

المعيار الدولي رقم 27 بروتوكولات تشخيص الآفات الخاضعة للوائح

بروتوكول التشخيص 10: *Bursaphelenchus xylophilus*

اعتمد في 2016 ونُشر في 2018

المحتويات

- 1- معلومات عن الآفة..... 2
- 2- المعلومات التصنيفية..... 3
- 3- الكشف..... 4
- 3-1 الكشف عن الآفة في الأشجار..... 4
- 3-2 الكشف عن الآفة عن طريق استخدام مصائد الحشرات، والمصائد الخشبية، وفي العينات المأخوذة من المناشر ومخازن الأخشاب..... 5
- 3-3 الكشف المباشر في الخشب والمنتجات الخشبية ومواد التعبئة الخشبية الصلبة..... 6
- 3-4 استخراج النيماتودا من عينات الخشب..... 6
- 3-5 استخراج النيماتودا من الحشرات الناقلة..... 7
- 4- تحديد الهوية..... 7
- 4-1 التحديد المورفولوجي..... 8
- 4-1-1 إعداد العينات..... 9
- 4-1-2 مفتاح مستوى الأنواع..... 10
- 4-1-3 مقارنة *Bursaphelenchus xylophilus* مع الأنواع المشابهة..... 14
- 4-2 التحديد الجزيئي..... 16
- 4-2-1 تعدد أشكال طول الشظايا المحددة باستخدام تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل لمبادئ النسخ الداخلي..... 16
- 4-2-2 تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل التقليدي..... 18
- 4-2-3 تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل الآني..... 20
- 4-2-4 الاختبارات الجزيئية القائمة على الحمض النووي الريبي للكشف عن النيماتودا الحية..... 23
- 4-2-5 التضخيم المتساوي الحرارة بواسطة العروة (LAMP)..... 25
- 4-2-6 ضوابط الاختبارات الجزيئية..... 26
- 4-2-7 تفسير نتائج تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل..... 28
- 4-2-8 التتابع..... 28
- 5- السجلات..... 29
- 6- جهات الاتصال للحصول على معلومات إضافية..... 30
- 7- شكر وتقدير..... 30
- 8- المراجع..... 31
- 9- الأشكال التوضيحية..... 36

1- معلومات عن الآفة

نيماتودا خشب الصنوبر، *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhner, 1934) Nickle 1970، هي العامل المسبب لمرض ذبول خشب الصنوبر. ويعتقد أن هذه الآفة نشأت في أمريكا الشمالية حيث تتوزع 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 *B. xylophilus*، ولكن الأنواع الغريبة التي تزرع في أمريكا الشمالية، خاصة في المناطق الجنوبية الأدفأ من الولايات المتحدة، تموت عندما تهاجمها هذه النيماتودا.

ونُقلت آفة *B. xylophilus* إلى اليابان في مطلع القرن العشرين، ويفترض أنها نُقلت عبر الأخشاب المصدرة من أمريكا الشمالية وباتت واحدة من أكثر آفات الغابات ضرراً في البلد، حيث ما زالت تسبب حالياً خسائر كبيرة في أشجار الصنوبر الكثيفة الأزهار (*Pinus densiflora*)، والصنوبر الأسود الياباني (*P. thunbergii*)، وصنوبر أوكيناوا (*P. luchuensis*). ودخلت آفة *B. xylophilus* أيضاً إلى الصين (بما في ذلك تايوان) وكوريا؛ وعثر عليها هناك في منتصف أو في أواخر ثمانينات القرن الماضي. وفي عام 1990، وجدت الآفة للمرة الأولى في أوروبا (البرتغال) في الصنوبر البحري (*P. pinaster*)، الذي تقتله الدودة في غضون أشهر قليلة بعد إصابته بالآفة (Mota et al., 1999; Fonseca et al., 2012). واكتشفت *B. xylophilus* أيضاً في الصنوبر الأسود (*P. nigra*) والصنوبر الشعاعي (*P. radiata*) في البرتغال وإسبانيا على التوالي (Inácio et al., 2014; Zamora et al., 2015). وفي عام 2008، وجدت آفة *B. xylophilus* للمرة الأولى في إسبانيا (Abelleira et al., 2011).

وتنتقل آفة *B. xylophilus* من شجرة إلى شجرة عن طريق خنفساء ساكنة في الخشب من الجنس *Monochamus* (الخنفساء غمدية الأجنحة Coleoptera: الخنافس الطويلة القرون Cerambycidae) (Linit, 1990; Evans et al., 1996). وتدخل النيماتودا في أجسام الحشرات بعد فترة وجيزة من خروج تلك الحشرات من طور الإخدار ومباشرة قبل أن تنقب 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.

(بما في ذلك الحطام المتساقط)، تبعاً لنوع الخنفساء *Monochamus*، حيث تقوم بوضع بيضها من خلال اللحاء. وتتغذى يرقات الخنفساء التي تفقس من البيض في الأنسجة القلبية التي تقع مباشرة تحت اللحاء لعدة أشهر. وعندما تصل إلى مرحلة النضج، تُحدث ثقوباً أعمق في الخشب كي تتشربق وبهذا تكتمل دورة حياتها. وتستفيد آفة *B. xylophilus* من هذه الدورة للانتقال إلى عائل شجري جديد (Wingfield, 1987)، ويمكن أن تدخل إلى الشجرة الجديدة أثناء البيض عن طريق الخنفساء (ويبدو أن تلك هي الوسيلة الوحيدة التي تنقل بها عدة أنواع من *Bursaphelenchus* التي تستعمر الأشجار الميتة) (Edwards and Linit, 1992). غير أن آفة *B. xylophilus* تبدو فريدة بين هذه الأنواع، إذ يمكنها أيضاً أن تنتقل إلى شجرة جديدة أثناء تغذية النضج عن طريق الخنافس، ويمكن أن يظهر مرض ذبول الصنوبر نتيجة لانتقالها 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، تتوزع النيماتودا في كل الشجرة وتُدمر الأنسجة الخشبية، مثل الخلايا الظهارية، والخلايا اللبائية لقنوات الراتنج المحوري والشعاعي، والقلب (الكبيوم) واللحاء. ويمكن أيضاً لآفة *B. xylophilus* أن توجد في الجذور حتى عندما تكون أجزاء الشجرة الواقعة فوق الأرض ميتة بالفعل، أو عندما تجف 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 إصابته على حالتها الصحية وظروف المناخ (لا سيما درجة الحرارة وإمدادات المياه). وتؤثر هذه العوامل أيضاً على توزيع النيماتودا في كل أجزاء الشجرة. ويمكن أن يكون توزيعها موضعياً أو غير منتظم، وينبغي مراعاة ذلك عند تحديد استراتيجيات أخذ العينات (Schröder et al., 2009).

ويمكن أن توجد آفة *B. xylophilus* أيضاً في الأشجار الميتة من الأنواع *Abies*، و *Chamaecyparis*، و *Cedrus*، و *Larix*، و *Picea*، و *Pseudotsuga*، وغيرها من المخروطيات (باستثناء التويا *Thuja spp*)، ولكن ليس معروفاً أن أيّاً من هذه الأجناس يتأثر بمرض ذبول الصنوبر على الرغم من أن الاختبارات المرضية على الشتلات تكشف عن تفاعلات ملحوظة، بما في ذلك موتها (Evans et al., 1996).

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. carolinensis* في أمريكا الشمالية، و *M. galloprovincialis* في البرتغال. وتبين 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 بالخنفساء الناقلة تشكل 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 المتلقي (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: Kishi (1995)؛ Mota and Vieira (2004)؛ Mota and Vieira (2008)؛ و Zhao et al. (2008).

2- المعلومات التصنيفية

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

Aphelenchoides xylophilus Steiner and Buhrer, 1934

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

Bursaphelenchus lignicolus Mamiya and Kiyohara, 1972

Nematoda, Rhabditida, Tylenchina, Aphelenchoidea, Aphelenchoididae, Parasitaphelenchinae, *Bursaphelenchus*

الاسم:

المترادفات:

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 (J1) لينتقل إلى الطور الصغير الثاني (J2) في البيضة. ويفقس الطور J2 من البيضة، ويوجد طوران آخران لليرقات 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 J3. ومن المحتمل أنها لا تتغذى في الطور J_{III}، وتتراكم الدهون في الخلايا 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_{IV} (الصغار الساكنة) وهذه تنقلها الخنافس 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، فإنها تتطور إلى الطور الإكثاري J4 (Wingfield et al., 1982).

ويمكن أن توجد آفة *B. xylophilus* الحية في أنواع مختلفة من أخشاب 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 محدّدة بشأن الكشف عن آفة *B. xylophilus* في الأشجار والأخشاب والمنتجات الخشبية، وكذلك في الخنافس الناقلة. وبالرغم من أن أخذ العينات بطريقة صحيحة أساسي للحصول على مادة مصابة على الأرجح بآفة *B. xylophilus*، لا تشكل الإرشادات المتعلقة بأخذ العينات جزءاً من البروتوكول الحالي. ونشر Schröder et al. (2009) ومنظمة وقاية النباتات في أوروبا والبحر المتوسط (2012) إرشادات عامة بشأن أخذ العينات، مع الإشارة إلى أنواع الخنافس الطويلة القرون *Monochamus* الأوروبية كنواقل.

3-1 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 تخزن فيها الأخشاب، ومناطق حرائق الغابات. تتجذب 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 وستين) التي استعمرتها الخنافس الطويلة القرون *Monochamus* بعد سقوطها. وينبغي البحث عن الأعراض التالية: تغيير لون الإبر (مثل اصفرارها)، والذبول، وأدلة تثبت حدوث هجوم من الحشرات (مثل نُحاتة الخشب على الأرض أو حدوث بروريات من شقوق اللحاء، والشقوق السطحية تحت اللحاء المحتوية على ثقب بيضوية موجهة في الاتجاه الطولي للجذع، وثقوب خروج دائرية للحشرات البالغة)، والبقع الفطرية الزرقاء في

الخشب، وقلة تدفق الراتنج الزيتي من الجروح. وينبغي التحقق من معدل تدفق الراتنج الزيتي عندما تكون الأشجار خضراء عن طريق إزالة جزء من اللحاء من الطبقة القلبية. وتغطي الأشجار السليمة سطح الخشب بالراتنج في غضون ساعة واحدة، بينما ينقص تدفق الراتنج في الأشجار المصابة. ومع ذلك، تتفاوت هذه الأعراض بتفاوت أنواع الصنوبر، وهي أعراض غير محددة بالنسبة لآفة *B. xylophilus*، إذ قد تحدثها مسببات أمراض أو عوامل أخرى. ولا يوجد حالياً أي طريقة للتمييز بصرياً بين الأشجار التي تموت بسبب مرض ذبول الصنوبر أو التي تموت لأسباب أخرى. ويفضل أن تكون الأشجار التي تُجمع عينات منها مرتبطة بهجوم الخنافس الطويلة القرون *Monochamus*، سواءً تغذية النضج أو الاستيلاد. وينبغي أن يكون معروفاً 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 الخنافس 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.

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

استحدثت في السنوات الأخيرة مصائد حشرات مزودة 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 حية وليس في مادة سائلة قاتلة.

ويمكن في المناطق التي توجد فيها تجمعات معروفة من خنافس *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 حياتها في تلك المواد. ويمكن أيضاً تسريع وتيرة تطور الخنافس 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 تجهز 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 ثقبوب دائرية (أي الثقبوب التي تخرج منها الخنافس) وثقبوب 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 ثقبوب للخروج، ولكن يمكن رؤية أنفاق اليرقات التي يصعب في بعض الأحيان اكتشافها نظراً لانسدادهما بجزيئات الخشب. وينبغي أخذ عينات من الأجزاء التي تنمو فيها الفطريات، خاصة بقع الفطريات الزرقاء. ومع ذلك، تبين في العديد من الحالات أن نيماتودا خشب الصنوبر الحية 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 حية بعد التجفيف. وتلافياً لحدوث تلوث بالنيماتودا في عينات الخشب المستخلصة، ينبغي فحص العينة بعد إزالة الجزء الخارجي من الخشب (Schröder et al., 2009).

