

## Morphology of Nematodes

### الشكل الخارجي للنيماتودا

في معظم نيماتودا النبات يكون الجسم مغزلي الشكل، حيث يكون عريض نسبيا في الوسط ويستدق عند المقدمة والمؤخرة باستثناء عدد قليل منها حيث يتحول جسمها إلى أشكال مختلفة كما في حالة إناث بعض الأنواع النيماتودية حيث تأخذ أشكال مختلفة (شكل 1) مثل:

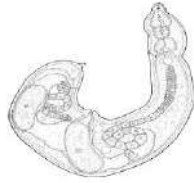
- ❖ الشكل الكمثري كما في نيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne spp*.
- ❖ الشكل الليموني كما في نيماتودا الحوصلات *Heterodera spp*.
- ❖ الشكل الكلوي كما في النيماتودا الكلوية *Rotyleuchulus reniformis* ونيماتودا الموالح *Tylenchulus semipenetrants* (مع امتداد منطقة العنق)
- ❖ الشكل الكروي أو المستدير كما في بعض أنواع النيماتودا الذهبية *Globodera spp*.
- ❖ الشكل المغزلي كما في نيماتودا الكاذب الجذور *Nacobhus spp*.

وهذه الأنواع المختلفة من الإناث تفقد قدرتها على الحركة وتبقى ساكنة داخل الجذور أو على سطوحها. أما النيماتودا المتطفلة على الحشرات فيكون شكل الجسم خيطي الشكل، أي أن عرض الجسم متساوي على طول محوره.



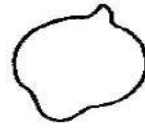
الشكل الكلوي  
نيماتودا الموالح

*Tylenchulus sp.*



الشكل الكلوي  
النيماتودا الكلوية

*Rotyleuchulus sp.*



الشكل الليموني  
نيماتودا الحوصلات

*Heterodera spp*



الشكل الكمثري  
نيماتودا تعقد الجذور

*Meloidogyne spp.*



الشكل المغزلي  
نيماتودا تعقد الجذور الكاذب

*Nacobbus spp.*



الشكل الكروي  
النيماتودا الذهبية

*Globodera spp.*



الشكل الكروي



الشكل الكلوي



الشكل الدودي



الشكل الكمثري



الشكل الكلوي

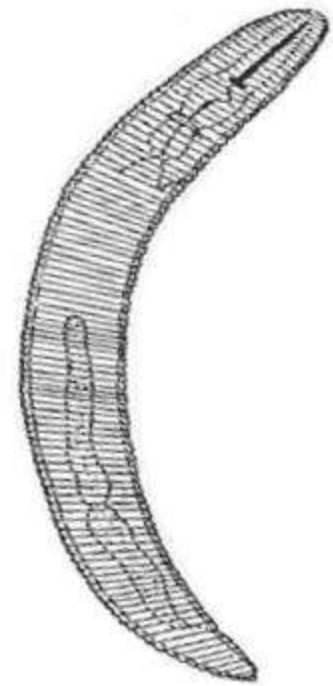
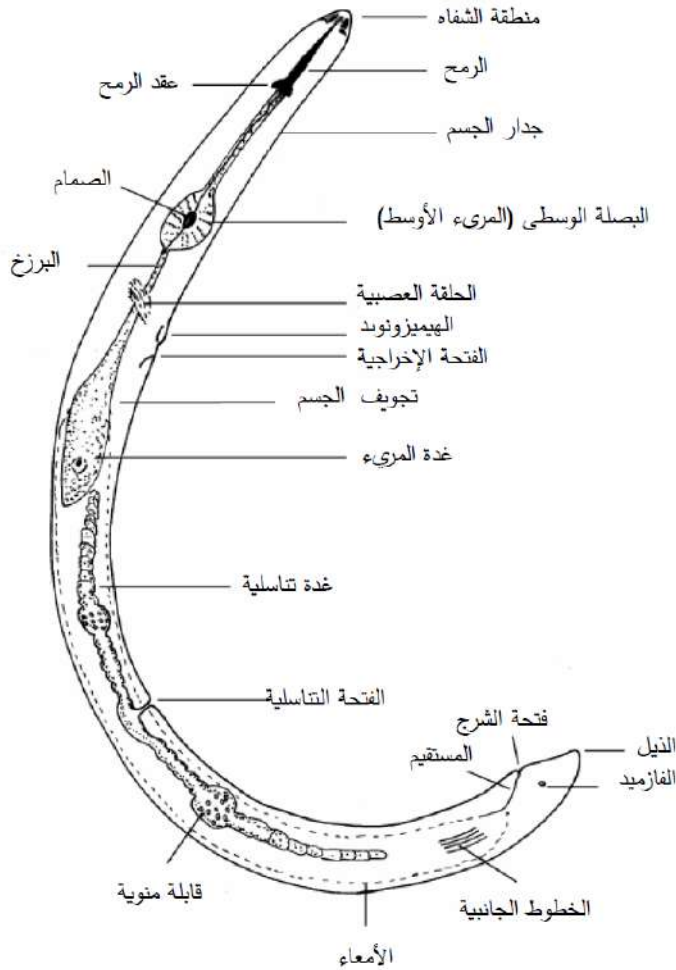
شكل (1)  
الاشكال  
المنفخة التي  
تتخذها اناث  
بعض اجناس  
النيماتودا.

ويختلف طول جسم الـنيماتودا حسب نوع الـنيماتودا. حيث يتراوح طول جسمها من 0.2 مم إلى عدة أمتار. بعض أنواع نيماتودا الحيوان يصل طولها إلى 7.5 متر، ويصل طول بعض أنواع الـنيماتودا البحرية إلى 5 سم وعرضها إلى 500 ميكرون. بينما نيماتودا النبات لا يزيد طولها عن خمسة مليمترات (5مم). وعرضها خمسة من مائة بالمائة مليمترات (0.05مم) وسمكها 15-35 ميكرون لذلك يصعب رؤيتها بالعين المجردة.

ويتميز جسم الـنيماتودا بأنه غير مقسم إلى حلقات، إلا أنه توجد بعض الأنواع القليلة جدا مثل الـنيماتودا الحلقيّة *Macroposthonia spp*. تبدو وكأن أجسامها مقسمة إلى حلقات. ولكن هذا التحلق لا يمتد إلى ما تحت طبقة الكيوتيكل في جدار الجسم (شكل 2).

وجسم الـنيماتودا شفاف عديم اللون في معظم الـنيماتودا الصغيرة. لكن في بعض الأنواع يتخذ الكيوتيكل لون أبيض أو أصفر إلى حد ما. لكن في بعض الأنواع الأخرى يتخذ لونا خفيفا يعكس محتويات الغذاء في أمعائها.

ويمكن تمييز جسم الـنيماتودا (شكل 3) طوليا إلى سطح بطني، يوجد عليه جميع الفتحات الطبيعية (الفتحة الإخراجية، الفتحة التناسلية والفتحة الشرجية في حالة الإناث، وفتحة المجمع في حالة الذكور). وسطح ظهري في الجهة العلوية.



شكل (2): الـنيماتودا الحلقيّة

شكل (3): الشكل الخارجي والتركيب الداخلي العام لنيماتودا النبات.

## التغذية والتطفل في الـنيماتودا المتطفلة على النبات

### Parasitism and Feeding in Plant-parasitic Nematodes

جميع الـنيماتودا المتطفلة على النباتات هي طفيليات إجبارية، لا تستطيع العيش والتكاثر ما لم تحصل على غذائها من عوائلها النباتية الحية. وتختلف أنواع الـنيماتودا المتطفلة على النبات في طبيعة تطفلها وأماكن وجودها بأنسجة عوائلها ومدى الأضرار التي تسببها لها. وعلى ذلك يمكن تقسيم الـنيماتودا حسب طريقة تغذيتها وتطفلها على النبات إلى المجاميع التالية:

#### أولاً- طفيليات على الأجزاء النباتية تحت سطح التربة Parasites of Below- Ground Plants Parts

تشمل الأنواع المتطفلة على الجذور والدرنات والسوق الأرضية الأخرى. وتقسم هذه المجموعة من حيث طبيعة تطفلها وتغذيتها على الجذور إلى الأقسام التالية:

#### 1- طفيليات داخلية Root endoparasites

تدخل الـنيماتودا الجذور النباتية بعد اختراقها وتتغذى على أنسجتها من الداخل وقد تكون ساكنة أو متجولة داخل الجذور. وتقسم إلى:

#### أ- ساكنة Sedentary

تخترق الـنيماتودا جذور العائل، وتستقر ، ثم تبدأ في التغذية وجميع جسمها داخل الجذر، حيث لا تتحرك طيلة فترة حياتها باستثناء نيماتودا الحوصلات وشبه الحوصلات فهي نيماتودا شبة داخلية خلال تطورها حيث يبرز جزء من جسمها خارج أنسجة الجذر. وتتميز الإناث بأن أجسامها منتفخة وتظل الذكور أسطوانية الشكل. ومنها الأجناس التالية:

• نيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne spp*

• نيماتودا تعقد الجذور الكاذب *Nacobbus*

• نيماتودا شبة الحوصلات *Meloidodera*

#### ب- متجولة Migratory

تخترق الـنيماتودا جذور العائل لكنها تظل متحركة (متنقلة) داخل الجذر طيلة فترة حياتها، وأحيانا تخرج إلى التربة ثم تعود إلى الجذور، وتحتفظ الإناث بشكلها الدودي الأسطواني، وتسبب هذه الـنيماتودا تقرحات شديدة في أنسجة النبات. ويمثل هذه المجموعة الـنيماتودا التالية:

• نيماتودا التقرح *Prapylenchus*

• النيماتودا الحفارة *Radopholus similis*

• نيماتودا الأرز *Hirschmanniella*

• بعض أنواع نيماتودا السوق والأبصال *Ditylenchus*

## 2- طفيليات شبة (نصف) داخلية Root semi-endoparasites

تدخل النيماتودا مقدمة جسمها أو النصف الأمامي من جسمها داخل الجذر وقد تكون ساكنة أو متجولة أثناء التغذية على الجذور. وتقسم إلى:

### أ- ساكنة Sedentary

تتميز نيماتودا هذه المجموعة بأن الإناث الناضجة تكون كروية أو كلوية الشكل، بينما تكون الذكور صغيرة الحجم وتقل قدرتها على التغذية. ويمثل هذه المجموعة النيماتودا التالية:

• نيماتودا الموالح *Tylenchulus Semipenetrans*

• النيماتودا الكلوية *Ropylenchulus*

• نيماتودا الحوصلات *Heterodera* و *Globodera*

### ب- متجولة Migratory

تتميز نيماتودا هذه المجموعة بأن جميع الأطوار اليرقية والذكور والإناث أطوارا متحركة نشيطة، تتغذى عادة وجزء من مقدمة الجسم مدفون في الجذر. ويمثل هذه المجموعة النيماتودا التالية:

• نيماتودا التقزم *Tylenchorhynchus*

• النيماتودا الرمحية *Hoplolainus*

• مجموعة النيماتودا الحلزونية *Rotylenchus* و *Helicotylenchus* و *Scutellonema*

## 3- طفيليات خارجية Root ectoparasites

تتغذى النيماتودا على الجذور من الخارج دون اختراقها. وتتميز بوجود رمح طويل جدا الذي يمتص العصارة من الجذور وقد تكون ساكنة أو متجولة أثناء التغذية على الجذور. وتقسم إلى:

### أ- ساكنة Sedentary

تعتبر نيماتودا هذه المجموعة ساكنة في تغذيتها إلى حد ما حيث أن الرمح الطويل هو الذي يخترق جذور العائل. ويمثل هذه المجموعة كل من:

• النيماتودا الدبوسية *Parapylenchus*

• النيماتودا الحلقية *Macroposthuonia*

• النيماتودا الغمدية *Hennicycliophora*

• النيماتودا *Criconema*

• النيماتودا *Hemicriconemoides*

### ب- متجولة *Migratory*

تتحرك نيماتودا هذه المجموعة باستمرار، وتتغذى على الجذور بحرية كاملة، ويمثل هذه المجموعة كل من:

• النيماتودا الخنجرية *Xiphineina*

• نيماتودا تقصف الجذور *Trichodoris*

• النيماتودا الإبرية *Longidorus*

• النيماتودا الواخزة *Belonolainus*

• النيماتودا المخرازية *Dolichodorus*

### ثانيا- طفيليات على الأجزاء النباتية فوق سطح التربة Parasites of Above- Ground Plants Parts

تقضي هذه النيماتودا جزءا من حياتها في التربة في بقايا أجزاء العائل المصاب. وعند توفر الظروف البيئية الملائمة والعائل المناسب، فإنها تتسلق وتهاجم البادرات الصغيرة النامية ثم تصيب الأجزاء المختلفة من النبات فوق سطح التربة كالسوق والأوراق والبراعم والأزهار حيث تكمل دورة حياتها وتتكاثر. وتضم هذه المجموعة النيماتودا التالية:

❖ نيماتودا السوق والأبصال *Ditylenchus dipsaci*

❖ نيماتودا تتألل حبوب القمح *Anguina tritici*

❖ نيماتودا البراعم والأوراق *Aphelenchoides*

❖ نيماتودا نخيل جوز الهند *Rhadinophelenchus cocophilus* تسبب مرض الحلقة الحمراء في نخيل جوز الهند.

