكية (أو من أوعية الغسيل المصنوعة من الفولاذ الذي لا يصدأ) يتسع الواحد منها لحوالي خمسة لترات، مجموعة من المناخل ٢٠، ١٥٠، ٣٢٥ و ٥٠٠ مش وبقطر ٢٠ سم (سعة ثقبها ٨٤٠، ١٠٥، ٤٥، ٢٦ ميكرونًا على التوالي)، وكأس زجاجية سعتها ١٥٠ مل.

#### الطريقة:

١ ( تخلط عينة التربة ويؤخذ منها حجم بمقدار ٥٠٠ سم<sup>٣</sup> ويوضع في السطل (أو وعاء الغسيل) الأول (أ)، ويضاف إليه كمية من الماء (٢ - ٣ لترات) بحيث تغمر التربة تمامًا.

٢ ( تخلط التربة مع الماء في السطل خلطًا جيدًا وتفتت كتل التربة المتناسكة.

٣ ( تترك المحتويات مدة حوالي ١٠ ثوان، ثم يمرر الجميع ما عدا رواسب التربة الثقيلة من خلال المنخل ٢٠ مش إلى السطل (ب). ولزيادة الاستخلاص يضاف كمية من الماء إلى العينة الأصلية وتكرر هذه الخطوة.

٤ ( بينما لا يزال المنخل ٢٠ مش ممسوكًا فوق السطل (ب)، تغسل محتويات المنخل بواسطة تيار من الماء (يستخدم عادة دش غسيل).

٥ ( يتخلص من المواد المتبقية في السطل (أ)، وكذلك مما تبقى على المنخل ٢٠ مش، ويتم غسلهما وتنظيفهما.

٦ ( تخلط محتويات السطل (ب) وتترك لتترسب مدة حوالي دقيقة، ثم تمرر من خلال المنخل ١٥٠ مش إلى السطل (أ) بعد أن تم تنظيفه.

٧ ( وبينما لا يزال المنخل ١٥٠ مش فوق السطل (أ) تغسل محتويات المنخل بواسطة تيار من الماء.

٨ ( تنقل المواد المتجمعة على المنخل ١٥٠ مش إلى كأس زجاجية (٢٥٠ مل)، وذلك بغسل المنخل من الخلف بواسطة تيار من الماء، كما ينظف السطل (ب) في هذه المرحلة.

٩ ( تخلط محتويات السطل (أ) وتترك لتترسب مدة حوالي دقيقة، ثم تمرر من خلال المنخل ٣٢٥ مش إلى السطل (ب).

١٠ ( بينما لا يزال المنخل ٣٢٥ مش فوق السطل (ب) تغسل محتويات المنخل بواسطة تيار خفيف من الماء (يستخدم عادة قنينة غسيل).

١١ ( تنقل المواد المتجمعة على المنخل ٣٢٥ مش إلى الكأس الزجاجية نفسها كما في الخطوة رقم ٨.

١٢ ( تخلط محتويات السطل (ب) وتترك لتترسب مدة حوالي دقيقة، ثم تمرر من خلال المنخل ٥٠٠ مش إلى حوض الغسيل.

(١٣) تنقل المواد المتجمعة على المنخل ٥٠٠ مش إلى الكأس الزجاجية نفسها كما في الخطوتين ٨، ١١.

(١٤) إذا كان معلق النيماتودا في الكأس الزجاجية غير نظيف (لوجود حبيبات التربة أو مواد عضوية)، فيمكن تنقيته واستخلاص النيماتودا وحدها باستخدام طريقة الجمع بين أطباق بيرمان والمناخل كما سيرد ذكره.

من مميزات هذه الطريقة (بدون الجمع مع أطباق بيرمان) استخلاص النيماتودا النشيطة وغير النشيطة واستعمالها كلقاح، وإمكانية استخدامها في حالة العينات الكبيرة، كما أنها لا تستغرق أكثر من نصف ساعة. لكن من عيوبها أنها تتطلب خبرة، وتتطلب مناخل وهي مرتفعة السعر عادة، كما أن كفاءتها في الاستخلاص ليست عالية، والمعلق الناتج - عادة - غير نظيف.

#### ثالثاً: طريقة الجمع بين أطباق بيرمان والمناخل

##### Combination of Baermann trays with sieving

تفيد هذه الطريقة في تنقية معلق النيماتودا من بقايا التربة والمواد العضوية الموجودة فيه، والحصول على معلق نظيف للنيماتودا.

وتتلخص هذه الطريقة في استخدام أجزاء الجذور والتربة المتحصل عليها من على المناخل، أو المعلق غير النقي في الطريقة السابقة، ثم استخلاص النيماتودا نقيّة بطريقة أطباق بيرمان السابقة الذكر (في أولاً).

#### رابعاً: طريقة الطرد المركزي مع الطفو Centrifugal-flotation method

تعتبر هذه الطريقة إحدى الطرق الممتازة، والشائعة الاستعمال في معظم مختبرات النيماتودا، لاستخلاص معظم أنواع النيماتودا من التربة، خاصة يرقات نيماتودا تعقد الجذور والنيماتودا الحلقيّة من جنس *Circonemella*. لكن من عيوبها أنها تسبب تلفاً لكثير من النيماتودا المستخلصة، ولذلك عادة لا تستعمل هذه النيماتودا كلقاح.

المواد والأدوات اللازمة: محلول سكري يحضر بإذابة ٤٥٤ جم من السكر في كمية كافية من الماء ويكمل الحجم إلى لتر واحد.

جهاز طرد مركزي ذو رأس أفقي (عند الدوران) يحمل أنابيب تتسع لمعلق بحجم ٥٠ مل أو أكثر، وبقوة طرد نسبية عند ٤٢٠ ج (420g)، خلط ميكانيكي أو خلط بالاهتزاز vibrator mixer لخلط العينات في الأنابيب، مناخل ٣٥، ٤٠، ٥٠٠ مش، وكؤوس زجاجية سعة ١٠٠، ١٥٠، ١٠٠٠ مل.

ملاحظة: تختلف سرعة الدوران في الدقيقة (rpm) للحصول على قوة الطرد المطلوبة من جهاز طرد مركزي إلى آخر، حسب نصف قطر الرأس في الجهاز، ويمكن حساب سرعة الدوران المطلوبة باستخدام المعادلة التالية:

قوة الطرد النسبية (٤٢٠ في هذه الحالة) =  $0.0000118 \times \text{نصف قطر الرأس}$  بالسنتيمتر (من الكتالوج)  $\times$  (سرعة الدوران المطلوبة)<sup>٢</sup>.

#### الطريقة:

١) تخلط عينة التربة ويؤخذ منها كمية بحجم ١٠٠ سم<sup>٣</sup>، وتوضع في كأس سعتها لتر واحد، ثم يضاف إليها كمية كافية من الماء بحيث يصبح الحجم النهائي حوالي ٦٠٠ مل.

٢) تحرك المحتويات جيّدًا مدة ٢٠ ثانية وتترك مدة دقيقة واحدة لترسب. ملاحظة: يجب ألا تزيد فترة الترسيب على ٢٠ - ٣٠ ثانية في حالة النيماتودا الحلقيّة *Criconemella*.

٣) يمرر المعلق من خلال المنخل ٣٥ مش بعد وضعه فوق المنخل ٤٠٠ مش، ويلاحظ أن المناخل تمسك دائمًا أثناء الصب بزاوية مائلة (٣٥ - ٤٠



درجة) وذلك لتقليل فرصة مرور النيماتودا الصغيرة الحجم من خلال فتحات المناخل.

ملاحظة: للحصول على حوصلات نيماتودا الحوصلات يمكن أن يضاف منخل ٦٠ أو ٨٠ مش بين المنخل ٣٥ مش والمنخل ٤٠٠ مش لحجز الحوصلات ومن ثم جمعها من عليه.

