



جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة كربلاء - كلية الزراعة

قسم وقاية النبات

تشخيص ديدان تعقد الجذور *Meloidogyne spp.* على  
الطماطة في بعض مناطق محافظة كربلاء وتقييم بعض  
عوامل المكافحة الإحيائية وغير الإحيائية

رسالة تقدمت بها

لقاء حسين محمد

إلى المجلس كلية الزراعة - جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة ماجستير علوم في الزراعة - وقاية النبات

بإشراف

م.د. إستبرق محمد عبد الرضا

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا  
مِنْهُ خَضِرًا نُخْرَجُ مِنْهُ حَبًّا مُتَرَاكِبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِنْ طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ  
وَجَنَّاتٍ مِنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُشْتَبِهٍ انظُرُوا إِلَى  
ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ إِنَّ فِي ذَلِكَُمْ لَآيَاتٍ لِقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ﴾

صدق الله العلي العظيم

سورة الأنعام الآية (99)

## الإهداء

إلى صاحب الفضل الهادي سِواء السَّبيل ... الله عزَّوجل

إلى معلم البشريَّة ونور العالمين وَنصح الأُمَّة ... نبينا محمد ﷺ

إلى مَنْ ارْتوت أرض وطننا بِدمائهم الطَّاهرة .... شهداءنا الأبطال

إلى مَنْ وَضع المولى ﷺ الأَجَنَّة تحت قَدَميها ... والدتي العَالية

إلى مَنْ أَحْمَل اسْمه بِكُل افتِخار .... والدي العَزيز

إلى مَنْ هُم سُنديّ وعوني ... إخوتي وأخواتي

إلى كَلِّ مَنْ ساندني وَشدَّ مِنْ أُرِّي ... حباً واعتزازاً

أهدي لكم ثمرة جهدي

## الشكر والتقدير

إلهي لا يطيب الليل إلا بشكرك ... ولا يطيب النهار إلا بطاعتك ... ولا تطيب اللحظات إلا بذكرك ولا تطيب الآخرة إلا بعفوك ... ولا تطيب الجنة إلا برويتك

فالحمد لله رب العالمين ، والصلاة والسلام على أشرف المرسلين ، نبينا وحبينا محمد الصادق الأمين وعلى آله وصحبه ومن سار على نهجه الى يوم الدين

« لا يَشْكُرُ اللهُ مَنْ لا يَشْكُرُ النَّاسَ »

يشرفني أن أتقدم بجزيل الشكر والتقدير إلى رئاسة جامعة كربلاء وإلى عمادة كلية الزراعة وقسم وقاية النبات لما قدموه من تسهيلات إدارية طوال مدة البحث .

وأتقدم بخالص الشكر والإحترام لصاحبة المهمة العالية والعلم الوافر مشرفتي وأستاذتي الفاضلة الدكتورة إستبرق محمد عبد الرضا كنعان .

يملي عليّ واجب الوفاء أن أتقدم بجزيل الشكر والإمتنان لأساتذتي أعضاء الهيئة التدريسية في قسم وقاية النبات الذين بذلوا ولم يبخلوا علينا من جهد ومعرفة وعلم وأخص بالذكر الدكتور مشتاق طالب محمد علي القرشي .

يسعدني أن أتقدم بوافر الشكر والتقدير إلى أعضاء لجنة المناقشة على ما تكبدوه من عناء في قراءة رسالتي المتواضعة وإغنائها بمقترحاتهم القيمة .

كل الشكر والإمتنان إلى إخواني وأخواتي زملائي من طلبة الدراسات العليا وكل من أسهم في إنجاز هذه الرسالة وساندني لإتمام هذا العمل أرجو من الله عز وجل أن يكون في ميزان حسناتهم .

## إقرار لجنة المناقشة

نشهد بأننا أعضاء لجنة المناقشة أطلعنا على هذه الرسالة والموسومة (تشخيص ديدان تعقد الجذور *Meloidogyne spp.* على الطماطة في بعض مناطق محافظة كربلاء وتقييم بعض عوامل مكافحة الإحيائية وغير الإحيائية) وقد ناقشنا الطالبة في محتوياتها وفيما له علاقة بها ووجدنا إنها جديرة بالقبول لنيل درجة الماجستير في العلوم الزراعية (وقاية النبات) .

### رئيس اللجنة

أ.د. رجاء غازي عبد المحسن الجنابي

كلية الزراعة / جامعة كربلاء

### عضواً

أ.م.د. أسماء منصور عبد الرسول الحكيم

كلية العلوم / جامعة الكرخ للعلوم

### عضواً

أ.م.د. سعد طارق عبد الملك ياس

كلية الزراعة / جامعة بغداد

### عضواً (المشرف)

م.د. إستبرق محمد عبد الرضا كنعان

كلية الزراعة / جامعة كربلاء

صدقت الرسالة من قبل مجلس كلية الزراعة / جامعة كربلاء

### الدكتور

أ.د. ثامر كريم خضير الجنابي

عميد كلية الزراعة / جامعة كربلاء

## إقرار المشرف

أشهد بأن الرسالة الموسومة (تشخيص ديدان تعقد الجذور *Meloidogyne spp.* على الطمطة في بعض مناطق محافظة كربلاء وتقييم بعض عوامل المكافحة الإحيائية وغير الإحيائية) التي تقدمت بها الطالبة (لقاء حسين محمد) قد تم أعدادها بإشرافي في كلية الزراعة / جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في العلوم الزراعية (وقاية النبات) .

التوقيع :

أسم المشرف : إستبرق محمد عبدالرضا كنعان

المرتبة العلمية : مدرس

التاريخ : / / 2021

## توصية رئيس القسم

بناءً على توصية الأستاذ المشرف ، أرشح هذه الرسالة للمناقشة

التوقيع :

الأسم : أ.م.د. ياسر ناصر حسين الحميري

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

التاريخ : / / 2021

## إقرار الخبير العلمي

أشهد أن الرسالة الموسومة (تشخيص ديدان تعقد الجذور *Meloidogyne* spp. على الطماطة في بعض مناطق محافظة كربلاء وتقييم بعض عوامل المكافحة الإحيائية وغير الإحيائية) التي تقدمت بها الطالبة (لقاء حسين محمد) في كلية الزراعة / جامعة كربلاء . قد جرى تقييمها علمياً من قبلي وهي صالحة للمناقشة .

التوقيع :

الأسم : أم.د. عناد ظاهر عبود المفرجي

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان : قسم وقاية النبات / كلية علوم الهندسة الزراعية / جامعة بغداد

التاريخ : / / 2021

## إقرار الخبير العلمي

أشهد أن الرسالة الموسومة (تشخيص ديدان تعقد الجذور *Meloidogyne* spp. على الطماطة في بعض مناطق محافظة كربلاء وتقييم بعض عوامل المكافحة الإحيائية وغير الإحيائية) التي تقدمت بها الطالبة (لقاء حسين محمد) في كلية الزراعة / جامعة كربلاء . قد جرى تقييمها علمياً من قبلي وهي صالحة للمناقشة .

التوقيع :

الأسم : أ.م.د. وسام عدنان راضي الجعفري

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان : قسم وقاية النبات / كلية الزراعة / جامعة الكوفة

التاريخ : / / 2021

## إقرار الخبير اللغوي

أشهد أن الرسالة الموسومة (تشخيص ديدان تعقد الجذور *Meloidogyne* spp. على الطماطة في بعض مناطق محافظة كربلاء وتقييم بعض عوامل المكافحة الإحيائية وغير الإحيائية) التي تقدمت بها الطالبة (لقاء حسين محمد) في كلية الزراعة / جامعة كربلاء . قد جرت مراجعتها من الناحية اللغوية تحت إشرافي وأصبحت بأسلوب علمي سليم خالي من الأخطاء اللغوية .

التوقيع :

الاسم : م.د. علياء نصرت حسن

المرتبة العلمية : مدرس

العنوان : كلية التربية للعلوم الإنسانية / جامعة كربلاء

التاريخ : / / 2021

## إقرار الخبير الإحصائي

أشهد أن الرسالة الموسومة (تشخيص ديدان تعقد الجذور *Meloidogyne* spp. على الطماطة في بعض مناطق محافظة كربلاء وتقييم بعض عوامل المكافحة الإحيائية وغير الإحيائية) التي تقدمت بها الطالبة (لقاء حسين محمد) في كلية الزراعة / جامعة كربلاء . قد جرت مراجعتها من الناحية الإحصائية تحت إشرافي وهي صالحة للمناقشة .

التوقيع :

الأسم : أ.د. ثامر كريم خضير الجنابي

المرتبة العلمية : أستاذ دكتور

العنوان : كلية الزراعة / جامعة كربلاء

التاريخ : / / 2021

## الخلاصة

أجري هذا البحث لتحديد نسبة وشدة الإصابة والتعرف على أنواع ديدان تعقد الجذور التي تصيب نباتات الطماطة في محافظة كربلاء وتشخيصها مظهرياً وجزئياً للنوع الأكثر تكراراً ، وإختبار حساسية عشر أصناف طماطة من الإصابة بديدان تعقد الجذور مع إختبار تأثير تراكيز المبيد الإحيائي Verox وأوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs والمبيد الكيميائي Velum prime على ديدان تعقد الجذور RKN في ظروف المختبر والحقل . وأظهرت النتائج أن معدل نسبة الإصابة في جميع الحقول التي شملها المسح بلغت 27.14% وسجلت أعلى نسبة إصابة 75% في الحقل 2 في ناحية الحسينية ، تلتها منطقة الإبراهيمية الحقل 1 وبلغت 72.72%، بالمقابل لم تسجل أي إصابات في الحقل 2 في منطقة الإبراهيمية ومزارع خان الربع وناحية الحر والعتبة العباسية . وبناءً على التشخيص المورفولوجي الذي يشمل أنماط العجان الأثوية تم تحديد نوعين من Root Knot Nematode هي *Meloidogyne javanica* و *Meloidogyne incognita* في عينات المنطقة المدروسة ، وكان الجنس *M. incognita* هو النوع السائد . تشارك تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) لـ *M. incognita* هويات 99.28% مع عزلتين من الولايات المتحدة الأمريكية وباكستان . فضلاً عن ذلك أظهرت أصناف الطماطة Samar -Sura -Maysaloun مقاومة عالية ضد *Meloidogyne* spp. بينما أظهرت أصناف 8-Narcan - RockStar- Sunagri حساسية عالية تجاه *Meloidogyne* spp.

قيم تأثير تراكيز المبيد الإحيائي Verox وأوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs على ديدان تعقد الجذور RKN في ظروف المختبر والحقل . في المختبر أدت التراكيز 2000 جزء في المليون من المبيد الإحيائي Verox والتركيز 4000 جزء في المليون من أوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs إلى إنخفاض كبير في فقس بيوض الديدان بمعدل 94.67 و 87.34% على التوالي ، أما معدل موت يافعات الجيل الثاني J<sub>2</sub> بلغ 94.33 و 88.33% على التوالي مقارنة بمعاملة السيطرة غير المعالجة Velum prime وبلغت 100% ، أدى استخدام 400 جزء في المليون ، 2000 جزء في المليون ، 4000 جزء في المليون ، من مبيد النيماتودا Velum prime ، المبيد الإحيائي Verox ، وأوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs على التوالي ، على أصناف نباتات الطماطة Samar - Meyameya - Maysaloun ، إلى تقليل تكوين العقد

الجزرية ومستوى الإصابة بالديدان الثعبانية بشكل ملحوظ مقارنة بمعاملة السيطرة . أما الصنف Maysaloun كان الأفضل من بين الأصناف الأخرى بنسبة تكوين عقد جذرية 0.14 ومعدل إصابة بلغ 0.09 . إضافة إلى ذلك فإن استخدام 2000 جزء في المليون و 4000 جزء في المليون من المبيد الإحيائي Verox وأوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs على التوالي، على أصناف Samar - Meyameya - Maysaloun أدى بشكل ملحوظ إلى تحسين المؤشرات الحيوية لنمو نباتات الطماطة من حيث الأوزان الرطبة والجافة للمجموع الخضري والجذري ، بالمقارنة مع معاملة السيطرة في التربة المعقمة .

## قائمة المحتويات

الصفحة	الموضوع	التسلسل
3-1	المقدمة	اولاً
34 - 4	مراجعة المصادر	ثانياً
4	Nematodes النيماتودا	1-2
5	ديدان تعقد الجذور Root-knot Nematode وأهميتها الاقتصادية	2-2
8	أعراض الإصابة بديدان تعقد الجذور Symptoms of <i>Meloidogyne</i> spp.	1-2-2
10	خصائص التربة الفيزيائية والكيميائية المؤثرة في انتشار وتوزيع ديدان تعقد الجذور <i>Meloidogyne</i> spp.	2-2-2
11	طرق تشخيص ديدان تعقد الجذور Identification of <i>Meloidogyne</i> spp.	3-2
12	التشخيص الجزيئي لديدان تعقد الجذور Molecular Idefinition of <i>Meloidogyne</i> spp.	1-3-2
14	جينات المقاومة Mi في نباتات الطماطة	4-2
17	سليبات جينات المقاومة Mi في نباتات الطماطة	5-2
18	تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase Chain Reaction	6-2
19	مراحل التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا Stage PCR	7-2
21	البادئ The Primer	8-2
22	البادئ Mi2.3	1-8-2
23	البادئ Mint للموقع Intro	2-8-2
24	تأثير المبيدات الإحيائية والمواد النانوية على حيوية النباتات	9-2
25	تأثير البكتريا الجذرية Rhizobacteria على حيوية النبات	1-9-2
26	تأثير أكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs على حيوية النبات	2-9-2
27	مكافحة ديدان تعقد الجذور Control of <i>Meloidogyne</i> spp.	10-2
27	الأصناف المقاومة Resistant Varieties	1-10-2
29	المكافحة الإحيائية Biological Control	2-10-2

31	المكافحة بالمواد النانوية Control Nanomaterials	3-10-2
32	المكافحة الكيميائية Chemical Control	4-10-2
33	المبيد الكيميائي Velum prime	1-4-10-2
63 -35	المواد وطرائق العمل	ثالثاً
37	المسح الحقل	1-3
39	تشخيص أنواع ديدان تعقد الجذور Meloidogyne spp. في حقول الدراسة بالاعتماد على الطراز العجاني Perineal Patterns	2-3
39	تحليل الصفات الكيميائية والفيزيائية للتربة لحقول الدراسة المشمولة بالمسح الحقل	3-3
40	تهيئة التربة المستخدمة في التجارب	4-3
41	تهيئة مزرعة نقية لديدان تعقد الجذور Pure Culture	5-3
42	تشخيص ديدان تعقد الجذور بالإعتماد على التفانات الجزيئية	6-3
42	عزل الحامض النووي المنقوص الاوكسجين DNA لديدان تعقد الجذور Meloidogyne spp.	1-6-3
44	تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction	2-6-3
45	الترحيل الكهربائي Electrophoresis	3-6-3
46	اعداد هلام الاكاروز	1-3-6-3
46	التحميل والترحيل	2-3-6-3
47	تحديد تتابعات القواعد النتروجينية Sequence	4-6-3
47	تحليل بيانات تتابعات القواعد النتروجينية لجينوم ديدان تعقد الجذور	5-6-3
47	تهيئة الهجن الوراثية لنبات الطماطة المستخدمة في التجارب الحقلية	7-3
48	تحضير لقاح ديدان تعقد الجذور Meloidogyne spp. المستخدم في التجارب	8-3
49	اختبار حساسية الهجن الوراثية لنبات الطماطة من الإصابة بديدان تعقد الجذور Meloidogyne spp.	9-3
50	حساب أعداد الاناث واليافاعات لديدان تعقد الجذور Meloidogyne spp. في جذور أصناف الطماطة	1-9-3

51	حساب أعداد الذكور واليافعات لديدان تعقد الجذور. <i>Meloidogyne spp.</i> في 150 غم تربة	2-9-3
51	قياس المعايير الخضرية للهجن الوراثية لنبات الطماطة	10-3
51	النسبة المنوية لإنبات البذور	1-10-3
52	محتوى الكلوروفيل الكلي للهجن الوراثية لنبات الطماطة	2-10-3
52	الكشف عن جينات المقاومة Mi-genes للهجن الوراثية المنتخبة لنبات الطماطة باستعمال تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل	11-3
52	استخلاص الحامض النووي DNA من الانسجة النباتية	1-11-3
53	أنواع البرايمرات المستخدمة في التجربة	2-11-3
54	بادئ Mi2.3	1-2-11-3
54	بادئ Intron	2-2-11-3
54	تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction	3-11-3
55	تحضير مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR	4-11-3
56	ترحيل العينات على هلام الاكاروز	5-11-3
57	تهينة معلق بيض ديدان تعقد الجذور. <i>Meloidogyne spp.</i>	12-3
58	اختبار تأثير التراكيز المختلفة للمبيد الإحيائي Verox وأوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs في تثبيط فقس بيوض ديدان تعقد الجذور <i>Meloidogyne spp.</i> مختبرياً	1-12-3
58	جمع يافعات الطور الثاني J2 لديدان تعقد الجذور. <i>Meloidogyne spp.</i>	13-3
59	اختبار تأثير التراكيز المختلفة للمبيد الإحيائي Verox وأوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs في هلاك يافعات الطور الثاني لديدان تعقد الجذور <i>Meloidogyne spp.</i> مختبرياً	1-13-3
60	إختبار التضاد بين المبيد الإحيائي Verox والمبيد الكيميائي Velum Prime في أطباق بتري	14-3
60	إختبار كفاءة المبيد الإحيائي Verox وأوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs على بعض معايير النمو للأصناف المدروسة تحت ظروف البيت البلاستيكي	15-3

61	مكافحة ديدان تعقد الجذور. <i>Meloidogyne spp.</i> على الهجن الوراثية المنتخبة لنبات الطماطة في ظروف البيت البلاستيكي	16-3
63	إختبار بقاء المبيد الإحيائي Verox في التربة المعاملة	17-3
63	التحليل الاحصائي	16-3
99-64	النتائج والمناقشة	رابعاً
64	نتائج المسح الحقل	1-4
64	النسبة المئوية لإصابة حقول الطماطة وشدة إصابتها بديدان تعقد الجذور <i>Meloidogyne spp.</i> في حقول الدراسة المشمولة بالمسح الحقل	1-1-4
66	تشخيص أنواع ديدان تعقد الجذور <i>Meloidogyne spp.</i> في حقول الدراسة بالاعتماد على الطراز العجاني Perineal Patterns	2-1-4
69	خواص التربة الفيزيائية والكيميائية في حقول الدراسة المشمولة بالمسح الحقل	3-1-4
71	التشخيص الجزيئي لديدان تعقد الجذور بالاعتماد على التقانات الجزيئية	2-4
72	تحليل نتائج تسلسل النيوكليوتيدات للحامض النووي المنقوص الاوكسجين لجينوم ديدان تعقد الجذور <i>Meloidogyne spp.</i>	1-2-4
75	إختبار حساسية الهجن الوراثية لنبات الطماطة من الإصابة بديدان تعقد الجذور <i>Meloidogyne spp.</i>	3-4
80	نتائج قياس المعايير الخضرية للهجن الوراثية لنبات الطماطة	4-4
80	النسبة المئوية لإنبات البذور	1-4-4
81	محتوى الكلوروفيل الكلي للهجن الوراثية لنبات الطماطة	2-4-4
82	نتائج الكشف عن جينات المقاومة للهجن الوراثية المنتخبة لنبات الطماطة	5-4
84	تأثير التراكيز المختلفة للمبيد الإحيائي Verox وأوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs في تثبيط فقس بيوض ديدان تعقد الجذور <i>Meloidogyne</i> <i>spp.</i> مختبرياً	6-4
86	تأثير التراكيز المختلفة للمبيد الإحيائي Verox وأوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs في هلاك يافعات الطور الثاني لديدان تعقد الجذور <i>Meloidogyne spp.</i> مختبرياً	7-4

89	إختبار التضاد بين المبيد الإحيائي Verox والمبيد الكيميائي Velum Prime في أطباق بتري	8-4
90	نتائج إختبار كفاءة المبيد الإحيائي Verox وأوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs على بعض معايير النمو للأصناف المدروسة حقلياً	9-4
94	نتائج مكافحة ديدان تعقد الجذور. <i>Meloidogyne spp.</i> على الهجن الوراثية المنتخبة لنبات الطماطة حقلياً	10-4
99	متبقيات المبيد الإحيائي Verox في التربة المعاملة	11-4
101-100	الإستنتاجات والتوصيات	خامساً
100	الإستنتاجات	1-5
101	التوصيات	2-5
147-102	المصادر	سادساً
102	المصادر العربية	1-6
105	المصادر الأجنبية	2-6
148	الملاحق	سابعاً
148	ملحق 1	1-7

## قائمة الجداول

الصفحة	عنوان الجدول	التسلسل
35	الأجهزة والأدوات المستخدمة في البحث	1
36	المواد المستخدمة في البحث	2
38	البيانات الخاصة بمناطق المسح الحقلية للكشف عن تواجد ديدان تعقد الجذور فيها	3
38	دليل تعقد الجذور المقترح من قبل Taylor و Sasser ( 1978 )	4
45	التسلسل النيوكليوتيدي للبادئات المستعملة بعملية التشخيص الجزيئي لديدان تعقد الجذور	5
45	الظروف المثلى لتفاعل البلمرة المتسلسل للبادئات المستخدمة في تشخيص ديدان تعقد الجذور	6
48	البيانات الخاصة بالهجن الوراثية لنبات الطماطة غير محدودة النمو	7
55	البادئات المستخدمة للكشف عن جينات المقاومة Mi-genes والبيانات الخاصة بأحجامها الجزيئية المتوقعة في أصناف الطماطة المنتخبة من الإصابة بديدان تعقد الجذور	8
55	الظروف المثلى لكل بادئ من البوادئ المستخدمة في التجارب للكشف عن جينات المقاومة في تفاعل البلمرة المتسلسل	9
56	مكونات عدة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR والاضافات التابعة للتفاعل	10
65	النسبة المئوية لإصابة حقول الطماطة وشدة إصابتها بديدان تعقد الجذور في مناطق الدراسة المشمولة بالمسح	11
68	الخواص الفيزيائية والكيميائية للتربة ضمن مناطق المسح الحقلية في محافظة كربلاء	12
71	أنواع ديدان تعقد الجذور ونسبة تكرار كل نوع في حقول الدراسة المشمولة بالمسح الحقلية	13
77	متوسط عدد الاثاث واليافاعات في الجذور وعدد اليافاعات والذكور في التربة بالإضافة الى دليل العقد ومعامل التكاثر للهجن الوراثية لنبات الطماطة الملوثة بديدان تعقد الجذور بعد شهرين من العدوى	14

86	تأثير تراكيز مختلفة للمبيد الإحيائي Verox وأوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs على فقس بيوض ديدان تعقد الجذور مختبرياً	15
89	تأثير تراكيز مختلفة للمبيد الإحيائي Verox وأوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs على هلاك يافعات الطور الثاني لديدان تعقد الجذور مختبرياً	16
91	تأثير استخدام المبيد الإحيائي Verox وأوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs على الوزن الرطب والجاف للمجموع الخضري لأصناف الطماطة المدروسة	17
93	تأثير استخدام المبيد الإحيائي Verox وأوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs على الوزن الرطب والجاف للمجموع الجذري لأصناف الطماطة المدروسة	18
97	تأثير استخدام المبيدات على عدد العقد الجذرية من الإصابة بديدان تعقد الجذور لأصناف الطماطة المدروسة	19
98	تأثير استخدام المبيدات على درجة الإصابة من ديدان تعقد الجذور لأصناف الطماطة المدروسة	20

## قائمة الاشكال

الصفحة	العنوان	رقم الشكل
15	المقارنة بين النمط المقاوم والحساس على الكروموسوم 6 في نبات الطماطة	1
21	خطوات تفاعل البلمرة المتسلسل PCR	2
23	رسم تخطيطي لجينات المقاومة Mi-1.1 و Mi-1.2	3
24	رسم تخطيطي لجينات Mi-1 و Mi-1.1 يوضح المواضع النسبية لبادئ الانترون .	4
34	التركيب الكيميائي لمادة Flupyram المادة الفعالة للمبيد الكيميائي Velum Prime	5
41	مزرعة نقية من ديدان تعقد الجذور على نبات الطماطة	6
59	طريقة أقماع بيرمان Baermann Funnul لإستخلاص يافعات الطورالثاني	7
66	أطوارمختلفة من ديدان تعقد الجذور بعد فحصها مجهرياً من العينات المصابة ضمن مناطق المسح الحقلية	8
69	النمط العجاني لديدان تعقد الجذور النوع <i>Meloidogyne javanica</i>	9
70	النمط العجاني لديدان تعقد الجذور النوع <i>Meloidogyne incognita</i>	10
72	الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR يظهر الحزمة بحجم 720 bp الناتجة من تضخيم المنطقة IGS-2 بين الجينات 5S- 18S للنوع <i>Meloidogyne incognita</i>	11
73	تسلسل تتابعات القواعد النتروجينية للعزلة العراقية MZ314042 مع العزلة الباكستانية JQ806340.1 في بنك الجينات العالمي	12
74	الشجرة التطورية التي تبين صلة القرابة بين تتابعات العزلة العراقية والعزلات العالمية اعتماداً على تتابعات النيوكلووتيدات المسجلة في البنك العالمي NCBI وفق برنامج Mega6	13
78	تصبغ جذور الهجن الوراثية لنباتات الطماطة بصبغة الفوكسين الحامضية بعد شهرين من العدوى ب (50±1500 بيضة ويافعة/ أصيص)	14

79	جذور الهجن الوراثية لنباتات الطماطة بعد شهرين من العدوى بديدان تعقد الجذور بمعدل $50 \pm 1500$ بيضة ويافعة / أصيص	15
80	نسب الانبات للهجن الوراثية لنباتات الطماطة	16
81	محتوى الكلوروفيل الكلي للهجن الوراثية لنباتات الطماطة	17
82	الترحيل الكهربائي لنواتج تضخيم جين Mi2.3 على هلام الاكاروز (3%) في دارئ TBE بفولتية مقدارها 3 فولت/سم <sup>2</sup> والمصبوغ بصبغة الأحمر السليم والمفحوص تحت الاشعة فوق البنفسجية	18
84	الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR للكشف عن جينات المقاومة المحمولة على الكروموسوم 6 باستخدام البادئ المتخصص Mi2.3 والبادئ غير المتخصص Mint	19
88	تأثير المبيدات المستخدمة على هلاك يافعات الطور الثاني لديدان تعقد الجذور مختبرياً	20
99	متبقيات المبيد الإحيائي من التربة المعاملة في أطباق بتري	21

## أولاً : المقَدِّمة Introduction

تتبع الطماطة *Solanum lycopersicum* L. إلى العائلة الباذنجانية (Solanaceae): (Family) ، وتعد ثاني أكثر محصول إستهلاكاً بعد محصول البطاطا سواء للإستخدام المحلي أم للتصدير ، موطنها الأصلي سلسلة جبال الإنديز في أمريكا الجنوبية ومنها إنتشرت إلى أوروبا ، تعد الصين المنتج الرئيسي للطماطة إذ يشكل إنتاجها حوالي 31% تليها الهند والولايات المتحدة الأمريكية (Navyashree واخرون، 2020) . تزرع الطماطة في جميع أنحاء العالم بإنتاج سنوي قدر ب 182 مليون طن ضمن مساحة قدرت ب 4.8 مليون هكتار (FAO، 2017) ، وفي العراق وصلت المساحة المزروعة بمحصول الطماطة لسنة 2020 حوالي 127917 دونم وبمعدل إنتاجية بلغ 754760 طن، وفي محافظة كربلاء بلغ معدل الإنتاج 14990 طن ضمن مساحة 2332 دونم (الجهاز المركزي للإحصاء ، 2020) .

صنفت الطماطة سنة ( 1754 م) من قبل ميلر *Solanum esculentum* ثم أُعيد تسميتها سنة 1990 من قبل Child و Peralta على إنها *Solanum lycopersicum* ( Diez و Nuez ، 2008 ) . لثمار الطماطة قيمة غذائية عالية لإحتوائها على العديد من الفيتامينات مثل A و C وعناصر معدنية مثل الحديد والفسفور فضلاً عن إحتوائها على مضادات الأكسدة بما في ذلك الليكوبين الذي يقلل من الإصابة بالسرطان (Rakha واخرون ، 2011) . يصاب محصول الطماطة بمختلف مناطق العالم وعلى مدار فصول السنة بأكثر من مسبب مرضي تسببه مجموعة من الفطريات والبكتريا والفايروسات فضلاً عن آفات أخرى منها نيماتودا تعقد الجذور. *Meloidogyne* spp (Singh واخرون ، 2017). سجلت أول إصابة بديدان تعقد الجذور RKN على نبات الطماطة نهاية القرن التاسع عشر في إيطاليا ونسب المرض الى *Heterodera radicolica* الاسم السابق لنيماتودا *M.javanica* (Seid واخرون ، 2015). أُعتمدت عدة طرق في تشخيص الأنواع المختلفة لديدان تعقد الجذور RKN ، من أدق الطرق هي التشخيص الجزيئي بإستخدام البصمة الوراثية للحامض النووي DNA من خلال عزل وتنقية الحامض النووي DNA من البيض أو أحد أطوار دورة حياة النيماتودا بالإعتماد على تفاعل البلمرة المتسلسل PCR للتمييز بين أنواع النيماتودا المختلفة وبإستخدام بادئات متخصصة وغير متخصصة (Cunha واخرون، 2018) .

تؤثر ديدان تعقد الجذور RKN على صحة النبات ونموه وتحت على تكوين خلايا عملاقة في منطقة الجذور، يسفر عنها إنخفاض في تغذية النبات وإمتصاص الماء مع إنخفاض في معدل البناء الضوئي يصاحبها ظهور أعراض على المجموع الخضري مثل الذبول والتقزم والإصفرار (Seebold ، 2014) . يمكن الحد من هذه الأضرار عن طريق خفض الكثافة العددية لديدان تعقد الجذور RKN في التربة إلى ما دون مستوى الضرر الاقتصادي بإتباع طريقة أو أكثر من وسائل المكافحة ، أستخدمت قديماً العديد من المبيدات الكيميائية Chemical Pesticides للسيطرة على ديدان تعقد الجذور RKN وعلى الرغم من كفاءة المواد الكيميائية بالمكافحة لكن تأثيرها السلبي على الإنسان والبيئة وسميتها للكائنات غير المستهدفة ومدة بقائها الطويلة وإرتفاع تكاليفها أدى إلى الحظر التام أو التقييد من إستخدام هذه المبيدات (Chakraborty و Sukul، 2013). لذلك كان لا بُدَّ من البحث على وسائل بديلة فعالة وآمنة للبيئة وغير مكلفة في الوقت نفسه مثل المكافحة البيولوجية Biological Control والتي حظيت بإهتمام واسع وتعني إستخدام الكائنات الحية أو منتجاتها لإزالة أو تقليل الأضرار الناجمة عن الآفات كإستخدام الفطريات المضادة والبكتريا ومن المعروف أن عدد كبير من أجناس *Rhizobacteria* أهمها *Bacillus* ، *Agrobacterium* ، *Streptomyces* ، *Pseudomonas* تعمل على تقليل الكثافة العددية للنيماتودا وعند إستخدامها في المكافحة الحيوية أعطت نتائج فعالة (Mahmood و Siddiqui، 1999) .

في السنوات الأخيرة أسهمت جزيئات النانو Nanoparticles كسماد لإدارة النيماتودا وتتميز هذه المواد النانوية التي يقل حجمها عن 100 نانومتر بإنها أكثر حماية للبيئة وعليه تحد من التلوث لكنها مكلفة (El-Sherif و اخرون ، 2019 ، Chaudhary و اخرون ، 2021) .

تعد الأصناف المقاومة لنباتات الطماطة طريقة اقتصادية وأمنة بيئياً للتحكم بديدان تعقد الجذور RKN وتقليل أضرارها على النبات ، اكتشف جين المقاومة Mi في الطماطة البرية من خلال الإنقاذ الجيني من قبل Smith (1944) وتم إدخاله الى الطماطة التجارية ويتم تحفيز هذا الجين في المراحل المبكرة بعد أسبوعين من الإنبات في أوراق وجذور نباتات الطماطة (De Ilarduya و اخرون ، 2001 و El-Sappah و اخرون ، 2019) .

أكتسبت الأصناف المقاومة Resistant Varieties لنباتات الطماطة التوجه نحو استخدام المقاومة الجينية كوسيلة ناجحة للسيطرة على ديدان تعقد الجذور RKN وتقليل كثافتها وأعدادها في التربة والوصول إلى صفات نباتية مرغوبة على درجة عالية متخصصة لذا هدفت هذه الدراسة إلى إجراء مسح ميداني لبعض حقول الطماطة في محافظة كربلاء ومعرفة مدى تأثرها من الإصابة بديدان تعقد الجذور RKN ، فضلا عن التحري عن جينات المقاومة لبعض أصناف الطماطة المعتمدة في الزراعة والوصول إلى برنامج مكافحة متكامل للسيطرة على مرض ديدان تعقد الجذور RKN.

## محاور البحث :-

- 1- إجراء مسح ميداني لعدة مناطق في محافظة كربلاء لحقول الطماطة التي شملت (ناحية الحسينية ، الأبراهيمية ، خان الربع ، الجدول الغربي ، ناحية عون ، ناحية الحر ، قضاء طوريج ، مزارع العتبة العباسية) للتعرف على الإصابة بديدان تعقد الجذور وحساب النسبة المئوية للإصابة وشدتها .
- 2 - تشخيص ديدان تعقد الجذور مظهرياً وجزئياً.
- 3 - تقييم حساسية بعض الأصناف للإصابة بديدان تعقد الجذور .
- 4 - التحري عن جينات المقاومة في بعض الأصناف المعتمدة باستخدام التشخيص الجزئي .
- 5 - إختبار تأثير بعض الجسيمات النانوية وبعض المبيدات الاحيائية في مقاومة ديدان تعقد الجذور .

## ثانياً : مراجعة المصادر Literature Review

### 2-1- الـنيماتودا (Nematodes)

كلمة نيماتودا مُشتَقَّة بالأصل من كلمتين إغريقيتين هما : Nema وتعني خيط ، وكلمة eidos وتعني شبيه ، عرفت هذه الكائنات الحية بالديدان الخيطية ولأن تعرف بالديدان النيماتودية وأحياناً تسمى الديدان الثعبانية ، إلا أن التسمية الأخيرة ليست صحيحة لأنَّه ليس لجميع أنواع الـنيماتودا حركة ثعبانية ، تنتمي هذه الديدان إلى المملكة الحيوانية شعبة الـنيماتودا ثاني أكبر مجموعة بعد الحشرات من حيث العدد والتنوع ، توجد الـنيماتودا في كل بيئة تتوفر فيها أسباب الحياة وتفتقر إلى الجهاز التنفسي والدوران ويغطي جسمها غشاء مائي رقيق وتقسّم إلى ثلاثة مجاميع رئيسية وهي نيماتودا الانسان والحيوان ، ونيماتودا البحار والمحيطات ، ونيماتودا الترب والمياه المعدنية وتكون الأخيرة على قسمين هما : الـنيماتودا الحرة والـنيماتودا المتطفلة على النباتات ، تختلف الـنيماتودا الحرة عن المتطفلة في أنها متباينة التغذية فمنها ما يتغذى على الفطريات أو البكتيريا أو نواتج التحلل البكتيري أو الطحالب أو قد تكون مفترسه ، أما الـنيماتودا المتطفلة على النباتات فتعد جميعها إجبارية التطفل سواء أكان على المجموع الجذري أم الخضري وتضم أكثر من 4100 نوع (الحازمي ، 1992 والحازمي ، 2009) . من أهم أجناس الـنيماتودا المتطفلة على النبات وأكثرها خطورة على المجموع الجذري جنس *Meloidogyne spp.* (Agrios ، 2005) . ويصنف هذه الجنس من قبل (Ley و Decraemer ، 2006).

Kingdom ... Animalia

Phylum ... Nematoda

Class ... Chromadorea

Sub class ... Chromadoria

Order ... Rhabditida

Sub order ... Tylenchina

Super Family ... Tylenchoidea

Family ... Meloidogynidae

Genus ... *Meloidogyn*

Species ... *incognita*

## 2-2- ديدان تعقد الجذور Root-knot Nematode وأهميتها الاقتصادية

طفيليات داخلية إجبارية مستقرة تنتمي إلى رتبة Rhabditida وتعد من أهم مجموعات النيماتودا المتطفلة على النباتات ( Plant-parasitic nematodes ) ، أسم *Meloidogyne* من أصل يوناني وتعني أنثى كمثرية الشكل (Moens واخرون ، 2009 و Jones واخرون ، 2013) . وتُعرف هذه الديدان بإسم ديدان تعقد الجذور لأنها تهاجم جذور النبات العائل وتشوه خلايا الجذر الطبيعية مكونة خلايا عملاقة وبالتالي تصبح الجذور مشوهة وتتشكل كتل على سطح الجذور ومن هنا جاء مصطلح نيماتودا تعقد الجذور ( Thakur واخرون ، 2018 ) .

تضم هذه الديدان أكثر من 100 نوع وتصيب أكثر من 3000 نوع نبات ( Hunt و Handoo ، 2009 ) . أول إشارة لديدان تعقد الجذور RKN كانت من قبل Berkeley (1855) إذ لوحظ وجود إنتفاخات Galls على جذور نباتات الخيار في أحد البيوت المحمية في إنكلترا ، أما أول إشارة لوجود ديدان تعقد الجذور في العراق عام 1955 (الأعظمي ، 1955) .

تنتشر ديدان تعقد الجذور RKN في مختلف مناطق العالم ويزداد عددها في التربة في ظل الظروف البيئية المناسبة مما جعلها ضمن أهم مسببات أمراض النبات ، الأنواع الأكثر إنتشاراً وشيوعاً هي *Meloidogyne javanica* و *M.incognita* و *M.hapla* و *M.arenaria* ، أما الأنواع الأكثر إنتشاراً في البلدان الاستوائية فهي *M.incognita* و *M.javanica* ، وفي البلدان الباردة بدرجة حرارة أقل من 15م° ، يعد *M.hapla* هو الأكثر إنتشاراً (Ralmi واخرون ، 2016 و Shukla واخرون ، 2018) . سجّل 120 عائلاً نباتياً في العراق يصاب بجنس *Meloidogyne spp.* (أنطوان ، 2014 ) ، وكما ذكر Stephan سنة (1997) إن الأنواع المعروفة في العراق هي *M.incognita* و *M.hapla* و *M.arenaria* و *M.javanica* و *M.thamesi* .

