## المعيار الدولي رقم 27 بروتوكولات تشخيص الآفات الخاضعة للوائح بروتوكول التشخيص 10: Bursaphelenchus xylophilus

## اعتمد في 2016 ونُشر في 2016

	المحتويات
3	1– معلومات عن الآفة
	2– المعلومات التَصنيفية
	3– الكشف
6	3-1 الكشف عن الآفة في الأشجار
	3-2   الكشف عن الآفة عن طريق استخدام مصائد الحشرات، والمصائد الخشبية، وفي العينات المأخوذة
7	من المناشر ومخازن الأخشاب
	3-3   الكشف المباشر في الخشب والمنتجات الخشبية ومواد التعبئة الخشبية الصلبة
	3-4 استخراج النيماتودا من عينات الخشب
	3-5 استخراج النيماتودا من الحشرات الناقلة
	عــــــــــــــــــــــــــــــــــــ
	1-4    التحديد المورفولوجي
11	ودوو ي 1-1-4    إعداد العينات
12	2-1-4 مفتاح مستوى الأنواع
17	3-1-4 مقارنة Bursaphelenchus xylophilus مع الأنواع المشابحة
19	2-4 التحديد الجزيئي
	- يعدد أشكال طول الشظايا المحدِّدة باستخدام تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل لمباعد النسخ الداخل
	2-2-4 تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل التقليدي
	2-2-4
	2-4-4    الاختبارات الجزيئية القائمة على الحمض النووي الريبي للكشف عن النيماتودا الحية
26	
29	4-2-5 التضخيم المتساوي الحرارة بواسطة العروة (LAMP)
	4-2-4 ضوابط الأختبارات الجزيئية
	4-2-7 تفسير نتائج تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل
32	8-2-4 التتابع

33	السجلات	-5
34	جهات الاتصال للحصول على معلومات إضافية	-6
	شکر وتقدیر	
36	المراجع	-8
	و ع الأشكال التهضيحية	

## 1- معلومات عن الآفة

نيماتودا خشب الصنوبر، ويعتقد أن هذه الآفة متوطنة في أمريكا الشمالية حيث تتوزَّع على نطاق واسع في كندا لمرض ذبول خشب الصنوبر. ويعتقد أن هذه الآفة متوطنة في أمريكا الشمالية حيث تتوزَّع على نطاق واسع في كندا والولايات المتحدة (Ryss et al., 2005) ويبدو أن توزيعها محدود في المكسيك (Dwinell, 1993). وأنواع صنوبر أمريكا الشمالية مقاومة أو على الأقل متحملة لآفة R. xylophilus، ولكن الأنواع الغريبة التي تزرع في أمريكا الشمالية، خاصة في المناطق الجنوبية الأدفأ من الولايات المتحدة، تموت عندما تحاجمها هذه النيماتودا.

ونُقلت آفة B. xylophilus إلى اليابان في مطلع القرن العشرين، ويفترض أنما نُقلت عبر الأحشاب المصدَّرة من أمريكا الشحالية وباتت واحدة من أكثر آفات الغابات ضرراً في البلد، حيث ما زالت تسبب حالياً خسائر كبيرة في أشحار الشحالية وباتت واحدة من أكثر آفات الغابات ضرراً في البلد، حيث ما زالت تسبب حالياً خسائر كبيرة في أشحار الصين ورد الياباني (P. thunbergii)، وصنوبر أوكيناوا الصين (P. luchuensis)، ودخلت آفة xylophilus أيضاً إلى الصين (بما في ذلك تايون) وكوريا؛ وعثر عليها هناك في منتصف أو في أواخر ثمانينات القرن الماضي. وفي عام 1990، وحدت الآفة للمرة الأولى في أوروبا (البرتغال) في الصنوبر البحري (Mota et al., 1999; Fonseca et al., 2012)، الذي تقتله الدودة في غضون أشهر قليلة بعد إصابته بالآفة (P. radiate) في البرتغال وإسبانيا واكتشفت B. xylophilus في الصنوبر الأسود (P. nigra) والصنوبر الشعاعي (P. radiate) في البرتغال وإسبانيا (Inácio et al., 2014; Zamora et al., 2015). وفي عام 2008، وحدت آفة xylophilus المدودة في إسبانيا (Abelleira et al., 2010).

وتنتقل آفة Coleoptera من شجرة إلى شجرة عن طريق حنفساء ساكنة في الخشب من الجنس Monochamus (الخنافس غمدية الأجنحة Coleoptera؛ (Clinit, 1990; Evans et al., 1996) (Cerambycidae) (Cerambycidae) (Coleoptera خمدية الأجنحة Coleoptera؛ الخنافس الطويلة القرون عروج تلك الحشرات من طور الإخدار ومباشرة قبل أن تثقب الشجرة العيماتودا في أجسام الحشرات بعد فترة وجيزة من حروج تلك الحشرات من طور الإخدار ومباشرة قبل أن تثقب الشجرة العائلة (Wingfield, 1987). وتطير الخنافس إلى تيجان الأشجار السليمة وتتغذى على الغصينات وأوراقها (تغذية النضج). وتتزاوج بعد ذلك وتبحث الإناث عن شجرة ضعيفة أو شجرة ماتت مؤخراً أو تبحث عن الجذوع أو الأغصان الأكبر (ما في ذلك الحطام المتساقط)، تبعاً لنوع الخنفساء والمنافس في الأنسجة القُلبية التي تقع مباشرة تحت اللحاء لعدة أشهر. وعندما يوقات الخنفساء التي تفقس من البيض في الأنسجة القُلبية التي تقع مباشرة تحت اللحاء لعدة أشهر. وعندما من هذه الدورة للانتقال إلى عائل شجري جديد (Wingfield, 1987)، وبمكن أن تدخل إلى الشجرة الجديدة أثناء البيض عن طريق الخنفساء (ويبدو أن تلك هي الوسيلة الوحيدة التي تنقل بما عدة أنواع من Bursaphelenchus التي تستعمر عن طريق الخنفساء (ويبدو أن تلك هي الوسيلة الوحيدة التي تنقل بما عدة أنواع من فيده الأنواع، إذ يمكنها أن تنتقل إلى شجرة جديدة أثناء تغذية النُضج عن طريق الخنافس، ويمكن أن يظهر مرض ذبول الصنوبر نتيجة أيضاً أن تنتقل إلى شجرة جديدة أثناء تغذية النُضج عن طريق الخنافس، ويمكن أن يظهر مرض ذبول الصنوبر نتيجة النشالها من خلال الغصينات (Wingfield, 1987).

وعندما تنتقل B. xylophilus أثناء وضع البيض، تبقى النيماتودا قريبة نسبياً من موقع دخولها الشجرة. ولكن عندما يحدث الانتقال من خلال الغصينات وعندما تصاب الشجرة بمرض ذبول الصنوبر، تتوزَّع النيماتودا في كل الشجرة وتُدمِّر الأنسجة

الخشبية، مثل الخلايا الظهارية، والخلايا اللبابية لقنوات الراتنج المحوري والشعاعي، والقُلب (الكمبيوم) واللحاء. ويمكن أيضاً لآفة B. xylophilus أن توجد في الجذور حتى عندما تكون أجزاء الشجرة الواقعة فوق الأرض ميتة بالفعل، أو عندما تحف أو تُقطع. وتتوقف إصابة الشجرة بمرض ذبول الصنوبر على نوع الشجرة (لا يتأثر عموماً سوى جنس أشجار . Pinus spp. التي ليست من أصل أمريكي)، كما تتوقف إصابتها على حالتها الصحية وظروف المناخ (لا سيما درجة الحرارة وإمدادات المياه). وتؤثر هذه العوامل أيضاً في توزيع النيماتودا في كل أجزاء الشجرة. ويمكن أن يكون توزيعها موضعياً أو غير منتظم، وينبغى مراعاة ذلك عند تحديد استراتيجيات أخذ العينات (Schröder et al., 2009).

ويمكن أن توجد آفة B. xylophilus أيضاً في الأشجار الميتة من الأنواع Abies، وChamaecyparis و R. xylophilus ويمكن أن توجد آفة Pseudotsuga، وغيرها من المخروطيات (باستثناء التويا على المناه التويا المناه المناه المناه المناه المناه المناه المناه المناه على المناه على

وتنقل آفة B. xylophilus بصورة شبه حصرية عن طريق أنواع الخنفساء ذات القرون الطويلة Monochamus، وتتفاوت أنواع النواقل تبعاً لتفاوت الأقاليم الجغرافية، مثل M. alternatus في الصين واليابان، و M. saltuarius في اليابان، و M. galloprovincialis في أمريكا الشمالية، و M. galloprovincialis في البرتغال. وتبيَّن في بعض الأحيان أن أنواعاً أخرى من فصيلة الخنافس الطويلة القرون أو الغمدية الأجنحة تنقل على أجسامها اليرقات الصغيرة "التي في طور السكون"، وإن كانت لا توجد أي أدلة تثبت أن لها دوراً كنواقل في نشر النيماتودا (Evans et al., 1996).

ومن المعروف أن النشاط البشري يمثل مساراً رئيسياً لانتشار B. xylophilus على مسافات أكبر، وجرى اعتراض الآفة ونواقلها في عدد من المناسبات في التجارة الدولية للخشب، وفي المنتجات الخشبية، ومن أبرزها مواد التعبئة الخشبية الصلبة المصنوعة من أخشاب المخروطيات. ولذلك فإن مخاطر تفشيها دولياً كبيرة.

وعلى الرغم من أن آفة B. xylophilus المرتبطة بالخنافس الناقلة تشكِّل أكبر مخاطر الانتشار فإن انتقال الآفة من الخشب المصاب إلى الخشب غير المصاب أو إلى الأشجار غير الموبوءة يمكن أن يحدث في ظروف محددة تتمثل في الاتصال المباشر بين المانح والخشب المتلقي، وزيادة محتوى الرطوبة في الخشب المتلقي أو الجروح في الأشجار (Sousa et al., 2011; Hopf and Schroeder, 2013).

ويمكن الرجوع إلى مزيد من التفاصيل عن الخصائص البيولوجية لآفة B. xylophilus ونواقلها، ومرض ذبول الصنوبر، وتوزيعها الجغرافي، وآثارها على الاقتصاد والتجارة، واستراتيجيات إدارتها، في الكتب الشاملة التالية: (Zhao et al. (2008)؛ (Mota and Vieira (2008)؛

## 2- المعلومات التصنيفية

Bursaphelenchus xylophilus (Steiner and Buhrer, 1934) Nickle, 1970

الاسم:

Aphelenchoides xylophilus Steiner and Buhrer, 1934

المترادفات:

Paraphelenchoides xylophilus (Steiner and Buhrer, 1934) Haque, 1967

Bursaphelenchus lignicolus Mamiya and Kiyohara, 1972

Nematoda, Rhabditida, Tylenchina, Aphelenchoidea, Aphelenchoididae,

Parasitaphelenchinae, Bursaphelenchus

الوضع التصنيفي

الاسم الشائع: نيماتودا خشب الصنوبر

3- الكشف

لآفة B. xylophilus ست أطوار: البيض والأطوار الصغيرة الأربعة السابقة على البلوغ. وينسلخ الطور الصغير الأول (I1) لينتقل إلى الطور الصغير الثاني (J2) في البيضة. ويفقس الطور J2 من البيضة، ويوجد طوران آخران للبرقات الصغيرة (الثالث والرابع) قبل طور البلوغ. وتظهر مختلف أنواع الأطوار الصغيرة في ظروف مختلفة. وفي الظروف المواتية التي تكون فيها درجة الحرارة 25 مئوية، تتطور B. xylophilus من البيضة من خلال أربعة أطوار صغيرة إكثارية (الطور الأول إلى الطور الرابع) للوصول إلى طور البلوغ في غضون أربعة أيام (Hasegawa and Miwa, 2008) (الشكل 1).

وفي الظروف غير المواتية، تتطور اليرقة في طور التشتت  $J_{III}$  بدلاً من الطور  $J_{III}$  ومن المحتمل أنحا لا تتغذى في الطور  $J_{III}$  وتتراكم الدهون في الحلايا المعوية (Kondo and Ishibashi, 1978) ويمكن أن تتحمل الظروف غير المواتية، مثل الجفاف أو انخفاض درجة الحرارة، أو نقص التغذية. وتنسلخ في العادة في هذا الطور إلى طور التشتت  $J_{IIV}$  (الصغار الساكنة) وهذه تنقلها الخنفساء الناقلة إلى الأشجار الجديدة. ومع ذلك، إذا لم تصبح الظروف مناسبة لتطور النيماتودا، وذلك على سبيل المثال عن طريق وضع يرقات الطور  $J_{III}$  في مستنبت فطريات، فإنحا تتطور إلى الطور الإكثاري  $J_{III}$  (Wingfield et al., 1982)  $J_{III}$ 

ويمكن أن توجد آفة B. xylophilus الحيّة في أنواع مختلفة من أحشاب الأنواع العائلة، بما في ذلك الأشجار القائمة أو الأشجار الساقطة، والمنتجات الخشبية، من قبيل مواد التعبئة الخشبية المصنوعة من المخروطيات، وكذلك النشارة، ورقائق الخشب وجزيئاته، والنفايات الخشبية، والأثاث غير المعالج والمشغولات اليدوية. وتتضمن الأقسام التالية معلومات محدَّدة بشأن الكشف عن آفة xylophilus في الأشجار والأحشاب والمنتجات الخشبية، وكذلك في الخنافس الناقلة. وبالرغم من أن أخذ العينات بطريقة صحيحة أساسي للحصول على مادة مصابة على الأرجح بآفة B. xylophilus ومنظمة وقاية النباتات في أوروبا الإرشادات المتعلقة بأخذ العينات جزءاً من البرتوكول الحالي. ونشر (2009) Schröder et al. ومنظمة وقاية النباتات في أوروبا والبحر المتوسط (2012) إرشادات عامة بشأن أخذ العينات، مع الإشارة إلى أنواع الخنافس الطويلة القرون Monochamus الأوروبية كنواقل.

## 1-3 الكشف عن الآفة في الأشجار

إذ لم يكن معروفاً ما إذا كانت آفة B. xylophilus موجودة في منطقة ما، ينبغي أن تركز عملية أخذ العينات على الأشجار القريبة من المواقع الشديدة التعرض للمخاطر، مثل موانئ مناولة الواردات من البلدان المعروفة بإصابتها بالآفة، والمطارات، والمناشر، ومرافق تجهيز الأخشاب، والأماكن التي تخزَّن فيها الأخشاب، ومناطق حرائق الغابات. تنجذب الخنافس الطويلة القرون إلى حرائق الغابات).

ولتوفير أفضل فرصة لاكتشاف آفة B. xylophilus في منطقة ما، ينصح بتركيز أخذ العينات على أشجار الصنوبر المحتضرة أو التي ماتت مؤخراً (الشكلان 2 و3)، والتي تكون قائمة أو ساقطة. ويمكن أيضاً استخدام الأشجار والنفايات المقطوعة من موسم التساقط الأخير (أي مواقع قطع الأخشاب التي يتراوح عمرها بين سنة وسنتين) التي استعمرتها الخنافس الطويلة القرون موسم المساميعد سقوطها. وينبغي البحث عن الأعراض التالية: تغير لون الإبر (مثل اصفرارها)، والذبول، وأدلة تثبت حدوث هجوم من الحشرات (مثل نُحاتة الخشب على الأرض أو حدوث بروزات من شقوق اللحاء، والشقوق السطحية تحت اللحاء المحتوية على ثقوب بيضوية موجّهة في الاتجاه الطولي للجذع، وثقوب حروج دائرية للحشرات البالغة)، والبقع الفطرية الزرقاء في الخشب، وقلة تدفق الراتنج الزيتي من الجروح. وينبغي التحقق من معدل تدفق الراتنج الزيتي عندما تكون الأشجار حضراء عن طريق إزالة جزء من اللحاء من الطبقة القلبية. وتغطي الأشجار السليمة سطح الخشب بالراتنج في غضون ساعة واحدة، بينما يقل أو ينعدم تدفق الراتنج في الأشجار المصابة. ومع ذلك، تتفاوت هذه الأعراض بتفاوت أنواع الصنوبر، وهي أعراض غير محددة بالنسبة لآفة xylophilus، ها إذ قد تحدثها مسببات أمراض أو عوامل أخرى. ويفضل أن تكون الأشجار التي تجمع عينات منها مرتبطة بمجوم الخنافس الطويلة القرون Monochamus، سواءً تغذية ويفضل أن تكون الأشجار التي بمعوفاً على الأقل وجود تلك الخنافس في المنطقة التي تؤخذ منها العينات.

ويمكن أن يكون توزيع النيماتودا موضعياً داخل الأشجار، خاصة بعد فترة وجيزة من دخولها عن طريق وضع البيض أو عن طريق تغذية النضج لدى الخنفساء الناقلة. وفي حالات مرض ذبول الصنوبر، يمكن أن تنتشر النيماتودا بسرعة لتنتج عدداً كبيراً في كل أجزاء الشجرة، باستثناء الإبر والأقماع والبذور. وتغزو النيماتودا B. xylophilus شجر الصنوبر أيضاً المجموع الجذري ويمكن أن تعيش هناك لمدة معينة عندما تكون الشجرة ميتة بالفعل أو جافة أو تم قطعها. ومع ذلك، يمكن لهجوم نيماتودا الصنوبر أن يظل محدوداً في توزيعه داخل الأشجار غير الحساسة عندما تكون الظروف المناخية غير مواتية أو في حالات فسيولوجية معينة للشجرة. ومن ذلك على سبيل المثال أن الإصابة بالآفة قد تكون تأكدت بالفعل في التاج أو في أجزاء منه دون أن تنتشر إلى سائر أجزاء الشجرة.

# 3-2 الكشف عن الآفة عن طريق استخدام مصائد الحشرات، والمصائد الخشبية، وفي العينات المأخوذة من المناشر ومخازن الأخشاب

استحدثت في السنوات الأخيرة مصائد حشرات مزوَّدة بطعم لاجتذاب أنواع الخنافس الطويلة القرون، ويمكن استخدام تلك المصائد في الرصد أيضاً (Sanchez-Husillos et al., 2015). وعند استخدام مصائد الخنافس الطويلة القرون لجمع الخنافس المراد فحصها للتأكد من احتمالات حدوث إصابات بنيماتودا خشب الصنوبر، ينبغي صيد الخنافس حيّة وليس في مادة سائلة قاتلة.

ويمكن في المناطق التي توجد فيها تجمعات معروفة من حنافس Monochamus، أن تستخدم الأخشاب المقطوعة كمصائد أثناء فترة طيران الخنافس. وتنجذب الخنافس إلى تلك المصائد لوضع بيضها، وقد ثبت أن انتقال النيماتودا يحدث في تلك الحالات (Dwinell, 1997; Luzzi et al., 1984). ويمكن أخذ عينات من الخشب أو الخنافس التي تظهر لرصد وجود نيماتودا خشب الصنوبر في مساحة محدودة. ويمكن أن تتم الخنافس دورة حياتما في تلك المواد. ويمكن أيضاً تسريع وتيرة تطور الخنفساء عن طريق أخذ قطع أخشاب المصائد إلى المختبر في فصل الخريف. وسوف تظهر الخنافس قبل عدة أسابيع من ظهورها في الظروف الطبيعية.

