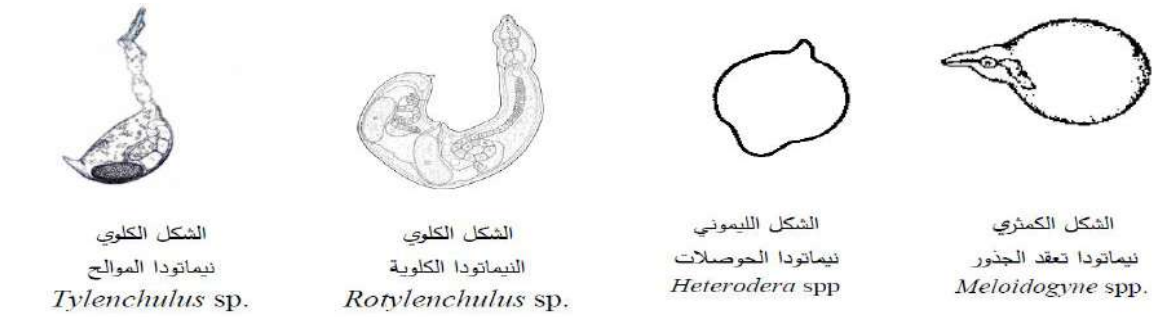
Morphology of Nematodes

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 يتحور 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 تعقد الجذور الكاذب *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.



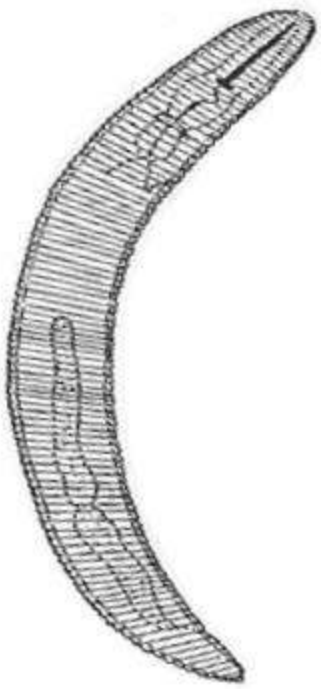
شكل (1) الاشكال المنتفخة التي تتخذها اناث بعض اجناس النيماتودا.

ويختلف طول جسم النيماتودا حسب نوع النيماتودا. 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 النيماتودا 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.

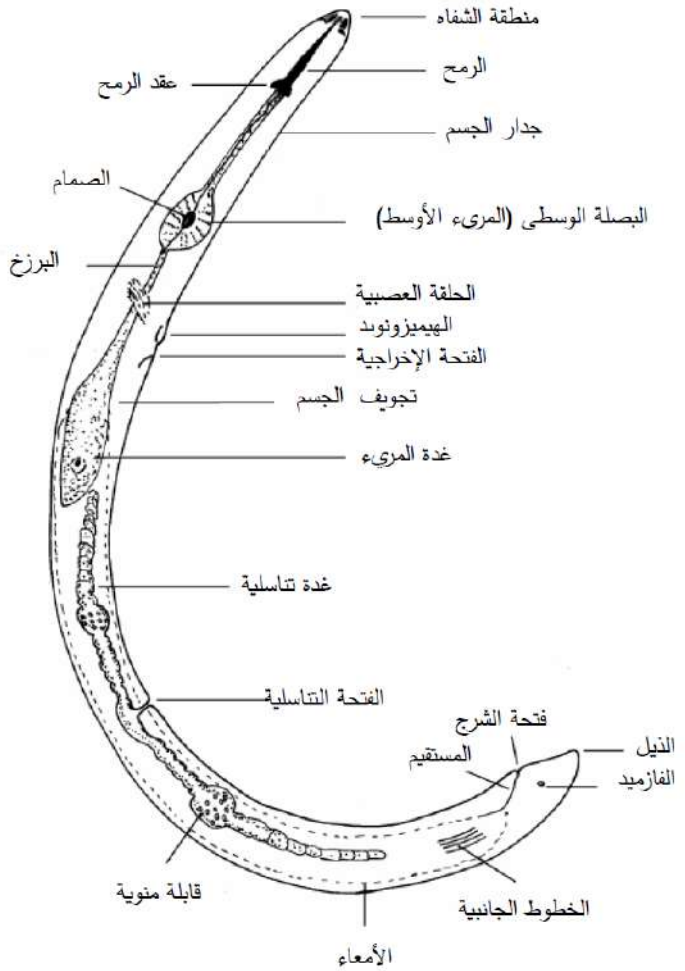
ويتميز جسم النيماتودا بأنه غير مقسم إلى حلقات، إلا أنه توجد بعض الأنواع القليلة جدا مثل النيماتودا الحلقية *Macroposthonia* spp. تبدو وكأن أجسامها مقسمة إلى حلقات. ولكن هذا التحلق لا يمتد إلى ما تحت طبقة الكيوتيكل في جدار الجسم (شكل 2).

وجسم النيماتودا شفاف عديم اللون في معظم النيماتودا 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 تميز جسم النيماتودا (شكل 3) طوليا إلى سطح بطني، يوجد عليه جميع الفتحات الطبيعية (الفتحة الإخراجية، الفتحة التناسلية والفتحة الشرجية في حاله الإناث، وفتحه المجمع في حالة الذكور). وسطح ظهري في الجهة العلوية.



شكل (2): النيماتودا الحلقية



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

التغذية والتطفل في النيماتودا المتطفلة على النبات

Parasitism and Feeding in Plant-parasitic Nematodes

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

أولا- طفيليات على الأجزاء النباتية تحت سطح التربةParasites 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 النيماتودا الجذور النباتية بعد اختراقها وتتغذى على أنسجتها من الداخل وقد تكون ساكنة أو متجولة داخل الجذور. وتقسم إلى:

أ- ساكنة Sedentary

تخترق النيماتودا جذور العائل، وتستقر ، ثم تبدأ في التغذية وجميع جسمها داخل الجذر، حيث لا تتحرك طيلة فترة حياتها باستثناء نيماتودا الحوصلات وشبة 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 النيماتودا 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 النيماتودا تقرحات شديدة في أنسجة النبات. ويمثل هذه المجموعة النيماتودا التالية:

- نيماتودا التقرح *Prapylenchus*

- النيماتودا الحفارة *Radopholus similis*
- نيماتودا الأرز *Hirschmanniella*
- بعض أنواع نيماتودا السوق والأبصال *Dinylenchus*

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 *Globodera* و *Heterodera*

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 *Scutellonenma*

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 *Dinylenchus dipsaci*
- ❖ نيماتودا تثألل 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 تثألل 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 بتحرك النيماتودا حول منطقة التغذية بواسطة الشفاه المزودة بعدد من أعضاء الحس.