تمر ديدان تعقد الجذور RKN بعدة أجيال في السنة تتراوح من 7-10 أجيال وتختلف مدة الجيل وفقاً للعائل النباتي الحساس ودرجة حرارة التربة ونوع نسجة التربة إذ تكون أسرع في الترب الرملية الخفيفة ، وتستغرق دورة حياتها 20 – 25 يوماً في الترب التي تكون درجة حرارتها 27 م° ، وتطول مدة بقائها في العوائل المحتملة غير

الحساسية في غضون 4 - 8 أسابيع (Taylor و Sasser ، 1978) . تتكون دورة حياتها من البيضة وأربع أطوار يافعة والطور البالغ من الذكور والإناث ، تضع الأنثى البالغة البيض في كتل جيلاتينية داخل أنسجة الجذور أو على بقايا النبات ثم تحدث عملية إنسلاخ داخل البيضة ويتكون الطور اليرقي (اليافعي) الأول (J<sub>1</sub>) بعدها تفقس البيوض وتخرج يرقات الطور اليرقي (اليافعي) الثاني (J<sub>2</sub>) ، ثم ينسلخ الطور اليرقي (اليافعي) الثاني إلى الطور اليرقي (اليافعي) الثالث (J<sub>3</sub>) ، ثم الطور اليرقي (اليافعي) الرابع (J<sub>4</sub>) ، وأخيراً الطور البالغ من الذكور أو الإناث ، الأنثى في مرحلة الطور اليافعي الثالث والرابع لا تتغذى أما الإناث الناضجة فتستمر بالتغذية وتستقر في جذور النبات بشكل دائم داخل مواقع التغذية (الخلايا العملاقة) والذكور تهجر ولا تتغذى على النبات إذ تبقى حرة في التربة ، وأهم الأطوار في دورة حياتها هو يافعات الطور الثاني J<sub>2</sub> لأنها المسؤولة عن إحداث الإصابة في النباتات وينجذب إلى جذور النبات العائل نتيجة الإفرازات المنبعثة من جذور النبات بالمقابل تفرز يافعات الطور الثاني J<sub>2</sub> أنزيمات مثل (Amylase ، Chitinase ، Pectinase ، Cellulose ، Beta-cloxidase) تحلل جدار الخلايا النباتية لتسهيل من إختراقها لجذور العائل النباتي عن طريق وخز الرمح في نسيج البشرة إذ تدخل مقدمة رأسها داخل الجذر وتبدأ بحركات متتالية بمساعدة الرمح ثم تتجه إلى منطقة الإستطالة ومن ثم إلى منطقة الحزم الوعائية وبعد اختراقها جذور العائل النباتي وداخل الأسطوانة الوعائية تستقر وتنشئ موقع تغذية دائم مكونه خلايا عملاقة Giant Cells بعد سحب الماء والمغذيات من العائل النباتي (Castagnone-sereno واخرون ، 2013 و Jones واخرون ، 2013 و Karssen واخرون ، 2013) . أشار Palomares-Rius واخرون (2017) إن الخلايا العملاقة تخضع لإنقسامات نووية متكررة قد تكون أكبر من الخلايا العادية ب 300 مره مؤدية إلى تضخمها مقابل ذلك يحدث إنحلال جزئي لجدار خلية العائل النباتي وإندماج البروتوبلاست .

تكون الذكور دودية الشكل في التربة ويتراوح طولها بين 1.2 - 1.5 ملم ، أما الإناث البالغة كمثريه الشكل ذات لون أبيض لؤلؤي ويصل طولها إلى 3ملم وعرض 0.27 - 1.75 ملم (الحازمي ، 2009 و Navyashree واخرون ، 2020) . الأنزيمات التي تفرزها ديدان تعقد الجذور RKN في مواقع التغذية تكون من الغدد اللعابية الثلاث للمريء ويتم حقنها في الخلايا النباتية حيث الغدتان تحت المركزية منها تفرز إنزيمات تسمح بإختراق يافعات الطور الثاني J<sub>2</sub> (Nguyen واخرون ، 2018) .

تعد هذه الديدان من أهم مجموعات الديدان المتطفلة على مختلف النباتات (Plant-parasitic nematodes) وتعود أهميتها إلى عدة عوامل أهمها : إنتشارها الواسع في مختلف مناطق العالم ومداه العائلي الكبير ، كذلك إشتراكها مع الأحياء الدقيقة في التربة وبالتالي إحداث أمراض نباتية مركبة ، فضلاً عن كسر صفة المقاومة لبعض الأصناف النباتية وأضعاف النباتات وتهيئتها للإصابة بأمراض ثانوية (الحازمي واخرون، 2010 و Qiao واخرون ، 2013) . وتعد الأنواع الأكثر خطورة وإنتشاراً التابعة لجنس *Meloidogyne* هي *M.arenaria* و *M.javanica* و *M.incognita* و *M.hapla* إذ تشكل أكثر من 95 % من مجموع حالات الإصابة ( أبو غربية ، 2010 ) ، وهناك العديد من الأسباب التي تؤدي إلى قلة توفر المعلومات حول الأهمية الإقتصادية لديدان تعقد الجذور RKN وبمختلف مناطق العالم منها نقص الوعي العام حول هذا المرض وتأثيره على إنتاج المحاصيل والتغاضي عنه ، كذلك النقص الحاد في الموارد البشرية لأطلاق مشاريع واسعة تقدر تأثيرات مرض ديدان تعقد الجذور RKN ، بالإضافة إلى قلة توفر الخيارات البديلة حول مكافحة ديدان تعقد الجذور RKN على المحاصيل والتركيز فقط على المبيدات الكيميائية المكلفة مادياً مما عكس صورة إيجابية لإنتشار الديدان المتطفلة ، وبشكل عام هنالك معلومات محدودة عن تأثيرات ديدان تعقد الجذور على مختلف المحاصيل في العراق وتشكل تهديد خطير للكثير من المشاريع في دول العالم ومنها المشروع الدولي (IMP) International Meloidogyne Project (Coyne واخرون ، 2006 و DeWaele و Elsen ، 2007) .

تعود إصابة نباتات الطماطة بنيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne spp.* إلى نهاية القرن التاسع عشر في حدائق البافيا في إيطاليا ونسب المرض إلى *Heterodera radicola* الأسم السابق لديدان تعقد الجذور RKN ، خلال نفس الفترة لوحظت أعراض مماثلة على جذور نباتات الطماطه في ألاباما (الولايات المتحدة الأمريكية) (Seid واخرون ، 2015) . أشار Sikora و Fernandez (2005) ان الأضرار التي تلحقها ديدان تعقد الجذور RKN على مختلف المحاصيل تصل إلى 80% في الحقول الموبوءة وبمختلف مناطق العالم وقد تصل الخسائر بصورة عامة إلى 173 مليار دولار على مستوى العالم (Elling ، 2013) .

إصابة نباتات الطماطة بالديدان تفسح المجال للعدوى البكتيرية أو مسببات الأمراض الفطرية أو الأمراض الفيروسية المنقولة والتي تؤدي إلى تفاقم تدهور النبات مما تسهم في زيادة الخسائر (Noling، 2014) ، وتم إنفاق مبلغ يقدر بـ 500 مليون دولار للسيطرة على ديدان تعقد الجذور RKN عن مختلف مناطق العالم (Keren-Zur وآخرون ، 2000) . غالباً ما تصل خسائر ديدان تعقد الجذور RKN في الطماطة إلى 100% وقد تقدر الخسارة 100 مليار دولار كل عام في جميع أنحاء العالم (Mukhtar وآخرون ، 2014 و Seid وآخرون ، 2015) . بعض الباحثين إعتَبَرُوا إن النوع *M.incognita* من أكثر مسببات أمراض المحاصيل ضرراً في العالم إذ تسببت الكثافة العددية الأولية للنيماتودا البالغة 4750 نيماتودا لكل 250 سم<sup>3</sup> من التربة في انخفاض محصول الطماطة بنسبة وصلت إلى 61% (Castagnone-Sereno و Danchin ، 2014 و Janati وآخرون ، 2018) .

## 2-2-1- أعراض الإصابة بديدان تعقد الجذور Symptoms of

### *Meloidogyne spp.*

تتمثل أعراض الإصابة بديدان تعقد الجذور RKN لمختلف النباتات المصابة على المجموع الخضري فوق سطح التربة بالتقزم والذبول المبكر والبطيء وإصفرار أوراق النبات فضلاً عن قلة النشاط وإنعدام الأزهار ورداءة الثمار وتميل الجوانب السفلية للأوراق إلى اللون الأرجواني مشابهاً لنقص عنصر الفسفور وفي الطماطة تظهر شحوب بالأوراق مشابهه لنقص عنصر النيتروجين أما أعراض الإصابة تحت سطح التربة تتمثل بالعقد والإنتفاخات على المجموع الجذري وعليه تقلل من قدرة النبات على إمتصاص الماء والعناصر وضعف عام بالجذور وهذا بدوره يزيد الفرصة لدخول المسببات المرضية الأخرى مثل الفطريات والبكتريا وتظهر الجذور المصابة بمظهر خشن ومتعرج ويختلف حجم وعدد العقد باختلاف شدة الإصابة المعتمدة على المسبب والعائل النباتي والظروف البيئية (Rahman ، 2003 و Mohiddin و Khan ، 2014 و Wann وآخرون ، 2016) . تظهر جذور نباتات الطماطة المصابة بالديدان درجات متفاوتة من الضرر بالإعتماد على الكثافة العددية للنيماتودا في التربة وغالباً ما تؤدي إلى تساقط الأوراق وذبولها وبالتالي تسبب تلف وموت النبات بأكمله عند الإصابة الشديدة (Abawi و Mai ، 1987) .

العقد والانتفاخات على جذور النباتات المصابة بديدان تعقد الجذور RKN يمكن رؤيتها بسهولة وتكون بأحجام مختلفة منها ما يصل حجم العقد إلى بضع سنتيمترات أو قد تكون صغيرة بقطر 1-2 ملم وتكرر الإصابة على طول الجذر محوله إياه إلى الشكل الصولجاني (Clubbingappearance) وهذه الأعراض تكون أكثر إنتشاراً في المناطق الإستوائية الدافئة مقارنة في المناطق المعتدلة والباردة (Williamson و Hussey ، 1996 و Trudgill و Blok ، 2001) .

الانتفاخات والعقد على الجذور تسمى Galls وتحتوي هذه العقد على الخلايا العملاقة والتي يكون حجمها عشرة أضعاف حجم الخلايا الطبيعية تعمل بمثابة جسور إنتقال تزود النيماتودا بالمواد الغذائية اللازمة لنموها وتكاثرها مؤدية إلى تغييرات فسيولوجية وبيوكيميائية ، وتوقف إمداد النبات بالماء والعناصر الغذائية وبذلك تحدث أضرار جسيمة للنبات ، وهناك كائنات أخرى تسبب مثل تلك الانتفاخات على المجموع الجذري والتي تسببها بكتريا Rhizobium على جذور العائلة البقولية ويمكن التمييز بينهما حيث تكون الانتفاخات التي تسببها البكتريا ضعيفة وتحوي داخلها سائل حليبي وردي إلى بني وتزال بسهولة من الجذر أما الانتفاخات المتسببة عن النيماتودا تكون قوية وازالتها تتطلب تمزيق اللحاء وتنشأ من مركز الجذر (خضير، 1987 و Crow و Dunn، 2005) . تكوين هذه العقد على المجموع الجذري يدفع النبات لتكوين جذور جانبية لإستمرار النبات بالحصول على العناصر الغذائية اللازمة من التربة ، إلا أن هذه الجذور الجانبية تصاب أيضاً بالديدان وتظهر عليها عقد وانتفاخات Galls وهكذا حتى تستنفذ طاقة النبات بأكمله وتتعفن الجذور في نهاية الموسم (Kalra و Pandey، 2003) . وأشار Sasser و Carter (1985) إن التقزم الحاصل بنباتات الطماطة من الإصابة بديدان تعقد الجذور RKN يكون أكثر تأثيراً في الترب الرملية وتبلغ شدته على الشتلات حديثة النمو ربما يؤدي إلى موتها وفي الترب الطينية تكون الإصابة أقل شدة والأعراض أقل وضوحاً. ويعتقد أن إنتاج الإيثيلين مسؤول إلى حد كبير بالتعبير عن الأعراض في الطماطة وقد ثبت أن الديدان مرتبطة إرتباطاً وثيقاً بجذور النبات العائل (Noling، 2010) .

## 2-2-2- خصائص التربة الفيزيائية والكيميائية المؤثرة في إنتشار وتوزيع

### ديدان تعقد الجذور. *Meloidogyne spp.*

من العوامل المؤثرة في إنتشار ديدان تعقد الجذور RKN وكثافتها في التربة منها تركيز أيون الهيدروجين pH ، نسجة التربة ، المادة العضوية ، الظروف البيئية، كما أن توفر ونوع العائل النباتي له دور كبير بتواجد ديدان تعقد الجذور في التربة ، فضلاً عن العمليات الزراعية والتي تؤثر سلباً أو إيجاباً لأن النيماتودا تقضي دورة حياتها كلياً أو جزئياً في التربة ( Stephan ، 1980 و أبو غربية ، 1994 ) .

إن قوام التربة يحدد حجم المسامات البينية بين حبيبات التربة مما يؤثر على أنشطة ديدان تعقد الجذور RKN وحركتها في التربة ، كلما كان حجم المسامات أكبر تكون حركة الديدان أسرع على الرغم من إن معظم الترب الزراعية ذات مسامات تسمح بحركة الديدان ولهذا تفضل ديدان تعقد الجذور RKN الترب الرملية ذات القوام الخشن وعليه يكون الضرر على العائل النباتي أشد في الترب الرملية منها في الترب الطينية الناعمة (الحازمي ، 1992) . أشار عمي والسبع (1988) ان إصابة الطماسة بنيماتودا *Meloidogyne javanica* أعطت أعلى عدد للعقد الجذرية في التربة الرملية المزيجية وأقل نسبة في التربة الطينية ولهذا إستنتج عمي والسبع (1989) ان قوام التربة يؤثر في الكثافة العددية للنيماتودا إذ تزداد أعداد النيماتودا في التربة الرملية الخشنة وتخفض كثافتها في التربة الطينية الناعمة .

تؤثر المادة العضوية على أنشطة ديدان تعقد الجذور RKN في التربة ، إذ بين Radwan واخرون (2004) عند إضافة نشارة خشب أو مسحوق الجت الى التربة خفض من عدد يافعات الطور الثاني  $J_2$  وبالتالي خفض من أعداد العقد الجذرية على جذور نبات الطماسة .

أما درجة حموضة التربة أو قاعديتها فتؤثر في فقس بيوض ديدان تعقد الجذور RKN وبالتالي تؤثر على معدل اختراق يافعات الطور الثاني  $J_2$  ووجد Stephan (1980) إن إصابة العوائل النباتية بديدان تعقد الجذور RKN ترتفع عندما يكون تركيز أيون الهيدروجين (pH) 6.5 وتقل كثافة ديدان تعقد الجذور وإنتشارها في التربة عند إرتفاع أو إنخفاض pH عن هذا الرقم ، وكما أشار Wagh واخرون (2015) ان درجة حموضة التربة بين ( 0.05 - 0.727 ) تؤثر سلباً على كثافة

النيماتودا ، وبين Guzmán-Plazola واخرون (2006) أن نباتات الطماطة المصابة بديدان تعقد الجذور *M.javanica* و *M.arenaria* و *M.incognita* ارتفعت في التربة التي درجة الحموضة فيها معتدلة إلى قليلة نسبياً ونسبة عالية من الرمل إلى متوسطة أما محتوى الطين كان منخفضاً .

### 3-2- طرق تشخيص ديدان تعقد الجذور Identification of

#### *Meloidogyne spp.*

تعدّ ديدان تعقد الجذور RKN من أكثر الأحياء الممرضة للنبات تعقيداً لصغر حجمها والتشابه المورفولوجي لعدد كبير منها وتشابه العلامات المتداخلة المميزة لها فضلاً عن قياساتها المورفومترية ما زاد من صعوبة تصنيفها ، كما إن دورة حياتها وكثرة أنواعها وتعدد عوائلها جعل التصنيف صعباً خصوصاً لمستوى النوع (Ye واخرون ، 2015 و Christoforou واخرون ، 2017) . ويعد الجمع بين الطرق التشخيصية ضرورياً لإعطاء وصف دقيق وواضح لأنواع وسلالات مختلفة لديدان تعقد الجذور RKN من أجل الوصول إلى طريقة مكافحة فعالة ، وأكثر هذه الطرق استخداماً هي الطريقة المورفولوجية والطريقة البايوكيميائية ، أما أدق وأحدث طرق التشخيص المستخدمة والتي أثبتت نجاحاً بالأونة الأخيرة هي التشخيص الجزيئي باستخدام البصمة الوراثية DNA ( Carneiro واخرون ، 2016 ) .

تعتمد طريقة التشخيص المورفولوجي ( المظهري ) Morphological Identification على الاختلافات المظهرية والتشريحية لديدان تعقد الجذور RKN والتي يمكن مشاهدتها تحت المجهر الضوئي أو الإلكتروني مثل طول الجسم ، شكل الذيل ، شكل الرمح ، شكل الرأس ، اليافعات والذكور ، الفتحة الاخراجية ، تخطيط النمط العجاني في مؤخرة جسم الاناث الناضجة ، وجود أو عدم وجود الأعضاء الفازميديّة Phasmids وكذلك مشاهدة الأطوار داخل أنسجة الجذور كالطور اليافعي الثاني J<sub>2</sub> وطور البالغات وتعد هذه الطريقة غير مكلفة كما إنها توضح صيغة العلاقة الوظيفية والتشريحية بين النيماتودا والنسيج النباتي فضلاً عن النتائج واعتمادها بالمسوحات الخاصة بالكثافة العددية للنيماتودا المتطفلة على النبات لكنها تحتاج الى مهارة وخبرة وتستهلك وقتاً طويلاً ( Eisenback و Van و Karssen ، 2001 و Hunt ، 2009 و Carneiro واخرون ، 2017 و Boros واخرون ، 2018 ) .

أما بالنسبة لطريقة التشخيص البايوكيميائي Biochemical Identification تقسم إلى قسمين هما طريقة فصل البروتين Isozyme وطريقة الأجسام المضادة Antibodies ، استخدمت الأنماط الظاهرية لفصل البروتين عام 1985 للتمييز بين أنواع *Meloidogyne spp.* ، تستغرق العملية بأكملها من ثلاث إلى أربع ساعات ويعتبر أنزيم Carboxylesterase الأكثر فعالية ومن عيوب هذه الطريقة تستخدم حصراً للإناث الناضجة أما طريقة الأجسام المضادة فتعتمد على جسم مضاد يتعرف على النيما تودا ثم يضاف الجسم المضاد الثانوي ويتم التقاط النيما تودا بنسبة نجاح تصل إلى 80 % (Chen) و اخرون 2003 و Blok و Powers و 2009 ، و Janssen و اخرون ، 2016) .

### 2-3-1- التشخيص الجزيئي لديدان تعقد الجذور Molecular Identification of *Meloidogyne spp.*

إن صعوبة التشخيص المورفولوجي للديدان دفع الباحثين بالتوجه إلى التشخيص الجزيئي لتحديد العديد من الأجناس النيما تودية المتطفلة على النبات (Oliveira و اخرون ، 2011) . إذ وفرت هذه التقنية تشخيصاً دقيقاً للأنواع وبالتالي إتخاذ الخطوات الناجحة في عمليات مكافحة فضلاً عن كونها خالية من الأخطاء التي تحدث في التشخيص المورفولوجي (Michalakis و اخرون ، 2017) . تعد طريقة التشخيص الجزيئي من أحدث طرق التشخيص المستخدمة مقارنة بالطرق المظهرية والبيوكيميائية ، وخاصة في الآونة الأخيرة إذ أصبحت أكثر شيوعاً حتى في البلدان النائية ومن المتوقع أن يتم تطوير هذه التقنية كل عام مع توسع التكنولوجيا الجزيئية وتطويرها ، تم تحسين التشخيص الجزيئي للديدان في العقد الماضي بتطوير تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR) وما يميز التشخيص الجزيئي إنه يمكن استخدام البيوض أو الياضعات أو حتى الإناث البالغة أو الذكور في التشخيص وتتضمن هذه الطريقة عدة أساليب منها تضاعف مناطق محددة من الحامض النووي Sequence Characterized Amplified Region (SCAR-PCR) ، التضاعف المتعدد الأشكال للحامض النووي المنقوص الأوكسجين Random Amplified Polymorphisms DNA (RAPD) ، التباين الشكلي لقطع الحامض النووي المنقوص الأوكسجين Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs) ، تضاعف الحامض النووي الرايبوسومي

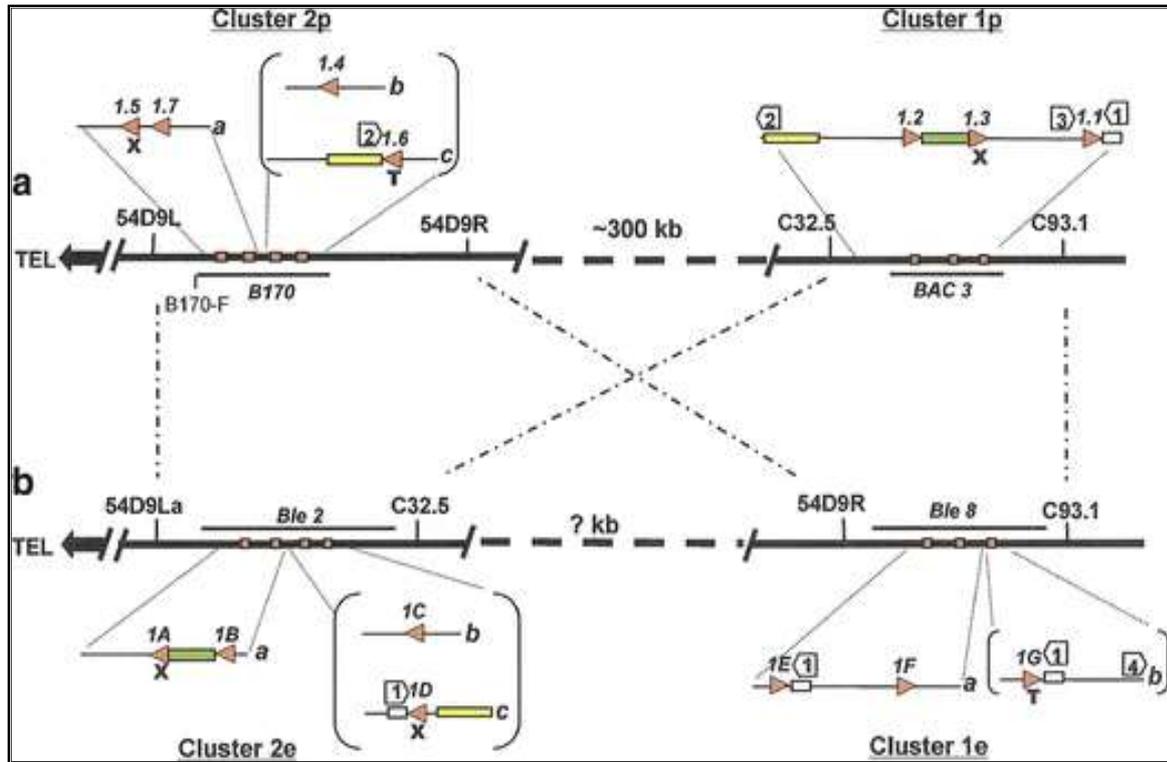
(mtDNA) mitochondrial DNA ، تضاعف ، ribosomal DNA (rDNA) ، Powers و Blok و 2007 ، Adam و 2000 ، Zijlstra) IGS ، ITS ، Oliveira و 2009 ، واخرون ، 2011 و Alemu ، 2014) . الحامض النووي DNA لديدان تعقد الجذور RKN يتألف من مئات من النسخ المترجمة إلى وحدات صغيرة تسمى Small Subunit (SSU) أو تسمى 18S ووحدات كبيرة تسمى Large Subunit (LSU) أو تسمى 28S ( Hillis و Dixon ، 1991 ) .

لوحظ Hasan واخرون ( 2020 ) كفاءة تقانة SCAR-PCR في تشخيص 14 عزلة من ديدان تعقد الجذور RKN التي تصيب محصول الباذنجان في محافظة بابل ، إضافة إلى التشخيص بواسطة النمط العجاني Perineal Pattern ، إذ استخدمت بادئات متخصصة ضمن المنطقة الجينية 18S rDNA بإستخدام البادئ / MelF / MelR Unversial Primer وتوصلت النتائج إلى تسجيل نوع جديد في العراق *M. cruciani* . أشارت الدراسة التي قام بها Ismael و Mahmood (2020) إلى إمكانية تشخيص ديدان تعقد الجذور RKN على نبات الخيار في كردستان العراق بإستخدام تقانة SCAR-PCR حيث تم عزل الحامض النووي DNA من يافعات الطور الثاني والذكور البالغة المعزولة من التربة لديدان تعقد الجذور نوع *Meloidogyne incognita* و *M. javanica* وبأستخدام بادئات متخصصة (AS5R,AS4R,AS5F). وفي دراسة أجراها Ye واخرون (2015) بتشخيص ديدان تعقد الجذور RKN على 51 عزلة من نبات زينة عشبي Turfgrasses في الولايات المتحدة الأمريكية ولاية كارولينا بالإعتماد على تقنية التشخيص الجزيئي إذ استخدمت بادئات متخصصة ضمن المناطق الجينية 18S و ITS و D2/D3 28S وتوصلت النتائج لنوع جديد من ديدان تعقد الجذور *M. marylandi* .

وجد Hu واخرون (2011) من خلال إستخدام ثلاثة أزواج من البادئات الخاصة وزوج واحد من البادئات العامة وبإستخدام تقانة (PCR) تمكن من تشخيص ثلاثة أنواع من ديدان تعقد الجذور *M. incognita* و *M. enterolobii* و *M. javanica* على نبات الطماطة في الصين . كما تمكن حنون واخرون (2018) من خلال إستخدام بادئات متخصصة ضمن المنطقة الجينية 18S rRNA ذات حجم 898bp بالإعتماد على تقانة (PCR) وتم تأكيد تشخيص النوع *Meloidogyne incognita* على أشجار الزيتون في العراق . أشارت الدراسة التي قام بها Rusinque واخرون



و Cluster 2e (Mi-1D ، Mi-1C،Mi-1B،Mi-1A) و Cluster 1p ( Mi-1G ،Mi-1F) ومكمـا  
موضح بالشكل أدناه (1) .



الشكل (1) المقارنة بين النمط المقاوم والحساس على الكروموسوم 6 في نبات الطماطة

\* الخطوط السميكة الأفقية تمثل الكروموسوم 6 في موقع (a) بالأصناف المقاومة ويقابلها الموقع (b) للأصناف الحساسة. المربعات الفارغة تمثل الجينات الكاذبة. T تمثل جينات القطع (1G،1.6). المربعات الحمراء تشير إلى الجينات في الموقع.

توصلت الدراسات السابقة إن الجينات Mi-1A ، Mi-1D ، Mi-1.5 ، Mi-1.3 جينات كاذبة تشترك بفقد جزء أو كل من منطقة الـ 1 مما تسبب بنقص في إطار القراءة المفتوح لبروتين (ORP) ، تعمل هذه الجينات على نخر موضعي للخلايا العملاقة التي تشكلها ديدان تعقد الجذور. *Meloidogyne spp* في جذور النبات حول الطرف الأمامي للنيماتودا في غضون يوم واحد من الإصابة (Ho واخرون ، 1992).

جينات المقاومة Mi تعد من الجينات المستحثة والمنظمة بواسطة حامض الساليسليك اسيد (SA) Salicylic Acid وحامض الياسمين (JA) Jasmonic Acid وتشير النتائج ان ارتفاع مستوى الحامض في النبات المقاوم يؤدي إلى تفاعل فرط الحساسية (HR) Hypersensitive Reaction مسبب موت الخلايا النباتية في موقع الإصابة وبالتالي يخفض من قدرة إنتشار الديدان إلى خلايا الجذور الأخرى

(Loffredo و Molinari ، 2006 و Molinari واخرون ، 2014). أشار كل من Leonetti و Molinari (2020) إلى ان جينات المقاومة تثبط عمل الأنزيم المضاد للأكسدة Glucanase في الجذور المصابة بالديدان الخيطية وتعمل أنزيم Chitinase الدفاعي بالنباتات المصابة .

آلية عمل هذه الجينات تكون وفقاً لنظرية فلور وهو تفاعل جين ضد جين، بعد أن تدخل ديدان تعقد الجذور RKN جذر النبات العائل ( الطماطة ) تنتج جينات تسمى gene (Avr) بالمقابل تتولد جينات في النبات العائل المقاوم Mi ويكون التعبير بينهما غير متوافق وعليه لا تتمكن الديدان من الإختراق واكمال دورة حياتها وعمل مواقع تغذية داخل جذور العائل النباتي مقارنة بالأصناف الحساسة التي لا تحمل مثل هذه الجينات ( Flor ، 1971 و Heath ، 2000 و Bakker واخرون ، 2006 ) .

بين Dervan و Elekcloglu (2004) ان التقانات الجزيئية مثل تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) لها دور فعال للكشف عن جينات المقاومة Mi في أصناف الطماطة الحساسة والمقاومة للإصابة بديدان تعقد الجذور RKN ومعرفة تأثيره على دليل العقد الجذرية . وتوصلت النتائج التي قام بها Bozbuga واخرون (2020) للتحري عن الجينات Mi في 99 تركيب وراثي من أصناف الطماطة إلى تركيب وراثي واحد فقط (Tom113) والذي أظهر رد فعل مناعي ضد ديدان تعقد الجذور النوع *Meloidogyne incognita* .

أكثر الجينات المقاومة إنتشاراً وفعالية في أصناف الطماطة هو الجين المقاوم Mi-1.2 وتم إدخاله في إحدى عشرة صنفاً من أصناف الطماطة المقاومة ، كما إنه يمنح المقاومة لأهم ثلاثة أنواع والأكثر خطورة بين ديدان تعقد الجذور *M. incognita* و *M.javanica* و *M.arenaria* بالإضافة إلى الأنواع الثانوية الأخرى *M.ethiopica* و *M.hispanica* و *M.luci*، كما إنه يمنح المقاومة لحشرة المن *Aphid* على البطاطا والذبابه البيضاء *Bemisia tabaci* وتظهر فعالية هذا الجين بعد 12 ساعة بموت الخلايا ( Mahfouze واخرون ، 2015 و Gabriel واخرون ، 2020 ) . يشفر جين المقاومة Mi-1.2 بروتيناً مفترضاً مكوناً من 1257 من الأحماض الأمينية وبعد هذا البروتين عضو في عائلة البروتينات النباتية المرتبطة بمقاومة الأمراض وتتميز بوجود نيوكليوتيد ملزم ومنطقة تكرار غنية بالحامض الأميني (ليوسين) ذات طرف كاربوكسيلي (Milligan واخرون ، 1998 و Rossi واخرون ،

(1998) . وجد ان الجين Mi-1.2 مرتبط بجين Ty-1 والذي يمنح مقاومة لفايروسات أوراق الطماطة ( Bhavana واخرون ، 2019 ) . تمكّن Yassein و Jabbar (2017) بالكشف عن جين المقاومة Mi-1.2 المسؤول عن ظهور المقاومة ضد نيماتودا تعقد الجذور. *Meloidogyne spp.* في تسع خطوط من الطماطة غير محدودة النمو والملقحة ب 1000 بيضة / 200 غرام تربة وتوصلت النتائج إلى مقاومة نباتات الطماطة للنيماتودا إذ كانت عدد العقد لا تتجاوز العقدة الواحدة مما يدل على مقاومتها لمرض ديدان تعقد الجذور RKN .

أظهرت النتائج تحت ظروف حرارة التربة أقل من 32 م° ان المقاومة بواسطة Mi-3 حدثت في المراحل المبكرة من العدوى بديدان تعقد الجذور RKN وتم التأكد إن هرمونات النبات الرئيسية حامض السالسيك (SA) Salicylic Acid وحامض الياسمين (JA) Jasmonic Acid كان مرتفعاً في المراحل المبكرة من العدوى كما ان أنواع الاوكسجين التفاعلية (ROS) Reactive Oxygen Species كان لها دور إيجابي في مقاومة المرض (Du واخرون ، 2021) . أجرى Abood وYassien (2016) دراسة للتحقق عن جينات المقاومة Mi المسؤولة عن ظهور صفة المقاومة في نباتات الطماطة ضد ديدان تعقد الجذور RKN في 46 سلالة نقية من أصناف الطماطة غير محدودة النمو وأظهرت النتائج إن عشر سلالات من الطماطة النقية مقاومتها لديدان تعقد الجذور بعد 60 يوم من التلقيح ب 5000 بيضة / كغم تربة ، بينما أظهرت 31 سلالة نقية من الطماطة قابليتها للإصابة بديدان تعقد الجذور والتي تجاوزت عدد العقد فيها 100 عقدة .

## 2-5- سلبات جينات المقاومة Mi في نباتات الطماطة

على الرغم من فعالية جينات المقاومة Mi وكفاءتها إلا أن هذه المقاومة لها بعض القيود التي تحد من فعاليتها ، إذ إن زراعة أصناف مقاومة لعدّة سنوات متتالية يزيد من خطر وكثافة النيماتودا على النبات ، لوحظت مثل هذه الحالة في المغرب عند زراعة الصنف المقاوم 3-8 سنوات متتالية ، وفي الولايات المتحدة الأمريكية بعد 5 سنوات على زراعة الصنف المقاوم وايضاً في أسبانيا بعد ثلاث دورات زراعية من زراعة أصناف طماطة مقاومة لديدان تعقد الجذور RKN ، أسباب هذه الظاهرة غير معروفة إلى الآن قد يكون بسبب الظروف البيئية أو تغييرات في النبات أو الديدان وإحياناً قد يعزى السبب إلى ان هذه الأصناف لها نفس منشأ المقاومة ( El-Sappah واخرون ،

2019). البعض من هذه الجينات لاتزال تعمل عند درجات الحرارة العالية لكن البعض يفقد مقاومته عند إرتفاع درجة الحرارة لأكثر من 28 م° كما إن هذه الجينات تمنح المقاومة للنيماتودا ولكن ليس مناعة اذ تؤدي الى تقليل كثافة J<sub>2</sub> على النبات مقارنة بالأصناف الحساسة (Roberts و Thomason ، 1989) ، ويفقد الجين مقاومته عند درجة حرارة عالية 32 م° ما يؤدي الى إصابة عالية (Wubie و Temesgen ، 2019) .

جينات المقاومة Mi تكون واسعة التأثير ضد أنواع مختلفة من ديدان تعقد الجذور RKN في المناطق الاستوائية مثل *M.javanica* و *M.incognita* و *M.arenaria* لكنها لا تؤثر على بعض الأنواع *M.enterolobii* و *M.hapla* و *M.chtiwoodi* (Brito و اخرون ، 2007 و Kiewnick و اخرون ، 2009) . ومن العوامل التي تتغلب على مقاومة أصناف الطماطة لديدان تعقد الجذور RKN حصول طفرات في جينات المقاومة Mi-gene أو فشل في ترجمة الجينات ، كما ان التعبير عن الجينات يتأثر ما إذا كان الجين من نوع متماثل الإليلات Homozygous أو متباين الأليلات Heterozygous (Liharska ، 1998 و Tzortzakakis و اخرون ، 1998 و Perez و Lopez و اخرون ، 2006).

## 2-6- تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase Chain Reaction

تفاعل البلمرة المتسلسل PCR من أكثر الطرق شيوعاً في علم الأحياء الجزيئي الحديث ، ولا يمكن الإستغناء عنه بسبب الدقة والخصوصية والحساسية العالية للكشف عن الحامض النووي DNA ، وصفت هذه التقنية من قبل الأمريكي الحاصل على جائزة نوبل Kary Mullis سنة 1984 ، وطورت سنة 1993 م من قبل Gobind Khorana بإستخدام أثنين من البادئات لتكرار الحامض النووي DNA ، وبواسطة هذه التقنية يمكن فصل قالب الدنا DNA المزدوج الشريط وتتم العملية في المختبر وبدرجات حرارة متفاوتة وخارج الجسم الحي وبوجود بادئات Primer مكملة للقالب Template DNA يمكن مضاعفة الحامض النووي بأعداد غير محدودة وعادة ما يتم تضخيم الحامض النووي DNA حتى 10 كيلوبايت (10 kb) والبعض قد يتضاعف إلى 40 كيلوبايت (40 kb) (Sárosi و اخرون ، 1992 و Bermingham و Luettich ، 2003 و Ye و اخرون ، 2012 و Rajalakshmie ، 2017 و Shaheen و Shahzad و اخرون ، 2020) . يتضاعف جزيء الحامض النووي

DNA المزدوج الشريط إلى نسختين ثم الترجمة إلى أربع ثم ثمانية وهكذا إلى أعداد هائلة وهذه المضاعفة المستمرة تتم بواسطة بروتينات معينة معروفة باسم Polymerases ، لتكوين شريط جديد من الحامض النووي أمام كل شريط قديم بواسطة أنزيم البلمرة Polymerase وتتكرر العملية حتى يتكون عدد كبير من الحامض النووي DNA يصل إلى ملايين النسخ من حامض الدنا ، وبواسطة أنزيم Taq Polymerase والمعزول من بكتريا محبة للحرارة *Thermus aquaticus* يمكن فصل الشريط المزدوج للحامض النووي DNA وبدرجات حرارة عالية تصل إلى 95 م° ، ويتطلب عمل هذه التقنية ، النيوكلويدات منقوصة الاوكسجين الثلاثية الفسفور Deoxynucleosid Triphosphate والمحلول الـ PCR byffer وقالب DNA وجهـاز Thermocycler وأنزيم Taq Polymerase (Erlich) ، 1989 و Gibbs ، 1990 و Morikawa واخرون ، 1994 و Benson واخرون ، 2003 و Stirling و Bartlett ، 2003 .

تطوير تضخيم الحامض النووي DNA بواسطة تفاعل PCR أنتجت فوائد هائلة في تحليل الجينات وكذلك تشخيص العديد من الأمراض الوراثية والكشف عن مسببات الأمراض الفطرية والفايروسية والبكتيرية (Clark و Pazdernik ، 2013) .

## 2-7- مراحل التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا PCR Stage

تفاعل البلمرة المتسلسل PCR يكون على ثلاث مراحل متتابعة في كل دورة من دورات التفاعل ولمدة زمنية معينة وهذه المراحل هي :-

### 1- مرحلة المسخ Denaturation Stage

المرحلة الأولى لتحضير قالب DNA مزدوج السلسلة Double Strand بتكسير الأواصر الهيدروجينية وتسخين خليط التفاعل بين 94 – 98 م° ولمدة 20 – 30 ثانية وتؤدي الحرارة المرتفعة إلى تعطيل الترابط الهيدروجيني لخيطين متكاملين لإنتاج قالب أحادي السلسلة ، وتعتمد على عدة عوامل منها مصدر ونوع DNA وأنزيم البلمرة وظروف التفاعل .