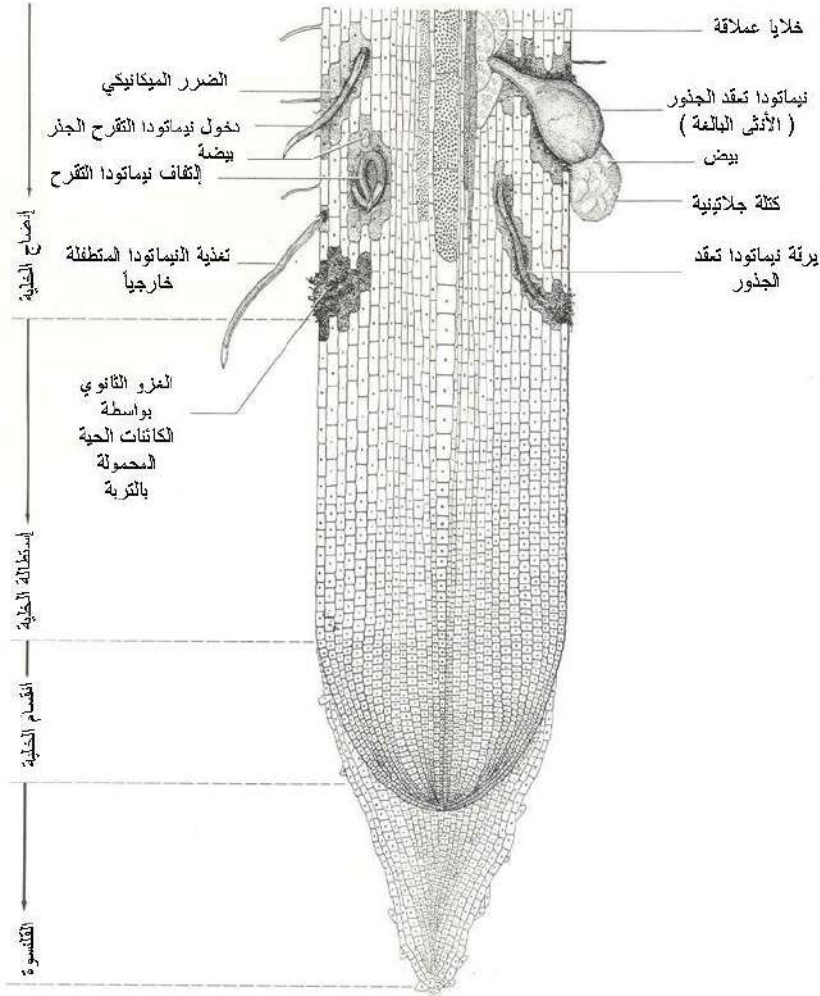
وتتغذى نيماتودا هذه المجموعة كطفيليات داخلية متجولة، باستثناء بعض أنواع نيماتودا السوق والأبصال و نيماتودا تتألل حبوب القمح يمكن أن تتطفل خارجيا.

والحقيقة أن طبيعة العلاقة التطفيلية بين النيماتودا والعائل النباتي تعتمد على نوع النيماتودا، وعلى عائلها النباتي وأحيانا على طور النيماتودا فمثلا بعض أنواع النيماتودا الحلزونية *Helicotylenchus spp.* يمكن أن تكون طبيعة تطفلها خارجية أو داخلية أو شبه داخلية حسب النوع والعائل المصاب.

ويمكن تلخيص ميكانيكية التغذية في النيماتودا المتطفلة على النبات في النقاط التالية:

- 1- استكشاف موقع التغذية بتحريك النيماتودا حول منطقة التغذية بواسطة الشفاه المزودة بعدد من أعضاء الحس.
- 2- إحداث ثقب في جدار الخلية بواسطة رمحها.
- 3- حقن العصارات الهاضمة التي تفرزها غدة المريء الظهرية وبمساعدة المريء إلى داخل الخلية النباتية.
- 4- امتصاص الغذاء (محتويات الخلية النباتية) عبر تجويف الرمح وبمساعدة المريء.
- 5- سحب الرمح ليعود إلى مكانة داخل الجسم وفصل شفاهها من على مكان التغذية ثم الانتقال إلى موقع تغذية آخر.

تختلف فترة التغذية كثيرة في الموقع الواحد باختلاف النيماتودا، فقد تستغرق أقل من دقيقة إلى عدة أيام، كما تختلف التأثيرات التي تحدثها طبيعة التغذية في الخلايا من تأثير بسيط جداً إلى تغيرات فسيولوجية وتشريحية كبيرة.



شكل يبين أماكن تغذية وتطفل بعض أنواع النيماتودا المتطفلة على جذر النبات.

## أعراض الإصابة بالنيMATودا

تعرف الأعراض بأنها انعكاسات المرض على النبات نتيجة الإصابة بمسبب مرضي ما ، وتعتبر النيMATودا إحدى المسببات الممرضة للنبات . وتشمل الأعراض الظاهرية ما يمكن مشاهدتها ظاهرة للعين على المجموع الجذري أو الخضري أو الثمري للنبات . ويتم التأكد فيما بعد من أن المسبب لهذه الأعراض المرضية هو النيMATودا عند وجود أي طور من أطوار نمو النيMATودا في الجزء المصاب من النبات ، أو في منطقة التربة المحيطة بالجذور .

تقسم الأعراض المرضية المتسببة عن النيMATودا إلى أعراض فوق سطح التربة أو أعراض تحت سطح التربة .

### أولا : الأعراض على أجزاء النبات فوق سطح التربة

تنتج أعراض الإصابة على الأجزاء الهوائية للنبات ، نتيجة إصابة الجذور تحت سطح التربة أو التربة نتيجة إصابة الأجزاء الهوائية للنبات بالنيMATودا .

#### 1- الأعراض الناتجة عن إصابة الجذور :

عند إصابة النبات بالنيMATودا المتطفلة على الجذور تظهر نتيجة لذلك أعراض على الأجزاء النباتية فوق سطح التربة و تتمثل بعرقلة في نمو النبات وهذه مشابهة لتلك الناجمة عن نقص في العناصر الغذائية أو نقص رطوبة التربة أو نقص في التسميد أو زيادة ملوحة التربة أو ارتفاع مستوى الماء الأرضي وغير ذلك من العوامل غير المناسبة ، وعادة تظهر الإصابة على شكل بقع متناثرة في الحقل بحيث تبدي النباتات المصابة الأعراض التالية:-

- ❖ ضعف عام في نمو المجموع الخضري فتبدو النباتات صغيرة الحجم ومتقرمة .
- ❖ اصفرار الأوراق وشحوب لونها .
- ❖ ذبول النبات وخاصة في الأوقات الحارة خلال النهار .
- ❖ انخفاض في الإنتاج وسوء في النوعية .

#### 2- الأعراض الناتجة عن إصابة المجموع الخضري :

تبدو هذه الأعراض متخصصة وتعود لتطفل أنواع متخصصة من النيMATودا على الأجزاء المختلفة للمجموع الخضري ومن هذه الأعراض

#### • تبقع الأوراق والموت الموضعي :

تظهر الأعراض على شكل بثرات صغيرة الحجم أو قد تكون كبيرة نوعا ما ويتغير لون هذه البقع في النهاية إلى اللون البني المسود ويكون محددا بعروق الورقة ، تبدو هذه الأعراض واضحة نتيجة إصابة نبات الأبقوان والكرائز نثيميم بنيMATودا البراعم والأوراق *Aphelenchoides ritzemabosi*



• **تكون عقد ورقية :**

تسبب بعض أنواع النيماتودا مثل *Anguina millefolii* عقدا على أوراق النباتات المصابة ، وبخاصة النجيليات حيث يصل حجم هذه العقد إلى بضعة مليمترات ، تكون في البداية ذات لون ارجواني ثم تتحول إلى بنفسجي مسود مع تشكل تجاعيد على السطح الخارجي للورقة و يلاحظ ضمن هذه العقد الأطوار المختلفة للنيماتودا



• **التفاف الأوراق وتجدها :**

تسبب نيماتودا ثاليل حبوب القمح *Anguina tritici* خلال أطوارها التفاف الأوراق وتجدها خلال تطفلها على نباتات القمح والشعير ، حيث يمكن عزل هذه الأطوار أثناء طور النمو اللبني للنبات





### • انتفاخ الساق وتشوّهه :



تسبب نيماتودا الساق والأبصال *Ditylencus dipsaci* على الفول والبصل تشوهات مختلفة تظهر على شكل تورمات في قاعدة الساق ، بالإضافة إلى تجعد الأوراق والتفاف الساق كما تقصر السلاميات ويتقزم النبات



### تكون عقد بذرية (تأليل) :

تسبب الإصابة بنيماتودا تأليل حبوب القمح *Anguina tritici* تكون عقد بذرية (تأليل) مكان الحبوب الطبيعية في السنابل ، وتتميز هذه العقد بلونها الداكن وبصلابتها وشكلها المجعد وتكون صغيرة الحجم .



## ثانيا : الأعراض على أجزاء النبات تحت سطح التربة

هي الأعراض التي تظهر على الجذور نتيجة لإصابة الجذور بأنواع النيماتودا المختلفة ، وهذه الأعراض غير متخصصة إذ يمكن أن يسبب أكثر من نوع من النيماتودا نفس الأعراض أو يمكن لهذه الأعراض أن تنتسب عن طفيليات الجذور الأخرى ومن هذه الأعراض :

### تكون العقد الجذرية

تتكون أشكال مختلفة من العقد على المجموع الجذري نتيجة الإصابة بأنواع مختلفة من النيماتودا التابعة للجنس *Meloidogyne* ويختلف شكل وحجم وموقع هذه العقد على الجذور باختلاف نوع النيماتودا وان سبب تكون العقد على الجذر تحدث نتيجة لزيادة في سرعة انقسام الخلايا وأعدادها (*Hyperplasia*) وكذلك في حجم الخلايا (*Hypertrophy*) في طبقة الأنسجة المحيطة (*Pericycle*) والبشرة الداخلية (*Endodermis*) والقشرة (*Cortex*) وتتميز العقد الناشئة عن الإصابة بنيماتودا تعقد الجذور عن العقد البكتيرية المثبتة للنيتروجين بان العقد المثبتة للنيتروجين تكون جانبية ومن السهل فصلها وعادة تكون صغيرة الحجم وتأخذ اللون الفاتح الأبيض أو الوردي أو الليموني في حين أن العقد المتسببة عن النيماتودا ناتجة من انتفاخ أنسجة الجذر وتكون خشنة الملمس ولا يمكن عزلها لأنها جزء من الجذر .



### تقرح الجذور

التقرح هو عبارة عن موت موضعي للنسيج النباتي المصاب ويظهر على شكل بقع ميتة محددة بوضوح في أنسجة الجذر وتتكون التقرحات عادة في طبقتي القشرة الداخلية والخارجية للجذور المصابة كما يمكن أن تتكون في طبقات القشرة المختلفة و تتكون التقرحات نتيجة للإصابة بنيماتودا *Pratylenchus spp.* والنيماتودا الحفارة *Rhizopholus similis* تكون الإصابة في البداية بشكل بقع صغيرة تكبر في الحجم مع تقدم الإصابة وتشارك أحياء التربة الأخرى كالبكتريا والفطريات في تحلل النسيج المصاب مما يؤدي إلى تلون كامل للجذر بلون بني داكن أو أسود وقد تؤدي في النهاية إلى موت النبات.



### تعفن الجذور

تظهر هذه الأعراض عند بعض النباتات الجذرية والأبصال حيث تسبب بعض أنواع النيماتودا بالمشاركة مع الفطريات والمسببات المرضية الأخرى تحطم أنسجة النبات مثل تعفن درنات البطاطا نتيجة الإصابة بنيماتودا الساق والأبصال *Ditylenchus destructor* كما يمكن أن تتحول التقرحات المتسببة عن نيماتودا التقرح *Pratylenchus similis* إلى تعفن الجذور.



## تقصف الجذور

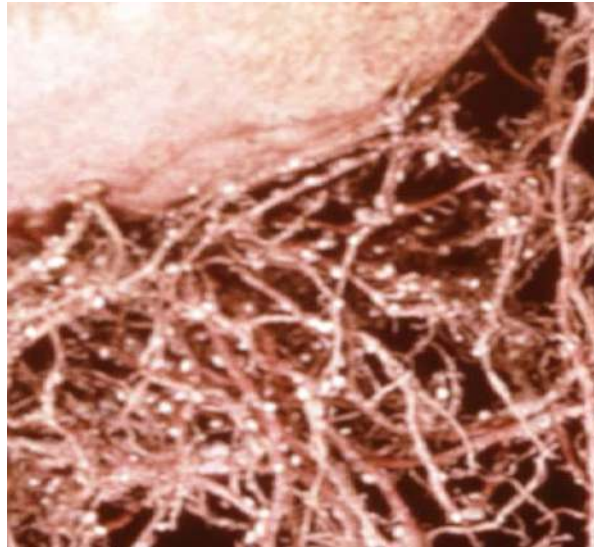
12

تسبب أنواع النيماتودا *Paratrichodorus spp* و *Trichodorus spp* و *Longidorus spp* عرقلة في نمو الجذور أو توقفها نهائيا وذلك نتيجة التأثير في القمة النامية حيث تتوقف الجذور الجانبية عن النمو وبالتالي يؤدي إلى تقزم الجذور وتكون جذور جانبية جديدة تصاب من جديد.



## الإفراط في تشعب الجذور

تسبب النيماتودا الحوصلية عادة تهيج في نمو الجذور وخاصة في النباتات الفتية وتتكون بذلك جذور ثانوية قوية تشبه الجذر الرئيسي بحيث يلاحظ على النبات أكثر من جذر رئيسي واحد وتأخذ الجذور الشكل الشبكي وتلاحظ الإناث الناضجة والحوصلات على الجذور.



وبشكل عام وللتحقق والتأكد من أن هذه الأعراض ناتجة عن الإصابة بالنيماتودا يجب أخذ العينات من التربة والنبات وإيجاد الطريقة المناسبة لاستخلاص النيماتودا ثم تشخيصها.