٤ ( بينما لا يزال المنخل ٣٥ مش فوق المنخل ٤٠٠ مش تغسل محتويات المنخل ٣٥ مش برفق، بواسطة تيار خفيف من الماء، مع ملاحظة تجنب الغسل الكثير لأنه يسبب مرور النيماتودا الصغيرة الحجم عبر كلا المنخلين.

٥ ( تنقل محتويات المنخل ٤٠٠ مش نقلاً كمياً بواسطة تيار خفيف من الماء - يسقط من خلف المنخل - إلى كأس زجاجية سعتها ١٥٠ مل.

٦ ( يوزع المعلق المتحصل عليه في الخطوة السابقة على أنابيب الطرد المركزي ثم توضع في جهاز الطرد المركزي مع التأكد من توازن الأنابيب في الجهاز.

٧ ( يغطى الجهاز ثم يدار على قوة طرد ٤٢٠ ج مدة خمس دقائق.

٨ ( بعد الانتهاء من عملية الطرد السابقة تؤخذ الأنابيب برفق، ويتخلص من الماء الرائق فيها إلى حوض الغسيل (توجد النيماتودا في كتلة التربة المترسبة في قاع الأنابيب).

٩ ( تعبأ الأنابيب بالمحلول السكري إلى ما قبل فوهة الأنبوبة بحوالي ٢ سم.

١٠ ( تخلط العينات جيداً داخل الأنابيب بواسطة الخلاط الميكانيكي، أو بواسطة جهاز الاهتزاز، ليتم دمج المحلول السكري مع راسب التربة والنيماتودا (يفضل أن يتم الخلط والأنابيب مغلقة متى توافرت أعطية لها).

(١١) توضع الأنابيب مرة أخرى في الجهاز ويدار على السرعة السابقة نفسها مدة ٣٠ - ٦٠ ثانية، فتصبح النيماتودا بعد الطرد معلقة في المحلول السكري بينما ترسب التربة في القاع.

(١٢) بعد الانتهاء من عملية الطرد الثانية تؤخذ الأنابيب برفق، ويمرر معلق النيماتودا - في المحلول السكري - ببطء من خلال المنخل ٥٠٠ مش (يفضل النوع ذو قطر ٣ بوصات).

(١٣) تغسل النيماتودا العالقة على المنخل ٥٠٠ مش بتيار خفيف جداً من الماء (قنية غسيل) لتخليصها من آثار السكر، ثم تنقل كمياً بواسطة تيار خفيف من الماء - يسلط من خلف المنخل - إلى كأس زجاجية سعتها ١٥٠ مل، بحيث يصبح معلق النيماتودا في حدود ٢٠ مل.

وهناك عدة طرق أخرى لاستخلاص النيماتودا من التربة، تعتمد أساساً على فصل النيماتودا عن حبيبات التربة بواسطة تيار ماء يتجه إلى الأعلى، والاحتفاظ بالنيماتودا في المعلق، بينما تسقط حبيبات التربة الثقيلة إلى الأسفل elutriation، ولكن تتطلب هذه الطرق بعض الأجهزة الخاصة المرتفعة الثمن، التي قد لا تتوافر في كثير من مختبرات النيماتودا. ومن هذه الأجهزة:

● جهاز الترويق شبه الأتوماتيكي Semiautomatic elutriator

● جهاز سينهورست للترويق Seinhorst elutriator

● جهاز أوستنبرنك للترويق Oostenbrink elutriator

طرق الاستخلاص من الأنسجة النباتية:

أولاً: الفحص المباشر Direct examination

تتبع هذه الطريقة - التي تنصف بالسهولة والسرعة - لمعرفة ما إذا كان النسيج النباتي مصاباً بالنيماتودا فقط، وليس لتقدير شدة الإصابة.

وتتلخص هذه الطريقة في وضع النسيج مع قليل من الماء في طبق زجاجي ، أو زجاجة ساعة ، ومن ثم يتم تمزيق النسيج أثناء فحصه تحت مجهر التشریح binocular (stereoscopic microscope) بواسطة إبرتي تشریح ، ويتعرف على النيماتودا تحت مجهر التشریح ، وقد يقتضي الأمر عمل تحضيرات مجهرية منها لفحصها تحت المجهر المركب .

ثانيًا: طريقة سينهورست باستخدام رذاذ الماء (غرفة الرذاذ)

Seinhorst's mist-spray extraction (mist chamber)

هذه الطريقة من أكثر الطرق استعمالاً لاستخلاص النيماتودا من الأنسجة النباتية ، لكنها تتطلب بعض الأدوات الخاصة لتركيب ما يسمى «جهاز» غرفة الرذاذ . وعندما لا تتوافر مثل هذه الغرفة في مختبر النيماتودا فيستعاض عن هذه الطريقة بطريقة الهزاز التالية .

ثالثًا: طريقة استخدام الهزاز Shaker

هذه الطريقة مشابهة تقريباً في كفاءتها لغرفة الرذاذ السابقة في استخلاص نيماتودا التفرح ، وغيرها من النيماتودا الداخلية من الجذور ، لكنها أقل كفاءة من غرفة الرذاذ ذات الكفاءة العالية .

المواد والأدوات اللازمة : مواد كيميائية تشمل مادة الأرتان Aretan

ethoxyethyl mercuric chloride ، وكبريتات الستربتومايسين streptomycin sulfate أو أيًا من المضادات الحيوية الأخرى المناسبة ، وذلك لمنع تعفن الجذور وزيادة كفاءة الطريقة .

كما تتطلب توافر هزاز shaker (من نوع محوري الدوران gyratory ) ، ومنخلين

٤٠٠ ، و ٥٠٠ مش ، دورق زجاجي سعته ١٢٥ مل ، وكذلك كأس زجاجية سعتها ١٥٠ مل .

**الطريقة:**

- (١) تغسل الجذور وتقطع إلى قطع صغيرة بطول ١ - ٢ سم.
- (٢) توزع عيّنات الجذور في الدوارق الزجاجية ذات السعة ١٢٥ مل، ويحدد ٥,٥ - ٥ جم في كل دورق.
- (٣) تغطى الجذور في الدوارق بمحلول مكون من ١٠ مجم من Aretan و ٥٠ مجم من كبريتات الستريتومايسين لكل لتر واحد من الماء (يمكن استعمال أي من المضادات الحيوية الأخرى المناسبة).
- (٤) توضع الدوارق على الهزاز ومن ثم يدار الجهاز على سرعة ١٠٠ دورة في الدقيقة، لمدة ٤٨ ساعة عند درجة حرارة الغرفة (٢٤ - ٢٨°م).
- (٥) يمرر المعلق من خلال منخل ٤٠٠ مش أو منخل ٥٠٠ مش.
- (٦) تجمع النيماتودا من على المنخل بواسطة تيار خفيف من الماء (قنينة الغسيل) يسلط من خلف المنخل إلى كأس زجاجية سعتها ١٥٠ مل ثم تفحص.

**رابعاً: طريقة الخلط مع أطباق بيرمان Blender - Baerman trays**

هذه الطريقة مفيدة في حالات محدودة، رغم ما يكتنفها من مشكلات، كالأضرار التي تحدث للنيماتودا لتعرضها لحركة الخلط. ويمكن استبدال أطباق بيرمان هنا بالمناخل، وذلك بفصل النيماتودا من المعلق الناتج من الخلط بواسطة عدد من المناخل المناسبة.

المواد والأدوات اللازمة: محلول من مادة Aretan (١٠ مجم/لتر ماء) أو أي مضاد حيوي مناسب، أو حتى أنواع معينة من المبيدات الفطرية كمبيد الكابتان Captan.



كما تتطلب الطريقة خلطاً عادياً blender ، وكؤوساً زجاجية ، ومنخل ٣٢٥ مش ، وكذلك أطباق بيرمان (أو أقماع بيرمان).