3-4 استخراج النيماتودا من عينات الخشب

يمكن استخراج النيماتودا الحية من الخشب المصاب باستخدام تقنية قمع بيرمان أو تقنية بيرمان المعدلة (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 حرارتها 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 المبين أعلاه، ولكن العديد من التعديلات تستخدم في الواقع العملي (EPPO, 2013c). ومن ذلك على سبيل المثال، أن رقايات 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 يبينها منظمة وقاية النباتات في أوروبا والبحر المتوسط (2013) وبين جهاز لرش الرزاز.

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

ويمكن أن تظهر النيماتودا بأعداد قليلة جداً في العينة، وبالتالي فإن كشفها قد يكون متعزراً. ويوصى بترك النيماتودا تتكاثر قبل استخلاصها. وتحقيقاً لهذه الغاية، تُغلف عينة الخشب المرطبة 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 الحية 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 حية 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 (Pajares *et al.*, 2004; Ibeas *et al.*, 2007) أو أخشاب المصائد للتأكد من وجود النيماتودا (القسم 3-2). وينبغي صيد الخنافس حية وليس في سائل قاتل، ما لم تكن ستستخدم في الكشف الجزيئي المباشر.

وتوجد في العادة صغار النيماتودا التي في طور التشبت J_{IV} (الصغار في مرحلة السكون) في القصب الهوائية للخنافس وعلي جسمها. ولا يوجد لدى النيماتودا التي ما زالت في طور السكون حربة. ولعزل النيماتودا، تجفف الخنافس وتطحن في طبق مناسب ويحتفظ بها في الماء لمدة تتراوح بين 24 و48 في درجة حرارة 25 درجة مئوية تقريباً (Sousa *et al.*, 2001; EPPO, 2013c). وسوف تخرج الصغار الساكنة من الخنافس. ويتعين نقل الصغار الساكنة في الطور J_{IV} إلى حصيرة من فطريات *Botryotinia fuckeliana* (الشكل: *Botrytis cinerea*) على أغار الشعير (القسم 4-1-1) لتدخل في دورة الحياة التكاثرية، إذ لا يمكن إجراء أي تحديد مورفولوجي آخر إلا في النيماتودا البالغة. ويمكن بدلاً من ذلك استخدامها مباشرة في التحديد الجزيئي. ويمكن أيضاً استخدام تقنية قمع بيرمان لاستخراج النيماتودا من الخنافس.

ويمكن إجراء فحص مورفولوجي للنيماتودا المستخرجة من الخشب أو من النواقل الحشرية على النحو المبين 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، يليها اختبار تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل الأني (بتصرف عن François *et al.*, 2007).

وهناك أيضاً عدة تقارير بشأن طرق الكشف الجزيئي التي يتم فيها استخراج الحمض النووي من آفة *B. xylophilus* مباشرة من الخشب قبل تضخيمه (Takeuchi *et al.*, 2005; François *et al.*, 2007; Kikuchi *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2011; Kanetani *et al.*, 2011; Cardoso *et al.*, 2012). غير أن مقدار الخشب المستخدم لاستخراج الحمض النووي في هذا التقارير يتراوح بين 5 و120 ملغراماً، 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 سواء أكانت حية أم ميتة. وبالتالي ينبغي لمن يأخذ بهذا النهج أن يحدد الإجراءات المتبعة لتأكيد وجود النيماتودا الحية في العينة إذا كان ذلك مناسباً للهدف الذي يرمي إليه التحليل.

4- تحديد الهوية

تم حتى الآن وصف حوالي 110 أنواع من جنس *Bursaphelenchus* (Futai, 2013). ويمكن الرجوع إلى آخر الاستعراضات العامة في (Ryss *et al.*, 2005) و (Hunt, 2008) و (Braasch *et al.*, 2009) و (Futai, 2013).

ويمكن تحديد آفة *B. xylophilus* إيجابياً بإحدى طريقتين: الطريقة المستندة إلى السمات المورفولوجية، والطريقة المستندة إلى تقنيات الخصائص البيولوجية الجزيئية. وبالرغم من أن عدد 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 جيدة، والحصول على مجهر ذي قدرة عالية، والتمتع بخبرة كبيرة في تصنيف النيماتودا، خاصة في المجموعة الصغيرة من الأنواع المرتبطة ارتباطاً وثيقاً بالآفة *B. xylophilus* (*B. mucronatus mucronatus* و *B. mucronatus kolymensis* و *B. fraudulentus*، 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 ضياع 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 بها هذه الطريقة. وفي حين أن طرق تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل القائمة على الحمض النووي لا تميز بين النيماتودا الميتة والحية، يمكن للطرق الجديدة المستندة إلى الحمض النووي الريبي المرسال أن توضح ما إذا كان الكشف الإيجابي ناشئ عن وجود نيماتودا حية (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 *B. 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 *B. xylophilus*. وبالإضافة 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 إجراء تحديد يمكن 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 يميز في العادة النيماتودا من رتبة Tylenchida، Aphelenchida و Dorylaimida. وينتمي النوع *Bursaphelenchus* إلى Aphelenchida التي تفتح غدتها البلعومية الظهرية في الجسم الخلفي على النقيض من نيماتودا Tylenchida التي تفتح غدتها 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 *B. xylophilus* (انظر، 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 1 000 (عدسة الغمر بالزيت). ويمكن لتباين فروق التداخل أن تسهل الملاحظة.

1-1-4 إعداد العينات

قد يكون من الضروري مضاعفة النيमतودا المستخرجة للحصول على مادة كافية لتحديد الهوية. ومعظم أنواع *Bursaphelenchus* يمكن استنباتها باستخدام الشكل الحامل للجراثيم في الفطريات من النوع *B. fuckeliana*. وتحتاج بعض الأنواع، خاصة الأنواع التي تنتمي إلى مجموعة *sexdentati*، إلى استنبات على شكل غير حامل للجراثيم. ويستنبت كلا الشكليين الفطريين على 2 في المائة من أغار خلاصة الشعير (15 غراماً من أغار – أغار، و15 غراماً من خلاصة الشعير، و750 ملغ من الماء؛ برقم أسّي قدره 7.0). وتملاً 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 النيमतودا المراد تربيتها في قطارة صغيرة توضع على الأفطور باستخدام ماصة أو وسيلة أخرى. ويوصى بحضن النيमतودا في درجة حرارة 25 مئوية تقريباً (بالاستناد إلى خصائصها البيولوجية)، ويؤدي ذلك إلى معدل تكاثر كافٍ للحصول على أعداد كافية من النيमतودا 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 الحية إلى قطرة صغيرة من الماء على شريحة زجاجية. وتسخن الشريحة لفترة وجيزة على لهب كحولي والتحقق مراراً من حركة النيमतودا. 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 النيमतودا إلى التحريك بعد ذلك في الوضع الظهري البطني لرؤية غشاء السفاد.

2-1-1-4 التحضيرات الدائمة

تجهز التحضيرات الدائمة لتحديد الهوية باستخدام المجهر الضوئي على النحو الذي سيرد بيانه أدناه. وتقتل النيमतودا المستخرجة من المادة النباتية أو التي يتم الحصول عليها عن طريق تربية النيमतودا 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 كما هو مبين في (Seinhorst (1959 وGoodey (1963). والطريقة الأسرع (1-1.5 ساعة) لإعداد الشرائح الدائمة هي الطريقة التي وصفها Ryss (2003) على أساس قتل النيमतودا 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 النيमतودا والشرائح الدائمة، بما في ذلك وصفات المثبتات، في (van Bezooijen (2006، وهو متاح مجاناً على الإنترنت.

4-1-2 مفتاح مستوى الأنواع

يستخدم المفتاح التالي المشتق جزئياً من Bongers (1989) لتحديد فصيلة عينات الإناث. وعُدل المفتاح المستخدم في فصيلة Parasitaphelenchinae لتحديد جنس *Bursaphelenchus* من Hunt (2008). والمفتاح داخل الجنس *Bursaphelenchus* بالنسبة للمجموعة *xylophilus* مأخوذ عن Braasch et al. (2009). وبدلاً من ذلك، يتاح في البروتوكول التشخيصي الذي وضعته المنظمة المذكورة لأفة *B. xylophilus* (EPPO, 2013b) مفتاح بسيط تم وضعه 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 *Diagnostic protocols for regulated pests: Pictorial glossary of morphological terms in nematology* (بروتوكولات تشخيص الآفات الخاضعة للوائح: قائمة مصورة بالمصطلحات المورفولوجية في علم الديدان الصادرة عن منظمة وقاية النباتات في أوروبا والبحر المتوسط) (EPPO, 2013a).

4-1-2-1 مفتاح العائلات أو الفصائل

- 1- الديدان ذات رمح أو قلم 2
- الديدان بدون رمح أو قلم NBS
- 2- الفم مزود بحربة مدببة والبلعوم متصل بتجويف الجسم الخلفي 3
- الفم به حربة أحادية، والبلعوم أسطواني أو كمثري بدون تجويف خلفي NBS
- 3- الجسم الخلفي مزود بصفائح 4
- الجسم الخلفي بدون صفائح واضحة NBS
- 4- الجزء الأمامي مفصول بوضوح عن الجزء الخلفي بجزء ضيق 5
- الجزء الأمامي والجزء الخلفي غير مفصولين بجزء ضيق، والبصلة القاعدية صغيرة بدرجة كبيرة، والبشرة تبدو مقسمة إلى حلقات NBS
- 5- غدة تناسلية واحدة (فتحة تناسلية خلفية) 6
- غدتان تناسليتان NBS
- 6- منطقة الشفة بدون شعيرات 7
- منطقة الشفة مزودة بشعيرات NBS
- 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 ... NBS
- 8- غدد البلعوم متداخلة مع الأمعاء من ناحية الظهر 9
- الغدد البلعومية داخل انتفاخ مجاور NBS
- 9- نهاية ذنب الذكر مغطاة بجليدة جناحية الشكل (لا يُرى إلا عندما تكون الديدان في الوضع الظهري البطني) 10
- الجليدة الجناحية الشكل غير موجودة NBS
- 10- مقبض الرمح موجود في العادة، والأنثى مزودة بفتحة شرجية *Parasitaphelenchinae*
- مقبض الرمح غير موجود في العادة، والأنثى غير مزودة بفتحة شرجية NBS

4-2-1-2 مفتاح فصيلة *Parasitaphelenchinae*

- 11- في معظم الأنواع، J_{III} أو J_{IV} الصغار في مرحلة السكون المرتبطة تعايشياً بالحشرات؛ والجزء الخلفي من الفتحة التناسلية (عادة 60-80 في المائة من طول الجسم)؛ وشوكتا السفاد مندمجتان جزئياً أو منفصلتان؛ وذنب الذكر به التواء شديد؛ وغشاء السفاد موجود في معظم الأنواع *Bursaphelenchus*
- الصغار في مرحلة الركود J_{IV} ، والفتحة التناسلية خلفية بدرجة كبيرة (80-90 في المائة من طول الجسم)؛ وشوكتا السفاد مندمجتان جزئياً؛ وذنب الذكر غير ملتو إلى الخلف بقوة؛ وغشاء السفاد موجود NBS