## ثانيا : الأعراض على أجزاء النبات تحت سطح التربة

هي الأعراض التي تظهر على الجذور نتيجة لإصابة الجذور بأنواع النيماتودا المختلفة ، وهذه الأعراض غير متخصصة إذ يمكن أن يسبب أكثر من نوع من النيماتودا نفس الأعراض أو يمكن لهذه الأعراض أن تتسبب عن طفيليات الجذور الأخرى ومن هذه الأعراض :

### تكون العقد الجذرية

تتكون أشكال مختلفة من العقد على المجموع الجذري نتيجة الإصابة بأنواع مختلفة من النيماتودا التابعة للجنس *Meloidogyne* ويختلف شكل وحجم وموقع هذه العقد على الجذور باختلاف نوع النيماتودا وان سبب تكون العقد على الجذر تحدث نتيجة لزيادة في سرعة انقسام الخلايا وأعدادها (*Hyperplasia*) وكذلك في حجم الخلايا (*Hypertrophy*) في طبقة الأنسجة المحيطة (*Pericycle*) والبشرة الداخلية (*Endodermis*) والقشرة (*Cortex*) وتتميز العقد الناشئة عن الإصابة بنيماتودا تعقد الجذور عن العقد البكتيرية المثبتة للنيتروجين بان العقد المثبتة للنيتروجين تكون جانبية ومن السهل فصلها وعادة تكون صغيرة الحجم وتأخذ اللون الفاتح الأبيض أو الوردي أو الليموني في حين أن العقد المتسببة عن النيماتودا ناتجة من انتفاخ أنسجة الجذر وتكون خشنة الملمس ولا يمكن عزلها لأنها جزء من الجذر .



### تقرح الجذور

التقرح هو عبارة عن موت موضعي للنسيج النباتي المصاب ويظهر على شكل بقع ميتة محددة بوضوح في أنسجة الجذر وتتكون التقرحات عادة في طبقتي القشرة الداخلية والخارجية للجذور المصابة كما يمكن أن تتكون في طبقات القشرة المختلفة و تتكون التقرحات نتيجة للإصابة بنيماتودا *Pratylenchus spp.* والنيماتودا الحفارة *Rhizopholus similis* تكون الإصابة في البداية بشكل بقع صغيرة تكبر في الحجم مع تقدم الإصابة وتشارك أحياء التربة الأخرى كالبكتيريا والفطريات في تحلل النسيج المصاب مما يؤدي إلى تلون كامل للجذر بلون بني داكن أو أسود وقد تؤدي في النهاية إلى موت النبات.



### تعفن الجذور

تظهر هذه الأعراض عند بعض النباتات الجذرية والأبصال حيث تسبب بعض أنواع النيماتودا بالمشاركة مع الفطريات والمسببات المرضية الأخرى تحطم أنسجة النبات مثل تعفن درنات البطاطا نتيجة الإصابة بنيماتودا الساق والأبصال *Ditylenchus destructor* كما يمكن أن تتحول التقرحات المتسببة عن نيماتودا التقرح *Pratylenchus similis* إلى تعفن الجذور.



## تقصف الجذور

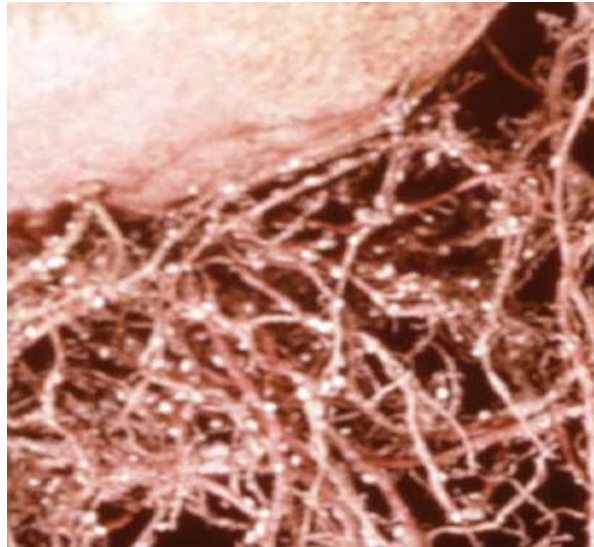
12

تسبب أنواع النيماتودا *Paratrichodorus spp* و *Trichodorus spp* و *Longidorus spp* عرقلة في نمو الجذور أو توقفها نهائيا وذلك نتيجة التأثير في القمة النامية حيث تتوقف الجذور الجانبية عن النمو وبالتالي يؤدي إلى تقزم الجذور وتكون جذور جانبية جديدة تصاب من جديد.



## الإفراط في تشعب الجذور

تسبب النيماتودا الحوصلية عادة تهيج في نمو الجذور وخاصة في النباتات الفتية وتتكون بذلك جذور ثانوية قوية تشبه الجذر الرئيسي بحيث يلاحظ على النبات أكثر من جذر رئيسي واحد وتأخذ الجذور الشكل الشبكي وتلاحظ الإناث الناضجة والحوصلات على الجذور.



وبشكل عام وللتحقق والتأكد من أن هذه الأعراض ناتجة عن الإصابة بالنيماتودا يجب أخذ العينات من التربة والنبات وإيجاد الطريقة المناسبة لاستخلاص النيماتودا ثم تشخيصها.



## أعراض الإصابة بالنيMATودا

تعرف الأعراض بأنها انعكاسات المرض على النبات نتيجة الإصابة بمسبب مرضي ما ، وتعتبر النيMATودا إحدى المسببات الممرضة للنبات . وتشمل الأعراض الظاهرية ما يمكن مشاهدتها ظاهرة للعين على المجموع الجذري أو الخضري أو الثمري للنبات . ويتم التأكد فيما بعد من أن المسبب لهذه الأعراض المرضية هو النيMATودا عند وجود أي طور من أطوار نمو النيMATودا في الجزء المصاب من النبات ، أو في منطقة التربة المحيطة بالجذور .

تقسم الأعراض المرضية المتسببة عن النيMATودا إلى أعراض فوق سطح التربة أو أعراض تحت سطح التربة .

### أولا : الأعراض على أجزاء النبات فوق سطح التربة

تنتج أعراض الإصابة على الأجزاء الهوائية للنبات ، نتيجة إصابة الجذور تحت سطح التربة أو التربة نتيجة إصابة الأجزاء الهوائية للنبات بالنيMATودا .

#### 1- الأعراض الناتجة عن إصابة الجذور :

عند إصابة النبات بالنيMATودا المتطفلة على الجذور تظهر نتيجة لذلك أعراض على الأجزاء النباتية فوق سطح التربة و تتمثل بعرقلة في نمو النبات وهذه مشابهة لتلك الناجمة عن نقص في العناصر الغذائية أو نقص رطوبة التربة أو نقص في التسميد أو زيادة ملوحة التربة أو ارتفاع مستوى الماء الأرضي وغير ذلك من العوامل غير المناسبة ، وعادة تظهر الإصابة على شكل بقع متناثرة في الحقل بحيث تبدي النباتات المصابة الأعراض التالية:-

- ❖ ضعف عام في نمو المجموع الخضري فتبدو النباتات صغيرة الحجم ومتقرمة .
- ❖ اصفرار الأوراق وشحوب لونها .
- ❖ ذبول النبات وخاصة في الأوقات الحارة خلال النهار .
- ❖ انخفاض في الإنتاج وسوء في النوعية .

#### 2- الأعراض الناتجة عن إصابة المجموع الخضري :

تبدو هذه الأعراض متخصصة وتعود لتطفل أنواع متخصصة من النيMATودا على الأجزاء المختلفة للمجموع الخضري ومن هذه الأعراض

#### • تبقع الأوراق والموت الموضعي :

تظهر الأعراض على شكل بثرات صغيرة الحجم أو قد تكون كبيرة نوعا ما ويتغير لون هذه البقع في النهاية إلى اللون البني المسود ويكون محددا بعروق الورقة ، تبدو هذه الأعراض واضحة نتيجة إصابة نبات الأبقوان والكرائز نثيميم بنيMATودا البراعم والأوراق *Aphelenchoides ritzemabosi*





• **تكون عقد ورقية :**

تسبب بعض أنواع الديدان مثل *Anguina millefolii* عقدا على أوراق النباتات المصابة ، وبخاصة النجيليات حيث يصل حجم هذه العقد إلى بضعة ملليمترات ، تكون في البداية ذات لون ارجواني ثم تتحول إلى بنفسجي مسود مع تشكل تجاعيد على السطح الخارجي للورقة و يلاحظ ضمن هذه العقد الأطوار المختلفة للديدان



• **التفاف الأوراق وتجدها :**

تسبب ديدان ثاليل حبوب القمح *Anguina tritici* خلال أطوارها التفاف الأوراق وتجدها خلال تطفلها على نباتات القمح والشعير ، حيث يمكن عزل هذه الأطوار أثناء طور النمو اللبني للنبات



### • انتفاخ الساق وتشوّهه :



تسبب نيماتودا الساق والأبصال *Ditylencus dipsaci* على الفول والبصل تشوهات مختلفة تظهر على شكل تورمات في قاعدة الساق ، بالإضافة إلى تجعد الأوراق والتفاف الساق كما تقصر السلاميات ويتقزم النبات

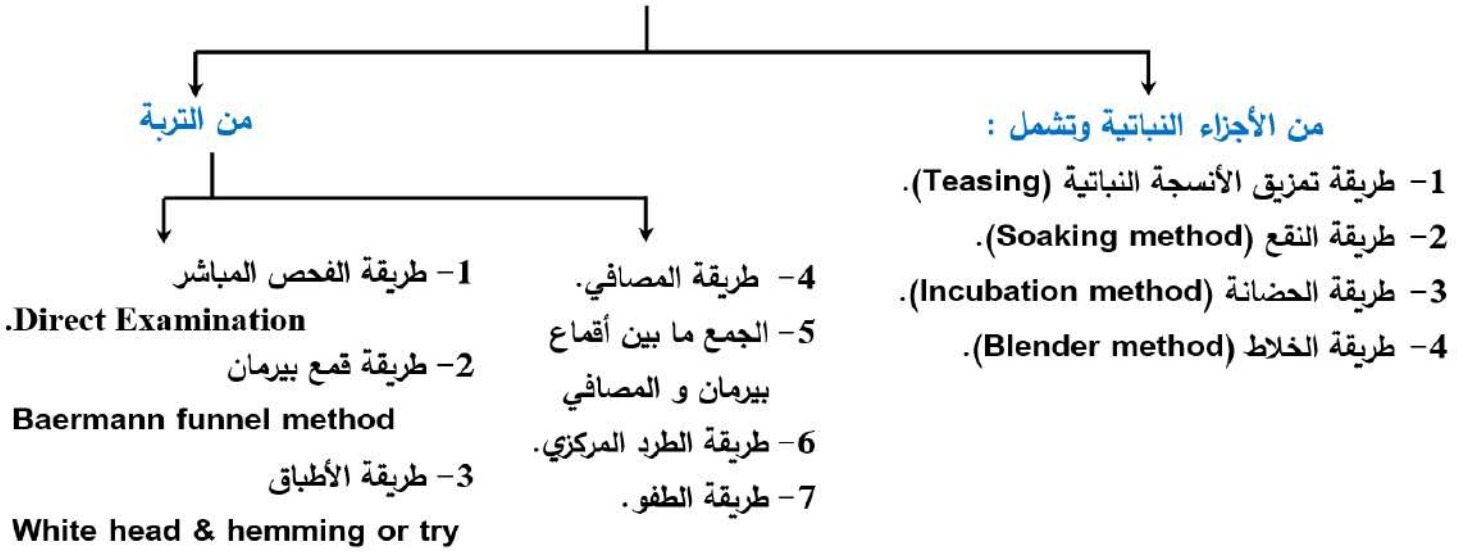


### تكون عقد بذرية (تأليل) :

تسبب الإصابة بنيماتودا تأليل حبوب القمح *Anguina tritici* تكون عقد بذرية (تأليل) مكان الحبوب الطبيعية في السنابل ، وتتميز هذه العقد بلونها الداكن وبصلابتها وشكلها المجعد وتكون صغيرة الحجم .



## استخلاص النيماتودا



## طرق استخلاص النيماتودا

## أولاً : طرق استخلاص النيماتودا من التربة

تتوقف الطريقة التي تتبع في استخلاص النيماتودا من التربة على نوع العينة وكذلك حجم العينة وفيما يلي أهم الطرق المستخدمة في استخلاص النيماتودا من التربة.

## 1- طريقة الفحص المباشر Direct Examination:

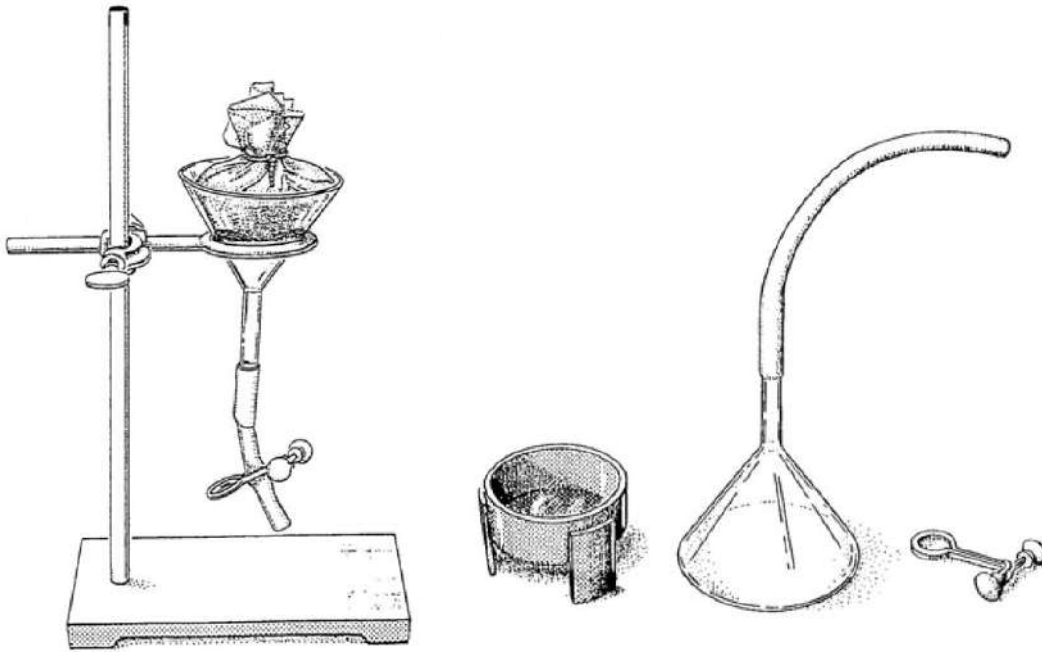
توضع عينة التربة في طبق بتري قطر (5-9 سم) مع قليل من الماء ويجرى الفحص المجهرى بواسطة مجهر التشريح Stereomicroscope ثم تلتقط النيماتودا بإبرة دقيقة وتنقل إلى زجاجة ساعة بها قليل من الماء المقطر إذا كانت هناك رغبة في الحصول على النماذج الحية أو قليل من محلول القتل والتثبيت في حالة استخدامها لعمل تحضيرات مجهرية.