#### الطريقة :

- ١ ( يغسل النسيج النباتي جيّداً بالماء ويقطع إلى أجزاء بطول حوالي ١ - ٢ سم .
- ٢ يوضع حوالي ٥٠ جم أو أقل من النسيج في الخلاط (سعة ٢ لتر) ويضاف إليه ٢٠٠ مل من الماء .
- ٣ يدار الجهاز على السرعة العالية لمدة ١٥ ثانية .
- ٤ يمرر المعلق الناتج في الخطوة السابقة من خلال المنخل ٣٢٥ مش مع استقبال الراشح في وعاء .
- ٥ تضاف كمية من الماء إلى بقية النسيج في الخلاط ويرج برفق (شطف) ، ثم تكرر الخطوة السابقة .
- ٦ تنقل المحتويات من على المنخل نقلاً كمياً بواسطة تيار خفيف من الماء (قنينة غسيل) يحتوي على محلول المضاد الحيوي إلى كأس زجاجية .
- ٧ يمرر الراشح الناتج في الخطوتين ٤ ، ٥ مرة أخرى من خلال المنخل .
- ٨ تكرر الخطوة رقم ٦ وتنقل المحتويات إلى الكأس الزجاجية السابقة نفسها .
- ٩ تصب - ويرفق - محتويات الكأس الزجاجية على ورق الترشيح (أو المناديل الورقية) لأطباق بيرمان .

(١٠) يضاف إلى طبق بيرمان كمية كافية من محلول المضاد الحيوي، بحيث يغطي فقط المحتويات المتبقية على ورق الترشيح، وتترك المحتويات للتخزين مدة يومين أو ثلاثة عند حرارة ٢١ - ٢٤ م°.

(١١) يضاف قليل من الماء كلما دعت الضرورة أثناء التخزين.

(١٢) تجمع النيماتودا من المعلق في الطبق بعد يومين أو ثلاثة من التخزين.

خامساً: طريقة هيبوكلوريت الصوديوم لاستخلاص بيض نيماتودا تعقد الجذور  
NaOCl-extraction of *Meloidogyne* eggs.

تستخدم مادة هيبوكلوريت الصوديوم NaOCl لإذابة المادة الجيلاتينية في كيس البيض وتحرير البيض. تعتبر هذه الطريقة سريعة ومفيدة جداً في الحصول على لقاح نظيف من البيض، لكنها تتطلب احتياطات خاصة لتقليل تعرض البيض لمادة هيبوكلوريت الصوديوم، إلا أنه، وبالرغم من الاحتياطات الاعتيادية، فإن نسبة ٢٠٪ فقط من البيض يفقس إلى يرقات قادرة على الإصابة، وعليه يجب أخذ ذلك بعين الاعتبار عند التلقيح بالبيض.

المواد والأدوات المطلوبة: محلول هيبوكلوريت الصوديوم NaOCl (يستخدم محلول الكلوروكس chlorox المستعمل للغسيل إذ يحتوي على ٢٥، ٥٪ NaOCl).

كما تتطلب الطريقة دورقاً زجاجياً سعته حوالي ٦٠٠ مل أو برطماناً زجاجياً jar مناسباً مع الغطاء، ومناخل ٢٠٠، ٥٠٠ مش، وكأساً زجاجية سعتها ١٥٠ مل.

#### الطريقة:

- ١ ( تغسل الجذور المصابة - برفق - بالماء ثم تقطع إلى قطع صغيرة بطول ١ - ٢ سم .

٢) يوضع حوالي ٥٠ جم أو أقل من الجذور في الدورق (أو البرطمان)، ويضاف إليها ٢٠٠ مل من محلول هيبوكلوريت الصوديوم تركيز ٥,٠ ٪ (٢٠ مل كلوروكس + ١٨٠ مل ماء).

٣) يغطي الدورق ثم يرج يدويًا وبشدة لمدة ثلاث دقائق، ولا يجوز زيادة هذه المدة على أربع دقائق وإلا تضرر البيض من هيبوكلوريت الصوديوم.

ملاحظة: أما إذا كان البيض المستخلص لن يستخدم كلقاح فيمكن زيادة تركيز هيبوكلوريت الصوديوم إلى ١ ٪، وكذلك مدة الرج إلى ١٠ دقائق (يمكن أن يستخدم هزاز في هذه الحالة).

٤) يمرر المعلق بسرعة من خلال المنخل ٢٠٠ مش بعد وضعه فوق المنخل ٥٠٠ مش، حيث يتجمع البيض على المنخل الأخير، بينما يحتفظ المنخل الأول بقطع الجذور.

٥) يوضع المنخل ٥٠٠ مش بما يحتويه من البيض بسرعة تحت تيار خفيف من الماء البارد لمدة بضع دقائق، لإزالة بقايا هيبوكلوريت الصوديوم.

٦) للحصول على أعداد إضافية من البيض يمكن إضافة كمية من الماء إلى بقية الجذور في الدورق مع رجّه، ثم يمرر المعلق من خلال المنخلين السابقين، مع ملاحظة عدم تعريض البيض لمادة هيبوكلوريت الصوديوم لأكثر من أربع دقائق.

٧) تنقل كمية البيض المتجمعة على المنخل ٥٠٠ مش نقلاً كمياً بواسطة تيار خفيف من الماء، يسقط من خلف المنخل، إلى كأس زجاجية سعتها ١٥٠ مل.

ويمكن أن تستخدم هذه الطريقة أيضًا في الحصول على بيض نيماتودا الحوصلات، لكن يجب أن تزداد مدة الرج إلى ٨ - ١٠ دقائق وتركيز هيبوكلوريت الصوديوم إلى ١٪.

### عمل التحضيرات المجهرية للنيماتودا

#### Mounting Nematodes

يمكن تقسيم أنواع التحضيرات المجهرية للنيماتودا إلى ثلاثة أنواع من التحضيرات: تحضيرات مؤقتة، وشبه مستديمة، ومستديمة.

#### أولاً: التحضيرات المؤقتة Temporary Mounts

يعتبر هذا النوع من أبسط وأسرع طرق التحضيرات، إلا أن العينة يجب أن تفحص مباشرة، أو على الأكثر خلال ساعات قليلة، وإلا تدهورت العينة وضاعت معالمها. تفيد هذه الطريقة في دراسة تفاصيل بعض التركيبات في جسم النيماتودا، كالرمح ومنطقة الرأس وتجويف المريء وغيرها من التركيبات التي تتأثر بمحاليل التثبيت. ويتم في هذه الطريقة تحميل النيماتودا حية في قطرة من الماء على الشريحة، وإذا كانت النيماتودا تتحرك بشدة بحيث يتعذر الفحص الجيد فإنه يتم قتلها، وذلك بتمرير الشريحة بضع مرات فوق لهب هادىء.

ويمكن تلخيص هذه الطريقة كالآتي:

- ١ - تستخدم شريحة زجاجية اعتيادية نظيفة، وبواسطة فرشاة دقيقة تعمل في وسط الشريحة حلقة خفيفة من مادة الـ glyceel (Zut) وإذا تعذر وجود هذه المادة فيمكن أن تستعمل مادة طلاء الأظافر (nail polish)، كما يمكن أن تستعمل الشرائح ذات التجويف كالمستعملة في دراسات البكتريا.

- ٢ - توضع قطرة صغيرة من الماء المقطر في وسط الحلقة.



٣ - يوضع معلق النيماتودا في طبق سيراكوز Syracuse dish ، أو أي طبق زجاجي مناسب (أطباق بترى) .

٤ - بينما تلاحظ العينة من خلال مجهر التشريح تلتقط بضع نيماتودات من المعلق كل على حدة، وتوضع في نقطة الماء على الشريحة . ويتم عملية الالتقاط باستخدام إبرة رفيعة خاصة للالتقاط، مع إثارة تيار خفيف في المعلق أسفل النيماتودا وتعويمها إلى السطح ثم التقاطها بسرعة . وإذا لم تتوافر مثل هذه الإبرة فيمكن استعمال شعرة من فرشاة الأسنان، أو مجس دقيق كالذي يستعمله طبيب الأسنان، أو شظية خيزرانية، أو أحد أعواد تنظيف الأسنان، وذلك بعد أن يتم شحذ رأس الأداة وتركيبها في ماسك إبرة تشريح .