ويمكن أن يكون جمع عينات من الخشب أو النُحاتة أو رقائق الخشب من المناشر ومخازن الأخشاب أكثر نجاحاً من أخذ عينات من الأشجار القائمة. وقد يكون مصدر تلك العينات مساحة شاسعة لأن المناشر الكبيرة يمكن أن تحصل على أخشابها من مناطق بعيدة ويمكن أن تجهِّز الأخشاب المحلية والمستوردة على السواء. ولكن ذلك ينطوي أيضاً على عيوب تتمثل في صعوبة إيجاد ارتباط بين عينة إيجابية ومنطقة المنشأ.

## 3-3 الكشف المباشر في الخشب والمنتجات الخشبية ومواد التعبئة الخشبية الصلبة

يمكن أخذ عينات من جميع أنواع أخشاب المخروطيات، لا سيما مواد التعبئة الخشبية الصلبة، وبخاصة من البلدان التي تظهر فيها نيماتودا خشب الصنوبر، وذلك باستخدام مثقاب منخفض السرعة، أو حفار، أو منشار، أو فأس، أو خطاف، وما إلى ذلك. وينبغي تركيز أخذ العينات على الأجزاء التي توجد فيها ثقوب دائرية (أي الثقوب التي تخرج منها الخنافس) وثقوب الدخول البيضاوية وأنفاق اليرقات التي تكون مسدودة في بعض الأحيان بجزيئات خشبية. ويمكن لإزالة اللحاء عندما يكون موجوداً أن يساعد على اكتشاف السراديب. وفي حالة الخشب المنشور، لا تلاحظ في العادة أي ثقوب للخروج، ولكن يمكن رؤية أنفاق اليرقات التي يصعب في بعض الأحيان اكتشافها نظراً لانسدادها بجزيئات الخشب، وينبغي أخذ عينات من الأجزاء التي تنمو فيها الفطريات، خاصة بقع الفطريات الزرقاء. ومع ذلك، تبيّن في العديد من الحالات أن نيماتودا خشب الصنوبر الحيّة يمكن اكتشافها في العينات بدون المؤشرات السالفة الذكر (منظمة وقاية النباتات في أوروبا والبحر المتوسط، 2012).

ويمكن لمواد التعبئة الخشبية الصلبة (مثل المنصات) أن تلامس التربة أثناء استخدامها. وقد يؤدي ذلك إلى تلوث السطح بالتربة والنيماتودا الساكنة في التربة، ويمكن أن تظل حيّة بعد التجفيف. وتلافياً لحدوث تلوث بالنيماتودا في عينات الخشب المستخلصة، ينبغي فحص العينة بعد إزالة الجزء الخارجي من الخشب (Schröder et al., 2009).

#### 4-3 استخراج النيماتودا من عينات الخشب

يمكن استخراج النيماتودا الحيّة من الخشب المصاب باستخدام تقنية قمع بيرمان أو تقنية بيرمان المعدَّلة وبلاستيكي يكون عنقه مسدود (Penas et al., 2002; EPPO, 2013c). وفي تقنية قمع بيرمان، يملأ بالماء قمع زجاجي أو بلاستيكي يكون عنقه مسدود بأنبوب مطاطي ومشبك. وتثبت العينة التي تتألف من قطع صغيرة من الخشب أو من براية الخشب على منخل في القمع ويوضع منديل ورقي يسمح بمرور النيماتودا على المنخل لتجنب تلوث الماء بحطام الخشب. ويملأ القمع بعد ذلك بالماء لتغطية العينة. وتترك العينة لمدة تتراوح بين 24 و48 ساعة في درجة حرارة الغرفة أو في حاضنة (درجة حرارةما 25 درجة مئوية تقريباً) وتنتقل النيماتودا أثناء ذلك من الخشب إلى الماء وتسقط في قاعدة القمع حيث يمكن جمعها عن طريق إخراج كمية صغيرة من الماء (10 مليلترات تقريباً) إلى طبق صغير.

ومبدأ تقنية قمع بيرمان هو على النحو المبيِّن أعلاه، ولكن العديد من التعديلات تستخدم في الواقع العملي (EPPO, 2013c). ومن ذلك على سبيل المثال، أن رقاقات الخشب يمكن غمسها مباشرة في الماء أو يمكن وضعها على مرشح من الصوف القطني في سلة بلاستيكية لاستخلاص النيماتودا. وبالإضافة إلى ذلك، يمكن الجمع بين كل طريقة من الطرق التي بينتها منظمة وقاية النباتات في أوروبا والبحر المتوسط (2013) وبين جهاز لرش الرزاز.

ويمكن نقل النيماتودا من طبق بيتري الصغير إلى شريحة زجاجية تحت مجهر مجسَّم باستخدام ماصة أو إبرة لفحص النيماتودا تحت مجهر عالي القدرة.

ويمكن أن تظهر النيماتودا بأعداد قليلة جداً في العينة، وبالتالي فإن كشفها قد يكون متعذراً. ويوصى بترك النيماتودا تتكاثر قبل استخلاصها. وتحقيقاً لهذه الغاية، تُغلَّف عينة الخشب المرطَّبة بدون أي لحاء في كيس بلاستيكي وتوضع في حاضنة درجة حرارتها 25 درجة مئوية تقريباً لمدة تتراوح بين أسبوعين وثلاثة أسابيع، وتستخلص النيماتودا بعد ذلك باستخدام تقنية قمع بيرمان.

ويستند مبدأ تقنية قمع بيرمان إلى اكتشاف النيماتودا الحيّة عندما تخرج من عينة الخشب، ولكن في غضون الساعات الأربع والعشرين أو الثماني والأربعين الموصى بها، تموت بعض النيماتودا (Baermann, 1917). غير أن من المؤكد أن تلك النيماتودا كانت حيّة عندما بدأت عملية الاستخلاص. وينبغي وضع ذلك في الحسبان عند تحليل المواد الخشبية المستوردة. ويمكن أيضاً استخلاص النيماتودا التي تكون قد ماتت بالفعل باستخدام بعض طرق الاستخلاص الأخرى، مثل الطرد المركزي (وهي طرق غير مبيّنة هنا؛ وهي أسرع كثيراً من تقنية قمع بيرمان) (Moens, 2000). ويمكن استخدام طريقة الطرد المركزي لرصد مساحة موبوءة بنيماتودا خشب الصنوبر، ولكن ليس لإثبات إجراء معالجة ناجحة للصحة النباتية في ذلك الخشب (Moens, 2000).

## 3-5 استخراج النيماتودا من الحشرات الناقلة

يمكن تقييم الخنافس من جنس Monochamus التي يتم الحصول عليها عن طريق المصائد (Monochamus التي يتم الحصول عليها عن طريق المصائد (et al., 2007) أو أخشاب المصائد للتأكد من وجود النيماتودا (القسم 3-2). وينبغي صيد الخنافس حيّة وليس في سائل قاتل، ما لم تكن ستستخدم في الكشف الجزيئي المباشر.

وتوجد في العادة صغار النيماتودا التي في طور التشتت  $J_{IV}$  (الصغار في مرحلة السكون) في القصبة الهوائية للخنافس وتطحن وعلى جسمها. ولا يوجد لدى النيماتودا التي ما زالت في طور السكون حربة. ولعزل النيماتودا، تحقّف الخنافس وتطحن في طبق مناسب ويحتفظ بها في الماء لمدة تتراوح بين 24 و48 في درجة حرارة 25 درجة مئوية تقريباً في طبق مناسب ويحتفظ بها في الماء لمدة تتراوح بين 24 و88 في درجة حرارة 25 درجة مئوية تقريباً (Sousa et al., 2001; EPPO, 2013c) وسوف تخرج الصغار الساكنة من الخنافس. ويتعيَّن نقل الصغار الساكنة في الطور  $J_{IV}$  إلى حصيرة من فطريات Botryotinia fuckeliana (الشكل: Botryotinia fuckeliana) على أغار الشعير (القسم  $J_{IV}$  لتدخل في دورة الحياة التكاثرية، إذ لا يمكن إجراء أي تحديد مورفولوجي آخر إلاّ في النيماتودا البالغة. ويمكن بدلاً من ذلك استخدامها مباشرة في التحديد الجزيئي. ويمكن أيضاً استخدام تقنية قمع بيرمان لاستخدام النيماتودا من الخنافس.

ويمكن إجراء فحص مورفولوجي للنيماتودا المستخرجة من الخشب أو من النواقل الحشرية على النحو المبيَّن أعلاه، أو يمكن إجراء اختبار جزيئي لنيماتودا خشب الصنوبر مباشرة في العينات المستخرجة. وتشير منظمة وقاية النباتات في أوروبا والبحر المتوسط (2013b) إلى إجراء الفرز على أساس طريقة بيرمان المعدلة للاستخراج، ويليها اختبار تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل في الوقت الحقيقي (بتصرف عن François et al., 2007).

وهناك أيضاً عدة تقارير بشأن طرق الكشف الجزيئي التي يتم فيها استخراج الحمض النووي من آفة B. xylophilus من الخشب قبل تضخيمه (Example al., 2005; François et al., 2007; Kikuchi et al., 2009; Hu et al., 2011; Cardoso et al., 2012). غير أن مقدار الخشب المستخدم لاستخراج الحمض النووي في هذا التقارير يتراوح بين 5 و120 ملّيغراماً، وهو مقدار ضئيل للغاية مقارنة بحجم عينات الخشب التي تحلل بصورة روتينية. وبالإضافة إلى ذلك، يمكن للكشف المباشر باستخدام الاختبار الجزيئي أن يكتشف أي نيماتودا مستهدفة سواءً أكانت حيّة أم ميّتة. وبالتالي ينبغي لمن يأخذ بهذا النهج أن يحدد الإجراءات المتبعة لتأكيد وجود النيماتودا الحيّة في العينة إذا كان ذلك مناسباً للهدف الذي يرمى إليه التحليل.

## 4- تحديد الهوية

تم حتى الآن وصف حوالي 110 أنواع من جنس Bursaphelenchus (Futai, 2013). ويمكن الرجوع إلى آخر الاستعراضات B. xylophilus و Ryss et al. (2005). ويمكن تحديد آفة Ryss et al. (2005). ويمكن تحديد آفة المستندة في العامة في العامة في الطريقة المستندة إلى السمات المورفولوجية، والطريقة المستندة إلى تقنيات الخصائص البيولوجية المجزيئية. وبالرغم من أن عدداً من أنواع Bursaphelenchus التي جرى وصفها في السنوات الأخيرة قد ازداد، ويتشابه بعضها

في خصائصه المورفولوجية، يمكن في معظم الحالات التمييز بينها من خلال الخصائص المورفولوجية. ومع ذلك فإن التعرف على الشكل المستدق الطرف لآفة B. xylophilus على أساس الخصائص المورفولوجية قد يكون أمراً متعذراً.

ويتطلب التحديد بالاستناد إلى السمات المورفولوجية إعداد شرائح مجهرية ذات نوعية حيدة، والحصول على مجهر ذي قدرة عالية، والتمتع بخبرة كبيرة في تصنيف النيماتودا، خاصة في المجموعة الصغيرة من الأنواع المرتبطة ارتباطاً وثيقاً بالآفة B. mucronatus kolymensis و B. mucronatus mucronatus، وغيرها). وتتطلب طرق التحديد باستخدام البيولوجيا الجزيئية معدات ومواد كاشفة باهظة التكلفة، ولكن يمكن استخدامها دون الحاجة إلى خبرة تقنية كبيرة (وبقليل جداً من التدريب المتخصص في النيماتودا). بيد أن الخبرة الوافية مطلوبة لضمان عدم ضيياع مواد النيماتودا المحدودة أثناء تطبيق الإجراءات. وفي حين أن تحديد الهوية المورفولوجية يستند إلى عينات من النيماتودا البالغة فإن التحديد الجزيئي يمكن إجراؤه حتى إذا لم يكن متاحاً سوى الأطوار الصغيرة أو جنس واحد من النيماتودا البالغة، وهذه ميزة تتسم بحا هذه الطريقة. وفي حين أن طرق تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل القائمة على الحمض النووي لا تميَّز بين النيماتودا الميتة والحيّة، يمكن للطرق الجديدة المستندة إلى الحمض النووي الريبي المرسال أن توضح ما إذا كان الكشف الإيجابي ناشئ عن وجود نيماتودا حيّة (Leal et al., 2013).

ويمكن تحديد هوية نيماتودا خشب الصنوبر على يد أخصائي في النيماتودا أو خبير متخصص في أمراض النبات ولديه خلفية عن النيماتودا باستخدام السمات المورفولوجية إذا كانت العينات المتاحة ذكوراً وإناثاً من النيماتودا البالغة وفي حالة جيدة. ومع ذلك، يمكن أن توجد حالات يوصى فيها بالجمع بين السمات المورفولوجية والمعلومات الجزيئية للحصول على درجة أعلى من التيقن بشأن تحديد الهوية، وذلك على سبيل المثال عندما تكتشف آفة xylophilus في منطقة جديدة، وعندما يكتشفها مختبر للمرة الأولى، وكضمان لجودة الامتثال لمخططات إصدار الشهادات، وعندما توجد الآفة في شحنات أثناء التفتيش على الواردات، خاصة عندما يُعلن عن خلو البلد المصدر من آفة xylophilus أو بالإضافة إلى ذلك، يمكن أن تكشف الآفة عن اختلافات مورفولوجية تجعل استخدام التقنية البيولوجية الجزيئية أمراً ضرورياً، مثل طرف الذنب المستدير أو المدبب لدى الإناث (الشكل 4) أو مكان الفتحة الإخراجية. وعندما لا يُعزل سوى عدد قليل من النيماتودا، يوصى بإكثارها على B. fuckeliana قبل تحديد هويتها للحصول على مادة كافية تساعد على إحراء تحديد عكن التعويل عليه (القسم 4-1-1).

## 1-4 التحديد المورفولوجي

يمكن أن يوجد العديد من أنواع النيماتودا في خلاصة مائية من الخشب المخروطي، لا سيما إذا كان تحلل الأنسجة قد بدأ. وسوف يكون بعضها أنواعاً رمية المعيشة حيث تفتقر النيماتودا البالغة إلى الرمح الذي يميّز في العادة النيماتودا من رتبة Aphelenchida 'Tylenchida وينتمي النوع Aphelenchida التي تفتح غدتما التي تفتح غدتما البلعومية الظهرية في الجسم الخلفي على النقيض من نيماتودا Tylenchida التي تفتح غدتما في تجويف البلعوم بين البصلة والرمح (الشكل 4). وإذا كانت الخلاصة لا تحتوي إلا على الصغار فإن التحديد المورفولوجي لآفة B. xylophilus لن يكون ممكناً. وفي تلك الحالات، ينبغي فصل أنواع aphelenchoide التي تقع ضمن نطاق حجم الصغار من آفة R. xylophilus وانظر، على سبيل المثال، Penas et al., 2008) وينبغي إكثارها في مستنبت أو استخدامها مباشرة للتحديد الجزيئي.

ولأغراض التحديد باستخدام مجهر ضوئي، يوصى بإجراء تكبير من 400 إلى 000 (عدسة الغمر بالزيت). ويمكن لتباين فروق التداخل أن تسهّل الملاحظة.

#### 4-1-1 إعداد العينات

قد يكون من الضروري مضاعفة النيماتودا المستخرجة للحصول على مادة كافية لتحديد الهوية. ومعظم أنواع B. fuckeliana يكن استنباتها باستخدام الشكل الحامل للجراثيم في الفطريات من النوع Bursaphelenchus. وتحتاج بعض الأنواع، خاصة الأنواع التي تنتمي إلى مجموعة sexdentati، إلى استنبات على شكل غير حامل للجراثيم. ويستبت كلا الشكلين الفطريين على 2 في المائة من أغار خلاصة الشعير (15 غراماً من أغار – أغار، و15 غراماً من خلاصة الشعير، و750 ملغ من الماء؛ برقم أسي قدره 7.0). وتملأ أطباق بيتري (التي يبلغ قطرها 90 مم) بما قدره 25 مل من أغار خلاصة الشعير المعقم. وتنقل أبواغ الفطر أو أجزاء من الأغار المحتوية على وائد فطري إلى أطباق بيتري في وحدة منصات نظيفة. ويوصى بوضع ألواح الفطريات في حاضنة في درجة حرارة الغرفة (25 درجة مئوية تقريباً). وتنقل النيماتودا المراد تربيتها في قطارة صغيرة توضع على الأفطور باستخدام ماصة أو وسيلة أخرى. ويوصى بحضن النيماتودا في درجة حرارة 25 مئوية تقريباً (بالاستناد إلى خصائصها البيولوجية)، ويؤدي ذلك إلى معدل تكاثر كافي للحصول على أعداد كافية من النيماتودا البالغة والصغيرة.

#### 1-1-1-4 التحضيرات المؤقتة

يتم إعداد التحضيرات المؤقتة للتحديد السريع أو لدراسة السمات التي يمكن مشاهدتها على أفضل نحو في العينات غير المثبتة على النحو الذي سيرد بيانه أدناه. وتنقل العينات الحيّة إلى قطرة صغيرة من الماء على شريحة زجاجية. وتسخَّن الشريحة لفترة وجيزة على لهب كحولي والتحقق مراراً من حركة النيماتودا. وينبغي أن يتوقف التسخين في أقرب وقت تتوقف فيه العينات عن الحركة. وتوضع ساترة وتكون الشريحة جاهزة للدراسة. ولا يوصى بتثبيت الساترة، إذ يمكن أن يحتاج جسم ذكور النيماتودا إلى التحريك بعد ذلك في الوضع الظهري البطني لرؤية غشاء السفاد.

#### 1-1-4 التحضيرات الدائمة

تجهّز التحضيرات الدائمة لتحديد الهوية باستخدام المجهر الضوئي على النحو الذي سيرد بيانه أدناه. وتقتل النيماتودا المستخرجة من المادة النباتية أو التي يتم الحصول عليها عن طريق تربية النيماتودا باستخدام حرارة هادئة، ويتم تثبيتها باستخدام الفورمالين وحمض الخليك والكحول (35 في المائة ماء مقطر، و10 في المائة من الفورمالين بتركيز 40 في المائة، و5 في المائة حمض الخل الثلجي، و50 في المائة من الكحول بتركيز 95 في المائة) (Andrássy, 1984) أو باستخدام ثلاثي إيثانول أمين والفورمالين (7 مل الفورمالين (40 في المائة فورمالدهايد)، و2 مل ثلاثي إيثانول أمين، و91 مل ماء مقطر)، وتُجهز باستخدام غليسرين لا مائي (لأغراض التخزين الطويل الأجل) وتوضع على الشرائح في غليسرين لا مائي وتوضع على الشرائح في غليسرين لا مائي مالطريقة الأسرع (1-5.1 ساعة) لإعداد الشرائح الدائمة هي الطريقة التي وصفها (2003) Ryss على أساس قتل النيماتودا في 4 في المائة من محلول فورمالدهايد الساخن. ويحدث

التثبيت بعد ذلك في درجات حرارة مختلفة في جهاز مبرمج للتحكم في درجات الحرارة ثم يعالج بعد ذلك بالغليسرين. ويمكن الرجوع إلى مزيد من التفاصيل بشأن إعداد عينات النيماتودا والشرائح الدائمة، بما في ذلك وصفات المثبتات، في (2006) van Bezooijen، وهو متاح مجاناً على الإنترنت.

