

التشخيص المورفولوجي والجزيئي لأنواع نيماتودا تعقد الجذور المرافقة لأشجار وشتلات الزيتون في بغداد وبابل وكربلاء العراق

**اسماء منصور عبدالرسول
قسم وقاية النبات/كلية الزراعة والغابات/جامعة الموصل
**E-mail: asmaa_mnsr@yahoo.com

*وارف محمد حنون زينب عليوي محمد التميمي
قسم وقاية النبات/كلية الزراعة/جامعة كربلاء
*E-mail: Waref_Mohamed@yahoo.com⁽³⁾

(أستلم 2018/ 6 /26 ؛ قُبِلَ 2018/ 11 /1)

المخلص

هدفت هذه الدراسة إلى إجراء مسح حقلي للتعرف على أنواع نيماتودا تعقد الجذور المنطفلة و المرافقة لأشجار وشتلات الزيتون في ثلاث محافظات وهي بغداد/ مزرعة الزعفرانية وبابل/ السدة وكربلاء/ العطيشي ومحطة بستانة الهندية سجلت أعلى نسبة إصابة وأعلى دليل مرضي لتعقد الجذور في بغداد/ مزرعة الزعفرانية/ الحقل بلغت 100% و 3 لكل منهما على التوالي في حين سجلت نفس المنطقة/ الظلة اقل نسبة إصابة ودليل مرضي لتعقد الجذور بلغت 6.6% و 0 لكل منهما على التوالي. تم تشخيص نوعين من نيماتودا تعقد الجذور عن طريق النمط العجاني وهما *M.javanica* و *M.incognita* في جميع مناطق الدراسة وتم تأكيد تشخيص النوع *M.incognita* بتقنية التشخيص الجزيئي PCR. الكلمات الدالة : الزيتون، تشخيص نيماتودا تعقد الجذور، النمط العجاني، التشخيص الجزيئي.

Morphological and Molecular Diagnosis of Root Knot Nematode Species Associated with Olive Seedling and Trees in Baghdad, Babil and Karbala/ Iraq

Waref M. Hanoon Zeinab A. Altememe
Department of Plant Protection/ College of Agriculture
University of Karbala

Asmaa M. Abdel rasool
Department of Plant Protection
College of Agriculture and Forestry
University of Mosul

ABSTRACT

The study was aimed to conduct a field survey to identify the Root knot nematodes species associated with olive trees and nurseries in provinces of Baghdad /Al- Zaafaraniya, Babil /Al- Sada, Karbala /Al-Atishi and Al-Hindiah Horticulture Center. Baghdad /Al- Zaafaraniya had the highest percentage of disease incidence (100%) and root-knot index (3) in the field, while nurseries under shade conditions in the same region had the least percentage of disease incidence and root-knot index (6.6% and 0), respectively.

Two species of root-knot nematodes *M. javanica* and *M.incognita* were identified in all study location, the perineal pattern technique was used for identification. *M.incognita* identification was molecularly confirmed by the PCR to be used in all study trials.

Keywords: Olive, Root knot nematode Diagnosis, Perineal Pattern, PCR.

المقدمة

شجرة الزيتون Olive trees شجرة مباركة ورد ذكرها في القرآن الكريم سبع مرات واسمها العلمي *Olea europaea* تعود إلى العائلة الزيتونية Oleacea وهي من الأشجار الخشبية المعمرة دائمة الخضرة (الكاتب ، 2000)، تشتهر زراعتها في مناطق حوض البحر الأبيض المتوسط و يعتقد العلماء أن الزيتون المزروع حالياً ناتج من تطور الزيتون البري وتزيد أصناف الزيتون على 1000 صنف يوجد منها في العراق أكثر من 40 صنفاً (الدوري والراوي، 2000). تشير الإحصائيات أن عدد أشجار الزيتون المزروعة في العراق 662,652 شجرة والإنتاج السنوي من الثمار هو 15113 طن ومعدل إنتاج الشجرة الواحدة في العراق هو 22,8 كغم، ونسبة أشجار الزيتون لأشجار الفاكهة الأخرى هي 2,5% (مديرية الإحصاء الزراعي، 2015).

تصاب أشجار الزيتون بالعديد من الأمراض التي تصيب المجموع الجذري ومن ضمنها الأمراض النيماتودية ويعد مرض تعقد الجذور Root-Knot Disease المتسبب عن الجنس *Meloidogyne spp* واحد من أهم الأمراض النيماتودية التي تصيب مدى واسع من النباتات مسببة خسائر اقتصادية كبيرة يعود ذلك إلى عدة عوامل من أهمها، انتشارها السريع في جميع أنحاء العالم، ومداهمها العائلي الواسع، وكذلك تعاونها مع الأحياء الأخرى بتهيأت منافذ لدخول مسببات المرضية مثل الفطريات والبكتيريا متسببة في إحداث الكثير من الأمراض النباتية المركبة التي يصعب مكافحتها، بالإضافة إلى قدرتها على كسر مقاومة النباتات لبعض الأمراض النباتية الأخرى و إضعاف النباتات (ابو غربية، 2010) وأول إشارة إليها كانت من قبل Berkeley عام 1855 م على جذور نباتات الخيار المزروعة في أحد البيوت الزجاجية في إنجلترا، بينما كانت أول إشارة لوجود نيماتودا تعقد الجذور في العراق عام 1955 م (الاعظمي، 1955).

تعد نيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne spp.* من أكثر مجموعات النيماتودا المتطفلة على النبات المنتشرة عالمياً وخطرها في المناطق الاستوائية والمعتدلة (ثابت وآخرون، 1976) ويتركز انتشارها في المناطق ذات المناخ الدافئ والحر والشتاء القصير أو المعتدل (Agrios, 2005). يعرف لحد الآن أكثر من 80 نوعاً مسجلاً تعد الأنواع التالية (*M. incognita* و *M. javanica* و *M. arenaria* و *M. hapla*) من الأنواع الرئيسية المنتشرة في معظم المناطق الزراعية في العالم (Karsen, 2002). أما مدى انتشارها وأهميتها عربياً فقد أوضحت الدراسات التي أجريت ترتيبها تنازلياً وهي *M.javanica* (57.25%) و *M.incognita* (30%) و *M.arenaria* (25.10%) و *M. hapla* (1.75%)، *M. artiella* (0.5%) (ابو غربية والعزة، 2004). أما انتشارها محلياً فتعتبر نيماتودا تعقد الجذور وبالأخص النوع *M.javanica* من أكثر الأنواع انتشاراً في معظم الدول (Cook, 2000) والعراق إذ شخّصت الأنواع الأربعة الرئيسية محلياً بالإضافة إلى نوع خامس وهو *M. thamsi* (الاعظمي، 1955 ؛ Katcho, 1972 ؛ الراوي، 1974 ؛ قاسم، 1980).