٥ - وعادة ما تقتل النيماتودا برفق، وذلك بتمرير الشريحة مرات قليلة فوق لهب هادىء .

٦ - توضع الشريحة تحت المجهر وتثبت عينات النيماتودا برفق (بواسطة إبرة الالتقاط) إلى وسط قاع قطرة الماء .

٧ - يوضع غطاء الشريحة النظيف (عادة يمرر فوق لهب خفيف للتخلص من الرطوبة) بواسطة ملقط صغير ببطء، وبزاوية على قطرة الماء، مع ملاحظة عدم إزاحة قطرة الماء أو تكوين فقاعات هوائية .

٨ - تقفل أطراف غطاء الشريحة بحلقة سميكة من مادة Zut أو طلاء الأظافر (في حالة استعمال الأغشية المستديرة)، أو بخليط متساوٍ من شمع البرافين واللانولين (في حالة الأغشية المربعة)، وفي الحالة الأخيرة يستخدم قضيب حديدي صغير مثبت في يد خشبية، يتم تسخينه على اللهب ثم يغمر بهذا الخليط، وقبل أن يتصلب الخليط يمرر القضيب على حواف غطاء الشريحة .

## ٩ - تفحص العينة في الشريحة تحت المجهر المركب.

## ثانيًا: التحضيرات شبه المستديمة Semi-permanent Mounts

والتحضيرات شبه المستديمة إما بسيطة وسريعة لكنها لا تتحمل الحفظ أكثر من عدة أيام، أو تلك التي تتطلب تثبيت النيماتودا بأحد محاليل التثبيت (انظر التحضيرات المستديمة) لكنها تتميز بأن مدة حفظها أطول قد تصل إلى عدة أسابيع.

لا تختلف التحضيرات شبه المستديمة البسيطة في طريقة عملها عن التحضيرات المؤقتة، إلا أنها تتطلب قتل النيماتودا ثم تحميلها على الشريحة في محلول ٢٪ فورمالين، أو أحد محاليل التثبيت، بدلاً من الماء. ويمكن تلخيص هذه الطريقة البسيطة كالتالي:

١ - اتبع الخطوات من ١ حتى نهاية ٥ كما في التحضيرات المؤقتة.

٢ - بعد قتل النيماتودا، تلتقط (تحت المجهر) وتنقل إلى شريحة حلقة أخرى تحتوي في وسطها على قطرة صغيرة من محلول ٢٪ فورمالين، أو أحد محاليل التثبيت.

٣ - اتبع الخطوات من ٦ إلى النهاية كما في التحضيرات المؤقتة.

## ثالثًا: التحضيرات المستديمة Permanent Mounts

هناك عدة طرق لعمل التحضيرات المستديمة تختلف باختلاف محاليل التثبيت هناك عدة طرق لعمل التحضيرات المستديمة تختلف باختلاف محاليل التثبيت (TAF, formalin, F. A. 4 : 1) fixing ، وطريقة معاملة العينة بالجليسرين ethanol-glycerine, formalin-glycerine ، وطريقة التحميل glycerine jelly . anhydrous glycerine وتتميز الشرائح المستديمة بالوضوح وطول مدة الحفظ التي قد تصل إلى ٢٥ سنة، ولعل من أبسط وأسرع طرق التحضيرات المستديمة طريقة سينهورست السريعة Seinhorst's rapid method التي تلخص كالتالي:

١ - تلتقط النيماتودا من المعلق وتنقل إلى طبق سيراكوز يحتوي على كمية قليلة جداً من الماء المقطر (دائماً استعمل ماء مقطرًا في جميع أنواع التحضيرات).

٢ - يضاف إلى الطبق محلول التثبيت F. A. 4:1 الساخن ، وذلك لقتل النيماتودا وتثبيتها. ويتركب هذا المحلول من ١٠ مل من الفورمالين (٤٠٪ فورمالدهيد)، و١ مل من حمض الخليك، و٨٩ مل من الماء المقطر. ويتم تسخين هذا المحلول (تحت جهاز طرد الغازات)، وذلك بوضعه في كأس أكبر منه تحتوي على ماء حار (حوالي ٩٠°م) حتى يسخن محلول التثبيت.

٣ - تترك النيماتودا في محلول التثبيت في الطبق الذي يجب تغطيته لبضع ساعات (أو يترك مدة ليلة واحدة).

٤ - تنقل النيماتودا إلى طبق آخر يحتوي على محلول ١٪ جليسر في كحول إيثانول تركيز ٢٠٪.

٥ - يوضع هذا الطبق في وعاء زجاجي مقفل (يمكن استخدام المجفف) يحتوي على عشر حجومه كحول تركيز ٩٦٪، ويترك في هذا الجو المشبع في حاضن عند درجة حرارة ٣٥ - ٤٠°م مدة لا تقل عن ١٢ ساعة.

٦ - يؤخذ الطبق ويذاح جزء من المحلول منه - عند الضرورة - ليضاف إليه محلول ٥٪ جليسر في كحول ٩٦٪، ويوضع الطبق في طبق بتري Petri dish الذي يقفل جزئياً ليسمح بالتبخر البطيء للكحول. يترك الطبقان مدة ثلاث ساعات على الأقل في الحاضن عند درجة حرارة ٤٠°م، أو حتى يتم التخلص من جميع الكحول وتصبح النيماتودا في جليسر نقي.

٧ - ينقل الطبق المحتوي على النيماتودا إلى مجفف calcium chloride desiccator ويترك مدة يومين أو ثلاثة.

٨ - بعد ذلك تلتقط النيماتودا وتحمل على الشرائح المجهرية في قطرة صغيرة من الجليسرين غير المائي anhydrous glycerine . وعادة يستخدم لذلك شرائح Cobb (Cobb aluminum slides) ، وهذه الشرائح عبارة عن طبقة واحدة من الألمنيوم ذات فتحة دائرية في وسطها، ويركب على الفتحة غطاء من أغطية الشرائح الزجاجية تُحْمَل النيماتودا بينها. وعند التحميل يستخدم غطاء شريحة مربع (رقم ١ ذو مساحة ٢٥ مم<sup>٢</sup>) يغسل بالكحول ويوضع في وسط شريحة Cobb فوق الفتحة الدائرية، ويضاف إلى هذا الغطاء قطرة صغيرة من الجليسرين غير المائي، ثم ينقل إليها ٣-٨ من النيماتودا في وسط قاع القطرة. ولدعم الغطاء الثاني يوضع في قاع قطرة الجليسرين ثلاث شعيرات دقيقة من الزجاج glass rods سمكها أقل بقليل من سمك النيماتودا. ويستخدم للغطاء الثاني غطاء شريحة مستدير (رقم ١) بعد غسله بالكحول وتعريضه للهب هادئ، ثم بواسطة ملقط صغير يوضع الغطاء ببطء على الغطاء الأول الذي يحمل قطرة الجليسرين وعينات النيماتودا، ويقفل الغطاء بعد ذلك بمادة الـ Zut ، ويفضل أن يتم القفل أولاً عند الزوايا الأربع، وبعد أن تجف (نصف ساعة تقريباً) يكمل قفل الشريحة تماماً.

#### دراسة بعض الصفات الظاهرية والتشريحية للنيماتودا

##### Morphology and Anatomy of Nematodes

لعل

الهدف من هذه الدواسة العملية هو تدريب الطلاب على ملاحظة ودراسة بعض الصفات الظاهرية والتشريحية للأجناس المختلفة التي تميز بعضها عن بعض، أو على الأقل تميز مجموعة منها عن الأخرى، وذلك استعداداً لاستعمال مفتاح مبسط لتعريف نيماتودا النبات إلى مستوى الجنس. وتتطلب هذه الدراسة تزويد الطلاب بمعلقات نقية لعدد من الأجناس النيماتودية المختلفة والمتوفرة في المنطقة.