## 2- مرحلة التحام البادئ Primer annealing Stage

تجري هذه المرحلة عند درجة حرارة 50-65 م° ولمدة 20 – 60 ثانية ، ويتم هذا الارتباط عبر روابط الفسفور بين نيوكلوتيدات البادئ و نيوكلوتيدات القوالب أحادية السلسلة ولإستخراج الدرجة الحرارية لتفكك 50% من البادئ عبر معادلة حسابية تحسب درجة الحرارة اللازمة للإلتحام تسمى درجة Melting Temperatures (Tm) وهي الدرجة المناسبة لحدوث الارتباط بين قالب DNA والبادئ .

معادلة Newton و Graham ( 1997 )

$$Tm = 4X ( G + C ) + 2X ( T + A )$$

## 3- مرحلة الإستطالة Primer extension Stage

هذه المرحلة مثالية وتتم عند درجة حرارة 70 – 74 م° ولمدة 5 – 15 دقيقة ، وبعد إرتباط البادئ في المرحلة السابقة ترتبط النيوكلوتيدات منقوصة الاوكسجين ثلاثية الفسفور dNTPs وتكمل قواعد القالب من الطرف الثالث 3' باتجاه الطرف الخامس 5' وتقسم dNTPs إلى أربع أنواع على وفق القواعد النتروجينية والسكر المنقوص الاوكسجين وثلاث مجاميع فوسفات : -

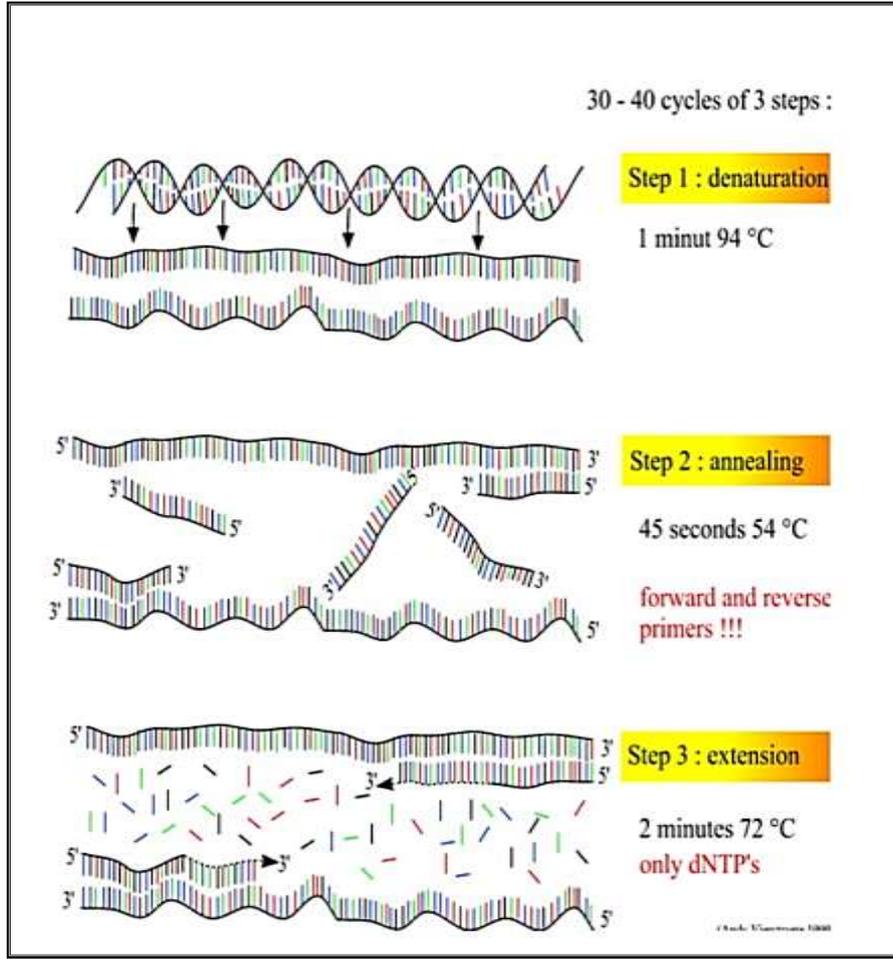
Deoxy-adenosine triphosphate (dATP)

Deoxy Thymosine Triphosphate (dTTP)

Deoxy Guanosine Triphosphate (dGTP)

Deoxycytosine triphosphate (dCTP)

ويؤكد أغلب الباحثين إن زيادة عدد الدورات في هذه المرحلة يؤدي إلى أخطاء محتملة ولذلك فالعدد المنخفض من الدورات يعطي كميات قليلة من الناتج المطلوب وناتج كل دورة يصبح كقالب للدورة اللاحقة وبذلك يزداد عدد النسخ مع عدد الدورات وتصل لأكثر من مليون قطعة بعد أقل من 30 دورة (Saiki واخرون، 1985 وBermingham وLuettich، 2003 وJoshi وDeshpande، 2010 وZádor، 2011 وInnis واخرون، 2012 وDubey، 2018 وShaheen Shahzad واخرون، 2020) .



الشكل (2) خطوات تفاعل البلمرة المتسلسل PCR (Vierstraete ، 1999 )

## 8-2- البادئ The Primer

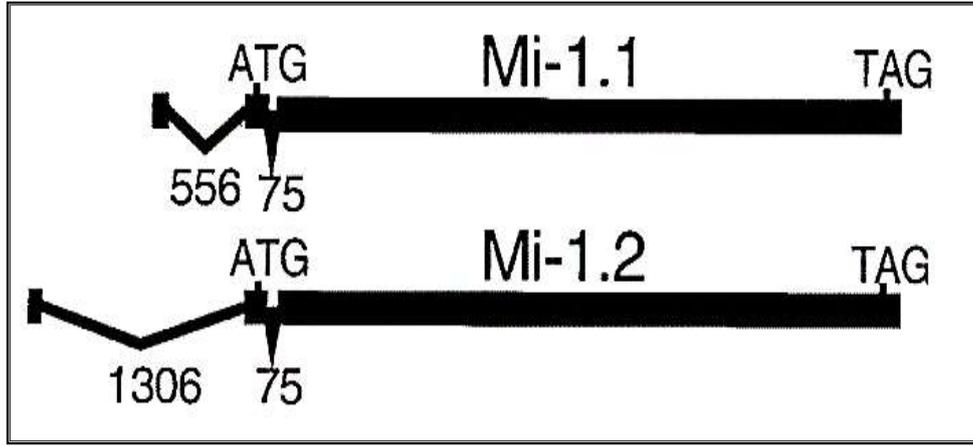
تسلسلات قصيرة من النيوكلووتيدات (Nucleotides) وصممت هذه البادئات لتكون مكملة للمناطق المحيطة بمنطقة إستنساخ DNA أثناء تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) وهذه القطع مصنعة وليست طبيعية ، تتكون البادئات العامة من قطعة واحدة وتعمل على كافة الأنواع أما البادئات الخاصة يكون الشريط المزدوج DNA بعد فصلهما إلى قطعتين أحدهما البادئ الامامي والآخر البادئ الخلفي، ومن أهم الأمور التي يجب تجنبها عند تصميم البادئ لعدم حدوث أي اشكال هو عدم تكامل تتابعاتها مع تتابع بادئات أخرى أو فيما بينها ، تعد البادئات الأطول الأكثر إستقراراً بسبب العدد الأكبر من الروابط الهيدروجينية التي تشكلها مع القالب لكنها مكلفة وتشكل هياكل ثانوية أما البادئات الأقصر على الرغم من تكلفتها المنخفضة فهي معرضة للتصليب خارج المنطقة المستهدفة مما يؤدي إلى منتج غير محدد

ولهذا وجد إن البادئات من 18 – 30 نيوكلوتيد هي الأفضل وتحتوي على نسبة عالية من السائتوسين والكوانين (G+C) Kwok ) وآخرون ، 1990 و Abd-Elsalam ، 2003 و Acinas وآخرون ، 2005 و Vikalo وآخرون ، 2006 و Apte و Daniel ، 2009 ) .

### 2-8-1- البادئ Mi2.3

يقع هذا البادئ ضمن المنطقة الواقعة بين الجينات الوظيفية Mi-1 و Mi1.2 وبالقرب من منطقة أسفل الجين المماثل الكاذب Mi-1.3 في منطقة حجمها 5 كيلوا قاعدة نروجينية وهي لا تشفر البروتين أو تعاني من الحذف والاضافة في تتابع النيوكلوتيدات ، ولكن تتماثل بين الجين Mi-1B والجين الكاذب Mi-1A بنسبة 97 % بأصناف الطماطة الحساسة ، وكشف وجود منطقة تغاير بحجم 57 نيوكلوتيد ظهر فيها الحذف والإضافة (Seah وآخرون ، 2007) .

تمكن Williamson وآخرون (1994) باستخدام البوادئ C1/2 و C2S4 لتضخيم 1600 قاعدة نروجينية في موقع الجين Mi-2.3 ومن خلالها تم تحديد السلالات المقاومة والحساسة ومع هذا لم يتمكن الباحثون من تحديد الأليلات المتماثلة والمتباينة. ثم صممت بوادئ بشكل افضل M23F و M23R لتضخيم منطقة 380 قاعدة نروجينية وتظهر صورة الجين Mi بشكل حزم للحامض النووي تتراوح بين (380 و 430) قاعدة نروجينية والحزم 430 قاعدة نروجينية متماثلة الزيجة للنباتات الحساسة للمرض والحزم 380 قاعدة نروجينية تعد متماثلة الزيجة للنباتات المقاومة للمرض ، أما النباتات الحاوية على الحزمتين (380 و 430) قاعدة نروجينية تعد مقاومة متباينة الزيجة وبذلك أستعمل هذا الزوج للكشف عن صفة المقاومة والحساسية للنباتات وتحديد الأليلات (الزايجوت) المتباينة والحساسة (Elekcioglu و Dervan ، 2004 و Danso وآخرون ، 2011) .



الشكل (3) رسم تخطيطي لجينات Mi-1.1 و Mi-1.2 ، تشير الخطوط الأفقية السمكية الى exons والخطوط العمودية المتعرجة تشير الى introns وعدد النيوكلووتيدات التي تشمل كل إنترون (Milligan وآخرون ، 1998) .

## 2-8-2- البادئ Mint للموقع Intron

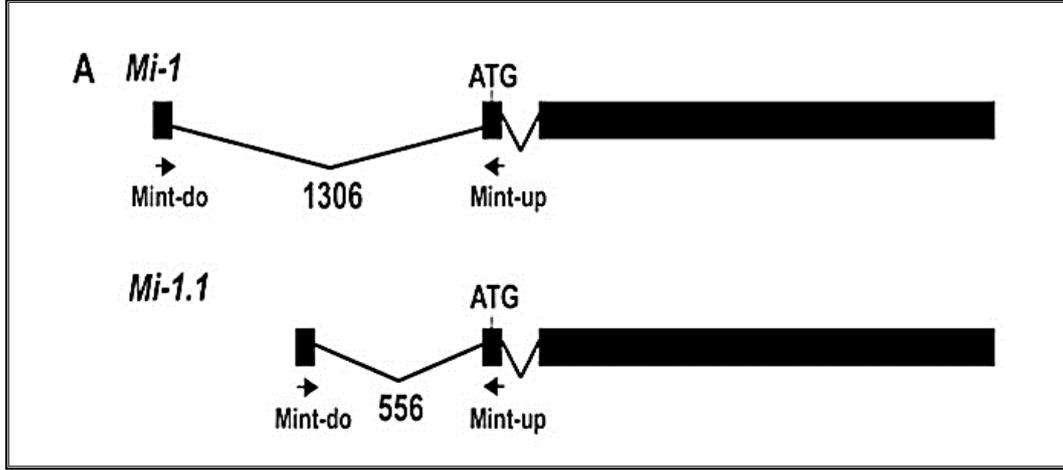
إستخدم هذا البادئ من قبل Jablonska وآخرون (2007) و Cortada وآخرون (2012) للكشف عن مجموعة جينات Mi في نباتات الطماطة الحاملة لهذا الجين والتي تعد مقاومة لمرض ديدان تعقد الجذور RKN حيث تم الكشف عن هذه الجينات من خلال ظهور الحزم بأحجام مختلفة وكما يلي :-

أ- حزم بحجم 622 قاعدة نروجينية للكشف عن وجود جين Mi1.1 كجين للمقاومة والنباتات غير الحاملة له تعد غير مقاومة للمرض لموقع هذا الجين .

ب- حزم بحجم 1186 قاعدة نروجينية للكشف عن الجين Mi-1.4 في النباتات المقاومة وحزم بحجم 981 قاعدة نروجينية في النباتات الحساسة أما العينات الحاملة لكلا الحزمتين فتعد مقاومة متباينة الأليات Heterozygous Resistance .

ج- حزم بحجم 1410 قاعدة نروجينية للكشف عن الجين Mi-1.6 في النباتات المقاومة للمرض وحزم بحجم 1353 قاعدة نروجينية في النباتات الحساسة والعينات الحاملة لكلا الحزمتين تعد مقاومة متباينة الأليات Heterozygous Resistance .

د- حزم بحجم 1373 قاعدة نروجينية للكشف عن الجين Mi-1.2 بالنباتات المقاومة للمرض ، كذلك حزم بحجم 1337 في النباتات الحساسة والعينات الحاملة لكلا الحزمتين تعد مقاومة متباينة الأليلات .



الشكل (4) رسم تخطيطي لجينات المقاومة *Mi-1* و *Mi-1.1* يوضح المواضع النسبية لبداي الانترون. البرايمر المرافق *Mint-do* ، *Mint-up* الخطوط السمكية تمثل النسخ والخطوط العمودية المتعرجة تمثل الانترونات (Jablonska وآخرون ، 2007).

## 9-2- تأثير المبيدات الاحيائية والمواد النانوية على حيوية النباتات

الإستخدام العالمي للمنشطات الحيوية النباتية وسيلة إيجابية لا يمكن الإستغناء عنها وأن لا تؤثر سلباً على الإنسان والبيئة وبدون مخلفات سامة مثل الكائنات الحية الدقيقة الميكروبية ومنها ، المايكورايزا الشجيرية *Arbuscular Mycorrhizal Fungi* ، البكتريا الجذرية أو تكون غير ميكروبية مثل مستخلصات الطحالب البحرية وغيرها ، إذ تستخدم هذه المركبات لتنظيم العمليات الفسيولوجية وتحسن من تعزيز نمو وإنتاجية المحاصيل ، وتحمل مقاومة مجموعة واسعة من الضغوط الإحيائية مثل الملوحة والجفاف ، كما إن إستخدام المواد النانوية من الحلول المحتملة على تحسين نمو النباتات وتقليل الأثار البيئية الضارة لإنتاج الغذاء الزراعي بشكل أفضل ، كما إنها تلعب دور مهم في تقليل التلوث في المياه والبيئة وهذا ينعكس تماماً على المردود الاقتصادي كما إنها تحسن من إنبات البذور (Adisa وآخرون ، 2019 و Al-Hadede وآخرون ، 2020 و Carillo وآخرون ، 2020 و Hofmann وآخرون ، 2020).

## 2-9-1- تأثير البكتريا الجذرية Rhizobacteria على حيوية النبات

غالباً ما يشار إلى البكتريا الجذرية على إنها البكتريا المعززة لنمو النبات أو Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) وأستخدم هذا المصطلح لأول مرة من قبل Joseph W. Kloepper وأخر السبعينيات ، هذه البكتريا ترتبط بالجذور وتشكل علاقات تكافلية للعديد من النباتات ، إذ تتأثر منطقة الجذور بعدد لا يحصى من العوامل الإحيائية والإحيائية ويمكن لهذه العوامل بدورها تعديل تأثيرات الرايزوبكتريا على صحة النبات ، وتمثل البكتريا الجذرية مجموعة متنوعة من الأنواع تسكن في جذور النبات وتحدث تغييرات في نمو النبات وتطويره وبالتالي تعزز من إنتاجية المحاصيل وتكسب مقاومة لمختلف المسببات المرضية وبلغ عن عدة أنواع من البكتريا في التربة مثل *Azospirillum* ، *Arthrobacter* ، *Flavobacterium* ، *Enterobacter* ، *Burkholderia* ، *Alcaligenes* ، *Bacillus* ، *Pseudomonas* ، *Rhizobium* والتي يمكن إستخدامها كمواد حيوية لزيادة المواد العضوية للتربة وتحسين بنية التربة والإحتفاظ بالمياه بغض النظر عن سلامتها على البيئة والإنسان ( Bloemberg و Lugtenberg ، 2001 و Egamberdiyeva ، 2005 و Saghafi و آخرون ، 2019 و Fatima و Arora ، 2019 و Kumari و آخرون ، 2019 ) . أشار Reyes-Castillo و آخرون (2019) إن البكتريا قادرة على تحويل النيتروجين والفسفور والبوتاسيوم وإمتصاصها بسهولة من قبل النبات وعلية تعزز من نمو نبات الطماطة ، في حين وجد Qessaoui و آخرون (2019) أن عزلات *Pseudomonas* كانت قادرة على إذابة الفوسفات ، وإنتاج حامض الحديد ، والأمونيا *Ammonia* ، وحامض الإندول *Indole-3-Acetic Acid* وأستعمار جذور نباتات الطماطة وتعزيز نموها . أشار Gupta و آخرون (2020) إن إستخدام اثنتين من السلالات البكتيرية *Klebsiella sp* و *Enterobacter sp* أدى إلى النمو الغزير لنبات الطماطة ، وأظهرت النتائج إن كلا السلالتين كانت فعالة في تعزيز نمو النبات وتعزيز الكتلة الحيوية ولكن السلالة *Enterobacter sp* كانت الأكثر فعالية في تعزيز طول الجذر ، وطول الساق ، ووزن الثمار وإمتصاص المغذيات . كما تبين ان البكتريا *Rhizobacteria* أما ان تحدث تأثيرات مباشرة من خلال الحصول على العناصر الغذائية مثل النيتروجين والفسفور والحديد وهما العناصر الأهم في نمو النبات أو تعدل مستوى واحد أو أكثر من الهرمونات النباتية مثل الاكسينات *Auxins* ، السيتوكينينات *Cytokinins* ، الجبرلينات *Gibberellins* داخل النبات

Bhattacharyya) واخرون ، 2015 و Calvo واخرون ، 2017 و Pérez-Flores واخرون ، 2017 .

لوحت Chiquito-Contreras واخرون (2020) عند تلقيح نبات الطماطة بسلاطين FA-8 و FA-56 من بكتريا *Pseudomonas putida* عن طريق غمر الجذور عززت بشكل كبير من إنتاجية النباتات . وأجريت دراسة من قبل Yagmur و Gunes (2021) لتحديد آثار البكتريا على جودة نباتات الطماطة ، إذ استخدمت عدة سلالات بكتيرية منها *Bacillus megaterium* ، *Paenibacillus polymxa* ، *Burkholderia cepacian* ، *Azospirillum sp-245* وبينت النتائج هنالك تأثير إيجابي وأظهرت معاملة البكتريا *Bacillus megaterium* على الأوراق زيادة المحصول 20% بالمقابل لم يظهر أي تأثير على حجم ووزن الثمار .

### 2-9-2- تأثير أكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs على حيوية النبات

الزنك أحد العناصر الغذائية اللازمة لنمو النبات إذ أنه المكون الأساسي للأنزيمات المختلفة المسؤولة عن العديد من التفاعلات الأيضية بمختلف المحاصيل ، جذبت المواد النانوية بالأونة الأخيرة اهتمام واسع إذ تحفز على نمو وتحسين النبات، كما إنها تتحكم في تخليق حامض Indole Acetic Acid (IAA) وهو هرمون نباتي ينظم نمو النبات وضروري لتخليق الكلوروفيل وتكوين الكربوهيدرات ويقلل من إمتصاص المعادن الثقيلة الضارة مثل الكاديوم Cd ، كما إنه يُمكن النباتات من تحمل درجات حرارة الهواء المنخفضة ويساعد في التخليق الحيوي للسيتوكروم Cytochrome (Adiloglu ، 2002 و Pandey واخرون ، 2010) . وجد Faizan واخرون (2018) عند غمر جذور الطماطة في 0 ، 2 ، 4 ، 8 ، 16 ملغم / لتر من جزيئات أكسيد الزنك النانوية (ZnO-NPs) أدت الى زيادة بالنمو وكفاءة التمثيل الضوئي وتحسين أنظمة مضادات الاكسدة وتراكم البرولين . كما أشار Pérez Velasco واخرون (2020) ان نباتات الطماطة المعالجة بمادة أكسيد الزنك النانوي (ZnO-NPs) بطريقة الغمر والرش الورقي أدت الى زيادة معنوية في طول النبات وقطر الساق وأجزاء النبات من الجذور والأوراق مقارنة بالنباتات غير المعالجة وأدى الرش الورقي باستخدام جزيئات أكسيد الزنك النانوية ZnO-NPs إلى تحسين نمو الطماطة عن طريق زيادة محتوى الكلوروفيل ونشاط للنظام الضوئي وزيادة تراكم الحديد بنسبة 12.2% في أوراق الطماطة ( Sun واخرون ، 2020 ) .

## 10-2- مكافحة ديدان تعقد الجذور. Control of *Meloidogyne* spp.

اتبعت العديد من الطرق لمكافحة ديدان تعقد الجذور RKN منها الكيميائية وغير الكيميائية مثل الاصناف المقاومة والإحيائية والزراعية والفيزيائية وتعدّ مكافحة ديدان تعقد الجذور RKN في التربة صعبة ومكلفة لكن مع ذلك ضرورية جداً لإنتاج محصول اقتصادي مربح ، وتهدف المكافحة بمختلف الطرق إلى خفض كثافة النيما تودا في التربة بحيث يكون الضرر على النبات منخفضاً جداً أو على الأقل ذات مردود اقتصادي مقبول (Sikora و Fernandez، 2005 والحازمي ، 2009) . الأعتقاد على طريقة واحدة للمكافحة قد لا يعطي نتائج إيجابية وبالتالي إستخدام أكثر من طريقة للمكافحة توفر نتائج مقبولة وأن تكون بنفس الوقت اقتصادية وليس لها تأثيرات جانبية (Mahmood و Ismael ، 2020) . ومن أوسع الطرق للسيطرة على ديدان تعقد الجذور هي الطرق الزراعية ومنها تسميس التربة ، الغمر، الدورة الزراعية ، حرق مخلفات المحاصيل ، إزالة النباتات المصابة وغيرها (Khan وآخرون ، 2014 و Kokalis-Burelle وآخرون ، 2016) . كما يمكن إستخدام بعض النباتات للسيطرة على ديدان تعقد الجذور إذ تنتج هذه النباتات مواد سامة تستهدف الكائنات الحية وغالباً ما تعتمد هذه الطريقة قبل الزرع لإعطاء نتائج فعالة مثل نبات النيم ، زهرة الشمس ، البازلاء وقد تطلق النباتات مواد كيميائية مختلفة في التربة كمواد جاذبة أو طاردة وهذه فرصة جيدة للسيطرة على ديدان تعقد الجذور (Sikder و Vestergard ، 2020) .

ومن أهم طرق المكافحة الشائعة الاستعمال

### 1-10-2- الأصناف المقاومة Resistant Varieties

زراعة الأصناف المقاومة تعد من أفضل الطرق في خفض كثافة ديدان تعقد الجذور RKN في التربة وهي طريقة اقتصادية وأمنة بيئياً وصحياً ، ترجع أهمية المقاومة في نبات الطماطة من الإصابة بديدان تعقد الجذور RKN إلى جين المقاومة السائد Mi ويعرف علماء أمراض النبات ان الصنف يعد مقاوماً متى ما كان تطور وتكاثر النيما تودا عليه بدرجة قليلة ، بينما يعد قابلاً للإصابة إذا كان مناسباً لتطور وتكاثر النيما تودا عليه بأعداد كبيرة ، الصنف المقاوم للإصابة تنصح زراعته في الحقول ذات الكثافة المنخفضة جداً لأن هذا الصنف حتى وان كان مقاوم للنيما تودا لكن

تعرضه لأعداد هائلة قد يتضرر وتحت معظم الظروف الحقلية يستعيد هذا الصنف نموه وبمحصول منخفض (الحازمي ، 2009) .

طبيعة المقاومة بالنبات بموت سريع موضعي إذ تفشل بإفغات الطور الثاني J<sub>2</sub> في إختراق أنسجة الجذور وتتوقف عن النمو والتطور ومن ثم تموت وأن حصل إختراق يمنع من تطوير الخلايا العملاقة وبالتالي يمنع من نمو النيماتودا وتترك جذور النبات العائل لتخترق جذراً اخر أو تتطور إلى ذكر (Paulson و Webster ، 1972 ، Melillo و اخرون ، 2006 و Williamson و اخرون ، 2009) .

وَجَدَ إن بعض الأصناف المقاومة لا تزود النيماتودا بعد إختراقها جذور النبات العائل ببعض العناصر الغذائية الضرورية لتكاثرها وتطورها وعليه لا تتمكن من وضع البيض وتكلمة دورة حياتها داخل أنسجة النبات ، كما إن بعض الأصناف المقاومة تتراكم بها الفينولات وتشكل طبقة من الأنسجة الميتة والتي تعيق تقدم النيماتودا إلى داخل أنسجة الجذور (Giebel ، 1970 و Pontier و اخرون ، 1999) . تتميز المقاومة الوراثية بموت الخلايا في مواقع إختراق الديدان الخيطية وذلك لتراكم المواد السامة إذ لوحظ مستوى عالي من الاوكسجين في مواقع الإختراق والخلايا المجاورة وكذلك وجود تراكم مرتفع لبيروكسيد الهيدروجين (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) على غشاء البلازما وجدار الخلية (Wubie و Temesgen ، 2019) . أشار Jaiteh و اخرون (2012) إن التهجين بين سلالات الطمطة يعطي هجن جديدة مقاومة لمرض ديدان تعقد الجذور RKN ودورها يزداد أهمية بالوقت الحاضر كما إنها تحمي الإنسان والبيئة من المخاطر . ومن الجدير بالذكر أن الأصناف الهجينة تتميز عن الأصناف العادية بتفوقها ومقاومتها للآفات وتأقلمها للظروف البيئية القاسية وكذلك تجانس نباتاتها متمثلة بشكل الثمار وموعد الأزهار وغيرها من الصفات ، كما ان طريقة الهجن سهلة ومرنة مقارنة بالطرق الأخرى وبالتالي جمع عدد من الصفات المرغوبة لصنف واحد مقاوم يجمع بين قوة النمو والتجانس وهاتان الصفتان يصعب جمعهما بطرائق التربية الأخرى لإن السلالات التي تربي داخلياً تكون ضعيفة النمو في حين إن الأصناف مفتوحة التلقيح قوية النمو لكنها غير متجانسة ، وهذا ما يسمح بإستخدام المكننة الزراعية على نطاق واسع من خلال زراعة الهجن والزيادة الكبيرة بالمحصول المبكر للصنف ، كما إنها تحفظ حقوق المربي إذ إستحيل معرفة أبوي الهجين من خلال النسل ويعد هذا من أهم الأسباب التي جعلت شركات البذور تتجه للتوسع بإنتاج الأصناف الهجينة المقاومة

والسيطرة على إنتاج هجتها طالما أحتفظت بسرية الأبناء (Sharma وآخرون، 2019) تمكن Faraj و Qadir (2018) من إستخدام خمسة أصناف طماطة هي RedRock, King Rock, Presto F1, Super Queen and Super Regina لإختبار حساسيتها ضد ديدان تعقد الجذور *Meloidogyne incognita* وأعطى الصنف Red Rock أعلى نسبة (0.57) بينما الصنف Super queen أقل نسبة (25.4).

## 2-10-2- المكافحة الإحيائية Biological Control

أتجه العالم إلى وضع إستراتيجيات مختلفة وبرامج إدارة كاملة للسيطرة على ممرضات النبات عن طريق إدخال كائنات صديقة للبيئة تعمل على خفض الكثافة العددية لمجتمع النيماتودا وتعرف بالمكافحة الإحيائية Biological Control والتي أظهرت نجاحاً في مكافحة النيماتودا الممرضة للنبات من خلال قدرتها على إستعمار المنطقة المحيطة بالجذور فضلاً عن قدرتها العالية على التكاثر والإنتشار إذ خفضت هذه الأحياء من مستوى الضرر الذي تحدثه النيماتودا إلى دون الحد الاقتصادي الحرج (Abd-Elgawad ، 2016). المكافحة البيولوجية وتعني إستخدام العوامل الإحيائية كالفطريات والبكتريا وغيرها ، أو نواتجها الثانوية مثل الأحماض العضوية والأمينية، أو استخدام المواد الطبيعية ، السماد الأخضر (Veronico وآخرون ، 2017). تتطلب المعاملة بالمكافحة البيولوجية غمر التربة بالمركبات الحيوية للسيطرة على ديدان تعقد الجذور (Pendse وآخرون، 2013) ، واستخدمت المكافحة البيولوجية ضد ديدان تعقد الجذور RKN لأول مره من قبل Duddington (1951). لاحظ Wang وآخرون (2007) إن أكثر عوامل المكافحة البيولوجية شيوعاً وإستعمالاً الفطريات والبكتريا ومن المعروف ان 30 جنساً و80 نوعاً من الفطريات متطفلة على ديدان تعقد الجذور .RKN

من أليات عمل هذه الأحياء ضد ديدان تعقد الجذور RKN إما أن تكون بإفراز مواد طارده تقلل من إنجذاب يافعات الطور الثاني J<sub>2</sub> نحو جذور العائل النباتي أو قد يحصل ضعف وتأخر في نمو الأثاث الناضجة ، أو أن بعض الفطريات مثل *Trichoderma* و *Paecilomyces* تؤثر على الديدان في التربة أو الجذور وعلى مراحل مختلفة من دورة حياة الديدان (بيض ، يافعات ، أطوار ناضجة) أو تنافسها على المواد مثل السكريات أو قد تحفز وتعزز من نمو النبات بإنتاج هرمونات مثل

السيتوكينين Cytokinins والجبرلينات Gibberellins (VanLoon) واخرون ،  
1998 Rodriguez واخرون ، 2009 Hofmann واخرون ، 2009 Redman  
واخرون ، 2011 Martinuz واخرون ، 2013 Yao واخرون ، 2015  
Schouteden واخرون ، 2015 Le واخرون ، 2016 Sikder  
وVestergard ، 2020). تحفز البكتريا الجذرية (PGPR) المقاومة الجهازية عن  
طريق زيادة نشاط الجين الدفاعي مما تؤدي الى انخفاض مستوى الإصابة لديدان تعقد  
الجذور RKN على نبات الطماطة (Vigila واخرون ، 2019). كما إن طبيعة  
التداخل بين الممرض والعامل الإحيائي تكون مختلفة حتى في الجنس الواحد إذ ان  
تفاعل عوامل مكافحة البيولوجية بإستخدام البكتريا مع جذور النبات يحفز النباتات  
ضد ديدان تعقد الجذور RKN مثل المعالجة بالمضادات الحيوية السامة التي تكونها  
البكتريا *Bacillus cereus* ، *Bacillus subtilis* وجزئيات البروتين السامة  
للبكتريا *Bacillus thuringiensis* والتأثير الأنزيمي لبكتريا *Bacillus firmus* ،  
وأشارت النتائج عند استخدام البكتريا *B.cereus* السلالة (BCM2) من السيطرة  
على نيماتودا *M.incognita* ، إذ أستعمرت البكتريا جذور نبات الطماطة وعملت  
كطارديا لفاعلات الطور الثاني J<sub>2</sub> (Abd-Elgawad و Askary ، 2018 و Li  
واخرون ، 2019). تمكن Koulagi و Sirohi (2015) من استخدام بكتريا  
*Agrobacterium* السلالة (GV-3101) والسلالة (LB4404) في مقاومة ديدان  
تعقد الجذور النوع *M.incognita*. أشار Verdejo-Lucas واخرون (2003) ان  
إستخدام فطر *Pochonia clamydospora* أدى الى تقليل *M.javanica* على  
نباتات الطماطة. أظهرت دراسة إن منتج مكافحة الحيوية التجارية والمتكون من  
*B.subtilis* و *B.licheniformis* و *Trichoderma longibrachiatum* خفض  
من كثافة النيماتودا *M.incognita* على نبات الطماطة نسبة 63.9% (Silva  
واخرون ، 2017). وأوضح Colagiero واخرون (2018) ان إستخدام البكتريا  
*B.cereus* ، *B.licheniformis* ، *P.fluorescens* لنباتات طماطة مصابة بديدان  
تعقد الجذور خفضت كثيراً من يافعات الطور الثاني J<sub>2</sub> المسؤول عن إحداث الإصابة.  
كما أشارت دراسات سابقة ان معاملة نباتات الطماطة ببكتريا *Bacillus* spp.  
و *Pseudomonas putida* زادت من إمتصاص الكالسيوم Ca وبالتالي يمنحها مناعة  
ضد العديد من مسببات الأمراض ومنها ديدان تعقد الجذور RKN (He واخرون ،  
2019 و Aldon واخرون ، 2018 و Thor ، 2019).

## 2-10-3- المكافحة بالمواد النانوية Nanomaterials Control

تعرف الجسيمات النانوية على إنها مجاميع ذرية أو جزيئية ويمكن أن تستخدم المواد النانوية بالرش الورقي أو معاملة البذور قبل الزراعة أو في التربة ومن أكثر الجسيمات النانوية إستخداماً في الزراعة تشمل التيتانيوم والزنك والسيليكا والفضة والذهب والنحاس والكبريت (Ghormade وآخرون، 2011 و Sabir وآخرون، 2014 و Panyuta وآخرون، 2016). نظراً لصغر حجم المواد النانوية وكبر مساحة سطحها وإستقرارها للبيئة بالإمكان أن تكون بمثابة البديل للأسمدة الكيميائية فضلاً عن تعزيزها للمغذيات (Sekhon، 2014 و Rai وآخرون، 2018) تعمل المواد النانوية على تعزيز نمو النباتات بإمتصاص العناصر الغذائية وتحسن من عملية التمثيل الضوئي من خلال قمع الضغوط المؤكسدة والتناضحية وتقليل الإجهاد الناجم عن الأشعة فوق البنفسجية وبالتالي حماية النباتات ضد الكائنات الممرضة (Siddiqui وآخرون، 2015 و Fraceto وآخرون، 2016 و Singh وآخرون، 2017). حالياً تفضل الأسمدة النانوية على الأسمدة التقليدية لأنها تزيد من خصوبة التربة وغير سامة وأقل ضرراً على الإنسان والبيئة (Abedi و Naderi، 2012).

تعد جسيمات أكسيد الزنك النانوية (ZnONPs) ثالث أكثر المواد النانوية الشائعة الإستخدام مع إنتاج سنوي يقدر بين 550 و 33400 طن عالمياً (Peng وآخرون، 2017). وجد El-Sherif وآخرون (2019) عند إستخدام ثلاث مواد نانوية ومعدنية (أكسيد الزنك النانوي 5ملغم، الزنك المعدني 5غم - حديد معدني 5غم، أكسيد الحديد النانوي 5ملغم - أكسيد الحديد والزنك المعدني 5غم، أكسيد الحديد والزنك النانوي 5 ملغم) للتحكم في ديدان تعقد الجذور *Meloidogyne incognita* إذ أشارت النتائج ان الأسمدة النانوية أكثر فعالية من المواد المعدنية وتقوم أكسيد الزنك النانوي بمعدل (93.6%) بخفض كثافة النيماتودا يليه أكسيد الحديد بنسبة (91.3%) ثم أكسيد الحديد والزنك بمعدل 83.8%. وفي دراسة أجراها Khan و Siddiqui (2020) في الدور الذي تلعبه الجسيمات النانوية من جزيئات أكسيد الزنك النانوية (ZnONPs) في إدارة العقدة المتكونة من نيماتودا *M.incognita* وبكتريا *betavasculorum Pectobacterium* (Pb) وفطر *Rhizoctonia solani* (Rs) وبتراكيوز 100 – 200 ملغم/ لتر إذ أعطى التركيز 200 ملغم/ لتر نتائج فعالة في موت يافعات الطور الثاني J<sub>2</sub> من نيماتودا

*M.incognita* وكذلك إعاقة نمو المسببات *Pectobacterium betavasculorum* و *Rhizoctonia solani*. أشار Khan و Siddiqui (2018) من إستخدام جزيئات أكسيد الزنك النانوية (ZnONPs) وبثلاث معاملات وهي ، معاملة البذور ، معاملة الرش الورقي ، معاملة التربة للسيطرة على المسببات المرضية *Ralstonia solanacearum* و *Phomopsis vexans* و *Meloidogyne incognita* وتم الحصول على زيادة في نمو النبات وكانت معاملة الرش الأكثر نتيجة فعالة تليها معاملة البذور ثم التربة .

## 2-10-4- المكافحة الكيميائية Chemical Control

يعد إستخدام المبيدات الكيميائية ضد ديدان تعقد الجذور RKN هو الإستراتيجية الأكثر شيوعاً وإستعمالاً وتسمى المبيدات النيماطودية Nematicides ، تقسم المبيدات النيماطودية إلى المبيدات المدخنة Fumigants Nematicides والمبيدات الغير مدخنة Non-Fumigants Nematicides ، المبيدات الغير مدخنة وتعرف بالمبيدات الغير متطايرة تضاف الى التربة ليسهل امتصاصها من قبل النيماطودا مثل مبيدات Oximecarbamate و Organophosphate (أبو غريبية 2010 و Strajnar و Sirca ، 2011 و Noling ، 2014 و Hajihassani واخرون ، 2019 و Medina و Canales واخرون ، 2019) .