## 4-1-4 مفتاح مستوى الأنواع

يستخدم المفتاح التالي المشتق جزئياً من (1989) Bongers لتحديد فصيلة عينات الإناث. وعُدل المفتاح المستخدم في فصيلة Bursaphelenchus لتحديد جنس Bursaphelenchus من (2008). والمفتاح داخل الجنس Parasitaphelenchinae بالنسبة للمجموعة xylophilus مأخوذ عن (2009) Braasch et al. (2009). وبدلاً من ذلك، يتاح في البروتوكول التشخيصي الذي وضعته المنظمة المذكورة لآفة EPPO, 2013b) B. xylophilus مفتاح بسيط تم توضعه بتوافق الآراء في منطقة منظمة وقاية النباتات في أوروبا والبحر المتوسط ويستخدم على نطاق واسع.

ويمكن الرجوع إلى تعاريف المصطلحات المستخدمة في الأقسام التالية في تعاريف المصطلحات المستخدمة في الأقسام التالية في Pictorial glossary of morphological terms in nematology (بروتوكولات تشخيص الآفات الخاضعة للوائح: قائمة مصورة بالمصطلحات المورفولوجية في علم النيماتودا الصادرة عن منظمة وقاية النباتات في أوروبا والبحر المتوسط) (EPPO, 2013a).

## 1-2-1-4 مفتاح العائلات أو الفصائل

2	1- النيماتودا ذات رمح أو قلم
	- النيماتودا بدون رمح أو قلم
3	2- الفم مزوَّد بحربة مدببة والبلعوم متصل بتجويف الجسم الخلفي
NBS	-الفم به حربة أحادية، والبلعوم أسطواني أو كمثري بدون تجويف خلفي
4	3- الجسم الخلفي مزوَّدة بصفائح
	- الجسم الخلفي بدون صفائح واضحة
5	4- الجزء الأمامي مفصول بوضوح عن الجزء الخلفي بجزء ضيق
	- الجزء الأمامي والجزء الخلفي غير مفصولين بجزء ضيق، والبصلة القاعدية صغيرة بدرجة كبيرة، والبشرة
NBS	تبدو مقسَّمة إلى حلقات
6	5- غدة تناسلية واحدة (فتحة تناسلية خلفية)
NBS	– غدتان تناسليتان
7	6- منطقة الشفة بدون شعيرات
NDC	– منطقة الشفة منجَّدة بشعبات

7- الجسم الخلفي عضلي بدرجة كبيرة ومن السهل ملاحظة أنه متطور بدرجة جيدة، ويمكن رؤيته بوضوح بتكبير
منخفض، وهو بيضاوي إلى مثلث دائري، وتفتح غدة البلعوم الظهرية في تجويف البلعوم الواقع داخل الجسم الخلفي 8
- الجسم الخلفي عادي، وغدة البلعوم الظهرية تفتح في تجويف البلعوم خلف الحربة مباشرة
8- غدد البلعوم متداخلة مع الأمعاء من ناحية الظهر
– الغدد البلعومية داخل انتفاخ مجماور
9- نحاية ذنب الذكر مغطاة بجليدة جناحية الشكل (لا يُرى إلاّ عندما
تكون النيماتودا في الوضع الظهري البطني)
- الجليدة الجناحية الشكل غير موجودة
10- مقبض الرمح موجود في العادة، والأنثى مزوَّدة بفتحة شرحية العادة، والأنثى مزوَّدة بفتحة
10- مقبض الرمح موجود في العادة، والأنثى مزوَّدة بفتحة شرجية
- مقابض الرمح غير موجودة في العادة، والأنثى غير مزوَّدة بفتحة شرجية
- مقابض الرمح غير موجودة في العادة، والأنثى غير مزوَّدة بفتحة شرجية
- مقابض الرمح غير موجودة في العادة، والأنثى غير مزوَّدة بفتحة شرجية
NBS $2-2-1-4$ مقابض الرمح غير موجودة في العادة، والأنثى غير مزوَّدة بفتحة شرجية $2-2-1-4$ Parasitaphelenchinae $3$ مفتاح فصيلة $3$ الصغار في مرحلة السكون المرتبطة تعايشياً بالحشرات؛ والجزء الخلفي من الفتحة التناسلية (عادة $3$ 0-60 في المائة من طول الجسم)؛ وشوكتا السفاد مند مجتان جزئياً أو منفصلتان؛ وذنب الذكر
- مقابض الرمح غير موجودة في العادة، والأنثى غير مزوَّدة بفتحة شرجية

#### 3-2-1-4 مفتاح جنس

#### xylophilus مفتاح فئة 4-2-1-4

في إطار فئة xylophilus، يمكن استخدام المفتاح التالي (المعدل وفقاً لمنظمة وقاية النباتات في أوروبا والبحر المتوسط (2013b, 2014) لتمييز Bursaphelenchus المستخرجة من الخشب واللحاء عن Bursaphelenchus من نفس الفئة. ويمكن الرجوع إلى مزيد من التفاصيل المتعلقة بسائر الأنواع المنتمية إلى فئة xylophilus في xylophilus فئة xylophilus على أنواع لا تنشأ عن الخشب المخروطي (مثل B. populi)؛ ويمكن استبعاد هذه الأنواع ببساطة عن طريق تحديد أنواع الخشب. واستنبات النيماتودا على صفائح الأغار المحتوية على فطر يمكن أن يزيد من تباين ذنب الأنثى.

13- ذنب الأنثى شبه أسطواني ومزوَّد أو غير مزوَّد بنهايات حادة (الشكلان 4 و5)
– ذيل الأنثى مخروطي (الشكل 6) أو مستدق بقوة، ومزوَّد وغير مزوَّد بنهايات حادة <b>فئة غير B.</b> xylophilus
14- طول الأشواك أقل من 30 ميكرون (يقاس من اللقمة إلى الطرف البعيد)
15- شوكة السفاد ذات منقار طويل ومدبب وأطرافها ذات انحناء زاوي (الشكلان 5(جيم) و7)
16- سديلة الفتحة التناسلية لدى الأنثى مستقيمة ولا تنتهي بتجويف عميق (الشكلان 5 (زاي) و8) - سديلة الفتحة التناسلية لدى الأنثى منتهية بتجويف عميق (الشكل 9 (ألف)) فئة غير B. xylophilus
17- نماية ذنب الأنثى أكثر من 3 ميكرون (الشكلان 4(ج) و10(د))
$^st$ ذنب الأنثى بدون نهاية مدببة (الشكلان 5 (حاء) و4(أ)) ومزوَّد أو غير مزوَّد ببروز صغير أقل من 2 ميكرون $^st$
(الشكلان 4(ب) و5(طاء)- (ياء))فئة غير B. xylophilus (الشكل المستدير الذيل)
18- الفتحة الإخراجية في تجويف الجسم الخلفي أو خلفه
– الفتحة الإخراجية في مقدمة تجويف الجسم الخلفي
NBS لیست من أنواع Bursaphelenchus species
ً في بعض تجمعات B. fraudulentus، يمكن أن توجد الإناث التي لديها بروز صغير أو حتى بدون نهاية مدببة (الشكل 9(باء)).
وإذا كان نوع الخشب الذي توجد فيه النيماتودا غير مؤكد (B. fraudulentus تظهر في الأحشاب النفضية ولكنها وجدت أيضاً في الأرز،

توجد النهايات المدببة في آفة B. xylophilus أساساً في أمريكا الشمالية ويوصى باستخدام الاختبارات الجزيئية (Gu et al., 2011) لإجراء فصل موثوق لهذا النوع عن "النوع الأوروبي" لآفة B. mucronatus kolymensis (Braasch et al., 2011).

ولكن لم توجد في الصنوبر) يوصى باستخدام الاختبار الجزيئي.

وإذا كان من الصعب التعرف على وضع الفتحة الإخراجية، فإن تحديد الهوية على أساس الخصائص المورفولوجية قد لا يكون صحيحاً. وفي تلك الحالات، ينبغي إجراء اختبارات جزيئية.

وتتسم آفة B. xylophilus عموماً بالخصائص التي يتميَّز بها جنس Bursaphelenchus (1970; Hunt 2008): يبلغ الطول حوالي 1 مم وهو نحيف؛ والمنطقة السفلية مرتفعة ويقابلها ضيق ومزوَّدة بست شفاه؛ والرمح متطور تماماً، وله في العادة قاعدة صغيرة وسميكة؛ والجسم الخلفي متطور تماماً (الشكلان 11 و5(واو)؛ ونحاية ذنب الذكر ملتوية بقوة ناحية البطن، ويمكن رؤية شكل شبه مخروطي في نحايته غشاء جرابي تناسلي في الوضع الظهري البطني (الشكل 12)؛ وأشواك السفاد قوية، وهي وردية شوكية الشكل، ولها قمة ومنقار بارزان؛ والجسم المرشد غير موجود (الشكلان 7 و10)؛ والفتحة التناسلية 70-80 في المائة من طول الجسم؛ وكيس الرحم الأمامي متطور تماماً (الشكل 5 (ألف)).

ومعظم بحمعات آفة B. xylophilus مستديرة الذنب ويمكن تمييزها عن سائر أنواع Bursaphelenchus عن طريق وجود الخصائص الثلاث التالية (الشكل 7) أشواك سفادية كبيرة نسبياً الخصائص الثلاث التالية (الشكل 7) أولادكان التالية (الشكل 7) أولادكان التالية (الشكل 7) أولادكان التالية (الشكل 10).

مقوسة بشكل متساو، وقاعدتها مدببة بحدة وبما (نتوءات قرصية الشكل) في النهايات البعيدة من الأشواك. (2) ذنب الإناث شبه مخروطي وبه نهاية مستديرة عموماً (الشكل 4(أ))، وهي غير مزوَّدة في العادة بنهايات مدببة (بروزات صغيرة)، ولكن توجد في العادة لدى الإناث ذات الشكل المستدير الذيل نهاية مدببة على ذنبها تقل في العادة عن 2 ميكرون (الشكل 4(ب)). (3) الفتحة التناسلية طويلة ومتداخلة مع الشفة الأمامية (الشكل 8).

ومع ذلك، يوجد لدى إناث النيماتودا المستدقة الطرف عموماً نهايات مدببة (4.2-1.5 ميكرون) في نهاية الذنب (الشكل 4(7)).

والخصائص التي تشاهد على أفضل وجه عن طريق المسح الجهري الإلكتروني هي أربع ثلمات (الشكل 13) في الناحية الجانبية، وعدد ومواضع الحليمات الذيلية في الذكور (الشكل 14): وزوج شرجي قبل الفتحة الشرجية مباشرة، وزوجان بعد الفتحة الشرجية موجدان قبل أصل الغشاء التناسلي، وحليمة متوسطة أمام الفتحة الشرجية. وهذه الخصائص يمكن بالكاد في بعض الأحيان أن تشاهد من خلال المجهر الضوئي. وأما الشكلان 13 و14 فهما صورتان باستخدام المجهر الإلكتروني توضحان هذه الخصائص حيث وردت الإشارة إليها في القسم 4-1-3 في ما يتعلق بتجميع أنواع xylophilus.

وترد في الجدول 1 قياسات الخصائص المورفولوجية لآفة B. xylophilus.

الجدول 1: قياسات خصائص Bursaphelenchus xylophilus (المتوسط والنطاق بين قوسين)

		الذكور			
Penas <i>et al.</i> (2008) (n = 20) ألبرتغال)	Penas <i>et al.</i> (2008) (n = 20) †(البرتغال)	Mota <i>et al.</i> (1999) (n = 12) †(البرتغال)	Mamiya and Kiyohara (1972) (n = 40) †(اليابان)	Nickle <i>et al.</i> (1981) (n = 5) (الولايات المتحدة)	المؤلف الخاصية
1.04	0.57	1.03	0.73	0.56	الطول (L)، مم
(1.17-0.87)	(0.69-0.45)	(1.30-0.80)	(0.82-0.59)	(0.60-0.52)	
45.7 (48.9-41.3)	46.0 (58.5–40.2)	49.4 (56–44)	42.3 (47–36)	40.8 (45-35)	أ (طول الجسم/أقصى قطر للحسم)
13.7	9.6	13.3	9.4	9.4	ب (طول الجسم/ المسافة من المقدمة إلى الصمام العلوي البلعومي)
(15.4–11.6)	(10.7-8.2)	(14.9-11.1)	(11.3-7.6)	(10.5-8.4)	
26.8 (31.4-23.6)	21.6 (24.6-19.1)	28.0 (32-24)	26.4 (31-21)	24.4 (29-21)	جيم (طول الجسم/طول الذيل)
14.0	11.0	12.6	14.9	13.3	الحربة، بالميكرون
(15–12)	(14-10)	(16-11)	(17-14)	(13.8-12.6)	
30.4	19.3	24	27.0	21.2	أشواك السفاد،
(33.5-25.0)	(24.0-16.5)	(25–22)	(30-25)	(23.0-18.8)	ميكرون

		الإناث			
Penas <i>et al.</i> (2008) (n = 20)  ‡ (البرتغال)  Penas <i>et al.</i> (2008) (n = 20)  † (البرتغال)		Mota <i>et al.</i> (1999) (n = 12) †(البرتغال)	Mamiya and Kiyohara (1972) (n = 40) †رالیابان)	Nickle <i>et al.</i> (1981) (n = 5) (الولايات المتحدة)	المؤلف الخاصية
1.13 (1.31-0.91)	0.58 (0.66-0.51)	1.05 (1.29-0.89)	0.81 (1.01-0.71)	0.52 (0.61-0.45)	الطول (L)، مم
45.6 (50.3-39.4)	41.9 (50.6-32.8)	50.0 (58-41)	40.0 (46-33)	42.6 (48-37)	أ (طول الجسم/أقصى قطر للحسم)
14.7 (16.8-11.6)	10.1 (11.2-9.1)	13.8 (16.4-12.7)	10.3 (12.8-9.4)	9.6 (10.5-8.3)	ب (طول الجسم/ المسافة من المقدمة

بروتوكول التشخيص 10–16

		الإناث			
Penas <i>et al.</i> (2008) (n = 20) †(البرتغال)	Penas <i>et al.</i> (2008) (n = 20) أولبرتغال)	Mota <i>et al.</i> (1999) (n = 12) †(البرتغال)	Mamiya and Kiyohara (1972) (n = 40) †(الیابان)	Nickle <i>et al.</i> (1981) (n = 5) (الولايات المتحدة)	المؤلف الخاصية
					إلى الصمام العلوي البلعومي)
28.1 (34.4-21.9)	25.4 (29.0-20.2)	26.6 (32-22)	26.0 (32-23)	27.2 (31–23)	جيم (طول الجسم/طول الذيل)
14.4 (16-12)	11.2 (12.5-10.0)	12.3 (15-11)	15.9 (18–14)	12.8 (13.0-12.6)	الحربة، بالميكرون
72.6 (74.5-70.4)	71.5 (72.9-70.1)	73.3 (76–70)	72.7 (78–67)	74.7 (78–73)	وضع الفتحة التناسلية (V)، النسبة المئوية من الطول

أ النيماتودا بعد الاستخراج من الطبقات التحتية في العائل الطبيعي.

## 3–1–4 مقارنة Bursaphelenchus xylophilus مع الأنواع المشابهة

تتوفر مفاتيح لتحديد أنواع Bursaphelenchus (مثل 2005)، ولكن العيب الذي تنطوي عليه تلك المفاتيح في مناتيح الذي تنطوي عليه تلك المفاتيح في Ryss et al. (2005) أن التوصيفات المبكرة لأنواع Bursaphelenchus. غير مكتملة أو تستند إلى عينات قليلة. انظر Vieira et al. (2003) للرجوع إلى التوصيفات الأصلية التي تشمل 74 نوعاً من أنواع Bursaphelenchus

وتمثل آفة Braasch (2001). وبالرغم من الجدل الدائر حالياً بين خبراء التصنيف حول عدد من الأنواع الواردة ضمن هذه الفئة فإن ما لا يقل عن 15 نوعاً أو نوعاً فرعياً بين خبراء التصنيف حول عدد من الأنواع الواردة ضمن هذه الفئة فإن ما لا يقل عن 15 نوعاً أو نوعاً فرعياً (حتى أبريل/نيسان 2015) ينتمي إلى فئة xylophilus على أساس عدد الخطوط الجانبية (الشكل 9)، وعدد ووضع الحليمات الذيلية وخصائص السديلة التناسلية ( xylophilus على أساس عدد الخطوط الجانبية (الشكل 9)، وعدد ووضع الحليمات الذيلية وخصائص السديلة التناسلية ( B. trypophloei Tomalak & Filipiak, 2011 and ) Bursaphelenchus الواعد عن نوعين من أنواع ( B. masseyi Tomalak, Worrall & Filipiak, 2013 ) لإضافتهما إلى فئة xylophilus غير أن هذا البروتوكول يتبع التصنيف الأخير الذي وضعه المؤلفان ( 2015) Braasch and Schönfeld ( 2015) اللذان لم يعتبرا أن هذين النوعين صالحان لأن يُدرجا ضمن هذه الفئة بسبب الخصائص المورفولوجية لشوكة السفاد. وبالتالي فإن الأنواع المنتمية إلى فئة xylophilus هي:

- B. xylophilus (Steiner & Buhrer, 1934) Nickle, 1970
  - B. fraudulentus Rühm, 1956 (Goodey, 1960)

<sup>&</sup>lt;sup>‡</sup> النيماتودا التي تنمو في مستنبت فطري لمدة سنة.

- B. mucronatus mucronatus (Mamiya & Enda, 1979) Braasch, Gu & Burgermeister, 2011
  - B. mucronatus kolymensis, Braasch, Gu & Burgermeister, 2011 -
    - B. conicaudatus Kanzaki, Tsuda & Futai, 2000
    - B. baujardi Walia, Negi, Bajaj & Kalia, 2003
      - B. luxuriosae Kanzaki & Futai, 2003
    - B. doui Braasch, Gu, Burgermeister & Zhang, 2004 -
    - B. singaporensis Gu, Zhang, Braasch & Burgermeister, 2005 -
  - B. macromucronatus Gu, Zheng, Braasch & Burgermeister, 2008
    - B. populi Tomalak & Filipiak, 2010 -
    - B. paraluxuriosae Gu, Wang & Braasch, 2012
    - B. firmae Kanzaki, Maehara, Aikawa & Matsumato, 2012
      - B. koreanus Gu, Wang & Chen, 2013 -
      - B. gillanii Schönfeld, Braasch, Riedel & Gu, 2013

ويمكن فصل آفة B. xylophilus إلى شكلين أو إلى مجموعتين: المستديرة الذيل والمستدقة الطرف (Gu et al., 2011) (الشكل 4). والمجموعات المستدقة الطرف توجد أساساً في أمريكا الشمالية وتشبه كثيراً B. mucronatus kolymensis.