يمكن أن تجرى هذه الدراسة العملية على النحو التالي:

#### أولاً: دراسة النيماتودا الرحيمة. *Hoplolaimus* spp.

١ - تلاحظ العينة تحت مجهر التبريح .



٢ - يتم التفريق (التمييز) بين الإناث والذكور، وكذلك الأطوار الكاملة واليرقية.

٣ - تعمل شريحة شبه مستديمة (بمحلول الفورمالين ٢٪) للإناث وأخرى للذكور (٤ - ٥ نيماتودات لكل شريحة).

٤ - تتم دراسة الصفات الظاهرية والتشريحية لكل من الإناث والذكور، تحت المجهر المركب، باستعمال الشرائح شبه المستديمة، وتلاحظ جميع الصفات التقسيمية الظاهرية والتشريحية التي درست في المحاضرات النظرية (يمكن أن يقوم المدرس بعمل جدول مبسط يوضح فيه صفات الأجناس المختلفة).

٥ - يقوم الطالب برسم جسم النيماتودا كاملاً، وكذلك عمل رسمين تفصيليين الأول للجزء الأمامي من الجسم شاملاً منطقة المريء، والآخر للجزء الخلفي للجسم (منطقة الذيل)، ويجب أن يكون الرسم دقيقاً وموضحاً عليه جميع الأجزاء المهمة.

٦ - ترسم جميع الأشكال (من الآن فصاعداً) في دفتر خاص يقوم المدرس بملاحظته وتقويمه.

ثانياً: تكرر الدراسة تفسها كما في «أولاً» على أجناس أخرى من النيماتودا:

١ - نيماتودا النبات مثل:

● نيماتودا التفريح *Pratylenchus* sp.

● نيماتودا التقزم *Tylenchorhynchus* sp.

● نيماتودا تقصف الجذور *Trichodorus* sp.

● النيماتودا الحلزونية *Helicotylenchus* sp.

● النيماتودا الحلقية *Macroposthonia* sp.

● النيماتودا الخنجرية *Xiphinema* sp.



- نيماتودا السوق والأبصال *Ditylenchus* sp.
- النيماتودا الواخزة *Belonolaimus* sp.
- نيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne* sp. (تلاحظ الإناث كمثرية الشكل في المعلق تحت مجهر التشريح ، وتحضر شريحة شبه مستديمة للذكور واليرقات).

## ٢ - النيماتودا الحرة

- نيماتودا *Diplogaster* sp.
- نيماتودا *Dorylaimus* sp.
- نيماتودا *Mononchus* sp.
- نيماتودا *Rhabditis* sp.

## مفتاح مبسط لتعريف الأجناس المهمة من نيماتودا النبات

يزود الطلاب بمعلق نقي للأجناس النيماتودية الشائعة في المنطقة، ويطلب منهم عمل تحضيرات مؤقتة أو شبه مستديمة (أو يزود الطلاب بتحضيرات جاهزة)، ومن ثم تعريف كل جنس باستخدام المفتاح المبسط التالي، الذي بني على أساس الصفات التقسيمية للإناث الناضجة، وعلى النحو التالي:

- ١ - لا يوجد رمح ..... نيماتودا غير متطفلة على النبات.
- ٢ - يوجد رمح ..... ٢
- ٢ - المريء قنبي، الرمح عادة بدون عقد ..... *Dorylaimida* ٣
- المريء تايلنكويد أو أفلنكويد، والرمح عادة ذو عقد ..... ٤
- ٣ - الرمح قصير ومنحن، والجسم قصير وغليظ (الشكل رقم ٨٠) .....  
جنس *Trichodorus*
- الرمح قصير ومستقيم .... عدد كبير من النيماتودا غير المتطفلة على النبات
- الرمح طويل ومستقيم، والجسم طويل وضيق .... جنس *Xiphinema*،  
*Longidorus*
- Longidorus*: الحلقة المرشدة للرمح تقع قرب الطرف الأمامي للرمح،

والرمح بدون انتفاخات قاعدية (شكل رقم ٧٧ ب، ج).  
*Xiphinema*: الحلقة المرشدة للرمح تقع بالقرب من قاعدة الرمح وأمام  
 اتصاله مع امتداد الرمح بمسافة قصيرة، والرمح ذو انتفاخات  
 واضحة (شكل ٧٩ ب).

٤ - المريء أفلنكويد ..... جنسي *Aphelenchus, Aphelenchoides*  
*Aphelenchoides*: نهاية ذيل الأنثى مستدقة (الشكل رقم ٨٣ أ)، والذكور  
 ليس لها جراب تناسلي.  
*Aphelenchus*: نهاية ذيل الأنثى مستديرة تقريباً، والذكور ذات جراب  
 تناسلي.

٥ - المريء تايلنكويد .....  
 ٥ - المريء بدون بصلة وسطى أو صمام *Neotylenchidae* .....  
 ٦ - المريء ذو بصلة وسطى وبها صمام متصلب .....

٦ - الإناث الناضجة ذات شكل منتفخ .....  
 ٩ - الإناث الناضجة دودية مغزلية الشكل .....

٧ - جسم الأنثى طري غير قاس ذو شكل كيسي ممتد أو كلوي، مع وجود  
 ذيل ..... الأجناس *Rotylenchulus, Tylenchulus, Nacobbus*.  
*Rotylenchulus*: ذات مبيضين، الجسم كلوي الشكل، والفتحة التناسلية  
 حوالي منتصف الجسم (الشكل رقم ٦٧ ب).

*Tylenchulus*: ذات مبيض واحد، والفتحة الإخراجية في الخلف بالقرب من  
 الفتحة التناسلية التي تقع في المؤخرة (الشكل رقم ٦٣ ب).  
*Nacobbus*: ذات مبيض واحد، والفتحة الإخراجية في الأمام بالقرب من  
 قاعدة المريء.

- جسم الأنثى يتحوصل، مستديراً أو ليمونيا، أو يظل طرياً ذا شكل كيسي،  
 ويدون ذيل .....  
 ٨ - جسم الأنثى طري ويتميز بوجود النمط العجاني (شكل ٥٤ و)

- Meloidogyne* جنس .....  
 - جسم الأنثى يتحوصل ..... جنسي *Heterodera, Globodera*  
*Heterodera*: الحوصلات ليمونية الشكل، ومنطقة الفتحة التناسلية ممتدة قليلاً بشكل مخروطي (الشكل رقم ٦٠ ب).  
*Globodera*: الحوصلات مستديرة الشكل، ولا يوجد امتداد لمنطقة الفتحة التناسلية (الشكل رقم ٥٩).  
 ٩ - الإناث ذات مبيض واحد .....  
 ١٢ - الإناث ذات مبيضين .....  
 ١٠ - الجسم الأمامي والبصلة الوسطى في المريء مندبجان مع بعضهما البعض ليكونا جسمًا بصلياً واسعاً ذا صمام ..... جنسي  
*Macroposthonia, Hemicycliophora*.  
*Macroposthonia*: تتميز بوجود تخطيط عرضي عميق يشبه الحلقات (الشكل رقم ٧٤).  
*Hemicycliophora*: تتميز الإناث الناضجة بوجود كيوتيكل زائد (الكيوتيكل القديم) يغلفها (الشكل رقم ٧٢ أ).  
 - الجسم الأمامي والبصلة الوسطى غير مندبجين .....  
 ١١ - الرمح ضعيف ورقيق ..... جنسي *Ditylenchus, Anguina*  
*Ditylenchus*: الإناث الناضجة عادة رفيعة الشكل ونشيطة، والبويضات مرتبة في صف، أو على الأكثر في صفين (الشكل رقم ٨٤).  
*Anguina*: الإناث الناضجة سميكة الشكل منحنية إلى الجهة البطنية، غير نشيطة، البويضات مرتبة في صفين أو أكثر (الشكل رقم ٨٢ ب).  
 - الرمح قوي وواضح (الشكل رقم ٦١) ..... جنس *Pratylenchus*  
 ١٢ - الرمح طويل (S) =  $\frac{\text{طول الرمح}}{\text{عرض الجسم عند منطقة عقد الرمح}}$  = ٢,٥ أو أكثر  
 ..... جنسي *Belonolaimus, Dolichodorus*