أما المبيدات المدخنة مصنوعة على شكل سوائل وتطاير بشكل غاز خلال فراغات الهواء منها بروميد المثيل methyl bromid و chloropicrin و 1,3 dichloropene وتعد المبيدات المدخنة هي الأكثر إستعمالاً للسيطرة على النيماطودا (Noling ، 2010 و Strajnar و Sirca ، 2011) . بالرغم من كفاءة إستعمال المبيدات ونتائجها الفعالة لكن في العقود الأخيرة بسبب تأثيرها على الإنسان والبيئة وسميتها للكائنات الغير مستهدفة ، والعامل الأكثر تأثيراً لتقييد إستعمال المبيدات في البلدان النامية يكون بسبب أسعارها الباهظة الثمن ونقص معرفة التقنية عند إستعمالها (Papadopoulou واخرون ، 2016 و Kim واخرون ، 2018 و Xiang واخرون ، 2018) . لوحظ في دراسة أجريت من قبل Saad واخرون (2017) في مصر من تقييم فعالية مبيد Avermactin مبيد حيوي للنيماطودا مقارنة بخمس مبيدات غير مدخنة هي Cadusafos ، Ethoprophos ، Fenamiphos ، Fosthiazate و Oxamyl لإدارة ديدان تعقد الجذور *Meloidogyne incognita* على الطماطة

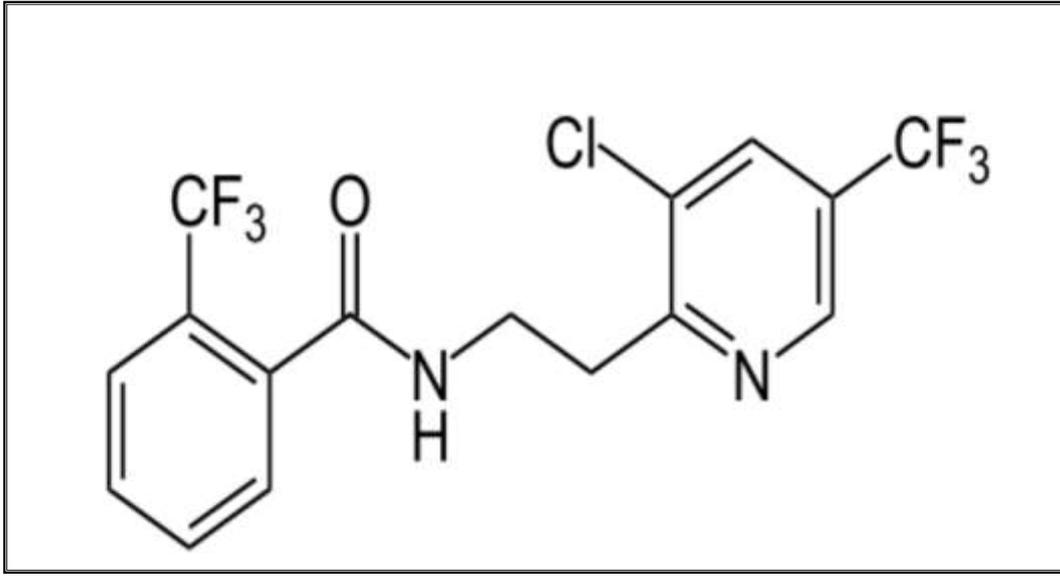
وأظهرت النتائج إن مبيد Fenamiphos و Oxamyl الأعلى فعالية بنسبة 91.73 ،  
89.53% على التوالي في حين ان Avermactin الأقل فعالية بنسبة 66.69% .

سجل مبيد الأباكتين قدرته الفعالة للسيطرة على ديدان تعقد الجذور على نباتات  
الطماطة لفترة طويلة ولا يزال إستعماله مستمر لمختلف دول العالم إذ أشارت الدراسة  
من قبل مطر (2016) من إستخدام مبيد Abamctin بثلاث تراكيز 1 ، 2 ، 4 مل /  
لتر لمكافحة ديدان تعقد الجذور على نبات الطماطة وأشارت النتائج الى خفض دليل  
العقد مع زيادة التركيز وسجل التركيز 4 مل / لتر أقل دليل بنسبة 1.33 مقارنة بمعاملة  
المقارنة التي سجلت 5 .

## 2-10-4-1- المبيد الكيميائي Velum Prime

مبيد يعود إلى مجموعة Phenyl-benzamide مادته الفعالة Flupyram وهو  
من المبيدات الفطرية وتمت الموافقة عليه من قبل وكالة حماية البيئة الامريكية EPA  
عام 2012 ، في بادئ الامر استعمل المبيد لمكافحة العديد من الفطريات وعلى  
محاصيل مختلفة مثل البياض الدقيقي بالعنب والعفن الرمادي ، وفي الآونة الأخيرة أفاد  
بعض الباحثين إن فلوبيرام يحتوي على Succinate Dehydrogenase Inhibitor  
(SDHI) والذي يفيد في السيطرة على النيماتودا واتسع إستعماله في مكافحة النيماتودا  
الممرضة للنبات فضلاً عن مكافحة العديد من الحشرات مثل الذبابة البيضاء والمن  
ويستخدم مبيد Velum Prime بصورة سائلة وهو من مبيدات النيماتودا الغير مدخنة  
والأفضل أن يستخدم من خلال غمر التربة مع الري بالتنقيط (Veloukas  
و Karaoglanidis ، 2012 و Weber واخرون ، 2015 و Faske و Hurd ، 2015  
و Vitale واخرون ، 2016) . بينت دراسة من قبل Oka و Saroya (2019) ان  
إستخدام مبيدات Fluopyram و Fluensulfone وتأثيرهما على  
نيماتودا *Meloidogyne incognita* و *Meloidogyne javanica* مختبرياً  
وتوصلت النتائج بعد 17 ساعة من التعرض للمبيد ان نيماتودا *M.incognita* أكثر  
حساسية للمبيد Fluensulfone أما *M.javanica* كانت أكثر حساسية لمبيد  
Fluopyram بينما أدى تعرض النيماتودا *M.incognita* و *M.javanica* لتركيز 4  
ملغم من Fluopyram إلى تثبيط فعال بعد 48 ساعة من التعرض . وجد Dahlin  
واخرون (2019) ان إستخدام المبيد الكيميائي Velum Prime مع المقاومة البايولوجية  
بفطر *Purpureocillium lilacinum* سلالة (251) لمكافحة ديدان تعقد الجذور

*M.incognita* على نبات الطماطة أعطت نتائج فعالة مقارنة بالمكافحة المفردة . وكما لوحظ Ji واخرون ( 2019 ) من زيادة محصول نبات الطماطة بنسبة 21.4% - 58.5% نتيجة معاملةها بالمبيد الكيميائي Fluopyram وبثلاث جرعات من الإصابة بنيماتودا *M.incognita* مع تعزيز نمو وإنتاجية نبات الطماطة ولم تقتصر كفاءة هذا المبيد على ديدان تعقد الجذور RKN كما اختبرت كفاءته ضد نيماتودا *Rotylenchulus reniformis* على نبات القطن واطهر نتائج فعالة ( Wright ، 2020 ) .



الشكل (5) التركيب الكيميائي لمادة Flupyram المادة الفعالة لمبيد Velum Prime  
( Heiken ، 2017 )

## ثالثاً : المواد وطرائق العمل Materials and Methode

### الجدول (1) الأجهزة والأدوات المستخدمة في البحث

ت	إسم الجهاز	الشركة المصنعة	البلد المنشأ
1	جهاز التعقيم البخاري Autoclave	Tom	Japan
2	الحاضنة Incubator	Memmert	Germany
3	مجهر ضوئي مركب Microscope	Olympus	Japan
4	فرن كهربائي Microwave Oven	Memmert	Germany
5	ثلاجة Refrigerater	L.G	Korea
6	أطباق بتري Petri Dishes	Afco	Jordan
7	جهاز الأشعة فوق البنفسجية U. V. Light	Cleaver	England
8	ميزان حساس Sensitive Balance	Sartorius	Germany
9	الرجاج Vortex	Heidolph	Germany
10	جهاز الطرد المركزي Centrifuge Cooling	HettichEBA.20	Germany
11	خلاط كهربائي Blender	National	Japan
12	أوراق ترشيح Filter paper	Whatman	England
13	دوارق زجاجية Flasks	Volac	England
14	جهاز التقطير distillation	G.F.L	Germany
15	أصص بلاستيكية Plastic pots	*	China
16	جهاز التسخين Hot plate	Photox	England
17	مناخل Sieves	Ogawa seikico	Japan
18	حمام مائي Water bath	Grant	England
19	مقياس الدالة الحامضية pH-meter	Hanna	Italy
20	جهاز قياس الملوحة EC-meter	Hanna	Italy
21	جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل Thermocycler	Labnet	Korea
22	جهاز الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis	Labnt	Korea
23	جهاز Chlorophyll Content meter	*	Germany
24	شرائح زجاجية واغطيتها Slides and Cover Slides	Mheco	China

Germany	Human	Micropipetes ماصات دقيقة	25
England	*	counting slide شريحة العد	26
England	Sigma	Test tubes أنابيب اختبار	27
Germany	*	Baermann Funnul أقمع بيرمان	28
Iraq	*	ملاقط ومقصات	29

\* غير معروف المنشأ أو الشركة المصنعة

## الجدول (2) المواد المستخدمة في البحث

البلد المنشأ	الشركة المصنعة	إسم المادة	ت
England	BDH	Glycerol الكليسيرول	1
India	*	Lactophenol اللاكتوفينول	2
India	*	Canada balsam كندا بلسم	3
Switzerland	Fluka	formalin فورمالين	4
Korea	GeNet Bio	Buffer lysis محلول تحطيم الخلايا	5
England	BDH	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> محلول ثاني كرومات البوتاسيوم	6
England	BDH	كبريتات الحديدوز النشادرية	7
USA	kaba	agarose gel هلام الاكاروز	8
Iraq	تجاري	Sodium hypochlorite هايوكلورات الصوديوم	9
USA	Sigma	Glacial acetic acid حامض الخليك الثلجي	10
England	BDH	Hydrochloric acid حامض الهيدروكلوريك	11
England	BDH	Fuchsin Acid صبغة الفوكسين الحامضية	12
Iraq	الجود	Ethyl alcohol كحول الاثيل	13
Iraq	*	Distilled water ماء مقطر	14
India	Himedia	PDA وسط البطاطا دكستروز اكار الجاهز	15
India	Himedia	Nutrient Agar	16
USA	Marvel	Verox المبيد الاحيائي	17
Germany	BAYER	Velum Prime المبيد الكيمائي	18
USA	*	ZnO NPs أوكسيد الزنك النانوي	19

### 3-1- المسح الحقلّي

اجري المسح الحقلّي للحقول المزروعة بنباتات الطماطة في محافظة كربلاء في الموسم الخريفي من سنة 2020 م ، وحسب الجدول (3) الذي يبين المعلومات الخاصة بجمع العينات ، أخذت العينات بصوره عشوائية من الحقول والتي شملت 8 مناطق و14 حقل هي ( ناحية الحسينية ، منطقة الابراهيمية ، خان الربع ، الجدول الغربي ، ناحية عون ، ناحية الحر ، قضاء طوريج ، مزارع العتبة العباسية ) بعد ملاحظة الأعراض الظاهرة على المجموع الخضري بذبول وإصفرار أوراق النباتات ثم وضعت في أكياس بولي إيثيلين مرطبة بكمية قليلة من الماء مثبتة عليها معلومات كل عينة وجلبت إلى مختبر أمراض النبات - كلية الزراعة / جامعة كربلاء ، حفظت العينات في الثلاجة عند درجة حرارة 5 م° (Hooper ، 1961 و VanBezooijen ، 2006) بمدة لا تزيد عن ثلاثة أيام لحين إجراء الفحوصات اللازمة عليها.

حسبت نسبة الإصابة بإعتماد المعادلة التالية :-

$$\text{نسبة الإصابة} = \frac{\text{عدد النباتات المصابة}}{\text{العدد الكلي للنباتات المفحوصة}} \times 100$$

كذلك حسبت شدة الإصابة إستناداً إلى دليل العقد الجذرية الذي وضعه Taylor و Sasser (1978) والمتكون من خمس درجات كما في الجدول (4)

قدرت شدة الإصابة حسب المعادلة التالية :-

$$\text{شدة الإصابة} = \frac{\text{مجموع (عدد النباتات المصابة} \times \text{درجة إصابتها)}}{\text{العدد الكلي للنباتات} \times \text{أعلى درجة}} \times 100$$

( McKinney ، 1923 )

الجدول (3) البيانات الخاصة بمناطق المسح الحقلية للكشف عن تواجد ديدان تعقد الجذور فيها

منطقة الجمع	رقم الحقل	نوع الموقع	تاريخ الجمع	عدد العينات	الصنف المزروع	طريقة الري
ناحية الحسينية	1	بستان	2020/9/12	14	غير معروف	سيح
	2	بستان	2020/9/15	8	فتون	سيح
	3	بستان	2020/9/21	10	علا	سيح
الابراهيمية	1	بستان	2020/9/7	22	غير معروف	سيح
	2	أنفاق	2020/12/25	6	دنا	تقطير
خان الربع	1	مزرعة	2020/9/27	10	ساره	تقطير
	2	مزرعة	2020/9/27	12	بكر	تقطير
	3	بيت بلاستيكي	2020/12/2	10	روعة + ساره	تقطير
الجدول الغربي	1	بستان	2020/9/18	8	غير معروف	سيح
ناحية عون	1	بيت بلاستيكي	2020/11/30	7	غير معروف	تقطير
ناحية الحر	1	زراعة محمية	2020/12/2	12	ساره	تقطير
	2	زراعة محمية	2020/12/2	12	بكر + نرجس	تقطير
قضاء طويرج	1	بيت بلاستيكي	2020/12/27	5	نسرين	تقطير
مزارع العتبة العباسية	1	بيت بلاستيكي	2020/12/2	4	SV4129TH	تقطير

الجدول ( 4 ) دليل تعقد الجذور المقترح من قبل Taylor و Sasser (1978)

الوصف	درجة الوصف
لا توجد عقد على الجذور	صفر
عدد العقد 1 – 2 عقدة على الجذر	1
عدد العقد 3 – 10 عقدة على الجذر	2
عدد العقد 11 – 30 عقدة على الجذر	3
عدد العقد 31 – 100 عقدة على الجذر	4
عدد العقد أكثر من 100 عقدة على الجذر	5

### 3-2- تشخيص أنواع ديدان تعقد الجذور. *Meloidogyne spp* في حقول الدراسة

#### بالاعتماد على الطراز العجاني *Perineal patterns*

بعد جلب العينات من الحقول المشمولة بالمسح ( ناحية الحسينية ، منطقة الابراهيمية ، خان الربع ، الجدول الغربي ، ناحية عون ، ناحية الحر ، قضاء طوريج ، مزارع العتبة العباسية ) إلى المختبر ، غسلت الجذور المصابة بالنيماتودا جيداً بالماء لإزالة الأتربة والمواد العالقة بها ، إلتقطت (2-3) اناث ناضجة من كل نبات مصاب وبعد إزالة كتل البيض من نهايتها الخلفية بواسطة أبرة التشريح وبالإستعانة بالمجهر (Stereomicroscope) ، وضعت الأنثى في قطرة من الكليسيرين على شريحة زجاجية لمدة 3 – 5 دقائق وقطعت نهايتها الخلفية بواسطة مشرط حاد مصمم لهذا الغرض وتم تنظيفها من الأحشاء الداخلية العالقة بالمؤخرة ، بعدها نقلت إلى شريحة زجاجية أخرى تحوي على قطرة من اللاكتوفينول ثم وضع غطاء الشريحة وتم قفل الشريحة بواسطة مادة كندا بلسم (Hesling ، 1952) وتركت لتجف ثم فحصت المقاطع تحت المجهر الضوئي (Coyne ، 2007) بقوة تكبير 40X وشخصت على وفق المفتاح التصنيفي الذي وضعه Tylor و Netscher (1974) ، ثم حسبت النسبة المئوية لتكرار ظهور الأنواع المعزولة وفق المعادلة التالية :-

$$\text{نسبة التكرار} = \frac{\text{عدد العينات المحتوية على نوع معين}}{\text{عدد العينات الكلية المفحوصة}} \times 100$$

(الحكيم وحسن ، 2011)

### 3-3- تحليل الصفات الكيميائية والفيزيائية للتربة في حقول الدراسة

#### المشمولة بالمسح الحقلي

حلت الصفات الكيميائية والفيزيائية للتربة في مناطق المسح الحقلي في المختبر المركزي لتحليل التربة والماء والنبات / كلية علوم الهندسة الزراعية / جامعة بغداد . جمعت عينات من التربة ضمن المواقع الخاصة والمشمولة بالمسح الحقلي والتي شملت 8 مناطق ، ووضعت في أكياس بولي إيثيلين وثبتت عليها معلومات كل موقع وجلبت إلى المختبر لتقدير الخواص الفيزيائية والكيميائية ومعرفة تأثيرها على كثافة وتوزيع ديدان تعقد الجذور RKN من خلال تحديد ما يلي :-

## 1- التحاليل الفيزيائية للتربة :

### أ- نسجة التربة

قدرت نسجة التربة بواسطة التحليل الميكانيكي بطريقة المكثاف Hydro meter المقترحة من قبل (Bouyoucos ، 1962) .

## 2- التحاليل الكيميائية للتربة :

### أ- المادة العضوية :

تم تقدير نسبة المادة العضوية حسب طريقة (Black و Walkley ، 1934) بإستعمال محلول ثاني كرومات البوتاسيوم 1N ( $K_2Cr_2O_7$ ) كعامل مؤكسد والتسحيح الرجعي مع 0.5 M كبريتات الحديدوز النشادرية .

### ب- درجة تفاعل التربة (pH) :

تبعاً لطريقة (Page واخرون ، 1982) تم القياس في راشح معلق التربة 1:1 بإستخدام جهاز pH Meter .

### ج- التوصيل الكهربائي (EC) :

قدر التوصيل الكهربائي للتربة بإستخدام جهاز (EC-meter) نوع Hanna الإيطالية وحسب طريقة (Richards ، 1954) .

## 3-4- تهيئة التربة المستخدمة في التجارب

عقمت تربة إنبات بذور أصناف الطماطة بجهاز المؤصدة Autoclave بدرجة حرارة 121 درجة مئوية وضغط 15 بار لمدة 60 دقيقة وأُعيد تعقيمها مرة أخرى بعد 24 ساعة ، أما التربة المستخدمة للتجارب الحقلية عقمت بالفورمالين تركيز 1 % ، إذ نخلت التربة بالمناخل لإزالة الكتل والأحجار الكبيرة ، بعدها تم إضافة السماد العضوي (بتموس) بنسبة 1:2 تربة / سماد ، ثم وضعت فوق قطعة من النايلون (البولي أنيلين) ورطبت جيداً بالفورمالين وغطيت بإحكام لمدة 48 ساعة ثم كشفت التربة لمدة أسبوع للتخلص من بقايا الفورمالين (حزام ، 2002) وَغُبُئَتْ فِي أُصْصِ بِلَاسْتِيكِيَّةِ (سَنَادِينِ) سَعَةً 1.5 كغم لِحِينِ الإِسْتِخْدَامِ .

### 3-5- تهيئة مزرعة نقية ديدان تعقد الجذور Pure Culture

زُرعت نباتات طماطة صنف Super marmand الحساس للإصابة بالنيماتودا في أصص بلاستيكية (سنادين) سعة 1.5 كغم مملوءة بمزيج من التربة والبتموس نسبة 1:2 المعقم بجهاز المؤصدة Autoclave كما في الفقرة 3-4. جمعت كتل البيض Egg Mases من انثى واحدة لديدان تعقد الجذور من نباتات طماطة مصابة (سبق وتم تشخيصها مظهرياً بالإعتماد على الطراز العجاني للنوع الأكثر تكراراً *Meloidogyne incognita* ضمن مناطق الدراسة المشمولة بالمسح الحقلية) ، وبعد فحصها بالمجهر الضوئي وضعت في إناء الجمع الزجاجي وأضيف لها 100 مل من الماء المقطر ( المعقم سابقاً بجهاز المؤصدة Autoclave على درجة حرارة 121 درجة مئوية وضغط 15 بار لمدة 20 دقيقة ) ووضعت في الحاضنة على درجة حرارة 30 م° ولمدة ثلاثة أيام لإتمام الفقس (Bird و Wallace ، 1965) . بعدها لوثت الشتلات وبعمر 2-3 أوراق حقيقية مع مراعاة السقي والتسميد بسماد NPK (20:20:20) عند الحاجة لمدة شهرين لإخضاعها للتشخيص الجزيئي وللتأكد من وجود النوع الأكثر تكراراً .



الشكل (6) مزرعة نقية من ديدان تعقد الجذور على نبات الطماطة

### 3-6- تشخيص ديدان تعقد الجذور بالاعتماد على التقانات الجزيئية

بعد مرور 60 يوماً على تهيئة المزرعة النقية الفقرة (3-5) وعند إكمال دورة حياة ديدان تعقد الجذور RKN أخذت عينات من المزرعة وخضعت للتشخيص الجزيئي لتأكيد أو دعم التشخيص المورفولوجي عن طريق الطراز العجاني وإجري التشخيص في مختبر التقدم العلمي / بغداد ، وفق خطوات العمل الآتية :-

### 3-6-1- عزل الحامض النووي المنقوص الاوكسجين DNA لديدان تعقد

#### الجذور. *Meloidogyne spp.*

تم إستخلاص المادة الوراثية العائدة لديدان تعقد الجذور RKN والمعزولة من نباتات الطماطة الملوثة بالديدان بعد تهيئتها من المزرعة النقية من كتلة بيض واحده مستخرجة من الإنثى الناضجة . وبإستعمال عدة الإستخلاص Genomic DNA Extraction kit for tissue من قبل شركة GeNet Bio الكورية وحسب الخطوات التالية :-

1- أُضيف 200 مايكروليتر من محلول تحطيم الخلايا lysis Buffer إلى أنبوب الطرد المركزي حجم 1.5 مل .

2- أُضيف 20 مايكروليتر من محلول تحطيم البروتين ProteinaseK (10mg/ml) وقلبت العينة تقلبياً خفيفاً لمزجها .

3- حضنت العينة على درجة حرارة 56 م° ولمدة 60 دقيقة .

4- أخرجت العينة من الحاضنة وأضيف لها 200 مايكروليتر من محلول Bindding Buffer ثم رجت العينة بإستعمال جهاز Vortex لمدة 15 ثانية .

5- حضنت العينة على درجة حرارة 56 م° لمدة 10 دقائق .

6- أخرجت العينة من الحاضنة وقلبت تقلبياً خفيفاً ونقلت محتوياتها الى أنبوب Spin column .

7- وضعت العينة في جهاز الطرد المركزي على سرعة دوران 10000 دورة / دقيقة ولمدة دقيقة واحدة .

8- تم التخلص من أنبوبة جمع الراشح النافذ ووضع Spin column في أنبوبة جمع جديدة .

9- أضيف 500 مايكروليتر من محلول الغسل (GWI) Washing Buffer إلى Spin column .

10- وضعت العينة في جهاز الطرد المركزي على سرعة دوران 10000 دورة / دقيقة ولمدة دقيقة واحدة .

11- التخلص من أنبوبة جمع الراشح النافذ ووضع Spin column في أنبوبة جمع جديدة .

12- إضافة 500 مايكروليتر من محلول الغسل (GWI) Washing Buffer إلى Spin column .

13- وضعت العينة في جهاز الطرد المركزي على سرعة دوران 10000 دورة / دقيقة ولمدة دقيقة واحدة .

14- التخلص من أنبوبة جمع الراشح النافذ ووضع Spin column في أنبوبة جديدة

15- وضعت العينة في جهاز الطرد المركزي على سرعة دوران 12000 دورة / دقيقة ولمدة دقيقتين للتخلص من بقايا محلول الغسل .

16- نقل Spin column إلى أنبوبة جديدة سعة 1.5 مل .

17- أضيف 200 مايكروليتر من محلول (GE) Elution Buffer إلى أنبوبة Spin column وتركت لمدة دقيقتين بدرجة حرارة الغرفة .

18- وضعت العينة في جهاز الطرد المركزي على سرعة دوران 10000 دورة / دقيقة ولمدة دقيقة واحدة .

19- التخلص من أنبوبة Spin column والحصول على المادة الوراثية DNA في أنبوبة الجمع .

20- حفظ الحامض النووي منقوص الاوكسجين (DNA) في الثلجة 4 م° لحين الاستخدام .

### 3-6-2- تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reactions

لغرض تشخيص ديدان تعقد الجذور والتأكد من وجود النوع الأكثر تكراراً أستعمل البادئان العموميان :

\*\* 194 (5"TTAACTTGCCAGATCGGACG"3)

\*\* 195 (3"TCTAATGAGCCGTACGC"5)

وهذان البادئان يستهدفان الجين 18S – 5S ويضخان مجالاً جينياً بطول 720 قاعدة نتروجينية (Blok واخرون ، 1997) ولغرض التأكد من وجود أو عدم وجود النوع النيما تودا *Meloidogyne javanica* والذي أظهر في حقول المسح أستعمل البادئان المتخصصان

\*\* F-Jav (5"GGTGC GCGGATTGAACTGAGC"3)

\*\* R-Jav (3"CAGGCCCTTCAGTGGA ACTATAC"5)

الذان يستهدفان الجين المتخصص Sequence Characterized Amplified (SCAR) Regions ضمن المنطقة الجينية 670 قاعدة نتروجينية كما موضح في الجدول (5) (Zijlstra واخرون ، 2000) .

أجري تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) بخليط التفاعل المكون من 2 مايكروليتر من الحامض النووي المستخلص DNA مع 1 مايكروليتر لكل من البادئ الأمامي والخلفي و5 مايكروليتر من Master mix إضافة إلى 16 مايكروليتر من الماء الخالي من الأنزيمات المحللة للحمض النووية (Free Water) وبحجم كلي 25 مايكروليتر وباستعمال أنبوبة التفاعل حجم 50 مايكروليتر، ثم التضخيم بإستعمال جهاز المدور الحراري Thermocycler نوع MultiGene - Mini من إنتاج شركة Labnet على وفق البرنامج الموضح في الجدول (6) .

الجدول (5) التسلسل النيوكليوتيدي للبادئات المستعملة بعملية التشخيص الجزيئي  
لديدان تعقد الجذور

المصدر	الحجم bp	النوع	التخصص	تسلسل البادئ (3-5)	إسم البادئ
Blok وآخرون 1997،	720	5S – 18S Gene	<i>Meloidogyne</i> spp.	TTAACTTGCCAGATCGGACG	194
				TCTAATGAGCCGTACGC	195
Zijlstra وآخرون 2000 ،	670	SCAR	<i>M. javanica</i>	GGTGCGCGGATTGAACTGAGC	F-Jav
				CAGGCCCTTCAGTGGAACTATAC	R-Jav

\* أضيف الماء المقطر لكل بادئ على حدى وحسب تعليمات الشركة المنتجة للحصول على تركيز 100 بيكومول / مل ( المحلول الأساس ) ثم خففت البوادئ للحصول على تركيز 10 بيكومول / مل وذلك بإضافة 10 مايكروليتر من المحلول الأساس الى 90 مايكروليتر من الماء المقطر المعقم وحفظت في 20- م° لحين الإستخدام .

الجدول (6) الظروف المثلى لتفاعل البلمرة المتسلسل للبادئات المستخدمة في  
تشخيص ديدان تعقد الجذور

مرحلة إنتهاء التفاعل	مرحلة الاستطالة النهائية دورة واحدة	مرحلة الاستطالة الأولية 35 دورة	مرحلة التحام البادئ 35 دورة	مرحلة المسخ النهائية 35 دورة	مرحلة المسخ الأولية دورة واحدة	البادئ
5 دقائق	72م° لمدة 7 دقائق	72م° لمدة 45 ثانية	58م° لمدة دقيقة واحدة	94م° لمدة دقيقة واحدة	98م° لمدة دقيقتين	<i>Meloidogyne</i> spp.
	72م° لمدة 7 دقائق	72م° لمدة 45 ثانية	64م° لمدة دقيقة واحدة	94م° لمدة دقيقة واحدة	98م° لمدة دقيقتين	<i>M. javanica</i>

\* رحل 5 مايكروليتر من ناتج PCR على هلام الاكاروز 1.5 % لمدة 90 دقيقة تحت فولتية 70 فولت وتيار 65 باستخدام جهاز Electrophoresis DNA Gel وبعد اكمال الترحيل صورت الحزم على جهاز الأشعة فوق البنفسجية (UV) عند الطول الموجي 365 نانوميتر .

### 3-6-3- الترحيل الكهربائي Electrophoresis

أجريت عملية الترحيل الكهربائي للكشف عن ناتج تضخيم الحامض النووي بتفاعل البلمرة المتسلسل وكما يلي :-

### 3-6-3-1- أعداد هلام الاكاروز

1- حضر هلام الاكاروز بتركيز 1.5 % وفق طريقة Sambrook (1989) بإذابة 1.5 غم من مسحوق الاكاروز نوع Agarose low EEO for Electrophoresis من إنتاج شركة chemo-supply السويدية في 100 مل من محلول \*TBE1X ( Tris-borate-EDTA ) من إنتاج شركة ThermoFisher Scientific Co.

2- وضع الخليط في جهاز المايكروويف Microwave لمدة دقيقتين حتى الذوبان التام.

3- ترك الهلام ليبرد الى درجة حرارة 50 م° .

4- أضيف 2 مايكروليتر من الصبغة الحمراء Red stain مع التحريك الخفيف لكي تمتزج الصبغة مع الهلام .

5- نقل لوح الهلام بعد تصلبه إلى جهاز الترحيل الكهربائي وغمر اللوح بمحلول الترحيل \*TBE 1X وتم إزالة مشط حفر التحميل من القالب .

حضر محلول TBE 1X من تخفيف TBE 10X بماء مقطر، بأخذ 10 مل من 10X TBE وإضافة 90 مل من الماء المقطر للحصول على TBE1X .

### 3-6-3-2- التحميل والترحيل

1- حملت نواتج التضخيم للحامض النووي داخل حفر الترحيل في لوح الهلام بعد مزجها بمحلول صبغة التحميل Loading dye بتركيز 6x ونسبة 5/3 (حجم/حجم) . إستعمل الدليل الحجمي DNA Marker من إنتاج شركة kaba الأمريكية وذلك لتحديد حجم حزم الحامض النووي الناتج من التضخيم .

2- تمت عملية الترحيل بإستعمال جهاز الترحيل الكهربائي نوع Enduro300 من إنتاج شركة Labnt الكورية لمدة 60 دقيقة بفرق جهد 70 فولت وتيار 65 ملي أمبير لتبدأ حركة الحامض النووي DNA من القطب السالب باتجاه القطب الموجب .

وبعد إكمال الترحيل صورت الحزم بجهاز UV transiluminaator بطول موجي 365 نانوميتر (Maniatis واخرون ، 1982) .

### 3-6-4- تحديد تتابعات القواعد النتروجينية Sequence

حددت تتابعات القواعد النتروجينية لنتائج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR للجين 18S لنيماتودا تعقد الجذور. *Meloidogyne* spp باستخدام البرايمرات ، إذ أرسل الشريط الأمامي فقط للبادئ إلى شركة Macrogene الكورية لغرض تحديد تسلسل التتابعات الخاصة بالحامض النووي المنقوص الاوكسجين .

### 3-6-5- تحليل بيانات تتابعات القواعد النتروجينية لجينوم ديدان تعقد الجذور

حللت تسلسلات النيوكلو تيدات التي تم الحصول عليها من الشركة الكورية Macrogene من المركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية National Center (NCBI) Biotechnology Information ورسمت شجرة التطور اعتماداً على تسلسلات النيوكلو تيدات للعزلات العالمية المسجلة في بنك الجينات Gene-Bank.

### 3-7- تهيئة الهجن الوراثية لنبات الطماطة المستخدمة في التجارب الحقلية

جلبت بذور عشر أصناف طماطة معتمدة ذات تراكيب وراثية مختلفة من المكاتب الزراعية وهي Maysaloun ، Narcan-8 ، Mariana ، Sato ، Madina ، Sunagri ، Meyameya ، Rockstar ، Sura ، Samar ، كما في الجدول (7) الذي يبين المعلومات الخاصة بهجن الطماطة ، إضافة الى صنف marmand Super الحساس للإصابة المستخدم كمقارنة ، نعتت البذور بالماء المقطر لمدة 4 ساعات ثم وضعت على مناديل ورقية في أطباق بتري حتى تجف بعدها زرعت في صحن بلاستيكية بالإضافة إلى أصص بلاستيكية (سنادين) مملوءة بمزيج من التربة والبتمس نسبة 1:2 المعقم بجهاز المؤصدة Autoclave كما في الفقرة 3-4 ، وسقيت يومياً لحين استخدام الشتلات بالتجارب الحقلية .

الجدول (7) البيانات الخاصة بالهجن الوراثية لنبات الطماطة غير محدودة النمو

الرمز	أسم الصنف	الشركة المنتجة	بلد المنشأ
1	Maysaloun	NUNHEMS	Germany
2	Narcan-8	PASA	Turkey
3	Mariana	DELTA	China
4	Sato	SATO	Holand
5	Madina	ATLAS	China
6	Sunagri	SUNAGRI	Turkey
7	Meyameya	SEMINIS	Thailand
8	Rock star	KISSAN	Taiwan
9	Sura	EL- MASA	Thailand
10	Samar	EL- MASA	Thailand
11	Super marmand	EMMA	China

8-3- تحضير لقاح ديدان تعقد الجذور *Meloidogyne spp* المستخدم في التجارب

أُتبعت طريقة Hussey و Bakker (1973) في إستخلاص لقاح ديدان تعقد الجذور RKN . جلبت نباتات طماطة مصابة من أحد البساتين التابعة لناحية الحسينية / كربلاء بعد ملاحظة أعراض الإصابة على المجموع الخضري بإصفرار وذبول الأوراق. نقلت العينات إلى المختبر وغسلت الجذور المصابة بتيار مائي خفيف لإزالة الأتربة العالقة بها وقطعت بواسطة مقص معقم إلى قطع صغيرة 2-3 سم ووضع في دورق زجاجي سعة 1000 مل من محلول هايبوكلورات الصوديوم NaOCl تركيز 1% وبعد رج الدورق بصورة جيدة لمدة 3 دقائق لتجانس المحلول وضعت في الخلاط الكهربائي لمدة 30 ثانية ثم مرر المحلول عبر سلسلة من المناخل تتدرج أقطارها (100 ، 150 ، 250 ، 400) مش ، غسلت محتويات المناخل عدة مرات بتيار مائي خفيف للتخلص من آثار هايبوكلورات الصوديوم حيث الأول والثاني لعزل الجذور

والشوائب والمنخل الأخير لجمع بيوض ويافاعات الطور الثاني J<sub>2</sub> وبعد جمع اللقاح في ورق أخذ 1مل من العالق بواسطة ماصة معقمة إلى شريحة العد وحسبت أعداد البيض ويافاعات الطور الثاني بإستعمال المجهر الضوئي المركب تحت قوة تكبير 40× واتبعت الطريقة نفسها عند تحضير كل لقاح في التجارب الحقلية.

### 9-3- إختبار حساسية هجن الطماطة من الإصابة بديدان تعقد

#### الجدور *Meloidogyne spp.*

إستخدمت عشرة أصناف طماطة إضافة إلى صنف سوبرمريموند Super Marmand الحساس للإصابة كمقارنة لمعرفة مدى حساسيتها للإصابة بديدان تعقد الجذور RKN ، وبعد ثلاث أسابيع على موعد زراعة البذور الفقرة (3-7) ، نقلت الشتلات بعمر 2-3 أوراق حقيقية إلى أصص بلاستيكية (سنادين) سعة 1.5 كغم مملوءة بمزيج من التربة والبيتموس نسبة 1:2 المعقم بالفورمالين تركيز 1 % ، وبمعدل 4 شتلات / أصيص وفق التصميم العشوائي الكامل Randomized Complete Design (CRD) بأربع مكررات لكل معاملة ، تركت الشتلات لمدة أسبوع لإستقرار وضع النباتات بالأصص ثم لقحت بديدان تعقد الجذور RKN والمضركما في الفقرة (3-8) وبواقع 1500 ± 50 بيضة ويافعة / أصيص تقريباً ، وإستخدام أنبوبة ماصة مدرجة ومعقمة لسحب اللقاح وأضافته للتربة بعمل شق طولي يبعد عن ساق النبات 2 سم وبعمق 3 سم ( ياس ، 2015 ) ، ثم غطيت بتربة خفيفة وسقيت النباتات عند الحاجة مع تسميدها بسماد NPK ( 20:20:20 ) بمعدل مره واحده كل أسبوعين بتركيز 1غم/ لتر ، وبعد مرور شهرين على إضافة اللقاح أخذت القراءات من خلال :-

1- دليل العقد الجذرية لكل صنف حسب طريقة Taylor و Sasser ( 1978 ) .

2 - أعداد الإثاث واليافاعات والبيوض داخل الجذور بتصبيغها وفق طريقة Byrd واخرون (1983).

3- أعداد الذكور واليافاعات في 150 غم من تربة كل مكرر .

### 3-9-1- حساب أعداد الإناث واليافعات والبيوض لديدان تعقد الجذور في جذور أصناف الطماطة *Meloidogyne spp.*

حسبت أعداد الإناث واليافعات والبيوض داخل جذور أصناف الطماطة بعد شهرين من إضافة لقاح النيما تودا بمعدل  $50 \pm 1500$  بيضة ويافعة  $J_2$  / اصيص ، وذلك بتصبيغها وفق طريقة Byrd وآخرون (1983) وتم التصبيغ بإتباع الخطوات التالية :-

- 1 - غسلت الجذور جيداً بتيار مائي خفيف لإزالة الأتربة العالقة بها .
- 2 - وضعت الجذور في ورق زجاجي سعة 1000 مل من محلول هايبيوكلورات الصوديوم تركيز 1% وتركت لمدة خمس دقائق .
- 3 - غسلت الجذور بالماء للتخلص من محلول هايبيوكلورات الصوديوم .
- 4 - غمرت الجذور في محلول حامض الخليك الثلجي تركيز 1% لثبات الصبغة .
- 5 - سكب المحلول الحامضي وأضيف لها 1 مل من الصبغة الحامضية و 30 مل ماء مقطر وسخن المحلول لمدة 30 ثانية وترك نصف ساعة في درجة حرارة المختبر ليبرد .
- 6 - غسلت الجذور جيداً للتخلص من آثار الصبغة ثم وضعت في 20 مل من محلول الكليسيروول الحامضي وسخن لمدة 30 ثانية وترك ليبرد .
- 7 - حملت الجذور على شرائح زجاجية وفحصت بالمجهر المركب تحت قوة تكبير  $40\times$  .

حضر المحلول الخاص لصبغة الفوكسين الحامضية من المواد التالية :-

- 1 - 35 غم مسحوق الصبغة .
  - 2 - 250 مل حامض الخليك الثلجي .
  - 3 - 750 مل ماء مقطر .
- أما محلول الكليسيروول الحامضي فحضر كآلاتي :-
- 1 - 700 مل كليسيروول .

2 - 300 مل ماء مقطر .

3 - 2 مل حامض الخليك الثلجي .