4-2-1-3 مفتاح جنس *Bursaphelenchus*

- 12- الفتحة التناسلية بها سديلة بارزة؛ والأشواك السفادية طويلة ونحيلة وشبه دائرية وتحتوي على صفيحة زاوية في الثلث الخلفي، والرأس مفلطح مع وجود بروز دائري خلفي وقاعدة مرتفعة، والبروز القرصي موجود في العادة؛ والفتحة الجانبية مزودة بأربعة خطوط..... فئة *xylophilus*
- خصائص مختلفة..... فئة غير *xylophilus*

4-2-1-4 مفتاح فئة *xylophilus*

في إطار فئة *xylophilus*، يمكن استخدام المفتاح التالي (المعدل وفقاً لمنظمة وقاية النباتات في أوروبا
أوروبا) لتمييز *B. xylophilus* المستخرجة من الخشب واللحاء عن *Bursaphelenchus* من نفس الفئة. ويمكن الرجوع إلى مزيد من التفاصيل المتعلقة بسائر الأنواع المنتمية إلى فئة *xylophilus* في (Braasch and Schönfeld 2015). وتحتوي أيضاً 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 ومزود أو غير مزود بنهايات حادة (الشكلان 4 و 5)..... فئة غير
- ذيل الأنثى مخروطي (الشكل 6) أو مستدق بقوة، ومزود وغير مزود بنهايات حادة..... فئة غير *B. xylophilus*
- 14- طول الأشواك أقل من 30 ميكرون (يقاس من اللقمة إلى الطرف البعيد)..... فئة غير *B. xylophilus*
- طول أشواك السفاد أكثر من 30 ميكرون..... فئة غير *B. xylophilus*
- 15- شوكة السفاد ذات منقار طويل ومدبب وأطرافها ذات انحناء زاوي (الشكلان 5 (جيم) و 7)..... فئة غير *B. xylophilus*
- الشوكة لها منقار قصير ومدبب، وأطرافها ذات انحناء مستدير،..... فئة غير *B. xylophilus*
- 16- سديلة الفتحة التناسلية لدى الأنثى مستقيمة ولا تنتهي بتجويف عميق (الشكلان 5 (زاي) و 8)..... فئة غير *B. xylophilus*
- سديلة الفتحة التناسلية لدى الأنثى منتهية بتجويف عميق (الشكل 9 (ألف))..... فئة غير *B. xylophilus*
- 17- نهاية ذنب الأنثى أكثر من 3 ميكرون (الشكلان 4 (ج) و 10 (د))..... فئة غير *B. xylophilus*
- ذنب الأنثى بدون نهاية مدببة (الشكلان 5 (حاء) و 4 (أ)) ومزود أو غير مزود ببروز صغير أقل من 2 ميكرون*
(الشكلان 4 (ب) و 5 (طاء) - (ياء))..... فئة غير *B. xylophilus* (الشكل المستدير الذيل)

- 18- الفتحة الإخراجية في تجويف الجسم الخلفي أو خلفه *B. mucronatus kolymensis* and *B. xylophilus* (mucronated form)**
 - الفتحة الإخراجية في مقدمة تجويف الجسم الخلفي فئة غير *B. xylophilus*

NBS ليست من أنواع *Bursaphelenchus* species في بعض تجمعات *B. fraudulentus*، يمكن أن توجد الإناث التي لديها بروز صغير أو حتى بدون نهاية مدببة (الشكل 9(ب)). وإذا كان نوع الخشب الذي توجد فيه النيماتودا غير مؤكد (*B. fraudulentus*) تظهر في الأخشاب النفضية ولكنها وجدت أيضاً في الأرز، ولكن لم توجد في الصنوبر) يوصى باستخدام الاختبار الجزيئي. **
 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*؛ أي (*B. mucronatus* *.kolymensis* (Braasch et al., 2011).

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

وتتسم آفة *B. xylophilus* عموماً بالخصائص التي يُميّز بها جنس *Bursaphelenchus* (Nickle, 1970; Hunt) (2008):
 يبلغ الطول حوالي 1 مم وهو نحيف؛ والمنطقة السفلية مرتفعة ويقابلها ضيق ومزودة بست شفاه؛ والرمح متطور تماماً وله في العادة قاعدة صغيرة وسميكة؛ والجسم الخلفي متطور تماماً (الشكلان 11 و5(واو))؛ ونهاية ذنب الذكر ملتوية بقوة ناحية البطن، ويمكن رؤية شكل شبه مخروطي في نهايته غشاء جراحي 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 تجمعات آفة *B. xylophilus* مستديرة الذنب ويمكن تمييزها عن سائر أنواع *Bursaphelenchus* عن طريق وجود الخصائص الثلاث التالية (الشكل 10). (1) يوجد لدى ذكور *B. xylophilus* (الشكل 7) أشواك سفادية كبيرة نسبياً مقوسة بشكل متساو، وقاعدتها مدببة بحدة وبها (نتوءات قرصية الشكل) في النهايات البعيدة من الأشواك. (2) ذنب الإناث شبه مخروطي وبه نهاية مستديرة عموماً (الشكل 4(أ))، وهي غير مزودة 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 (1.5 – 4.2 ميكرون) في نهاية الذنب (الشكل 4(ج)).

والخصائص التي تشاهد على أفضل وجه عن طريق المسح المجهر الإلكتروني هي أربع ثلمات (الشكل 13) في الناحية الجانبية، وعدد ومواضع الحليمات الذيلية في الذكور (الشكل 14): زوج شرجي قبل الفتحة الشرجية مباشرة، وزوجان بعد الفتحة الشرجية موجودان 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 بجميع أنواع *Bursaphelenchus* في فئة *.xylophilus*.

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

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

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

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

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

[†] النيماتودا بعد الاستخراج من الطبقات التحتية في العائل الطبيعي.
[‡] النيماتودا التي تنمو في مستنبت فطري لمدة سنة.

3-1-4 مقارنة *Bursaphelenchus xylophilus* مع الأنواع المشابهة

تتوفر مفاتيح لتحديد أنواع *Bursaphelenchus* (مثل Ryss *et al.*, 2005)، ولكن العيب 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 *B. xylophilus* نوعاً واحداً من فئة *xylophilus* بالمعنى الوارد في (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 (حتى أبريل/نيسان 2015) ينتمي إلى فئة *xylophilus* على أساس عدد الخطوط الجانبية (الشكل 9)، وعدد ووضع الحليمات الذيلية وخصائص السديلة التناسلية (Gu *et al.*, 2005; Ryss *et al.*, 2005; Braasch, 2015). واقترح مؤخراً ما لا يقل عن نوعين من أنواع *B. tryphloei* Tomalak & Filipiak, 2011 and *B. masseyi* Tomalak, Worrall & Filipiak, 2013 لإضافتهما إلى فئة *xylophilus*؛ غير أن هذا البروتوكول يتبع التصنيف الأخير الذي وضعه المؤلفان (Braasch and Schönfeld, 2015) اللذان لم يعتبراً 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)
- *B. mucronatus mucronatus* (Mamiya & Enda, 1979) Braasch, Gu & Burgermeister, 2011
- *B. mucronatus kolyensis*, 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 & Matsumoto, 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 (الشكل 4). والمجموعات المستدقة الطرف توجد أساساً في أمريكا الشمالية وتشبه كثيراً *B. mucronatus kolymensis* (Gu et al., 2011).

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

وأكثر أنواع فئة *xylophilus* انتشاراً هي *B. mucronatus mucronatus* و *B. mucronatus kolymensis*. ويتوزع هذان النوعان في كل أنحاء أوروبا وآسيا وكذلك في كندا (Ryss et al., 2005). ولذلك، من المحتمل أن التمييز في الأغلب يكون بين *B. xylophilus* و *B. mucronatus mucronatus* أو *B. mucronatus kolymensis* (الشكلان 6 و 10).

وتتاح في مجموعة مستنبتات *Bursaphelenchus* مستنبتات مرجعية تشمل 50 نوعاً من أنواع *Bursaphelenchus*، بما فيها 41 سلالة من سلالات *B. xylophilus* من شتى مناشئها في جميع أنحاء العالم، وذلك في معهد بوليوس 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 المبين في بداية كل قسم.

ويتاح كثير من الطرق لتحديد هوية *B. xylophilus*. والاختبارات الجزيئية المبيّنة في ما يلي هي الاختبارات الموصى بها 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 الآني (القسم 4-2-3). واستخدمت كل هذه التقنيات، لا سيما تعدد أشكال طول الشظايا المحددة لمبادئ 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 نهج 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 الحَجَر (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 الحَجَر، من الحاسم التمييز بين النيماتودا الحية والميتة. وتقتل عدة معالجات خاصة بالصحة النباتية آفة *B. xylophilus* في الخشب، ولا يمكن لطرق الكشف الحالية باستخدام الحمض النووي أن تحدد ما إذا كانت نتيجة إيجابية ما راجعة إلى نيماتودا حية أم إلى بقايا حمض نووي في نيماتودا ميتة. ويفضل استخدام الطرق الجزيئية القائمة على الحمض النووي الريبي التي يمكن أن تميز النيماتودا الحية والميتة في الخشب لدواعي التنظيم الخاص بالحَجَر (Leal et al., 2013) (القسم 4-2-2). ويتعين مراعاة هذه

المشكلة عند اختيار طريقة استخلاص النيماتودا (تعتمد تقنية قمع بيرمان، مثلاً، على النيماتودا الحية؛ القسمين 3-4 و 3-5) والتقنية الجزيئية المستخدمة في التحديد. وينبغي، حيثما أمكن، التثبت من سلامة النتيجة الجزيئية الإجابة عن طريق التحديد المورفولوجي.

ويصف هذا البروتوكول التشخيصي الطرق المتبعة (بما فيها الإشارة إلى أسماء العلامات التجارية) كما نشرت، لأنها تحدد 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 المخبرية الواردة في هذه البروتوكولات بما يناسب معايير المختبرات الفردية، شريطة التثبت منها على النحو الوافي.

4-2-1 تعدد أشكال طول الشظايا المحددة باستخدام تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل لمبادئ النسخ الداخلي

استخدم Burgermeister et al. (2005, 2009) تقنية تعدد أشكال طول الشظايا المحددة لمبادئ النسخ الداخلي باستخدام تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل للتمييز بين *B. xylophilus* 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 لمبادئ النسخ الداخلي باستخدام تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل على أساس الطريقة التي استحدثها (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 النيما تودا (الإناث والذكور الناضجة، والصغار) باستخدام مجموعة أدوات QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen¹). وتوضع عينات النيما تودا (1 إلى 30 عينة) في 5 ميكرو لتر من الماء في أنابيب إيبندورف¹ وتجمّد في درجة حرارة -20 مئوية إلى أن يتم الاستخلاص. وقبل الاستخلاص، تذاب العينة وتخلط مع 10 ميكرو لتر من داري انحلال الأنسجة (ATL) (Qiagen¹) وتتم بعد ذلك مجانستها في أنبوب إيبندورف¹ باستخدام أنبوب طرد مركزي (إيبندورف¹). ويتم بعد ذلك استخلاص الحمض النووي وفقاً لتوصيات الشركات المصنّعة (QIAamp DNA Micro Kit Handbook, Qiagen) "عزل الحمض النووي للجينوم من الأنسجة"¹، باستثناء الخطوات التالية. وفي ما يتعلق بالخطوة 4، يستمر التحضين لمدة 3 ساعات. وفي ما يتعلق بالخطوة 12 (الشطف)، يستخدم 20 ميكرو لتر (لخلاصة دودة النيما تودا الواحدة) أو 100 ميكرو لتر (لأستخلاص ماصاً يصل إلى 30 دودة نيما تودا) من الداري AE (Qiagen¹) على الغشاء. وتخزّن الشطافة المحتوية على الحمض النووي المستخلص في درجة حرارة -20 مئوية لحين الاستخدام.