- Belonolaimus*: متوسط طول الجسم عادة ١,٧٥ مم أو أكثر، المريء متراكب مع الأمعاء، نهاية ذيل الأنثى مستديرة (الشكل رقم ٨١).
- Dolichodorus*: متوسط طول الجسم عادة أقل من ١,٧٥ مم، والمريء غير متراكب مع الأمعاء، نهاية ذيل الأنثى ذات بروز على شكل مخراز.
- ١٣ - الرمح متوسط الطول أو قصير (S = أقل من ٢,٥) ..... ١٣
- ١٣ - طول الذيل أقل من ١,٥ مرة من قطر الجسم عند فتحة الشرج ..... ١٥
- ١٤ - طول الذيل ١,٥ مرة أو أكثر من قطر الجسم عند فتحة الشرج ..... ١٤
- ١٤ - المريء متراكب مع الأمعاء ..... جنسي *Hirschmanniella, Radopholus*  
*Hirschmanniella*: التراكب من الناحية البطنية.  
*Radopholus*: التراكب من الناحية الظهرية.
- المريء غير متراكب مع الأمعاء (الشكل رقم ٦٩) ..... جنس *Tylenchorhynchus*
- ١٥ - الأعضاء الفازميديّة صغيرة تشبه الفتحات والجسم حلزوني الشكل ..... جنسي *Helicotylenchus, Rotylenchus*  
*Helicotylenchus*: المريء يتراكب مع الأمعاء عادة من الناحية البطنية، ومنطقة الشفاه غير مخططة طولياً، تفتح غدة المريء الظهرية بمسافة خلف قاعدة الرمح تقدر بربع طول الرمح أو أكثر.
- Rotylenchus*: المريء يتراكب مع الأمعاء عادة من الناحية الظهرية والجانبية، ومنطقة الشفاه مخططة أو غير مخططة، تفتح غدة المريء الظهرية بالقرب من قاعدة الرمح.
- الأعضاء الفازميديّة كبيرة الحجم والجسم حلزوني أو غير حلزوني الشكل ..... جنسي *Scutellonema, Hoplolaimus*  
*Scutellonema*: يقع العضوان الفازميديان في منطقة الذيل وهما متضادان

في الموقع، الجسم حلزوني الشكل (الشكل رقم ٧١)،  
الذكور نادرة.

*Hoplolaimus*: يقع عضو فازميدي أمام الفتحة التناسلية والآخر خلفها،  
الجسم سميك وعادة على شكل حرف C، عقد الرمح  
ذات بروز إلى الأمام، الذكور ذات جراب تناسلي  
(الشكل رقم ٧٣).

#### التعرف على الأعراض الظاهرية والتشريحية على العوائل المصابة

يهدف هذا التدريب العملي إلى إكساب الطلاب مهارة تشخيص الأمراض،  
عن طريق الملاحظة والتعرف على الأعراض الظاهرية والتشريحية المختلفة، التي تسببها  
بعض أجناس نيماتودا النبات على عوائلها النباتية.

ويفضل أن تسبق هذا التدريب في المختبر جولة ميدانية دراسية، تشمل بعض  
الحقول القريبية من المختبر، وذلك للتعرف على الأعراض الظاهرية للإصابة على  
المجموع الخضري، كالذبول والاصفرار والتقزم بشكل خاص، وكذلك توضيح طبيعة  
توزيع المرض في الحقل، التي تتميز عادة بأنها على هيئة بقع متناثرة patches في الحقل  
(الشكل رقم ٣١)، وخاصة في مراحل تطور المرض الأولى، كما يقوم الطلاب بجمع  
بعض العينات المصابة ونقلها إلى المختبر لدراستها.

وقد لا تتوافر في جميع الظروف والأوقات الأعراض المطلوب التعرف عليها  
ودراستها، ولذلك يفضل أن يقوم العاملون على هذا التدريب بعمل عدوى صناعية  
ببعض أنواع النيماتودا على عوائلها المناسبة (في البيوت المحمية الخاصة بالتجارب) قبل  
وقت كاف، بحيث تكون الأعراض واضحة وقت تنفيذ هذا التدريب العملي.

ويمكن أن يتم هذا التدريب العملي على النحو التالي:

أولاً: الأعراض الظاهرية على المجموع الخضري  
بالإضافة إلى الأعراض الظاهرية العامة على المجموع الخضري، كالتقزم  
والاصفرار والذبول، يتعرف الطلاب على الأعراض التالية:  
١ - البقع الورقية على نباتات الكريزانثم، نتيجة الإصابة بنيماتودا البراعم  
والأوراق *A. ritzemabosi* (الشكل رقم ٣٢).

٢ - انتفاخ وتشوه سوق نباتات البرسيم الحجازي، نتيجة الإصابة بنيماتودا  
السوق والأبصال *D. dipsaci* (الشكل رقم ٣٤).

٣ - العقد البذرية في سنابل القمح، وكذلك تشوه الأوراق في القمح، نتيجة  
الإصابة بنيماتودا تتألل حبوب القمح *A. tritici* (الشكل رقم ٣٧).

ثانياً: الأعراض الظاهرية على المجموع الجذري

١ - العقد الجذرية root-knots or galls على جذور النباتات المصابة  
(كالطماطم مثلاً) بنيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne* spp. (الشكل رقم ٤٧). كما يجب  
ملاحظة الفرق بين هذه العقد والعقد nodules التي تسببها بكتريا العقد الجذرية  
*Rhizobium* على جذور النباتات البقولية (يزود الطلاب بعينات منها) (الشكل  
رقم ٤٨).

٢ - التقرحات الشديدة على جذور بعض العوائل المناسبة (كالفاصوليا مثلاً)،  
نتيجة الإصابة بنيماتودا التقرح *Pratylenchus* (الأشكال رقم ٣٩ - ٤١).

٣ - الانتفاخات في أطراف الجذور (الشكل رقم ٤٣) كالتسبب النيماتودا  
الخنجرية *X. diversicaudatum* على جذور الورد، ويجب ملاحظة الفرق بينها وبين  
العقد التي تسببها نيماتودا تعقد الجذور.

٤ - تقصف الجذور في بعض العوائل المناسبة (كالذرة الشامية)، نتيجة الإصابة بنيماتودا تقصف الجذور *Trichodorus* (الشكل رقم ٤٤).

٥ - تعفن الجذور نتيجة للإصابة القديمة والمسبقة بنيماتودا تعقد الجذور (الشكل رقم ٥٦)، أو نيماتودا التقرح (الشكل رقم ٤١)، التي يعقبها الإصابة بفطريات وبكتريا التعفّنات. ويمكن مقارنة ذلك مع إصابات حديثة بالنيماتودا وغير متعفنة.

٦ - جذور موالح مصابة بنيماتودا الموالح، ويلاحظ التصاق حبيبات التربة على شكل كتل طينية ملتصقة على الجذر (الشكل رقم ٥١). تغسل الجذور بتيار خفيف من الماء، وتلاحظ النيماتودا متصلة بالجذر (تحت مجهر التشريح) (الشكل رقم ٦٥).

٧ - جذور بطاطس مصابة بنيماتودا حوصلات البطاطس *Globodera rostochiensis*، وتلاحظ أجسام الإناث المستديرة الشكل تقريباً متصلة بالجذور، مع عدم وجود عقد جذرية أو أعراض متخصصة (الشكل رقم ٥٠).