## 2- طريقة قمع برمان Baermann funnel:

ويتركب هذا الجهاز من قمع زجاجي قطره (10 سم) تقريباً ومثبت على حامل من الحديد أو الخشب ويركب بساق القمع الزجاجي أنبوبة من المطاط يتراوح طولها بين 6-8 سم ويثبت في نهاية الأنبوبة مشبك معدني يوضع فوق هذه المصفاة قطعة من قماش الموسلين (الشاش) أو المناديل الورقية الخفيفة. يقفل المشبك المثبت في نهاية الأنبوبة ثم يملأ القمع الزجاجي بماء مقطر درجة حرارته (40°م) بحيث يعلو فوق مستوى ساق القمع بقليل تتقع عينة التربة في كأس زجاجي (250 سم) في قليل من الماء ثم تنقل نقلاً كميّاً إلى القمع

فوق قطعة القماش ثم تزود بالماء إلى أن يصل مستواه إلى حوالي (1 سم) فوق المصفاة يترك الجهاز في مكان دافئ لمدة (24 ساعة) تستقبل بعدها محتويات ساق القمع الزجاجي في زجاجة ساعة نظيفة وتفحص تحت المجهر.

والنظرية التي بنيت عليها هذه الطريقة هي تهيئة الظروف البيئية المناسبة لنشاط وحركة النيماتودا وتجميعها في الجزء السفلي من الأنبوبة نتيجة لوزنها النوعي الذي يزيد قليلاً عن الوزن النوعي للماء كما أن هذه الطريقة تقيد في فصل النيماتودا الحية عن النيماتودا الميتة.



### 3- طريقة White head & Hemming:

وتسمى أيضاً بطريقة (try) أو طريقة الأطباق، وفي هذه الطريقة يتم استخدام مناخل ذات معدن لا يصدأ وحن الجمع أكبر بقليل من المنخل يتم وضع قطعة من المناديل الورقية أو ورق الترشيح الخاص فوق المنخل ثم توضع عينة التربة فوقها بحيث لا تتجاوز (300 غم) ثم يوضع المنخل فوق صحن الجمع بعد ذلك يتم إضافة الماء ما بين صحن الجمع والمنخل وبحذر تام إلى أن تتربط التربة ثم تترك لمدة (24-48 ساعة) بعد ذلك يرفع المنخل ويفحص الماء الموجود في صحن الجمع.



#### 4- طريقة المصافي Sieves:

الغرض من هذه الطريقة هو فصل النيماتودا من التربة مع أقل قدر ممكن من حبيبات التربة وبقايا النباتات والمواد العضوية ويستعمل لذلك عدد من المصافي تختلف عن بعضها في عدد الثقوب الموجودة في البوصة الطولية والتي تسمى بـ "المش" وتتكون مجموعة المصافي عادة كما يلي:

**المصفاة الأولى:** عدد ثقوبها (25 مش) في البوصة الطولية وتعمل على فصل الحصى والأجزاء النباتية الكبيرة.

**المصفاة الثانية:** عدد ثقوبها (50 مش) في البوصة الطولية وتعمل على فصل إناث كل من نيماتودا العقد الجذرية ونيماتودا الحوصلات.

**المصفاة الثالثة:** عدد ثقوبها (200 مش) في البوصة الطولية وتعمل على فصل أنواع النيماتودا الدودية الشكل والتي تمثل عادة أغلب أنواع النيماتودا.

**المصفاة الرابعة:** عدد ثقوبها (325 مش) في البوصة الطولية وتعمل على فصل أنواع النيماتودا الصغيرة الحجم وكذلك اليرقات.

وتتلخص طريقة فصل النيماتودا بواسطة المصافي كالاتي:

- يؤخذ حجم معين من التربة بعد تمام خلطها وهذا الحجم يتراوح بين (100-250 غم) توضع العينة في طبق وتخلط مع كمية من الماء بحيث يتكون منها معلق متجانس ثم يسكب هذا المعلق فوق مجموعة المصافي الموضوعة بعضها فوق البعض في ترتيب متسلسل بحيث تكون المصفاة ذات الثقوب الأوسع على قمة المجموعة.
- يضاف إلى طبق الغسيل كمية أخرى من الماء وتقلب التربة ثم تنقل إلى مجموعة المصافي وتكرر هذه العملية عدة مرات حتى يتم نقل معظم التربة.

- ترفع المصفاة الأولى وتغسل محتوياتها جيداً بواسطة تيار قوي من الماء ويستخدم عادة دش غسيل لهذا الغرض ويجمع ماء الغسيل في وعاء آخر.
- ينقل ماء الغسيل الناتج في الخطوة السابقة إلى مجموعة المصافي.
- تكرر عملية الغسيل بالنسبة للمصفاة الثانية والثالثة بالطريقة نفسها.
- تجمع محتويات كل مصفاة على حدى في إحدى جوانبها وتنتقل نقلاً كميّاً باستخدام تيار خفيف من الماء إلى دورق غسيل أو كاس نظيف.
- يرمز لكل كأس برمز معين يكتب عليه رقم العينة ورقم المصفاة.



### 5- طريقة الجمع ما بين أقماع برمان والمصافي

- تفيد هذه الطريقة في تنقية معلق النيماتودا من بقايا التربة والمواد العضوية الموجودة فيه والحصول على معلق نظيف للنيماتودا وتستعمل في هذه الطريقة مصفّاتان عدد ثقبها 60 في البوصة الطولية والثانية عدد ثقبها 200 في البوصة الطولية وتتبع الخطوات التالية:
- يؤخذ حجم معين من التربة وينقع في كمية من الماء ثم تقلب التربة جيداً حتى يتكون معلق من الماء والتربة.
  - ينقل معلق التربة إلى مجموعة المصافي.

- توضع كمية أخرى من الماء في الإناء وتقلب التربة ثم ينقل المعلق المتكون إلى مجموعة المصافي وتكرر تلك العملية حتى يتم غسل كل عينة التربة.
- تغسل محتويات المصفاة الأولى باستخدام تيار قوي من الماء ويجمع ماء الغسيل في طبق نظيف ثم تنقل محتويات هذا الطبق إلى المصفاة الثانية.
- تغسل محتويات المصفاة الثانية عدة مرات حتى يصبح ماء الغسيل رائقاً تماماً وخالياً من الشوائب المختلفة.
- تجمع محتويات المصفاة الثانية من أحد جوانبها وتنقل بدقة إلى كأس نظيف سعته 250 سم<sup>3</sup> باستخدام تيار ضعيف من الماء.
- تنقل محتويات الكأس إلى قمع برمان الذي سبق وصفه وتركيبه ويراعى توزيع العينة على سطح المصفاة حتى تتكون طبقة رقيقة من التربة فوق قماش الموسلين تسمح للنيماتودا باختراقها والسقوط من ساق القمع.
- يترك الجهاز مدة (24 ساعة) في مكان دافئ ثم تجمع محتويات ساق القمع في زجاجة ساعة نظيفة وتفحص مجهرياً وتلتقط النيماتودا بواسطة إبرة الالتقاط.

### 6- طريقة الطرد المركزي Centrifuge Method

- تعد هذه الطريقة من أسرع الطرق لاستخلاص معظم أنواع النيماتودا الموجودة في التربة، وبالرغم من قصر الوقت الذي تتطلبه هذه الطريقة إلا أنها تسبب تلفاً لكثير من النيماتودا المستخلصة، وفي هذه الطريقة نتبع الخطوات التالية:
- يوضع (100-150 سم<sup>3</sup>) من التربة في كأس زجاجي كبير (250 سم<sup>3</sup>) ثم يملأ لنصفه بالماء وتخلط التربة بالماء جيداً حتى يتكون معلق متجانس منها.
  - يترك الكأس بما فيه حوالي 30 ثانية ثم تصب محتويات الكأس في مصفاة عدد ثقبها 325 في البوصة الطولية.
  - تغسل التربة التي بالمصفاة ثم تنقل نقلاً كمياً إلى كأس زجاجي.
  - تنقل التربة من الكأس إلى أنابيب جهاز الطرد المركزي ثم يدار الجهاز لمدة 4 دقائق (3000 دورة في الدقيقة).

- يصب الماء الزائد في الأنابيب ثم تملأ الأنابيب بمحلول السكر المعد لذلك (484.5) غم سكر / لتر ماء يدار جهاز الطرد المركزي مرة ثانية لمدة دقيقة واحدة.
- تسكب محتويات الأنابيب من المعلق في مصفاة عدد ثقبها في البوصة الطولية 325 مش.
- يغسل الجزء المتبقي في المصفاة ثم ينقل نقلاً كميّاً باستعمال تيار ضعيف من الماء إلى كأس.
- تصب محتويات الكأس الزجاجي في أطباق بتري صغيرة الحجم (قطر 5 سم) تقريباً وذلك للفحص المجهرى وتلتقط النيماتودا.

ومن عيوب هذه الطريقة:

- 1- فقدان عدد كبير من النيماتودا الموجودة في العينة قد يصل إلى النصف نتيجة عملية سكب الزائد بأنابيب جهاز الطرد المركزي.
- 2- تعرض النيماتودا للمحلول السكري يضر بحيويتها ضرراً بالغاً.



## طرق استخلاص النيماتودا من الأجزاء النباتية:

### 1- طريقة تمزيق الأنسجة النباتية **Teasing method**:

تعد هذه الطريقة من أبسط الطرق فهي تكشف عن جميع أنواع النيماتودا التي تتطفل داخل الأجزاء النباتية في هذه الطريقة تقطع الأجزاء النباتية المصابة إلى قطع صغيرة جداً بواسطة مشرط حاد في زجاجة الساعة مع قليل من الماء ثم تفحص تحت مجهر التشريح وقد يقتضي الأمر زيادة تمزيق الأنسجة أثناء الفحص وذلك بواسطة ابرتي تشريح.

### 2- طريقة النقع **Soaking method**:

يطلق على هذه الطريقة أيضاً بطريقة Young وفيها تقطع الأجزاء النباتية المراد استخلاص النيماتودا منها إلى قطع صغيرة، توضع مع كمية قليلة من الماء تكفي لتشبع الجو بالرطوبة (دون غمر الجذور) في طبق بترى مزود بورق ترشيح مبلل ثم تحفظ على درجة حرارة مناسبة لنشاط النيماتودا (30°م) عادة وتترك لمدة 24 ساعة تزال بعدها كمية الماء المحتوية على النيماتودا وتعرض بكمية أخرى وهكذا تعد هذه الطريقة من أنسب الطرق لاستخلاص أنواع النيماتودا المتنقلة Migratory والتي في طور سكون مثل نيماتودا السوق والأبصال كما أنها تصلح لاستخلاص نيماتودا التابعة للجنس Pratylenchus.

### 3- طريقة الحضانة **Incubation method**:

تشبه الطريقة السابقة إلى حد ما، كما أنها تتناسب أيضاً مع أنواع من النيماتودا المتنقلة بصفة خاصة وتستخدم في استخلاص النيماتودا من الأنسجة النباتية بصفة عامة، توضع الأجزاء النباتية المراد استخلاص النيماتودا منها في دورق زجاجي نظيف وذلك بعد غسلها جيداً ويضاف إليها قليل من الماء يكفي لتغطيتها وتترك في مكان دافئ لمدة ثلاثة أيام تنشط خلالها النيماتودا ثم تغسل محتويات الدورق وتنقل نقلاً كميلاً إلى مخبار مدرجة ويعاد غسل الدورق ثانية ويصب ماء الغسيل في المخبار وهكذا يصل إلى حجم مناسب، تنقل محتويات المخبار إلى قمع برمان أو مصفاة عدد ثقبها 60 في البوصة الطولية ثم إلى مصفاة أخرى عدد ثقبها 270 مش في البوصة الطولية ثم تغسل محتويات المصفاة الثانية جيداً وتنقل إلى كأس زجاجي أو أطباق بترى لفحصها مجهرياً.

### 4- طريقة الخلاط **Blender method**:

- تغسل عينة الجذور النباتية المراد استخلاص النيماتودا منها بالماء غسلاً جيداً وذلك لإزالة التربة المتعلقة بها تماماً.
- توضع العينة في صبغة اللاكتوفينول والفوكسين الحامضي لمدة دقيقة واحدة وهذه الصبغة تصبغ النيماتودا بدرجة كبيرة بينما تترك الأنسجة النباتية باهتة أو فاتحة.
- تزال الصبغة الزائدة بغسل العينة بالماء وتجفف الجذور بوضعها بين ورقتي ترشيح يضغط عليها ضغطاً هيناً.
- تقطع الجذور إلى قطع طولها (1 سم) ثم يوضع مقدار حوالي (10 غم) منها في الخلاط ويضاف إليها نحو (80 سم) ماء ثم يدار الخلاط بأقصى سرعة لمدة دقيقة.
- ينقل المعلق إلى ثلاث مصافي عدد ثقبها 60 و 100 و 300 في البوصة الطولية على التوالي ولزيادة سرعة الاستخلاص يمكن الاستعانة بقمع بوخز الذي يركب فيه المصفاة الأخيرة ويتصل بالقمع دورق مخروطي ذو ذراع جانبي يوصل بمضخة تفريغ زجاجية متصلة بصنبور ماء.
- تغسل محتويات المصفاة الأخيرة بقليل من الماء وتنقل إلى أطباق بتري صغيرة لفحصها.