ويتم إجراء تحليل تعدد أشكال طول الشظايا المحددة لتفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل ومبادئ النسخ الداخلي عن طريق إجراء تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل على الحمض النووي المستخلص ويلي ذلك تعدد أشكال طول الشظايا المحددة على نتائج تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل. ويتم تضخيم جزء من الحمض النووي الريبوسومي المحتوي على مناطق مبادئ النسخ الداخلي ITS1، و ITS2 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 ميكرو لتر) على 0.6 ميكرو مولار من كل بادئ، و 2 وحدة من إنزيم بلمرة الحمض النووي Taq (Stratagene¹ أو Fermentas¹)، و 10 مليمولار من Tris- (pH 8.8) و 50 مليمولار HCl و 50 مليمولار KCl، و 2 مليمولار كلوريد المغنيسيوم، و 0.2 مليمولار dNTPs، و حمض نووي بتركيز 2 دانو غرام كقالب نموذجي. ويتم إجراء التضخيم باستخدام جهاز تدوير حراري ببارامترات التدوير التالية: دلّرة عند درجة حرارة 94 درجة مئوية لمدة 2.5 دقائق. و 40 دورة تفاعل (عند درجة حرارة 94 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة، و 55 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة، و 72 درجة مئوية لمدة دقيقتين) وتمديد نهائي لمدة 5 دقائق عند درجة حرارة 72 درجة مئوية. وبعد إتمام عملية تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل، يحلّل 5 ميكرو لتر من أجزاء منتج تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل باستخدام الارتحال الكهربائي الهلامي. ويتم هضم أجزاء مناسبة من الحمض

¹ توصي في هذا البروتوكول التشخيصي الطرق (بما فيها الإشارة إلى أسماء العلامات التجارية) كما نشرت، وهذه تحدّد 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.

النووي المضخم باستخدام 3 وحيدات من النيوكليزات الداخلية المحددة *AluI*, *HaeIII*, *HinfI*, *MspI* and *RsaI*، 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 *Bursaphelenchus* (Gu, 2014):

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. eggarsi*, *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. paracorneolus*, *B. paraluxuriosae*, *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. singaporensis*, *B. thailandae*, *B. tusciae*, *B. vallesianus*, *B. willibaldi*, *B. xylophilus*, *B. yongensis* and *B. yuyaoensis*.

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

الجدول 2: أنماط تعدد أشكال طول الشظايا المحددة لأنواع *Bursaphelenchus*

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

المصدر: Burgermeister et al. (2009).

4-2-2 تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل التقليدي

تتيح اختبارات تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل التالية تحديد أنواع *B. xylophilus*، ولكنها لن تحدد ما إذا كانت

أي أنواع أخرى من *Bursaphelenchus*.

1-2-2-4 تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل التقليدي الذي يستهدف الحمض النووي الريبي لمبادئ النسخ الداخلي

تناولا Matsunaga and Togashi (2004) الطريقة الخاصة بالأنواع لتحديد *B. xylophilus* التي تستهدف منطقة ITS1-ITS2 للحمض النووي الريبي. وقُيِّمت هذه الطريقة على أساس خمس وأربع مجموعات يابانية من *B. mucronatus* و *B. xylophilus* على التوالي. وفي ما يلي بروتوكول التجربة.

توضع النيما تودا كل واحدة على حدة في 5 ميكرو لترات من دارئ التحلل (50 ملليمولار كلوريد البوتاسيوم، و 10 ملليمولار من ثلاثي حمض الهيدروكلوريك (الرقم الأسّي 8.2)، و 2.5 ملليمولار من كلوريد المغنيسيوم، و P-40 و Nonidet بتركيز 0.45 في المائة (وزن/حجم)، وتوين 20 بتركيز 0.45 في المائة (وزن/حجم)، وجيلاتين بتركيز 0.01 في المائة (وزن/حجم، و 0.06 مغ/مل من البروتيناز K) في 0.2 مل أنابيب تفاعل MicroAmp (Applied Biosystems¹) وتوضع في درجة حرارة -70 درجة مئوية أو أقل لمدة 10 دقائق (استخلاص الحمض النووي نقلاً عن Barstead et al., 1991). وبعد إزالة التجمد في درجة حرارة الغرفة، يسخن محلول الحمض النووي في درجة حرارة 60 درجة مئوية لمدة ساعة واحدة ثم لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة 95 درجة مئوية. وتستخدم خلاصة الحمض النووي الخام الناتجة كنموذج في تفاعل محدّد لإنزيم البلمرة المتسلسل. ويتم إجراء التفاعل المتسلسل لإنزيم البلمرة باستخدام الزوج البادئ التالي:

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 ميكرو لترات من مزيج التفاعل المحتوي على النموذج المعد سابقاً للحمض النووي (5 ميكرو لتر من خلاصة الحمض النووي الخام)، و 50 ملليمولار من كلوريد البوتاسيوم، و 10 ملليمولار Tris (الرقم الأسّي 8.3)، و 1.5 ملليمولار من كلوريد المغنيسيوم، و 0.001 في المائة جيلاتين، و 200 ميكرومولار لكل بادئة، و 0.25 وحدة إنزيم بلمرة الحمض النووي Taq (AmpliTaq Gold, Applied Biosystems¹) باستخدام جهاز التدوير الحراري لنظام Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems¹). وبعد الدلترة لمدة 5 دقائق في درجة حرارة 94 درجة مئوية، يتم إجراء 35 دورة (94 درجة مئوية لمدة 30 ثانية، و 55.9 درجة مئوية لمدة 30 ثانية، و 72 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة) مع تمديد نهائي مدته 6 دقائق في درجة حرارة 72 درجة مئوية.

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

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

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

ويتم إجراء التضخيم في الأحاد من النيما تودا التي يتم تحضيرها وفقاً لإجراء تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل

المعدل من Williams et al. (1992). وبايجاز فإن النيما تودا الفردية تنتقل إلى أنبوب تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل وتغطي بدارى تحلل قدره 2.5 ميكرو لترات (50 ملليمولار كلوريد بوتاسيوم، و 10 ملليمولار Tris (رقمه الأسى 8.2)، و 2.5 ملليمولار من كلوريد المغنيسيوم، و 60 مغ/مل بروتيناز K، و 0.45 في المائة Nonidet P-40، و 0.45 في المائة توين 20، و 0.01 في المائة جيلاتين). وتوضع الأنابيب في درجة حرارة -80 درجة مئوية لمدة 45 دقيقة، وتنتقل 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 محدد لإنزيم البلمرة المتسلسل.

وصممت بادئات تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل المستخدمة في التفاعل بحيث تكون قريبة من طرفي
الذي يشمل مونومر من 160 زوجاً قاعدياً لعائلة الحمض النووي التابع التي حدّدت خصائصها من قبل في B. xylophilus (Tarès et al., 1993) رقم الانضمام إلى بنك الجينات (L09652):

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 ميكرو لتراً من مزيج التفاعل المحتوي على القالب النموذجي المعد سابقاً للحمض النووي (5 ميكرو لترات من خلاصة الحمض النووي الخام)، و 50 ملليمولار من كلوريد البوتاسيوم، و 10 ملليمولار Tris (الرقم الأسى 8.2)، و 2.5 ملليمولار من كوريد المغنيسيوم، و 200 ميكرومولار لكل dNTP، و 250 نانوغراماً لكل بادئة، و 1 وحدة إنزيم بلمرة الحمض النووي Taq (QBiogene¹). وبعد الدلترة في درجة حرارة 94 درجة مئوية لمدة 5 دقائق، يتم إجراء التدوير 25 دورة (94 درجة مئوية لمدة 30 ثانية، و 94 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة، و 72 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة)، مع تمديد نهائي لمدة 5 دقائق في درجة حرارة 72 درجة مئوية.

وبالنظر إلى أنه تبيّن أن عائلة الحمض النووي التابع تتألف من تكرارات منظمة في مصفوفات جنباً إلى جنباً (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 Bursaphelenchus الأخرى، لا يكتشف أي تضخيم، ويؤدي ذلك إلى نتيجة بسيطة وموثوقة تكون إيجابية بوضوح أو سلبية بوضوح في ما يتعلق بالنوع B. xylophilus (Castagnone et al., 2005).

3-2-4 تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل الآني

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

1-3-2-4 تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل الآني الذي يستهدف تتابعات الحمض النووي التابع

تناول François et al. (2007) طريقة خاصة بالأنواع لتحديد B. xylophilus باستخدام تتابعات الحمض النووي التابع. وتتميز هذه الطريقة بحساسيتها الشديدة، إذ يمكن أن تكشف عن حمض نووي جيني يبلغ 1 بيكوغرام، وأحاد من النيما تودا في عينات مختلطة تكون فيها B. xylophilus مرتبطة بأنواع B. mucronatus الوثيقة الترابط، حتى حد يصل إلى 0.1 في المائة و 1 في المائة من المزيج على

التوالي. وهذه الطريقة كشفت أيضاً عن *B. xylophilus* مباشرة من خلال 100 ملليغرام من الخشب.

ويستخلص الحمض النووي من النيماتودا المعزولة التي تكوّنت في مستنبتات خالصة باستخدام الإجراء المضخم، على النحو الذي سبق بيانه (Castagnone et al., 2005)، بعد إدخال تعديل طفيف: لا يكون حجم دارئ التحلل ثابتاً بل يُعدّل على النحو الذي يتفق مع عدد ديدان النيماتودا (أي 3 ميكرولترات لما يتراوح بين دودة واحدة وأربع ديدان من النيماتودا، و20 ميكرولتراً لعدد أكبر من النيماتودا).

ويتم استخراج الحمض النووي من الخشب المصاب بآفة *B. xylophilus* باستخدام مجموعة أدوات استخراج الحمض النووي الجيني (Invitrogen¹) ChargeSwitch genomic DNA Plant Kit. ويقطع حوالي 0.1 غرام من الخشب المصاب إلى قطع صغيرة ويوضع في كيس بلاستيكي يحتوي على 5 مل من دارئ التحلل CST المحتوي على 1 في المائة من بولي فينيل البيروليدون، و20 ملليولار من كلوريد الكالسيوم. وتمزق العينة قليلاً باستخدام مطرقة ثم يُنزع 1 مل من سائل التحلل ويعالج وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة. وبايجاز، يضاف 100 ميكرولتراً 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 (18 000g تقريباً) تقريباً لمدة 5 دقائق. ويُنزع 1 مل من المادة الطافية، ويضاف 100 ميكرولتراً من مطهر CST، وهي 40 ميكرولتراً من خزرات CST إلى المادة الطافية. ويُستخدم القلم PickPen 8-M (Bio-Nobile¹) لنقل خزرات CST والحمض النووي المربوط من خلال خطوتين من خطوات الغسيل (يستخدم في كل منها 1 مل من دارئ الغسيل CST) وفي 150 ميكرولتراً من دارئ الشطف باستخدام طبق عميق سعته 2.2 مل. وتنزع بعد ذلك الجزيئات المغناطيسية. ويختبر الحمض النووي فوراً أو يخزن في درجة حرارة -20 درجة مئوية لتحليله في المستقبل.