ويمكن التمييز بين الأنواع أو الأنواع الفرعية الخمسة عشر من فقة xylophilus عن جميع أنواع Bursaphelenchus الأخرى من حيث شكل الأشواك السفادية لدى الذكر وعن طريق وجود سديلة تناسلية ذات شكل مميّز لدى الأنثى. ولفصل آفة B. xylophilus عن الأنواع الأخرى الأربعة عشر في الفئة، يمكن استخدام شكل الذيل (شبه اسطواني أو اسطواني ذو نحايات مستديرة في العادة، مع عدم وجود نحايات مدببة). ويمكن الرجوع إلى مفتاح مفصًّل لكل أنواع فئة xylophilus، بما في ذلك رسومات تبين الخصائص الرئيسية، في (2015) Braasch and Schönfeld (2015). ويمكن الرجوع إلى مفتاح مفصًّل لكل أنواع فئة xylophilus الأخرى من فئة من xylophilus إما ذيل مخروطي أو ذيل مدبب لدى الإناث. ومع ذلك، لا يوجد سوى القليل من التجمعات المدببة الشكل من آفة R. xylophilus في أمريكا الشمالية، ومن الصعب التمييز مورفولوجياً بينها وبين الأنواع المدببة (الشكل 4). وبالإضافة الى ذلك، تظهر عموماً إناث R. xylophilus التي يتم الحصول عليها من الأشجار المصابة أو من الأشجار الملقحة اصطناعياً عام، في حين أن السلالات التي يتم الحصول عليها من الأشجار المصابة أو من الأشجار الملقحة اصطناعياً يمكن أن تحتوي على إناث لديها نحايات مدببة مختلفة الأطوال إلى جانب إناث مستديرة الذيل (الشكل 4). ويمكن الرجوع على مريد من التفاصيل حول هذا الموضوع في (2011). Gu et al. (2011)

وأكثر أنواع فئة xylophilus انتشاراً هي B. mucronatus mucronatus و B. mucronatus و يتوزع هذان النوعان يكون فئة كل أنحاء أوروبا وآسيا وكذلك في كندا (Ryss et al., 2005). ولذلك، من المحتمل أن التمييز في الأغلب يكون بين B. mucronatus kolymensis أو B. mucronatus mucronatus و B. xylophilus و B. xylophilus في كاندا (10).

وتتاح في مجموعة مستنبتات Bursaphelenchus مستنبتات مرجعية تشمل 50 نوعاً من أنواع Bursaphelenchu، بما فيها 41 سلالة من سلالات B. xylophilus من شتى مناشئها في جميع أنحاء العالم، وذلك في معهد يوليوس كوهن، ومركز البحوث الفيدرالي للنباتات المزروعة، ومعهد صحة النباتات الوطنية والدولية، براونشفايغ، ألمانيا.

#### 4-2 التحديد الجزيئي

يتضمن هذا القسم معلومات عن الاختبارات الجزيئية التي تتيح تحديد هوية B. xylophilus من النيماتودا المعزولة. ويتم إجراء الاختبارات عموماً بعد إجراء فحص مورفولوجي من أجل تأكيد النتائج التي يتم استخلاصها. وفي الأقسام الفرعية التالية، تُعرض أنواع مختلفة من الاختبارات التي تتناول قضايا محددة على النحو المبيَّن في بداية كل قسم.

ويتاح كثير من الطرق لتحديد هوية B. xylophilus. والاختبارات الجزيئية المبيَّنة في ما يلي هي الاختبارات الموصيى بحا وقت صياغة البروتوكول. ويمكن إجراء اختبارات أخرى. ويمكن إجراء التحديد الجزيئي من خلال تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل التقليدي (القسم 4-2-2) أو عن طريق تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل في الوقت الحقيقي (القسم 4-2-1) واستخدمت كل هذه التقنيات، لا سيما تعدد أشكال طول الشظايا المحددة لمباعد النسخ الداخلي (في القسم 4-2-1) بنجاح في المختبرات في كل أنحاء العالم، ولكنها لم تخضع حتى الآن لتقييم من خلال اختبار الحلقة. وتم استحداث اختبار التضخيم المتساوي الحرارة بواسطة العروة (القسم 4-2-5) للكشف المباشر عن النيماتودا المستهدفة في الخشب وتحديد هويتها.

ويتوقف أحدث نمج متبع في التحديد الجزيئي على تحليل التتابع والترميز الشريطي (القسم 4-2-8). ويتطلب هذا النهج إتاحة إمكانية الوصول إلى مرافق التتابع والوصول إلى تتابعات موثوقة (مثل التتابعات الموجودة في بنك الخُجْر (Q-bank) (http://www.q-bank.eu/Nematodes/) ويتطلب أيضاً موظفين على درجة عالية من المهارة على نحو يمكنهم من تلافي التوصل إلى نتائج كاذبة.

وعندما تستخدم التقنيات الجزيئية للكشف عن B. xylophilus في المنتجات الخشبية لأغراض الحُهُور، من الحاسم التمييز بين النيماتودا الحيّة والميتة. وتقتل عدة معالجات خاصة بالصحة النباتية آفة B. xylophilus في الخشب، ولا يمكن لطرق الكشف الحالية باستخدام الحمض النووي أن تحدّد ما إذا كانت نتيجة إيجابية ما راجعة إلى نيماتودا حيّة أم إلى بقايا حمض نووي في نيماتودا ميتة. ويفضل استخدام الطرق الجزيئية القائمة على الحمض النووي الرببي التي يمكن أن تميّز النيماتودا الحيّة والميتة في الخشب لدواعي التنظيم الخاص بالحُهُور (2013 Leal et al., 2013) (القسم 2-2-2). ويتعيَّن مراعاة هذه المشكلة عند اختيار طربقة استخلاص النيماتودا (تعتمد تقنية قمع بيرمان، مثلاً، على النيماتودا الحيّة؛ انظر القسمين 3-4 و 3-5) والتقنية الجزيئية المستخدمة في التحديد. وينبغي، حيثما أمكن، التثبت من سلامة النتيجة الجزيئية الإجابة عن طربق التحديد المورفولوجي.

ويصف هذا البروتوكول التشخيصي الطرق المتبعة (بما فيها الإشارة إلى أسماء العلامات التجارية) كما نشرت، لأنها تحدّد المستوى الأصلي للحساسية والخصوصية و/أو إمكانية الاستنساخ المتحققة. ولا يعني استخدام كواشف أو مواد كيميائية أو معدات في هذه البروتوكولات التشخيصية الموافقة على استخدامها حصراً دون غيرها من الكواشف أو المواد الكيميائية أو المعدات التي قد تكون مناسبة أيضاً. ويمكن تعديل الإجراءات المختبرية الواردة في هذه البروتوكولات بما يناسب معايير المختبرات الفردية، شريطة التثبت منها على النحو الوافي.

### 4-2-1 تعدد أشكال طول الشظايا المحدِّدة باستخدام تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل لمباعد النسخ الداخلي

استخدم (2005, 2009). Bursaphelenchus تقنية تعدد أشكال طول الشظايا المحدِّدة لمباعد النسخ الداخلي باستخدام تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل للتمييز بين B. xylophilus و 43 و 43 نوعاً آخر من أنواع Bursaphelenchus. وترد تقريباً في كل توصيفات أنواع Bursaphelenchus الجديدة التي نُشرت بعد عام 2009 أنماط تعدد أشكال طول الشظايا المحددة لمباعد النسخ الداخلي باستخدام تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل على أساس الطريقة التي استحدثها (2009). Burgermeister et al. (2009) وهذه التقنية، من بين كل التقنيات الجزيئية الواردة في هذا البروتوكول، هي التقنية التي أثبتت فعاليتها في أوسع مجموعة من أنواع Bursaphelenchus.

ويستخلص الحمض النووي من أطوار حياة مختلطة من النيماتودا (الإناث والذكور الناضحة، والصغار) باستخدام مجموعة أدوات (Qiagen النووي من أطوار حياة عينات النيماتودا (1 إلى 30 عينة) في 5 ميكرون من الماء في أنابيب إبيندوف وتحمَّد في درجة حرارة -20 مئوية إلى أن يتم الاستخلاص. وقبل الاستخلاص، تذاب العينة وتخلط أنابيب إبيندوف وتحمَّد في درجة حرارة -20 مئوية إلى أن يتم الاستخلاص. وقبل الاستخلاص، تذاب العينة وتخلط مع 10 ميكرولترات من دارئ انحلال الأنسجة (ATL) (ATL) وتتم بعد ذلك مجانستها في أنبوب إبيندورف باستخدام أنبوب طرد مركزي (إبيندورف أ). ويتم بعد ذلك استخلاص الحمض النووي وفقاً لتوصيات الشركة المصنعة النووي المحينوم من الأنسجة أ)، باستثناء الخطوات التالية. وفي ما يتعلق بالخطوة 12 (الشطف)، يستخدم 20 التالية. وفي ما يتعلق بالخطوة 12 (الشطف)، يستخدم 20 ميكرولتراً (لخلاصة دودة النيماتودا الواحدة) أو 100 ميكرولتر (لاستخلاص ما يصل إلى 30 دودة نيماتودا) من الدارئ AE (Qiagen) على الغشاء. وتخزَّن الشُطافة المحتوية على الحمض النووي المستخلص في درجة منوية لحين الاستخدام.

ويتم إجراء تحليل تعدد أشكال طول الشظايا المحددة لتفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل ومباعد النسخ الداخلي عن طريق إجراء تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل على الحمض النووي المستخلص ويلي ذلك تعدد أشكال طول الشظايا المحدِّدة على نتاج تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل. ويتم تضخيم جزء من الحمض النووي الريبوسومي المحتوي على مناطق مباعد النسخ الداخلي ITS1، وITS2 عن طريق تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل باستخدام الزوج البادئ التالي:

ITS1-forward (F): 5'-CGT AAC AAG GTA GCT GTA G-3' (Ferris et al., 1993)

ITS2-reverse (R): 5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3' (Vrain, 1993)

ويحتوي خليط تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل (50 ميكرولتراً) على 0.6 ميكرومولار من كل بادئ، و2 وحدة من إنزيم المحرة المحمض النووي Tris-HCl (pH 8.8)، و10 مليمولار من (Fermentas و50 مليمولار من (Tris-HCl (pH 8.8))، و10 مليمولار كلوريد المغنيسيوم، 0.2 مليمولار مليمولار كلوريد المغنيسيوم، 0.2 مليمولار عبارامترات التدوير التالية: دلترة عند درجة حرارة 94 درجة مئوية لمدة 2.5

\_

<sup>1</sup> توصى في هذا البروتوكول التشخيصي الطرق (بما فيها الإشارة إلى أسماء العلامات التجارية) كما نشرت، وهذه تحدَّد المستوى الأصلي للحساسية والخصوصية و/أو إمكانية الاستنساخ المتحققة. ولا يعني استخدام أسماء كواشف أو مواد كيميائية أو معدات في هذه البروتوكولات التشخيصية الموافقة عليها دون غيرها من الكواشف والمواد الكيميائية والمعدات التي يمكن أن تكون مناسبة أيضاً. ويمكن تعديل الإجراءات المختبرية الواردة في هذه البروتوكولات بما يناسب معايير المختبرات الفردية، شريطة التثبت منها على النحو الوافي.

دقائق. و40 دورة تفاعل (عند درجة حرارة 94 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة، و55 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة، و75 درجة مئوية. وبعد إتمام عملية تفاعل إنزيم و77 درجة مئوية. وبعد إتمام عملية تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل، يحلل 5 ميكرولترات من أجزاء منتج تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل باستخدام الارتحال الكهربائي المحلامي. ويتم هضم أجزاء مناسبة من الحمض النووي المضخة باستخدام 3 وحدات من النيوكليزات الداخلية المحددة المحددة AluI, HaeIII, HinfI, MspI and Rsal، وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة.

وتحدد هوية B. xylophilus على أساس أنماط شظايا تحديد الحمض النووي الخاصة بالنوع (الشكل 15). ووصفت أعداد وأحجام شظايا تحديد الحمض النووي على الأقل بالنسبة للأنواع التالية من Gu, 2014) Bursaphelenchus):

B. abietinus, B. abruptus, B. africanus, B. anamurius, B. andrassyi, B. antoniae, B. arthuri, B. arthuroides, B. braaschae, B. burgermeisteri, B. chengi, B. conicaudatus, B. corneolus, B. doui, B. eggersi, B. eremus, B. fraudulentus, B. fuchsi, B. fungivorus, B. gerberae, B. gillanii, B. hellenicus, B. hildegardae, B. hofmanni, B. hylobianum, B. koreanus, B. leoni, B. luxuriosae, B. macromucronatus, B. masseyi, B. mucronatus mucronatus (previously B. mucronatus East Asian type), B. mucronatus kolymensis (previously B. mucronatus European type), B. obeche, B. paraburgeri, B. paracorneols, B. paraluxoriosae, B. paraparvispicularis, B. parathailandae, B. parvispicularis, B. pinasteri, B. pinophilus, B. poligraphi, B. populi, B. posterovolvus, B. rainulfi, B. seani, B. sexdentati, B. silvestris, B. sinensis, B. singporensis, B. thailandae, B. tusciae, B. vallesianus, B. willibaldi, B. xylophilus, B. yongensis and B. yuyaoensis.

وهناك اقتراح بإعادة تصنيف B. hunanensis و B. lini و B. hunanensis و يقدِّم النوعان بالتالي لجنس B. hunanensis. ويقدِّم Burgermeister et al. (2009) Burgermeister et al. (2009) ملخصاً شاملاً للأنماط وأحجام شظايا الحمض النووي من خلال تعدد أشكال طول الشظايا المحددة لمباعد النسخ الداخلي في 44 نوعاً من أنواع Bursaphelenchus. ويرد في الجدول 2 مثال يبين التمييز بين الأنواع عن طريق أنماط الشظايا المحددة لمباعد النسخ الداخلي بالنسبة لعازلات عن طريق أنماط الشظايا المحددة لمباعد النسخ الداخلي بالنسبة لعازلات النوع B. mucronatus kolymensis والنوع B. mucronatus mucronatus هي والنوع B. mucronatus kolymensis

الجدول 2: أنماط تعدد أشكال طول الشظايا المحدِّدة لأنواع Bursaphelenchus

نزيم التحديد						
AluI	HinfI	MspI	HaeIII	RsaI	منتج تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل (أزواج قاعدية)	النوع
674 246	408 232 121 86 49 24	355 302 263	621 299	486 412 12	920	B. mucronatus نوع شرق آسیا = B. mucronatus mucronatus
678 247	412 232 121 87 49 24	356 303 266	625 195 105	413 263 227 22	925	B. mucronatus النوع الأوروبي = B. mucronatus kolymensis
433 256 142 96	263 232 142 139 125 24	562 363	728 197	483 420 22	925	B. xylophilus

المصدر: .Burgermeister et al. (2009).

## 2-2-4 تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل التقليدي

تتيح اختبارات تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل التالية تحديد أنواع B. xylophilus، ولكنها لن تحدِّد ما إذا كانت هناك أي أنواع أخرى من Bursaphelenchus.

#### 4-2-2 تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل التقليدي الذي يستهدف الحمض النووي الريبي لمباعد النسخ الداخلي

تناولا (2004) Matsunaga and Togashi الطريقة الخاصة بالأنواع لتحديد B. xylophilus التي تستهدف منطقة B. mucronatus و B. mucronatus و B. mucronatus و B. xylophilus على النووي الرببي. وقيِّمت هذه الطريقة على أساس خمس وأربع مجموعات يابانية من B. xylophilus و على التوالى. وفي ما يلى بروتوكول التجربة.

توضع النيماتودا كل واحدة على حدة في 5 ميكرولترات من دارئ التحلل (50 مليمولار كلوريد البوتاسيوم، و10 مليمولار من ثلاثي حمض الهيدروكلوريك (الرقم الأسي 8.2)، و2.5 مليمولار من كلوريد المغنيسيوم، و40 Nonidet P-40 بتركيز 0.45 في المائة (وزن/حجم، وجيلاتين بتركيز 0.01 في المائة (وزن/حجم، وحيلاتين بتركيز 0.01 في المائة (وزن/حجم، ومنائة (وزن/حجم، ومنائة (وزن/حجم، ومنائة (وزن/حجم، ومنائة ووزن/حجم، ومنائة (وزن/حجم، ومنائة ووزن/حجم، ومنائة ووزن/حجم، ومنائة ووزن/حجم، ومنائة ووزن/حجم، ومنائة والمنائة (وزن/حجم، ومنائة والمنائة ووزن/حجم، ومنائة والمنائة واحدة ثم لمنائة المنائة المنائة والمنائة والمنائة المنائة المنائة المنائة المنائة المنائة والمنائة المنائة ا

X-F: 5'-ACG ATG ATG CGA TTG GTG AC-3'

X-R: 5'-TAT TGG TCG CGG AAC AAA CC-3'

ويتم إجراء تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل في 10 ميكرولترات من مزيج التفاعل المحتوي على النموذج المعد سابقاً للحمض النووي (5 ميكرولتر من خلاصة الحمض النووي الخام)، و50 مليمولار من كلوريد البوتاسيوم، و10 مليمولار لكل MTP، (الرقم الأسي 8.3)، و1.5 مليمولار من كلوريد المغنيسيوم، و0.001 في المائة جيلاتين، و200 ميكرومولار لكل AmpliTaq Gold, Applied Biosystems¹) Taq في المحتول المحتول الكل بادئة، و0.25 وحدة إنزيم بلمرة الحمض النووي Taq (Applied Biosystems¹) Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600). وبعد باستخدام جهاز التدوير الحراري لنظام 9600 System 9600 الدلترة لمدة 5 دقائق في درجة حرارة 94 درجة مئوية، يتم إجراء 35 دورة (94 درجة مئوية لمدة 30 ثانية، و55.9 درجة مئوية لمدة 10 ثانية، و75 درجة مؤوية لمدة 10 ثانية، و75 درجة مؤوية لمدة 10 ثانية المؤون المؤ

وينتج هذا التفاعل أمبليكون حمض نووي يبلغ 557 زوجاً قاعدياً (bp) من كل عزلات B. xylophilus التي يتم اختبارها.

#### 4-2-2-2 تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل التقليدي الذي يستهدف الحمض النووي التابع

تناول (2005) Castagnone et al. بالوصف طريقة خاصة بالأنواع لتحديد B. xylophilus باستخدام تكنولوجيا تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل القائم على الحمض النووي التابع. وقيِّمت خصوصية هذه الطريقة على أساس نوع Bursaphelenchus غير المستهدف (B. Tusciae) B. Mucronatus و B. leoni) وكذلك باستخدام مجموعة يابانية ومجموعتين كنديتين من B. xylophilus.