هناك العديد من الطرق المستخدمة في تشخيص وتميز الأنواع المختلفة لنيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne spp.* ويعد الجمع بين الطرق التشخيصية ضرورياً من أجل إعطاء تعريف دقيق وصورة واضحة لأنواع وسلالات نيماتودا تعقد الجذور للوصول إلى طريقة مكافحة فعالة لها. و أكثر هذه الطرق تطبيقاً هي الطريقة المورفولوجية التي تعتمد على الصفات المورفولوجية العامة أي الصفات النوعية والقياسية وتعد الصفات النوعية الأكثر جدوى وفائدة من القياسية في إعطاء التعريف الدقيق (Karajeh, 2004؛ Jepson, 1983) للأطوار الحياتية من إناث وذكور و يافعات الطور الثاني، ويعد شكل النمط العجاني Perineal patten في مؤخرة جسم الأنثى الأهم من بين الصفات الشكلية والنوعية للتمييز بين الأنواع الأربعة الشائعة *M.javanica* و *M.incognita* و *M.hapla* و *M.arenaria* (ابو غربية، 2010).

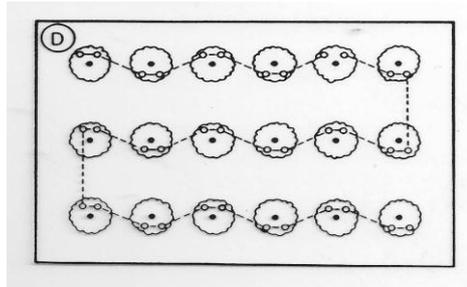
أما أدق وأسرع وأحدث طرق التشخيص المستخدمة التي أثبتت نجاحاً وهي تقنية التشخيص الجزيئي باستخدام البصمة الوراثية لـ DNA والتي من خلالها يمكن تمييز خلائط من أنواع النيماتودا وتعطي نتائجاً دقيقة خلال أيام قليلة من خلال عزل

وتتقنية الـ DNA من بيض او يافعات الطور الثاني أو الإناث مفردة او مجتمعة، ثم تضخيم الـ DNA من خلال تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase Chain Reaction للتفريق بين أنواع نيماتودا تعقد الجذور (Zijlstra et al., 1995) باستخدام بادئات طولها 18-23 قاعدة تكمل التسلسلات الموجودة على الـ DNA، ثم يتم إجراء فصل كهربائي لحزم الـ DNA المضخمة ومشاهدتها تحت الأشعة فوق البنفسجية، ثم مقارنة حجم الحزم الناتجة مع ما يمثلها من كل نوع واستخدمت هذه الطريقة في مصر (Haroon et al., 2003) والأردن (Karajeh et al., 2005) في تمييز الانواع المحلية من نيماتودا تعقد الجذور ضمن المنطقة العربية وفي العراق لم نعثر على اي دراسة حول استخدام تقنية التشخيص الجزئي باستخدام البصمة الوراثية.

المواد وطرائق العمل

أجري المسح الحقل في ثلاث محافظات وهي بغداد/الزعفرانية تمثلت بمزرعة الزعفرانية (اربع بيوت بلاستيكية، ظلة ، حقل للزيتون) ومحافظة بابل/السدة شمل المسح ثلاثة بساتين متجاورة أما محافظة كربلاء - العطيبي شمل المسح حقل تابع لكلية الزراعة ومحطة بستنة الهندية.

1- جمع العينات: جُمعت عينات من جذور شتلات وأشجار الزيتون في مناطق المسح المذكورة سابقا أخذت العينات من الجذور الرفيعة عشوائياً بعد قلع الشتلات الصغيرة بالكامل أما بالنسبة إلى الأشجار الكبيرة تم الحفر في التربة القريبة من مساقط الأوراق من الجهة اليمنى للشجرة الأولى ويقابله من الجهة اليسرى من الشجرة الثانية وحسب طريقة (Barker 1985) كما موضحة في الشكل (1) وعلى بعد 30-50 سم عن جذع الشجرة وتراوح عمق الحفر بين 10-30 سم حسب عمر الشجرة لأخذ العينات من الجذور الرفيعة.



الشكل 1 : نموذج مقترح لجمع عينات التربة من الاشجار والشجيرات عن (Barker 1985).

نقلت عينات الجذور والتربة الى المختبر ووضعت في الثلاجة عند درجة حرارة 5°م لحين اجراء عملية تشخيص الاجناس المتطفلة على جذور الزيتون و تواجدتها في كل منطقة من مناطق الدراسة تم حساب نسبة الإصابة في كل منطقة من مناطق الدراسة بالاستعانة بالمعادلة التالية

$$\text{النسبة المئوية للإصابة} = \frac{\text{عدد النباتات المصابة}}{\text{العدد الكلي للنباتات المفحوصة}} \times 100$$

فضلا عن حساب الدليل المرضي Root-knot index / منطقة من مناطق الدراسة بالاستناد إلى الدليل المرضي الذي

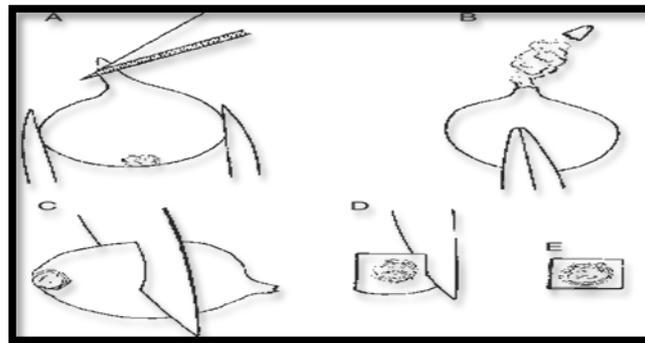
وضعه كل من (Taylor and Sasser, 1978) و (Hartman and Sasser, 1987).

الجدول 1: يوضح معايير قياس الدليل المرضي لنيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne spp.* الموضوع من قبل Taylor and Sasser, (1978) و Hartman and Sasser, (1987).