## تحضير السلايدات أو الشرائح المؤقتة والدائمة:

### ❖ طريقة تحضير السلايدات أو الشرائح المؤقتة:

تعد هذه الطريقة من أسهل الطرق وأسرعها لتشخيص النيماتودا وتظهر النيماتودا درجة وضوح عالية بالتركيبة الداخلية لها كالمرح وتجويف الفم وشكل المرئ والجهاز التناسلي وغيرها من الصفات المعتمدة في التشخيص. إلا إنه يجب دراسة النيماتودا بسرعة تفادياً لتلفها. وتكون طريقة تحضير السلايدات أو الشرائح كالاتي:

- 1- تنقل النيماتودا المعزولة من التربة أو من الأجزاء النباتية مع قليل من الماء إلى زجاجة ساعة، أو طبق بتري صغير.
- 2- تلتقط النيماتودا بواسطة ابرة تلقيح خاصة (تحت المجهر) وذلك بتعويم النيماتودا على سطح الماء ثم التقاطها بسرعة على طرف الأبرة.
- 3- تنقل النيماتودا إلى شريحة زجاجية مقعرة أو شريحة زجاجية عادية يحاط مركزها بقطع مكسورة من الزجاج أو أي مادة أخرى وتضع في وسطها قطرة الماء ثم تنقل النيماتودا إلى وسط هذه القطرة.
- 4- يوضع غطاء السلايد على شريحة زجاجية ويقفل بمادة طلاء الأظافر أو مادة Zut.

### ❖ طريقة تحضير السلايدات أو الشرائح الدائمة:

محاليل التثبيت المستخدمة في تثبيت النيماتودا عند عمل السلايدات أو الشرائح الدائمة:

هناك أربعة محاليل شائعة الاستخدام للتثبيت وهي:

محلول FA ، محلول TAF ، محلول FAA ، محلول فورمالين .

### طريقة سينهورست السريعة: (تحضير السلايدات أو الشرائح الدائمة)

تعد هذه الطريقة واحدة من أسرع الطرق وأبسطها في عمل السلايدات أو الشرائح الدائمة وتتلخص هذه الطريقة بنقل النيماتودا من أحد محاليل التثبيت إلى زجاجة ساعة تحوي على نصف مل من:

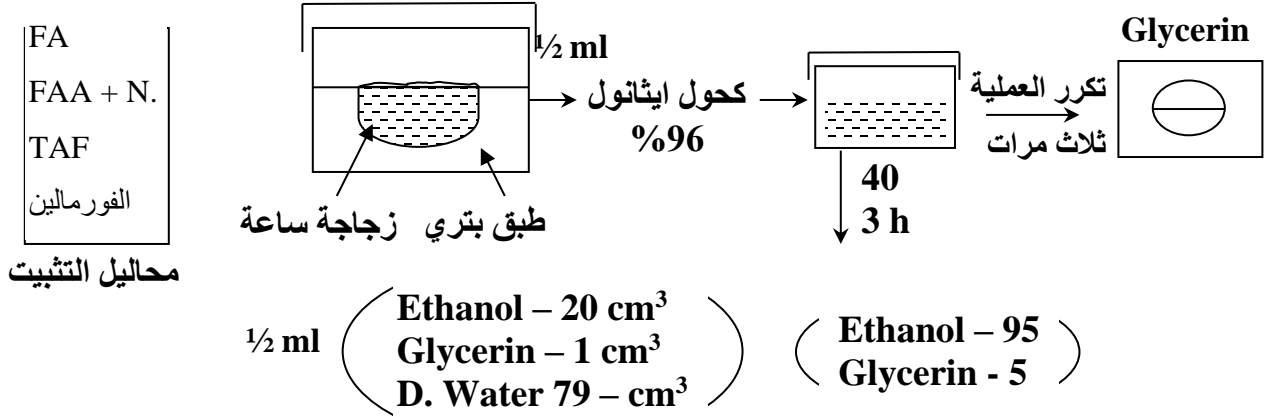
Ethanol 96%----- 20cm<sup>3</sup>  
Glycerine ----- 1cm<sup>3</sup>  
D.Water ----- 79 cm<sup>3</sup>

وتوضع في زجاجة ساعة مع النيماتودا المنقولة بها ثم توضع زجاجة الساعة بما يحتويها في طبق بتري يحتوي على كحول إيثانول بتركيز 96 % ثم يغطى بإحكام ويترك على الأقل (12) ساعة على درجة حرارة 35-40 م ° ثم تملئ زجاجة الساعة بمحلول آخر مكون من الإيثانول 96%.

Ethanol 96% ----- 95 cm<sup>3</sup>

Glycerine ----- 5 cm<sup>3</sup>

ثم تنقل النيماتودا إلى المحلول الأخير ويترك في طبق مقفول جزئياً على درجة حرارة 40°م حتى يتبخر الكحول تماماً وتصبح النيماتودا في كلسرين نقي ويستلزم هذه العملية ثلاث ساعات على الأقل ثم تكرر هذه العملية عدة مرات بعدها تحمل النيماتودا على قطرة من الكلارين الموضوعة في سلايد ثم تحمل ويوضع عليها غطاء شريحة ويقفل أما بمادة طلاء الأظافر أو مادة Zut وتكون السلايدات جاهزة للفحص ويمكن أن تبقى لمدة (6) أشهر.



## المحاضرة الثامنة

### حساب الكثافة العددية للنيماطودا:

لحساب الكثافة العددية للنيماطودا نتبع الخطوات التالية:

- 1- يحسب حجم المعلق النيماطودي (يوضع المعلق النيماطودي في بيكر مدرج ونقيس حجم المعلق).
  - 2- يرج المعلق جيداً (لضمان توزيع النيماطودا بالتساوي في جميع أجزاء البيكر).
  - 3- نسحب (1 مل) من المعلق بعد عملية الرج مباشرة وتوضع في سلايد مقسم خاص بعد النيماطودا ثم تفحص تحت الميكروسكوب ونحسب عدد النيماطودا في (1 مل) من المعلق.
  - 4- تكرر هذه العملية (5 مرات) ... الخطوة الثالثة.
  - 5- يتم حساب متوسط عدد النيماطودا في (1 مل).
  - 6- يضرب الناتج في حجم المعلق الكلي للنيماطودا.
- ومثال على ذلك:

أحسب الكثافة العددية للنيماطودا في معلق حجمه (250 مل) علماً أنه عند سحب (1 مل) من المعلق في المرة الأولى كان عدد النيماطودا (25) وفي المرة الثانية كان العدد (20) والمرة الثالثة (27) والمرة الرابعة (28) والمرة الخامسة (15)

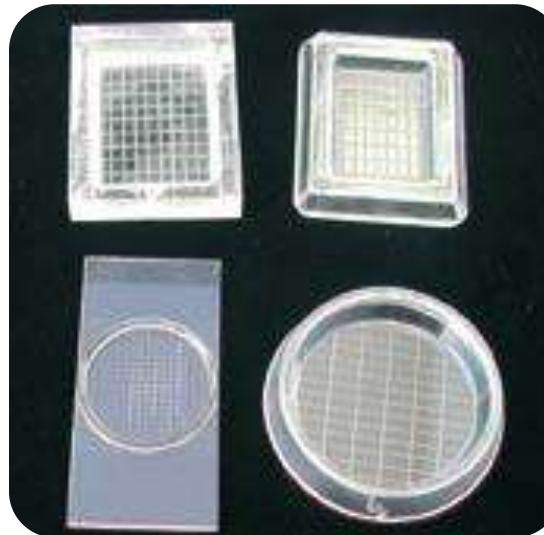
1- نوجد متوسط عدد النيماطودا في (1 مل):

$$115 = 15 + 28 + 27 + 20 + 25$$

$$23 = 115 \div 5 \text{ متوسط عدد النيماطودا في (1 مل)}$$

2- يحسب عدد النيماطودا في المعلق الكلي:

$$5750 = 23 \times 250$$



طبق عد النيماطودا

**طريقة تصبغ الانسجة النباتية باستخدام هاييوكلورات الصوديوم وحمض الفوكسين**

تعد هذه الطريقة من الطرق الجيدة في تصبغ الجذور المصابة بالنيماتودا ولها فوائد عديدة وهي تجنب التعرض الشخصي للسموم مثل الفينولات فضلا عن ان مادة هاييوكلورات الصوديوم تنظف انسجة الجذر قبل عملية الصبغ بحامض الفوكسين مما يقلل من كثافة الصبغة وبالتالي الوقت الذي تحتاجه من اجل ازالة الصبغة قصير جدا.  
يتم تحضير الصبغة في المختبر من المواد التالية :

- Lactic acid ..... 250 cm<sup>3</sup>
- Acid Fuchson ..... 3.5 grams
- D. water ..... 750 cm<sup>3</sup>

**طريقة العمل :**

- 1- تغسل الجذور النباتية بالماء جيدا للتخلص من حبيبات التربة والمواد العالقة
- 2- توضع الجذور في كاس زجاجية (بيكر) بعد تقطيعها الى قطع صغيرة بحدود 1-2 سم يضاف اليها 100 سم<sup>3</sup> من محلول هاييوكلورات الصوديوم تركيز 1% ويمكن زيادة التركيز للمحلول ما بين 1 – 3 % حسب عمر الجذور.
- 3- تترك لمدة 4 – 5 دقائق مع مراعاة التحريك
- 4- تغسل الجذور بماء الحنفية لمدة دقيقة ثم تنقع لمدة 15 دقيقة لازالة بقايا محلول هاييوكلورات الصوديوم.
- 5- التخلص من الماء بتنشيف الجذور ويضاف 50 سم<sup>3</sup> من الماء مع حوالي 1 سم<sup>3</sup> من محلول صبغة الفوكسين الحامضية
- 6- يسخن المحلول لمدة 30 دقيقة في وعاء ساخن باستخدام حمام مائي او على سخان كهربائي.
- 7- يبرد المحلول وتغسل الجذور بالماء لازالة محلول الصبغة من الجذور.
- 8- توضع الجذور في محلول يحتوي على 30 سم<sup>3</sup> من الكليسرسن الحامضي المحضر باضافة بعض قطرات من حامض الهيدروكلوريك الى الكلسرين وتسخن الجذور حتى درجة الغليان من اجل ازالة الصبغة من الجذور ثم تفحص بعد ذلك.

### استخلاص البيوض من الجذور:

تصبيغ كتل البيض بصبغة فلوكسين B لاتعطي أعداد البيوض داخل كتلة البيض الواحد وتبقى البيوض متجمعة داخل الكتلة الجيلاتينية ولاستخلاص البيوض من جذور النباتات المصابة تنقع الجذور بمحلول هاييوكلورات الصوديوم الذي يذيب كتل البيض الجيلاتينية ويستخدم بتركيز 0.5 اذ كان الغرض الحصول على اللقاح اما اذ كانت البيوض المستخدمة ليست كلقاح ممكن زيادة تركيز هاييوكلورات الصوديوم الى 1% مع الرج لمدة 10 دقائق يمرر بعدها المعلق من خلال منخل حجمه 500 مش ويسلط عليه تيار خفيف من الماء لمدة بضعة دقائق لازالة بقايا الهايوكلورات ثم تجمع بواسطة تيار خفيف من الماء يسلط خلف المنخل الى كاس زجاجي (بيكر).

## المحاضرة العاشرة

## تصبغ النيماتودا في الأنسجة النباتية:

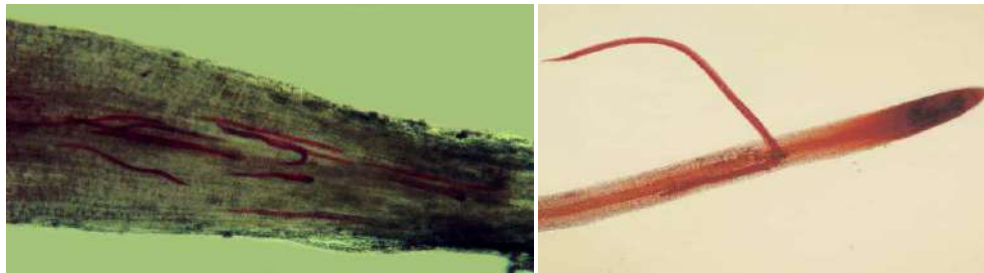
يتم تحضير محلول اللاكتوفينول Lactophenol المضاف إليه صبغة الفوكسين الحامضية Acid Fuchsin بالطريقة التالية:

- Phenol ..... 20 grams
- Lactic acid ..... 20 grams
- Glycerin ..... 40 grams
- D. water ..... 20 cc

يتم إذابة (1 غم) من صبغة الفوكسين الحامضية في (100 مل) من الماء ثم يؤخذ (5 مل) من المحلول الأخير ويضاف إلى محلول اللاكتوفينول المحضر أعلاه.