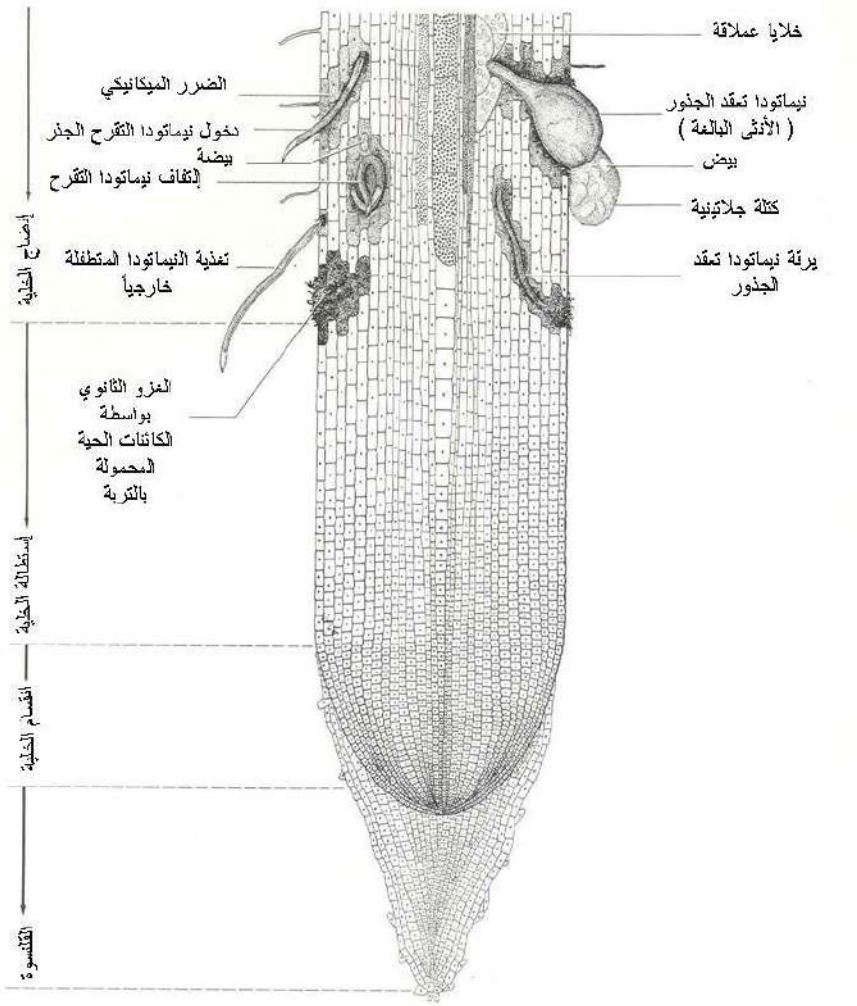
2- إحداث ثقب في جدار الخلية بواسطة رمحها.

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 أخر.

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 جدا إلى تغيرات فسيولوجية وتشريحية كبيرة.



شكل يبين اماكن تغذية وتطفل بعض انواع النيماتودا المتطفلة على جذر النبات.

أعراض الإصابة بالنيماتودا

تعرف الأعراض بأنها انعكاسات المرض على النبات نتيجة الإصابة بمسبب مرضي ما ، وتعتبر النيماتودا 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 النيماتودا عند وجود أي طور من أطوار نمو النيماتودا في الجزء المصاب من النبات ، أو في منطقة التربة المحيطة بالجذور .

تقسم الأعراض المرضية المتسببة عن النيماتودا 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 بالنيماتودا .

1- الأعراض الناتجة عن إصابة الجذور :

عند إصابة النبات بالنيماتودا 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 ومتقزمة .
- 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 النيماتودا 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 الأقحوان والكرايزنثيميم بنيماتودا 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 وتجعدها :**

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

- **انتفاخ الساق وتشوهه :**

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 (ثأليل):

تسبب الإصابة بنيماتودا ثأليل حبوب القمح *Anguina tritici* تكون عقد بذرية (ثأليل) 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 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 آن 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 التقرح *Pratylenchus* spp. والنيماتودا الحفارة *Rhadopholus 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

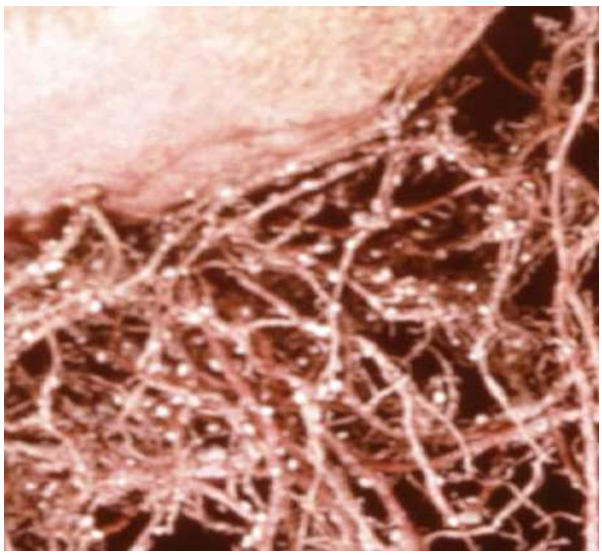
تظهر هذه الأعراض عند بعض النباتات الجذرية والأبصال حيث تسبب بعض أنواع النيماتودا بالمشاركة مع الفطريات والمسببات المرضية الأخرى تحطم أنسجة النبات مثل تعفن درنات البطاطا نتيجة الإصابة بنيماتودا الساق والأبصال *Ditylenchus destructor* كما يمكن أن تتحول التقرحات المتسببة عن نيماتودا التقرح *Pratylenchus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

تقصف الجذور

تسبب أنواع النيماتودا *Longidorus* spp و *Trichodorus* spp و *Paratrichodorus* 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 آن 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 التقرح *Pratylenchus* spp. والنيماتودا الحفارة *Rhadopholus 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