### 3-9-2- حساب أعداد الذكور واليافاعات لديدان تعقد الجذور

#### *Meloidogyne spp.* في 150 غم تربة

وزنت 150 غم من تربة كل أصيص ( مكرر) بعد إنتهاء 60 يوم على إختبار تجربة حساسية أصناف الطماسة ، ثم أضيف لها 1000 مل ماء وخلطت جيداً لتجانس ثم مرر المحلول عبر سلسلة من المناخل (100 ، 150 ، 250 ، 400) مش ، بعدها جمعت محتويات المنخل الأخير في ورق زجاجي وسحب 1مل من المحلول بواسطة ماصة مدرجة ووضع على شريحة العد لحساب الكثافة العددية للديدان حسب المعادلة التالية :-

الكثافة العددية النهائية للديدان (Final population) = عدد الذكور واليافاعات في التربة + عدد البيوض والاناث واليافاعات في الجذر + عدد العقد على الجذر

ومنه تم حساب معامل التكاثر Reproduction Factor للديدان حسب المعادلة التالية :

$$\text{معامل التكاثر (RF)} = \frac{\text{الكثافة العددية النهائية لأفراد الديدان}}{\text{مستوى اللقاح الأولي المستخدم في التلوين}}$$

( Tedford و Fortnum ، 1988 )

### 3-10-10- قياس المعايير الخضرية للهجن الوراثية لنبات الطماسة

#### 3-10-10-1- النسبة المئوية لإنبات البذور

نفذت هذه التجربة بتاريخ 2020/10/17 ، إذ عقت بذور الهجن الوراثية لنبات الطماسة بمحلول هايبوكلورات الصوديوم تركيز 2% لمدة 3 دقائق ثم غسلت جيداً بماء مقطر للتخلص من تأثير المحلول ووضعت في أطباق بتري على ورق ترشيع معقم وغطيت بورق ترشيع معقم آخر حتى تجف ، بعدها زرعت البذور في أصص بلاستيكية (سنادين) سعة 1.5 كغم مملوءة بمزيج من التربة والبتمسوس نسبة 1:2 المعقم بجهاز المؤصدة Autoclave كما في الفقرة 3-4 ، وبمعدل 6 بذور/ أصيص ، وفق التصميم العشوائي الكامل CRD بثلاث مكررات لكل معاملة وباستخدام

الصنف Super Marmand كمقارنة ، مع السقي وتوفير الحرارة والرطوبة المناسبة  
لهما داخل الظلة.

بعدها أخذت القراءات لمعرفة نسب الإنبات للهجن الوراثية وفق المعادلة التالية:-

$$\text{نسبة الإنبات} = \frac{\text{عدد البذور النابتة}}{\text{العدد الكلي للبذور المزروعة}} \times 100$$

(بامؤمن ، 1994)

### 3-10-2- محتوى الكلوروفيل الكلي للهجن الوراثية لنبات الطماطة

تم قياس محتوى الكلوروفيل للهجن الوراثية لنبات الطماطة الفقرة (3-10-1) ،  
وبعد وصول الشتلات عمر 5-6 أوراق حقيقية ، أُستخدم جهاز Content Meter  
Chlorophyll نوع SPAD-502 لقياس نسبة الكلوروفيل حيث أُخذت القراءات  
للأوراق أسفل القمة بواقع 4 أوراق / أصيص ، ثم أُخذ متوسط عام كل معاملة  
(Minotti واخرون ، 1994) وفق التصميم العشوائي الكامل Complete  
Randomized Design (CRD) بثلاث مكررات لكل معاملة وباستخدام الصنف  
Super Marmand للمقارنة وقيست بالوحدات SPAD-unit استناداً إلى  
(Jemison و Williams ، 2006) .

### 3-11- الكشف عن جينات المقاومة Mi-genes للهجن الوراثية المنتخبة

#### نبات الطماطة بإستعمال تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل

أُجري الكشف عن الجينات في المختبر الجزيئي التخصصي في بغداد ولثلاث هجن  
وراثية منتخبة فقط ( Samar - Meyameya - Maysaloun ) استناداً إلى إختبار  
حساسيتها للإصابة بالديدان الفقرة (3-9) وقياس المعايير الخضرية الفقرة (3-10) ،  
وفق الخطوات الآتية :-

### 3-11-1- إستخلاص الحامض النووي DNA من الانسجة النباتية

أُستخدمت عدة الإستخلاص القياسية المنتجة من قبل شركة بروميكا الأمريكية  
Wizard genomic DNA Purification kit وأُستخلص الحامض النووي من  
أوراق أصناف الطماطة حسب الخطوات التالية :-

1- سحقت 40 ملغم من الاوراق النباتية بالنتروجين السائل باستخدام الهاون الخزفي ثم نقلت في انابيب سعه 1.5 مل Eppendorf tube .

2- أُضيف 600 مايكروليتر من محلول تحليل النوى Nucleic lysis Solution ومزج بواسطة المازج الهزاز Vortex لمدة 10 ثواني .

3- حضنت العينة بدرجة حرارة 65 م° لمدة 15 دقيقة .

4- أُضيف 3 مايكروليتر من RNase بتركيز 4 ملغم/مل .

5- مزجت العينة جيداً ثم حضنت بدرجة 37م° لمدة نصف ساعة ومع مزج النموذج كل 2-3 مرات اثناء مدة الحضانة .

6- أُضيف 200 مايكروليتر من محلول ترسيب البروتين Protein precipitatio ومزج بواسطة المازج الهزاز Vortex بالسرعة العالية لمدة 20 ثانية ثم أُجري نبذ مركزي للعينة لمدة 3 دقائق بسرعة 14000 دورة / دقيقة .

7- نقل الرائق (الطافي) بحذر إلى أنبوبة معقمة جديدة بحجم 1.5 مل حاوية على 600 مايكروليتر من كحول الأيثيل المطلق المبرد ثم مزج بهدوء لحين ظهور كتله مرئية من الدنا .

8- أُجري طرد مركزي لمدة دقيقة وبسرعة 14000 دورة / دقيقة . بعدها تم التخلص من الرائق ثم أُضيف 600 مايكروليتر من الكحول الإيثيلي تركيز 70% .

9- أُجريت عملية طرد مركزي لمدة دقيقة وبسرعة 14000 دورة / دقيقة ، بعدها تم التخلص من الرائق وتركت الأنبوبة الحاوية على راسب الدنا مفتوحة لمدة 15 دقيقة للتخلص من بقايا الكحول .

10- أُضيف 100 مايكروليتر من محلول الترطيب Rehydration Solution ثم خزنت العينات بدرجة حرارة 4 م° لحين الإستخدام .

### 3-11-2- أنواع البرايمرات المستخدمة في التجربة

أُستخدم بادئاً أثنان فقط للكشف عن جينات المقاومة Mi لمرض ديدان تعقد الجذور RKN للأصناف المختارة وكما يلي :-

### Mi 2.3-1-2-11-3 - بادئ

أستخدم هذا البادئ من قبل الباحث (Seah وآخرون، 2007) للكشف عن جين Mi1.2 الذي يضيف المقاومة لنباتات الطماطة ضد مرض ديدان تعقد الجذور RKN إذ يظهر صورة للجين بشكل حزم للحامض النووي DNA تتراوح (380 و430) قاعدة نتروجينية ، إذ تمثل الحزم بحجم 430 قاعدة نتروجينية ، ان النباتات الحساسة للمرض متماثلة الأليلات المتتحية Homozygous (mi/mi) والحزم بحجم 380 قاعدة نتروجينية المقاومة للمرض متماثلة الأليلات السائدة Homozygous (Mi/Mi). أما النباتات الحاوية على الحزمتين معاً (380 و430) قاعدة نتروجينية فتعتبر أصناف متباينة الأليلات مقاومة Resistance Heterozygous (Mi/mi) .

### Intron 2-2-11-3 - بادئ

استخدم هذا البادئ من قبل الباحث (Jablonska وآخرون ، 2007) للكشف عن مجموعة جينات Mi في نباتات الطماطة الحاملة لهذا الجين والتي تعتبر مقاومة لديدان تعقد الجذور RKN ، إذ تم الكشف عن هذه الجينات من خلال ظهور الحزم بأحجام مختلفة وكما يلي :-

أ- حزم بحجم 622 قاعدة نتروجينية للكشف عن وجود جين Mi1.1 كجين للمقاومة والنباتات غير الحاملة له تعتبر غير مقاومة للمرض لموقع هذا الجين .

ب- حزم بحجم 1186 قاعدة نتروجينية للكشف عن جين Mi-1.4 في النباتات المقاومة وحزم بحجم 981 قاعدة نتروجينية في النباتات الحساسة اما العينات الحاملة لكلا الحزمتين فتعتبر مقاومة متباينة الأليلات Heterozygous Resistance .

ج- حزم بحجم 1410 قاعدة نتروجينية للكشف عن جين Mi-1.6 في النباتات المقاومة للمرض وحزم بحجم 1353 قاعدة نتروجينية في النباتات الحساسة والعينات الحاملة لكلا الحزمتين تعتبر مقاومة متباينة الأليلات Heterozygous Resistance .

### 3-11-3- تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reactions

للكشف عن وجود الجينات المقاومة لديدان تعقد الجذور. *Meloidogyne* spp في أصناف الطماطة المنتخبة باستخدام برايمرات متخصصة كما في الجدول (8) التي تم الحصول عليها من الشركة الكورية (Macrogen) .

تم تحضير البرايمرات على أفراد بإذابتها بماء معقم خالي من الأيونات و خالي من أنزيم RNAase حسب توصيات الشركة المنتجة للوصول لتركيز 100 بيكومول لكل بادئ ، بعد ذلك خفف البرايمر لتركيز 10 بيكومول بإضافة 10 مايكرو ليتر من البرايمر إلى 90 مايكروليتر من الماء منزوع الأيونات والأنزيمات وتم التضخيم على وفق البرنامج الموضح بالجدول (9) وحفظت بعد ذلك في الثلاجة تحت درجة 4 م° لحين الإستخدام .

الجدول (8) البادئات المستخدمة للكشف عن جينات المقاومة *Mi-genes* والبيانات الخاصة بأحجامها الجزيئية المتوقعة في أصناف الطماطة المنتخبة من الإصابة بديدان تعقد الجذور

المصدر	حجم البادئ	تسلسل البادئ	إسم الجين	إسم البادئ
Seah واخرون(2007)	430,380	TGGAAAAATGTTGAATTTCTTTTG GCATACTATATGGCTTGTTTACCC	Mi1.2	<b>Mi23</b>
Jablonska واخرون (2007)	622,1353,11 86,1410,981	TTCTCTAGCTAAACTTCAGCC TTTTTCGTTTTTCCATGATTCTAC	Mi- 1.1,1.2,1.4,1.6	<b>Intron</b>

الجدول (9) الظروف المثلى لكل بادئ من البوادئ المستخدمة في التجارب للكشف عن جينات المقاومة في تفاعل البلمرة المتسلسل

مرحلة إنتهاء التفاعل	مرحلة الإستطالة النهائية دورة واحدة	مرحلة الإستطالة الأولية دورة 35	مرحلة إلتحام البادئ دورة 35	مرحلة المسخ النهائية دورة 35	مرحلة المسخ الأولية دورة واحدة	البادئ
4 م° لمدة 5 دقائق	72 م° لمدة 5 دقائق	72 م° لمدة 30 ثانية	58 م° لمدة دقيقة	95 م° لمدة 30 ثانية	95 م° لمدة 3 دقائق	<b>Intron</b>
		72 م° لمدة دقيقة	57 م° لمدة دقيقة	94 م° لمدة 30 ثانية	94 م° لمدة 5 دقائق	<b>Mi23</b>

### 3-11-4- تحضير مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR

أُستخدمت العدة القياسية PCR Pre-mix المجهزة من شركة INTRON الكورية في تفاعل البلمرة المتسلسل PCR والتي تتكون من المزيج التالي :-

Mgcl<sub>2</sub> ( 4mM)

dATP ( 400μM)

dGTP ( 400μM)

dCTP ( 400μM)

dTTP ( 400μM)

Taq Polymerase (2.5 Unit) والذي حجمه النهائي 5 مايكروليتر. حضر مزيج التفاعل PCR من خلال مزج المكونات الموضحة في الجدول أدناه (10)

الجدول (10) مكونات عدة تفاعل البلمرة المتسلسل والإضافات التابعة للتفاعل

المواد	الحجم (مايكروليتر)	التركيز
Taq PCR PreMix	5	MgCl <sub>2</sub> (4Mm) dATP ( 400μM) dGTP( 400μM) dCTP( 400μM) dTTP( 400μM) Taq polymerase ( 2.5 Unit )
البادئ الامامي	1	10 بيكومول / مايكروليتر
البادئ الخلفي	1	10 بيكومول / مايكروليتر
ماء مقطر	16	17-16
الحامض النووي المنقوص الاوكسجين	3-1	ng250-150
الحجم النهائي	25	_____

مزجت المكونات بواسطة المازج الهزاز vortex لعدة ثواني لضمان تجانس المكونات ووضعت العينات في جهاز تفاعل PCR و برمج الجهاز بالدرجات الحرارية حسب كل بادئ وفق البحوث العالمية .

### 3-11-5- ترحيل العينات على هلام الاكاروز

رحلت العينات على هلام الاكاروز بتركيز 3% إذ حضر هلام الأكاروز من إذابة 2.4 غم من الاكاروز في 80 مل من المحلول الناتج من خلط 90 مل ماء مقطرو 10 مل من محلول TBE 10X\* في جهاز التسخين Hot plate، ترك الهلام ليبرد ثم أضيف له 2 ميكروليتر من صبغة Red safe بتركيز 0.5 ميكروغرام / مل وأجريت عملية مزج للحصول على خليط متجانس مع تجنب تكون الفقاعات عند صب الأكاروز في صفيحة الهلام (Tray) ، بعدها صب الاكاروز في الحوض الخاص بجهاز الترحيل الكهربائي و ثبت المشط Comb في الحوض وترك الهلام ليتصلب ، بعدها رفع المشط ثم أضيف محلول TBE تركيز 1X إلى الهلام بحيث يغمر بالكامل وحمل نواتج PCR على هلام الأكاروز 3% بإستعمال وحدة الترحيل الكهربائي الأفقي حيث وضع في الحفر بواقع 7 مايكروليتر وترك الأول ليتم وضع Ladder فيه بمقدار 7 ميكروليتر مع مؤشر الدليل الحجمي DNA-Ladder من (100-2000) bp ورحلت كهربائياً (50 تيار و 70 فولت .سم<sup>-1</sup>) لمدة (180 دقيقة) وبعد ترحيل النواتج وظهور الحزم صور الهلام ليتسنى بعد ذلك قياس حجم البانندات الظاهرة من خلال مقارنتها مع بانندات الليدر الموازية لها والمعلومة القياس .

### 3-12- تهيئة معلق بيض ديدان تعقد الجذور. *Meloidogyne* spp.

أُنتظت كتل البيض من العقد المتكونة على جذور نباتات طماطة مصابة بالديدان وعولمت بمحلول هايبوكلورات الصوديوم NaOCL تركيز 1% لمدة دقيقتين مع التحريك المستمر بواسطة فرشاة ناعمة لفصل البيوض المتجمعة من الكتل الجيلاتينية ووضعت في خلاط كهربائي أقل سرعة للحفاظ على البيوض ولمدة 30 ثانية بعدها سكب المعلق في مناخل تحت تيار مائي خفيف للتخلص من آثار المحلول واليرقات الفاقسه وجمع الراشح المار عبر سلسلة من المناخل وصولاً إلى المنخل الأخير حجم 400 مش وكررت الطريقة أكثر من مره للحصول على بيض الديدان ، سحب 2مل من المعلق بواسطة ماصة معقمة في شريحة العد ( Counting slide ) لتقدير عدد البيوض في 2 مل ( الحكيم ، 2009 ) والحاوي على 100 بيضة تقريباً لمعاملته بمبيدات الإختبار لاحقاً .

### 3-12-1- إختبار تأثير التراكيز المختلفة للمبيد الإحيائي Verox وأوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs في تثبيط فقس بيوض ديدان تعقد الجذور *Meloidogyne spp.* مختبرياً

تم تهيئة أطباق بلاستيك ( أطباق بتري ) قطر 9 سم وإرتفاع 2 سم وأضيف إليها 5 مل لكل من المواد المستخدمة في التجربة وبتلات تراكيز لكل معاملة وهي (1000 ، 1500 ، 2000) ppm للمبيد الإحيائي Verox ، وتركيز (1000 ، 2000 ، 4000) ppm لأوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs (بعد إذابته في حامض الخليك HCL) وكمل الحجم إلى 7 مل بإضافة 100 بيضة / طبق ، والمحضر في الفقرة السابقة (3-12) ، نفذت هذه التجربة حسب التصميم العشوائي الكامل Complete Randomized Design (CRD) وبتلات مكررات لكل تركيز مع عمل مقارنة باستخدام ماء مقطر معقم ومعاملة المبيد الكيميائي Velum Prime بتركيز 400 ppm حسب توصية الشركة المنتجة ، وضعت الأطباق في الحاضنة بدرجة حراره 28 م° ثم عد البيض الفاقس تحت عدسة المجهر بقوة تكبير 40X وعلى ثلاثة أزمنة (24 ، 48 ، 72) ساعة وفق المعادلة التالية :-

$$\text{النسبة المئوية للفقس} = \frac{\text{عدد البيض الفاقس}}{\text{عدد البيض الكلي في الطبق}} \times 100$$

ومنه تم حساب النسبة المئوية المصححة للبيض المثبط باستعمال معادلة Abbott (1925)

$$\text{النسبة المئوية المصححة لتثبيط الفقس} = \frac{\text{البيض المثبط في المعاملة} - \text{البيض المثبط في المقارنة}}{100 - \text{البيض المثبط في المقارنة}} \times 100$$

### 3-13- جمع يافعات الطور الثاني J<sub>2</sub> لديدان تعقد الجذور *Meloidogyne spp.*

تم الحصول على يافعات الطور الثاني juvenile 2 (J<sub>2</sub>) لديدان تعقد الجذور RKN بطريقة أقماع بيرمان Baermann Funnul ، حيث خلطت عينة تربة موبوءة بديدان تعقد الجذور قدر 150 غم وأضيف لها لتر ماء ووضع فوق منديل ورقي بعد وضعه على الشبك داخل فلاسك زجاجي لجمع المعلق كما في الشكل (7) ، وتركت العينات مدة 72 ساعة ثم أخذ المحلول ( المعلق ) ومرر خلال منخل حجم

250 مش للحصول على يافعات الطور الثاني J<sub>2</sub> لمعاملتها بمبيدات الإختبار لاحقاً ( الحازمي ، 2009 ) .



الشكل (7) طريقة أقماع بيرمان Baermann Funnul لإستخلاص يافعات الطور الثاني

### 3-13-1- إختبار تأثير التراكيز المختلفة للمبيد الاحيائي Verox وأوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs في هلاك يافعات الطور الثاني لديدان تعقد الجذور *Meloidogyne spp.* مختبرياً

وضع 3مل من المحلول المحضر في الفقرة السابقة (3-13) والحاوي على 100 يافعة (J<sub>2</sub>) في طبق بتري قطر 9 سم وإرتفاع 2 سم وكمل الحجم إلى 10 مل لكل من المواد المستخدمة في التجربة وبثلاث تراكيز لكل معاملة وهي (1000 ، 1500 ، 2000 ppm) للمبيد الاحيائي Verox وتركيز (1000 ، 2000 ، 4000 ppm) لأوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs ، نفذت هذه التجربة حسب التصميم العشوائي الكامل (CRD) Complete Randomized Design وبثلاث مكررات لكل تركيز مع عمل مقارنة بإستخدام ماء مقطر معقم ومعاملة المبيد الكيماي Velum Prime بتركيز 400 ppm حسب توصية الشركة المنتجة ووضعت في الحاضنة بدرجة حراره 28±2 م° ثم أخذت القراءات بعد (24 ، 48 ، 72) ساعة من خلال عد اليرقات (اليافعات) غير المتحركة في الطبق ( تعد اليرقة ميتة إذا تم وخزها بشعرة رفيعة ولم تتحرك بالإضافة إلى إنها تكون بشكل خط مستقيم وتظهر بلون بني) (العبيدي ، 1985) وحسبت النسبة المئوية لموت اليافعات بإعتماد المعادلة التالية :-

$$\text{النسبة المئوية لموت اليافاعات} = \frac{\text{عدد اليافاعات غير المتحركة في الطبق}}{\text{العدد الكلي لليافاعات المختبرة في الطبق}} \times 100$$

( Dababat و Sikora ، 2007 و Khattak ، 2008 )

### 3-14- إختبار التضاد بين المبيد الاحيائي Verox والمبيد الكيميائي

#### Velum Prime في أطباق بتري

حضر الوسط الزرعي PDA ( بإذابة 20 غم من مسحوق الوسط في 500 مل ماء مقطر) في دورق زجاجي حجم 500 مل وعقم بجهاز المؤسدة Autoclave على درجة حرارة 121 درجة مئوية وضغط 15 بار لمدة 20 دقيقة ، بعد إنتهاء التعقيم وإنخفاض درجة الحرارة إلى مرحلة قبل التصلب أضيف المبيد الكيميائي Velum Prime بتركيز 300 ppm ( أقل من الجرعة الموصى بها ) في نفس الدورق الزجاجي ومزج جيداً مع الوسط الزرعي ثم صب الوسط في أطباق بتري وبعد التصلب أضيف المبيد الاحيائي Verox بتركيز 2000ppm ، ونفذت معاملة مقارنة بإضافة المبيد الاحيائي فقط إلى الوسط الزرعي PDA ، حضنت الأطباق بدرجة حرارة 30±3 م° لمدة 72 ساعة لأخذ النتائج .

### 3-15- إختبار كفاءة المبيد الاحيائي Verox وأوكسيد الزنك النانوي

#### ZnO-NPs على بعض معايير النمو للأصناف المدروسة تحت

#### ظروف البيت البلاستيكي

أُعتمدت ثلاث هجن وراثية منتخبة لنبات الطماطة (Maysaloun - Samar - Meyameya) إستناداً إلى إختبار حساسيتها للإصابة بالديدان الفقرة (3-9) وقياس المعايير الخضرية الفقرة (3-10) ، نقلت شتلات نباتات الطماطة بعمر 4 – 5 أوراق حقيقية إلى أصص بلاستيكية ( سنادين ) سعة 1.5 كغم مملوءة بمزيج من التربة والبتموس نسبة 2:1 المعقم بالفورمالين تركيز 1% وبمعدل 3 شتلات لكل أصيص وفق التصميم العشوائي الكامل Complete Randomized Design (CRD) بثلاث مكررات / صنف ، وشملت التجربة المعاملات التالية :-

1- المعاملة بإضافة المبيد الاحيائي Verox تركيز 2000ppm .

2- المعاملة بإضافة أوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs تركيز 4000ppm.

### 3- معاملة الشاهد بدون أي إضافة .

تمت إضافة المبيد الاحيائي والمادة النانوية بعد 3 أيام من نقل الشتلات إلى السنادين وعلى ثلاث مراحل بين كل مرحلة وأخرى 15 يوم وبمعدل 100 مل لكل نبات ، سقيت النباتات عند الحاجة وبعد مرور شهرين على إجراء التجربة وحسبت معايير النمو بأخذ الوزن الرطب والجاف للمجموع الجذري والخضري بإستعمال الميزان الكهربائي الحساس ، تم فصل المجموع الخضري عن الجذري من منطقة التاج بواسطة مقص وأخذ الأوزان الرطبة ثم حفظت العينات في أكياس ورقية ووضعت في الفرن الكهربائي على درجة حرارة 70م° لمدة 72 ساعة حتى ثبات الوزن وبعدها أخذت الاوزان الجافة لكل من المجموع الخضري والجذري .

### 3-16- مكافحة ديدان تعقد الجذور. *Meloidogyne spp* على الهجن الوراثية المنتخبة لنبات الطماطة في ظروف البيت البلاستيكي

أُعدت ثلاث هجن وراثية لنبات الطماطة ( Meyameya - Maysaloun - Samar ) إستناداً إلى إختبار حساسيتها للإصابة بالديدان الفقرة (3-9) وقياس المعايير الخضرية الفقرة (3-10) ، بالإضافة إلى إستخدام صنف Super Marmande الحساس للإصابة كمقارنة مع الهجن الوراثية المنتخبة ، نقلت شتلات نباتات الطماطة بعمر 5 – 6 أوراق حقيقية إلى أصص بلاستيكية ( سنادين ) سعة 1.5 كغم مملوءة بمزيج من التربة والبتموس نسبة 1:2 المعقم بالفورمالين تركيز 1% وبمعدل 4 شتلات /أصيص وفق التصميم العشوائي الكامل Randomized Complete Design (CRD) بثلاث مكررات / صنف وتركت لمدة أسبوع لإستقرار وضع النباتات ثم لقت بديدان تعقد الجذور RKN بواقع 50 ± 1500 بيضة ويافعة / أصيص، تم إضافة لقاح النيماتودا (المحضر بالفقرة السابقة 3-8) بإستخدام أنبوبة ماصة مدرجة ومعقمة لسحب اللقاح وأضافته للتربة بعمل شق طولي يبعد عن ساق النبات 2 سم وبعمق 3 سم (ياس ، 2015) وغطيت بتربة خفيفة وسقيت النباتات عند الحاجة مع تسميدها بسماد NPK ( 20:20:20 ) وبمعدل مره واحده كل 14 يوم بتركيز 1غم / لتر .

وشملت التجربة على المعاملات الآتية :-

1- معاملة المكافحة الاحيائية / (Verox) وهومبيد وقائي علاجي من انتاج شركة Marvel الأمريكية مادته الفعالة مجموعة من البكتريا الصديقة للبيئة Rhizobacteria وتم إستخدامه بتركيز 2000ppm وعلى ثلاث مراحل بين كل مرحلة وأخرى 15 يوم .

2- معاملة المكافحة بالمواد النانوية / أوكسيد الزنك النانوي (ZnO-NPs) وتم إستخدامه بتركيز 4000ppm وعلى ثلاث مراحل بين كل مرحلة وأخرى 15 يوم .

3- معاملة المكافحة الكيميائية / (Velum Prime) وهو عبارة عن مبيد كيميائي يحتوي على المادة الفعالة Fluopyram من إنتاج شركة BAYER الألمانية وتم إستخدامه بتركيز 400 ppm/لتر حسب توصية الشركة المنتجة وعلى مرحلتين بين كل مرحلة وأخرى 20 يوم .

4- معاملة المكافحة الكيميائية / (Velum Prime) أستخدم بتركيز (300 ppm) أقل من الجرعة الموصى بها وعلى مرحلتين بين كل مرحلة وأخرى 20 يوم .

5- المعاملة التكاملية / وتضمنت إستخدام المبيد الكيميائي Velum Prime (300ppm) + المبيد الاحيائي Verox (2000ppm) + أوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs (4000ppm) .

6- معاملة المقارنة الملوثة / أستخدام اللقاح فقط بدون إضافة أي مبيد أو مادة نانوية .

7- معاملة المقارنة غير الملوثة / بدون أي إضافات .

تمت إضافة المبيد الاحيائي والكيميائي والمادة النانوية بعد 3 أيام من إضافة اللقاح إلى المعاملات بإستثناء معاملة المقارنة غير الملوثة ، وبمعدل 100 مل لكل نبات من خلال عمر التربة ، وتركت لمدة شهرين لأخذ القراءات بحساب عدد العقد ودرجة الإصابة تبعاً للمقياس الذي وضعه Taylor و Sasser (1978) والمكون من خمس درجات كما في الفقرة (3-1) الجدول رقم (4) .

### 17-3- إختبار بقاء المبيد الإحيائي Verox في التربة المعاملة

بعد إنتهاء فترة تجربة المكافحة الحقلية للديدان الفقرة (3-16) تركت الأصص المزروعة لنباتات الطماطة والمعاملة بالمبيد الإحيائي Verox مدة أربعة أشهر لاختبار بقاءها في التربة المعاملة ، حيث أخذت عينات من التربة 1غم/ أصيص ، وأضيف 99 مل ماء مقطر للحصول على التخفيف الأول وعمل منها سلسلة من التخافيف ثم أخذ جزء من التخفيف  $10^{-3}$  بواسطة إبرة تلقيح بحجم 1مل ولقحت الأطباق الحاوية على وسط (NA) Nutrient Agar (المحضر من إذابة 7 غم من مسحوق الوسط في 250 مل ماء مقطر) ووضعت الأطباق في الحاضنة على درجة حرارة  $30 \pm 3$  م° لمدة 72 ساعة للكشف عن تواجد البكتريا .

### 18-3- التحليل الاحصائي

تم تحليل نتائج البيانات على أساس التصميم العشوائي الكامل Complete Randomized Design (CRD) لجميع التجارب المختبرية والحقلية . وحللت البيانات باستخدام برنامج (SAS) Statistical Analysis System (2012) للتحليل الاحصائي وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار اقل فرق معنوي L.S.D تحت مستوى معنوية 0.05 .

## رابعاً : النتائج والمناقشة Results and Discussion

### 1-4- نتائج المسح الحقلی

#### 1-1-4- النسبة المئوية لإصابه حقول الطماطة وشدة إصابتها بديدان تعقد الجذور

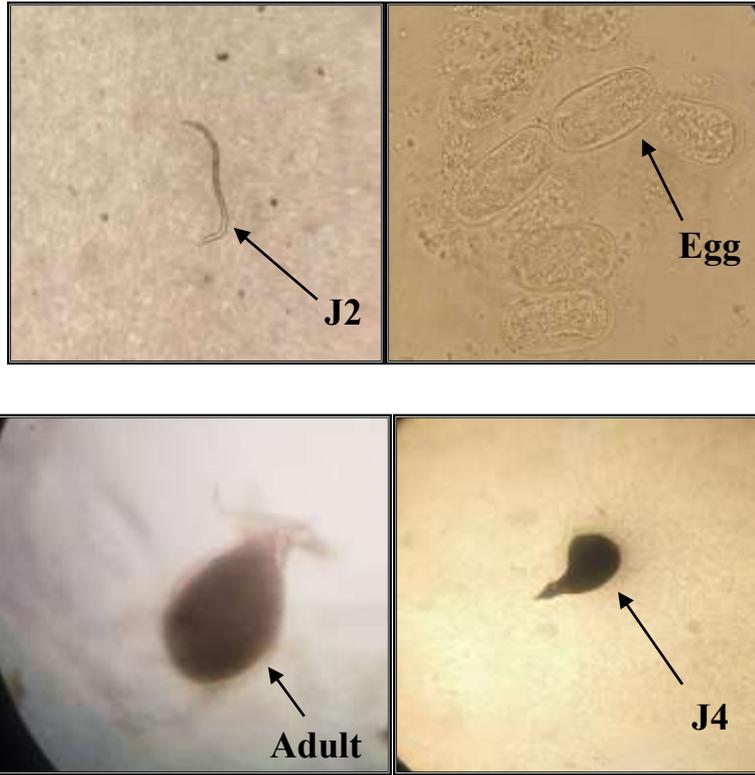
#### *Meloidogyne spp.* في حقول الدراسة المشمولة بالمسح

أظهرت نتائج المسح الحقلی ان نباتات الطماطة المصابة من جميع الحقول التي شملها المسح 38 نبات مصاب من اصل 140 عينة وكما مبين بالجدول (11) ان النسبة المئوية للحقول المصابة التي شملها المسح بلغت 27.14 % في محافظة كربلاء كانت مصابة بديدان تعقد الجذور RKN ، وقد بلغ متوسط نسبة الإصابة 22.79 % ومتوسط شدة إصابة بلغ 13.25% في جميع الحقول التي شملها المسح ، إذ كانت أعلى نسبة إصابة في ناحية الحسينية الحقل (2) وبلغت 75% وشدة إصابة 60 % تلاها منطقة الإبراهيمية الحقل (1) بنسبة إصابة بلغت 72.72 % وشدة إصابة بنسبة 58.18 % . فيما لم تسجل أي إصابة لديدان تعقد الجذور RKN في المزارع التابعة لمنطقة خان الربع وناحية الحر ومزارع العتبة العباسية وكذلك منطقة الإبراهيمية الحقل (2) . قد يعود السبب لإرتفاع نسبة الإصابة إلى زراعة نباتات حساسة لديدان تعقد الجذور RKN أو توفر الظروف المناسبة للنيماتودا من ناحية درجة الحرارة ونوع التربة أو وجود الأدغال والتي تعد عوامل ثانوية للنيماتودا فضلاً عن عدم إتباع الطرق الزراعية بصورة صحيحة لقللة الخبرة ، أما من ناحية انخفاض نسبة الإصابة في بعض الحقول قد يكون السبب إحتواء التربة على الأحياء من المفترسات والمتطفلات التي تقلل من أعداد النيماتودا في التربة أو إستخدام المبيدات من قبل المزارعين والتي تقلل من الكثافة العددية للنيماتودا وهذا ما تم تأكيده من قبل أصحاب المزارع في ناحية الحر وخان الربع بإستخدامهم للمبيدات على الأقل مرتين في الأسبوع دون جدوى ودون رقابة بهدف الربح ، وقد يعزى السبب إلى طبيعة الصنف ومقاومته للنيماتودا وبالتالي لا تكمل دورة حياتها على النبات العائل أو عدم توفر الظروف المناسبة للنيماتودا ، أغلب هذه الأسباب أدت إلى التفاوت في نسبة الإصابة لبعض المناطق دون الأخرى وهذا يتفق مع ما وجدته Sikora و Fernandez (2005) إلى إنتشار ديدان تعقد الجذور في مناطق زراعية مختلفة ، كما أشارت نتائج الجدول ان نسبة الإصابة كانت منخفضة في الحقول التي تروى بالتنقيط مقارنة بإرتفاع نسبة الإصابة في الحقول التي تروى سياً كما في ناحية الحسينية والابراهيمية

والجدول الغربي . إذ ان السقي بطريقة السيح تؤدي إلى جرف أنواع كثيرة من الممرضات ومن ضمنها النيما تودا الممرضة للنبات إلى المناطق الخالية منها وهذا ما يؤكد زيادة الإصابة في الحقول التي تسقى عن طريق السيح . وكما موضح بالشكل (8)

**الجدول (11) النسبة المئوية لأصابه حقول الطماطة وشدة إصابتها بديدان تعقد الجذور في مناطق الدراسة المشمولة بالمسح الحقل**

منطقة الجمع	رقم الحقل	عدد العينات	العينات المصابة	نسبة الإصابة %	شدة الإصابة %
ناحية الحسينية	1	14	6	42.85	25.71
	2	8	6	75	60 %
	3	10	3	30	12
الإبراهيمية	1	22	16	72.72	58.18
	2	6	0	0	0
	1	10	0	0	0
خان الربع	2	12	0	0	0
	3	10	0	0	0
	1	8	4	50	20
الجدول الغربي	1	8	4	50	20
ناحية عون	1	7	2	28.57	5.71
ناحية الحر	1	12	0	0	0
	2	12	0	0	0
قضاء طويريج	1	5	1	20	4
العتبة العباسية	1	4	0	0	0
معدل متوسط نسبة وشدة الإصابة				22.79	13.25
النسبة المئوية للحقول المصابة				27.14	



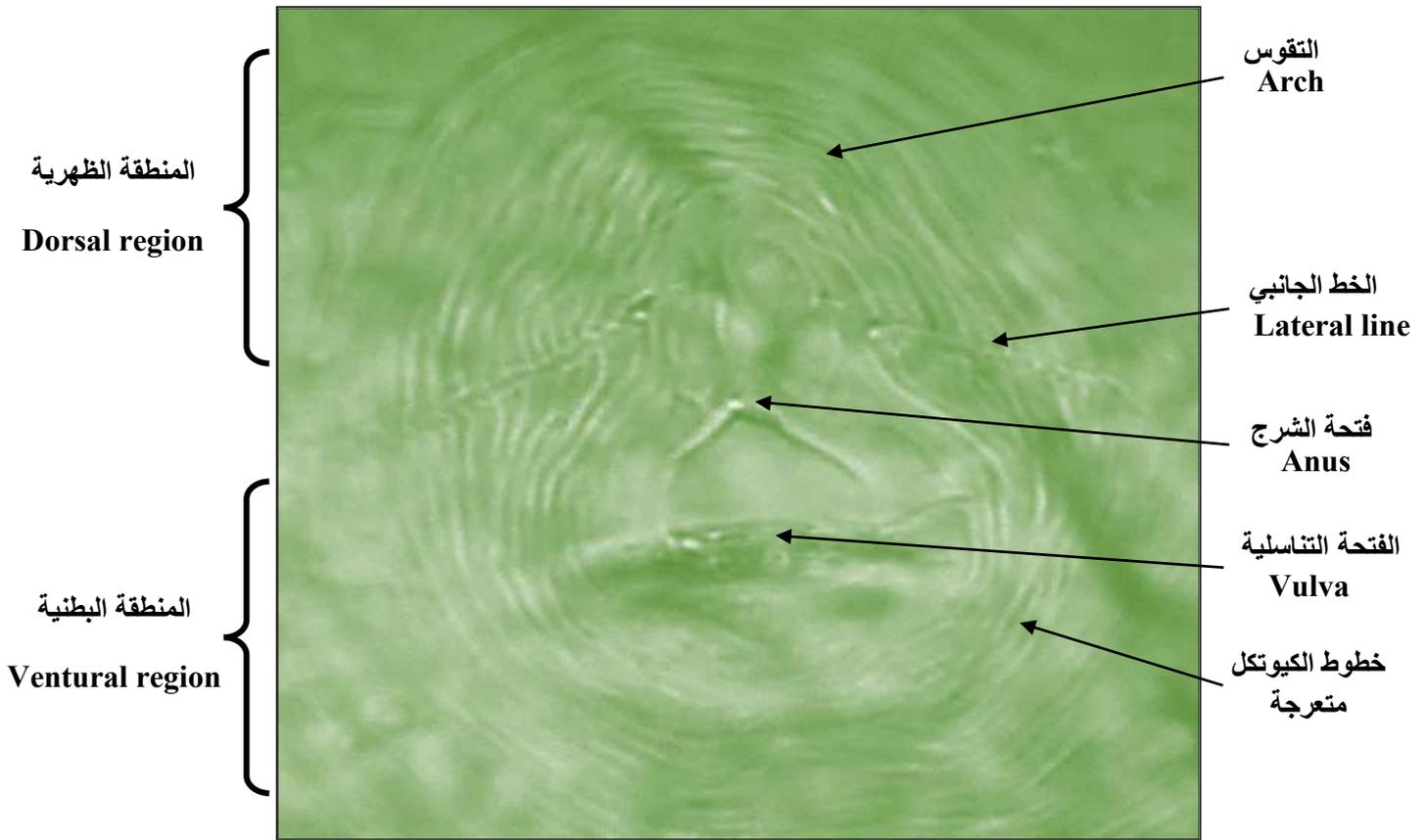
الشكل (8) أطوار مختلفة من ديدان تعقد الجذور بعد فحصها مجهرياً من العينات المصابة ضمن مناطق المسح الحقلية