عدد العقد أو كتل البيض	الدليل المرضي
جذور خالية من العقد أو كتل البيض	صفر
جذور فيها 1-2 عقدة أو كتلة بيض	1
جذور فيها 3 - 10 عقد أو كتل بيض	2
جذور فيها 11 - 30 عقدة أو كتلة بيض	3
جذور فيها 31 - 100 عقدة أو كتلة بيض	4
جذور فيها أكثر من 100 عقدة أو كتلة بيض	5

2- تشخيص أنواع نيماتودا تعقد الجذور المتطفلة على الزيتون بالاعتماد على الصفات المورفولوجية للنمط العجاني **Perineal Pattern**:

جلبت عينات جذور الزيتون من مناطق المسح التي ظهرت عليها أعراض الإصابة بنيماتودا تعقد الجذور إلى المختبر و غسلت الجذور المصابة بالنيماتودا بتيار ماء خفيف لإزالة الأتربة والمواد العالقة بها، استخرجت منها الإناث بعد إزالة كتل البيض من نهاياتها الخلفية بواسطة إبرة التشريح والاستعانة بمجهر التشريح (Stereomicroscope)، شخّصت أنواع نيماتودا تعقد الجذور بالاستناد على الصفات المورفولوجية للنمط العجاني Perineal pattern للإناث البالغة حسب Taylor and Netscher, (1974) و Hartman and Sasser, (1987)، استخرجت خمسة إناث بالغة من كل عينة لغرض التشخيص، إذ وضعت الأنثى في قطرة من الكليسرين لمدة 3-5 دقائق على شريحة زجاجية نظيفة وقطعت النهاية الخلفية لها بواسطة مشرط حاد صمم لهذا الغرض وجرى تنظيفها من الأحشاء الداخلية العالقة بالمؤخرة الشكل (2) ثم نقلت إلى شريحة زجاجية أخرى تحوي قطرة من اللاكتوفينول وبعد وضع غطاء الشريحة ثم ختم محيط غطاء الشريحة مع الشريحة بمادة صبغ الأظافر وتركت لتجف، وفحصت المقاطع بواسطة المجهر الضوئي المركب (Binocular Microscope).



الشكل 2: طريقة تحضير النمط العجاني Perineal Pattern

3- تشخيص نوع نيماتودا تعقد الجذور بالاعتماد على تفاعل البلمرة المتسلسل **Polymerase Chain Reaction (PCR)**

اجري هذا التشخيص في مختبر فايروسات النبات التابع لقسم وقاية النبات/ كلية الزراعة/ جامعة كربلاء وبمساعدة د.عدنان عبدالجليل، تم عزل الحامض النووي DNA من اناث نيماتودا تعقد الجذور المعزولة من أشجار وشتلات الزيتون وحسب طريقة Robin *et al.*, 2005 لغرض تأكيد تشخيص النوع الذي ظهر بنسبة كبيرة في محافظة كربلاء بعد اكثاره على مزرعة نقية .Pure culture

1- عزل الحامض النووي DNA لاناث نيماتودا تعقد الجذور:

- أجريت عملية استخلاص للـ DNA الكلي من المزرعة النقية المصابة حسب طريقة العمل الموصوفة مع العدة DNeasy Plant Mini kit من شركة Qiagen الالمانية وكما يلي:
- 1- اخذت عينة مكونة من (50-100 مليغرام) من الاناث الناضجة، ووضعت في انبوبة صغيرة (Eppendrofe tube) اضيف لها 400 ميكرو لتر من البفر API و 4 ميكرو لتر من الانزيم RNase وسحقت العينة جيدا لإزالة الكتل العالقة باستخدام المدقة الصغيرة (Micro pestle) ورجت العينة رجاً خفيفاً باستخدام جهاز الـ Vortex.
- 2- سخن الخليط بدرجة حرارة 65 م° لمدة 10 دقائق مع الرج 2-3 مرة خلال فترة التسخين ويتم في هذه الخطوة تحطيم خلايا العينة.
- 3- اضيف 130 ميكرو لتر من بفر P3 الى المزيج مع الرج ثم حفظ بالثلج لمدة 5 دقائق في هذه الخطوة يتم تحطيم البروتينات.
- 4- اجراء انتباز مركزي للعينة في جهاز الطرد المركزي (14000 دورة في الدقيقة) لمدة 5 دقائق ونقل الرائق الى انبوبة نظيفة. ليتم في هذه الخطوة التخلص من الرواسب.
- 5- اخذ ناتج عملية التحطيم والتحلل بواسطة الماصة الصغيرة ونقلت الى انبوبة جمع جديدة حجم 2مل من نوع (QIAshredder Mini spin column lilac) ثم نقلت الى جهاز الطرد المركزي (14000 دورة في الدقيقة) لمدة 2 دقيقة.
- 6- نقل 450 ميكرو لتر من السائل المتدفق النازل من الخطوة السابقة الى أنبوبة جديدة.
- 7- اضيف حجم ونصف الحجم من بفر AW1 المضاف له ايثانول للناتج من الخطوة السابقة اي تقريبا 675 ميكرو لتر ويقل الحجم حسب حجم المحلول من الخطوة السابقة، وخط المحتويات جيدا باستخدام الماصة الصغيرة.
- 8- سحب 650 ميكرو لتر من خليط الخطوة السابقة مع الراسب باستخدام ماصة ووضعت في انبوب جمع جديد حجم 2 مل من نوع DNeasy Mini spin column التي تحتوي على فلتر خاص ثم نقلت جميع الانابيب الى جهاز الطرد المركزي (8000 دورة في الدقيقة) لمدة دقيقة واحدة بعدها يتم التخلص من السائل النافذ.
- 9- كررت الخطوة السابقة مع العينة المتبقية باستخدام انبوب جمع واطافة بفر AW1.
- 10- وضعت فلتر DNeasy Mini spin column في انبوب جمع جديد 2 مل واطيف له 500 ميكرو لتر من بفر AW2 والمضاف له ايثانول ثم إلى جهاز الطرد المركزي (8000 دورة في الدقيقة) لمدة دقيقة واحدة.
- 11- إضافة 500 ميكرو لتر بعدها من بفر AW2 إلى DNeasy Mini spin column ثم نقلت الى جهاز الطرد المركزي (14000 دورة في الدقيقة) لمدة 2 دقيقة للتخلص من الراشح واجري عملية انتباز مركزي اخرى بسرعة 14000 دورة/ دقيقة، لمدة 2 دقيقة لأجل تجفيف الفلتر الحاوي على الحمض النووي الموجود في الاعمدة والتخلص من بقايا كحول الايثيلي. وهذه الخطوة تمنع من انتقال الكحول مع الخليط وجمعت في انبوب جديد. بعد الغسل مع بفر AW2.
- 12- اضيف بفر AE الى الفلاتر الناتجة من الخطوة السابقة بعدها التحضين لمدة 5 دقائق في درجة حرارة الغرفة (15-25 درجة مئوية)، ثم نقلت الانابيب الحاوية على الفلاتر الى جهاز الطرد المركزي (8000 دورة في الدقيقة) لمدة دقيقة واحدة.