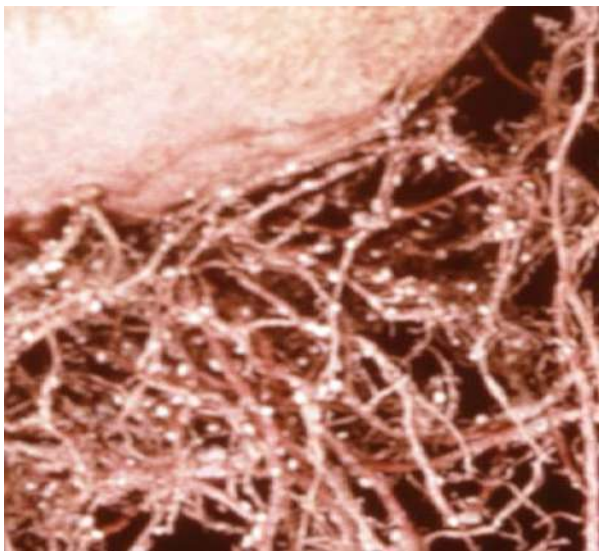
تظهر هذه الأعراض عند بعض النباتات الجذرية والأبصال حيث تسبب بعض أنواع النيماتودا بالمشاركة مع الفطريات والمسببات المرضية الأخرى تحطم أنسجة النبات مثل تعفن درنات البطاطا نتيجة الإصابة بنيماتودا الساق والأبصال *Ditylenchus destructor* كما يمكن أن تتحول التقرحات المتسببة عن نيماتودا التقرح *Pratylenchus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

تقصف الجذور

تسبب أنواع النيماتودا *Longidorus* spp و *Trichodorus* spp و *Paratrichodorus* 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 بالنيماتودا

تعرف الأعراض بأنها انعكاسات المرض على النبات نتيجة الإصابة بمسبب مرضي ما ، وتعتبر النيماتودا 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 النيماتودا عند وجود أي طور من أطوار نمو النيماتودا في الجزء المصاب من النبات ، أو في منطقة التربة المحيطة بالجذور .

تقسم الأعراض المرضية المتسببة عن النيماتودا 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 بالنيماتودا .

1- الأعراض الناتجة عن إصابة الجذور :

عند إصابة النبات بالنيماتودا 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 ومتقزمة .
- 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 النيماتودا 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 الأقحوان والكرايزنثيميم بنيماتودا 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 وتجعدها :**

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

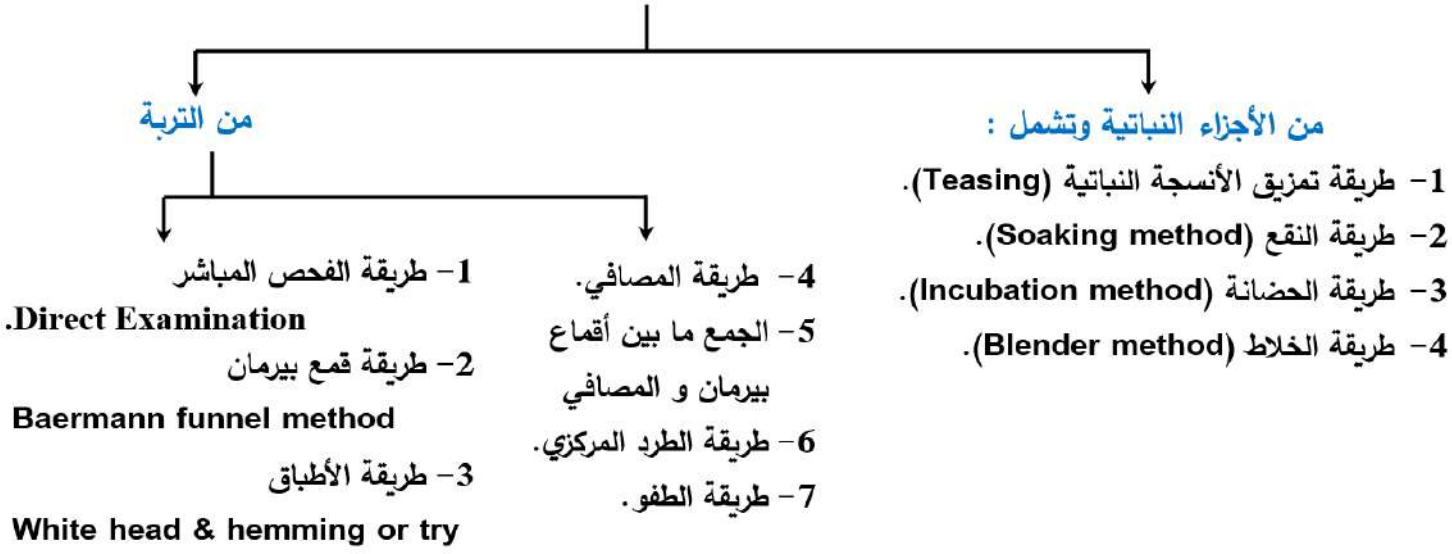
- **انتفاخ الساق وتشوهه :**

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 (ثأليل):

تسبب الإصابة بنيماتودا ثأليل حبوب القمح *Anguina tritici* تكون عقد بذرية (ثأليل) 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:

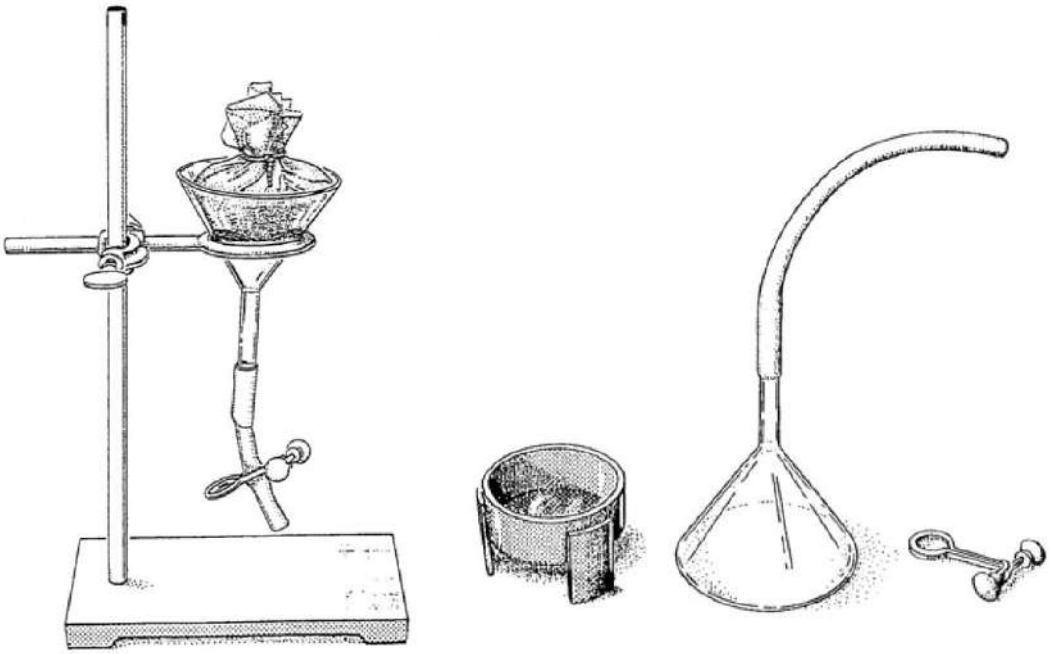
توضع عينة التربة في طبق بتري قطر (5-9 سم) مع قليل من الماء ويجرى الفحص المجهري بواسطة مجهر التشريح Stereomicroscope ثم تلتقط النيماتودا بإبرة دقيقة وتنقل إلى زجاجة ساعة بها قليل من الماء المقطر إذا كانت هناك رغبة في الحصول على النماذج الحية أو قليل من محلول القتل والتثبيت في حالة استخدامها لعمل تحضيرات 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 تنقع عينة التربة في كأس زجاجي (250 سم) في قليل من الماء ثم تنقل نقلاً كمياً 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 هذهِ 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 تفيد 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 وصحن 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 تترطب 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 كالآتي:

- 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 وتنقل نقلاً كمياً 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 مصفاتان عدد ثقوبها 60 في البوصة الطولية والثانية عدد ثقوبها 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^3 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^3) من التربة في كأس زجاجي كبير (250 سم^3) 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 ثقوبها 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 ثقوبها في البوصة الطولية 325 مش.
- يغسل الجزء المتبقي في المصفاة ثم ينقل نقلاً كمياً باستعمال تيار ضعيف من الماء إلى كأس.
- تصب محتويات الكأس الزجاجي في أطباق بتري صغيرة الحجم (قطر 5 سم) تقريباً وذلك للفحص المجهري 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 بتري 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 كمياً 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 ثقوبها 60 في البوصة الطولية ثم إلى مصفاة أخرى عدد ثقوبها 270 مش في البوصة الطولية ثم تغسل محتويات المصفاة الثانية جيداً وتنقل إلى كأس زجاجي أو أطباق بتري 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 ثقوبها 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 والدائمية:

❖ طريقة تحضير السلايدات أو الشرائح المؤقتة:

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

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 الدائمية:

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

هناك أربعة محاليل شائعة الاستخدام للتثبيت وهي:

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

طريقة سينهورست السريعة: (تحضير السلايدات أو الشرائح الدائمية)

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

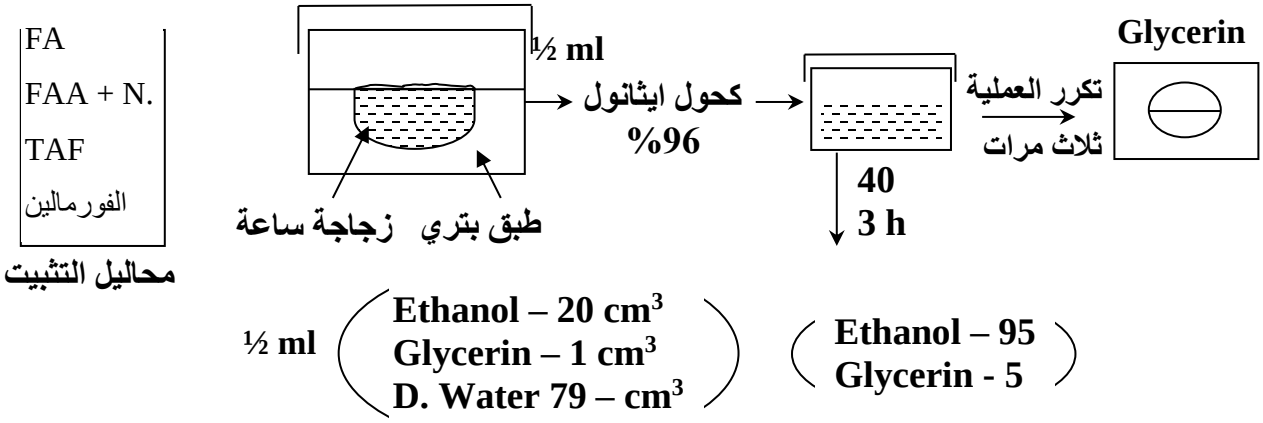
Ethanol 96%---------- 20cm³
Glycerine ---------- 1cm³
D.Water ---------- 79 cm³

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 cm³

Glycerine ---------- 5 cm^3

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 الكلسرين الموضوعة في سلايد ثم تحمل ويوضع عليها غطاء شريحة ويقفل أما بمادة طلاء الأظافر أو مادة Zut وتكون السلايدات جاهزة للفحص وممكن أن تبقى لمدة (6) أشهر.



حساب الكثافة العددية للنيماتودا:

لحساب الكثافة العددية للنيماتودا نتبع الخطوات التالية:

1- يحسب حجم المعلق النيماتودي (يوضع المعلق النيماتودي في بيكر مدرج ونقيس حجم المعلق).

2- يرج المعلق جيداً (لضمان توزيع النيماتودا بالتساوي في جميع أجزاء البيكر).

3- نسحب (1 مل) من المعلق بعد عملية الرج مباشرة وتوضع في سلايد مقسم خاص بعد النيماتودا ثم تفحص تحت الميكروسكوب ونحسب عدد النيماتودا في (1 مل) من المعلق.

4- تكرر هذه العملية (5 مرات) ... الخطوة الثالثة.

5- يتم حساب متوسط عدد النيماتودا في (1 مل).

6- يضرب الناتج في حجم المعلق الكلي للنيماتودا.

ومثال على ذلك:

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

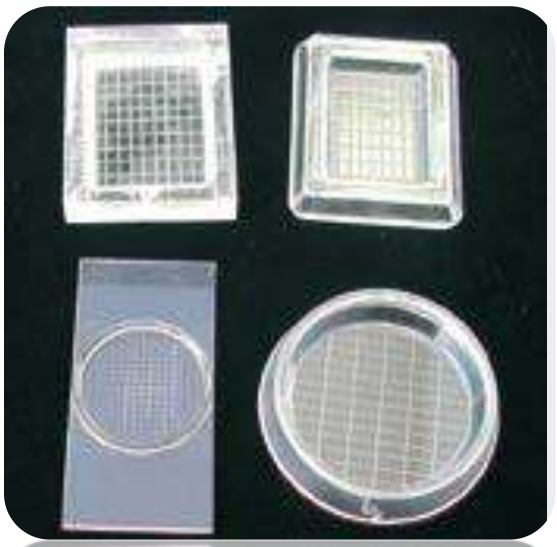
1- نوجد متوسط عدد النيماتودا في (1 مل):

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

$115 \div 5 = 23$ متوسط عدد النيماتودا في (1 مل)

2- يحسب عدد النيماتودا في المعلق الكلي:

$250 \times 23 = 5750$



طبق عد النيماتودا

طريقة تصبيغ الانسجة النباتية باستخدام هايبوكلورات الصوديوم وحامض الفوكسين

تعد هذه الطريقة من الطرق الجيدة في تصبيغ الجذور المصابة بالنيماتودا ولها فوائد عديدة وهي تجنب التعرض الشخصي للسموم مثل الفينولات فضلا عن ان مادة هايبوكلورات 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^3
- Acid Fuchsion ……. 3.5 grams
- D. water …… 750 cm^3

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 $سم^3$ من محلول هايبوكلورات الصوديوم تركيز 1% ويمكن زيادة التركيز للمحلول مابين 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 هايبوكلورات الصوديوم.
5- التخلص من الماء بتنشيف الجذور ويضاف 50 $سم^3$ من الماء مع حوالي 1 $سم^3$ 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 $سم^3$ 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 هايبوكلورات 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 هايبوكلورات 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 الهايبوكلورات ثم تجمع بواسطة تيار خفيف من الماء يسلط خلف المنخل الى كاس زجاجي (بيكر).