## طريقة العمل:

- 1- غسل الأجزاء النباتية جيداً لإزالة التربة من الأجزاء النباتية.
- 2- سخن محلول اللاكتوفينول المضاف إليه محلول الصبغة إلى درجة الغليان ثم تغمر الأجزاء النباتية لمدة (1 - 3 دقائق) في هذه الخطوة ستصطبغ كل من الأنسجة النباتية والنيماتودا بمحلول الصبغة.
- 3- أزل محلول الصبغة وذلك بغسل العينات بالماء البارد.
- 4- أحفظ الأجزاء النباتية بمحلول اللاكتوفينول النقي أي الخالي من الصبغة هذا المحلول الأخير يجعل الأنسجة النباتية شفافة والنيماتودا تأخذ لون الصبغة وتكون واضحة.





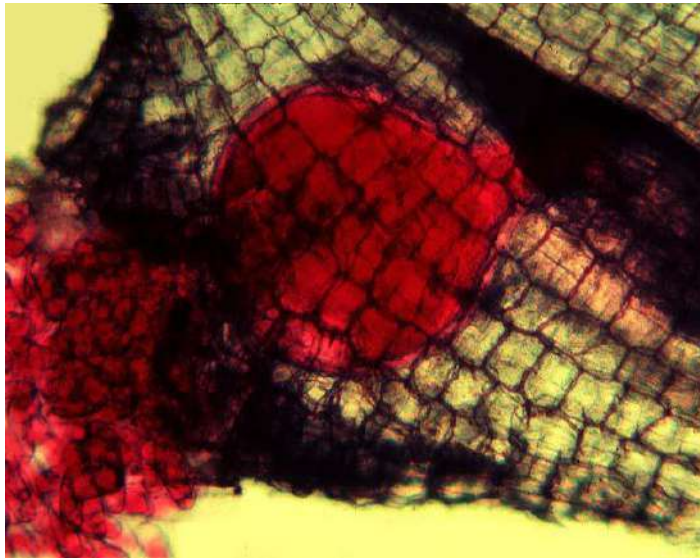
## المحاضرة الحادية عشرة

**صبغ أكياس البيض:**

لتسهيل عد أكياس البيض الموضوعة من قبل النيماتودا على الجذور لابد من عملية تلوين هذه الأكياس على المجموع الجذري ويستخدم لهذه الغاية صبغة الفلوكسين (Phloxine B) التي تلوّن أكياس البيض الجيلاتينية باللون الأحمر ولكنها لا تفيد في عد البيض ضمن الكيس الجيلاتيني، كما أن البيض يبقى حياً.

**طريقة العمل:**

- 1- تغسل الجذور النباتية بالماء جيداً للتخلص من حبيبات التربة والمواد العالقة.
- 2- تنقع الجذور في محلول الفلوكسين B (تركيزه 0.015%) \* لمدة 15-20 دقيقة.
- 3- تغسل الجذور تحت ماء جاري للتخلص من بقايا الصبغة.
- 4- تعد أكياس البيض الجيلاتينية ذات اللون الأحمر.



\* ملاحظة: يحضر محلول صبغة الفلوكسين B بتركيزه 0.015% بإذابة 0.15 غم من صبغة الفلوكسين B في 1 لتر من ماء مقطر.

## طرق جمع العينات Sampling Method

تنتشر النيماتودا الممرضة للنبات في التربة منطقة انتشار الجذور أو في الجذور النباتية كما تتواجد بعض أطوارها في الأجزاء الهوائية للنبات كالساق والأوراق والبذور ، ولذلك لابد من التعرف على الطرق المختلفة لجمع العينات والعناية بها قبل إيصالها إلى المختبر للتأكد من الإصابة بالنيماتودا ، 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 (طبيعية تطفلها ، تكاثرها ، انتشارها في التربة ) ومهما اختلفت طرق جمع العينات فلا بد أن تكون العينة المأخوذة ممثلة تماما لمجتمع وكثافة النيماتودا في الحقل وقت جمع العينة .

### أولا :- جمع العينات من التربة

ان أعراض الإصابة بالنيماتودا فوق سطح التربة مشابهة الى أعراض نقص العناصر الغذائية وبعض الأمراض الفسيولوجية الأخرى وبما ان أعراض النيماتودا تبدو غير متخصصة فانه من الضروري تحليل التربة للتأكد مما تحتويه التربة من أنواع النيماتودا النباتية وكثافتها العددية المنتشرة في الحقل ، وهناك بعض الأدوات اللازمة التي يجب ان تتوفر لدى الباحث قبل القيام بعملية جمع العينات ومنها:-

- 1- أنبوبة جمع العينات أو جاروف لجمع العينات أو غيرها من أدوات الحفر.
- 2- أكياس من البولي ايثيلين لوضع العينات
- 3- قلم ودفتر لتسجيل الملاحظات
- 4- بطاقة تدوين المعلومات ترفق بالعينة وعادة ماتكون مغلقة بكيس من البولي ايثيلين الشفاف حتى لا تتأثر برطوبة التربة.
- 5- براد عازل أو صندوق خشبي لحفظ العينات

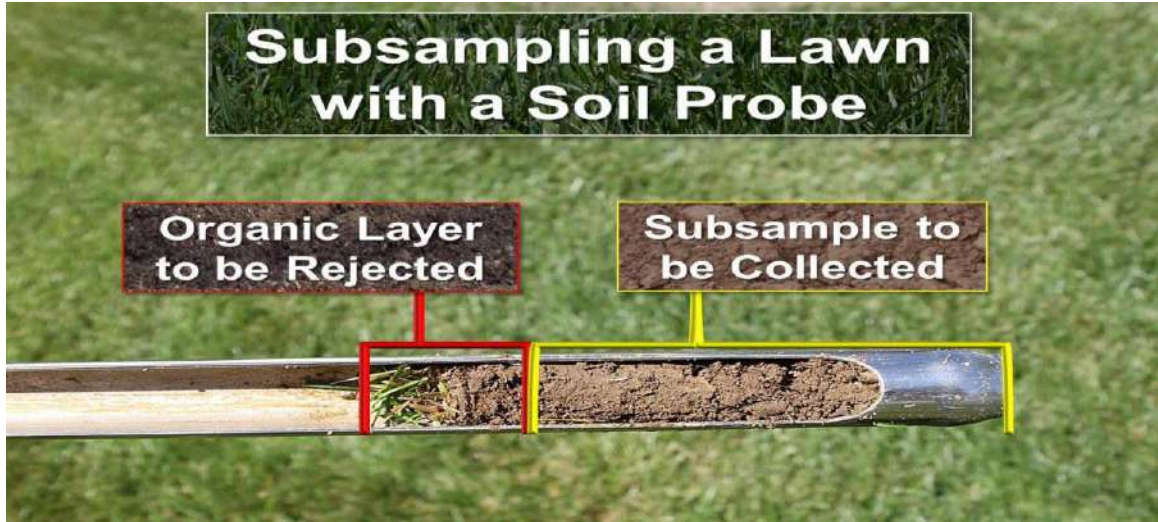
### اسطوانة جمع العينات Sampling tube

وهي الأكثر استعمالاً من قبل العاملين في مجال النيماتودا وهي عبارة عن أنبوبة اسطوانية طولها 38 سم وقطرها 2,5 سم (القطر الداخلي 2سم ) مفتوحة من جانب واحد ويعلوها مقبض يدوي وطرفها السفلي دائري حاد لتسهيل اختراقها للتربة إلى عمق 20 سم عادة نتخلص دائما من الجزء العلوي للعينة (5سم العليا من الاسطوانة ) لاحتوائها على بعض الحشائش وبقايا المواد العضوية المتساقطة على سطح التربة.

تستخدم اسطوانة جمع العينات وفي حالة عدم توفرها تستخدم جاروف أو معول أو أية أداة

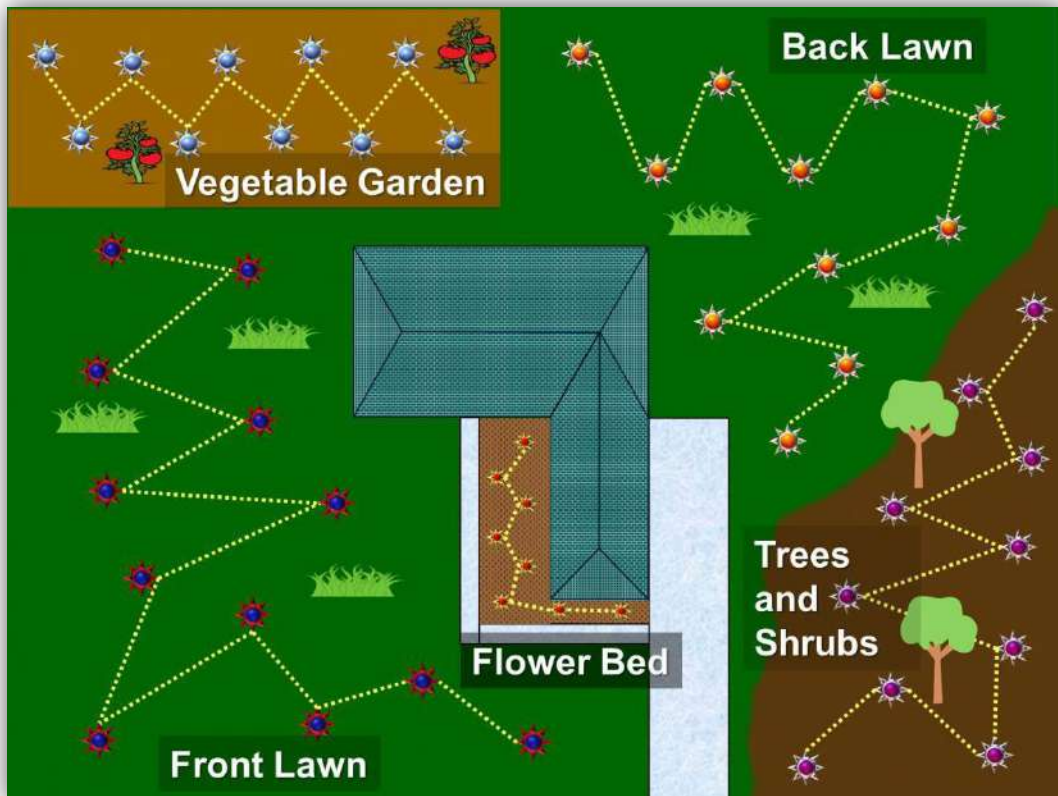
مناسبة لجمع العينات





وبشكل عام يجب ان تكون العينة المأخوذة من الحقل أو البستان ممثلة قدر المستطاع لوضع النيماتودا في ذلك الحقل وفيما يلي أهم الطرق المتبعة لجمع العينات ومنها :-

- 1- **جمع العينات بشكل عشوائي** تأخذ العينات من عدة مواقع وبشكل عشوائي ويختلف عدد هذه العينات باختلاف مساحة الحقل.
- 2- **جمع العينات بشكل منتظم** يحدد موقع كل عينة على مسافة ثابتة من الموقع السابق سواء من طول الحقل أو عرضه ويمكن في هذه الحالة أيضا تقسيم الحقل الى أقسام متساوية وتؤخذ العينة من مركز هذه الأقسام.
- 3- **جمع العينات بشكل زكزاك او من محيط القوس** يحدد موقع كل عينة على مسافة ثابتة من الموقع السابق وذلك عند المسير في الحقل بشكل زكزاك أو بشكل قوسي وعادة ماتكون البداية من مدخل الحقل أو من ناحية الطريق.



### طريقة العمل لاخذ العينات من التربة

تؤخذ العينة بواسطة أدوات جمع العينات وذلك باستعمال أنبوبة أخذ العينات أو الجاروف أو المعول وذلك من عدة مناطق متقاربة من القسم ذاته وبحدود 6-12 عينة على عمق 10-25 سم تخلط مع بعضها البعض ويتم التخلص من الحصى وبقايا الحشائش والاوزاخ ثم يؤخذ منها الكمية المطلوبة من التربة وتوضع في اكياس من البولي اثيلين يرقم الكيس برقم الموقع الذي اخذت منه العينة وترقف العينة ببطاقة تدون فيها المعلومات التالية :-

- ❖ اسم الجامع ، تاريخ جمع العينة ، رقم العينة
- ❖ اسم صاحب الحقل
- ❖ مكان الجمع ( المحافظة ، المدينة ، القرية)
- ❖ اسم النبات المزروع
- ❖ نوع التربة
- ❖ اسم المحصول الذي كان مزروع سابقا في الحقل والدورة الزراعية المتبعة

يتم الاستعانة بالمزارع في تلك المنطقة لاخذ هذه المعلومات كما تدون هذه المعلومات ايضا في دفتر موضحا كل مايتعلق بالحقل والعينات

تحفظ العينات في اكياس من البولي اثيلين على درجة حرارة 4-8م بعيدا عن اشعة الشمس والاماكن الجافة وفي حالة اخذ العينات في الصيف فيجب على الباحث أخذ صندوق الفليني العازل (البراد الميداني) وبعدها تنتقل للمختبر

**ملاحظة** يجب ان يتم عزل النيماتودا من عينات التربة خلال 1-2 يوم وكحد أقصى مدة أسبوع على ان تكون العينات محفوظة في الثلجة وتفحص العينات بعد العزل مباشرة او تثبت وتحفظ.

### ثانيا :- جمع العينات من الجذور النباتية

يتم جمع العينات من الجذور النباتية للكشف عن النيماتودا داخلية التطفل ويتم الكشف عن الاطوار المختلفة للنيماتودا ضمن الجذور النباتية ومنها الداخلية التطفل المتجولة والاطوار المستقرة الداخلية التطفل وتختلف طريقة جمع العينات باختلاف الهدف من الدراسة ومساحة الحقل وحالة الحقل وتتبع نفس الطرق في جمع العينات من التربة وهي الطريقة العشوائية والمنتظمة وبشكل زكزاك او محيط قوس.