13- كررت الخطوة السابقة مرة اخرى باستخدام انبوب جديد ومن الممكن إعادة هذه الخطوة بإضافة 50 ميكروليتر من بفر AE الى الفلاتر، وفي هذه الحالة يكون تركيز الحمض النووي اقل.

2- تفاعل البلمرة المتسلسل PCR

استخدم الـ DNA كقالب في التفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase chain reaction باستخدام Ready-To-Go PCR Beads kit من شركة GE Healthcare / المملكة المتحدة وكالاتي:

1- كان الحجم النهائي للتفاعل هو 25 مايكروليتر ويتكون من محلول التفاعل، $MgCl_2$ ، dNTPs و انزيم Taq polymerase التي تكون على شكل مادة جافة والتي اذيت في 21 مايكروليتر من الماء المقطر بالإضافة الى 1 مايكروليتر من كل من البادئات الموضحة أدناه (الجدول 3) و 2 مايكروليتر من الـ DNA.

الجدول 2: صفات البادئ المستخدم لتشخيص نيماتودا تعقد الجذور

نوع نيماتودا تعقد الجذور	تسلسل البادئ من (5'-3')	اسم البادئ	حجم الحزمة (bp)	المصدر
<i>Meloido gyne incognita</i>	CGCGAATRGCTCATTACAACAGC	Forward primer Nem-18S-F	898	Robin et al., 2005
	GGGCGGTATCTGATCGCC	Reverse primer Nem-18S-R		

ظروف التفاعل تبدأ بخطوة مرحلة المسخ الاولي Intial Denaturation لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة 94 م° ثم 35 دورة تتكون من ثلاث مراحل تبدأ بالتفكك مدة 30 ثانية بدرجة حرارة 94 م° ثم الالتصاق Annealing لمدة 30 ثانية بدرجة حرارة 54 م° بعدها التمدد Extension لمدة 60 ثانية بدرجة حرارة 72 م°. بعدها تبدأ الخطوة الأخيرة للتفاعل المتمثلة بالتمدد النهائي Final extension لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة 72 م°.

الجدول 3: برنامج تضاعف الجين rDNA18s

عدد الدورات	درجة الحرارة C°	الوقت	عدد الدورات
-	94	5 دقائق	مرحلة المسخ الاولي Intial Denaturation
35 دورة	94	30 ثانية	المسخ Denaturation
	54	30 ثانية	الالتصاق (التصاق) Annealing
	72	60 ثانية	الاستطالة Extension
-	72	10 دقائق	مرحلة الاستطالة النهائية Final extension
-	4	-	المرحلة النهائية للخرن Storing

مرحلة الترحيل رحل ناتج الـ PCR باستخدام الترحيل الكهربائي على وسط هلام Agrose تركيز 1.5% لمدة 30-60 دقيقة بعد إضافة 5 مايكروليتر من صبغة بروميد الاثيديوم بوجود دليل حجمي Ladder (100pb) لتحديد حجم حزمة تفاعل البلمرة على هلام الاكروز ببولنتية مقدارها 70 فولت وتيار 65 لتبدأ حركة الحامض النووي من القطب السالب الى القطب الموجب

وبعد اكتمال عملية الترحيل تم ملاحظة الحزم باستخدام جهاز الأشعة فوق البنفسجية UV transiluminator على طول موجي 365 نانوميتر لغرض فحص نتائج التفاعل.

حفظ ناتج التفاعل الفائض في الثلجة تحت درجة حرارة - 20 م لغرض إرساله الى شركة Macrogen في سيئول /كوريا الجنوبية المختصة بتحديد التسلسل النوكليوتيدي لعينات الـ DNA وتم تحليل النتائج باستخدام طرق مختلفة من المعلوماتية الحيوية من قبل د.عدنان عبد الجليل وإرسالها لغرض التوثيق إلى المركز الوطني للمعلومات الحيوية/ امريكا وحسب الموقع الالكتروني [/https://www.ncbi.nlm.nih.gov](https://www.ncbi.nlm.nih.gov) وبعد ملء البيانات والإجابة على أسئلة المتخصصين.

النتائج والمناقشة

نسبة الإصابة ودليل فهرست العقد الجذرية:

يتضح من نتائج (الجدول 4) ان أعلى نسبة اصابة سجلت في بغداد/ مزرعة الزعفرانية/ الحقل ثلثها نفس المنطقة البيت البلاستيكي 1 اذ وصلت نسبة الإصابة الى 100% و 93.3% لكل منهما على التوالي في حين وصل دليل فهرست العقد الجذرية الى 3 و 3 لكل منهما على التوالي، لوحظت أقل نسبة اصابة في بغداد/ مزرعة الزعفرانية/ الظلة، وفي كربلاء محطة بستنة الهندية الظلة اذ وصلت نسبة الإصابة الى 6.6% و 30% لكل منهما على التوالي ووصل دليل فهرست العقد الجذرية الى 0 و 1 لكل منهما على التوالي، وربما يرجع التباين في نسب الإصابة في مواقع الدراسة الى اختلاف طرق الري من منطقة لآخرى (عياش، 2014). وربما يرجع سبب ان الشتلات في الظلة كانت مزروعة في اكياس من البولي اثلين الاسود والمعروف عن اللون الاسود انه يمتص الحرارة وبالتالي تقلل من كمية الرطوبة التي تحتاجها النيماتودا وتجف التربة بسرعة مقارنة مع تلك المزروعة في الارض حيث تحتفظ الارض بالرطوبة لفترة أطول نتيجة لزيادة المساحة السطحية لها مقارنة مع الاكياس.