المحاضرة العاشرة

تصبيغ النيماتودا في الأنسجة النباتية:

يتم تحضير محلول اللاكتوفينول Lactophenol المضاف إليه صبغة الفوكسين الحامضية Acid Fuchsion 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.

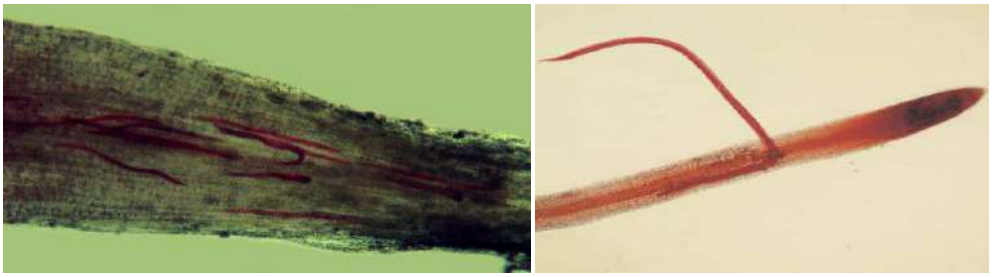
طريقة العمل:

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 تلون أكياس البيض الجيلاتينية باللون الأحمر ولكنها لا تفيد في عد البيض ضمن الكيس الجيلاتيني، كما أن البيض يبقى حياً.

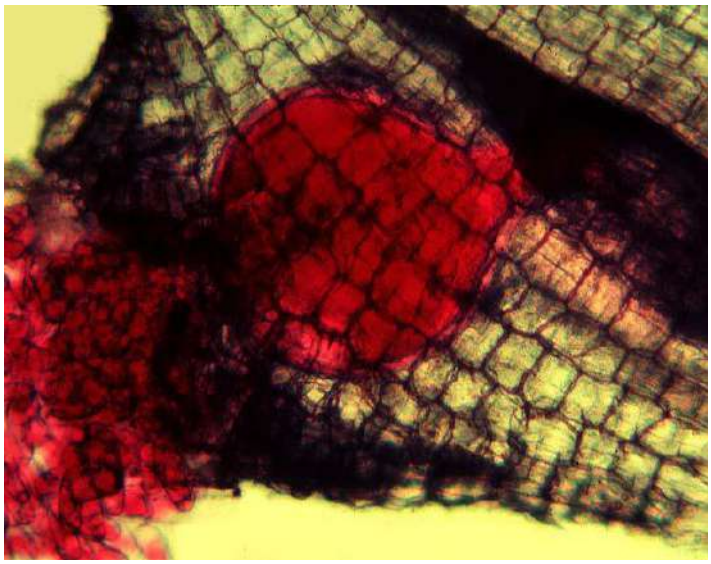
طريقة العمل:

1- تغسل الجذور النباتية بالماء جيداً للتخلص من حبيبات التربة والمواد العالقة.

2- تنقع الجذور في محلول الفوكسين 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 (طبيعة 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

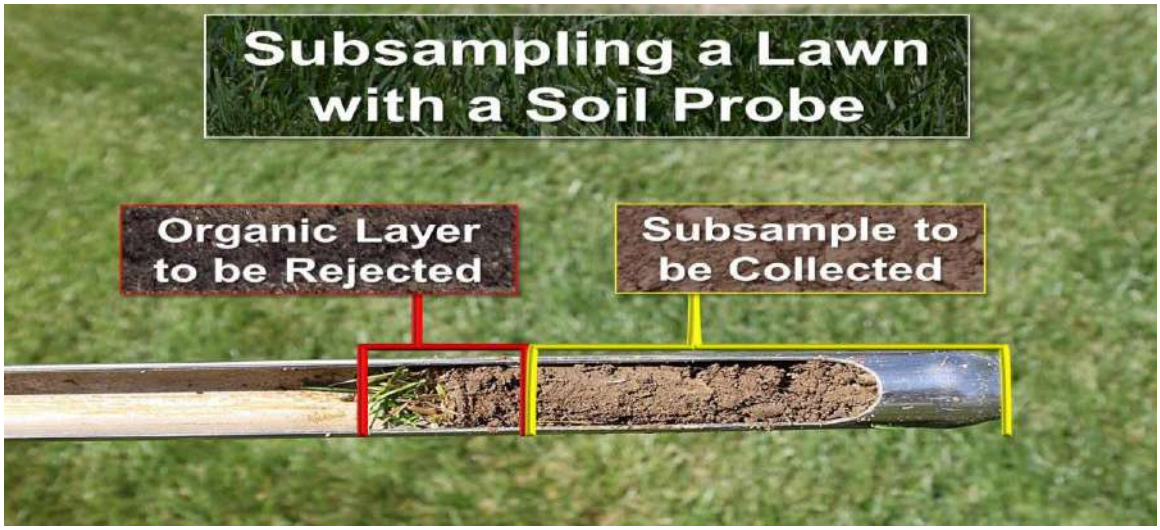
ان أعراض الاصابة بالنيماتودا فوق سطح التربة مشابهه الى أعراض نقص العناصر الغذائية وبعض الامراض الفسيولوجية الاخرى وبما ان أعراض النيماتودا تبدو غير متخصصة فانه من الضروري تحليل التربة للتأكد مما تحتويه التربة من أنواع النيماتودا النباتية وكثافتها العددية المنتشرة في الحقل ، وهناك بعض الادوات اللازمة 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 اثيلين لوضع العينات
3- قلم ودفتر لتسجيل الملاحظات
4- بطاقة تدوين المعلومات ترفق بالعينة وعادة ماتكون مغلفة بكيس من البولي اثيلين الشفاف حتى لاتتأثر برطوبة التربة.
5- براد عازل أو صندوق خشبي لحفظ العينات