وفي ما يلي 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 ميكرولتراً من الحمض النووي الجيني. ويحتوي كل تفاعل على 2.5 ميكرولتراً من 10× دارئ التفاعل (qPCR Core Kit¹ Eurogentec)، و5 ملليولار من كلوريد المغنيسيوم، 200 ملليولار لكل dNTP، 0.5 U إنزيم البلمرة Taq (qPCR Core Kit¹) و200 ملليولار لكل بادئة ومسبار. ويتم إجراء اختبارات تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل الآني في جهاز التدوير الحراري DNA Engine Opticon 2 (MJ Research¹). وبارامترات التدوير هي 10 دقائق في درجة حرارة 95 درجة مئوية، ثم 30 دورة (95 درجة مئوية لمدة 15 ثانية و59 درجة مئوية لمدة 30 ثانية). وتحلل البيانات باستخدام الإصدار 3.1¹ من برنامج رصد أوبتيكون² 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 الآني لخلاصات الخشب على جهاز التدوير SmartCycler II (Cepheid¹). ويتألف كل تفاعل من 0.025 وحدة/ميكرولتراً تارك ساخن (Biogene¹)، و1× دارئ تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل، 0.2 ملليولار لكل dNTP، و5.5 ملليولار 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 SmartCycler II¹ (30 وحدة فلورية). وتختبر الخلاصات دون تخفيف ومخففة بنسبة 1:10 في ماء خالٍ من النيوكلياز.

2-3-2-4 اختبار تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل الآني الذي يستهدف تتابع الجين hsp70

استحدث Leal et al. (2007) طريقة تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل الآني على أساس جين بروتين الصدمة الحرارية (hsp70). وتبين أن هذه الطريقة محدّدة للآفة *B. xylophilus* (واختبرت على خمس عزلات من *B. xylophilus*)، 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 Burgermeister et al. (2005) بعد إجراء التغييرات التالية:

- (1) تحضين جُناصة العينة في درجة حرارة 56 درجة مئوية طوال الليل بدلاً من 3 ساعات؛
- (2) عدم استخدام الحمض النووي الريبي الناقل إلا عندما يستخلص الحمض النووي من نيماتودا واحدة؛ (3) وضع الدارئ (10 ملليمولار Tris-HCl، برقم أسّي 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 وتضخيم تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل؛ و(5) شطف العينات في 30 ميكرولتراً (لعينة النيماتودا الواحدة) و50 ميكرولتراً (للعينات المحتوية على أكثر من دودة نيماتودا).

وفي ما يلي 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-IAbIkFQ-3'

ويتم إجراء تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل في 20 ميكرولتراً من حجم التفاعل المحتوي على 5 ميكرولترات من القالب النموذجي، و50 ميكرومولار Tris (الرقم الأسّي 8.3)، و0.25 ملّيغراماً (ملّيتر من ألبومين مصل البقر غير المؤسّتل (BSA) (Sigma¹) و0.1 ميكرومولار من المسبار، و0.7 ملّيمولار بادئ أمامي، و0.5 ملّيمولار بادئ خلفي، و0.4 ملّيمولار لكل dNTP (Roche¹)، و5 ملّيمولار كلوريد مغنيسيوم، و1 وحدة إنزيم بلمرة الحمض النووي السريع FastStart Taq (Roche¹). ويتم إجراء التضخيم في جهاز التدوير الحراري LightCycler 1.5 (Roche Diagnostics¹)، باستخدام البارامترات التالية: دلّرة أولية وتنشيط لإنزيم بلمرة الحمض النووي FastStart Taq (Roche Diagnostics¹) عند درجة حرارة 95 درجة مئوية لمدة 10 دقائق، ثم 45 دورة (دلّرة عند 94 درجة مئوية لمدة 5 ثوانٍ، وتلدين لمدة 20 ثانية عند درجة حرارة 62 درجة مئوية، وتمديد لمدة 10 ثوانٍ عند درجة حرارة 72 درجة مئوية). وتحلل البيانات باستخدام الإصدار 3.5 من برنامج LightCycler¹.

وتأكيداً لجودة الحمض النووي الجيني المنقى الخاص بالنيماطودا المستخدم في هذا الاختبار، يتم إجراء تضخيم باستخدام البادنتين الضابطين ITS1-F و ITS2-R (يرد وصف البادئات في القسم 4-2-1) باستخدام تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل التقليدي. ويتألف مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل الذي يبلغ 25 ميكرو لتر من 5 ميكرو لتر من القالب النموذجي، و 2.5 ميكرو لتر من 10× داري تفاعل (50 ملليمولار Tris-HCl، و 10 ملليمولار من كلوريد البوتاسيوم، و 5 ملليمولار من كبريتات الأمونيوم؛ برقم أسي قدره 8.3)، و 1.5 ملليمولار من كلوريد المغنيسيوم، و 1 ميكرومولار لكل بادنئة، و 0.2 ملليمولار لكل dNTP، و 1 وحدة من إنزيم بلمرة الحمض النووي 1.6 ميكروغراماً BSA، و FastStart Taq (Roche¹). وتشمل بارامترات التدوير دلترية أولية لمدة 5 دقائق عند درجة حرارة 94 درجة مئوية، وتليها 40 دورة (94 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة، و 55 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة، و 72 درجة مئوية لمدة دقيقتين) مع إطالة نهائية لمدة 5 دقائق عند درجة حرارة 72 درجة مئوية.

4-2-4 الاختبارات الجزيئية القائمة على الحمض النووي الريبي للكشف عن النيماطودا الحية *Bursaphelenchus xylophilus*

الاختبارات التالية تكشف فقط عن النيماطودا الحية. وترد خيارات بشأن النسخ العكسي التقليدي والآني في تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل.

4-2-4-1 تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل باستخدام النسخ الآني والعكسي التقليدي الذي يستهدف تتابع الحمض النووي الخاص بجين بروتين الصدمة الحرارية hsp70

الكشف عن آفة *B. xylophilus* الحية بالاستناد إلى تتابع جين بروتين الصدمة الحرارية 70 ورد بيانه في (Leal et al. 2013). وفي هذا الاختبار، توضع البادنتان الأمامية والعكسية على أي من جانبي الإنترون لجين بروتين الصدمة الحرارية 70 ويمكن التمييز بسهولة بين الحمض النووي الجيني والحمض النووي المكمل عن طريق حجم الأمبليكون. وقيمت خصوصية الاختبار على أساس ستة أنواع غير مستهدفة من آفة *Bursaphelenchus*، و 6 عزلات من *B. xylophilus*. وحد الكشف في هذا الاختبار هو 0.4 ديدان من النيماطودا لكل تفاعل ويتم قياسها في ثلاث من ثلاث نسخ متكررة.

ويستخلص الحمض النووي الريبي والحمض النووي الجيني من 20 دودة نيماطودا على الأقل. ويتم إجراء الاستخلاص المتزامن لكل من الحمض النووي الريبي والحمض النووي الجيني باستخدام مجموعة أدوات AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen¹) وفقاً لبروتوكول الشركة المصنعة بعد إجراء التعديلات التالية: تطرح كريات النيماطودا التي خزنت عند درجة حرارة -80 درجة مئوية باستخدام مدق الكريات Kontes Pellet Pestle (Kimble Chase Life Science and Research Products¹) ويضاف 350 ميكرو لتر من داري التحلل RLT (من مجموعة أدوات الاستخلاص التي تنتجها شركة Qiagen¹) إلى كل كرية محتوية على النيماطودا. ويتم الانتهاء من خطوة المجانسة باستخدام الأعمدة الدوارة (QIAshredder Mini Spin Columns) (Qiagen¹). ويشطف الحمض النووي الريبي من العمود باستخدام 20 ميكرو لتر من الماء الخالي من الريبونيكليس، ويشطف الحمض النووي باستخدام 50 ميكرو لتر من الداري EB المدفأ مسبقاً (من مجموعة الاستخلاص التي تنتجها شركة Qiagen¹). ويسمح للشطافة بأن تستقر على غشاء العمود لمدة 3 دقائق تقريباً لتيسير الشطف الأقصى باستخدام الطرد المركزي لمرة واحدة.

وفي ما يلي البادئات الخاصة بأفة *B. xylophilus* المستخدمة في هذا الاختبار، والأمبليكون المنتج من نموذج الحمض النووي المكمل 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 جين 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 المكمل، يستخدم 12 ميكرو لتر من الحمض النووي الريبي كمادة بادئة. ويشمل ذلك الخطوة الاختيارية المقترحة من الشركة المصنعة لمجموعة الأدوات والتي تتمثل في دلترية الحمض النووي الريبي والبادئات لمدة 10 دقائق في درجة حرارة 65 درجة مئوية، يلي ذلك تبريد فوري على الثلج. وبعد الانتهاء من تخليق الحمض النووي المكمل، تخزن العينات في درجة حرارة -20 درجة مئوية لاستخدامها لاحقاً كقالب نموذجي.

ويحتوي مزيج التفاعل المؤلف من 25 ميكرو لتر من تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل من 2 ميكرو لتر من الحمض النووي المكمل كقالب نموذجي، و 19 ميكرو لتر من الدارئ GoTaq Flexi PCR (Promega¹)، و 1.5 ملليمولار من كلوريد المغنيسيوم، و 0.20 ملليمولار لكل dNTP (Roche Diagnostics¹)، و 1.25 وحدة من إنزيم بلمرة الحمض النووي GoTaq Flexi (Promega¹)، و 0.4 ميكرومولار لكل بادئة (بروتين الصدمة الحرارية Hsp23F1 وبروتين الصدمة الحرارية Hsp19R2). ويتم إجراء التضخيم وفقاً لبارامترات التدوير التالية: دلترية أولية لمدة 5 دقائق عند درجة حرارة 95 درجة مئوية، وتليها 35 دورة من التضخيم (دلترية 30 ثانية عند درجة حرارة 95 درجة مئوية، وتلدين لمدة 30 ثانية عند درجة حرارة 60 درجة مئوية، وتمديد لمدة دقيقة واحدة عند درجة حرارة 72 درجة مئوية)، وإطالة نهائية لمدة 5 دقائق عند درجة حرارة 72 درجة مئوية. وفي ما يتعلق بالتضخيم باستخدام البادئات الضابطة، يكون مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل المؤلف من 25 ميكرو لتر من نفسه كما سبق بيانه أعلاه، ولكن باستخدام 1 ميكرو لتر من الحمض النووي الجيني (40 نانوغرام/ميكرو لتر) و 1 ميكرومولار لكل بادئة (BxActF3، و BxActR3). ويتم إجراء التضخيم باستخدام بادئات التدوير التالية: دلترية أولية لمدة 5 دقائق عند درجة حرارة 95 درجة مئوية، وتليها 35 دورة (95 درجة مئوية لمدة 30 ثانية، و 52 درجة مئوية لمدة 30 ثانية، و 72 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة) مع إطالة نهائية لمدة 5 دقائق عند درجة حرارة 72 درجة مئوية.

2-4-2-4 تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل باستخدام النسخ العكسي الآلي لاستهداف تتابع الحمض النووي المكمل لجين بروتين الصدمة الحرارية hsp70^a

يرد في (Leal et al. (2013 وصف لاختبار SYBR Green لتفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل باستخدام النسخ العكسي

الآلي لتحديد *B. xylophilus* الحية حصرياً عن طريق كشف وجود hsp70 mRNA كمؤشر للقدرة على المعيشة والنمو بشكل سليم. ويكشف هذا الاختبار التضخيم المحدد للحمض النووي المكمل لجين

البروتين *hsp70* في *B. xylophilus* المنسوخة عكسياً، حيث تربط البادئة العكسية عبر وصلة إكسون – إنترن، ويؤدي ذلك بالتالي إلى استبعاد تضخم الحمض النووي الجيني. وقِيّمت خصوصيتها على أساس ستة أنواع غير مستهدفة من *Bursaphelenchus* وست عزلات من *B. xylophilus*. وحد الكشف في هذا الاختبار هو 0.25 نيماتودا لكل تفاعل ويقاس ذلك في ثلاث من ثلاث نسخ 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 المكمل 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 المكمل، تخزن العينات في درجة حرارة -20 درجة مئوية لاستخدامها لاحقاً كقالب نموذجي.