### كيف تؤخذ عينات الجذور؟

- 1) في المحاصيل الحولية يتناسب وزن المجموع الجذري طرديا مع تقدم موسم النمو ففي بداية موسم النمو او النباتات الصغيرة فيجب ان يؤخذ كامل المجموع الجذري مع التربة المحيطة.
  - 2) بالنسبة للمحاصيل والاعشاب المعمرة يكون المجموع الجذري متجانسا وكبير الحجم على مدار السنة ولهذا يجب ان تؤخذ كمية كافية من المجموع الجذري
  - 3) اذ كانت العينة المراد جمعها من حقل يحتوي على نباتات متباينة في درجة نموها فيجب ان تؤخذ العينات عشوائية تمثل كافة النباتات
  - 4) في حالة جمع العينات من الاشجار يجب ان يكون وزن العينة ما بين 10-20غم من الجذور الحديثة التكوين من كل شجرة
- توضع العينات بعد جمعها مع قليل من التربة المحيطة بالجذور مباشرة في اكياس من البولي اثيلين وترقف ببطاقة تعريف للعينة وتحفظ في مكان بارد لتفادي جفافها الى حين ايصالها الى المختبر وفحصها.

**الامور الواجب مراعاتها عند أخذ العينات**

- 1- تجنب أخذ العينات من المناطق الجافة جدا أو المناطق الرطبة جدا لان العينات تكون غير دقيقة وغير ممثلة لكثافة النيماتودا ويجب ازالة الجذور السطحية والتربة السطحية من العينة.
- 2- يجب عدم أخذ العينة من نبات ميت
- 3- يجب عدم ترك العينة خارج الثلاجة لاكثر من ساعات
- 4- يجب تنظيف آلة أخذ العينة بعد كل عينة منعا للتلوث وانتشار النيماتودا
- 5- يجب ان تكون الجذور الماخوذة مغمورة في داخل التربة (داخل الكيس) منعا لجفافها
- 6- يجب عدم اضافة الماء للعينة
- 7- يجب ايضاح نظام توزيع النباتات غير الطبيعية في الحقل
- 8- يجب معرفة ان عدم الدقة في احدى خطوات اخذ العينات يؤدي الى ان تكون النتائج المتحصل عليها غير دقيقة.

### تشخيص انواع نيماتودا تعقد الجذور

نظرا لاهمية نيماتودا تعقد الجذور وماتسببه من اضرار كبيرة على النباتات المختلفة سنركز على كيفية تشخيص الانواع المهمة التابعة للجنس *Meloidogyne* والمنتشرة في العراق هناك عدة طرق لتشخيص انواع نيماتودا تعقد الجذور منها اختبار العوائل النباتية المفرقة *test* Carolina North *host differential* وهي (التبغ صنف NC95 والقطن صنف Deltapine 61 والفلفل صنف California Wonder والرقي صنف Charleston Grey و الفستق الحقل صنف Florryner و الطماطة صنف Rutgers ) يعتمد هذا الاختبار على مدى قابلية إصابة – أو مقاومة – أصناف معينة، في ستة عوائل نباتية قياسية، للأنواع الأربعة الشائعة من نيماتودا تعقد الجذور. وتشمل هذه العوائل أصنافاً معينة من كل من القطن، والتبغ، والفلفل، والبطيخ، والفول السوداني، وكذلك الطماطم. وعلى ضوء إصابة – أو عدم إصابة – هذه النباتات (متوسط عدد كتل البيض والعقد على الجذور) بالنيماتودا المختبرة يتم تعريفها بالمقارنة مع جدول قياسي (كما موضحة في الجدول).

نوع النيماتودا والسلاطة	استجابة الصنف النباتي للإصابة					
	قطن Delta pine 61	تبغ NC 95	فلفل California wonder	بطيخ Charleston Gray	فول سوداني Florryner	طماطم Rutgers
<i>M. incognita</i>						
سلاطة رقم ١	-	-	+	+	-	+
سلاطة رقم ٢	-	+	+	+	-	+
سلاطة رقم ٣	+	-	+	+	-	+
سلاطة رقم ٤	+	+	+	+	-	+
<i>M. javanica</i>	-	+	-	+	-	+
<i>M. arenaria</i>						
سلاطة رقم ١	-	+	+	+	+	+
سلاطة رقم ٢	-	+	+	+	-	+
<i>M. hapla</i>	-	+	+	-	+	+

- ، + تدل على أن الصنف مقاوم أو قابل للإصابة، على التوالي.  
□ تدل على العوائل المفرقة المتأخية.

(عن Sasser and Carter, 1985)

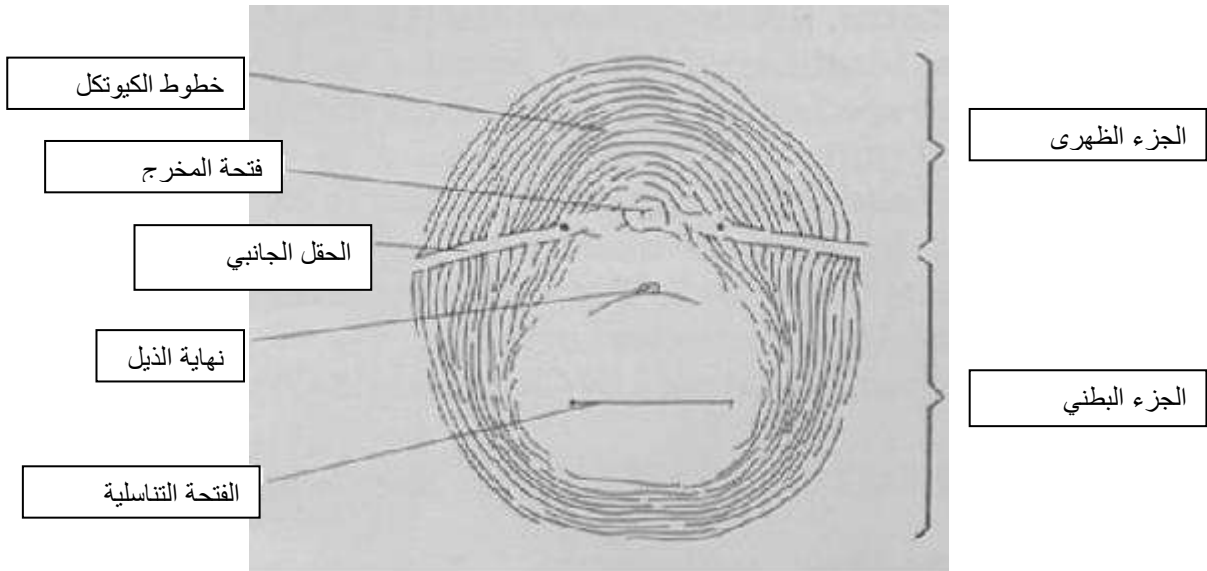
يتميز هذا الاختبار بأنه لا يحتاج إلى خبرة ومهارة فنية، كما أنه يميز أيضا بين السلالات المرضية المختلفة داخل النوع الواحد. فقد وجد أن النوع *M. incognita* يحتوي على أربع سلالات مرضية (حسب الإصابة على نباتات القطن والتبغ)، وكذلك يحتوي النوع *M. arenaria* على سلالتين (حسب الإصابة على الفول السوداني). إلا أن من عيوب هذا الاختبار اقتصره على الأنواع الأربعة الشائعة، وكذلك طول الفترة اللازمة للحصول على نتائج يمكن مقارنتها بالجدول القياسي، حيث لا بد من مرور شهر على الأقل بعد تلقيح النباتات بالنيماتودا للحصول على نتائج. كذلك فإن هذا الاختبار يعتبر أوليا لا يعتمد عليه وحده، ويحتاج إلى تدعيمه بمعرفة الصفات المورفولوجية لنوع النيماتودا، كالنمط العجاني للأنثى وشكل الرأس في الذكر، والشكل المورفولوجي للرمح. فيما يعتمد البعض الآخر على الصفات الوراثية كعدد الكروموسومات وطريقة التكاثر، أو الصفات الكيموحيوية، أو على القدرة الإراضية للنوع على

عوائل نباتية مفرقة. وتعتبر طريقة النمط العجاني للأنثى وطريقة العوائل المفارقة من أهم الطرق وأكثرها استخداماً.

### النمط العجاني Perineal Pattern

النمط العجاني عبارة عن الشكل المورفولوجي لمؤخرة جسم الأنثى الذي يوضح شكل وترتيب تخطيط الكيوتيكل في هذه المنطقة من الجسم، بالإضافة الى نهاية الذيل، والفتحات الفازميدية، والخطوط الجانبية للحقل الجانبي، وكذلك فتحتا الشرج والجهاز التناسلي ويتميز كل نوع من أنواع هذه النيماتودا بنمط عجاني ذي شكل خاص به، كما هو الحال في بصمات أصابع الإنسان.

يختلف كل نوع في الشكل العام للنمط العجاني (مستدير، بيضي، كمثري، قوسي)، وكذلك في وجود - أو عدم تراكيب في منطقة الحقلين الجانبيين أو تنقيط حول نهاية الذيل. وكذلك في شكل تخطيط الكيوتيكل (ناعم، مستمر، متقطع، متموج، متعرج) بالإضافة إلى وجود - أو عدم وجود - أجنحة على جانب، أو كلا جانبي النمط.

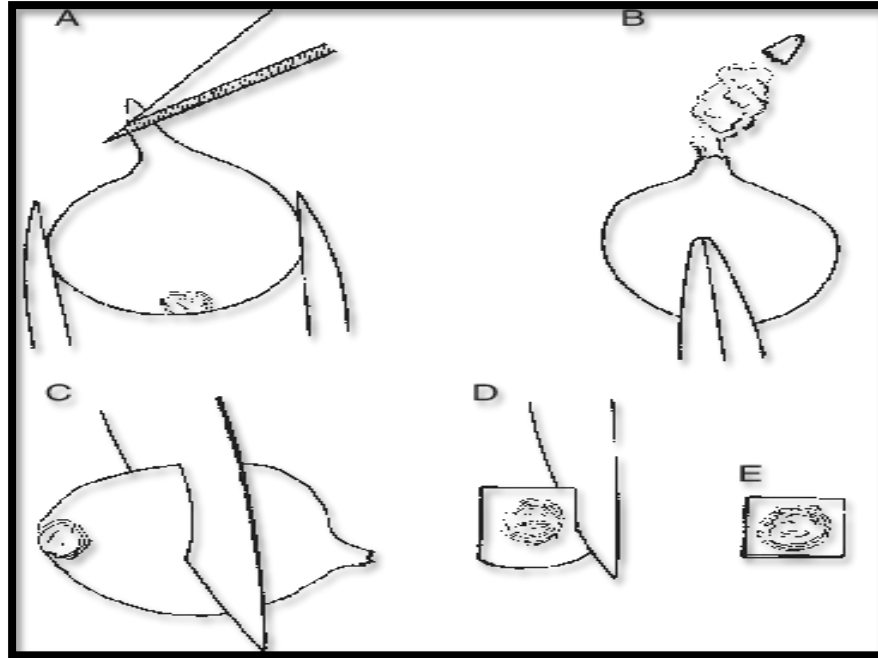


يعتبر استخدام النمط العجاني في التمييز بين جميع الأنواع طريقة سريعة، لكنها طريقة تحتاج إلى مهارة فنية في عمل النمط، وخبرة في التمييز بين الأنماط، التي أحياناً ما تتشابه كثيراً، لكنها لا تميز بين السلالات داخل النوع الواحد. وهناك عدة محاولات حديثة لتحسين الطريقة وزيادة كفاءتها.

### طريقة تحضير سلايدات خاصة بالنمط العجاني :

- 1- تؤخذ عينات جذور النباتات المصابة بنيماتودا تعقد الجذور و تغسل بتيار ماء خفيف لإزالة الأتربة والمواد العالقة بها .
- 2- تستخرج إناث نيماتودا تعقد الجذور بعد إزالة كتل البيض من نهاياتها الخلفية بواسطة إبرة التشريح والاستعانة بالمجهر الضوئي المجسم ( Stereomicroscope )

3- توضح على شريحة زجاجية نظيفة في قطرة من الكليسرين لمدة 3-5 دقائق وتقطع النهاية الخلفية لها بواسطة مشرط حاد صمم لهذا الغرض ويتم تنظيفها من الأحشاء الداخلية العالقة بالمؤخرة (كما موضحة بالشكل).

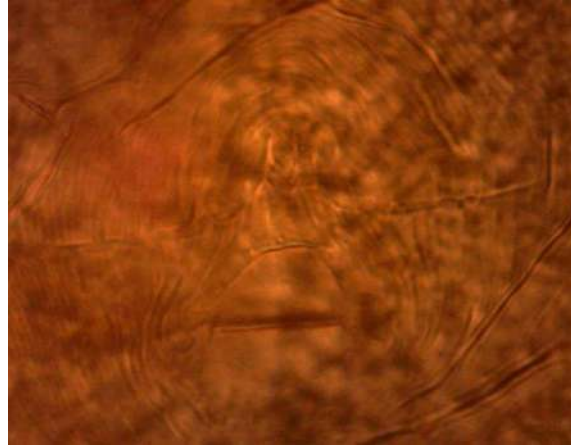


- 4- ينقل النمط العجاني بعد تنظيفه من الاحشاء الداخلية إلى شريحة زجاجية أخرى نظيفة تحوي على قطرة من اللاكتوفينول وبعد وضع غطاء الشريحة يتم ختم محيط غطاء الشريحة مع الشريحة بمادة صبغ الأظافر او بكندا بلسم وتترك لتجف .
- 5- تفحص المقاطع بواسطة المجهر الضوئي المركب ( Binocular Microscope ) .
- 6- تشخص أنواع نيماتودا تعقد الجذور بالاستناد على الصفات المورفولوجية للنمط العجاني Perineal patterns للإناث البالغة .