اسطوانة جمع العينات Sampling tube

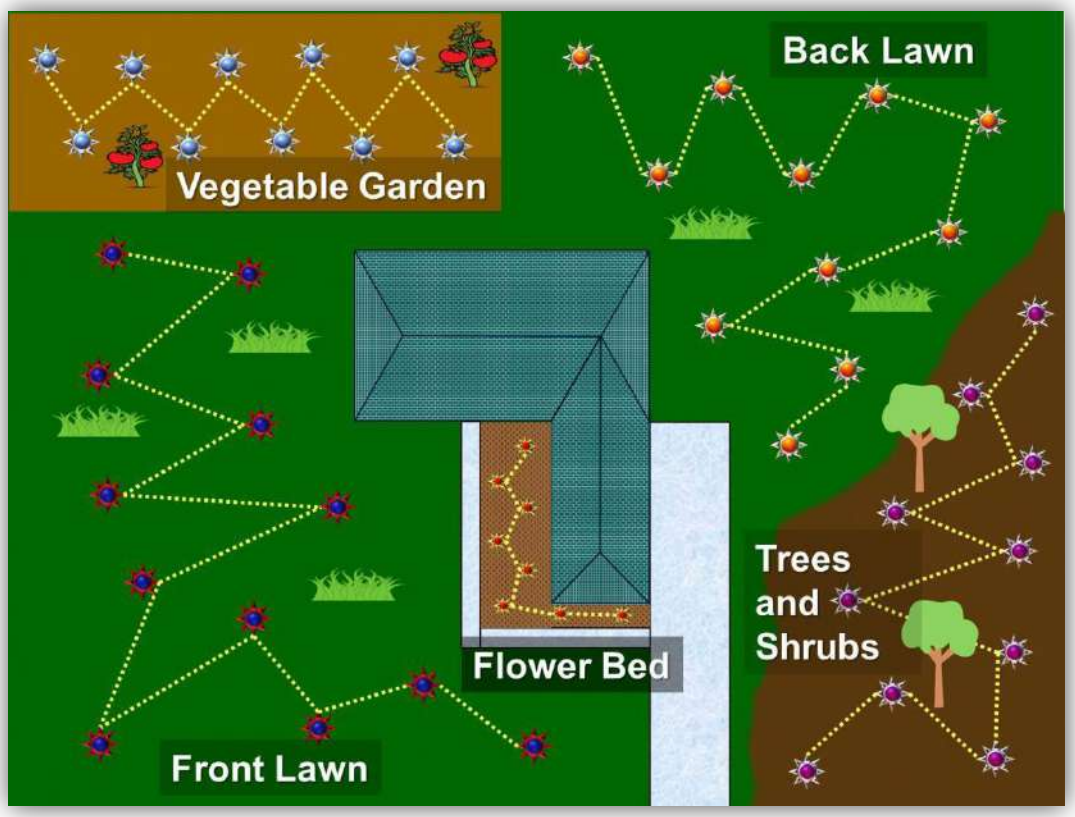
وهي الأكثر استعمالاً من قبل ألعاملين في مجال النيماتودا وهي عبارة عن أنبوبة اسطوانية طولها 38 سم وقطرها 2,5 سم (القطر الداخلي 2سم) مفتوحة من جانب واحد ويعلوها مقبض يدوي وطرفها السفلي دائري حاد لتسهيل اختراقها للتربة إلى عمق 20 سم عادة نتخلص دائما من الجزء العلوي للعينة (5سم العليا من الاسطوانة) لاحتوائها 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 الاقسام.
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 والاوساخ 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 تنقل للمختبر

ملاحظة يجب ان يتم عزل النيماتودا من عينات التربة خلال 1-2 يوم وكحد أقصى مدة أسبوع على ان تكون العينات محفوظة في الثلاجة 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 مابين 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 وترفق ببطاقة تعريف للعينة وتحفظ غي 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 ألة أخذ العينة بعد كل عينة منعا للتلوث وانتشار النيماتودا
5- يجب ان تكون الجذور الماخوذة مطمورة 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 منها اختبار العوائل النباتية المفرقة test host differential Carolina North وهي (التبغ صنف NC95 والقطن صنف Deltapine 61 والفلفل صنف California Wonder والرقي صنف Charleston Grey و فستق الحقل صنف Florrunner و الطماطة صنف Rutgrers) يعتمد هذا الاختبار على مدى قابلية إصابة – أو مقاومة – أصناف معينة، في ستة عوائل نباتية قياسية، للأنواع الأربعة الشائعة من نيماتودا تعتقد 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 والسلالة	استجابة الصنف النباتي للإصابة					
	قطن Delta pine 61	تبغ NC 95	فلفل California wonder	بطيخ Charleston Gray	فول سوداني Florunner	طماطم Rutgers
M. incognita						
سلالة رقم ١	[−]	[−]	+	+	−	+
سلالة رقم ٢	[−]	[+]	+	+	−	+
سلالة رقم ٣	[+]	[−]	+	+	−	+
سلالة رقم ٤	[+]	[+]	+	+	−	+
M. javanica	−	+	[−]	+	−	+
M. arenaria						
سلالة رقم ١	−	+	+	+	[+]	+
سلالة رقم ٢	−	+	+	+	[−]	+
M. hapla	−	+	+	[−]	+	+

−، + تدل على أن الصنف مقاوم أو قابل للإصابة، على التوالي.
□ تدل على العوائل المفرّقة المفتاحية.
(عن Sasser and Carter, 1985)