ويتألف مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل المكون من 20 ميكرو لتر من 5 ميكرو لترات من نموذج الحمض النووي المكمل (المخفف بنسبة 1:10 في 10 ميكرومولار من Tris، برقم أسّي قدره 8.0)، و 0.6 ميكرومولار من بادئة أمامية (HspexR3)، و 0.4 ميكرومولار من بادئة عكسية (HspexR3)، و 4 ميكرو لترات من 5× LightCycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green 1 Mix (Roche Diagnostics¹)، ويتم إجراء التضخيم الآني في جهاز التدوير LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics¹) باستخدام الإصدار 4.1 من برنامج LightCycler¹، وفقاً للبارامترات التالية: دلترة أولية وتنشيط لمدة 10 دقائق عند درجة حرارة 95 درجة مئوية، وتليها 40 دورة (95 درجة مئوية لمدة 15 ثانية، و 66 درجة مئوية لمدة 10 ثوان و 72 درجة مئوية لمدة 15 ثانية). وفي ما يتعلق بالتضخيم باستخدام البادئات الضابطة، لا يختلف مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل الذي يبلغ 20 ميكرو لتر من سابق أعلاه، باستثناء استخدام 0.5 ميكرومولار لكل بادئة (BxActF3 و BxActR3). ويتم إجراء التضخيم باستخدام بارامترات التدوير التالية: دلترة أولية وتنشيط لمدة 10 دقائق عند درجة حرارة 95 درجة مئوية، وتليها 45 دورة (95 درجة مئوية لمدة 15 ثانية، و 52 درجة مئوية لمدة 10 ثوان، و 72 درجة مئوية لمدة 15 ثانية).

4-2-5 التضخيم المتساوي الحرارة بواسطة العروة (LAMP)

يرد في Kikuchi et al. (2009) وصف طريقة للكشف عن *B. xylophilus* في عينات الخشب. واستحدث هؤلاء المؤلفون طريقة كشف *B. xylophilus* على نحو أسرع وبحساسية أكبر مما في اختبار تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل الآني 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*، وستة أنواع من أجناس النيماتودا غير المستهدفة، و *P. thunbergii* و *P. densiflora* و *B. fuckeliana*. وحُدّدت حساسية الاختبار

كعشر نسخ من الجين المستهدف (مباعد النسخ الداخلي (ITS) و 2.5×10^{-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 ميكرو لتر من داري الاستخلاص، ويحتوي ذلك على البروتيناز K، وداي ثيوثريتول الذي يرد مع مجموعة أدوات الكشف عن *Nippon B. xylophilus* (Gene¹)، 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 بيّنه Notomi *et al.* (2000) باستخدام مجموعة أدوات تضخيم الحمض النووي Loopamp DNA Amplification Kit (Eiken Chemical¹). ويحتوي مزيج التفاعل المؤلف من 25 ميكرو لتر من 2 ميكرو لتر من الحمض النووي المستخلص، و5 بيكومول لكل بادئة من البادئتين F3 وB3، و40 بيكومول لكل بادئة من البادئتين FIP وBIP، و20 بيكومول للبادئة LF، و12.5 ميكرو لتر من 2× مزيج التفاعل، و1 ميكرو لتر من إنزيم بلمرة الحمض النووي Bst، و1 ميكرو لتر من كاشف فلوري (Eiken Chemical¹). ويتم تحضين مزيج التفاعل لمدة 60 أو 120 دقيقة في درجة حرارة 63 درجة مئوية وينتهي بتحضين في درجة حرارة 80 درجة مئوية لمدة دقيقة. وتكتشف الأمبليكات الناتجة عن التضخيم المتساوي الحرارة بواسطة العروة من خلال التغيرات اللونية في محلول التفاعل تحت الأشعة فوق البنفسجية.

ويمكن تقييم المنتجات المضخمة بصورة اختيارية عن طريق استخدام نظام الكشف القائم على المسبار. ويستخدم الشكل المعالج بالبيوتين لبادئة 5'-FIP في تفاعل التضخيم المتساوي الحرارة بواسطة العروة. وبعد انتهاء التفاعل، يضاف 10 ميكرو لتر من المسبار الموسوم بمادة إيزوتيسيانات الفلورسين (10 بيكومول/ميكرو لتر؛ 5'-GGC GAG AGG GCT TCG TGC TCG ATT GTC GTG C-3')، وهو مصمم للتهجين في منطقة داخلية من التتابع المستهدف، ويضاف ذلك المسبار إلى مزيج التفاعل ويتم تحضينه لمدة 5 دقائق في درجة حرارة 95 درجة مئوية، ثم يبرد ببطء ليصل إلى درجة حرارة 25 درجة مئوية. ويُخفف مزيج التفاعل باستخدام 100 ميكرو لتر من الداري الجاري (محلول ملحي مدروء بالفوسفات مع 3 في المائة توين) ويوضع مباشرة على شرائط التهجين HybriDetect (Milenia Biotec¹) وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة. وتكشف شرائط HybriDetect الشظايا المحتوية على البيوتين FITC الناشئة عن التضخيم المحدد. وفي المقابل، عندما يحدث تضخيم غير محدد، 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 للقلب النموذجي) وكذلك، عند الاقتضاء (مثل الكشف المباشر عن النيماطودا) 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 وبارامتراتنا. 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 مخلق، أو أوليغونيوكلويد طويل.

ضابط التضخيم السلبي (بدون ضابط للقلب 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 المحدد. 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 الآني، والتضخيم المتساوي الحرارة بواسطة العروة، يمكن استخدام ضوابط داخلية، مثل منطقة مبادئ النسخ الداخلي (ITS)، أو 18S rRNA 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، ينبغي ألا يولد هذا الضابط إشارة بعد التضخيم.

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 الريبي التي تشمل التتابع المستهدف للاختبار (مثل خلاصة الحمض الريبي المجهزة في المختبر والتي تكون نتيجتها الإيجابية قد أكدت من قبل). وينبغي أن يولد 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.

7-2-4 تفسير نتائج تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل

1-7-2-4 تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل التقليدي

- لا يُعد تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل الخاص بمسبب المرض صالحاً إلا إذا:
- ولدت الضوابط الإيجابية منتج تضخيم بالحجم المتوقع للنيماتودا المستهدفة؛
 - لم تولد ضوابط الاستخلاص السلبية وضوابط التضخيم السلبية منتج تضخيم بالحجم المتوقع للنيماتودا المستهدفة.

وإذا استخدمت بادئات الضبط الداخلي في التفاعلات البسيطة، ينبغي أن تولد الضوابط الإيجابية، وكذلك كل عينة من عينات الاختبار، منتج تضخيم بالحجم المتوقع. وفي ما يتعلق بالتفاعلات المتعددة، ينبغي أن تولد 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 ولد منتج تضخيم بالحجم الصحيح.

2-7-2-4 تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل الآني

لا يعتبر تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل الآني سليماً إلا إذا:

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

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

8-2-4 التتابع

أجري تسلسل مباشر لعدة مناطق جينومية من النيماتودا المعزولة (عينة واحدة كما في Wu et al. (2013) أو عدة عينات من مستنبتات على فطريات في حالة (Ye et al. (2007) لأغراض تحديد هوية أنواع *B. xylophilus* والتمييز بين مختلف أنواع *Bursaphelenchus*. وتشمل هذه المناطق مبادئ النسخ الداخلي (ITS-1, ITS-2, 5.8S) للحمض النووي المطعم (Abeleira et al., 2011; Wu et al., 2013) أو منطقة D2-D3 من الجينوم 28S للحمض النووي المطعم (Ye et al., 2007). وتضخم المنطقة المستهدفة عن طريق تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل، ويتم إجراء تتابع للأمبليونات 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 *Bursaphelenchus* المتاحة في قاعدة بيانات المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (مثل أرقام الانضمام HQ646254 و KC460340 بالنسبة لمنطقة مبادئ النسخ الداخلي المذكورة أعلاه، و AY508105 إلى AY508109 بالنسبة لمنطقة الحمض النووي المطعم 28S).

وفي ما يتعلق بجين مبادئ 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، فإنها تُحدّد على أنها *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، فإنها تُحدّد على أنها *B. xylophilus*.

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 الحَجَر (Q-bank) (<http://www.q-bank.eu/Nematodes/>)، بما في ذلك أداة البحث الخاصة بمواءمة البيانات المحلية الأساسية (BLAST).

5- السجلات

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

وفي الحالات التي قد تتأثر فيها الأطراف المتعاقدة الأخرى بنتائج التشخيص، لا سيما في حالات عدم الامتثال (المعيار 13) (مبادئ توجيهية بشأن الإخطار عن عدم الامتثال وإجراءات الطوارئ) وفي الحالات التي تظهر فيها آفة *B. xylophilus* في 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 مثبتة في مثبت TAF أو في محلول غليسرين. وفي الحالات التي توجد فيها *B. xylophilus* في منطقة للمرة الأولى، سيكون من المفيد لإجراء فحوصات أخرى للمسار إجراء مستنبت لآفة *B. xylophilus* الحية المتكاثرة على *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، ينبغي الاحتفاظ بالبيانات المتعلقة بالمنشأ والمواد (مثل الأخشاب المستديرة و مواد 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: thomas.schroeder@jki.bund.de).

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 Dixmères, 49044 Angers Cedex 01, France (Geraldine Anthoine; e-mail: geraldine.anthoine@anses.fr).

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: sunfc@inspection.gc.ca).

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)

الإقليم أو البلد	تفاصيل الاتصال بالخبير
أفريقيا	Forestry and Agricultural Biotechnology Institute (FABI) (معهد الحراجة والتكنولوجيا الحيوية والزراعية)، University of Pretoria, Pretoria 0002, South Africa (Michael J. Wingfield; e-mail: mike.wingfield@fabi.up.ac.za)
أستراليا	CSIRO Ecosystem Sciences-Black Mountain Laboratories (مختبرات ماونتين بلاك لعلوم النظام الإيكولوجي التابعة لمنظمة الكومنولث للبحوث العلمية والصناعية) Clunies Ross Street, Black Mountain, ACT 2601, Australia (Mike Hodda; e-mail: Mike.Hodda@csiro.au)
الصين	Department of Forest Protection (إدارة وقاية الغابات)، Nanjing Forestry University, No. 159 Longpan Road, Nanjing, 210037 China (Boguang Zhao; e-mail: 13505186675@126.com)
الاتحاد الأوروبي	NemaLab-ICAM (مختبر النيماتودا) قسم البيولوجيا، جامعة إيفورا، Departamento Biologia, Universidade de Évora, 7002-554 Évora, Portugal (Manuel Mota; e-mail: mmota@uevora.pt)
اليابان	Forest Pathology Laboratory (مختبر باثولوجيا الغابات)، Forestry and Forest Products Research Institute (معهد بحوث الغابات والمنتجات الغابية) Tsukuba, Ibaraki 305-8687, Japan (Mitsuteru Akiba; e-mail: akiban@ffpri.affrc.go.jp)
جمهورية كوريا (كوريا الجنوبية)	Division of Forest Insect Pests and Disease (شعبة الآفات الحشرية وأمراض الغابات)، Korea Forest Research Institute (المعهد الكوري لبحوث الغابات)، 207 Cheongnyangni 2-dong, Dongdaemun-gu, Seoul 130-712, Korea (ROK) (Hyerim Han; e-mail: hrhan@forest.go.kr)

ويمكن أن تقدّم المنظمات الوطنية لوقاية النباتات أو المنظمات الإقليمية لوقاية النباتات أو الأجهزة التابعة لتدابير الصحة النباتية طلباً لإعادة النظر في بروتوكول التشخيص 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))، و Geraldine Anthoine (مختبر

الصحة النباتية التابع للوكالة الفرنسية لسلامة الأغذية والبيئة والصحة المهنية، فرنسا (انظر القسم السابق))، Isabel Leal (دائرة الغابات الكندية، كندا (انظر القسم السابق))، Jianfeng Gu (المركز التقني، هيئة نينغبو للتفتيش والحجر في منافذ الدخول والخروج، الصين (انظر القسم السابق))، و Fengcheng 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 مراحل الأولى.