ويتم إجراء التضخيم في الآحاد من النيماتودا التي يتم تحضيرها وفقاً لإجراء تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل وتغطى المعدل من (1992). Williams et al. (1992). وبإيجاز فإن النيماتودا الفردية تنقل إلى أنبوب تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل وتغطى بدارئ تحلل قدره 2.5 ميكرولترات (50 مليمولار كلوريد بوتاسيوم، و10 مليمولار (رقمه الأسي 8.2)، و2.5 مليمولار من كلوريد المغنيسيوم، و60 مغ/مل بروتيناز K، و0.45 في المائة 10.40 و 0.45 في المائة توين 20، و10.0 في المائة جيلاتين). وتوضع الأنابيب في درجة حرارة -80 درجة مئوية لمدة 45 دقيقة، وتنقل فوراً إلى درجة حرارة -60 درجة مئوية لمدة 60 دقيقة ثم 95 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة في جهاز تدوير حراري. وتستخدم خلاصة الحمض النووي الخام الناتجة كنموذج في تفاعل محدَّد لإنزيم البلمرة المتسلسل.

وصممت بادئات تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل المستخدمة في التفاعل بحيث تكون قريبة من طرفي التتابع الذي يشمل مونومر من 160 زوجاً قاعدياً لعائلة الحمض النووي التابع التي حدِّدت خصائصها من قبل في R. xylophilus (Tarès et al., 1993) رقم الانضمام إلى بنك الجينات 1606.

J10-1: 5'-GGT GTC TAG TAT AAT ATC AGA G-3'

J10-2Rc: 5'-GTG AAT TAG TGA CGA CGG AGT G-3'

ويتم إجراء تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل في 25 ميكرولتراً من مزيج التفاعل المحتوي على القالب النموذجي المعد سابقاً للحمض النووي (5 ميكرولترات من خلاصة الحمض النووي الخام)، و50 مليمولار من كلوريد البوتاسيوم، و10 مليمولار الرقم الأسي 8.2)، و2.5 مليمولار من كوريد المغنيسيوم، و200 ميكرومولار لكل dNTP، و250 نانوغراماً لكل بادئة، و1 وحدة إنزيم بلمرة الحمض النووي Taq (QBiogene). وبعد الدلترة في درجة حرارة 94 درجة مئوية لمدة 5 دقائق، يتم إجراء التدوير 25 دورة (94 درجة مئوية لمدة 30 ثانية، و94 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة، و72 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة)، مع تمديد نمائي لمدة 5 دقائق في درجة حرارة 72 درجة مئوية.

وبالنظر إلى أنه تبيَّن أن عائلة الحمض النووي التابع تتألف من تكرارات منظمة في مصفوفات جنباً إلى جنب (Tarès et al., 1993)، فإن تضخيم سلم من أجزاء متعددة من المونومر المؤلف من 160 زوجاً قاعدياً يتم الحصول عليه بعد تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل المحتوي على الحمض النووي لآفة B. xylophilus كنموذج. وفي المقابل، في حالة أنواع المنافع Bursaphelenchus الأخرى، لا يكتشف أي تضخيم، ويؤدي ذلك إلى نتيجة بسيطة وموثوقة تكون إيجابية بوضوح أو سلبية بوضوح في ما يتعلق بالنوع (Castagnone et al., 2005).

## 4-2-3 تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل في الوقت الحقيقي

يمكن إجراء اختبارات تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل في الوقت الحقيقي لتحديد B. xylophilus. وهذا النوع من الاختبارات حساس بشكل أعم ويستغرق وقتاً أقل من تقنيات تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل التقليدي المبيّنة في القسمين 4-2-1 و4-2-2.

#### 4-2-1 تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل في الوقت الحقيقي الذي يستهدف تتابعات الحمض النووي التابع

تناول (2007) François et al. (2007) طريقة خاصة بالأنواع لتحديد B. xylophilus باستخدام تتابعات الحمض النووي التابع. وتتميَّز هذه الطريقة بحساسيتها الشديدة، إذ يمكن أن تكشف عن حمض نووي جيني يبلغ 1 بيكوغرام، وآحاد من النيماتودا في عينات مختلطة تكون فيها B. mucronatus مرتبطة بأنواع B. mucronatus الوثيقة الترابط، حتى حد يصل إلى 0.1 في المائة و المنابع على التوالي. وهذه الطريقة كشفت أيضاً عن R. xylophilus مباشرة من خلال 100 مليغرام من الخشب.

ويستخلص الحمض النووي من النيماتودا المعزولة التي تكوَّنت في مستنبتات خالصة باستخدام الإجراء المضخَّم، على النحو الذي سبق بيانه (Castagnone et al., 2005)، بعد إدخال تعديل طفيف: لا يكون حجم دارئ التحلل ثابتاً بل يُعدِّل على النحو الذي يتفق مع عدد ديدان النيماتودا (أي 3 ميكرولترات لما يتراوح بين دودة واحدة وأربع ديدان من النيماتودا، و 20 ميكرولتراً لعدد أكبر من النيماتودا).

ويتم استخراج الحمض النووي من الخشب المصاب بآفة B. xylophilus. ويقطع حوالي 0.1 غرام من الخشب المصاب إلى قطع الحيني (ChargeSwitch genomic DNA Plant Kit (Invitrogen). ويقطع حوالي 0.1 ألحتوي على 1 في المائة من بولي فينيل صغيرة ويوضع في كيس بلاستيكي يحتوي على 5 مل من دارئ التحلل CST المحتوي على 1 في المائة من بولي فينيل البيروليدون، و20 ملّيمولار من كلوريد الكالسيوم. وتمرَّق العينة قليلاً باستخدام مطرقة ثم يُنزع 1 مل من سائل التحلل ويعالج وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة. وبإيجاز، يضاف 100 ميكرولتر من كبريتات دوديسيل الصوديوم إلى سائل التحلل ثم يتم تحضينه لمدة 5 دقائق في درجة حرارة الغرفة، ثم يضاف 40 ميكرولتراً من دارئ الترسيب ويتم إخضاعه لطرد مركزي بسرعة قصوى (100 g18 تقريباً) تقريباً لمدة 5 دقائق. ويُنزع 1 مل من المادة الطافية، ويضاف 100 ميكرولتر من مطهر (ST والحمض النووي المربوط من خلال خطوتين من خطوات الغسيل (يستخدم في كل منها 1 مل من دارئ الغسيل CST ويترع بعد ذلك الجزيئات المغناطيسية. (CST ويتبر الحمض النووي فوراً أو يحرَّل في درجة حرارة –20 درجة مئوية لتحليله في المستقبل.

وفي ما يلى بادئات هذه الطريقة ومسبار TaqMan المستخدم فيها:

BsatF: 5'-TGA CGG AGT GAA TTG ACA AGA CA-3'

BSatRV: 5'-AAG CTG AAA CTT GCC ATG CTA AA-3'

Fluorogenic TaqMan probe BSatS: 5'-FAM-ACA CCA TTC GAA AGC TAA TCG CCT GAG A-TAMRA-3'

ويتم إجراء تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل في حجم إجمالي 25 ميكرولتراً يحتوي على 1 ميكرولتر من الحمض النووي الجيني. ويحتوي كل تفاعل على 2.5 ميكرولتراً من ×10 دارئ التفاعل (qPCR Core Kit, Eurogentec¹)، و5 مليمولار لكل بادئة من كلوريد المغنيسيوم، 200 مليمولار لكل dNTP 0.5 لا أنزيم البلمرة ومسار. ويتم إجراء اختبارات تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل في الوقت الحقيقي في جهاز التدوير الحراري DNA Engine ومسبار. ويتم إجراء اختبارات تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل في الوقت الحقيقي في جهاز التدوير الحراري (MJ Research) Opticon 2 درجة مئوية، ثم 30 دورة (95 درجة مئوية، ثم 30 دورة (95 درجة مئوية لمدة 15 ثانية و 59 درجة مئوية لمدة 30 ثانية). وتحلل البيانات باستخدام الإصدار 3.1 أمن برنامج رصد أوبتيكون وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة. وتفحص الخلاصات من دون تخفيف ومخففة بنسبة 1: 10 في ماء خالٍ من النيوكلياز.

ويتم إجراء اختبار تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل في الوقت الحقيقي لخلاصات الخشب على جهاز التدوير (Biogene¹)، و×1 دارئ تفاعل SmartCycler II (Cepheid¹)، و×1 دارئ تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل، 0.2 مليمولار لكل dNTP، و5.5 مليمولار كلوريد مغنيسيوم، و5 في المائة تريهالوز (وزن/حجم)، و300 نانو مولار لكل بادئة، ومسبار 100 نانو مولار. وظروف التدوير هي 95 درجة مئوية لمدة 10 دقائق، ثم 40 دورة من خطوتين (95 درجة مئوية لمدة 15 ثانية و60 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة). وتحلل البيانات باستخدام تعدادات العتبة الأصلية لبرنامج 30 SmartCycler II¹ (30 وحدة فلورية). وتختبر الخلاصات دون تخفيف ومخففة بنسبة 1: 10 في ماء خالٍ من النيوكلياز.

#### hsp70 اختبار تفاعل إنزيم البرملة المتسلسل في الوقت الحقيقي الذي يستهدف تتابع الحين hsp70

استحدث (2007). Leal et al. (2007) طريقة تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل في الوقت الحقيقي على أساس جين بروتين الصدمة الحرارية (hsp70). وتبيَّن أن هذه الطريقة محدَّدة للآفة B. xylophilus (واختبرت على خمس عزلات من البلمرة المتسلسل دون ملاحظة أي تضخيم في الأنواع السبعة غير المستهدفة من Bursaphelenchus. وهذا التفاعل لإنزيم البلمرة المتسلسل لجين بروتين الصدمة الحرارية (hsp70) حساس بما يكفي لكشف ما لا يقل عن 0.005 نانوغرام من الحمض النووي الجيني للآفة B. xylophilus. وكذلك الحمض النووي المستخلص من النيماتودا الواحدة.

وفي ما يتعلق باستخلاص الحمض النووي، تستخدم طريقة (2005) Burgermeister et al. (2005) بعد إجراء التغييرات التالية: (1) تحضين جُناسة العينة في درجة حرارة 56 درجة مئوية طوال الليل بدلاً من 3 ساعات؛ (2) عدم استخدام الحمض النووي الرببي الناقل إلا عندما يستخلص الحمض النووي من نيماتودا واحدة؛ (3) وضع الدارئ (10 مليمولار Tris-HCl، برقم أُسي قدره (8.0) على غشاء العمود الأدنى ويتم تحضنه لمدة 5 دقائق قبل الطرد المركزي لشطف الحمض النووي في العينة؛ (4) تسخين خلاصات الحمض النووي في درجة حرارة 55 درجة مئوية لمدة 5 دقائق لإزالة أي بقايا

للإيثانول يمكن أن تؤثر لاحقاً على قياس كمية الحمض النووي ونوعيته وتضـخيم تفاعل إنزيم البلمرة المتسـلسـل؛ و(5) شـطف العينات في 30 ميكرولتراً (لعينات المحتوية على أكثر من دودة نيماتودا).

وفي ما يلى البادئات ومسبار TaqMan في هذه الطريقة (الأحرف الصغيرة تشير إلى الأحماض النووية المغلقة):

BxLNAF: 5'-TAA GAT GTc TTT tAc AGA TGc CAA G-3'

BxLNAR: 5'-GCc TGG ACG AcC TTG AAT-3'

Dual-labelled TaqMan probe BxLNAP: 5'-FAM-AtT GgC CGC AAA TtC GaT GAa CC-IAblkFQ-3'

ويتم إجراء تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل في 20 ميكرولتراً من حجم التفاعل المحتوي على 5 ميكرولترات من القالب النموذجي، و50 ميكرومولار قلار (RSA) (Rocal)، و0.25 مليغراماً (مليلتر من ألبومين مصل البقر غير المؤستل (Rocal) و0.1 ميكرومولار من المسبار، و0.7 مليمولار بادئ أمامي، و0.5 مليمولار بادئ خلفي، وفاء مليمولار لكل (ANTP (Roche)، و5 مليمولار كلوريد مغنيسيوم، و1 وحدة إنزيم بلمرة الحمض النووي السريع (Roche Diagnostics¹) LightCycler 1.5 ويتم إجراء التضخيم في جهاز التدوير الحراري Roche Diagnostics¹) باستخدام البارامترات التالية: دلترة أوَّلية وتنشيط لإنزيم بلمرة الحمض النووي Roche Diagnostics¹) بعند (Roche Diagnostics¹) FastStart Taq عند درجة حرارة 95 درجة مئوية لمدة 5 ثوانٍ، وتلدين لمدة 20 ثانية عند درجة حرارة 55 درجة مئوية، وتمديد لمدة 10 ثوانٍ عند درجة حرارة 75 درجة مئوية). وتحلل البيانات باستخدام الإصدار درجة من برنامج LightCycler¹.

وتأكيداً لجودة الحمض النووي الجيني المنقى الخاص بالنيماتودا المستخدم في هذا الاختبار، يتم إجراء تضخيم باستخدام البادئتين الضابطتين TTS1-F وTS1-F (يرد وصف البادئات في القسم 4-2-1) باستخدام تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل الذي يبلغ 25 ميكرولتراً من 5 ميكرولترات من القالب النموذجي، التقليدي. ويتألف مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل الذي يبلغ 25 ميكرولتراً من كلوريد البوتاسيوم، و5 مليمولار و 2.5 ميكرولتراً من كلوريد البوتاسيوم، و5 مليمولار من كلوريد المعنيسيوم، و1 ميكرومولار لكل بادئة، من كبريتات الأمونيوم؛ برقم أسي قدره 8.3)، و1.5 مليمولار من كلوريد المغنيسيوم، و1 ميكرومولار لكل بادئة، و6.1 ميكروغراماً BSA، و0.2 مليمولار لكل طNTP، و1 وحدة من إنزيم بلمرة الحمض النووي FastStart Taq (Roche¹). وتشمل بارامترات التدوير دلترة أوَّلية لمدة 5 دقائق عند درجة حرارة 94 درجة مئوية، وتليها 40 دورة (94 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة، و55 درجة مئوية لمدة دقيقتين) مع إطالة نمائية لمدة 5 دقائق عند درجة حرارة 70 درجة مئوية.

## 4-2-4 الاختبارات الجزيئية القائمة على الحمض النووي الريبي للكشيف عن النيماتودا الحية Bursaphelenchus xylophilus

الاختبارات التالية تكشف فقط عن النيماتودا الحيّة. وترد خيارات بشأن النسخ العكسي التقليدي والآني في تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل. 4-2-4 تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل باستخدام النسخ الآني والعكسي التقليدي الذي يستهدف تتابع الحمض النووي الخاص بحين بروتين الصدمة الحرارية hsp70

الكشف عن آفة B. xylophilus الحيّة بالاستناد إلى تتابع جين بروتين الصدمة الحرارية 70 ورد بيانه في (2013). Leal et al. (2013) ويمكن وفي هذا الاختبار، توضع البادئتان الأمامية والعكسية على أي من جانبي الإنترون لجين بروتين الصدمة الحرارية 70 ويمكن التمييز بسهولة بين الحمض النووي الجيني والحمض النووي المكمِّل عن طريق حجم الأمبليكون. وقيِّمت خصوصية الاختبار على أساس ستة أنواع غير مستهدفة من آفة Bursaphelenchus، و6 عزلات من B. xylophilus. وحد الكشف في هذا الاختبار هو 0.4 ديدان من النيماتودا لكل تفاعل ويتم قياسها في ثلاث من ثلاث نسخ متكررة.

ويستخلص الحمض النووي الرببي والحمض النووي الجيني من 20 دودة نيماتودا على الأقل. ويتم إجراء الاستخلاص المتزامن لكل من الحمض النووي الرببي والحمض النووي الجيني باستخدام مجموعة أدوات ('RollPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen' درجة حرارة -80 درجة وفقاً لبروتوكول الشركة المصنّعة بعد إجراء التعديلات التالية: تطرح كريات النيماتودا التي خزّنت عند درجة حرارة -80 درجة مئوية باستخدام مدق الكريات Kontes Pellet Pestle (Kimble Chase Life Science and Research Products) ويضاف ميكرولتراً من دارئ التحلل RLT (من مجموعة أدوات الاستخلاص التي تنتجها شركة (Qiagen') إلى كل كرية محتوية على النيماتودا. ويتم الانتهاء من خطوة المجانسة باستخدام الأعمدة الدوارة (Qiagen') من الريبونيكليس، ويشطف (Qiagen')). ويشطف الحمض النووي الرببي من العمود باستخدام 20 ميكرولتراً من الماء الخالي من الريبونيكليس، ويشطف الحمض النووي باستخدام 50 ميكرولتراً من الدارئ EB المدفأ مسبقاً (من مجموعة الاستخلاص التي تنتجها شركة 'Qiagen'). ويسمح للشُطافة بأن تستقر على غشاء العمود لمدة 3 دقائق تقريباً لتيسير الشطف الأقصى باستخدام الطرد المركزي لمرة واحدة.

وفي ما يلي البادئات الخاصة بآفة B. xylophilus المستخدمة في هذا الاختبار، والأمبليكون المنتج من نموذج الحمض النووي المكمّل هو 473 زوجاً قاعدياً:

Hsp23F1: 5'-ACC CAA GTT TGA GTT GTA TTG TTT-3'

Hsp19R2: 5'-ACG GTA ACA ACG GCA TCC T-3'

وتستهدف البادئات الضابطة التالية حين الأكتين ويمكن إدراجها لضمان إجراء الاختبار حسب المتوقع عند فحص الحمض النووي الجيني المعزول. ويؤدي ذلك إلى إنتاج أمبليكون يتكون من 228 زوجاً قاعدياً:

BxActF3: 5'-TCG TCA CCA ACT GGG ATG ATA-3'

BxActR3: 5'-CAC CAG TGG TAC GAC CG-3'

ويستخدم بروتوكول من خطوتين لتفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل عن طريق النسخ العكسي. ويكتمل تفاعل النسخ العكسي باستخدام مجموعة أدوات النسخ (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics¹) إلى جانب البروتوكول البادئ anchored-oligo(dT)18. وفي ما يتعلق بتخليق الحمض النووي المكمّل، يستخدم 12 ميكرولتراً

من الحمض النووي الربيي كمادة بادئة. ويشمل ذلك الخطوة الاختيارية المقترحة من الشركة المصنعة لمجموعة الأدوات والتي تتمثل في دلترة الحمض النووي الرببي والبادئات لمدة 10 دقائق في درجة حرارة 65 درجة مئوية، ويلي ذلك تبريد فوري على الثلج. وبعد الانتهاء من تخليق الحمض النووي المكمِّل، تخرَّن العينات في درجة حرارة -20 درجة مئوية لاستخدامها لاحقاً كقالب نموذجي.