وقد يكون السبب هو ترك اصحاب المشاتل التربة معرضة لأشعة الشمس لفترات طويلة قبل تعبئة الأكياس وهذا يعرض النيماتودا لأشعة الشمس المباشرة وبالتالي الجفاف وقلة أعدادها وربما يعود السبب الى حساسية الاصناف المزروعة في كل موقع من مواقع الدراسة او نتيجة وجود بعض المفترسات والمتطفلات التي تتطفل على النيماتودا في المواقع التي قلت بها أعداد العقد والاناث وكنت البيض وربما بسبب استخدام المبيدات او الأسمدة التي تزود النبات بوسائل إضافية للدفاع عن نفسه او العمليات الزراعية واحد من هذه الأسباب او أكثر تؤثر على أطوار النيماتودا وبالتالي تتعكس على الإصابة (الحازمي، 1992 و المصري واخرون، 2011، 2016؛ Ali et al., 2016) وربما عدم ملائمة الصنف المزروع للنيماتودا أو ان المواد الغذائية للجذر كانت غير مستساغة ولم تكمل دورة حياتها وربما كانت الإصابة حديثة ولم تتمكن النيماتودا بعد من إكمال تطورها على المجموع الجذري.

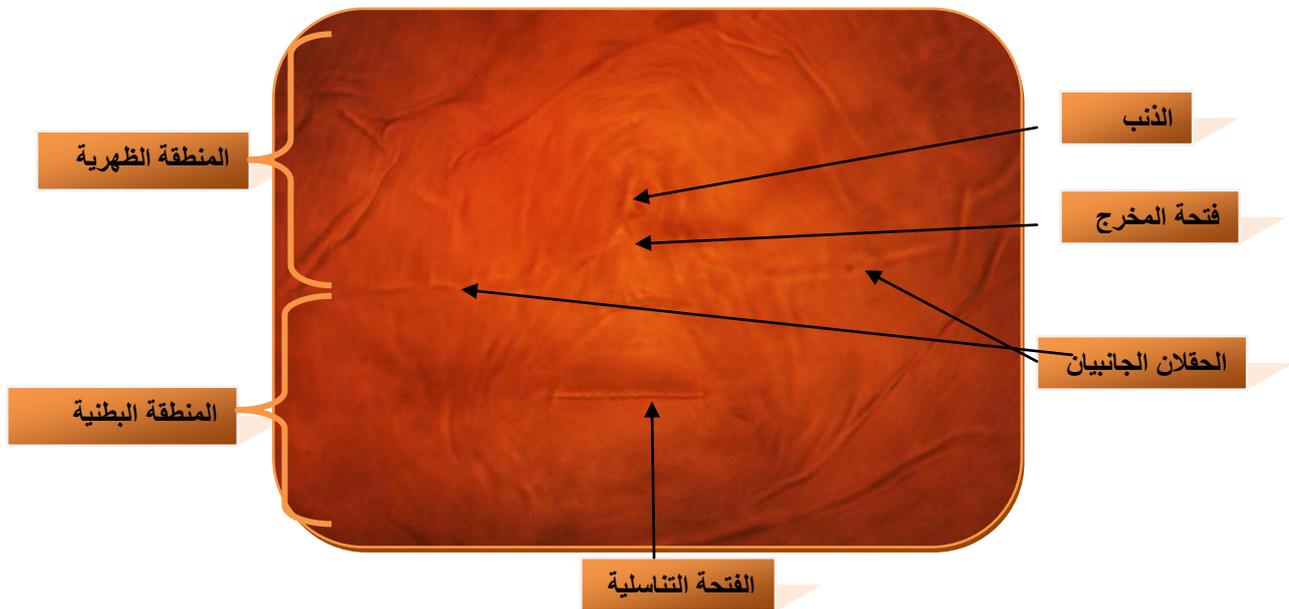
الجدول 4: نسبة الإصابة والدليل المرضي لنيماتودا تعقد الجذور على الزيتون في مواقع المسح

مواقع الدراسة	نسبة الإصابة	الدليل المرضي
بغداد / مزرعة الزعفرانية	93.3	بيت بلاستيكي 1
	80	بيت بلاستيكي 2
	53.3	بيت بلاستيكي 3
	80	بيت بلاستيكي 4
	6.6	ظلة
	100	حقل

2	85.7	بستان 1	بابل / السدة
3	85.7	بستان 2	
2	85.7	بستان 3	
2	83.3	حقل	كربلاء/العطيشي
1	30	ظلة	كربلاء/ محطة بستنة الهندية

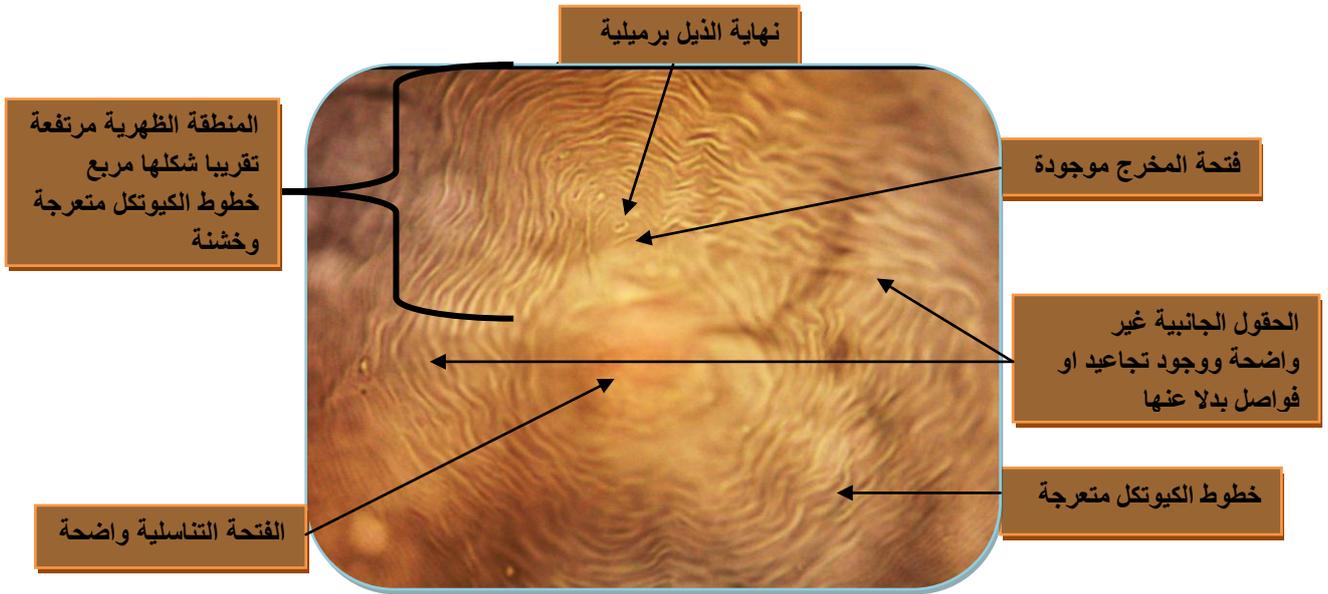
تشخيص نوع نيماتودا تعقد الجذور بالاعتماد على الصفات المورفولوجية للنمط العجاني Perineal Pattern:

أظهرت نتائج التشخيص بطريقة النمط العجاني الى وجود نوعين من نيماتودا تعقد الجذور في المناطق الممسوحة وهي *M.javanica* و *M.incognita* إذ نلاحظ من الشكل (3) الذي يمثل مقطع للنمط العجاني للنوع *M.javanica* والذي يتميز بوجود الحقلين الجانبين Lateral field بشكل واضح يقسم النمط العجاني الى منطقتين وهي المنطقة الظهرية Dorsal Arch والمنطقة البطنية Ventral Arch وتعد اهم صفة يمتلكها هذا النوع، تمتاز المنطقة الظهرية بخطوط كيوتكل خشنة مستقيمة الى متموجة الشكل ذات قوس دائري منخفض، الفتحة التناسلية Vulva وفتحة المخرج Anus تكون مميزة نهاية الذيل واضحة برميلية الشكل، وتطابقت هذه الصفات مع دراسات سابقة (Eisenbach et al.,1981؛ Tuminem et al., 2015؛ Aydinli and Mennan, 2016).



الشكل 3: النمط العجاني لنيماتودا تعقد الجذور *M.javanica*

أما النوع الثاني من نيماتودا تعقد الجذور وهو *M.incognita* اتصف الشكل المورفولوجي للنمط العجاني الشكل (4) بعدم وجود الخطوط أو الحقول الجانبية بصورة واضحة في النموذج فضلا عن وجود فواصل أو تجاعيد بدلا عنها وتميزت المنطقة الظهرية بارتفاعها وبدت مربعة الشكل تقريبا، خطوط الكيوتكل ناعمة الى متعرجة او خشنة نهاية الذيل برميلية المظهر كما في النوع *M.javanica* الفتحة التناسلية وفتحة المخرج واضحة على النمط العجاني كما هو الحال مع النوع *M.javanica* وهو مطابق لما ذكره (Eisenbach et al., 1981؛ Tuminem et al., 2015؛ Aydinli and Mennan, 2016).



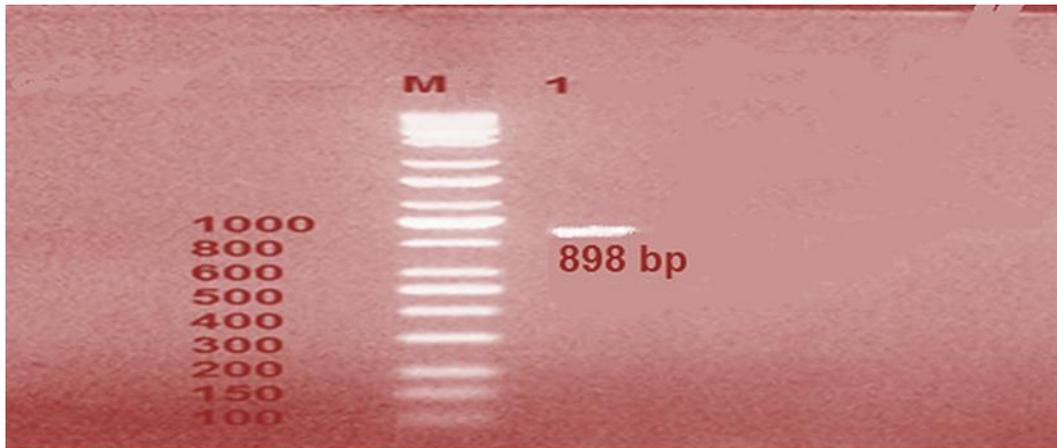
الشكل 4 : النمط العجاني لنيماتودا تعقد الجذور *M. incognita*

تشخيص نوع نيماتودا تعقد الجذور بالاعتماد على تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction

(PCR)

يبين لنا الشكل (5) ان حجم الحزمة الناتجة من الترحيل الكهربائي لعزلة نيماتودا تعقد الجذور المعزولة من المزرعة النقية

والتي بلغت 898bp.



الشكل 5: حجم الحزمة الناتجة من الترحيل الكهربائي 898bp .

تم تسجيل تتابع القواعد النيروجينية لجين 18S rRNA ذات الحجم 898 لنيماتودا تعقد الجذور ومقارنتها مع مايمائلها من النوع الشكل (6) بعد مراسلات مع المركز الوطني للمعلوماتية الاحيائية / امريكا Center Biotechnology Information (NCBI) والإجابة على أسئلة المختصين تم تأكيد تشخيص النوع *Meloidogyne incognita* وهو تشخيص تأكيدي للنتائج التي حصلنا عليها أثناء التشخيص بطريقة النمط العجاني Perineal Pattren وتم تسجيلها كما موضح في (الجدول 6) والشكل (7) علما ان الجهة المانحة: المركز الوطني للمعلومات الاحيائية /أمريكا

الجدول 6: الرقم العالمي للعزلة العراقية واسم الجين لنيماتودا تعقد الجذور المعزولة من اشجار الزيتون في محافظة كربلاء.