#### ثالثاً: الأعراض التشريحية

يزود الطلاب بشرائح مجهرية جاهزة ومصبوغة توضح الأعراض التشريحية في الجذور، نتيجة الإصابة ببعض أجناس النيماتودا، ويقوم الطلاب بدراساتها تحت المجهر الضوئي. ويمكن أن تشمل هذه الشرائح على التالي:

١ - الخلايا العملاقة (giant cells) في أنسجة الجذور المصابة بنيماتودا تعقد الجذور. يلاحظ عدد وموقع هذه الخلايا بالنسبة لأنسجة الجذور ورأس النيماتودا، كما يلاحظ شكل وحجم هذه الخلايا ومحتواها من السيتوبلازم وعدد الأنوية فيها (الشكل رقم ٥٣، ٥٧).

٢ - الاندماجات الخلوية syncytia في أنسجة الجذور المصابة بكل من نيماتودا الحوصلات *Heterodera*، وتعقد الجذور الكاذب *Nacobbus* (الشكل رقم ٥٣ ب،



ج)، والنيماتودا الكلوية *Rotylenchulus*. وفي جميع الحالات يلاحظ عدد وموقع هذه الخلايا بالنسبة لأنسجة الجذور ورأس الأنثى، ويلاحظ حجم وشكل هذه الخلايا وتركيبها الداخلي، وإن أمكن تلاحظ مناطق اتصالها مع بعضها البعض، ومقارنة هذه الخلايا بالخلايا العملاقة.

٣- الخلايا المغذية nurse cells في أنسجة جذور الموالح المصابة بنيماتودا الموالح. يلاحظ عدد وموقع هذه الخلايا بالنسبة لأنسجة الجذور ورأس النيماتودا، كما يلاحظ حجم وشكل هذه الخلايا ومحتواها من السيتوبلازم (الشكل رقم ٥٣، ٦٦).

### صبغ النيماتودا داخل الأنسجة النباتية

#### Staining Nematodes in Plant Tissues

يحتاج كثير من الدراسات التي تجرى على النيماتودا الداخلية التطفل إلى صبغ النيماتودا داخل أنسجة النبات، بهدف دراسة اختراق وتطور النيماتودا داخلياً بدون الحاجة إلى تمزيق الأنسجة.

وهناك عدة طرق لصبغ النيماتودا داخل أنسجة الجذور، وتعتبر طريقة الصبغ بواسطة الفوكسين الحامضي واللاكثوفينول acid fuchsin-lactophenol من أكثرها استعمالاً. إلا أن هناك طريقة حديثة يستخدم فيها هيبوكلوريت الصوديوم NaOCl (محلول الكلوروكس chlorox المستخدم في الغسيل والتنظيف) لمعاملة الأنسجة قبل صبغها بالفوكسين الحامضي، وقد أثبتت نجاحاً وكفاءة بالإضافة إلى سهولة استخدامها.

تتميز طريقة الصبغ بواسطة هيبوكلوريت الصوديوم والفوكسين الحامضي sodium hypochlorite-acid fuchsin عن غيرها من طرق الصبغ الأخرى بأن أنسجة الجذور لا تصطبغ بشدة عند صبغها بالفوكسين الحامضي، وذلك نتيجة لمعاملتها بالكلوروكس قبل صبغها، وبالتالي فإن الوقت المطلوب لإزالة الصبغة يكون قصيراً،

ولا يتطلب مواد أخرى لإزالة الصبغة، كما أن مستخدم هذه الطريقة لا يتعرض للمواد السامة (مثل أبخرة الفينول) المستعملة في الطرق الأخرى.

في هذا التمرين يتدرب الطلاب على صبغ جذور الطماطم، أو أي عائل آخر، المصابة بأحد أنواع نيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne spp.*، ومن ثم يتدرب الطلاب على دراسة مراحل تطور النيماتودا داخل الجذور وملاحظة الأطوار اليرقية والكاملة للنيماتودا (شكل ٥٨)، وتتلخص الطريقة فيما يلي:

١ - يغسل المجموع الجذري المصاب بالماء جيّداً، ثم يوضع في كأس زجاجية سعتها ١٥٠ مل. وإذا كان المجموع الجذري كبيراً فيمكن تقطيعه إلى أجزاء صغيرة بطول حوالي ١ - ٢ مم.

٢ - يتم ترويق الجذور قبل صبغها وذلك بإضافة ٥٠ مل من الماء وحجم مناسب من محلول الكلوروكس (5.25% NaOCl)، وتعتمد الكمية المضافة من الكلوروكس على عمر الجذور. وكقاعدة عامة يستخدم ١٠ مل من الكلوروكس للجذور الصغيرة العمر، و ٢٠ مل للمتوسطة العمر، و ٣٠ مل للكبيرة العمر أو الجذور الخشبية.

٣ - تترك الجذور في محلول الترويق مدة أربع دقائق مع الرج من وقت لآخر.

٤ - بعد ذلك تغسل الجذور مدة حوالي ٤٥ ثانية بواسطة ماء الصنبور الجاري.

٥ - تنقع الجذور في الماء مدة ١٥ دقيقة لإزالة بقايا الكلوروكس الذي يعمل على تثبيط عملية الصبغ بواسطة الفوكسين الحامضي.

٦ - تؤخذ الجذور وتجفف من الماء الزائد وتنقل إلى كأس زجاجية أخرى تحتوي على ٣٠ - ٥٠ مل ماء.

٧ - يضاف إلى الجذور بعد ذلك ١ مل من محلول صبغة الفوكسين الحامضي (يحضر محلول الصبغة بإذابة ٣,٥ جم من صبغة الفوكسين الحامضي في ٢٥٠ مل من حامض الخليك و ٧٥٠ مل من الماء المقطر).

٨ - تغلى محتويات الكأس من الجذور ومحلول الصبغة مدة ٣٠ دقيقة على سخان كهربائي hot plate .

٩ - تبرد المحتويات إلى درجة حرارة الغرفة ثم يتخلص من المحلول، وتغسل الجذور بماء الصنبور الجاري .

١٠ - تنقل الجذور إلى كأس تحتوي على ٢٠ - ٣٠ مل من الجليسر المضاف إليه نقط قليلة من حامض الهيدروكلوريك 5N HCl (جليسر حامضي).

١١ - تسخن الجذور في هذا المحلول وذلك لإزالة الصبغة من أنسجتها . ويتم التسخين عادة حتى الغليان أو حتى زوال الصبغة تماماً من أنسجة الجذور، حيث تبدو الأنسجة عديمة اللون بينما تحتفظ النيماتودا بلون الصبغة .

١٢ - بعد عملية إزالة الصبغة من أنسجة الجذور، تفحص الجذور مباشرة، أو تحفظ في الجليسر الحامضي إلى أن يتم فحصها .

ولفحص النيماتودا داخل أنسجة الجذور، توزع الجذور مع قليل من الجليسر على لوح زجاجي مستطيل (حوالي ١٥ × ٨ سم)، ثم تغطى بلوح مائل مع الضغط الخفيف، ومن ثم تفحص تحت مجهر التشريح . ويمكن الاستعاضة عن اللوحين الزجاجيين بطبق بتري (زجاجي أو بلاستيكي) حيث توزع الجذور مع الجليسر داخل غطاء الطبقة، ثم تغطى مع الضغط الخفيف بقاع الطبقة الخارجي ثم تفحص .

ويلاحظ عند الفحص عدد وشكل الأطوار المختلفة، فالطور اليرقي الثاني ذو شكل مغزلي، والطوران اليرقيان الثالث والرابع ذوا شكل كيسي متفخ، بينما تتخذ الإناث شكلاً كمثرياً (شكل ٥٨)، كما تلاحظ كتل البيض، وكذلك يلاحظ مكان النيماتودا بالنسبة للعقد الجذرية، وعدد الإناث داخل كل عقدة. كما يمكن استخلاص النيماتودا من الجذور المصبوغة بواسطة طريقة الخلاط، إلا أنه يجب الحرص على عدم إزالة الصبغة من النيماتودا، أو تمزيقها أثناء عملية الاستخلاص بواسطة الخلاط.