ويحتوي مزيج التفاعل المؤلف من 25 ميكرولتراً من تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل من 2 ميكرولتر من الحمض النووي المكمّل كقالب نموذجي، و19 ميكرولتراً من الدارئ (GoTaq Flexi PCR (Promega¹) و 0.20 ملّيمولار لكل (ANTP (Roche Diagnostics¹) و 1.25 وحدة من إنزيم بلمرة الحمض النووي GoTaq Flexi و 0.20 ملّيمولار لكل (Promega¹)، و 0.40 ميكرومولار لكل بادئة (بروتين الصدمة الحرارية Hsp13F1 وبروتين الصدمة الحرارية Hsp19R2). ويتم إجراء التضخيم وفقاً لبارامترات التدوير التالية: دلترة أوّلية لمدة 5 دقائق عند درجة حرارة 95 درجة مئوية، وتلدين لمدة 30 ثانية عند درجة حرارة 06 درجة مئوية، من التضخيم (دلترة لمدة 30 ثانية عند درجة حرارة 75 درجة مئوية)، وإطالة نمائية لمدة 5 دقائق عند درجة حرارة 70 درجة مئوية. وفي ما يتعلق بالتضخيم باستخدام البادئات الضابطة، يكون مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل المؤلف من 25 ميكرولترا و و نفسه كما سبق بيانه أعلاه، ولكن باستخدام 1 ميكرولتر من الحمض النووي الجيني (40 نانو غرام/ميكرولتر) و 1 ميكرومولار لكل بادئة (BxActF3)، ويتم إجراء التضخيم باستخدام بادئات التدوير التالية: دلترة أوّلية لمدة 5 دقائق عند درجة حرارة 95 درجة مئوية، وتليها 35 دورة (95 درجة مئوية لمدة 30 ثانية، و 52 درجة مئوية المدة 30 ثانية، و 52 درجة مئوية لمدة 30 ثانية، و 52 درجة مئوية لمدة 30 ثانية، و 72 درجة مئوية لمدة 30 ثانية، و 73 درجة مئوية لمدة 30 ثانية لمؤية لمؤ

4-2-4 تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل باستخدام النسخ العكسي في الوقت الحقيقي لاستهداف تتابع الحمض النووي المكمِّل لجين بروتين الصدمة الحرارية a hsp70.

يرد في (2013) Leal et al. (2013) وصف لاختبار SYBR Green لتفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل باستخدام النسخ العكسي ليود في الوقت الحقيقي لتحديد B. xylophilus الحيّة حصرياً عن طريق كشف وجود hsp70 mRNA كمؤشر للقدرة على المعيشة والنمو بشكل سليم. ويكشف هذا الاختبار التضخيم المحدَّد للحمض النووي المكمِّل لجين البروتين hsp70 في hsp70 في xylophilus المنسوخة عكسياً، حيث تربط البادئة العكسية عبر وصلة إكسون – إنترون، ويؤدي ذلك بالتالي إلى استبعاد تضخم الحمض النووي الجيني. وقيِّمت خصوصيتها على أساس ستة أنواع غير مستهدفة من Bursaphelenchus وست عزلات من ثلاث من ثلاث من ثلاث من ثلاث من متكررة.

ويتم إجراء بروتوكول الاستخلاص المتزامن للحمض النووي الريبي والحمض النووي الجيني مثلما في طريقة تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل التقليدي (القسم 4-2-4-1).

وفي ما يلي البادئات المستخدمة في هذا الاختبار:

HspexF3: 5'-AGA ACC ACT CCC TCG TAT GTC-3'

HspexR3: 5'-TCA AAC GCT TGG CAT CAA-3'

ويمكن إدراج البادئات الضابطة الداخلية التالية لضمان إجراء الاختبار حسب المتوقع:

BxActF3: 5'-TCG TCA CCA ACT GGG ATG ATA-3'

BxActR3: 5'-CAC CAG TGG TAC GAC CG-3'

ويستخدم بروتوكول من خطوتين لتفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل عن طريق النسخ العكسي، ويتم تخليق الحمض النووي المكمِّل مثلما في طريقة تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل التقليدي (القسم 4-2-4-1) باستثناء استخدام البادئة anchored-oligo(dT)18 أو البادئة الخاصة بالتتابع (HspexR3). وبعد تخليق الحمض النووي المكمِّل، تخرَّن العينات في درجة حرارة -20 درجة مئوية لاستخدامها لاحقاً كقالب نموذجي.

ويتألف مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل المكون من 20 ميكرولتراً من 5 ميكرولترات من نموذج الحمض النووي المكمّل (HspexR3) بن 10 في 10 ميكرومولار من بادئة أمامية (Tris برقم أسي قدره 8.0)، و 0.6 ميكرومولار من بادئة أمامية (HspexR3)، و 4 ميكرولترات من HspexR3) و 5× LightCycler FastStart DNA MasterPLUS ميكرومولار من بادئة عكسية (SYBR Green 1 Mix (Roche Diagnostics¹) و 10 ميكرومولار من بادئة عكسية (Roche Diagnostics¹) و 10 ميكرومولار من بادئة عكسية (Roche Diagnostics¹) و 10 ميكرومولار من بادئة و 10 من برنامج التضخيم في الوقت الحقيقي في جهاز التدوير (Roche Diagnostics¹) باستخدام الإصدار 4.1 من برنامج (10 دورة و 10 درجة مئوية للدة 15 ثانية، و 10 درجة مئوية للدة 10 ثوانٍ و 72 درجة مئوية لمدة 15 ثانية). وفي ما يتعلق بالتضخيم باستخدام البادئات الضابطة، لا يختلف مزيج للدة 10 ثوانٍ و 10 درجة مئوية لمدة 15 ثانية و 10 ميكرومولار لكل بادئة (10 دورة 10 و 10 دورة 10 دورة (10 درجة مئوية المدة 10 ثانية). ويتم إجراء التضخيم باستخدام بارامترات التدوير التالية: دلترة أوَّلية وتنشيط لمدة 10 ثوانٍ عند درجة حرارة 95 درجة مئوية، وتليها 45 دورة (95 درجة مئوية لمدة 15 ثانية، و 52 درجة مئوية لمدة 15 ثانية).

#### 4-2-4 التضخيم المتساوي الحرارة بواسطة العروة (LAMP)

يرد في (2009) Kikuchi et al. (2009) وصف طريقة للكشف عن B. xylophilus في عينات الخشب. واستحدث هؤلاء المؤلفون طريقة كشف Kikuchi et al. (2009) على نحو أسرع وبحساسية أكبر ثما في اختبار تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل في الوقت الحقيقي باستخدام مسبار TaqMan الذي طورته أيضاً نفس هذه المجموعة. وتم تأكيد خصوصية البادئات والاختبار باستخدام الحمض النووي المستخلص من المادة غير المستهدفة: عشرة أنواع من النيماتودا المرتبطة بنيماتودا B. xylophilus، وحُدِّدت حساسية الاختبار كعشر من أجناس النيماتودا غير المستهدفة، وP. thunbergii و P. thunbergii و كدِّدت حساسية الاختبار كعشر نسخ من الجين المستهدف (مباعد النسخ الداخلي (ITS) و 2.5 لنيماتودا معزولة من مستنبت خالص.

ويتم تحضين عينات الخشب (حوالي 0.12 غراماً من الخشب في الإجراء التجريبي) عند درجة حرارة 55 درجة مئوية لمدة 20 دقيقة في 800 ميكرولتر من دارئ الاستخلاص، ويحتوي ذلك على البروتيناز K، وداي ثيوثريتول الذي يرد مع مجموعة

أدوات الكشف عن Nippon Gene<sup>1</sup>) B. xylophilus)، ويلي ذلك عملية تحضين لمدة 10 دقائق عند درجة حرارة 95 درجة مئوية.

وتستخدم في هذه الطريقة البادئات التالية:

ITS(ID19) F3: 5'-GCA GAA ACG CCG ACT TGT-3'

ITS(ID19) B3: 5'-TCA TCC GAA CGT CCC TGA C-3'

ITS(ID19) FIP: 5'-CGC GGA ACA AAC CGC GTA AAA C-CG TTG TGA CAG TCG TCT C G-3'

ITS(ID19) BIP: 5'-AGA GGG CTT CGT GCT CGA TTGGCC GTT GAA ACA ACA TCA CC-3'

ITS(ID19) LF: 5'-AGA TGG TGC CTA ACA TTG CG-3'

ويتم إجراء تفاعل التضخيم المتساوي الحرارة بواسطة العروة على النحو الذي بيَّنة (2000). Notomi et al. (2000) المؤلف أدوات تضخيم الحمض النووي (Loopamp DNA Amplification Kit (Eiken Chemical). ويحتوي مزيج التفاعل المؤلف من 25 ميكرولتراً من 2 ميكرولتر من الحمض النووي المستخلص، و5 بيكومول لكل بادئة من البادئتين FIP وBIP وPIP وPIP وPIP و التفاعل، يكومول لكل بادئة من البادئتين Eiken Chemical، و02 بيكومول للبادئة المؤلف و1 ميكرولتر من إنزيم بلمرة الحمض النووي Bst و1 ميكرولتر من كاشف فلوري (Eiken Chemical). ويتم تحضين مزيج التفاعل التفاعل لمدة 60 أو 120 دقيقة في درجة حرارة 63 درجة مئوية وينتهي بتحضين في درجة حرارة 80 درجة مؤلف التفاعل التفاعل التفاعل التفاعل النفية فوق البنفسجية.

ويمكن تقييم المنتجات المضخّمة بصورة اختيارية عن طريق استخدام نظام الكشف القائم على المسبار. ويستخدم الشكل المعالج بالبيوتين لبادئة -'FIP 5 في تفاعل التضخيم المتساوي الحرارة بواسطة العروة. وبعد انتهاء التفاعل، يضاف 10 ميكرولترات من المسبار الموسوم بمادة إيزوتيوسيانات الفلورسين (10 بيكومول/ميكرولتر؟ TCG TGC TGC TTG GTC GTG C-3′ ويضاف ذلك المسبار إلى مزيج التفاعل ويتم تحضينه لمدة 5 دقائق في درجة حرارة 95 درجة مئوية، ثم يبرَّد ببط ليصل إلى درجة حرارة 25 درجة مئوية، ثم يبرَّد ببط ليصل إلى درجة حرارة 50 درجة مئوية. ويُخفف مزيج التفاعل باستخدام 100 ميكرولتر من الدارئ الجاري (محلول ملحي مدروء بالفوسفات درجة مئوية. ويُخفف من ويضاف الشركة المصنّعة. مع 3 في المائة توين) ويوضع مباشرة على شرائط التهجين HybriDetect الناشئة عن التضخيم المحدّد. وفي المقابل، عندما يحدث تضخيم غير محدّد، لا تلاحظ أي إشارة على شريط الاختبار.

#### 4-2-6 ضوابط الاختبارات الجزيئية

لكي تكون نتيجة الاختبار التي يتم الحصول عليها موثوقة، ينبغي النظر في استخدام ضوابط ملائمة تتوقف على نوع الاختبار المستخدم ومستوى التيقن المطلوب في كل سلسلة من سلاسل عزل الحمض النووي وتضخيم الحمض النووي

للآفة المستهدفة. وفي ما يتعلق بالاختبارات الجزيئية، ينبغي استخدام ضابط إيجابي للحمض النووي، وضابط سلبي للتضخم (لا يستخدم ضابط للقالب النموذجي) وكذلك، عند الاقتضاء (مثل الكشف المباشر عن النيماتودا) ضابط داخلي للضوابط الدنيا. وفي حالة تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل باستخدام النسخ العكسي (التقليدي أو الآني) ينبغي إدراج ضابط إيجابي للنسخ العكسي.

الضابط الإيجابي للحمض النووي. يستخدم هذا الضابط لرصد ما إذا كان الاختبار يتم إجراؤه حسب المتوقع في حدود ظروف التجربة وبارامتراتها. ويمكن أن يكون الضابط الإيجابي أي حمض نووي يحتوي على تتابع مستهدف للاختبار؛ أي، الحمض النووي لآفة B. xylophilus عندما تكون الاختبارات السابقة قد كشفت عن نتائج إيجابية؛ أو بلازميد يحتوي على التتابع المستهدف المستنسخ؛ أو الحمض النووي الريبي المنسوخ في المختبر؛ أو منتج من تفاعل تضخيم سابق؛ أو حمض نووي مزدوج مخلَّق، أو أوليغونيوكليوتيد طويل.

ضابط التضخيم السلبي (بدون ضابط للقالب النموذجي). يلزم هذا الضابط لتفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل من أجل استبعاد النتائج الإيجابية التي تكون كاذبة بسبب التلوث أثناء تحضير مزيج التفاعل أو أثناء التضخيم غير المحدّد. ويضاف الماء الصالح لتفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل الذي كان يستخدم في تحضير مزيج التفاعل في مرحلة التضخيم.

الضابط الداخلي. في ما يتعلق بتفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل التقليدي، وتفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل في الوقت الحقيقي، والتضخيم المتساوي الحرارة بواسطة العروة، يمكن استخدام ضوابط داخلية، مثل منطقة مباعد النسخ الداخلي (ITS)، أو β-actin، أو جينات COX لاستبعاد إمكانية النتائج السلبية الكاذبة لتفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل بسبب فشل أو تدهور استخلاص الحمض النووي أو وجود موانع للتفاعل.

وفي ما يتعلق بتفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل باستخدام النسخ العكسي، ينبغي إدراج ضابط غير مضاد للنسخ العكسي للتحقق من أن عينات الحمض النووي الريبي غير ملوثة بالحمض النووي للجينوم. ويشمل هذا الضابط كل كواشف تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل باستخدام النسخ العكسي باستثناء إنزيم النسخ العكسي. وفي حال عدم وجود تلوث بالحمض النووي للجينوم، ينبغى ألا يولِّد هذا الضابط إشارة بعد التضحيم.

وفي ما يتعلق بتفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل باستخدام النسخ العكسي، ينبغي إدراج ضابط مضاد للنسخ العكسي للتحقق من أن إنزيم النسخ العكسي يعمل بطريقة صحيحة. ويشمل هذا الضابط كل كواشف تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل باستخدام النسخ العكسي وخلاصة الحمض النووي الرببي التي تشمل التتابع المستهدف للاختبار (مثل خلاصة الحمض الرببي الجهيّزة في المختبر والتي تكون نتيجتها الإيجابية قد أُكدّت من قبل). وينبغي أن يولِّد هذا الضابط إشارة بعد التضخيم.

وفي ما يتعلق بتفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل والتضخيم المتساوي الحرارة بواسطة العروة، ينبغي توخي الحذر لتجنب انتقال التلوث بسبب الهباء الجوي من الضابط الإيجابي أو من العينات الإيجابية.

#### 4-2-7 تفسير نتائج تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل

#### 4-2-7 تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل التقليدي

لا يُعد تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل الخاص بمسبب المرض صالحاً إلاّ إذا:

- ولَّدت الضوابط الإيجابية منتج تضخيم بالحجم المتوقع للنيماتودا المستهدفة؛
- لم تولّد ضوابط الاستخلاص السلبية وضوابط التضخيم السلبية منتج تضخيم بالحجم المتوقع للنيماتودا المستهدفة.

وإذا استخدمت بادئات الضبط الداخلي في التفاعلات البسيطة، ينبغي أن تولِّد الضوابط الإيجابية، وكذلك كل عينة من عينات الاختبار، منتج تضخيم بالحجم المتوقع. وفي ما يتعلق بالتفاعلات المتعددة، ينبغي أن تولِّد جميع العينات السلبية منتج تضخيم بالحجم المتوقع. وفي بعض الحالات، يمكن أيضاً للعينات الإيجابية من النيماتودا أن تؤدي إلى منتج تضخيم بالحجم المتوقع باستخدام بادئات الضبط الداخلي.

وسوف يُعتبر اختبار العينة إيجابياً إذا ولَّد منتج تضخيم بالحجم الصحيح.

#### 4-2-7-2 تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل في الوقت الحقيقي

لا يعتبر تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل في الوقت الحقيقي سليماً إلاّ إذا:

- أنتجت الضوابط الإيجابية منحني تضخيم باستخدام البادئات الخاصة بالنيماتودا المستهدفة
  - لم تولّد الضوابط السلبية منحنى تضخيم.

وإذا استخدمت بادئات الضبط الداخلي، ينبغي أن تنتج الضوابط الإيجابية وكل عينة من عينات الاختبار منحني تضخيم.

#### 8-2-4 التتابع

أُجري تسلسل مباشر لعدة مناطق جينومية من النيماتودا المعزولة (عينة واحدة كما في (2013) (Wu et al. (2013)) أو عدة عينات من مستنبتات على فطريات في حالة ((2007)) Ye et al. (2007) لأغراض تحديد هوية أنواع B. xylophilus والتمييز بين مختلف أنواع المطعّم (ITS-1, ITS-2, 5.8S) وستمل هذه المناطق مباعدات النسخ الداخلي (28S و 1.3.2) للحمض النووي المطعّم (Abelleira et al., 2011; Wu et al., 2013) (Ye et al., 2007) أو منطقة D2-D3 من الجينوم 28S للحمض النووي المطعّم بطريقة مباشرة وتضخم المنطقة المستهدفة عن طريق تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل، ويتم إجراء تتابع للأمبليكونات سواءً بطريقة مباشرة أو بعد استنساخها. ويمكن بعد ذلك تحليل بيانات التتابع باستخدام أداة بحث مواءمة البيانات المحلية الأساسية (BLAST) المتاحة في المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) ومقارنتها مع تتابعات المركز الوطني لمعلومات المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (مثل أرقام الانضمام 140646254) والموافق المتاحة في قاعدة بيانات المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (مثل أرقام الانضمام 140646254)

و4460340 بالنسبة لمنطقة مباعد النسخ الداخلي المذكورة أعلاه، وAY508105 إلى AY508109 بالنسبة لمنطقة الحمض النووي المطعَّم 285).

وفي ما يتعلق بجين مباعد النسخ الداخلي، إذا كان اختلاف تسلسل تتابع الأزواج بالمقارنة مع التتابعات المعلومة في حالة B. xylophilus أقل من 2 في المائة ولكن أكثر من 2 في المائة مع كل الأنواع الأخرى، فإنحا تُحدَّد على أنحا ألا المعلومة في xylophilus B. xylophilus وفي ما يتعلق بالجين 28S، إذا كان اختلاف تتابع أزواج العينة بالمقارنة مع التتابعات المعلومة في B. xylophilus أقل من 0.5 في المائة ولكن أكثر من 0.5 في المائة مع كل الأنواع الأخرى، فإنحا تحدَّد على أنحا ألحا ألحر من 0.5 في المائة مع كل الأنواع الأخرى، فإنحا تحدَّد على أنحا ألحا ألحر من 0.5 في المائة مع كل الأنواع الأخرى، فإنحا تحدَّد على أنحا المحاورة في المائة مع كل الأنواع الأخرى، فإنحا تحدَّد على أنحا المحاورة في المائة ولكن أكثر من 0.5 في المائة مع كل الأنواع الأخرى، فإنحا تحدَّد على أنحا المحاورة في المائة ولكن أكثر من 0.5 في المائة مع كل الأنواع الأخرى، فإنحا تحدَّد على أنحا المحاورة في المائة ولكن أكثر من 0.5 في المائة مع كل الأنواع الأخرى، فإنحا تحدَّد على أنحا المحاورة في المائة ولكن أكثر من 0.5 في المائة مع كل الأنواع الأخرى، فإنحا المحاورة المحاورة في المائة ولكن أكثر من 0.5 في المائة مع كل الأنواع الأخرى، فإنحا المحاورة ولكن أكثر من 0.5 في المائة مع كل الأنواع الأخرى، فإنحا المحاورة ولكن أكثر من 0.5 في المائة ولكن أكثر المائة ولكن أكثر من 0.5 في المائة ولكن أكثر المائة ولكن أكثر المائة ولكن أكثر المائة ولكن

وينبغي إجراء مزيد من البحث في أي نتائج أخرى.