\*\* Egg = بيض / J2 = يافعات الطور الثاني (المسؤول عن أحداث الإصابة) J4 = يافعات الطور الرابع / Adult = الكاملة ( الطور البالغ للأنثى )

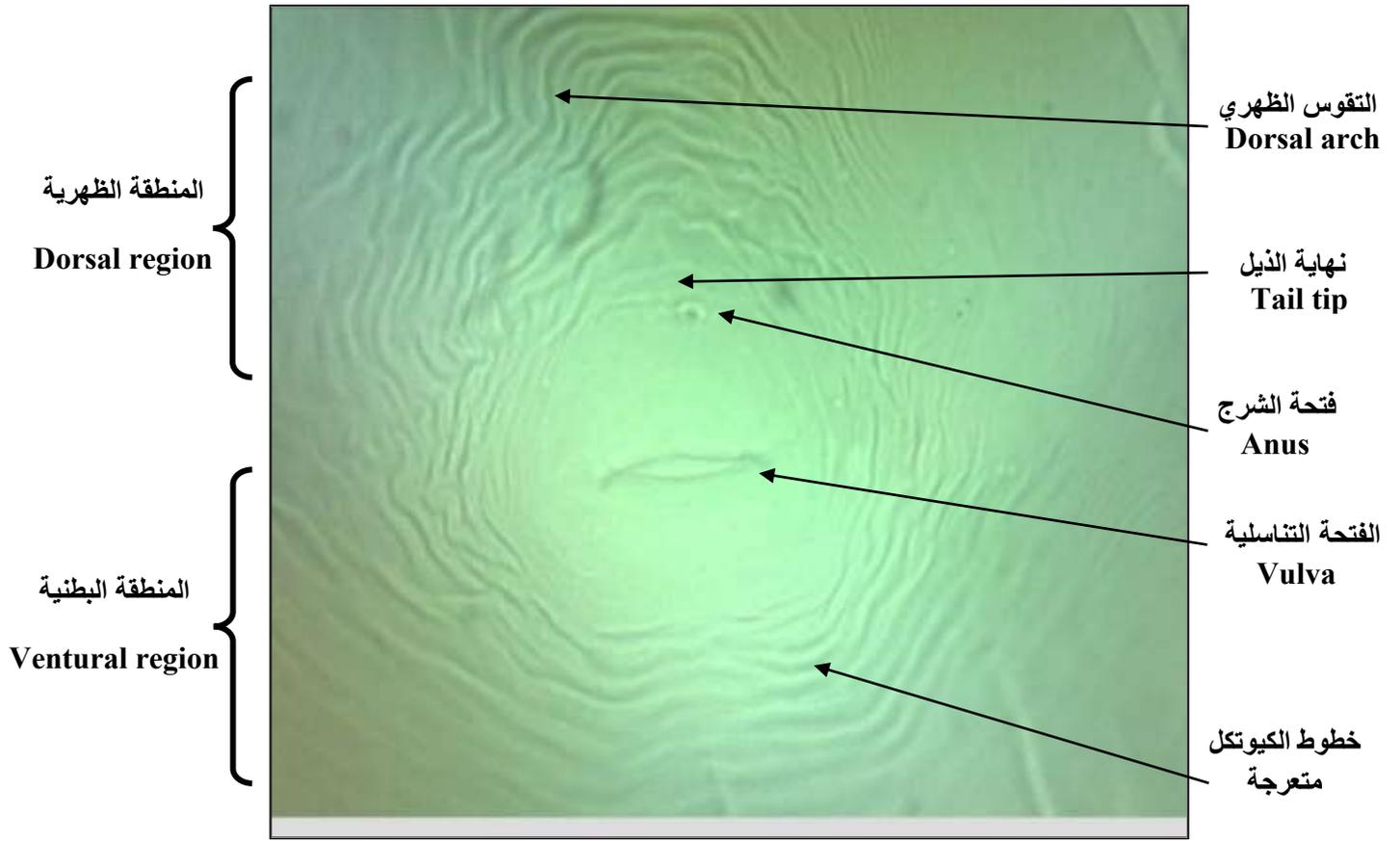
#### 4-1-2- تشخيص أنواع ديدان تعقد الجذور. *Meloidogyne* spp. في حقول الدراسة بالإعتماد على الطراز العجاني Perineal patterns

تبين من خلال نتائج التشخيص المظهري بواسطة الطراز العجاني Perineal patterns للإناث الناضجة وجود نوعين من نيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne* spp. في حقول الطمارة المصابة بالديدان في محافظة كربلاء وهي (*M.javanica* و *M.incognita*). إذ يبين الشكل (9) النمط العجاني للنوع *M.javanica* ويتميز بوجود الخط الجانبي في وسط النمط وهذه أهم صفة مميزة يمتلكها هذا النوع، بينما يبين الشكل (10) إن النمط العجاني للنوع *M.incognita* وجود التقوس الظهري المتعرج Squarish dorsal arch في قمة الجهة الظهرية للنمط العجاني ووجود خيوط الكيوتكل متعرجة وخشنة غير منفصلة والحقول الجانبية غير واضحة مقارنة بالنوع *M.javanica*، ووجود فواصل وتجاويف بدلاً عنها وهذا ما يميزها عن الأنواع

الأخرى (Eisenback وآخرون، 1981، و Jepson، 1987). وكان النوع *M. incognita* الأكثر انتشاراً كما مبين بالجدول (12) إذ وصلت نسبة تكراره إلى 100% بصورة منفردة ولأكثر من حقل ضمن الحقول التي ظهرت فيها الإصابة منها ناحية الحسينية الحقل رقم (3) ومنطقة الجدول الغربي وناحية عون، أما النوع *M. javanica* كان الأقل ظهوراً مقارنة بالنوع الآخر ولم يظهر بصورة منفردة إلا في حقل واحد من منطقة قضاء طوريج وهذا يتفق مع العديد من الدراسات التي أشارت إلى وجود هذه الأنواع في الترب العراقية (الكبيسي، 2013 والحيالي، 2021). ونظراً لعدم وجود دراسة كافية عن ديدان تعقد الجذور في محافظة كربلاء يعد هذا أول تشخيص لهذه الافة على محصول الطماطة في محافظة كربلاء، ولكن سبق وإن تم الكشف عن هذه الأنواع من ديدان تعقد الجذور RKN على أشجار الزيتون في محافظة كربلاء من قبل حنون وآخرون (2018).



الشكل (9) النمط العجاني لديدان تعقد الجذور النوع *Meloidogyne javanica*.



الشكل (10) النمط العجاني لديدان تعقد الجذور النوع *Meloidogyne incognita*

الجدول (12) أنواع ديدان تعقد الجذور ونسبة تكرار كل نوع في حقول الدراسة المشمولة بالمسح الحقلية

نسبة تكرار النوع %		نوع نيماتودا تعقد الجذور		رقم الحقل	منطقة الجمع
<i>M.incognita</i>	<i>M.javanica</i>	<i>M.incognita</i>	<i>M.javanica</i>		
66.66	33.33	+	+	1	ناحية الحسينية
50	50	+	+	2	
100	0	+	-	3	
37.5	62.5	+	+	1	الابراهيمية
0	0	-	-	2	
0	0	-	-	1	خان الربع
0	0	-	-	2	
0	0	-	-	3	
100	0	+	-	1	الجدول الغربي
100	0	+	-	1	ناحية عون
0	0	-	-	1	ناحية الحر
0	0	-	-	2	
0	100	-	+	1	قضاء طوريج
0	0	-	-	1	مزارع العتبة العباسية

+ ظهور نوع النيماتودا  
- عدم ظهور النيماتودا

#### 4-1-3- خواص التربة الفيزيائية والكيميائية في حقول الدراسة المشمولة بالمسح الحقلية

بينت نتائج الجدول (13) إختلافات في تربة الحقول الممسوحة في محتواها من الطين والغرين والرمل حيث كانت أعلى نسبة للرمل 760 غم كغم<sup>1-</sup> في منطقة خان الربع وناحية الحر الحقل (2) ذات النسجة الرملية المزيجية وأقلها في منطقة الجدول الغربي إذ بلغت نسبة الرمل 60 غم كغم<sup>1-</sup> ذات النسجة الغرينية الطينية . بينما كانت أعلى نسبة للطين 424 غم كغم<sup>1-</sup> في منطقة الإبراهيمية ذات النسجة الطينية الغرينية

وأدناها في ناحية الحر الحقل (2) وبلغت 124 غم كغم<sup>1</sup> ذات النسجة الرملية المزيجية وظهرت أعلى نسبة للغرين 596 غم كغم<sup>1</sup> في منطقة الجدول الغربي ذات النسجة الغرينية الطينية وأقلها في منطقة خان الربع بنسبة 96 غم كغم<sup>1</sup> ذات النسجة الرملية المزيجية . ويبدو من نتائج الجدول إن أعلى نسبة للمادة العضوية بلغت 7.8 غم كغم<sup>1</sup> في منطقة الإبراهيمية وأقلها في ناحية الإمام عون حيث بلغت 6.3 غم كغم<sup>1</sup> ، كما تبين من الجدول إن الأس الهيدروجيني pH يميل قليلاً إلى القاعدية في الحقول كافة وكانت متقاربة في جميع المناطق إذ تراوحت بين 7.00 - 7.81 ، أما ملوحة التربة كانت مرتفعة في ناحية الحسينية الحقل (1) .

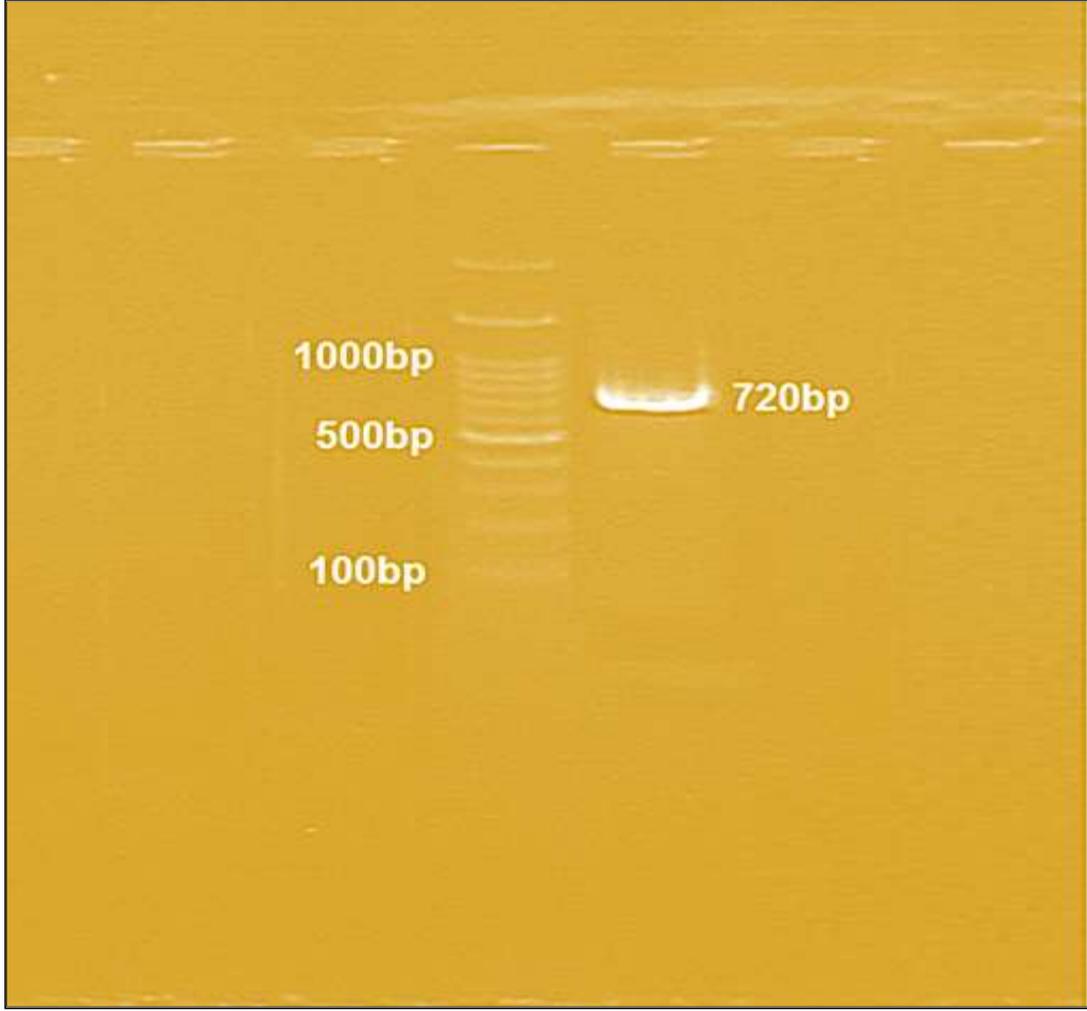
يتبين من نتائج تحليل التربة إن نسبة الإصابة بديدان تعقد الجذور RKN كانت مرتفعة في الحقول ذات المحتوى العالي من الطين وأنخفاضها في الحقول ذات المحتوى العالي من الرمل وهذا لا يتفق مع العديد من الدراسات السابقة التي أشارت بان حيوية ونشاط وحركة النيماتودا تكثر في الترب الرملية ( Abed و Taha ، 1975 و Taylor واخرون ، 1982 و عمي ، 1985 و Asif واخرون ، 2015 ) . ومن المعروف أن ديدان تعقد الجذور RKN تفضل الترب الرملية على غيرها إلا إن نسبة وشدة الإصابة كانت منخفضة أو لا توجد إصابة لبعض الحقول في الترب الرملية ويعود السبب وكما ذكر سابقاً الفقرة ( 4-1-1 ) نتيجة طريقة الري المستخدمة بالتنقيط أو بسبب إستخدام المبيدات أو وجود الأعداء الحيوية للنيماتودا في هذه الترب أو تكون الإصابة موجوده ولكنها خفيفة بحيث لم يتم الكشف عن نباتات مصابة عند أخذ العينات وفيما يختص بتأثير درجة تركيز أيون الهيدروجين تبين أن لا يوجد هنالك تأثير على كثافة وتوزيع النيماتودا وقد تقاربت النسب سواء في الترب الرملية أو الطينية وهذا يدل على إن الديدان الخيطية يمكن أن تعيش على مستويات مختلفة من الأس الهيدروجيني وحسب ما بين Luc واخرون (2005) ان أنواع *Meloidogyne* تتكاثر عند مستويات الأس الهيدروجيني بين 4.0 - 8.0 . كما تبين إن المادة العضوية لها دور في إنتشار وتوزيع النيماتودا في الحقول حيث أرتفعت نسبة الإصابة بإنخفاض المادة العضوية مقارنة بحقول أخرى ارتفعت نسبة المادة العضوية في حين كانت نسبة الإصابة واطئة وهذا يتفق مع (Linford واخرون ، 1938) من إن المادة العضوية عند تحللها في التربة تعمل على إطلاق مواد وسطية ومن ضمنها مادة البيوتريك اسيد Butyric Acid الذي له تأثير سام على ديدان تعقد الجذور (Husain و Masood ، 1975) .

الجدول (13) الخواص الفيزيائية والكيميائية للتربة ضمن مناطق المسح الحقلية في محافظة كربلاء

Ec Dsm <sup>-1</sup> التربة	pH التربة	المادة العضوية غم كغم تربة <sup>-1</sup>	نسجة التربة	مفصولات التربة غم كغم <sup>-1</sup>			منطقة الجمع
				غرين	طين	رمل	
11.6	7.31	7.6	رملية طينية	276	324	400	ناحية الحسينية 1
1.4	7.41	6.6	غرينية طينية	376	344	280	ناحية الحسينية 2
1.8	7.00	7.8	طينية غرينية	316	424	260	منطقة الابراهيمية
3.6	7.35	7.1	رملية مزيجية	96	144	760	خان الربع
1.0	7.13	7.4	غرينية طينية	596	344	60	الجدول الغربي
6.1	7.81	6.3	مزيجية	376	324	300	ناحية الإمام عون
2.1	7.21	6.7	رملية مزيجيه	116	144	740	ناحية الحر 1
2.0	7.45	6.4	رملية مزيجيه	116	124	760	ناحية الحر 2
0.8	7.12	6.9	رملية مزيجيه	176	184	640	قضاء طوريج
2.8	7.58	6.7	رملية مزيجيه	136	164	700	مزارع العتبة العباسية

#### 4-2- التشخيص الجزيئي لديدان تعقد الجذور بالاعتماد على التقانات الجزيئية

بينت نتائج إختبار التشخيص الجزيئي بإستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل PCR والترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز بظهور حزمة الحامض النووي DNA بحجم (720bp) وهي الحزمة المتوقع تكوينها عند تضخيم المنطقة الجينية IGS-2 بين جينات 5S-18S للنوع *M.incognita* بإستعمال البادئ 194 / 195 وهذه النتائج تتفق مع نتائج الدراسة التي قام بها Adam وآخرون (2005) والذي أشار الى كفاءة البادئ 194 / 195 في تشخيص ديدان تعقد الجذور لمستوى النوع. ولم تظهر النتائج ظهور حزمة بحجم 670 قاعدة نروجينية وهذا يشير الى عدم وجود النوع *M.javanica* في المزرعة النقية.



الشكل (11) الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR يظهر الحزمة بحجم 720 bp الناتجة من تضخيم المنطقة IGS-2 بين الجينات 5S-18S للنوع *Meloidogyne incognita*

#### 4-2-1- تحليل نتائج تسلسل النيوكلو تيدات للحمض النووي المنقوص الاوكسجين لجينوم لديدان تعقد الجذور. *Meloidogyne spp.*

بينت نتائج التتابعات النيوكلو تيدية من شركة MacroGen الكورية بتطابقها مع تتابعات العزلات العالمية لنيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne spp.* والمسجلة في قاعدة بيانات المركز الوطني للتقانات الحيوية National Center Biotechnology Information (NCBI) وتحديد نوع الديدان من خلال الموقع الرسمي للمنظمة العالمية <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> وأشارت النتائج وجود النوع *Meloidogyne incognita* وظهر بنسبة تطابق 99.28 % مع تتابعات العزلة

الباكستانية [JQ806340.1](#) والعزلة الامريكية بوجود بعض التغيرات في تسلسل القواعد النروجينية للعزلة العراقية [MZ314042](#) مع تسلسلات القاعدة النروجينية للعزلة الباكستانية وكما مبين بالشكل (12) استبدال transition لقاعدة A في العزلة العراقية الى قاعدة C في العزلة الباكستانية [JQ806340.1](#) واستبدال القاعدة T الى القاعدة A في العزلة الباكستانية . وتنطبق هذه التغيرات الموضحة بالشكل (12) على باقي العزلات العالمية المطابقة مع العزلة العراقية.

**Meloidogyne incognita isolate Pak.S.R.6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence**  
Sequence ID: [JQ806340.1](#) Length: 877 Number of Matches: 1

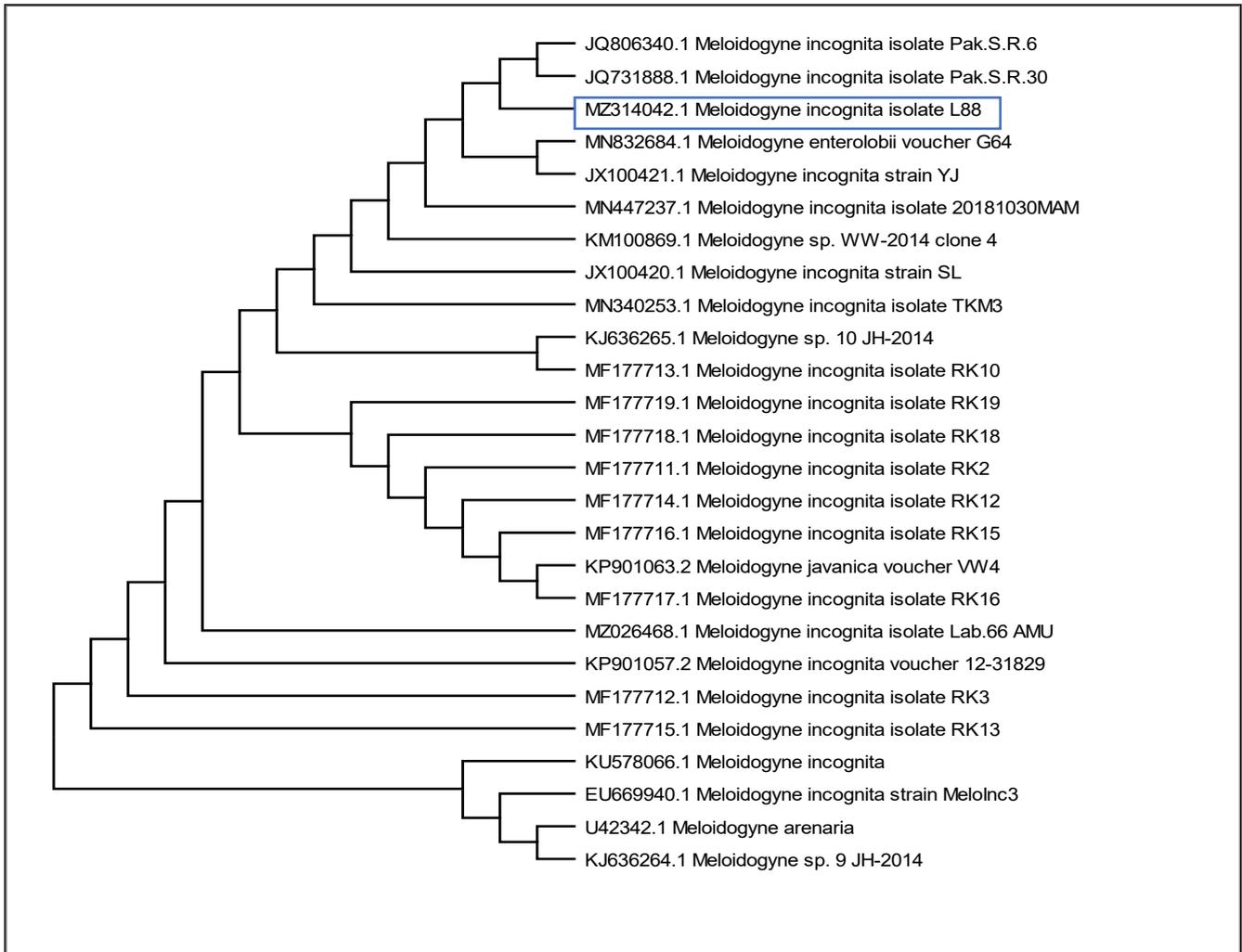
Range 1: 177 to 873 [GenFlare](#) [Graphics](#) [▼ Hide Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1258 bits(681)	0.0	692/697(99%)	2/697(0%)	Plus/Plus
Query 1	GCCGATGGAAATTATATTGCCTTGGTGGGGAGCTTCCCGGCAACGAAAGTCTTCCGGTTC	60		
Sbjct 177	.....A.....	236		
Query 61	CGGGGAAGTATGTTGCAAAAGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGGAAGGGCACCACCAGG	120		
Sbjct 237	.....	296		
Query 121	AGTGGAGCCTGCGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAACTCACCCGGCCGGACACTGT	180		
Sbjct 297	.....	356		
Query 181	GAGGATTGACAGATTGATAGCTTTTTTCATGATTCAGTGGATGGTGCATGGCCGTTCT	240		
Sbjct 357	.....	416		
Query 241	TAGTTCGTGGAGTGATTTGTCTGGTTATTCCGATAACGAGCGAGACTCTCACCTACTAA	300		
Sbjct 417	.....A.....	476		
Query 301	ATAGTTGGTACATACTCTTAGTGTACTGCTTCTTAGAGGGATTTGCGGCGTTCAGCCG	360		
Sbjct 477	.....A.....	536		
Query 361	AAAGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCGGGCTGCACGCCGCGC	420		
Sbjct 537	.....	596		
Query 421	TACACTGGCAAAATCAACGTGCTTGCTTACCCTGAAAGGGGGGGTAAACCATTGAAAA	480		
Sbjct 597	.....	656		
Query 481	TTTGCCGTGATTGGGATCGGAAATTGCAATTAATTTCCGTGAACGAGGAATTCGAAGTAA	540		
Sbjct 657	.....	716		
Query 541	GTGCGAGTCATCAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCT	600		
Sbjct 717	.....	776		
Query 601	GCCCCGGACTGAGCCATTTGAGAAATTTGGGACCGTTGATTTAA-TTTTTCTAAATTA	659		
Sbjct 777	.....T.....	836		
Query 660	CTTTGATGGAAACCAATTAATCGCA-TGGGCTTGAA	695		
Sbjct 837	.....G.....	873		

الشكل (12) تسلسل تتابعات القواعد النروجينية للعزلة العراقية [MZ314042](#) مع العزلة الباكستانية [JQ806340.1](#) في بنك الجينات العالمي . يمثل Query تتابعات القواعد النروجينية للعزلة العراقية و Sbjct تتابعات العزلة الباكستانية

رسمت الشجرة التطورية Phylogenetic tree باستخدام برنامج Mega6 للعزلة العراقية [MZ314042](#) للنوع *Meloidogyne incognita* لتوضيح صلة القرابة بينها وبين العزلات العالمية في البنك العالمي للتقانة الحيوية NCBI اعتماداً

على المنطقة الجينية 18s rDNA والمتواجدة في جميع أنواع النيماتودا التابعة لجنس *Meloidogyne* ما عدا أختلافات بسيطة في تسلسل النيوكليوتيدات ويبين الشكل (13) مخطط الشجرة الوراثية بين العزلة العراقية MZ314042.1 والعزلات العالمية، وهذه النتائج تتفق مع نتائج دراسة سابقة قام بها Blok وآخرون (1997) والذي أشار إلى كفاءة البادئ 194 / 195 المصمم من قبل الباحث في تشخيص ديدان تعقد الجذور لمستوى النوع. وأشارت دراسة أخرى من قبل الحيالي (2021) باستخدام البادئ 194 / 195 في تشخيص ديدان تعقد الجذور على نباتات الزينة ضمن المنطقة الجينية 18s Rdna.



الشكل (13) الشجرة التطورية التي تبين صلة القرابة بين تتابعات العزلة العراقية والعزلات العالمية اعتماداً على تتابعات النيوكليوتيدات المسجلة في البنك العالمي NCBI وفق برنامج Mega6.

### 4-3- إختبار حساسية الهجن الوراثية لنبات الطماطة من الإصابة بديدان

#### تعقد الجذور. *Meloidogyne spp.*

أظهرت نتائج الجدول (14) بعد مرور 60 يوم من إضافة لقاح ديدان تعقد الجذور RKN بواقع  $50 \pm 1500$  بيضة ويافعة / أصيص ، بإختلاف أصناف الطماطة فيما بينها لحساسيتها من الإصابة بالديدان ، وتبين أن هنالك فروقاً معنوية بين بعض النباتات من حيث عدد الإناث داخل الجذور حيث تفوق الصنف Narcan-8 بتسجيله أعلى عدد للإناث بلغ 40.00 أنثى/ جذر ، تلاه الصنف Rock star والذي سجل 31.75 أنثى / جذر مقارنة بالصنف الحساس للإصابة Super marmand والذي سجل 43.25 أنثى / جذر ، بينما سجلت الأصناف Maysaloun و Samar أقل عدد للإناث بلغ 1.00 أنثى / جذر ولم تلاحظ فروق معنوية بين الأصناف Sato و Madina و Sunagri و Meyameya من حيث عدد الإناث بالجذور . بينما أظهرت نتائج أعداد اليافعات في الجذور إلى وجود فروق معنوية بين الأصناف وتفوق الصنف Narcan بتسجيله أعلى عدد بلغ 56.75 يافعة / جذر تلاه الصنف Rock star والذي سجل 48.75 يافعة / جذر مقارنة بالصنف الحساس للإصابة Super marmand والذي سجل 65.00 يافعة / جذر ، بينما سجل الصنف Maysaloun أقل عدد والذي بلغ 1.75 يافعة / جذر ولم تكن هنالك فروق معنوية بين الأصناف Madina و Sura و Samar من حيث عدد اليافعات بالجذر . إنعكس تزايد أو انخفاض عدد الإناث واليافعات بالجذر على عدد البيوض وعدد الذكور واليافعات في التربة ودليل العقد ومعامل التكاثر كما في الشكل (14) ، وكما لوحظ من نتائج الجدول هنالك فروق معنوية بين الأصناف بعدد العقد وسجلت الأصناف Narcan و Sunagri بأعلى دليل للعقد بلغ 4.25 ، 3.75 عقدة / الجذر على التوالي ويشير هذا إلى حساسية هذه الأصناف من الإصابة بديدان تعقد الجذور RKN حسب الدليل المعتمد للعقد الجذرية الذي وضعه Taylor و Sasser (1978) الوارد في الفقرة (3-1) الجدول رقم (4) ، ولم تختلف معنوياً من الصنف الحساس للإصابة Super Marmand الذي بلغ دليل العقد 5 درجات ، بينما سجلت الأصناف Maysaloun و Sura و Samar بأقل دليل للعقد الجذرية بلغ 0.00 ، 1.00 ، 1.00 على التوالي وهذا ما يشير إلى المقاومة العالية لهذه الأصناف (H.R) High Resistance والتي اختلفت معنوياً عن الأصناف ذات الحساسية العالية للإصابة بالنيماتودا وكما مبين من الشكل (15) .

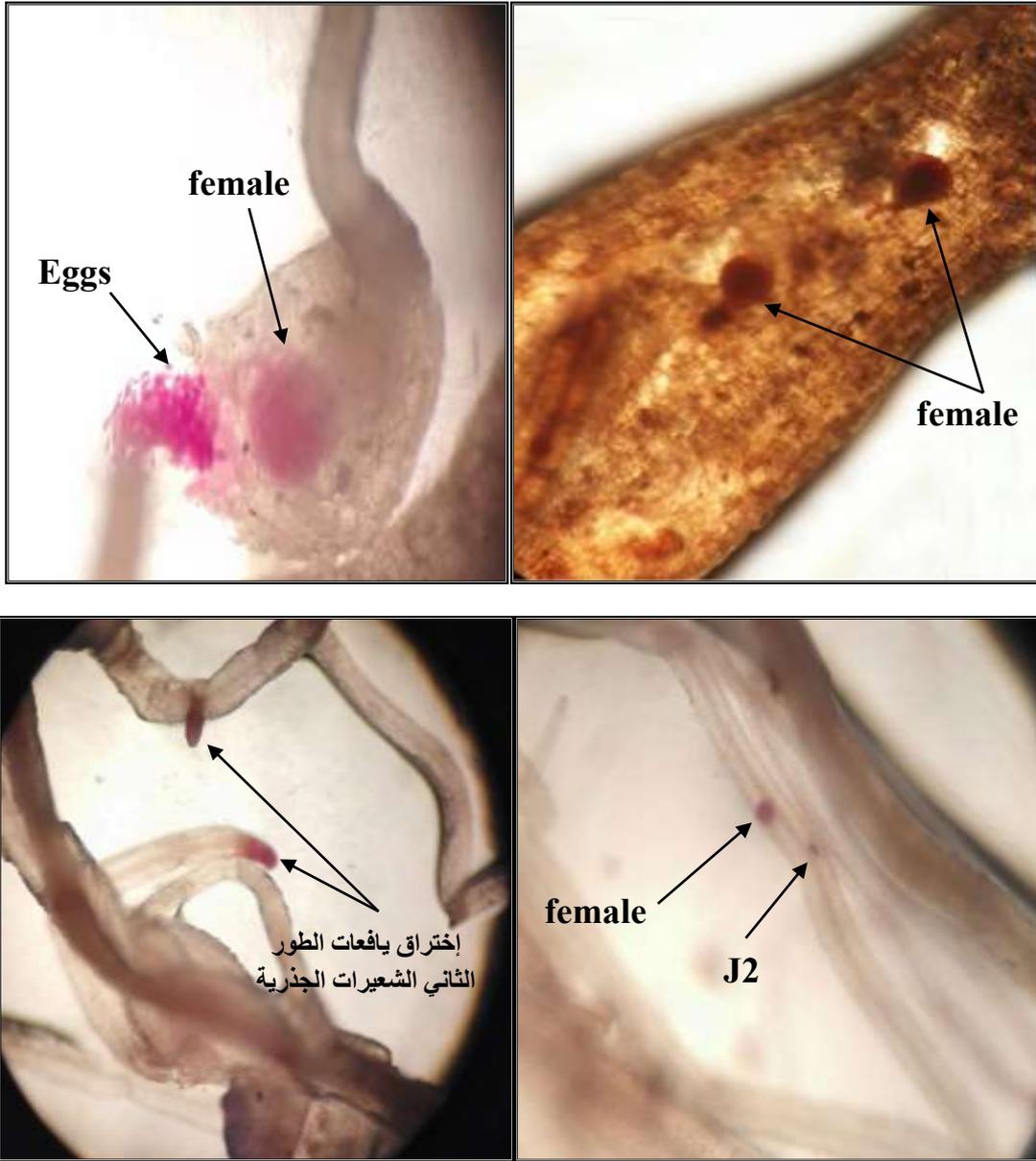
أهم الأسباب التي أدت الى تفاوت قابلية الأصناف فيما بينها من الإصابة بديدان تعقد الجذور RKN هو المقاومة الوراثية داخل النبات وهذه الدفاعات مسؤول عنها جين المقاومة Mi والذي سجل لأول مره في الطماطة البريه ومحمول على الكروموسوم 6 (Smith ، 1944) ويعمل هذا الجين على تحفيز تفاعل فرط الحساسية (HR) Hypersensitive Reaction مسبب موت الخلايا النباتية في موقع الإصابة وعليه يخفض من قدرة إنتشار الديدان إلى خلايا الجذر الأخرى ويمنع من تطور يافعات الطور الثاني J<sub>2</sub> بالأصناف الحاملة لهذا الجين (Molinari وآخرون، 2014 و Seid وآخرون، 2017 و Bozbuga وآخرون، 2020). كما أن تغيير المناخ وارتفاع درجة الحرارة خاصة وقت الظهيرة والتعرض لدرجة حرارة 35 م° كافية لكسربعض الجينات إذ تلعب درجة الحرارة دور مهم في كثافة النيما تودا حيث لوحظ ان تكاثر *M.javanica* أعلى بكثير تحت الظروف المثلى 25 م° وأدى إلى ارتفاع كثافة النيما تودا من 1.9 إلى 13 (deCarvalho وآخرون، 2015 و Karajeh و Salameh، 2015). قد يكون الوقت عامل مهم يؤثر على كثافة النيما تودا حيث وجد ان عدد *M.incognita* كان أقل من نيما تودا *M.javanica* او *M.arenaria* خلال اول 30 – 60 يوم من إضافة اللقاح ولكن وجدت فروق بالكثافة النهائية بعد 90 يوم من الإصابة (Loubser و Meyer، 1987). أشار Cap وآخرون (1993) ان الأصناف المقاومة تمتاز بمقاومتها للشد البيئي ويمكن استخدامها في الإدارة المتكاملة للمكافحة. كما ان استخدام الأصناف المقاومة في الزراعة غير محدودة النمو أثبتت قدرتها العالية في مقاومة ديدان تعقد الجذور RKN وتقليل ضررها دون اللجوء الى برامج مكافحة متكاملة، وتمنح النبات حماية ضد سلالات متعددة من المسبب المرضي (Martin وآخرون، 2003). أهم هذه الجينات التي تعطي مقاومة لأكثر من نوع من الديدان وتمنع تطور اليافعات داخل جذور العائل الجين Mi1.2 وتطابقت هذه النتائج مع دراسات سابقة قام بها Expósito وآخرون (2019) و Pocerull وآخرون (2020) إلى فعالية جين (Mi1.2) في تقليل الإصابة أو منع حدوثها لبعض الهجن الوراثية لنبات الطماطة.