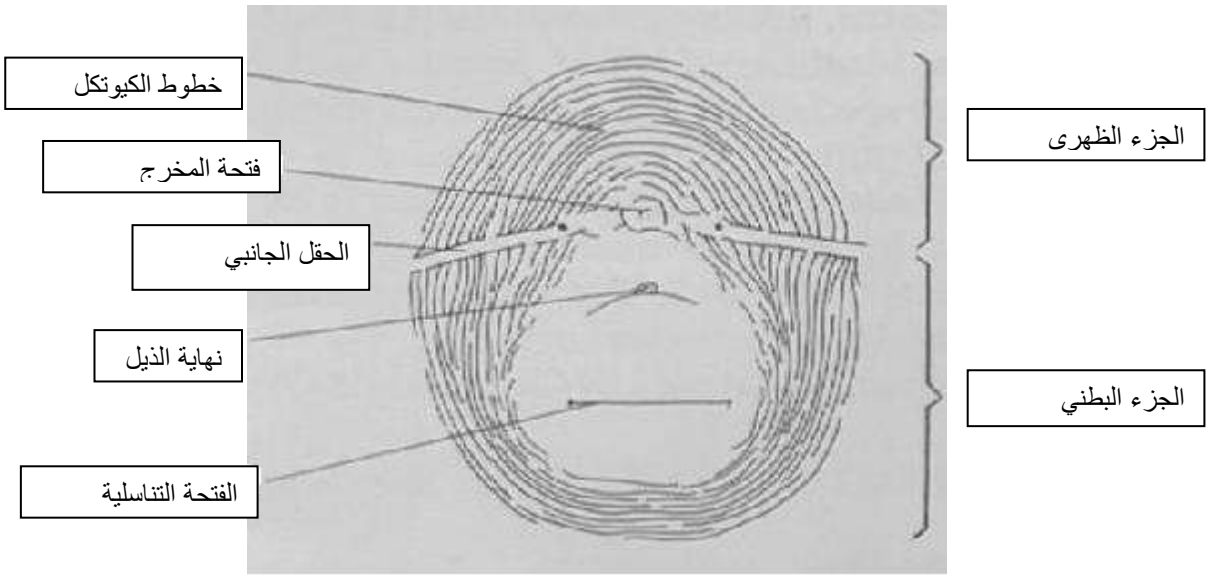
يتميز هذا الاختبار بأنه لا يحتاج إلى خبرة ومهارة فنية، كما أنه يميز أيضا بين السلالات المرضية المختلفة داخل النوع الواحد. فقد وجد أن النوع M. incognita يحتوي على أربع سلالات مرضية (حسب الإصابة على نباتات القطن والتبغ)، وكذلك يحتوي النوع M. arenaria على سلالتين (حسب الإصابة على الفول السوداني). إلا أن من عيوب هذا الاختبار اقتصاره على الأنواع الأربعة الشائع ، وكذلك طول الفترة اللازمة للحصول على نتائج يمكن مقارنتها بالجدول القياسي، حيث لابد 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 الأخر على الصفات الوراثية كعدد الكروموسومات وطريقة التكاثر، أو الصفات الكيموحيوية، أو على القدرة الإمراضية للنوع على

عوائل نباتية مفرقة. وتعتبر طريقة النمط العجاني للأنثى وطريقة العوائل المفرقة 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 انواع 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 وجود 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، آو كلا جانبي النمط.

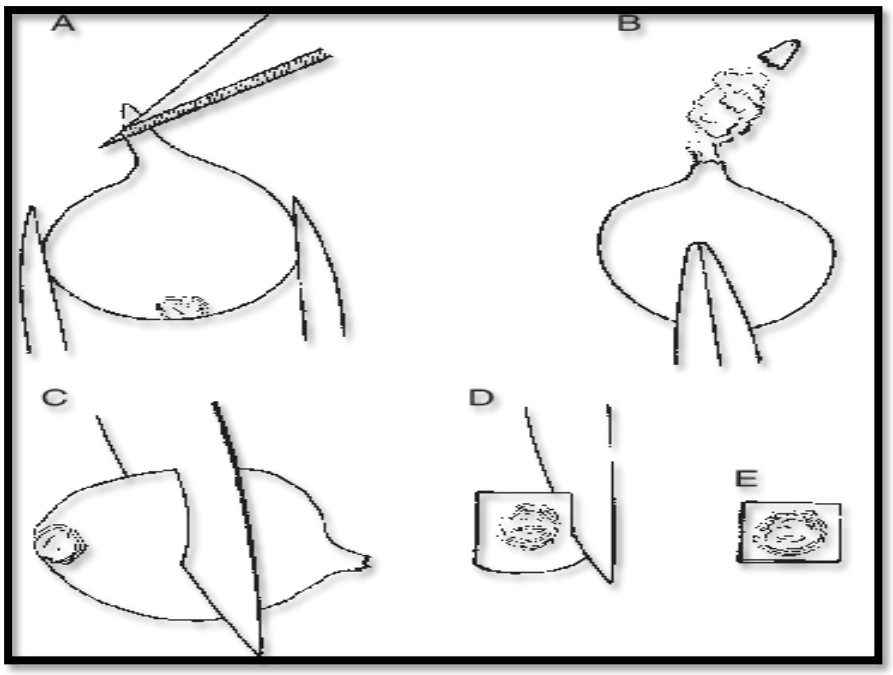


يعتبر استخدام النمط العجاني في التمييز بين جميع الأنواع طريقة سريعة، لكنها طريقة تحتاج إلى مهارة فنية في عمل النمط، وخبرة في التمييز بين الأنماط، التي أحياناً ما تتشابه كثيراً، لكنها لا تميز بين السلالات داخل النوع الواحد. وهناك عدة محاولات حديثة لتحسين الطريقة وزيادة كفاءتها.

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) .



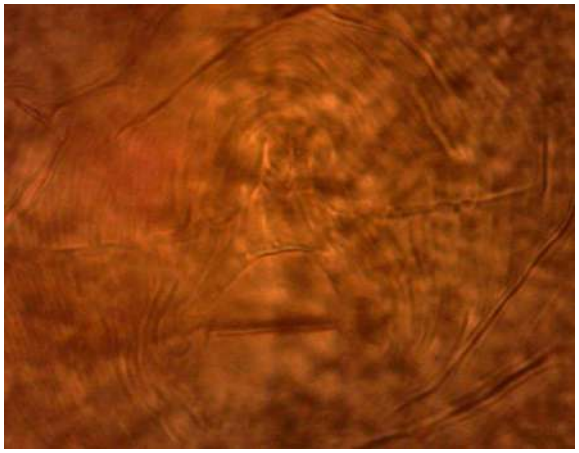
4- ينقل النمط العجاني بعد تنظيفه من الاحشاء الداخلية إلى شريحة زجاجية أخرى نظيفة تحوي على قطرة من اللاكتوفينول وبعد وضع غطاء الشريحة يتم ختم محيط غطاء الشريحة مع الشريحة بمادة صبغ الأظافر او بكندا بلسم وتترك لتجف .

5- تفحص المقاطع بواسطة المجهر الضوئي المركب (Binocular Microscope) .