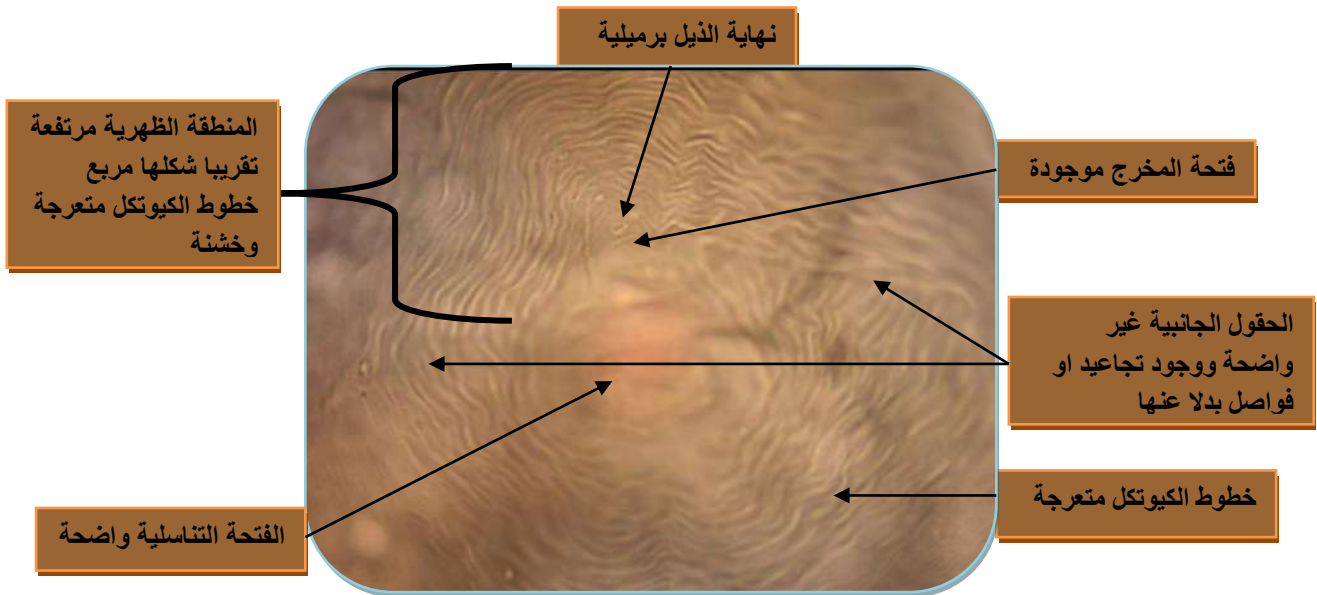
#### الصفات المورفولوجية للنمط العجاني للأنواع الثلاثة

النوع *M.javanica* يتميز بوجود الحقلين الجانبيين Lateral field بشكل واضح تقسم النمط العجاني الى منطقتين وهي المنطقة الظهرية Dorsal Arch والمنطقة البطنية Ventral Arch وتعد هذه اهم ميزة يتميز بها هذا النوع وتمتاز المنطقة الظهرية بخطوط الكيوتكل ذو قوس دائري منخفض وخطوط الكيوتكل تكون خشنة مستقيمة الى متموجة احيانا الفتحة التناسلية Vulva وفتحة المخرج Anus تكون واضحة ومميزة نهاية الذيل واضحة ذات شكل برميلية كما موضح في الشكل

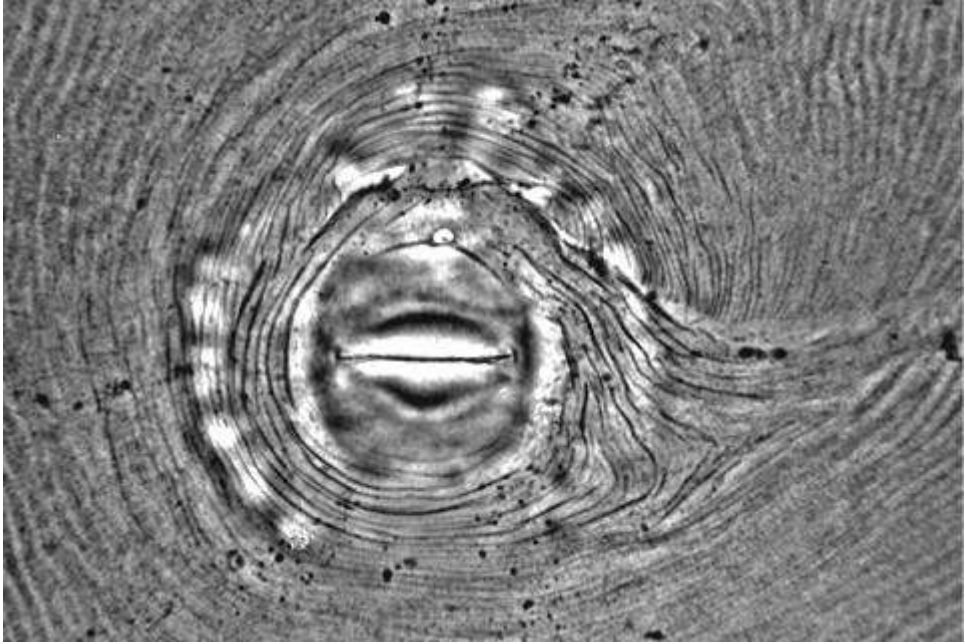




**النوع *M.incognita*** : يتميز الشكل المورفولوجي للنمط العجاني بعدم وجود الخطوط أو الحقول الجانبية بشكل واضح في النموذج ووجود فواصل أو تجاعيد بدلا عنها وتميزت المنطقة الظهرية بارتفاعها وتبدو ومربعة الشكل تقريبا، خطوط الكيوتكل متعرجة و خشنة نهاية الذيل برميلية  
النوع *M.javanica* الفتحة التناسلية وفتحة المخرج واضحة على النمط العجاني كما هو الحال مع النوع *M.javanica*



**النوع *M.hapla***: يتميز الشكل المورفولوجي للنمط العجاني بعدم وجود الخطوط أو الحقول الجانبية ويلاحظ وجود التجنحات على جانب او جانبي النمط العجاني وهذه اهم ميزة تصنيفية لهذا النوع بالاضافة الى وجود نقاط على الجزء العلوي للنمط العجاني وشكل النمط العجاني يكون منخفض ودائري الشكل ، خطوط الكيوتكل ناعمة، نهاية الذيل برميلية واضحة والفتحة التناسلية وفتحة المخرج واضحة على النمط العجاني .



## المحاضرة الخامسة عشرة

## طرق حفظ العينات النباتية المصابة وحفظ النيماتودا

## تثبيت النيماتودا

في حالات خاصة قد يكون من الضروري إرسال النيماتودا إلى معاهد متخصصة لتشخيص نيماتودا تتواجد لأول مرة في المنطقة أو لغرض التأكد من التشخيص وان إرسال العينات الحية يعتبر ممنوع دوليا بسبب القوانين الدولية للحجر الزراعي فضلا عن إن العينات تكون عرضة للتلف ولهذا نلجأ إلى عملية قتل وتثبيت النيماتودا قبل إرسالها إلى المعاهد المتخصصة بالتشخيص ، وان إضافة محاليل التثبيت يجب أن تتم مباشرة بعد قتل النيماتودا وان التأخر في عملية التثبيت تسيء إلى محتويات النيماتودا وتعيق لاحقا عملية التشخيص أو ربما تجعلها غير ممكنة فعملية التثبيت الجيدة تساعد على حفظ العينات لأشهر أو سنوات دون حدوث تغيرات في أنسجة النيماتودا.

ومن أهم محاليل التثبيت المستخدمة في تثبيت النيماتودا هي:

- 1- محلول FA.
- 2- محلول TAF.
- 3- محلول FAA.
- 4- محلول فورمالين.

## 1- طريقة تحضير محلول FA في المختبر

يحضر محلول FA في المختبر من اضافة الفورمالين تركيز ( 40% فورمالديهايد) بمعدل 10 مل و 1مل من حامض الخليك و 80 مل من الماء المقطر المعقم

Formalin (40% formaldehyde)----- 10 cm<sup>3</sup>

Glacial acetic acid ----- 1cm<sup>3</sup>

D. Water ----- 80 cm<sup>3</sup>

## طريقة العمل :-

- 1- تجمع النيماتودا في 2-3 مل من الماء في زجاجة الساعة
- 2- تضاف كمية مناسبة من المثبت الساخن (90م° ) الى النيماتودا الموجودة في زجاجة الساعة وتغطى
- 3- تترك 2-4 ساعات دون تحريك حتى نضمن تثبيت النيماتودا بشكل جيد .

**ملاحظة :-**

يمكن أن يتغير لون عينات النيماتودا خلال أسبوع إلى اللون البني ويصبح الجزء القاعدي للرمح شفاف وفي هذه الحالة يمكن إضافة حامض البكريك المشبع للمثبت

**2- طريقة تحضير محلول TAF في المختبر**

يحضر محلول TAF في المختبر من إضافة التراي ايثانول أمين بمعدل 2 مل إلى الفورمالين تركيز ( 40% فورمالديهايد) بمعدل 7 مل و 91 مل من الماء المقطر المعقم

Tri ethanol amine ----- 2cm<sup>3</sup>

Formalin (Formaldehyde 40%) ----- 7cm<sup>3</sup>

D.Water ----- 91 cm<sup>3</sup>

**طريقة العمل :-**

- 1- تجمع النيماتودا في 2-3 مل من الماء في زجاجة الساعة
- 2- تنقل الى الفرن بدرجة حرارة 50 م° ولفترة قصيرة بهدف ترخيتها
- 3- يضاف المثبت الى العينات حتى تمتلئ زجاجة الساعة
- 4- تغطى زجاجة الساعة وتحفظ ضمن درجة حرارة الغرفة وتترك لعدة ساعات بعدها تصبح النيماتودا مثبتة

**ملاحظة :-**

يمكن استخدام هذا المثبت مع النيماتودا الحية مباشرة حيث أنها تقتل أثناء عملية تسخين المثبت فضلا عن انه يمكن استخدام هذا المثبت عن طريق معاملة الجذور حيث يفيد في قتل وتثيين النيماتودا الداخلية التطفل تمهيدا لصبغها ، محلول TAF يحفظ النيماتودا لمدة تزيد عن سنة

**3- طريقة تحضير محلول FAA في المختبر**

يحضر محلول FAA في المختبر من إضافة الكحول الايثيلي 96% بمعدل 100 مل إلى الفورمالين تركيز ( 40% فورمالديهايد) بمعدل 30 مل و 5مل من حامض الخليك و 200 مل من الماء المقطر المعقم

Ethanol alcohol 96%----- 100cm<sup>3</sup>

Formalin (Formaldehyde 40%) ----- 30 cm<sup>3</sup>

Glacial acetic acid ----- 5 cm<sup>3</sup>

D . Water ----- 200 cm<sup>3</sup>

### طريقة العمل :-

- 1- تجمع النيماتودا في 2-3 مل من الماء في زجاجة الساعة
- 2- تنتقل إلى الفرن بدرجة حرارة 50 م° ولفترة قصيرة بهدف ترخيتها
- 3- يضاف المثبت إلى العينات حتى تمتلئ زجاجة الساعة
- 4- تغطى زجاجة الساعة وتحفظ ضمن درجة حرارة الغرفة وتترك لعدة ساعات بعدها تصبح النيماتودا مثبتة

### ملاحظة :-

يسبب استخدام محلول التثبيت الفورمالين و الكحول FAA انكماش في جسم النيماتودا نظرا لاحتوائه على الكحول ولهذا فان شكل الخطوط الطولية والتحرزات العرضية الناعمة للنيماتودا تكون اقل وضوحا.

### 4- طريقة تحضير محلول FAA تركيز 2- 4 % في المختبر

يحضر محلول TAF في المختبر من إضافة الفورمالين تركيز ( 40% فورمالديهايد) بمعدل 2 مل و 38 مل من الماء المقطر المعقم واذا كان تركيز الفورمالديهايد 37% او 38% فيؤخذ 2 مل من الفورمالين ويكمل ب 35 مل و 36 مل من الماء المقطر على التوالي واذا كان المطلوب تحضير الفورمالين بتركيز 4% فيؤخذ 4 مل من الفورمالين التجاري ويكمل ب 36 مل اذ كان تركيز الفورمالديهايد 40% و 33 مل من الماء المقطر اذ كان تركيز الفورمالديهايد 37% و 34 مل من الماء المقطر اذ كان تركيز الفورمالديهايد 38%

**طريقة العمل :-**

- 1- تجمع النيماتودا في 2-3 مل من الماء في زجاجة الساعة
- 2- تنتقل الى الفرن بدرجة حرارة 40 - 45 م° ولفترة قصيرة بهدف ترخيتها
- 3- يضاف المثبت بدرجة حرارة 40-45 م° إلى العينات حتى تمتلئ زجاجة الساعة
- 4- تغطى زجاجة الساعة وتحفظ ضمن درجة حرارة الغرفة وتترك لعدة ساعات بعدها تصبح النيماتودا مثبتة

**ملاحظة :-**

مثبت الفورمالين تركيز 2-4% يحفظ عينات النيماتودا لمدة 3-4 شهور فقط

**حفظ العينات النباتية المصابة**

يستخدم لحفظ العينات محلول الفورمالين 5% أو الكحول 70% والفورمالين أكثر المحاليل شيوعاً حيث تظل الأجزاء النباتية في حالة جيدة لمدة طويلة و دون أن يطرأ عليها تغيير في لونها الطبيعي.

**طريقة العمل :-**

- 1- تؤخذ الأجزاء النباتية التي تحتوي على إصابات نيماتودية وخاصة الجذور حيث تغسل بالماء الجاري لإزالة بقايا التربة العالقة بها
- 2- توضع داخل إناء محكم الغلق ويضاف إليها كحول الايثانول تركيز 70% أو محلول الفورمالين ويحضر بتركيز 5% وتضاف فوق عينة الجذور ثم تغلق بإحكام.