ويمكن أيضاً استخدام منطقة الوحدة الفرعية لأكسيداز السيتوكروم I COI لتحديد هوية الأنواع. وتتاح الإرشادات المتعلقة بالمنهجية والتتابع المرجعي المستخلص من المواد المرجعية (التتابع Q38) في بنك الحجر (Q-bank). بما في ذلك أداة البحث الخاصة بمواءمة البيانات المحلية الأساسية (http://www.q-bank.eu/Nematodes/).

#### **5− السجلات**

ينبغي الاحتفاظ بالسجلات والأدلة على النحو المبيَّن في القسم 2-5 من المعيار 27 (بروتوكولات تشخيص الآفات الخاضعة للوائح).

وفي الحالات التي قد تتأثر فيها الأطراف المتعاقدة الأخرى بنتائج التشخيص، لا سيما في حالات عدم الامتثال (المعيار B. xylophilus وفي الحالات التي تظهر فيها آفة على المعيار عن عدم الامتثال وإجراءات الطوارئ) وفي الحالات التي تظهر فيها آفة على أفي منطقة للمرة الأولى، ينبغي الاحتفاظ بالسجلات والأدلة والمواد الإضافية التالية لمدة لا تقل عن سنة واحدة على نحو يكفل إمكانية التتبع:

- عينة من النيماتودا سواء على شريحة دائمة أو مثبّتة في مثبت TAF أو في محلول غليسرين. وفي الحالات التي توجد فيها B. xylophilus فيها B. xylophilus فيها B. xylophilus فيها B. xylophilus فيها B. cinerea. وقد يكون من المفيد أيضاً الاحتفاظ بعينات أو بالحمض النووي لإجراء اختبار جزيئي في مرحلة لاحقة حتى في حالة التحديد المورفولوجي.
- إذا كان التحديد مستنداً إلى تقنيات جزيئية، يمكن الاحتفاظ بخلاصة الحمض النووي في درجة حرارة -20 درجة مئوية وخلاصة الحمض النووي الريبي في درجة حرارة -80 درجة مئوية.
- في الحالات التي تظهر فيها آفة B. xylophilus في الخشب أو في المنتجات الخشبية، بما في ذلك مواد التعبئة الخشبية، الخشبية، ينبغي الاحتفاظ بالبيانات المتعلقة بالمنشأ والمواد (مثل الأخشاب المستديرة ومواد التعبئة الخشبية) وظروف الاستيراد (مثل الظهور المتزامن للخنافس الناقلة) بدلاً من المعلومات الجغرافية المتعلقة بأخذ العينات. ويلاحظ أن مواد التعبئة الخشبية ليست بالضرورة من نفس منشأ الشحنة. ووفقاً للمعيار 15 (إخضاع مواد التعبئة

الخشبية في التجارة الدولية للوائح)، ينبغي أن تحمل مواد التعبئة الخشبية في التجارة الدولية علامة يمثل فيها الحرفان الأولان رمز المنظمة الدولية لتوحيد المقاييس في البلد الذي تنتج فيه مواد التغليف الخشبية.

## 6- جهات الاتصال للحصول على معلومات إضافية

يمكن الحصول على مزيد من المعلومات عن هذا الكائن أو عن هذا البروتوكول من الأشخاص التالية أسماؤهم:

Julius Kühn-Institut (JKI), Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for National and International Plant Health, Messeweg 11-12, D-38104 Braunschweig, Germany (Thomas Schröder; e-mail: <a href="mailto:thomas.schroeder@jki.bund.de">thomas.schroeder@jki.bund.de</a>).

Technical Center, Ningbo Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No. 9 Mayuan Road, Ningbo, 315012 China (Jianfeng Gu; e-mail: jeffgu00@qq.com).

ANSES Plant Health Laboratory, 7 rue Jean Dixméras, 49044 Angers Cedex 01, France (Geraldine Anthoine; e-mail: <a href="mailto:geraldine.anthoine@anses.fr">geraldine.anthoine@anses.fr</a>).

Canadian Forest Service, 506 West Burnside Road, Victoria, BC V8Z 1M5, Canada (Isabel Leal; e-mail: ileal@nrcan.gc.ca).

Canadian Food Inspection Agency, 3851 Fallowfield Road, Ottawa, ON K2H 8P9, Canada (Fencheng Sun; e-mail: <a href="mailto:sunfc@inspection.gc.ca">sunfc@inspection.gc.ca</a>).

وبالإضافة إلى الخبراء الواردة أسماؤهم أعلاه، يرد في الجدول 3 معلومات عن الخبراء الإقليميين المعنيين بتغيير النيماتودا.

الجدول 3: قائمة الخبراء الإقليميين والوطنيين المعنيين بآفة Bursaphelenchus xylophilus (قائمة غير حصرية)

تفاصيل الاتصال بالخبير	الإقليم أو البلد
, (معهد الحراجة والتكنولوجيا الحيوية والزراعية)، Forestry and Agricultural Biotechnology Institute (FABI) University of Pretoria, Pretoria 0002, South Africa (Michael J. Wingfield; e-mail: mike.wingfield@fabi.up.ac.za)	أفريقيا
CSIRO Ecosystem Sciences-Black Mountain Laboratories (مختبرات ماونتين بلاك لعلوم النظام الإيكولوجي التابعة لمنظمة الكومنولث للبحوث العلمية والصناعية) Australia (Mike Hodda; e-mail: Mike.Hodda@csiro.au)	أستراليا
Nanjing Forestry University, No. 159 Longpan (إدارة وقاية الغابات) Department of Forest Protection Road, Nanjing, 210037 China (Boguang Zhao; e-mail: 13505186675@126.com)	الصين
Departamento Biologia, Universidade de (مختبر النيماتودا) قسم البيولوجيا، جامعة إيفورا) NemaLab-ICAM Évora, 7002-554 Évora, Portugal (Manuel Mota; e-mail: <u>mmota@uevora.pt</u> )	الاتحاد الأوروبي
Forestry and Forest Products Research Institute (معهد بحوث الغابات) Forest Pathology Laboratory  Tsukuba, Ibaraki 305-8687, Japan (Mitsuteru Akiba; e-(معهد بحوث الغابات والمنتجات الغابية) mail: akiban@ffpri.affrc.go.jp)	اليابان
Korea Forest Research ، (شُعبة الآفات الحشرية وأمراض الغابات)، Division of Forest Insect Pests and Disease 207 Cheongnyangni 2-dong, Dongdaemun-gu, Seoul 130-712, (المعهد الكوري لبحوث الغابات)، Institute Korea (ROK) (Hyerim Han; e-mail: hrhan@forest.go.kr)	جمهورية كوريا (كوريا الجنوبية)

ويمكن أن تقدِّم المنظمات الوطنية لوقاية النباتات أو المنظمات الإقليمية لوقاية النباتات أو الأجهزة التابعة لتدابير الصحة النباتية طلباً لإعادة النظر في بروتوكول التشيخيص من خلال أمانة الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات (ippc@fao.org) التي ستقوم بدورها بإحالتها إلى الفريق الفني المعني بوضع بروتوكولات التشخيص.

## 7- شكر وتقدير

كتب هذا البروتوكول التشخيصي Thomas Schröder (المركز الاتحادي لبحوث النباتات المستزرعة، ومعهد الصحة النباتية الوطنية والدولية، ألمانيا (انظر القسم السابق))، وGeraldine Anthoine (مختبر الصحة النباتية التابع للوكالة الفرنسية لسلامة الأغذية والبيئة والصحة المهنية، فرنسا (انظر القسم السابق))، وIsabel Leal (دائرة الغابات الكندية، كندا (انظر القسم السابق))، وJianfeng Gu (المركز التقني، هيئة نينغبو للتفتيش والحجر في منافذ الدحول والخروج، الصين (انظر القسم السابق)). وFengcheng Sun (الوكالة الكندية للتفتيش على الأغذية، كندا (انظر القسم السابق)).

وساهم كل من Vladimir Gaar (مختبر التشخيص التابع للإدارة الحكومية للصحة النباتية، الجمهورية التشيكية)، و David McNamara (سابقاً منظمة وقاية النباتات في أوروبا والبحر المتوسط) في إعداد هذا البروتوكول في مراحله الأولى.

وتولى في البداية إعداد وصف تقنية تعدد أشكال طول الشظايا المحددة لمباعد النسخ الداخلي Wolfgang Burgermeister (معهد فسيولوجيا والميكروبيولوجيا والسلامة البيولوجية، معهد يوليوس كوهن، ألمانيا). وقدَّم UMR1064 INRA/UNSA/CNRS, Interactions Plantes-Microorganismes et ) Philippe Castagnone-Sereno وقدَّم Sante Vegetale, France) الوصف الأوَّلي لطريقة تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل التقليدي المستهدف للحمض النووي التابع عند تحديد هوية آفة B. xylophilus.

ويستند نص هذا البروتوكول التشخيصي جزئياً إلى البروتوكول التشخيصي لمنظمة وقاية النباتات في أوروبا والبحر المتوسط بشأن آفة EPPO, 2001, 2013b) B. xylophilus)

## 8- المراجع

يمكن أن يشير هذا الملحق إلى المعايير الدولية لتدابير الصحة النباتية. وتتاح هذه المعايير في بوابة الصحة النباتية الدولية في الرابط التالى: https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/ispms.

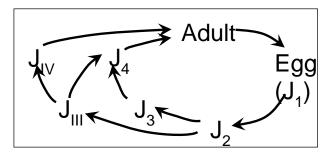
- **Abelleira, A., Picoaga, A., Mansilla, J.P. & Aguin, O.** 2011. Detection of *Bursaphelenchus xylophilus*, causal agent of pine wilt disease on *Pinus pinaster* in northwestern Spain. *Plant Disease*, 95(6): 776–776.
- **Andrássy, I.** 1984. Klasse Nematoda (Ordnungen Monhysterida, Desmoscolecida, Araeolaimida, Chromadorida, Rhabditida). *In Bestimmungsbücher zur Bodenfauna Europas*, pp. 24–25. Stuttgart, Germany, Gustav Fischer Verlag. 509 pp.
- **Baermann, O.** 1917. [A simple method of discovering ankylostomo (nematode) larvae in faeces.] *Med. Geneeslc. Lab. Weltevreden*, 1917: 41–47 (in German).
- **Barstead, R.J., Kleiman, L. & Waterston, R.H.** 1991. Cloning, sequencing and mapping of an alphaactinin gene from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 20: 69–78
- van Bezooijen, J. 2006. *Methods and techniques for nematology*. Wageningen, Netherlands, Department of Nematology, Wageningen University. 112 pp. Available at https://www.wageningenur.nl/upload\_mm/4/e/3/f9618ac5-ac20-41e6-9cf1-c556b15b9fa7\_MethodsandTechniquesforNematology.pdf.
- **Bongers, T.** 1989. [*The nematodes of the Netherlands*] (translated from the Dutch by J. van de Haar). Wageningen, Netherlands, Wageningen Agricultural University. 83 pp.
- **Braasch, H.** 2001. *Bursaphelenchus* species in conifers in Europe: Distribution and morphological relationships. *EPPO Bulletin*, 31: 127–142.
- **Braasch, H., Burgermeister, W. & Gu, J.** 2009. Revised intra-generic grouping of *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Nematoda: Aphelenchoididae). *Journal of Nematode Morphology and Systematics*, 12(1): 65–88.
- **Braasch, H., Gu, J. & Burgermeister, W.** 2011. *Bursaphelenchus mucronatus kolymensis* comb. n.: New definition of the "European type" of *B. mucronatus. Journal of Nematode Morphology and Systematics*, 14(2): 77–90.
- **Braasch, H. & Schönfeld, U.** 2015. Improved morphological key to the species of the *xylophilus* group of the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937. *EPPO Bulletin*, 45(1): 73–80.
- **Burgermeister, W., Braasch, H., Metge, K., Gu, J., Schröder, T. & Woldt, E.** 2009. ITS-RFLP analysis, an efficient tool for identification of *Bursaphelenchus* species. *Nematology*, 11: 649–668.
- **Burgermeister, W., Metge, K., Braasch, H. & Buchbach, E.** 2005. ITS-RFLP patterns for differentiation of 26 *Bursaphelenchus* species (Nematoda: Parasitaphelenchidae) and observations on their distribution. *Russian Journal of Nematology*, 13(1): 29–42.
- Cardoso, J., Fonseca, L. & Abrantes, I. 2012. Direct detection of the pinewood nematode, Bursaphelenchus xylophilus, from pine wood, bark and insect vector. European Journal of Plant Pathology, 133: 419–425.
- Castagnone, C., Abad, P. & Castagnone-Sereno, P. 2005. Satellite DNA-based species-specific identification of single individuals of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae). *European Journal of Plant Pathology*, 112: 191–193.
- **Dwinell, L.D.** 1993. First report of pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) in Mexico. *Plant Disease*, 77: 846.
- **Dwinell, L.D.** 1997. The pinewood nematode: Regulation and mitigation. *Annual Review of Phytopathology*, 35: 153–166.
- **Edwards, O.R. & Linit, M.J.** 1992. Transmission of *Bursaphelenchus xylophilus* through oviposition wounds of *Monochamus carolinensis* (Coleoptera: Cerambycidae). *Journal of Nematology*, 24(1): 133–139.
- **EPPO** (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2001. *Bursaphelenchus xylophilus*. Diagnostics PM 7/4 (1). *EPPO Bulletin*, 31(1): 61–69.
- **EPPO** (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2012. *Bursaphelenchus xylophilus* and its vectors: Procedure for official control. National regulatory control systems PM 9/1 (5). *EPPO Bulletin*, 42(3): 477–485.

- **EPPO** (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2013a. *Diagnostic protocols for regulated pests: Pictorial glossary of morphological terms in nematology*. EPPO Technical Document No. 1056 (rev. 4). Paris, EPPO. 21 pp.
- **EPPO** (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2013b. *Bursaphelenchus xylophilus*. Diagnostics PM 7/4 (3). *EPPO Bulletin*, 43(1): 105–118.
- **EPPO** (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2013c. Nematode extraction. Diagnostics PM 7/119 (1). *EPPO Bulletin*, 43(3): 471–496.
- **EPPO** (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2014. *Bursaphelenchus xylophilus*. Addendum to Diagnostics PM 7/4 (3). *EPPO Bulletin* 44(1): 105.
- **EPPO/CABI.** 1996. *Bursaphelenchus xylophilus. In* I.M. Smith, D.G. McNamara & P.R. Scott, eds. *Quarantine pests for Europe*, 2nd edn. Wallingford, UK, CABI. 1425 pp.
- **Evans, H.F., McNamara, D.G., Braasch, H., Chadoeuf, J. & Magnusson, C.** 1996. Pest risk analysis (PRA) for the territories of the European Union (as PRA area) on *Bursaphelenchus xylophilus* and its vectors in the genus *Monochamus*. *EPPO Bulletin*, 26: 199–249.
- **Ferris, V.R., Ferris, J.M. & Faghihi, J.** 1993. Variation in spacer ribosomal DNA in some cyst-forming species of plant parasitic nematodes. *Fundamental and Applied Nematology*, 16: 177–184.
- Fonseca, L., Cardoso, J.M.S., Lopes, A., Pestana, M., Abreu, F., Nunes, N., Mota, M. & Abrantes, I. 2012. The pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in Madeira Island. *Helminthologia*, 49(2): 96–103.
- François, C., Castagnone, C., Boonham, N., Tomlinson, J., Lawson, R., Hockland, S., Quill, J., Vieira, P., Mota, M. & Castagnone-Sereno, P. 2007. Satellite DNA as a target for TaqMan real-time PCR detection of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Molecular Plant Pathology*, 8: 803–809.
- **Futai, K.** 2013. Pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Annual Review of Phytopathology*, 51: 61–83.
- **Goodey, J.B.** 1963. *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*. Technical Bulletin No. 2 of the Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. London, HMSO. 72 pp.
- **Gu, J.**, ed. 2014. [*Identification of* Bursaphelenchus xylophilus *and its closely related species*.] Xiamen, China, Xiamen University Press (in Chinese).
- Gu, J., Wang, J., Braasch, H., Burgermeister, W. & Schröder, T. 2011. Morphological and molecular characterisation of mucronate isolates (M form) of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae). *Russian Journal of Nematology*, 19(2): 103–120.
- Gu, J., Zhang, J., Braasch, H. & Burgermeister, W. 2005. *Bursaphelenchus singaporensis* sp. n. (Nematoda: Parasitaphelenchidae) in packaging wood from Singapore: A new species of the *B. xylophilus* group. *Zootaxa*, 988: 1–12.
- **Hasegawa, K. & Miwa, J.** 2008. Embryology and cytology of *Bursaphelenchus xylophilus*. *In* B.G. Zhao, K. Futai, J.R. Sutherland & Y. Takeuchi, eds. *Pine wilt disease*, pp. 81–104. Tokyo, Springer. 459 pp.
- **Hopf, A. & Schroeder, T.** 2013. Non vector spread of *Bursaphelenchus xylophilus* via wood chips. *In* T. Schroeder, ed. Pine Wilt Disease Conference, 15–18 October 2013, Braunschweig, Germany. *Berichte aus dem Julius Kühn Institut*, 169: 46–47.
- Hu, Y.Q., Kong, X.C., Wang, X.R., Zhong, T.K., Zhu, X.W., Mota, M.M., Ren, L.L., Liu, S. & Ma, C. 2011. Direct PCR-based method for detecting *Bursaphelenchus xylophilus*, the pine wood nematode in wood tissue of *Pinus massoniana*. *Forest Pathology*, 41: 165–168.
- **Hunt, D.J.** 2008. A checklist of the Aphelenchoidea (Nematoda: Tylenchina). *Journal of Nematode Morphology and Systematics*, 10(2): 99–135.
- **Ibeas, F., Gallego, D., Diez, J.J. & Pajares, J.A.** 2007. An operative kairomonal lure for managing pine sawyer beetle *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerymbycidae). *Journal of Applied Entomology*, 131(1): 13–20.
- Inácio, M.L., Nóbrega, F., Vieira, P., Bonifácio, L., Naves, P., Sousa, E. & Mota, M. 2014. First detection of *Bursaphelenchus xylophilus* associated with *Pinus nigra* in Portugal and in Europe. *Forest Pathology*, 45(3): 235–238.
- Kanetani, S., Kikuchi, T., Akiba, M., Nakamura, K., Ikegame, H. & Tetsuka, K. 2011. Detection of *Bursaphelenchus xylophilus* from old discs of dead *Pinus armandii* var *amamiana* trees using a new detection kit. *Forest Pathology*, 41: 387–391.
- **Kikuchi, T., Aikawa, T., Oeda, Y., Karim, N. & Kanzaki, N.** 2009. A rapid and precise diagnostic method for detecting the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* by loop-mediated isothermal amplification. *Phytopathology*, 99: 1365–1369.