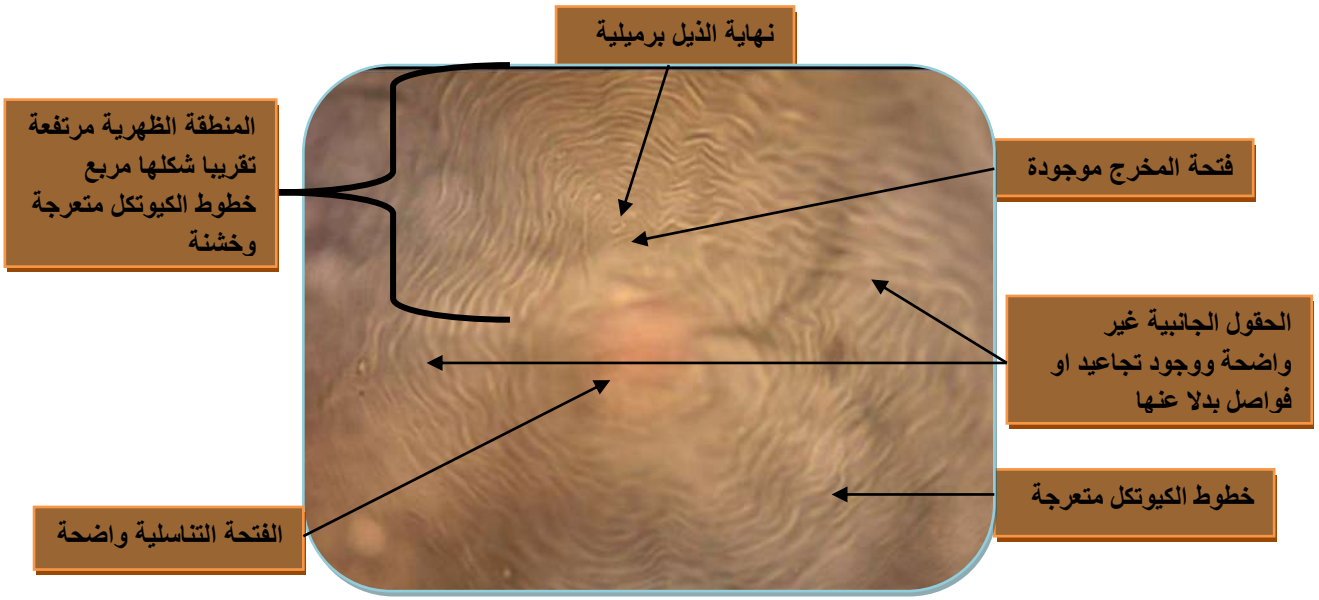
6- تشخص أنواع نيماتودا تعقد الجذور بالاستناد على الصفات المورفولوجية للنمط العجاني Perineal patterns للإناث البالغة .

الصفات المورفولوجية للنمط العجاني للانواع الثلاثة

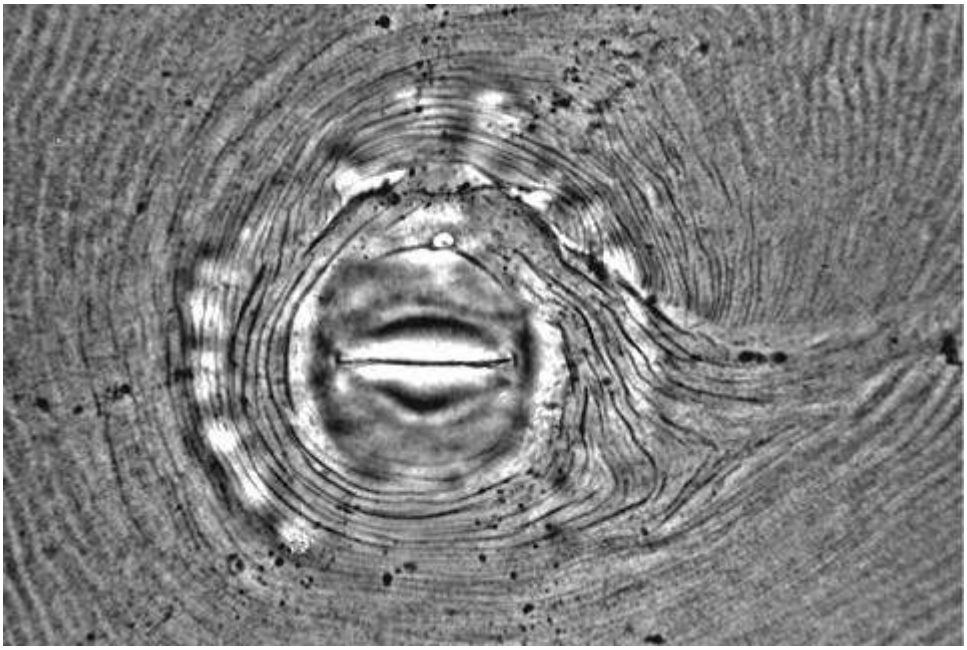
النوع *M.javanica* يتميز بوجود الحقلين الجانبين Lateral field بشكل واضح تقسم النمط العجاني الى منطقتين وهي المنطقة الظهرية Dorsal Arch والمنطقة البطنية Ventral Arch وتعد هذه اهم ميزة يتميز بها هذا النوع وتمتاز المنطقة الظهرية بخطوط الكيوتكل ذو قوس دائري منخفض وخطوط الكيوتكل تكون خشنة مستقيمة الى متموجة احيانا الفتحة التناسلية Vulvaوفتحة 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 او تجاعيد بدلا عنها وتميزت المنطقة الظهرية بارتفاعها وتبدو ومربعة الشكل تقريبا، خطوط الكيوتكل متعرجة **و** خشنة نهاية الذيل برميلية الشكل كما في 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 ووجود 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 تسئ 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% فورماليهايد) بمعدل 10 مل و1مل من حامض الخليك و80 مل من الماء المقطر المعقم

Formalin (40% formaldehyde)---------- 10 cm³

Glacial acetic acid ---------- 1cm³

D. Water ---------- 80 cm³

طريقة العمل :-

1- تجمع النيماتودا في 2-3 مل من الماء في زجاجة الساعة

2- تضاف كمية مناسبة من المثبت الساخن (90مْ) 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 و91 مل من الماء المقطر المعقم

Tri ethanol amine ---------- 2cm³

Formalin (Formaldehyde 40%) ---------- 7cm³

D.Water ---------- 91 cm³

طريقة العمل :-

1- تجمع النيماتودا في 2-3 مل من الماء في زجاجة الساعة

2- تنقل الى الفرن بدرجة حرارة 50 مْ 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 وتثبين 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 الاثيلي 96% بمعدل 100 مل إلى الفورمالين تركيز (40% فورمالديهايد) بمعدل 30 مل و5مل من حامض الخليك و200 مل من الماء المقطر المعقم

Ethanol alcohol 96%---------- 100cm³

Formalin (Formaldehyde 40%) ---------- 30 cm³

Glacial acetic acid ---------- 5 cm³

D . Water ---------- 200 cm³

طريقة العمل :-

1- تجمع النيماتودا في 2-3 مل من الماء في زجاجة الساعة

2- تنقل إلى الفرن بدرجة حرارة 50 مْ 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 والتحززات 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 و38 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 واذ كان المطلوب تحضير الفورمالين بتركيز 4% فيؤخذ 4 مل من الفورمالين التجاري ويكمل بـ 36 مل اذ كان تركيز الفورمالديهايد 40% و 33 مل من الماء المقطر إذ 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- تنقل الى الفرن بدرجة حرارة 40 - 45 مْ ولفترة قصيرة بهدف ترخيتها

3- يضاف المثبت بدرجة حرارة 40-45 مْ 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 الكحول70% والفورمالين أكثر المحاليل شيوعا 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.