وتولى في البداية إعداد وصف تقنية تعدد أشكال طول الشظايا المحددة لمبادئ النسخ الداخلي Wolfgang Burgermeister (معهد فسيولوجيا النبات والميكروبيولوجيا والسلامة البيولوجية، معهد يوليوس-كرويس-وهرن، ألمانيا).

وقدّم Philippe Castagnone-Sereno (UMR1064 INRA/UNSA/CNRS, Interactions Plantes-Microorganismes et Sante Vegetale, France) الوصف الأولي 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 *B. xylophilus* (EPPO, 2001, 2013b).

8- المراجع

يمكن أن يشير هذا الملحق إلى المعايير الدولية لتدابير الصحة النباتية. وتتاح هذه المعايير في بوابة الصحة النباتية الدولية في الرابط التالي: <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. Geneesl. Lab. Weltevreden*, 1917: 41–47 (in German).
- Barstead, R.J., Kleiman, L. & Waterston, R.H. 1991. Cloning, sequencing and mapping of an alpha-actinin 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.

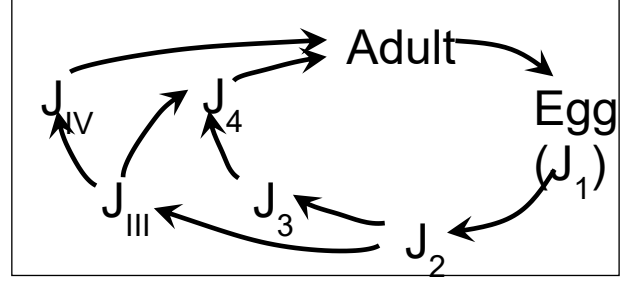
- Braasch, H. & Schönfeld, U.** 2015. Improved morphological key to the species of the *xylophilus* group of the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937. *EPPO Bulletin*, 45(1): 73–80.
- Burgermeister, W., Braasch, H., Metge, K., Gu, J., Schröder, T. & Woldt, E.** 2009. ITS-RFLP analysis, an efficient tool 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 tryphloeus* sp. n. (Nematoda: Parasitaphelenchinae): An associate of the bark beetle, *Tryphloeus 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, *Tryphloeus 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



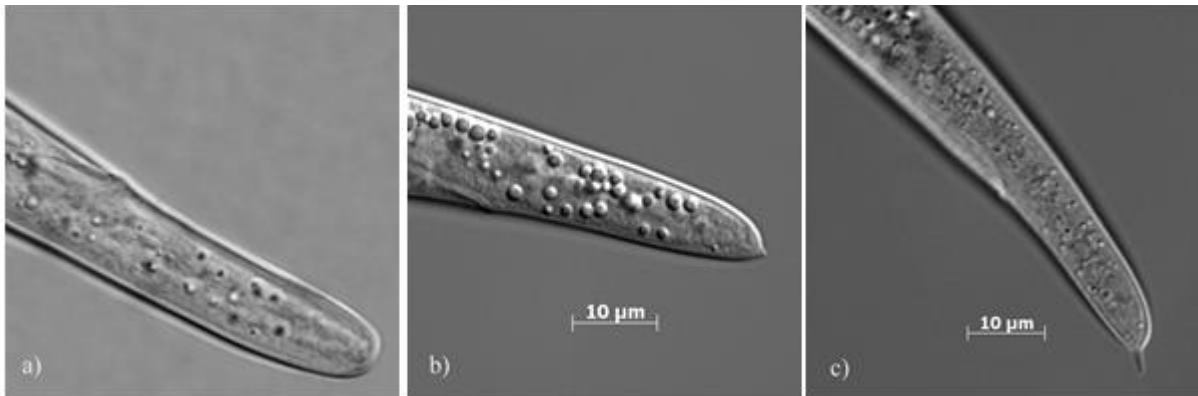
الشكل 1: دورة حياة *Bursaphelenchus xylophilus* من البيضة إلى النيماتودا البالغة. JX، اليرقات الصغيرة في الطور X. المصدر: بتصرف من Wingfield et al. (1982).



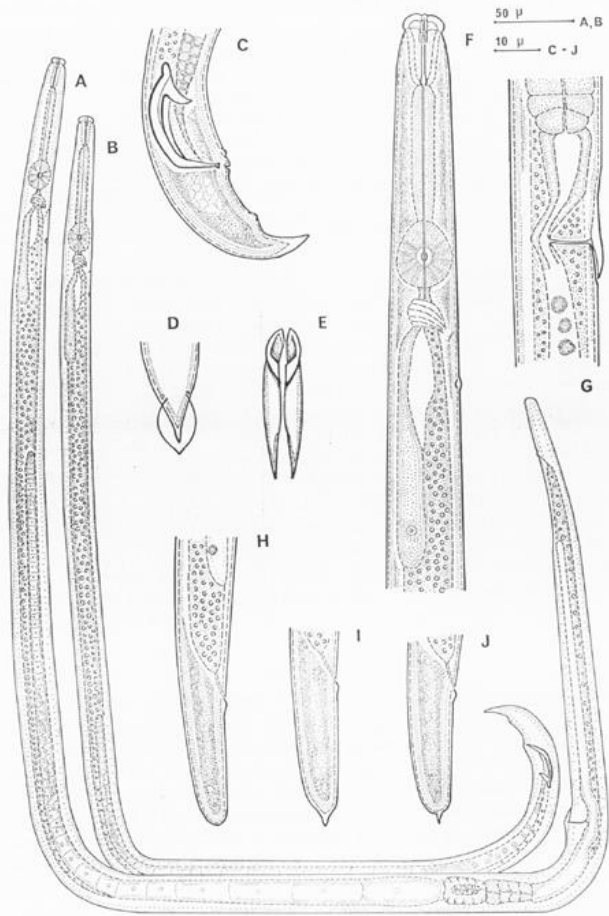
الشكل 2: تطور الأعراض في أشجار الصنوبر (*Pinus pinaster*) المصابة بأفة *Bursaphelenchus xylophilus*، من شجرة سليمة إلى شجرة ميتة. الصور إهداء من: T. Schröder، معهد يوليوس كوهن، ألمانيا.



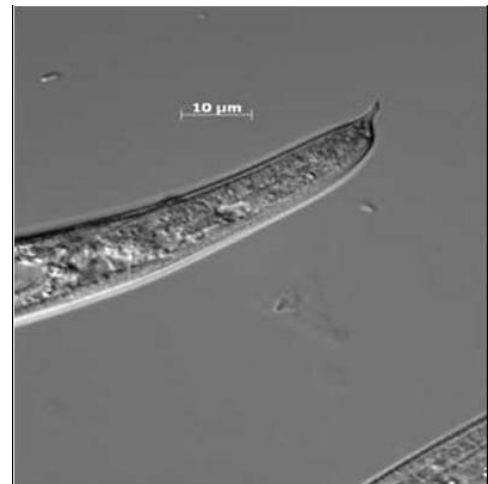
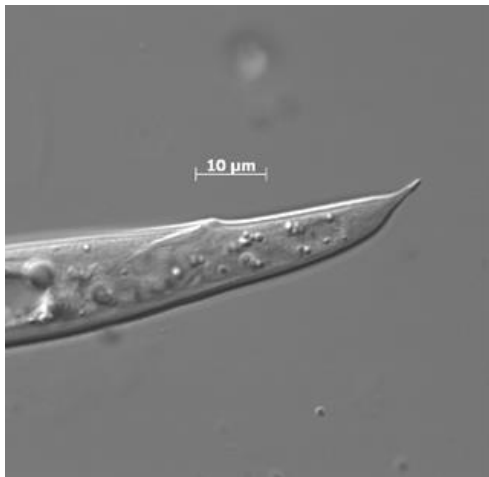
الشكل 3: أعراض مرض ذبول خشب الصنوبر في أشجار *Pinus pinaster*، بسبب آفة *Bursaphelenchus xylophilus*.
الصورة إهداء من: T. Schröder، معهد يوليوس كوهن، ألمانيا.



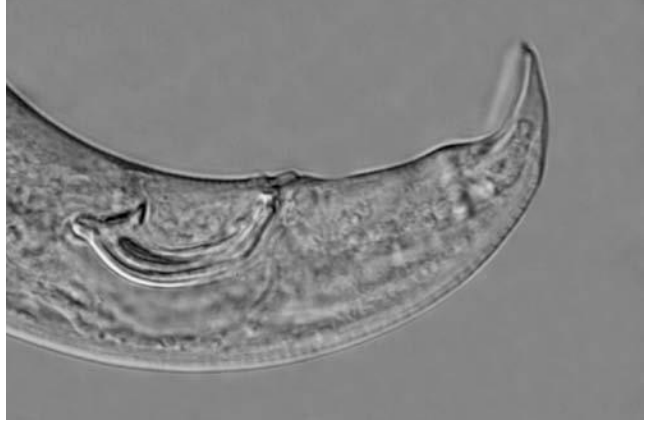
الشكل 4: أذنان إناث آفة *Bursaphelenchus xylophilus*. (أ) مستدير (تكبير بقوة 1 000)؛ (ب) نتوء صغير بارز؛ (ج) شكل مدبب.
الصور من إهداء (أ) T. Schröder، معهد يوليوس كوهن، ألمانيا، و (b، c) J. Gu، هيئة Ningbo للتفتيش والحجر في منافذ الدخول والخروج، الصين.



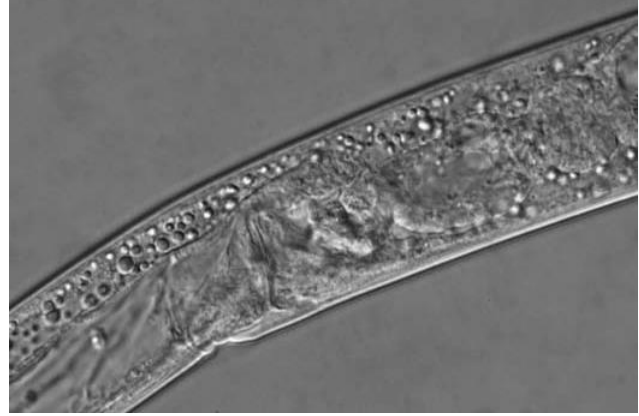
الشكل 5: *Bursaphelenchus xylophilus*. (A) أنثى؛ (B) ذكر؛ (C) ذنب الذكر؛ (D) منظر لذنب الذكر من ناحية البطن، ونهاية الذنب مزودة بغشاء تناسلي على هيئة جناح، (E) منظر بطني للشوكتين السفاديتين؛ (F) الجزء الأمامي من الأنثى؛ (G) الفتحة التناسلية للأنثى؛ (H)، (I)، (J) ذنب الأنثى. المصدر: Mamiya and Kiyohara (1972).



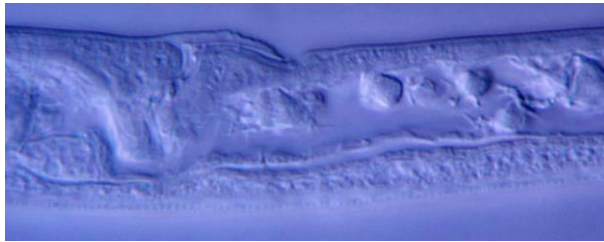
الشكل 6: ذنب الأنثى لدى *Bursaphelenchus mucronatus mucronatus* (إلى اليسار) و *B. mucronatus kolymensis* (إلى اليمين). الصور من إهداء J. Gu، هيئة نغبو للتفتيش والحجر في منافذ الدخول والخروج، الصين.