العزلة	الموقع الالكتروني	عدد القواعد النيروجينية	الرقم العالمي	اسم الجين المسجل
<i>Meloidogyne incognita</i> 18S subunit Ribosomal RNA gene partial sequence	https://www.ncbi.nlm.nih.gov	898 bp	MF511 154.1	ITS/ rDNA region

Meloidogyne incognita voucher 12-31829 18S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: [KP901057.2](#) Length: 2047 Number of Matches: 1

Range 1: 89 to 961 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1550 bits(839)	0.0	863/874(99%)	4/874(0%)	Plus/Plus
Query 12	ttGATCTTGATTGTCT-AATGGATAACTGTGGAAAAGCTAGAGCTAATACATGCACTAAA			70
Sbjct 89	TTGATCTTGATTGTCTAAATGGATAACTGTGGAAAAGCTAGAGCTAATACATGCACTAAA			148
Query 71	GCTTTGTCTTACGGAAAAGCGCATTATTAGAACAAAACACGCGGCTTCGGCTGCTTC			130
Sbjct 149	GCTTTGTCTTACGGAAAAGCGCATTATTAGAACAAAACACGCGGCTTCGGCTGCTTC			208
Query 131	TTGTTGACTCAGAATAACTTAGCTGACCGCATGGCCTTGTCGGCGCGCGTGTCTTTCAA			190
Sbjct 209	TTGTTGACTCAGAATAACTTAGCTGACCGCATGGCCTTGTCGGCGCGCGTGTCTTTCAA			268
Query 191	GCGTCCACTTTATCAACTTGACGGGAGCATAATCGACTCCCGTGGTGGTGACGGGATAACG			250
Sbjct 269	GCGTCCACTTTATCAACTTGACGGGAGCATAATCGACTCCCGTGGTGGTGACGGGATAACG			328
Query 251	GAGGATCAGGGTTCGACTCCGGAGAAGGGCCGTGAGAAATGGCCACTACGTCTAAGGATG			310
Sbjct 329	GAGGATCAGGGTTCGACTCCGGAGAAGGGCCGTGAGAAATGGCCACTACGTCTAAGGATG			388
Query 311	GCAGCAGGCGCGCAAATACCCACTCTCGGCTCGAGGAGGTAGTGACGAGAAATAACGAG			370
Sbjct 389	GCAGCAGGCGCGCAAATACCCACTCTCGGCTCGAGGAGGTAGTGACGAGAAATAACGAG			448
Query 371	ACCGTCTCTTTGAGGCCGGTTCATCGGAATGGGTACAATTTAAACCCCTTTAACGAGTATC			430
Sbjct 449	ACTGTTCTCTTTGAGGCCGGTTCATCGGAATGGGTACAATTTAAACCCCTTTAACGAGTATC			508
Query 431	AAGCAGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCTGCAAATACATAGA			490
Sbjct 509	AAGCAGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCTGCAAATACATAGA			568
Query 491	ATTATTGCTGCGGTTAAAAAGCTCATAGTTGGATTTCGTATCGATACCTTGGAAACCCCTCG			550
Sbjct 569	ATTATTGCTGCGGTTAAAAAGCTCATAGTTGGATTTCGTATCGATACCTTGGAAACCCCTCG			628
Query 551	GGTGTCTCTGGGTGTTATCGATTTATCGAAATGTTTCGGTTTTGAGTCCCTAACAGGATTC			610
Sbjct 629	GGTGTCTCTAGGTGTTATCGATTTATCGAAATGTTTCGGTTTTGAGTCCCTAACAGGATTC			688
Query 611	TTAACAGGCATTGCAAGTTTACTTTGAACAAATCAGAGTGCTTCAAACAGGCGTTTTTCGC			670
Sbjct 689	TTAACAGGCATTGCAAGTTTACTTTGAACAAATCAGAGTGCTTCAAACAGGCGTTTTTCGC			748

الشكل 6 : مقارنة بين تسلسل تتابع قواعد النيوكليوتيدات لجين 18S rRNA للنيماتودا.

NCBI Resources How To adnan79 My NCBI Sign Out

Nucleotide Nucleotide Search

Advanced Help

GenBank Send to: Change region shown

Meloidogyne incognita strain Oe.Mi1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MF511154.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS MF511154 898 bp DNA linear INV 26-JUL-2017

DEFINITION Meloidogyne incognita strain Oe.Mi1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION MF511154

VERSION MF511154.1

KEYWORDS .

SOURCE Meloidogyne incognita (southern root-knot nematode)

ORGANISM [Meloidogyne incognita](#)
Eukaryota; Metazoa; Ecdysozoa; Nematoda; Chromadorea; Tylenchida; Tylenchina; Tylenchoidea; Meloidogynidae; Meloidogyninae; Meloidogyne; Meloidogyne incognita group.

REFERENCE 1 (bases 1 to 898)

AUTHORS Mohammed,W., Alteneme,Z.A., Mansoor,A.

TITLE Molecular characterization of the root-knot nematode Meloidogyne incognita infecting the Olea europaea trees in Kerbala governorate/Iraq

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 898)

AUTHORS Mohammed,W., Alteneme,Z.A., Mansoor,A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (21-JUL-2017) Plant protection Department, Agriculture College-University of Kerbala, City center, Kerbala, Kerbala KK1 30R, Iraq

Analyze this sequence

Run BLAST

Pick Primers

Highlight Sequence Features

Find in this Sequence

Related information

Taxonomy

Recent activity

Turn Off Clear

Meloidogyne incognita strain Oe.Mi1 small subunit ribosomal RNA gene, partial Nucleotide

MF511154 (0) Nucleotide

Byssoscliamys spectabilis strain Pa.Bs1 internal transcribed spacer 1, partial Nucleotide

Cladosporium oxysporum strain SE.Cofind internal transcribed spacer 1, partial Nucleotide

الشكل 7: المعلومات المسجلة في الموقع العالمي لبنك الجينات يوضح جميع المعلومات المتعلقة بالجين المسجل والمعزول من اشجار الزيتون المصابة بنيماتودا تعقد الجذور

ويؤيد النتائج التي حصلنا عليها Stephan *et al.*, 1988 الذي اشار الى انتشار نيماتودا تعقد الجذور على أغلب النباتات المزروعة في العراق وشخص النوعين *M.incognita* و *M.javanica* على الزيتون وعلى بقية المحاصيل المزروعة في العراق.