هذا ويمكن صبغ كتل البيض egg masses على الجذور، لدراسة قدرة تكاثر نيماتودا تعقد الجذور على عوائلها، بواسطة صبغة فلوكسين ب Phloxine B. والواقع أن هذه الصبغة تصبغ بصورة أساسية كيس البيض الجيلاتيني وليس البيض، كما أنها لا تعطي معلومات عن عدد البيض المنتج على الجذور، وإنما فقط عدد أكياس (كتل) البيض على المجموع الجذري.

وتتلخص هذه الطريقة بنقع الجذور المصابة في المحلول المائي للصبغة (١٥، ١٠ جم من الصبغة / لتر من الماء) مدة ١٥ - ٢٠ دقيقة ثم غسلها بالماء لإزالة آثار الصبغة من على الجذور. تتلون كتل البيض باللون الأحمر الذي يسهل من عملية تعداد كتل البيض على الجذور المصابة. ويمكن بعد الانتهاء من تعداد كتل البيض استخدام الجذور مرة ثانية لصبغ النيماتودا داخل الجذور، بطريقة هيبوكلوريت الصوديوم والفوكسين الحامضي السابقة الذكر.

أما إذا كان الهدف هو صبغ البيض نفسه فيمكن استخلاص البيض بطريقة هيبوكلوريت الصوديوم، ثم صبغه بإضافة نقطتين من صبغة الفوكسين الحامضي إلى ٣٠ مل من معلق البيض المستخلص والتسخين حتى الغليان، ومن ثم تعداد البيض تحت مجهر التشريح.



## دراسة تأثير نيماتودا تعقد الجذور على مقاومة الطماطم للذبول الفيوزاريومي

## Influence of Root-Knot Nematodes on Resistance of

## Tomato to Fusarium Wilt

يهدف هذا التمرين (التجربة) إلى توضيح قدرة نيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne incognita* على «كسر» مقاومة الطماطم صنف Rutgers (أو أي صنف مقاوم) لمرض الذبول الذي يسببه فطر *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. كما تفيد هذه التجربة في تدريب الطلبة على عملية التلقيح بواسطة بيض النيماتودا وجراثيم الفطر.

وحيث إن هذه التجربة تستغرق وقتاً أطول من فترة الدرس العملي في الإعداد لها والقيام بها، لذلك يقترح أن يزود الطلاب بمعلق جاهز من لقاح بيض النيماتودا بتركيز ٢٠٠ بيضة / مل (المستخلص بطريقة هيبوكلوريت الصوديوم لمدة ثلاث دقائق فقط)، ومعلق آخر من جراثيم الفطر الكونيدية بتركيز ٢٠٠٠٠ جرثومة / مل (تستخلص الجراثيم من مزرعة الفطر النامية لمدة خمسة أيام على بيئة مرق البطاطس والدكستروز potato dextrose broth، وذلك بترشيح المعلق من خلال ورقة ترشيح وغسل الجراثيم من على ورقة الترشيح للحصول عليها). كذلك يزود الطلبة بشتلات الطماطم (صنف Rutgers) بعمر ٣ - ٤ أسابيع مزروعة في أصص (قصاري) صغيرة (بقطر ٥ سم)، وأصص pots نظيفة بقطر ١٥ سم، وتربة معقمة (خليط متساوٍ من الرمل الخشن وتربة رملية طميية).

وتتكون هذه التجربة من المعاملات التالية:

- ١ - شتلات بدون تلقيح (للمقارنة control).
- ٢ - التلقيح بالنيماتودا بمعدل ١٠٠٠ بيضة لكل شتلة.
- ٣ - التلقيح بالفطر بمعدل ١٠٠٠٠٠ جرثومة لكل شتلة.
- ٤ - التلقيح بالنيماتودا (كما في ٢ أعلاه)، ثم يلي ذلك - وبعد أسبوعين - التلقيح بالفطر (كما في ٣ أعلاه).

ولإجراء التجربة يمكن أن يقسم الطلبة إلى أربع مجموعات أو خمس، بحيث تقوم كل مجموعة بعمل مكرر واحد من كل من المعاملات السابقة.

وتتلخص الطريقة على النحو التالي:

١ - تعبأ الأصص (قطر ١٥ سم) إلى ما قبل حافاتها بخليط التربة المعقم، وتعلم الأصص في هذه المرحلة برقم المجموعة (رقم المكرر)، ورقم المعاملة، وتاريخ التلقيح بالنيماتودا والفطر.

٢ - تعمل حفرة صغيرة ومناسبة في وسط التربة وتنقل إليها الشتلات.

٣ - تلقح الشتلات في المعاملتين الثانية والرابعة بالنيماتودا، وذلك بإضافة ٥ مل من معلق بيض النيماتودا حول الجذور.

٤ - تردم التربة حول الجذور في جميع المعاملات، ثم تضاف كمية مناسبة من التربة المعقمة إلى الأصص للملئها.

٥ - تنقل جميع الشتلات إلى البيت المحمي (الصوبة الزجاجية) greenhouse (٢٥ - ٢٨ م) وتروى رية خفيفة، ويجب الاحتياط لمنع تلوث الأصص فيما بينها.

٦ - تتم رعاية الشتلات في البيت المحمي من حيث الري المنتظم، وتسمدة مرة أو مرتين بمحلول هوغلاند Hoagland's solution بمعدل ٥٠ - ١٠٠ مل لكل أصيص.

٧ - بعد أسبوعين تلقح الشتلات في المعاملتين الثالثة والرابعة بالفطر، وذلك بعمل خمسة ثقوب صغيرة holes في التربة بعمق ٤ - ٦ سم حول ساق الشتلة، ويضاف إلى كل ثقب ١ مل من معلق جراثيم الفطر.

٨ - بعد ذلك تملأ هذه الثقوب بخليط التربة المعقم وتعاد الشتلات إلى مكانها في البيت المحمي مع استمرار رعاية الشتلات.

### النتائج المتوقعة

بعد حوالي أسبوعين من التلقيح بالفطر يبدأ ظهور أعراض مرض الذبول على الشتلات الملقحة بالنيماتودا والفطر معاً (المعاملة الرابعة)، بينما لا تظهر أي أعراض ذبول على الشتلات الملقحة بالفطر فقط (المعاملة الثالثة)، وذلك يعود لفقد صفة المقاومة في الشتلات المعاملة بالنيماتودا والفطر معاً، بينما تحتفظ الشتلات الملقحة بالفطر فقط بصفة المقاومة للذبول. وتتمثل هذه الأعراض الأولية بتهدل أعناق الأوراق إلى الأسفل، الذي يبدأ من الأوراق السفلى.

وبعد أسبوع آخر تصبح الأعراض واضحة تماماً، وتتمثل باصفرار الأوراق ثم ذبولها وموتها. وعموماً تعتمد سرعة وظهور أعراض الذبول على عمر الشتلات عند التلقيح، وكثافة العدوى، ودرجة الحرارة، وكذلك مصدر المقاومة للذبول.

### دراسة مكافحة النيماتودا بالأصناف المقاومة

#### والمبيدات النيماتودية

#### Control of Nematodes by Resistant

#### Varieties and Nematicides

يهدف هذا التدريب (التجربة) إلى إكساب الطلبة الخبرة والمهارة في تقويم كفاءة كل من الأصناف المقاومة والمبيدات النيماتودية في مكافحة النيماتودا. كما تفيد هذه التجربة في تدريب الطلبة على التعامل مع المبيدات بحرص، وكيفية حساب الكميات اللازمة منها، هذا بالإضافة إلى تقدير تأثير إصابة النبات بالنيماتودا.

تستعمل في هذه التجربة شتلات الطماطم كعائل لنيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne javanica*، ويختار أحد أصناف الطماطم المقاومة مثل VFN-8, Atkinson