الجدول (14) متوسط عدد الاناث واليافعات في الجذور وعدد اليافعات والذكور في التربة بالإضافة الى دليل العقد ومعامل التكاثر للهجن الوراثية لنبات الطماطة والملوثة بديدان تعقد الجذور بعد شهرين من العدوى

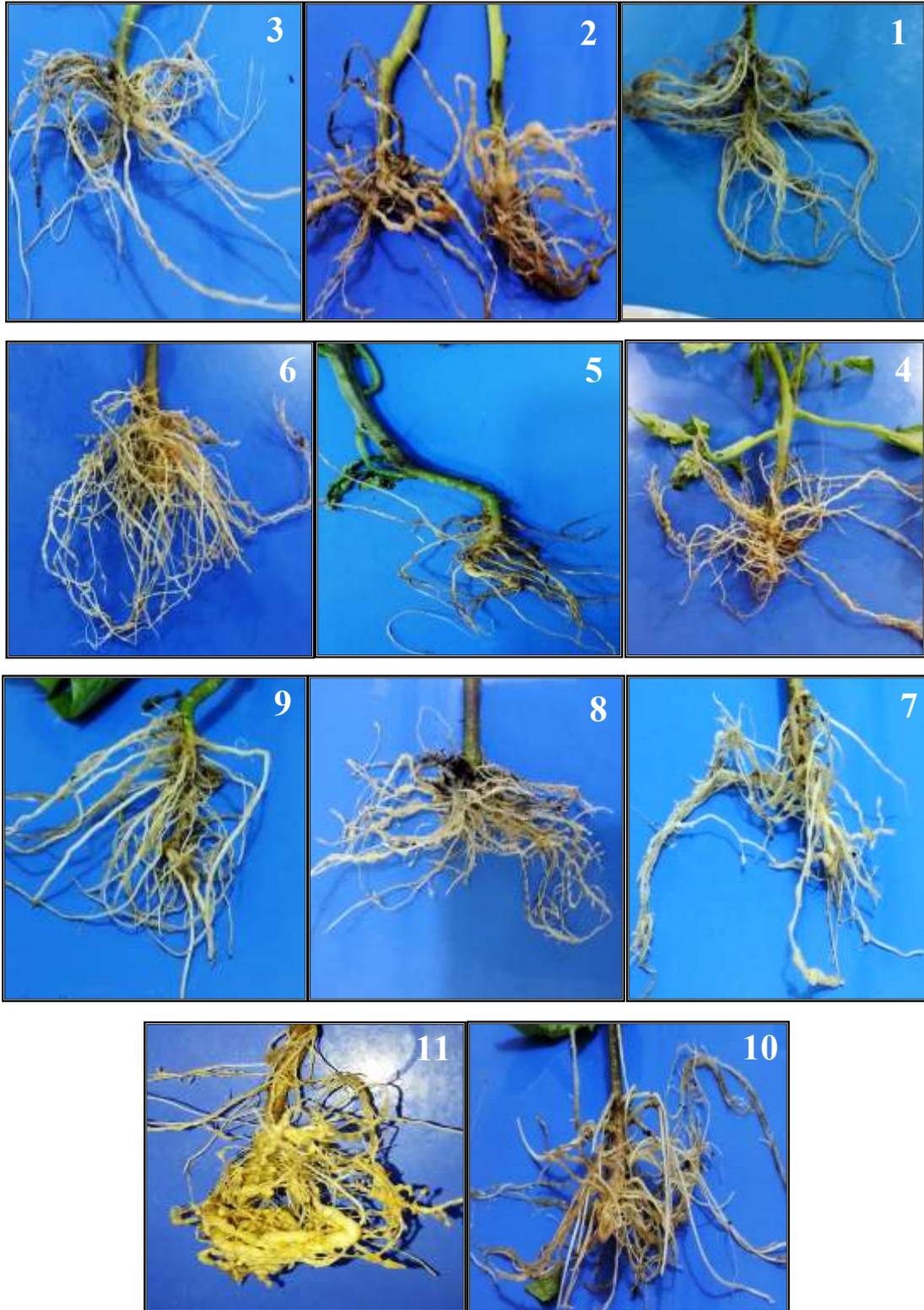
رمز الصنف	إسم الصنف	الاناث في الجذر	اليافعات في الجذر	الذكور في التربة	اليافعات في التربة	عدد البيوض	معامل التكاثر	دليل العقد	استجابة النبات للإصابة
1	Maysaloun	1.00	1.75	0.00	0.00	5.00	0.4	0.00	H.R
2	Narcan-8	40.00	56.75	11.25	36.00	30.50	11.6	4.25	H.S
3	Mariana	9.50	17.25	0.00	0.00	25.00	3.4	2.00	R
4	Sato	12.00	28.00	0.00	2.00	32.75	4.9	2.50	M.R→S
5	Madina	17.00	15.50	0.00	0.00	28.75	4	2.00	R
6	Sunagri	14.00	33.25	2.00	13.75	27.25	6	3.75	H.S
7	Meyameya	14.00	20.25	1.00	4.00	34.75	4.8	2.50	M.R→S
8	Rock star	31.75	48.75	8.00	30.00	62.00	12	3.50	S
9	Sura	2.00	6.25	0.00	0.00	6.25	0.9	1.00	H.R
10	Samar	1.00	2.50	0.00	0.00	9.25	0.8	1.00	H.R
11	Super marmand	43.25	65.00	14.50	54.75	88.00	17.6	5.00	H.S
	<b>L.S.D (0.05)</b>	<b>7.337</b>	<b>10.317</b>	<b>2.808</b>	<b>6.392</b>	<b>19.914</b>	<b>0.020</b>	<b>0.811</b>	

\* الأرقام هي متوسطات لأربع مكررات

\*\* تم حساب دليل تعقد الجذور حسب مقياس Taylor و Sasser ( 1978 ) وكما يلي:- 0 = لا توجد عقد على الجذر 1= 2-1 عقدة ، 2 = 10-3 عقدة ، 3 = 30 -11 عقدة ، 4 = 100 - 31 عقدة ، 5 = اكثر من 100 عقدة على الجذر، وصنفت مدى حساسية ومقاومة النباتات حسب الدليل وكما يلي/ مقاومة عالية High Resistance (H.R) = دليل العقد 1-0 ، مقاوم Resistance (R) = دليل العقد 2 ، متوسط الحساسية Moderately Resistance (M.R) = Moderately Susceptible (M.S) = دليل العقد 2.1 - 2.6 ، حساس Susceptible (S) = دليل العقد 2.7 - 3.5 ، عالي الحساسية High Susceptible (H.S) = دليل العقد 3.6-5 .



الشكل (14) تصبيغ جذور الهجن الوراثية لنباتات الطماطة بصبغة الفوكسين الحامضية بعد شهرين من العدوى ب (50±1500 بيضة ويافعة / أصيص)  
 \*\* female = الانثى ، J<sub>2</sub> = Juvinele2 يافعات الطور الثاني ، Eggs = البيوض .



الشكل (15) جذور الهجن الوراثية لنبات الطماطة بعد شهرين من العدوى بديدان تعقد الجذور بمعدل  $50 \pm 1500$  بيضة ويافعة / أصيص .

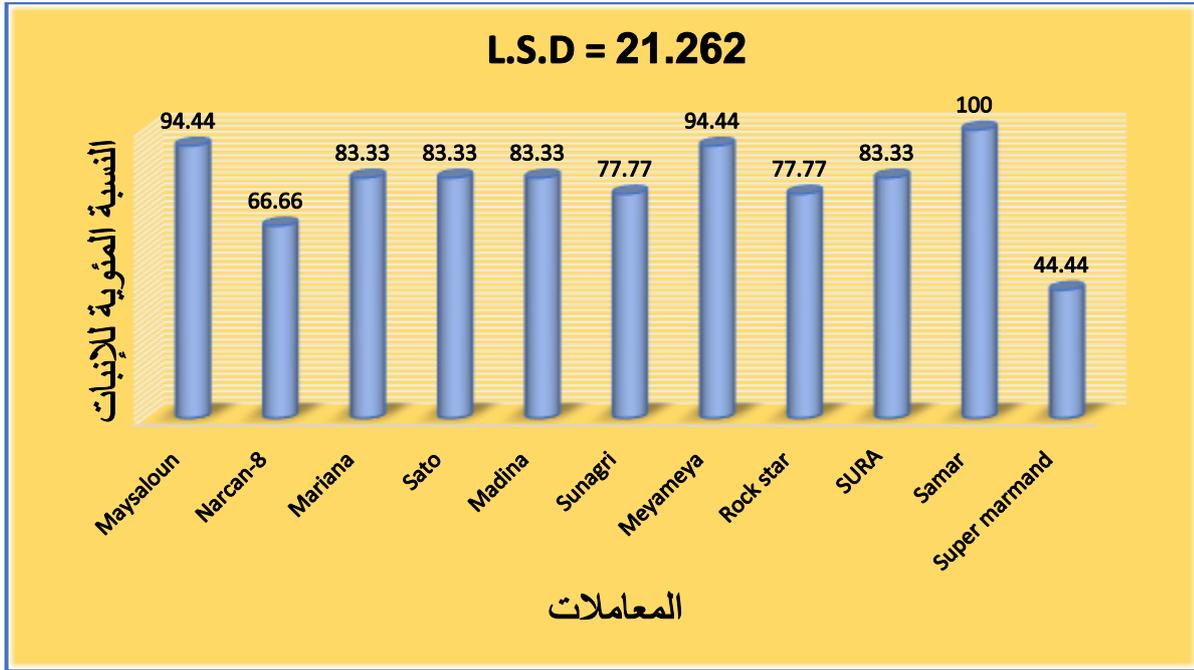
\*\* كل رقم يمثل صنف معين وكما يلي :-

- 1- Maysaloun 2- Narcan 3- Mariana 4- Sato 5- Madina 6- Sunagri  
7- Meyameya 8- Rock star 9- Sura 10- Samar 11- Super marmand

#### 4-4- نتائج قياس المعايير الخضرية للهجن الوراثية لنبات الطماطة

##### 4-4-1- النسبة المئوية لإنبات البذور

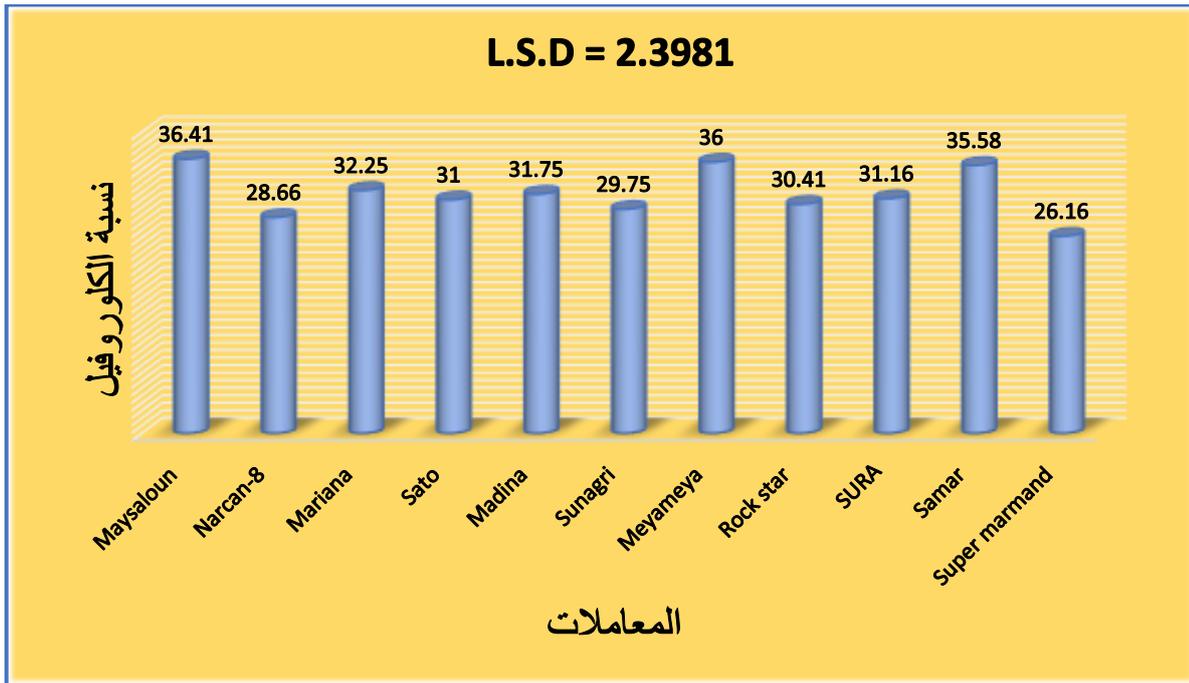
بينت نتائج الشكل (16) ان أعلى نسبة إنبات بذور تعود للصفة Samar بنسبة 100 % في حين كانت أقل نسبة إنبات للبذور في الصنف Narcan-8 وبلغت 66.66 % مقارنة مع الصنف Super Marmande حيث بلغت نسبة الإنبات 44.44 % ، ولا توجد فروق معنوية بين أغلب الأصناف ، يرجع السبب في إنخفاض نسبة الإنبات لبعض الأصناف لعدم التعرض الكافي للإضاءة وبالتالي يؤثر على محتوى الكلوروفيل أو طبيعة الصنف أو إن البذور لم تعامل بمنظمات النمو أو قد يكون بتأثير خواص التربة ونقص بالعناصر وإحياناً يعزى إنخفاض نسبة الإنبات إلى قلة إمتصاص الماء وهي أول مراحل الإنبات وعليه لا يحدث تمزق لأغلفة البذور أو بسبب طبيعة الصنف وانخفاض حيوية البذور، كما إن صحة البذور تؤثر بشكل كبير على الإنبات (Cardoso و Escobar ، 2015 و Yasmin وآخرون ، 2020).



الشكل (16) نسب الإنبات للهجن الوراثية لنبات الطماطة

#### 4-4-2- محتوى الكلوروفيل الكلي للهجن الوراثية لنبات الطماطة

بينت نتائج الشكل (17) هنالك فروقات معنوية بين نسب الكلوروفيل لبعض الأصناف حيث تفوق الصنف Maysaloun معنوياً على باقي الأصناف بمعدل بلغ 36.41 وحدة SPAD في حين كانت أقل نسبة في الصنف Narcan-8 وبلغت 28.66 % مقارنة مع الصنف Super Marmand الذي سجل أقل نسبة 26.16 وحدة SPAD . ربما أهم الدلائل التي تشير لخفض نسبة الكلوروفيل إلى تكوين أنزيم Chllorofase المسؤول عن تحطيم الكلوروفيل أو تغييرات في تركيب بروتين البلاستيدات الخضراء ( Tuna واخرون ، 2008 ) . وقد يرجع السبب إلى زيادة البوتاسيوم الذي له دور فعال في التركيب الضوئي أو هنالك عمليات تحدث داخل النبات منها رفع معدل عملية التمثيل الضوئي ومحتوى الكلوروفيل بالنبات فضلاً عن زيادة المساحة الورقية والتقليل من معدلات التبخر مما يعكس صورة إيجابية لنمو النبات ( Mangel ، 2007 و Jun واخرون ، 2010 ) .



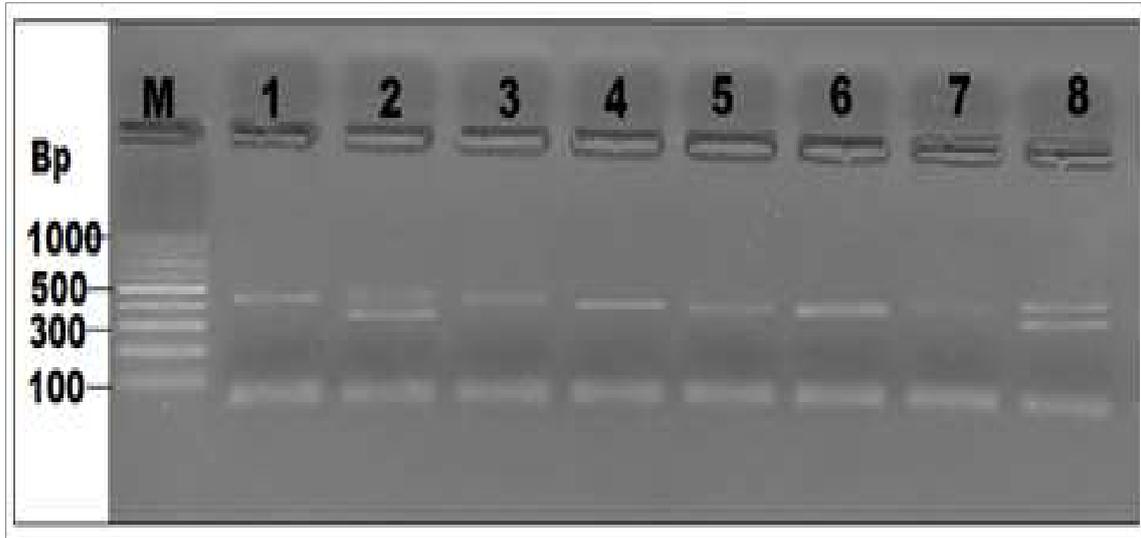
الشكل (17) محتوى الكلوروفيل الكلي للهجن الوراثية لنبات الطماطة

#### 4-5- نتائج الكشف عن جينات المقاومة للهجن الوراثية المنتخبة لنبات الطماطة

باستخدام 2 زوج من البادئات للكشف عن وجود جينات المقاومة Mi-genes للهجن الوراثية المنتخبة لنبات الطماطة وبينت النتائج ما يلي :-

#### 1- البادئ Mi 2.3

أستخدم هذا البادئ Mi2.3 للكشف عن الجين Mi1.2 المحمول على الكروموسوم 6 لأصناف الطماطة ضد ديدان تعقد الجذور RKN ومعرفة مقاومتها أو حساسيتها للإصابة بالديدان ، وبينت نتائج الترحيل الكهربائي لتفاعل البلمرة المتسلسل PCR على هلام الاكاروز حزماً مختلفة الأوزان الجزيئية . إذ أعطى الصنف Samer وMaysaloun حزمتين ذات حجم (430 و 380 bp) قاعدة نتروجينية وهذا يشير إلى وجود الأليلات المتباينة الزيجة المقاومة Resistance Heterozygous ما يؤكد على أن هذه الأصناف حاملة لجين المقاومة . وكما موضح بالشكل (18) الأعمدة (2 ، 8) ، والشكل (19) الأعمدة (9 ، 11) .



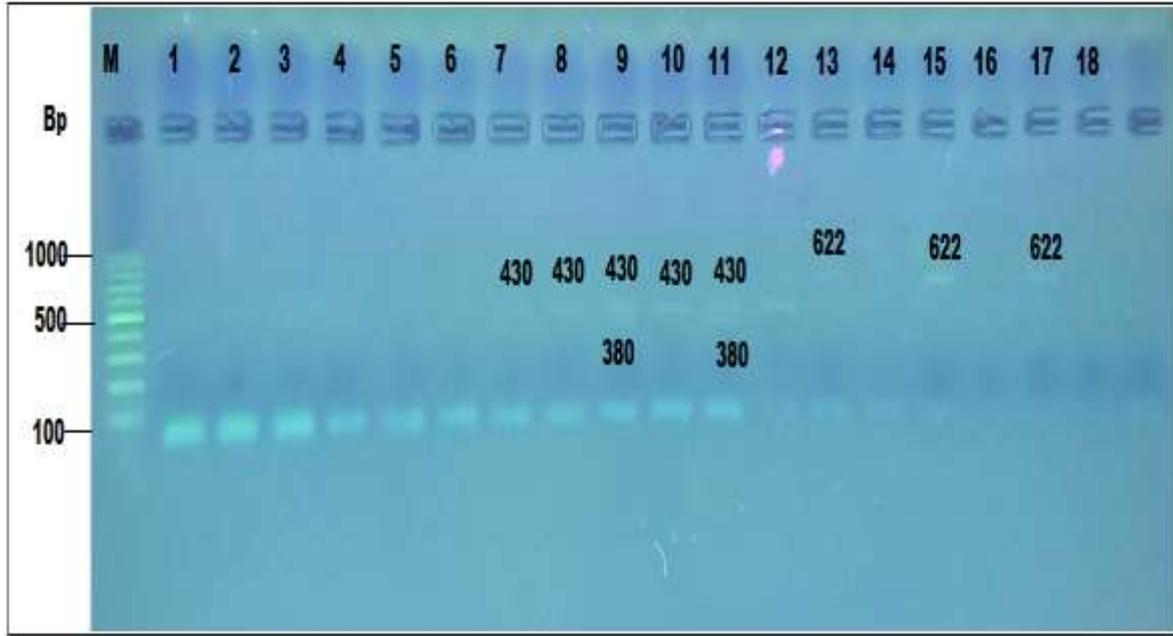
الشكل (18) الترحيل الكهربائي لنواتج تضخيم جين Mi2.3 على هلام الاكاروز (3%) في دارئ TBE بفولتية مقدارها 3 فولت/سم<sup>2</sup> والمصبوغ بصبغة الاحمر السليم والمفحوص تحت الاشعة فوق البنفسجية .

\*\* العمود M ويمثل الدليل الحجمي 100 قاعدة نتروجينية. الأعمدة (2 ، 8) تظهر بحزمتين وتمثلان النمط متباين الزيجة المقاوم Resistance Heterozygous للصنف Samer وMaysaloun. الأعمدة (1، 3، 4، 5، 6، 7) وتظهر بحزمة واحدة وتمثل النمط متماثل الزيجة الحساس Homozygous Susceptible للصنف Meyameya .

بينما أعطى الصنف Meyameya حزمة واحدة بحجم (bp 430) قاعدة نتروجينية والتي تشير الى كون الصنف متماثل الزيجة حساس Homozygous Susceptible أي عدم وجود جينات مقاومة ، وكما موضح بالشكل (18) الأعمدة (1، 3، 4، 5، 6، 7) ، والشكل (19) الأعمدة (7، 8، 10) وهذه النتائج تتفق مع دراسات سابقة (Seah) واخرون ، 2007 و Maleita واخرون ، 2011 و Hasan و Abood ، 2018 و Hassan و Mahmoud ، 2021) . قام Danso واخرون (2011) بالكشف عن جينات المقاومة Mi1.2 بإستخدام البادئ Mi2.3 في 26 تركيب وراثي لنبات الطماطة وتأكد من مقاومة وحساسية هذه الأصناف من الإصابة بديدان تعقد الجذور بإستخدام البادئ Mi2.3 وبينت النتائج بظهور خمسة أصناف مقاومة متباينة الأليلات. وأشارت الدراسة التي قام بها Yerasu واخرون (2019) إلى كفاءة إستخدام هذا البادئ (Mi2.3) وإعطائه نتائج جيدة للكشف عن الجينات المقاومة في نبات الطماطة .

## 2- البادئ Mint للكشف عن Introne

أستخدم هذا البادئ للكشف عن مجموعة من جينات المقاومة Mi الموجودة في نطاق الانترون في أصناف الطماطة الحاملة لهذا الجين والتي تعد مقاومة لمرض نيماتودا تعقد الجذور RKN ، وبينت النتائج الشكل (19) ظهور حزم بحجم bp 622 قاعدة نتروجينية في الأعمدة ( 13 ، 15 ، 17 ) كدلالة على وجود الجين المقاوم Mi1.1 بالأصناف الحاملة له وهي Samer و Maysaloun ، وعدم ظهورها بالصنف Meyameya يدل على ان هذا الصنف غير مقاوم ، وهذه النتائج تتفق مع دراسات سابقة (Milligan واخرون ، 1998 و Cortada واخرون ، 2012) . تمكن Jablonska واخرون (2007) من خلال إستخدام البادئ Introne من نقل جين المقاومة Mi-9 من الطماطة البرية الى الطماطة التجارية والكشف عن الجين Mi-1 المتماثل الزايجوت وكذلك الجين Mi-1.1 والذي يمنح مقاومة لديدان تعقد الجذور RKN .



الشكل ( 19 ) الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR للكشف عن جينات المقاومة المحمولة على الكروموسوم 6 باستخدام البادئ المتخصص Mi2.3 والبادئ غير المتخصص Mint. على هلام الاكاروز (3%) في دارئ TBE بفولتية مقدارها 3 فولت/سم<sup>2</sup> والمصبوغ بصبغة الاحمر السليم والمفحوص تحت الاشعة فوق البنفسجية .

\*\* العمود M ويمثل الدليل الحجمي 100 قاعدة نتروجينية . الأعمدة (9 ، 11) تظهر بحزمتين وزنهما الجزيئي (430 و 380) وتمثلان النمط متباين الزيجة المقاوم Heterozygous Resistance للصفن Samer و Maysaloun . الأعمدة (7 ، 8 ، 10) وتظهر حزمة واحدة حجمها 430 قاعدة نتروجينية وتمثل النمط متماثل الزيجة الحساس Homozygous Susceptible للصفن Meyameya . أما الأعمدة (13 ، 15 ، 17) تمثل نواتج التضخيم للبادئ Mint للكشف عن Intron والنباتات الحاملة له (622) تعتبر مقاومة .(Maysaloun و Samer)

#### 4-6- تأثير التراكيز المختلفة للمبيد الاحيائي Verox وأوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs في تثبيط فقس بيوض ديدان تعقد الجذور *Meloidogyne spp.* مختبرياً

بينت النتائج ( الجدول 15) إن هنالك تأثير فعال للمبيد الإحيائي Verox والمادة النانوية أوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs في تثبيط فقس بيوض ديدان تعقد الجذور RKN بعد ثلاثة أيام من المعاملة ، إذ أبدت معاملة المبيد الإحيائي Verox عند

التركيز 2000ppm الأكثر كفاءة وأعلى فعالية في تثبيط فقس البيض وبلغت 94.67% وأدناها عند التركيز 1000ppm بنسبة تثبيط بلغت 75.34% ، أما عند استخدام أكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs فقد تراوحت نسبة التثبيط أعلاها عند التركيز 4000ppm بنسبة 87.34% وأدناها عند التركيز 1000ppm بنسبة تثبيط بلغت 51% ، وهذه النتائج مقارنة بمعاملة السيطرة للمبيد الكيميائي Velum Prime والتي بلغت 100% مع الإشارة إلى ان معدل التثبيط في معاملة المقارنة الحاوية على ماء مقطر كانت معدومة. وهذا يتفق مع ما وجدته Olson وآخرون (2012) إن المبيد Velum Prime له القدرة على تثبيط فقس بيض ديدان تعقد الجذور RKN وإيقاف تطور الجنين داخل البيضة بقتل الجنين أو يافعات الطور الأول قبل فقسها وهي داخل البيضة أو قتل يافعات الطور الثاني J<sub>2</sub> ، وقد يرجح السبب إلى إحتواء المبيد على نرة الفلور الثلاثية التي تمكنه من أختراق غشاء البيض وبالتالي قتل الأجنة ومنع تطورها .

أظهرت معاملة المبيد الإحيائي Verox وأكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs إلى وجود تأثير معنوي في تثبيط فقس البيض ويزداد هذا التأثير بزيادة التراكيز المختلفة في كل معاملة وكذلك زيادة فترة التعرض ، هذه النتائج تتفق مع ما وجدته Soliman وآخرون (2019) و Panpatte وآخرون (2021) من تأثير العزلات البكتيرية على منع فقس بيوض ديدان تعقد الجذور *Meloidogyne spp.* في ظل الظروف المختبرية وسجلت أعلى إنخفاض في فقس البيض بعد 24 ، 48 ، 72 ساعة على التوالي والتي تبين الدور الفعال لأنشطة الانزيمات البروتينية وخاصة انزيم Chitinase و Chitin وتحللها لمادة الكايتين في قشرة البيوض. أو يعزى السبب إلى إنتاج البكتريا للسموم ومادة سيانيد الهيدروجين ومركب 2,4-DiAcetylPhloroGlucinol (2,4-DAPG) مما تؤثر على خفض فقس البيوض (Jasson و Zuckerman ، 1984 و Siddiqui و Mahmood ، 1999 و Mena وآخرون، 2002 ونعممة وآخرون ، 2016). أما لتأثير أكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs في خفض فقس بيوض ديدان تعقد الجذور فيتفق مع Khan و Siddiqui (2020) وقد يعزى السبب إلى سمية المادة النانوية (Sávolly وآخرون ، 2016) .

الجدول (15) تأثير تراكيز مختلفة للمبيد الإحيائي Verox وأوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs على فقس بيوض ديدان تعقد الجذور مختبرياً

النسبة المئوية للتثبيط	عدد البيض الفاقس			التركيز	المعاملات
	72 ساعة	48 ساعة	24 ساعة		
%75.34	24.66	20.66	18.00	1000ppm	Verox
% 86.34	13.66	13.00	10.00	1500ppm	
% 94.67	5.33	5.33	3.66	2000ppm	
% 51	49.00	45.66	36.00	1000ppm	ZnO-NPs
% 60	40.00	36.00	23.33	2000ppm	
% 87.34	12.66	11.00	10.00	4000ppm	
% 100	0	0	0	400 ppm	Velum Prime
0.00	100	92	78	—	Control
—	7.17	10.99	6.86	—	L.S.D (0.05)

\* الأرقام هي متوسطات لثلاث مكررات

#### 7-4- تأثير التراكيز المختلفة للمبيد الإحيائي Verox وأوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs في حيوية يافعات الطور الثاني لديدان تعقد الجذور *Meloidogyne spp.* مختبرياً

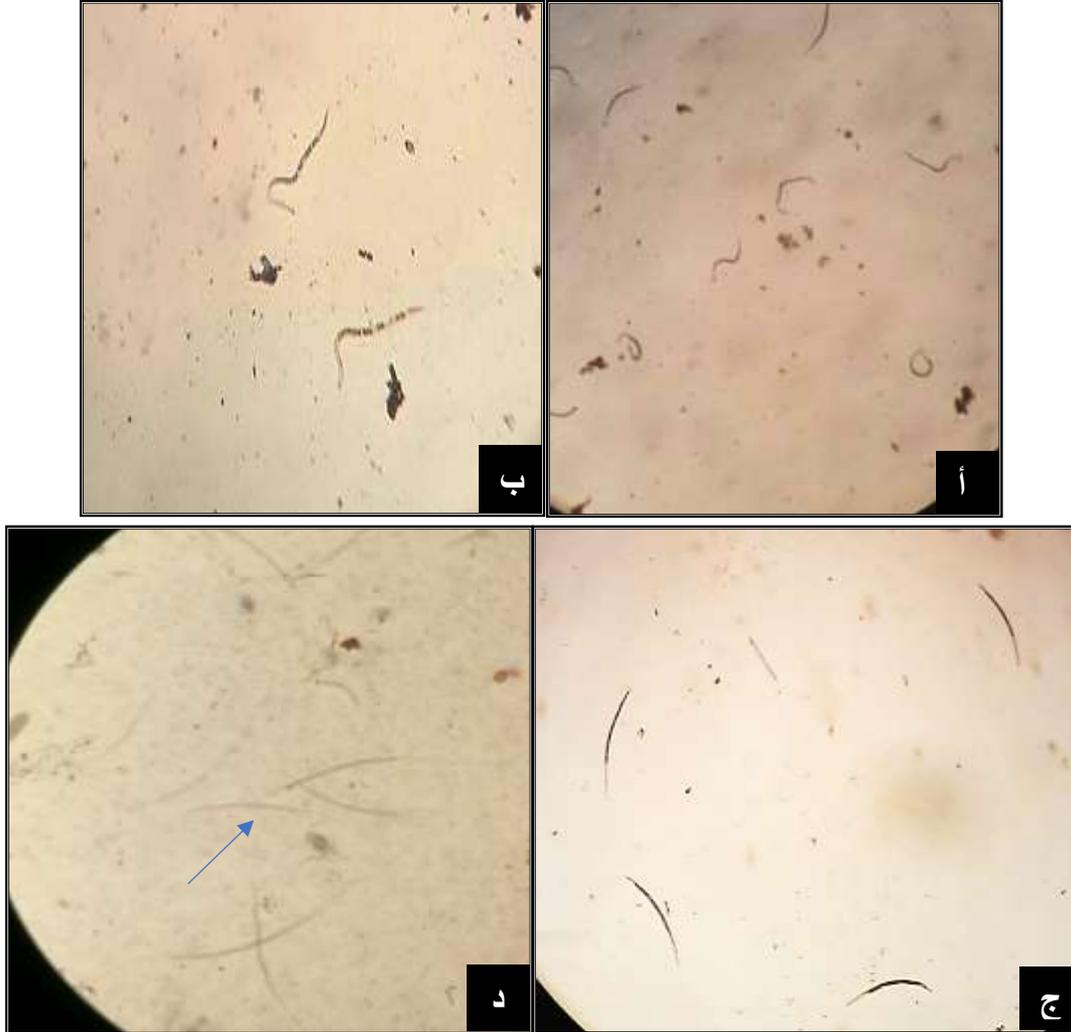
يلاحظ من نتائج (الجدول 16) وجود تأثير معنوي للمبيد الإحيائي Verox وأوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs في هلاك يافعات الطور الثاني لديدان تعقد الجذور RKN ويزداد هذا التأثير بزيادة التراكيز المختلفة في كل معاملة وكذلك زيادة فترة التعرض للمبيد ، وأوضحت النتائج عند استخدام المبيد الإحيائي Verox كان التركيز 2000ppm الأكثر كفاءة حيث بلغت النسبة المئوية لموت اليافعات 94.33 % وأدناها عند التركيز 1000ppm بنسبة وفيات بلغت 72.33 % ، أما عند استخدام المادة النانوية أوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs فقد تراوحت النسبة المئوية لموت

اليافعات بين 88.33% أعلاها عند التركيز 4000ppm ، وأدناها عند التركيز 1000ppm بنسبة بلغت 48.33% ، وهذه النتائج مقارنة بمعاملة السيطرة للمبيد الكيميائي Velum Prime والتي بلغت 100% مع الإشارة إلى إن النسبة المئوية لموت يافعات الطور الثاني J<sub>2</sub> في معاملة المقارنة الحاوية على ماء مقطر كانت معدومة وكما موضح بالشكل (20) ، وهذا يتفق مع ما وجدته Alheyalee و Aljuboori (2020) ان المبيد الكيميائي Velum Prime بتركيز 400ppm أثار بشكل كبير في هلاك يافعات الطور الثاني مختبرياً ويزداد هذا التأثير بزيادة التركيز حيث بلغ 52.34% إلى 88.51% بعد 72 ساعة .

أما بالنسبة لتأثير المبيد الإحيائي Verox على هلاك يافعات الطور الثاني J<sub>2</sub> فيتفق مع ما وجدته Xiang وآخرون (2017) من تأثير البكتريا في معدل وفيات يافعات الطور الثاني J<sub>2</sub> من نيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne incognita* مختبرياً وتسببت 212 سلالة من بين 662 سلالة بكتريا في نسبة وفيات عالية جداً ، وأعطى الجنس *Bacillus* أعلى نسبة وفيات مقارنة بالأجناس الأخرى . وقد تعزى كفاءة المبيد الإحيائي ودورها الفعال بإنتاج سيانيد الهيدروجين Hydrogen Cyanide وتم الكشف أيضاً عن العديد من الانزيمات والهرمونات منها (Chitinase ، Siderophores ، Dissolve phosphorus ، Indole Acetic Acid ، Protease)

وأدت هذه البكتريا إلى هلاك يافعات الطور الثاني مختبرياً بنسبة 100% (AbdelRazek وYaseen، 2020). وكما ذكر Viljoen وآخرون (2019) أن المستقبلات الثانوية التي تنتجها السلالات البكتيرية هي المسؤولة عن نشاط مكافحة الحيوية وتأثير هذه السلالات *Bacillus firmus* ، *Bacillus aryabhattai* ، *Bacillus cereus* ، *Paenibacillus alvei* ، *Paenibacillus barcinonensis* على موت يافعات الطور الثاني J<sub>2</sub> مختبرياً . أشارت دراسة أخرى من قبل Kumar وآخرون (2016) من استخدام أربع عزلات بكتيرية واختبار تأثيرها على ديدان تعقد الجذور *Meloidogyne javanica* ليافعات الطور الثاني J<sub>2</sub> في المختبر وأعطت جميع العزلات نتائج فعالة عند تركيزات أعلى . أظهرت معاملة أكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs تأثير معنوي في هلاك يافعات الطور الثاني وهذا يتفق مع ( Siddiqui وآخرون، 2019) ، ويعزى السبب إلى سمية المادة النانوية المذابة بالزنك (Sávolly وآخرون ، 2016) أو بسبب التأثير السلبي لأوكسيد الزنك على الديدان من خلال

التأثير على الدهون والكلايوجين والسكريات المتعددة للجدار الخارجي للديدان  
(Hou وآخرون ، 2018) .



الشكل (20) تأثير المبيدات المستخدمة على هلاك يافعات الطور الثاني لديدان تعقد الجذور  
مختبرياً

أ- معاملة المقارنة Control ب- معاملة أكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs

ج- معاملة المبيد الكيميائي Velum Prime د- معاملة المبيد الاحيائي Verox

الجدول (16) تأثير التراكيز المختلفة للمبيد الإحيائي Verox وأوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs على حيوية يافعات الطور الثاني لديدان تعقد الجذور مختبرياً

النسبة المئوية للموت	عدد اليافعات الميتة			التركيز	المعاملات
	72 ساعة	48 ساعة	24 ساعة		
72.33 %	72.33	63.33	60.66	1000ppm	Verox
86.66 %	86.66	81.00	52.33	1500ppm	
94.33 %	94.33	83.00	66.00	2000ppm	
48.33 %	48.33	40.66	32.66	1000ppm	ZnO-NPs
66.33 %	66.33	54.33	39.33	2000ppm	
88.33 %	88.33	76.00	64.00	4000ppm	
100 %	100	100	92	400ppm	Velum Prime
0.00	0	0	0	—	Control
—	8.16	14.83	8.26	—	L.S.D (0.05)

\* الأرقام هي متوسطات لثلاث مكررات

#### 8-4- إختبار التضاد بين المبيد الإحيائي Verox والمبيد الكيميائي Velum Prime في أطباق بتري

أثبتت نتائج التضاد بين المبيدين عدم وجود تأثير لأحد المبيدين على المبيد الآخر ويستنتج من هذا إمكانية إستخدام المبيدين الإحيائي والكيميائي بشكل منفرد أو متداخل مع بعضهما وإعطاء نتائج فعالة في برنامج المكافحة وهذه يتفق مع ما أورده (Wang وآخرون ، 2017 و Dahlin وآخرون ، 2019) إلى إمكانية إستخدام المبيد الكيميائي مع المكافحة البايولوجية وإعطاء نتائج فعالة مقارنة بالمكافحة المفردة .

#### 9-4- نتائج إختبار كفاءة المبيد الإحيائي Verox وأوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs على بعض معايير النمو للأصناف المدروسة حقلياً

تشير نتائج الجدول (17) إلى وجود فروق معنوية بين الأوزان الرطبة للمجموع الخضري لأصناف الطماطة المزروعة في الترب المعقمة والمعاملة بأوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs والمبيد الإحيائي Verox ، إذ يلاحظ إن معاملة الأصناف بالمبيد الإحيائي Verox حاز الصنف Samar على أعلى وزن رطب وبلغ 51.77غم ، يليه الصنف Maysaloun و Meyameya بوزن ( 46.33 ، 45.44 غم ) على التوالي ، ولا توجد فروق معنوية بين الصنفين الأخيرين والتي اختلفت معنوياً عن معاملة المقارنة Control التي بلغت نسبة 35.84غم ، في حين بلغ معدل المعاملة 47.84غم ، أما عند معاملة الأصناف بمادة أوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs فيلاحظ أن الصنف Meyameya سجل أعلى معدل بنسبة وزن بلغت 48.10 غم ، يليه الصنف Samar و Maysaloun بنسبة (42.66 ، 41.99 غم) على التوالي ولم تكن هنالك فروق معنوية بين الصنف Samar و Maysaloun ، وكانت جميع الأصناف لمعاملة أوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs ذات معنوية عالية عن معاملة المقارنة Control والتي بلغت 35.84 غم .

كما بينت نتائج الجدول وجود فروق معنوية بين الأوزان الجافة للمجموع الخضري لأصناف الطماطة المزروعة في الترب المعقمة والمعاملة بأوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs والمبيد الإحيائي Verox ، إذ يلاحظ أن معاملة الأصناف بالمبيد الإحيائي Verox حاز الصنف Meyameya على أعلى وزن جاف إذ بلغ 13.46 غم ، يليه الصنف Maysaloun و Samar بوزن (10.60 ، 9.70 غم) على التوالي ، ولا توجد فروق معنوية بين الصنفين الأخيرين والتي اختلفت بمعنوية عالية عن معاملة المقارنة Control التي بلغت بمعدل 5.97 غم ، في حين بلغ معدل المعاملة 11.25غم أما عند معاملة الأصناف بمادة أوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs يلاحظ ان الصنف Samar سجل أعلى معدل بنسبة وزن جاف بلغت 10.40 غم ، يليه الصنف Meyameya و Maysaloun بنسبة (10.10 ، 9.66 غم) على التوالي ولم تكن هنالك فروق معنوية بين الأصناف Samar و Maysaloun و Meyameya واختلفت معنوياً عن معاملة المقارنة Control التي بلغت 5.97غم.