- **Kishi, Y.** 1995. *The pine wood nematode and the Japanese pine sawyer*. Forest Pests in Japan No. 1. Tokyo, Thomas Company Limited. 302 pp.
- **Kondo, E. & Ishibashi, N.** 1978. Ecological significance of dormancy in plant parasitic nematodes. 7. Ultrastructural differences between propagative and dispersal forms in pine wood nematode, *Bursaphelenchus-lignicolus*, with reference to survival. *Applied Entomology and Zoology*, 13: 1–11.
- **Leal, I., Foord, B., Allen, E., Campion, C., Rott, M. & Green, M.** 2013. Development of two reverse transcription-PCR methods to detect living pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in wood. *Forest Pathology*, 43: 104–114.
- **Leal, I., Green, M., Allen, E., Humble, L. & Rott, M.** 2007. Application of a real-time PCR method for the detection of pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in wood samples from lodgepole pine. *Nematology*, 9: 351–362.
- **Linit, M.J.** 1990. Transmission of pinewood nematode through feeding wounds of *Monochamus carolinensis* (Coleoptera: Cerambycidae). *Journal of Nematology*, 22(2): 231–236.
- **Luzzi, M.A., Wilkinson, R.C. & Tarjan, A.C.** 1984. Transmission of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*, to slash pine trees and log bolts by a cerambycid beetle, *Monochamus tilliator*, in Florida. *Journal of Nematology*, 16(1): 37–40.
- **Mamiya, Y. & Kiyohara, T.** 1972. Description of *Bursaphelenchus lignicolus* n.sp. from pine wood and histopathology of nematode-infested trees. *Nematologica*, 18: 120–124.
- **Matsunaga, K. & Togashi, K.** 2004. Among-tree difference in the inhibition of systemic dispersal of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) by *Pinus densiflora*. *Applied Entomology and Zoology*, 39(2): 271–277.
- **Moens, M.** 2000. The pinewood nematode: Development of a sampling, extraction and identification method. Final report FAIR1-CT95-0034 EU research project. 102 pp.
- Mota, M., Braasch, H., Bravo, M.A., Penas, A.C., Burgermeister, W., Metge, K. & Sousa, E. 1999. First record of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology*, 1: 727–734.
- Mota, M. & Vieira, P., eds. 2004. The pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. Proceedings of an international workshop, University of Évora, Portugal, 20–22 August 2001. *In Nematological monographs and perspectives*, Vol. 1. Leiden, Netherlands, Brill. 291 pp.
- Mota, M. & Vieira, P., eds. 2008. Pine wilt disease: A worldwide threat to forest ecosystems. Berlin, Springer Verlag. 405 pp.
- **Nickle, W.R**. 1970. A Taxonomic review of the genera of the Aphelenchoidae (Fuchs, 1937) Thorne, 1949 (Nematoda: Tylenchida). *Journal of Nematology*, 2(4): 375–392.
- **Nickle, W.R., Golden, A.M., Mamiya, Y. & Wergin, W.P.** 1981. On the taxonomy and morphology of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhrer, 1934) Nickle (1970). *Journal of Nematology*, 13: 385–392.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. & Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28: e63.
- **Pajares, J.A., Ibeas, F., Diez, J.J. & Gallego, D.** 2004. Attractive responses by *Monochamus galloprovincialis* (Col., Cerambycidae) to host and bark beetle semiochemicals. *Journal of Applied Entomology*, 128(9/10): 633–638.
- Penas, A.C., Bravo, M.A., Valads, V. & Mota, M. 2008. Detailed morphometric studies of *Bursaphelenchus xylophilus* and characterisation of other *Bursaphelenchus* species (Nematoda: Parasitaphelenchidae) associated with *Pinus pinaster* in Portugal. *Journal of Nematode Morphology and Systematics*, 10(2): 137–163.
- **Penas, A.C., Dias, L.S. & Mota, M.M.** 2002. Precision and selection of extraction methods of aphelenchoid nematodes from maritime pine wood, *Pinus pinaster L. Journal of Nematology*, 24(1): 62–65.
- **Ryss, A.Y.** 2003. Express technique to prepare permanent collection slides of nematodes. *Zoosystematica Rossica*, 11: 257–260.
- **Ryss**, A., Viera, P., Mota, M. & Kulinich, O. 2005. A synopsis of the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Aphelenchida: Parasitaphelenchidae) with keys to species. *Nematology*, 7(3): 393–458.
- Sanchez-Husillos, E., Etxebeste, I. & Pajares, J. 2015. Effectiveness of mass trapping in the reduction of *Monochamus galloprovincialis* Olivier (Col.: Cerambycidae) populations. *Journal of Applied Entomology*, doi:10.1111/jen.12219.
- Schröder, T., McNamara, D.G. & Gaar, V. 2009. Guidance on sampling to detect pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* in trees, wood and insects. *EPPO Bulletin*, 39: 179–188.
- **Seinhorst, J.W.** 1959. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica*, 4: 67–69.

- Sousa, E., Bravo, M.A., Pires, J., Naves, P., Penas, A.C., Bonifácio, L. & Mota, M.M. 2001. Bursaphelenchus xylophilus (Nematoda: Aphelenchoididae) associated with *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera; Cerambycidae) in Portugal. *Nematology*, 3(1): 89–91.
- **Sousa, E., Naves, P., Bonifácio, L., Henriques, J., Inácio, L. & Evans, H.** 2011. Assessing risks of pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* transfer between wood packaging by simulating assembled pallets in service. *EPPO Bulletin*, 41: 423–431.
- **Takeuchi, Y., Kanzaki, N. & Futai, K.** 2005. A nested PCR-based method for detecting the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, from pine wood. *Nematology*, 7: 775–782.
- **Tarès, S., Lemontey, J.M., de Guiran, G. & Abad, P.** 1993. Cloning and characterization of a highly conserved satellite DNA sequence specific for the phytoparasitic nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Gene*, 129: 269–273.
- **Tomalak, M. & Filipiak, A.** 2011. *Bursaphelenchus trypophloei* sp. n. (Nematoda: Parasitaphelenchinae): An associate of the bark beetle, *Trypophloeus asperatus* (Gyll.) (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae), in aspen, *Populus tremula* L. *Nematology*, 13: 619–636.
- **Tomalak, M., Worall, J. & Filipiak, A.** 2013. *Bursaphelenchus masseyi* sp. n. (Nematoda: Parasitaphelenchinae): A nematode associate of the bark beetle, *Trypophloeus populi* Hopkins (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), in aspen, *Populus tremuloides* Michx. affected by sudden aspen decline in Colorado. *Nematology*, 15: 907–921.
- Vieira, P.R., Mota, M. & Eisenback, J.D. 2003. Pinewood Nematode Taxonomic Database. CD-ROM. Blacksburg, VA, Mactode Publications.
- **Vrain, T.C.** 1993. Restriction fragment length polymorphism separates species of the *Xiphinema* americanum group. *Journal of Nematology*, 25: 361–364.
- Williams, B.D., Schrank, B., Huynh, C., Shownkeen, R. & Waterston, R.H. 1992. A genetic mapping system in *Caenorhabditis elegans* based on polymorphic sequence-tagged sites. *Genetics*, 131: 609–624.
- **Wingfield, M.J.** 1987. A comparison of the mycophagous and the phytophagous phases of the pine wood nematode. *In M.J. Wingfield, ed. Pathogenicity of the pine wood nematode.* Symposium Series, pp. 81–90. St Paul, MN, APS Press. 122 pp.
- Wingfield, M.J., Blanchette, R.A., Nicholls, T.H. & Robbins, K. 1982. The pine wood nematode: A comparison of the situation in the United States and Japan. *Canadian Journal of Forest Research*, 12: 71–75.
- **Wu, H.Y., Tan, Q.Q. & Jiang, S.X.** 2013. First report of pine wilt disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus* on *Pinus thunbergii* in the inland city of Zibo, Shandong, China. *Plant Disease*, 97(8): 1126.
- **Ye, W., Giblin-Davis, R.M., Braasch, H., Morris, K. & Thomas, W.K.** 2007. Phylogenetic relationships among *Bursaphelenchus* species (Nematoda: Parasitaphelenchidae) inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43: 1185–1197.
- Zamora, P., Rodriguez, V., Renedo, F., Sanz, A.V., Domínguez, J.C., Pérez-Escolar, G., Miranda, J., Álvarez, B., González-Casas, A., Mayor, E., Duenas, M., Miravalles, A., Naves, A., Robertson, L., Gutiérrez Abascal, C.J. & Martín, A.B. 2015. First report of *Bursaphelenchus xylophilus* causing pine wilt disease on pinus radiata in Spain. *Disease Notes*, http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-03-15-0252-PDN.
- Zhao, B.G., Futai, K., Sutherland, J.R. & Takeuchi, Y. 2008. *Pine wilt disease*. Berlin, Springer. 459 pp.

## 9 - الأشكال التوضيحية



الشكل 1: دورة حياة Bursaphelenchus xylophilus من البيضة إلى النيماتودا البالغة.

JX، اليرقات الصغيرة في الطور X.

المصدر: بتصرف من (1982) Wingfield et al.



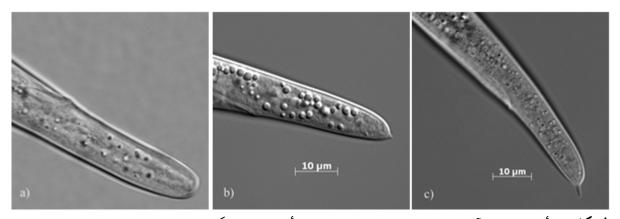
الشكل 2: تطور الأعراض في أشجار الصنوبر (Pinus pinaster) المصابة بآفة Bursaphelenchus xylophilus، من شجرة سليمة إلى شجرة ميتة.

الصور إهداء من: T. Schröder، معهد يوليوس كوهن، ألمانيا.

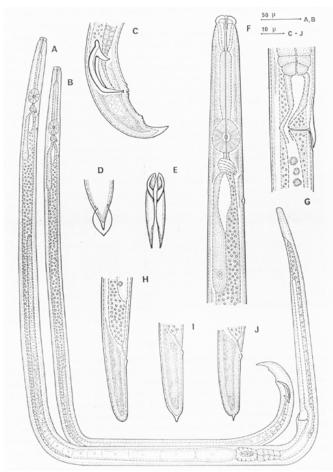
بروتوكول التشخيص 10-40 الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات



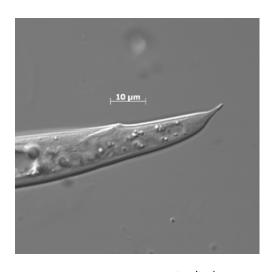
الشكل 3: أعراض مرض ذبول خشب الصنوبر في أشجار Pinus pinaster، بسبب آفة Bursaphelenchus xylophilus. الصورة إهداء من: T. Schröder، معهد يوليوس كوهن، ألمانيا.

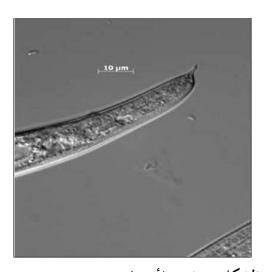


الشكل 4: أذناب إناث آفة Bursaphelenchus xylophilus: (أ) مستدير (تكبير بقوة 000 1)؛ (ب) نتوء صغير بارز؛ (ج) شكل مدبب. الصور من إهداء (أ) Ningbo للتفتيش والحجر في منافذ الصور من إهداء (أ) Ningbo للتفتيش والحجر في منافذ الدخول والخروج، الصين.



المصادر: Mamiya and Kiyohara (1972).



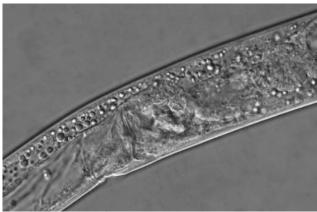


الشكل 6: ذنب الأنثى لدى Bursaphelenchus mucronatus سير الله اليسار) و Bursaphelenchus mucronatus (إلى اليسار).

الصور من إهداء J. Gu، هيئة ننغبو للتفتيش والحجر في منافذ الدخول والخروج، الصين.

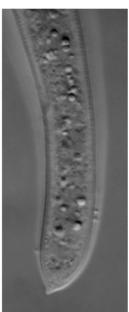


الشكل 7: ذنب ذكر Bursaphelenchus xylophilus مزوَّد بشوكتين سفاديتين (تكبير بقوة 000 1). الصورة من إهداء T. Schröder، معهد يوليوس كوهن، ألمانيا.



الشكل 8: أنثى Bursaphelenchus xylophilus مزوَّدة بسديلة تناسلية (تكبير بقوة 640). الصورة من إهداء T. Schröder، معهد يوليوس كوهن، ألماني.

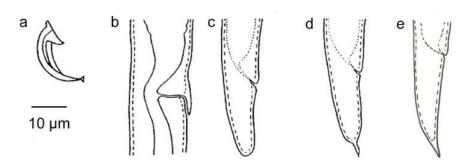






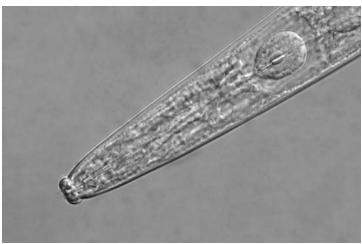
الشكل 9: أنواع ليست Bursaphelenchus xylophilus من فئة (A) السديلة التناسيلية للأنثى، ملتوية ومنتهية بتجويف عميق (B) ذنب أنثى B. fraudulentus مزوَّد بنتوء بارز (إلى اليسار) وبدون نتوء بارز (إلى اليمين) (تكبير بقوة 000 1).

الصور من إهداء M. Tomalak، معهد وقاية النباتات، المعهد الوطني للبحوث، بولندا.

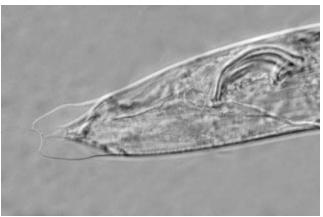


الشكل 10: الخصائص التشخيصية لآفة Bursaphelenchus xylophilus و Bursaphelenchus و B. mucronatus و B. mucronatus و الشكل 10: الخصائص التشخيصية لآفة و (c) ألف الأنواع الثلاثة؛ (d) السديلة التناسلية لدى كل الأنواع الثلاثة؛ (e) شوكتا السفاد لدى كل الأنواع الثلاثة؛ (d) السديلة التناسلية لدى كل الأنواع الثلاثة؛ (e) ألفية ذنب أنثى B. mucronatus kolymensis فاية ذنب أنثى B. mucronatus mucronatus

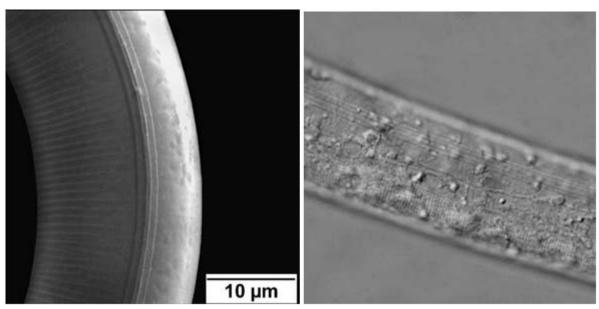
المصدر: بتصرف من EPPO/CABI (1996).



الشكل 11: المنطقة الأمامية لآفة Bursaphelenchus xylophilus مزوَّدة بحربة وجسم خلفي (تكبير بقوة 640). الصورة من إهداء T. Schröder، معهد يوليوس كوهن، ألمانيا.

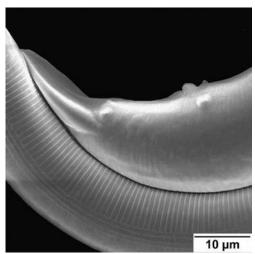


الشكل 12: منظر لآفة Bursaphelenchus xylophilus يبين ذنب الذكر في الوضع الظهري البطني حيث يظهر الغشاء المجنح (تكبير بقوة 000 1). المجنح (تكبير بقوة 7. Schröder) معهد يوليوس كوهن، ألمانيا.

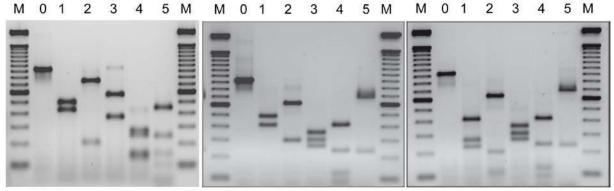


الشكل 13: آفة Bursaphelenchus xylophilus تحت الجهر الإلكتروني في الوضع الجانبي (إلى اليسار) والمجهر الضوئي (إلى اليمين) (تكبير بقوة 1 600).

الصور من إهداء (إلى اليسار) M. Brandstetter، المعهد النمساوي لبحوث الغابات، النمسا و (إلى اليمين) T. Schröder، معهد يوليوس كوهن، ألمانيا.



الشكل 14: الحليمات الذيلية لدى Bursaphelenchus xylophilus، صورة لجهر إلكتروني< الصورة من إهداء M. Brandstetter، المركز النمساوي لبحوث الغابات، النمسا.



B. xylophilus

B. mucronatus mucronatus

B. mucronatus kolymensis

الشكل 15: مباعد النسخ الداخلي (ITS) — أنماط تعدد أشكال طول الشظايا المحدِّدة لدى B. mucronatus (إلى اليسار) و B. mucronatus mucronatus سروي الوسط) و B. mucronatus سروي (إلى اليسار) و M ،(1) Rsal (1) باستخدام (1) باستخدام (1) باستخدام (1) واسم الحمض النووي (سلم من 100 زوج قاعدي).

الصورة من إهداء W. Burgermeister، معهد يوليوس كوهن، ألمانيا

#### التسلسل التاريخي للمطبوع

لا يشكل ذلك جزءً رسميًا من المعيار

Bursaphelenchus xylophilus (2004-016) : المعايير أضافت الموضوع المادين المعايير أضافت الموضوع المادين المادين

04-2006 المعيار - 1 أضافت هيئة تدابير الصحة النباتية في دورتها الأولى (2006) موضوع برنامج العمل: النيماتودا (2006-008).

09-2007 نقاش فريق الخبراء المعنى بإعداد مشروع بروتوكولات التشخيص.

06-2008 ناقش نقاش فريق الخبراء المعنى بإعداد مشروع بروتوكولات التشخيص مع المؤلف الرئيسي.

09-2013 تم تكوين فريق لصياغة البروتوكول التشخيصي الجديد.

03-2014 مشاورة للخبراء.

10-2014 لجنة المعايير وافقت على مشاورة الأعضاء .(2014\_eSC\_Nov\_11).

2015- 02 مشاورة الأعضاء

2015 – 10 فريق الخبراء المعني بإعداد بروتوكولات التشخيص وافق على تقديمه إلى لجنة المعايير لاعتماده بقرار إلكتروني (eTPDP\_Oct\_02).

11-2015 لجنة المعايير وافقت على فترة الإخطار الخاصة بالبروتوكول التشخيصي

.(2015\_eSC\_Nov\_08)

01-2016 لجنة المعايير اعتمدت البروتوكول التشخيصي بالنيابة عن هيئة تدابير الصحية النباتية (لم تتلق أي اعتراضات رسمية).

المعيار الدولي رقم 27 - الملحق Bursaphelenchus xylophilus 10 (2016)، روما، الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات، منظمة الأغذية والزراعة.

آخر تحديث للتسلسل التاريخي للمطبوع: 2016-04

الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات بروتوكول التشخيص 10-47