المصادر العربية

- ابو غريبة، وليد ابراهيم؛ احمد، سعد الحازمي؛ زهير، عزيز اسطيفان؛ احمد، عبد السميع دوابة (2010). نيماتودا النبات في البلدان العربية الجزء الاول والثاني، دار وائل للطباعة والنشر.
- أبوغريبة، وليد؛ طلب، العزة (2004). النيماتودا المصاحبة للنباتات في البلدان العربية. مجلة وقاية النبات العربية. 22، 1-22.
- الاعظمي، عبد الرزاق (1955). تشخيص انواع نيماتودا تعقد الجذور في العراق. وزارة الزراعة. مطبعة الزهور. بغداد 15.
- ثابت، كمال علي؛ رجب، محمود ماهر؛ عبد الله، أحمد الشهيد؛ مصطفى، محمد فهيم (1976). علم أمراض النبات، جامعة القاهرة، كلية الزراعة مطبعة السعادة.
- الحازمي، احمد بن سعد (1992). مقدمة في نيماتولوجيا النبات، الطبعة الأولى كلية الزراعة مطابع جامعة الملك سعود، 321 ص.
- الدوري، علي حسين عبد الله؛ عادل، خضر سعيد الراوي (2000). إنتاج الفاكهة. مطبعة دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل، الموصل، العراق. 524 ص.
- الراوي، فرقد عبد الرحيم (1974). ديناميكية وتشخيص ديدان العقد الجذرية على النباتات القثائية في محافظة بغداد . رسالة ماجستير - كلية الزراعة - جامعة بغداد.
- عياش، لؤي مطر؛ رياض، فالح السبع (2014). مسح لأنواع وسلالات نيماتودا تعقد الجذور. *Meloidogyne spp.* المصاحبة لنباتات الباذنجان في محافظة نينوى. مجلة الانبار للعلوم الزراعية 12 (عدد خاص ببحوث المؤتمر الرابع)، 289-301.
- قاسم، اكرم حمدي (1980). تشخيص الديدان الثعبانية المسببة لمرض تعقد الجذور التي تصيب الخضروات وغريلة بعض اصناف الخضروات المهمة لإيجاد مدى مقاومتها للإصابة بالنيماتودا لوحدها وبمصاحبته الفطر *Fusarium solani* رسالة ماجستير - كلية الزراعة والغابات - جامعة الموصل .
- الكاتب، يوسف منصور (2000). تصنيف النباتات البذرية. الطبعة الثانية. مطبعة دار الكتاب للطباعة والنشر. جامعة الموصل، الموصل، العراق. 584 ص .
- مديرية الإحصاء الزراعي (2015). الجهاز المركزي للإحصاء، وزارة التخطيط. العراق
- المصري، ميمونة؛ خالد، العسوس؛ تيسير، ابو الفضل (2011). ديناميكية المجتمعات النيماتودية المتطفلة المرافقة لتربة القطن وجذوره في المنطقة الوسطى من سورية. مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية. 27(1)، 351-364.

المصادر الأجنبية

- Agrios, G.N. (2005). "Plant Pathology". 5th ed. Elsevier Academic Press. 948 p.
- Ali, N.; Johannes, T.; Elodie, C.; Thierry, M. (2016). Trend to Explain the Distribution of Root Knot Nematodes *Meloidogyne spp.* Associated with Olive Trees in Morocco. *J. Agriculture, Ecosystem and Environment*. 225, 22-32
- Aydinli, G.; Mennan, S. (2016). Identification of Root Knot Nematode (*Meloidogyne spp.*) From Greenhouse in The Middle Black Sea Region of Turkey. *Turkish J. Zoology*. 40, 675-685.
- Barker, K.R. (1985). Nematode extraction and bioassays. An advanced treatise on *Meloidogyne*. In: Baker KR, Carter CC, Sasser JN., editors Methodology. vol II. Raleigh, NC: North Carolina State University Graphics; pp. 19-35.
- Cook, R.J. (2000). Advances in Plant health management in the twentieth century. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38, 95-116.
- Eisenback, J.D.; Hirschmann H.; Sasser J.N.; Triantaphyllou A.C. (1981). A guide to the four most common species of Root Knot Nematode (*Meloidogyne spp.*) with A Pictorial Key. Washington DC (US): North Carolina State University.

- Haroon, S.; Al-Ghor, A.A.; El-Rheem, M.A.; Abdella, E. (2003). Identification of differential root-knot nematodes and detection of intra- species and intra- population genetic variabilities between different nematode samples using RAPD technique. *Arab J. Biotechnol.*, **6**(2), 247-266.
- Hartman, K.M.; Sasser, J.N. (1987). Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host and perineal-pattern morphology. In :An Advanced (Barkey; C.C. Carter and J.N. Sasser, eds PP.69-7. North Carolina state Univ. graphics.
- Jepson, S. (1983). Identification of *Meloidogyne* : a general assessment and a comparison of male morphology using light microscope, with a key to 24 species . *Rev . Nematol.*, **6**, 291-309.
- Karajeh, M.R. (2004). Identification, Distribution, and Genetic Variability of the Root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) on Jordan . ph. D. Thesis, University of Jordan. 152 p.
- Karajeh, M.R.; Abu-Gharbiea, W.I.; Masoud S.A. (2005). First report of the Root-Knot Nematode *Meloidogyne arenaria* Race 2 from Several Vegetable Crops in Jordan . *Pl. Dis.*, **89**(2), 206.
- Karssen, G. (2002). The plant – parasitic nematode genus *Meloidogyne* Goldi 1892 (Tylenchida) in Europe. Koninklijke Brill NV, Leiden, The Netherlands. 157 p.
- Katcho, Z.A. (1972). First occurrence of certion root – knot nematodes spp. In Iraq . *Plant Dis. Repr.* **56**, 824.
- Robin, M.F.; Alex, D.R.P.; Johan, D.L.; Craig R.S. (2005). Nematode-specific PCR primers for the 18S small subunit rRNA gene. Natural Environment Research Council, British Antarctic Survey, High Cross, Madingley Road, Cambridge, CB3 0ET, UK
- Stephan, Z.A. (1988). Newly reported hosts of root-knot nematode in Iraq. *Int. Nematol. Net Work. Newsl.* **5**(3),36-43
- Taylor, A.L.; Sasser, J.N. (1978). Biology. Identification and control of root – knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) Coop. Pub. Dep. Plant pathol. North Carolina state Univ., and U.S. Agency. In. T. Dev. Raleigh, N. C.111 p.
- Taylor, D.P.; Netscher, C. (1974). An improved techniaue for preparing perinealpatterns of *Meloidogyne* spp. *Nematologica.* **20**, 268-269.
- Tuminem, S.; Meity, S.S.; Giyanto (2015). First Report on The Root Knot Nematodes *Meloidogyne* spp. of Sweetpotatoes in Sorong Regency, West Papua Indonesia. *International J. Sci. Basic and Applied Research (IJSBAR).* **21**(2),325-334
- Zijlstra, C.; Lever, A.E.M.; Uenk, B.J.; Van Silfhout, C.H. (1995). Differences between ITS regions of isolates of root-knot nematodes *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. *Phytopathology.* **85**,1231-1237.