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



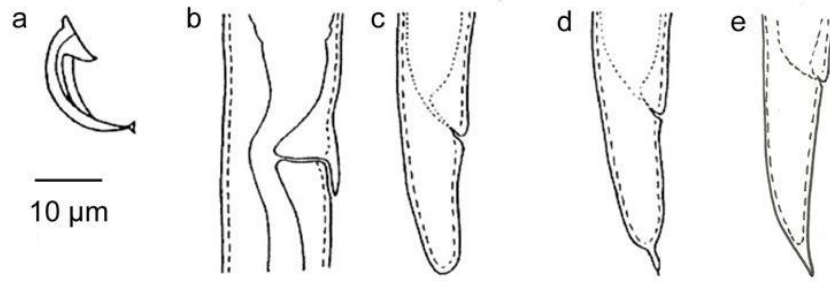
الشكل 8: أنثى *Bursaphelenchus xylophilus* مزوّدة بسديلة تناسلية (تكبير بقوة 640).
الصورة من إهداء T. Schröder، معهد يوليوس كوهن، ألمانيا.



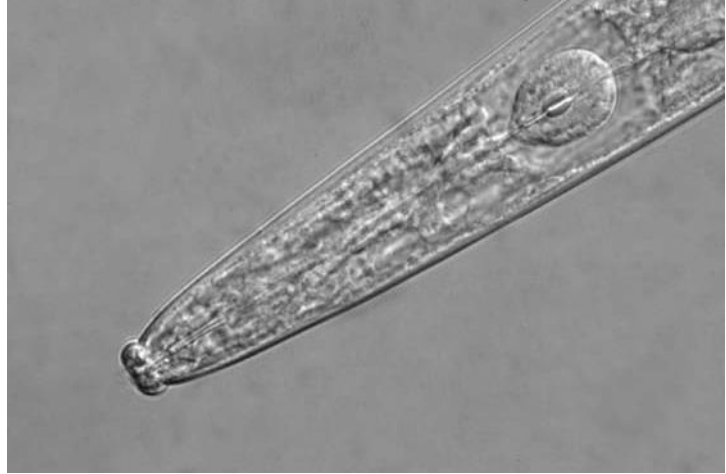
الشكل 9: أنواع ليست *Bursaphelenchus xylophilus* من فئة *xylophilus*: (A) السديلة التناسلية للأنثى، ملتوية ومنتهية بتجويف عميق (B) ذنب أنثى *B. fraudulentus* مزوّد بنتوء بارز (إلى اليسار) وبدون نتوء بارز (إلى اليمين) (تكبير بقوة 1 000).

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





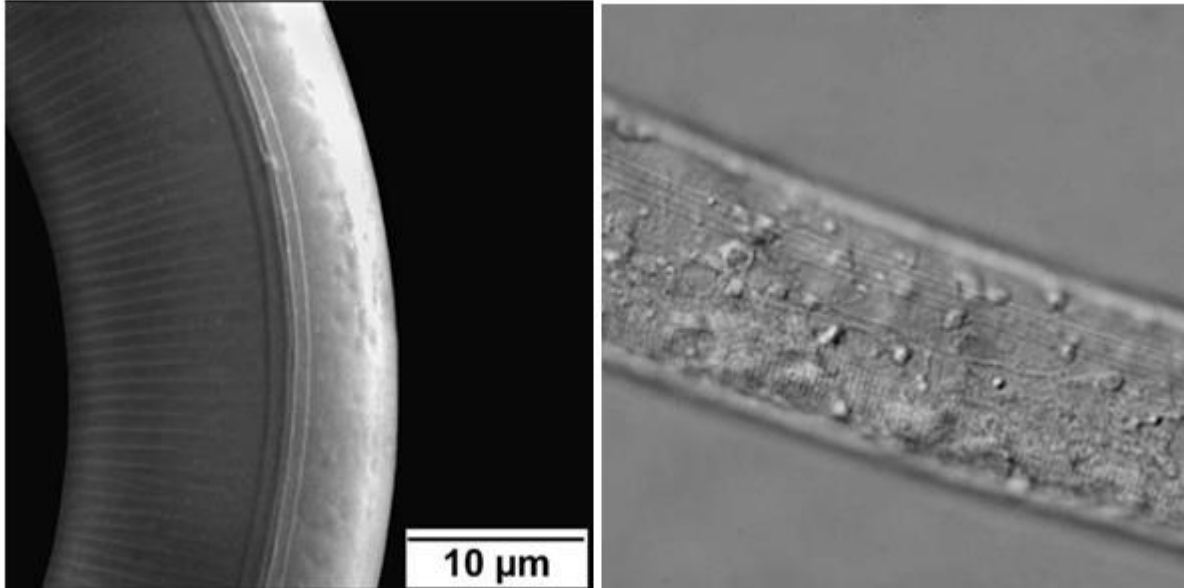
الشكل 10: الخصائص التشخيصية لآفة *Bursaphelenchus xylophilus* و *B. mucronatus mucronatus* و *B. mucronatus kolymensis*: (a) شوكتا السفاد لدى كل الأنواع الثلاثة؛ (b) السديلة التناسلية لدى كل الأنواع الثلاثة؛ (c) نهاية ذنب أنثى *B. xylophilus*، ذات شكل مستدير؛ (d) نهاية ذنب أنثى *B. mucronatus kolymensis*؛ (e) نهاية ذنب أنثى *B. mucronatus mucronatus*. المصدر: بتصرف من EPPO/CABI (1996).



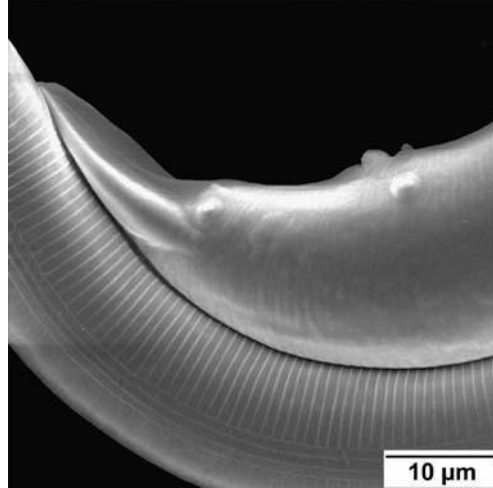
الشكل 11: المنطقة الأمامية لآفة *Bursaphelenchus xylophilus* مزودة بحربة وجسم خلفي (تكبير بقوة 640). الصورة من إهداء T. Schröder، معهد يوليوس كوهن، ألمانيا.



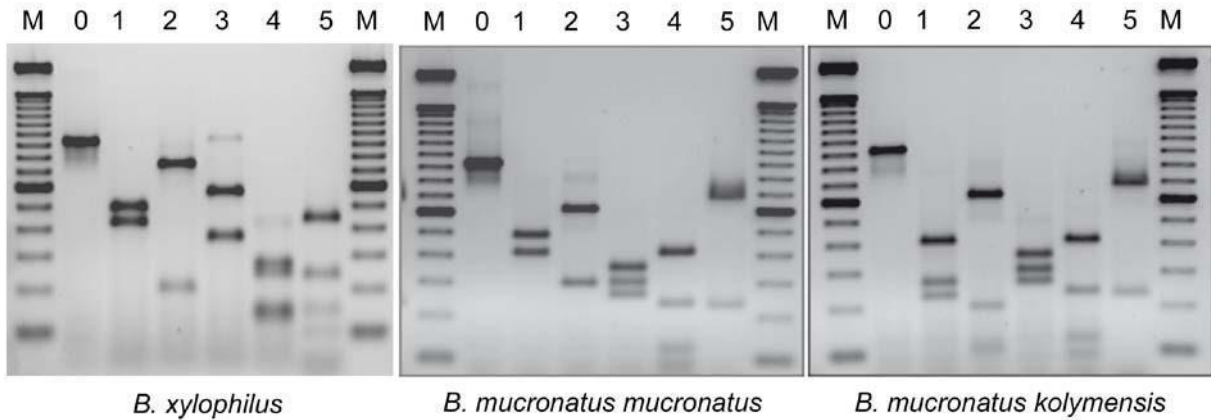
الشكل 12: منظر لآفة *Bursaphelenchus xylophilus* يبين ذنب الذكر في الوضع الظهري البطني حيث يظهر الغشاء المجنح (تكبير بقوة 1 000). الصورة من إهداء T. Schröder، معهد يوليوس كوهن، ألمانيا.



الشكل 13: آفة *Bursaphelenchus xylophilus* تحت المجهر الإلكتروني في الوضع الجانبي (إلى اليسار) والمجهر (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 لمجهر إلكتروني > الصورة من إهداء M. Brandstetter، المركز النمساوي لبحوث الغابات، النمسا.



الشكل 15: مبادئ النسخ الداخلي (ITS) – أنماط تعدد أشكال طول الشظايا المحددة لدى *Bursaphelenchus xylophilus* (إلى اليسار) و *B. mucronatus mucronatus* (في الوسط) و *B. mucronatus kolymensis* (إلى اليمين). وتم الحصول على شظايا التحديد عن طريق هضم شظية الحمض النووي الريبوسومي المطعم (0) باستخدام *RsaI* (1)، M، واسم الحمض النووي (سلم من 100 زوج قاعدي). الصورة من إهداء W. Burgermeister، معهد بيوليوس كوهن، ألمانيا

التسلسل التاريخي للمطبوع

لا يشكل ذلك جزءاً رسمياً من المعيار

- 2004-11 لجنة المعايير أضافت الموضوع: (2004-016) *Bursaphelenchus xylophilus*.
 2006-04 المعيار - 1 أضافت هيئة تدابير الصحة النباتية في دورتها الأولى
 (2006) موضوع برنامج العمل: النيماتودا (2006-008).
 2007-09 نقاش فريق الخبراء المعني بإعداد مشروع بروتوكولات التشخيص.
 2008-06 نقاش نقاش فريق الخبراء المعني بإعداد مشروع بروتوكولات التشخيص مع المؤلف الرئيسي.
 2013-09 تم تكوين فريق لصياغة البروتوكول التشخيصي الجديد.
 2014-03 مشاوررة للخبراء.
 2014-10 لجنة المعايير وافقت على مشاوررة الأعضاء (2014_eSC_Nov_11).
 2015-02 مشاوررة الأعضاء
 2015-10 فريق الخبراء المعني بإعداد بروتوكولات التشخيص وافق على تقديمه
 إلى لجنة المعايير لاعتماده بقرار إلكتروني (eTPDP_Oct_02).
 2015-11 لجنة المعايير وافقت على فترة الإخطار الخاصة بالبروتوكول التشخيصي (2015_eSC_Nov_08).
 2016-01 لجنة المعايير اعتمدت البروتوكول التشخيصي بالنيابة عن هيئة تدابير الصحة النباتية (لم تتلق أي اعتراضات رسمية).
 المعيار الدولي رقم 27 - الملحق 10 *Bursaphelenchus xylophilus* (2016)، روما، الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات، منظمة الأغذية والزراعة.
 2017-04 اخذت هيئة تدابير الصحة النباتية ، في دورتها (12) ، علماً بالتعديلات التحريرية المقترحة من قبل مجموعة مراجعة اللغة العربية.
 2018-01 راجعت خدمات الترجمة التابعة لمجموعة مراجعة اللغة الخاصة باللغة العربية بروتوكول التشخيص هذا وقامت أمانة الاتفاقية الدولية لوقاية النبات بدمج التعديلات وفقاً لذلك.
 آخر تحديث لتاريخ المطبوع: 2018-01