الجدول (17) تأثير استخدام المبيد الإحيائي Verox وأوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs على الوزن الرطب والجاف للمجموع الخضري لأصناف الطماطة المدروسة

الوزن الجاف غم/نبات			الوزن الطري غم/نبات			الإصناف المعاملات
Samar	Meyameya	Maysaloun	Samar	Meyameya	Maysaloun	
10.40	10.10	9.66	42.66	48.10	41.99	ZnO-NPs (4000ppm)
9.70	13.46	10.60	51.77	45.44	46.33	Verox (2000ppm)
6.43	4.86	6.63	34.77	36.44	36.33	Control
8.84	9.47	8.96	43.07	43.32	41.66	معدل الأصناف
Control	Verox	ZnO-NPs	Control	Verox	ZnO-NPs	معدل المعاملات
5.97	11.25	10.05	35.84	47.84	44.25	
التداخل	الإصناف	المعاملة	التداخل	الإصناف	المعاملة	L.S.D (0.05)
2.6276	1.517	1.517	7.5141	4.3383	4.3383	

\* الأرقام هي متوسطات لثلاث مكررات

كما أوضحت نتائج الجدول (18) إلى وجود فروق معنوية بين الأوزان الرطبة للمجموع الجذري لأصناف الطماطة المزروعة في الترب المعقمة والمعاملة بأوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs والمبيد الإحيائي Verox ، إذ يلاحظ ان معاملة الأصناف بالمبيد الإحيائي Verox حاز الصنف Meyameya على أعلى وزن رطب للمجموع الجذري وبلغ 20.50 غم ، يليه الصنف Samar وMaysaloun بوزن ( 16.10 ، 12.33 غم ) على التوالي ، ولوحظ إن هنالك فروق معنوية بين الأصناف وأختلف الصنف Meyameya و Samar معنوياً عن معاملة المقارنة Control التي بلغت نسبة 13.68 غم . في حين بلغ معدل المعاملة 16.31 غم، أما عند معاملة الأصناف في التربة المعقمة بمادة أوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs يلاحظ إن الصنف Maysaloun سجل أعلى معدل بنسبة وزن بلغت 19.00 غم ، يليه الصنف Meyameya و Samar بمعدل (17.80 ، 16.93 غم) على التوالي ولم تكن هنالك

فروق معنوية بين الأصناف ، وأختلفت معنوياً عن معاملة المقارنة Control التي بلغت 13.68 غم .

كما لوحظ من نتائج الجدول إلى وجود فروق معنوية بين الأوزان الجافة للمجموع الجذري لأصناف الطماطة المزروعة في الترب المعقمة والمعاملة بأوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs والمبيد الإحيائي Verox ، إذ يلاحظ ان معاملة الأصناف بالمبيد الإحيائي Verox حاز الصنف Maysaloun على أعلى وزن جاف للمجموع الجذري وبلغ 2.20 غم ، يليه الصنف Samar و Meyameya بوزن (2.16 ، 1.90 غم) على التوالي ، ولم توجد فروق معنوية بين الصنف Maysaloun و Samar وأختلفنا معنوياً عن معاملة المقارنة Control التي بلغت نسبة 1.88 غم ، في حين بلغ معدل المعاملة 2.08 غم ، أما عند معاملة الأصناف بمادة أوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs يلاحظ إن الصنف Maysaloun سجل أعلى معدل بنسبة وزن بلغت 1.96 غم ، يليه الصنف Samar و Meyameya بنسبة ( 1.93 ، 1.86 غم ) على التوالي ولم تكن هنالك فروق معنوية بين الأصناف ولم تختلف معنوياً عن معاملة المقارنة Control التي بلغت 1.88 غم .

تكمن الزيادة الحاصلة في أوزان أصناف الطماطة قيد الدراسة إلى وجود الرايزوبكتريا Rhizobacteria التي لها القدرة على تثبيت النتروجين الجوي وإذابة المركبات الفوسفاتية وإنتاج حامض الحديد وحامض Indole Acetic Acid وخفض درجة التفاعل وتحرير العناصر الغذائية منها البوتاسيوم فضلاً عن إفراز العديد من منظمات النمو والأحماض العضوية التي لها القدرة على جلب العناصر وزيادة تركيزها بالتربة مما تنعكس إيجابياً على نمو النبات وهذه البكتريا تستعمر الجذور وتعزز نمو النبات من خلال تسهيل تحمل الإجهاد الحيوي وغير الحيوي ودعم تغذية النباتات (Deka وآخرون، 2015 و Dixit وآخرون، 2017 و Guerrieri وآخرون ، 2020 و Basu وآخرون ، 2021) . ولا توجد فروق معنوية بمعاملة المادة النانوية ZnO-NPs عن المبيد الإحيائي Verox ، ربما يرجع السبب على تفسير بعض الباحثين ان المادة النانوية لها القدرة على تحفيز الخلايا الخضريّة في التكاثر والإستطالة من خلال التأثير المباشر على مناطق تكوين الأوراق وزيادة عدد أنقساماتها وكذلك التأثير على الهرمونات المسؤولة عن تكوين الأوراق وزيادة المجموع الخضري (Raliya وآخرون ، 2015 و Sun وآخرون ، 2020) . فضلاً عن كون

المادة النانوية ZnO-NPs تؤثر على فسلة الخلية وهذا ما يتفق مع المرسومي (1999) حيث أكد على ان هذه الدقائق المتناهية الصغر تمتص من قبل الخلايا وتسلك سلوكاً تحفز الخلايا على الإنقسامات المتكررة . وتبين من النتائج بصورة عامة إن كل من المبيد الإحيائي Verox وأوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs أثرت بشكل إيجابي على نمو النبات مقارنة بمعاملة الشاهد Control ربما بسبب إرتفاع ملوحة التربة ما يؤدي إلى إعاقه الإمتصاص بفعل زيادة الأسموزية في التربة مؤدياً إلى إختلال بالتوازن الغذائي ( Shirazi ، 2001 ) .

**الجدول (18) تأثير استخدام المبيد الإحيائي Verox وأوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs على الوزن الرطب والجاف للمجموع الجذري لأصناف الطماطة المدروسة**

الوزن الجاف غم/نبات			الوزن الطري غم/نبات			الإصناف
Samar	Meyameya	Maysaloun	Samar	Meyameya	Maysaloun	
1.93	1.86	1.96	16.93	17.80	19.00	ZnO-NPs (4000ppm)
2.16	1.90	2.20	16.10	20.50	12.33	Verox (2000ppm)
2.20	2.03	1.43	13.50	14.33	13.23	Control
2.10	1.93	1.86	15.51	17.54	14.85	معدل الأصناف
Control	Verox	ZnO-NPs	Control	Verox	ZnO-NPs	معدل المعاملات
1.88	2.08	1.92	13.68	16.31	17.91	
التداخل	الإصناف	المعاملة	التداخل	الإصناف	المعاملة	L.S.D (0.05)
1.0543	0.6087	0.6087	5.9085	4.4113	4.4113	

\* الأرقام هي متوسطات لثلاث مكررات

#### 10-4- نتائج مكافحة ديدان تعقد الجذور. *Meloidogyne* spp على الهجن الوراثية المنتخبة لنبات الطماطة تحت ظروف البيت البلاستيكي

أوضحت نتائج مكافحة الحقلية إن استخدام المبيدات الكيميائية والحيوية والمواد النانوية كان لها تأثير إيجابي وأعطت نتائج فعالة للحد من الإصابة بديدان تعقد الجذور وأدت إلى تقليل عدد العقد على جذور أصناف الطماطة المستخدمة في التجربة وبالتالي انخفاض شدة إصابتها من الديدان ، إذ تفوقت جميع المعاملات في خفض عدد العقد على الجذور وشدة الإصابة وأختلفت معنوياً عن معاملة المقارنة الملوثة بالنيماتودا فقط والتي بلغ معدل عدد العقد فيها 41.66 ودرجة الإصابة 2.25 حسب مقياس Taylor و Sasser (1978) ، وفيما يخص معدل الأصناف لوحظ أن أكثر الأصناف كفاءة الصنف Maysaloun بتسجيله أقل عدد عقد بمعدل 0.14 ودرجة الإصابة بلغت 0.09 تلاه الصنف Samar و Meyameya بنسبة 0.42 ، 3.47 وبلغت درجة الإصابة 0.33 ، 0.71 على التوالي وهذه النتائج مقارنة بالصنف Super marmand الحساس للإصابة بمعدل 24.42 عقدة ودرجات الإصابة من المعاملات بلغت 1.76 .

يتضح من النتائج المشار إليها في الجداول (19 ، 20) الدور المهم لعامل المكافحة الإحيائية بإستخدام المبيد Verox قيد الدراسة والذي خفض من الإصابة بديدان تعقد الجذور RKN على أصناف الطماطة المدروسة وتفوق الصنف Maysaloun على باقي الأصناف ولم يسجل أي عدد عقد تلاه الصنف Samar و Meyameya وبلغ عدد العقد 0.66 عقدة لكلا الصنفين ودرجة الإصابة 0.66 ، 0.33 على التوالي مقارنة بالصنف الحساس للإصابة Super Marmand إذ بلغ معدل عدد العقد على الجذور 7.33 ودرجة إصابة 2.00 ، وهذه النتائج لم تختلف معنوياً عن معاملة المقارنة غير الملوثة التي لم تسجل أي إصابة بالديدان ولكنها اختلفت معنوياً عن معاملة المقارنة الملوثة وبلغت درجة الإصابة فيها 2.25 وعدد العقد بمعدل 41.66 عقدة ، وهذه الدراسة تتفق مع دراسة سابقة من قبل (كنعان وفرقد ، 2016 و Bavaresco وآخرون ، 2020) عند استخدام البكتريا *Bacillus subtilis* للسيطرة على ديدان تعقد الجذور RKN في صنفين من الطماطة أحدهما حساس والآخر مقاوم وأدى التلقيح بعد الزراعة إلى تقليل عدد الديدان الخيطية في جذور الطماطة وبالتالي خفض من عدد العقد على الجذور . ويعزى السبب في تقليل عدد العقد على جذور أصناف الطماطة

الملقحة بديدان تعقد الجذور من قبل العامل الإحيائي هو تثبيط فقس بيض النيماتودا وهذا بدوره يحفز من نمو النبات للدفاع وإنتاج أنزيم Chitinases (Seenivasan) واخرون ، 2012) .

بينت معاملة تأثير أكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs (قيد الدراسة) على ديدان تعقد الجذور RKN إذ لوحظ إن الصنف Maysaloun الأكثر فعالية للسيطرة على الديدان ولم تسجل أي إصابة تلاه الصنف Samar و Meyameya إذ بلغت درجة الإصابة 0.33 ، 1.00 على التوالي مقارنة بالصنف Super Marmand الحساس للإصابة وبلغ عدد العقد على الجذور 16.00 ودرجة إصابة 2.66 ولم تختلف معنوياً عن معاملة المقارنة غير الملوثة وكذلك معاملة السيطرة بالمبيد الكيميائي بالجرعة الموصى بها (400ppm) والمعاملة التكاملية ، وهذه النتائج تتفق مع El-Sherif واخرون (2019) والذي إفاد بأن الأسمدة النانوية تلعب دور مهم في تثبيط الكائنات الدقيقة الضارة في التربة ومنها ديدان تعقد الجذور لتخصيب زراعة الطماطة تحت ظروف الإحتباس الحراري وفي الوقت نفسه تعزز من معايير نمو النبات وتحافظ على صحة النبات .

وبينت النتائج من إستخدام المبيد الكيميائي Velum Prime بالتركيز الموصى بتأثير واضح ولم تختلف معنوياً عن معاملة المقارنة الغير ملوثة والمعاملة التكاملية ولم تسجل أي إصابة للأصناف وبلغ عدد العقد 1.33 ودرجة الإصابة 1.00 من تأثير إستخدام المبيد الكيميائي مقارنة بالصنف الحساس Super Marmand .

أظهرت نتائج معاملة المكافحة المتكاملة بإستخدام الأصناف المقاومة والمبيد الإحيائي والمبيد الكيميائي بالجرعة الأقل من الموصى بها نتائج تكاملية في تقليل عدد العقد بمعدل 0.25 ودرجة إصابة بمعدل 0.16 ولم تختلف معنوياً عن باقي المعاملات ولكنها اختلفت معنوياً عن معاملة المقارنة الملوثة .

وكما لوحظ من النتائج هنالك فروقات معنوية في معاملة المقارنة الملوثة بين أصناف الطماطة حيث تفوق الصنف Meyameya بتسجيله أعلى عدد للعقد الجذرية بمعدل 22.00 وبلغت درجة الإصابة 3.00 ، وأختلفت معنوياً عن الصنف Maysaloun و Samar التي بلغت بنسبة 0.66 ، 1.33 على التوالي في حين بلغت درجة الإصابة

0.33 ، 1.00 على التوالي مقارنة بالصنف Super Marmand الحساس للإصابة إذ بلغ معدل عدد العقد على الجذور 142.66 ودرجة إصابة 4.66 .

من الآليات التي توضح تأثير البكتريا ودورها الفعال في مكافحة أنها تنتج مركبات سامة تمنع من نمو وأنشطة النيماتودا ، أو التنافس على الغذاء والمقاومة الجهازية المستحثة أو إنتاج المضادات الحيوية ومسؤوليته في تقليل نشاط النيماتودا ، ومن المعروف ان بكتريا *B. thuringiensis* تنتج مادة تسمى بروتينات سموم دلتا *proteins called delta-endotoxins* والتي تعطل المسارات الهضمية للنيماتودا عن طريق تكوين المسامات في الأغشية ( Tong-Jian و اخرون ، 2013 و Tian و اخرون ، 2007 و Jisha و اخرون ، 2013 و Berlitz و اخرون ، 2013 ) .

أما أهم الآليات التي تبين تأثير أكسيد الزنك النانوي على الديدان الخيطية ، النسيج المستهدف الأساسي فهو أمعاء الديدان ويعتقد ان سمية أكسيد الزنك هي مزيج من تأثيرات NPs وسبب السمية الزنك المذاب ، ويعتقد أن أكسيد الزنك يؤثر بشكل عام على جلد الديدان الخيطية ويعمل على زيادة أنشطة مضادات الأكسدة ويعتبر الزنك عامل حيوي مغذي لنمو النبات وتطوره ، كما يلعب الزنك دوراً رئيسياً في إستقلاب النبات من خلال تنظيم أنشطة الأنزيمات الرئيسية للنبات مثل Carbonic Anhydrase ( Gupta ) و اخرون ، 2015 و Sávolly و اخرون ، 2016 و Khan و Siddiqui ، 2018 و Faizan و اخرون ، 2018 و Rizwan و اخرون ، 2019 و Pullagurala و اخرون ، 2018 ) . تعمل جزيئات أكسيد الزنك النانوي ZnO- NPs على تقليل الإجهاد الناجم عن الإشععة فوق البنفسجية وكذلك الحماية ضد مجموعة واسعة من الضغوط الحيوية والغير حيوية وقد ثبت ان أكسيد الزنك النانوي يحمي نظام التمثيل الضوئي عن طريق قمع الضغوط المؤكسدة والتناضحية ( Singh ) و اخرون ، 2017 و Feregrino-Perez و اخرون ، 2018 و Siddiqui و اخرون ( 2015 ) . ويرجع الدور الفعال للمبيد الكيميائي Velum Prime إذ يعمل هذا المبيد على تثبيط السلسلة التنفسية في المايكوبلازما وإيقاف إنتاج Adenosine triphosphate وهي المادة الأساسية لتوفير الطاقة في الخلية الحية وعليه يؤدي إلى إيقاف العمليات الحيوية في النيماتودا وموتها بعد مدة قصيرة ويؤثر عن طريق الملامسة والجهاز الهضمي وهو مبيد غير إنتقائي ( Bayer Crop Science ، 2019 ) . وأشارت العديد من الدراسات حول فعالية المبيد Velum Prime في قمع أنواع النيماتودا وتقليل

أضرارها على مختلف النباتات مثل الطماطة والقطن وفول الصويا سواء في الحقل أو البيت البلاستيكي ويؤدي إلى خفض كثافة النيماتودا حتى وأن أستعمل بتراكيز منخفضة أقل من الموصى بها (Hurd و Faske ، 2015 و Dahlin و اخرون ، 2019 و Hawk ، 2019) .

**الجدول (19) تأثير استخدام المبيدات على عدد العقد الجذرية الناتجة من الإصابة بديدان تعقد الجذور لأصناف الطماطة المدروسة**

معدل المعاملات	عدد العقد الجذرية				الأصناف المعاملات
	Super marmand	Samar	Meyameya	Maysaloun	
2.16	7.33	0.66	0.66	0.00	<b>Verox</b> (2000ppm)
4.41	16.00	0.33	1.33	0.00	<b>ZnO-NPs</b> (4000ppm)
0.33	1.33	0.00	0.00	0.00	<b>Velum Prime</b> (400ppm)
1.00	2.66	0.66	0.33	0.33	<b>Velum Prime</b> (300ppm)
0.25	1.00	0.00	0.00	0.00	<b>Compelet</b> (2000 +4000+300)ppm
41.66	142.66	1.33	22.00	0.66	+ مقارنة ملوثة
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	- مقارنة سليمة
	24.42	0.42	3.47	0.14	معدل الاصناف
		التداخل	الأصناف	المعاملات	L.S.D (0.05)
		19.755	7.4666	9.8773	

\* الأرقام هي متوسطات لثلاث مكررات

أشارت دراسات سابقة إن استخدام الجسيمات النانوية مع عامل المكافحة الإحيائية Verox تؤدي دوراً مهماً في المكافحة وإدارة المحاصيل وكما بين Bhatia و اخرون (2021) ان الرايزوبكتريا تجمعات ميكروبية ذاتية الإفراز تلتزم بأسطح حيوية وغير حيوية و تكون أغشية حيوية مما تسهم في إستعمار جذور النبات و عليه تعزز من نمو النبات وإدارة الإجهاد وأيضا توفر بيئة مناسبة لتخليق وحبس الجسيمات النانوية . وقد أشارت دراسة قام بها Wang و اخرون (2017) إن التطبيق المشترك للمبيد الكيمائي

Velum و Brassinolide و Biological و Neemheyopo أدى إلى تحسين نمو نبات الطماطة وزيادة نشاط نمو الأنزيمات الواقية وجميع العلاجات كان لها تأثير إيجابي لكن يعتبر Velum و Brassinolide هو الأمثل للتحكم في إدارة ديدان تعقد الجذور .

الجدول (20) تأثير استخدام المبيدات على درجة الإصابة من ديدان تعقد الجذور لأصناف الطماطة المدروسة

معدل المعاملات	درجة الإصابة				الإصناف المعاملات
	Super marmand	Samar	Meyameya	Maysaloun	
0.75	2.00	0.33	0.66	0.00	<b>Verox</b> (2000ppm)
1.00	2.66	0.33	1.00	0.00	<b>ZnO-NPs</b> (4000ppm)
0.25	1.00	0.00	0.00	0.00	<b>Velum Prime</b> (400ppm)
0.66	1.33	0.66	0.33	0.33	<b>Velum Prime</b> (300ppm)
0.16	0.66	0.00	0.00	0.00	<b>Compelet</b> (2000 +4000+300)ppm
2.25	4.66	1.00	3.00	0.33	+ مقارنة ملوثة
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	- مقارنة سليمة
	1.76	0.33	0.71	0.09	معدل الأصناف
		التداخل	الأصناف	المعاملات	L.S.D (0.05)
		0.6677	0.2524	0.3339	

\* الأرقام هي متوسطات لثلاث مكررات

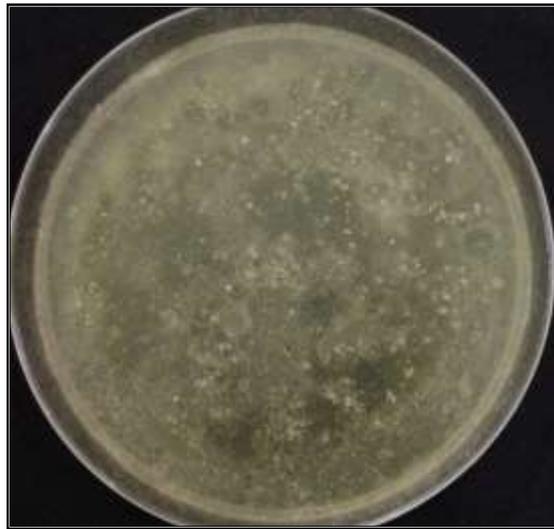
\*\* تم تقييم درجة الإصابة إستناداً إلى الدليل المرضي حسب مقياس Taylor و Sasser (1978) وكما يلي :-

0 = لا توجد عقد على الجذر ، 1 = 2-1 عقدة ، 2 = 3-10 عقدة ، 3 = 11-30 عقدة ، 4 = 31 - 100 عقدة 5 = أكثر من 100 عقدة على الجذر .

#### 4-11- متبقيات المبيد الإحيائي Verox في التربة المعاملة

بينت نتائج العزل من تربة الأصص المزروعة بنباتات الطماطة والمعاملة بالمبيد الإحيائي Verox من خلال تنميتها على وسط Nutrient Agar بظهور مستعمرات بيضاء متفرعة على الوسط الزراعي (MacFaddin ، 2000) وهذا يدل على قدرة البكتريا على البقاء في التربة وتنافسها مع الأحياء الأخرى وبالتالي ما يساعد النباتات بالمواسم اللاحقة من خفض الإصابة بمسببات مرضية مختلفة وتلجأ هذه البكتريا إلى تكوين أبواغ خيطية للظروف غير الملائمة وهذه من أهم صفات المقاومة والبقاء في التربة كما أستغلت هذه الظاهرة لإنتاج أبواغ صناعية لتكون رائدة في برامج المكافحة (Glick ، 2012). تعتبر البكتريا المحفزة (PGPR) Plant Growth Promoting Rhizobacteria صديقة للبيئة وليس لها أضرار وقادرة على تحسين صحة التربة من خلال أليات مُختلفة منها تثبيت النتروجين ، إذابة الفوسفات ، عزل المعادن الثقيلة ، تحلل مخلفات المحاصيل ، قمع مسببات الأمراض النباتية ، إنتاج هرمونات نباتية (حامض الاندول والجبرلين والسيتوكينين) مما يجعلها مفيدة بالترب وخاصة التي تعاني من نقص المغذيات (Prasad وShameer، 2018). البكتريا المحفزة تضم

انواع *Ente*، *Collimonas*، *Burkholderia*، *Bacillus*، *Arthrobacter*، *Agrobacterium*، *Serratia*، *Pedobacter*، *Paenibacillus*، *Rahnella*، *Pseudomonas*، *robacter* كمنتجات للمركبات المتطايرة ومضادات الميكروبات وبالتالي تمنع من نمو المسببات المرضية الفطرية التي تنقلها التربة مؤدية إلى تربة صحية وخصبة (Kanchiswamy وآخرون، 2015 وChenniappan وآخرون، 2019).



الشكل (21) متبقيات المبيد الإحيائي من التربة المعاملة في أطباق بتري

## خامساً : الاستنتاجات والتوصيات

### 1-5- الاستنتاجات Conclusions

- 1- تعد ديدان تعقد الجذور من الآفات الرئيسية في حقول نباتات الطماطة التابعة لمحافظة كربلاء في الزراعة المكشوفة والمحمية ويعد النوع *Meloidogyne incognita* من أكثر الأنواع إنتشاراً .
- 2- أظهرت المسوحات الحقلية لنباتات الطماطة لمحافظة كربلاء تفاوت نسب وشدة الإصابة لإعتماد بعض المزارعين الأصناف المقاومة .
- 3- أبدت المبيدات الاحيائية تأثيراً واضحاً في إنخفاض نسب الإصابة وما زالت المبيدات الكيميائية هي الأكثر فعالية من بدائلها كالمواد النانوية والمبيدات الاحيائية.
- 4- ان إستخدام الأصناف المقاومة الحاوية على جينات مقاومة أدت الى انخفاض نسب الإصابة مقارنة بالأصناف الحساسة .
- 5- أعطت المكافحة المتكاملة بإستخدام الأصناف المقاومة والمبيدات الاحيائية والمواد النانوية والمبيدات الكيميائية نتائج إيجابية في خفض الكثافة العددية للديدان وتقليل أثرها.
- 6- إمكانية إستعمال التراكيب الوراثية المقاومة مع المبيدات الاحيائية والكيميائية والمواد النانوية واستخدامها في برامج المكافحة المتكاملة IPM .

## 5-2- التوصيات Recommendations

- 1- إجراء مسوحات لحقول محافظة كربلاء لم يشملها المسح للتحري عن الأنواع التابعة لجنس *Meloidogyne* التي تصيب حقول الطماسة .
- 2- إعتداد أصناف مقاومة معتمدة ومن شركات رصينة لاستخدامها في الزراعة .
- 3- إمكانية إجراء الكشف عن جينات المقاومة قبل اعتمادها في الزراعة .
- 4- إقامة دورات توعية وارشادية للمزارعين في محافظة كربلاء لأهمية استخدام الأصناف المقاومة فضلا عن استخدام المكافحة المتكاملة باستخدام المبيدات الاحيائية واهمية دمجها مع المبيدات الكيميائية في برامج المكافحة .
- 5- إستعمال المبيد الإحيائي Verox لمكافحة ديدان تعقد الجذور لقابليته على البقاء في الترب العراقية على المدى الطويل .

## 6-1- المصادر العربية Arabic References

أبو غربية ، محمد وليد .(1994) . ديدان تعقد الجذور في الأردن . دراسات حول أنواعها ونشاطاتها الحيوية ومكافحتها . كلية الزراعة ، الجامعة الأردنية ، منشورات الجامعة الأردنية ، عمادة البحث العلمي . الطبعة الثانية . 97 صفحة .

أبو غربية ، وليد إبراهيم .(2010) . ديدان النبات في البلدان العربية .الجامعة الأردنية. دار وائل للنشر. 1242 صفحة.

أنطوان ، باسمة جورج .(2014) . ديدان تعقد الجذور. مجلة الزراعة العراقية . (1): 56-59 .

الاعظمي، عبد الرزاق .(1955) . تشخيص انواع ديدان تعقد الجذور في العراق. وزارة الزراعة. مطبعة الزهور. بغداد 15.

الجهاز المركزي للإحصاء . (2020) . مديرية الإحصاء الزراعي ، وزارة التخطيط . العراق .

[/http://www.cosit.gov.iq/ar](http://www.cosit.gov.iq/ar)

الحازمي ، احمد بن سعد .(1992) . مقدمة في نيماتولوجيا النبات ، الطبعة الأولى كلية الزراعة ، مطابع جامعة الملك سعود ، 321 صفحة .

الحازمي ، احمد بن سعد .(2009) . مقدمة في نيماتولوجيا النبات / الطبعة الثانية . مطابع جامعة الملك سعود ، الرياض / المملكة العربية السعودية ، 440 ص .

الحازمي ، احمد سعد و خليفة حسين دعباج و موفق رمضان كراجه و صالح نعمان النظاري .(2010). إحيائية ديدان تعقد الجذور في نيماتودا النبات في البلدان العربية .الجزء الأول.

الحكيم ، أسماء منصور عبد الرسول .(2009) . دراسة حياتية ونسجية لنيماتودا الحمضيات *Tylenchulus semipenetrans* Cobb,1913 وبعض طرائق مكافحتها ، أطروحة دكتوراه ، كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل ، العراق .

الحكيم ، أسماء منصور وحسن يونس محمد .(2011). مسح لأنواع ديدان تعقد الجذور المصاحبة لنبات الفاصوليا في محافظة نينوى . المؤتمر العلمي الخامس لكلية الزراعة - جامعة تكريت.

الحيالي ، ريان سالم محمود .(2021). التحري عن أهم أجناس النيमतودا المصاحبة لنباتات الزينة (العائلة الوردية و العائلة الدفلية و العائلة الباذنجانية) في مدينة الموصل ومكافحتها . رسالة ماجستير- كلية الزراعة والغابات - جامعة الموصل .

العبيدي ، جمال فاضل وهيب .(1985). استخدام مستخلصات بعض النباتات في مكافحة ديدان تعقد الجذور *Meloidogyn javanica* على الطماطة . رسالة ماجستير – كلية الزراعة – جامعة بغداد .

الكبيسي ، لؤي عياش .(2013). تشخيص أنواع وسلالات ديدان تعقد الجذور *Melodiogyne spp.* على الباذنجان ومكافحتها . رسالة ماجستير - كلية الزراعة والغابات - جامعة الموصل .

المرسومي ، حمود غربي خليفة .(1999). تأثير بعض العوامل في صفات النمو الخضري وحاصل البذور في ثلاثة اصناف من البصل *Allium cepa* . أطروحة دكتوراه، كلية الزراعة، جامعة بغداد، العراق.

بامؤمن، عوض مبارك .(1994). إنتاج وفحص التقاوي، الطبعة الأولى ، عدن-اليمن، مطبوعات جامعة عدن.

حزام ، منير عبد الحميد .(2002). استخدام بعض المواد العضوية وغير العضوية في مكافحة ديدان تعقد الجذور *Meloidogyne javanica* في الباذنجان . رسالة ماجستير . كلية الزراعة والغابات . جامعة الموصل .

حنون ، وارف محمد ، زينب عليوي محمد التميمي وأسماء منصور عبدالرسول . (2018) . التشخيص المورفولوجي والجزيئي لأنواع نيमतودا تعقد الجذور المرافقة لاشجار وشتلات الزيتون في بغداد وبابل و كربلاء العراق . مجلة علوم الرافدين ، المجلد 27 ، العدد (4) ، المؤتمر العلمي الثالث لعلوم الحياة .

خضير ، عبد الحميد خالد .(1987) . أمراض النبات العام . مديرية دار الكتب للطباعة والنشر ، جامعة الموصل ، 327.

عمي ، سليمان نائف . (1985). دراسات بيئة وحياتية لنيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne* spp. وتأثيرها على نبات الطماطة في شمال العراق . رسالة ماجستير – كلية الزراعة والغابات – جامعة الموصل .

عمي ، سليمان نائف ورياض فالح السبع . (1988). دراسة تأثير درجة الحموضة على فقس بيوض ديدان تعقد الجذور *Meloidogyne javanica* . مجلة زراعة الرافدين ، 20: 363 – 370 .

عمي ، سليمان نائف ورياض فالح السبع . (1989). دراسة الكثافة العددية لديدان تعقد الجذور *Meloidogyne* spp. في حقول الطماطا شمال العراق ، مجلة زراعة الرافدين ، 21 (2) .

كنعان ، إستبرق محمد عبدالرضا وفرقد عبدالرحيم عبد الفتاح . (2016) . المكافحة الإحيائية لديدان تعقد الجذور *Meloidogyne* spp. على نبات الطماطة ببعض الأنواع البكتيرية *Azotobacter* و *Pseudomonas fluorescens* و *Streptomyces* sp . مجلة كربلاء للعلوم الزراعية ، 3 (3) .

مطر، شمائل سحاب . (2016). كفاءة بعض المبيدات في مكافحة مرض تعقد الجذور النيماتودي المتسبب عن *Meloidogyne* spp. على نباتات الطماطة . مجلة الانبار للعلوم الزراعية ، مجلد 14 العدد 2 .

نعمة ، هيلين محمد ، أحلام كاظم نعيم وجميل جري يوسف . (2016) . تأثير مركب Diacetyl phloroglucinol 2,4 المنتج من قبل جرثومة *Pseudomonas fluorescens* على بعض الاحياء المجهرية . مجلة جامعة الكوفة لعلوم الحياة ، 8 (1) : 357 – 370 .

ياس ، سعد طارق عبدالملك . (2015). التداخل بين *Trichoderma harzianum* ومستحضر مبيد Glyphosate وتأثيره في المعقد المرضي بين الفطر *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* وديدان تعقد الجذور *Meloidogyne* spp. على الطماطة. أطروحة دكتوراه، كلية الزراعة، جامعة بغداد، العراق .

## English References المصادر الأجنبية -2-6

- Abbot, W. S. (1925).** A method for computing the effectiveness of an insecticide./ econ.
- Abd-Elgawad, M. M. (2016).** Use of Taylor's power law parameters in nematode sampling. Int J Pharm Tech Res, 9(12): 999-1004.
- Abd-Elgawad, M. M., & Askary, T. H. (2018).** Fungal and bacterial nematicides in integrated nematode management strategies. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 28(1):74.
- AbdelRazek, G. M., & Yaseen, R. (2020).** Effect of some rhizosphere bacteria on root-knot nematodes. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 30(1):1-11.
- Abd-Elsalam, K. A. (2003).** Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. african Journal of biotechnology, 2(5): 91-95.
- Abed, F. M. A. H., & Taha, A. H. (1975).** influence of soil texture on the infectivity of the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*, on tomato, *Lycopersicon esculentum*. Ann Agric Sci Moshtohor.
- Aboud, I. D., & Yassien, H. S. H. (2016).** Detection resistance genes of root knot nematode mi in some of pure lines of tomato indeterminate growth.iraq journal of agricultural sciences , 47 (5) : 1321-1327 .
- Acinas, S. G., Sarma-Rupavtarm, R., Klepac-Ceraj, V., & Polz, M. F. (2005).** PCR-induced sequence artifacts and bias: insights from comparison of two 16S rRNA clone libraries constructed from the same sample. Applied and environmental microbiology, 71(12): 8966-8969.

- Adam, M. A. M., Phillips, M. S., & Blok, V. C. (2007).** Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). *Plant pathology*, 56(1): 190-197.
- Adam, M. A., Phillips, M. S., & Blok, V. C. (2005).** Identification of *Meloidogyne* spp. from North East Libya and comparison of their inter-and intra-specific genetic variation using RAPDs. *Nematology*, 7(4): 599-609.
- Adiloglu, A. (2002).** The effect of zinc (Zn) application on uptake of cadmium (Cd) in some cereal species. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 48(6): 553-556.
- Adisa, I. O., Pullagurala, V. L. R., Peralta-Videa, J. R., Dimkpa, C. O., Elmer, W. H., Gardea-Torresdey, J. L., & White, J. C. (2019).** Recent advances in nano-enabled fertilizers and pesticides: a critical review of mechanisms of action. *Environmental Science: Nano*, 6(7), 2002-2030.
- Agrios, G. N. (2005).** *Plant pathology 5th Edition*: Elsevier Academic Press. Burlington, Ma. USA, 79-103.
- Aldon, D., Mbengue, M., Mazars, C., and Galaud, J. P. (2018).** Calcium signalling in plant biotic interactions. *International journal of molecular sciences*, 19(3): 665.
- Alemu, N. (2014).** Review on nematode molecular diagnostics: from bands to barcodes. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 4(27): 129-153.

- Al-Hadede, L. T., Khaleel, S. A., & Hasan, S. K. (2020).** Some applications of nanotechnology in agriculture. *Biochemical and Cellular Archives*, 20(1): 1447-1454.
- Alheyalee, R. S., & Aljuboori, F. K. (2020).** The first recording of root-knot nematodes *Meloidogyne javanica* on the winter cherry *Solanum pseudocapsicum* and controlling it in vitro. *EurAsian Journal of BioSciences*, 14(2): 6679-6685.
- Apte, A., & Daniel, S. (2009).** PCR primer design. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009(3), pdb-ip65.
- Asif, M., Rehman, B., Parihar, K., Ganai, M. A., & Siddiqui, M. A. (2015).** Effect of various physico-chemical factors on the incidence of root knot nematode *Meloidogyne* spp. infesting tomato in district Aligarh (Uttar Pradesh) India. *Journal of plant Sciences*, 10(6): 234-243.
- Bailey, D. M. (1941).** The seedling test method for root-knot-nematode resistance. In *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*. (38) :573-575.
- Bakker, E. G., Toomajian, C., Kreitman, M., & Bergelson, J. (2006).** A genome-wide survey of R gene polymorphisms in *Arabidopsis*. *The Apte Plant Cell*, 18(8): 1803-1818.
- Bartlett, J. M., & Stirling, D. (2003).** A short history of the polymerase chain reaction. In *PCR protocols* (pp. 3-6). Humana Press.
- Basu, A., Prasad, P., Das, S. N., Kalam, S., Sayyed, R. Z., Reddy, M. S., & El Enshasy, H. (2021).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as Green Bioinoculants: Recent Developments, Constraints, and Prospects. *Sustainability* 2021(13) :1140.

- Bavaresco, L. G., Guaberto, L. M., & Araujo, F. F. (2020).** Interaction of *Bacillus subtilis* with resistant and susceptible tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the control of *Meloidogyne incognita*. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 1-16.
- Bayer Crop Science. (2019).**  
<https://cropscience.bayer.co.uk/blog/articles/2019/02/velumprime-and-pcn-control/> .
- Bendezu, I. F. (2004).** Detection of the tomato mi 1.2 gene by PCR using non-organic DNA purification. Nematropica: 23-30.
- Benson, L. M., Null, A. P., & Muddiman, D. C. (2003).** Advantages of Thermococcus kodakaraensis (KOD) DNA polymerase for PCR-mass spectrometry based analyses. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 14(6): 601-604.
- Berkeley, M. (1855).** Vibro forming excrescence on roots of cucumber plants Grad, Chorn 14: 220. Jhorne's Principles of Nematology. McGraw-Hill Book Co; New York, 312.
- Berlitz, D. L., de Athayde Saul, D., Machado, V., de Cássia Santin, R., Guimarães, A. M., Matsumura, A. T. S., ... & Fiuza, L. M. (2013).** *Bacillus thuringiensis*: molecular characterization, ultrastructural and nematotoxicity to *Meloidogyne* spp. Journal of Biopesticides, 6(2): 120.
- Bermingham, N., & Luetlich, K. (2003).** Polymerase chain reaction and its applications. Current diagnostic pathology, 9(3):159-164.
- Bhatia, R., Gulati, D., & Sethi, G. (2021).** Biofilms and nanoparticles: applications in agriculture. Folia Microbiologica, 1-12.

- Bhattacharyya, D., Garladinne, M., & Lee, Y. H. (2015).** Volatile indole produced by rhizobacterium *Proteus vulgaris* JBL5202 stimulates growth of *Arabidopsis thaliana* through auxin, cytokinin, and brassinosteroid pathways. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34(1): 158-168.
- Bhavana, P., Singh, A. K., Kumar, R., Prajapati, G. K., Thamilarasi, K., Manickam, R., ... & Choudhary, J. S. (2019).** Identification of resistance in tomato against root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) and comparison of molecular markers for Mi gene. *Australasian Plant Pathology*, 48(2): 93-100.
- Bird, A. F., & Wallace, H. R. (1965).** The influence of temperature on *Meloidogyne hapla* and *M. javanica*. *Nematologica*, 11(4):581-589.
- Bloemberg, G. V., & Lugtenberg, B. J. (2001).** Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current opinion in plant biology*, 4(4) : 343-350.
- Blok, V. C., & Powers, T. O. (2009).** Biochemical and molecular identification. *Root-knot nematodes*, 98-118.
- Blok, V. C., Ehwaeti, M., Fargette, M., Kumar, A., Phillips, M. S., Robertson, W. M., & Trudgill, D. L. (1997).** Evolution of resistance and virulence in relation to the management of nematodes with different biology, origins and reproductive strategies. *Nematologica*, 43(1): 1-13.
- Boros, L., Fanelli, E., Sesan, T. E., Dobrin, I., Iacomi, B., & De Luca, F. (2018).** Detection and characterization of root-knot nematodes

(*Meloidogyne* spp.) associated with three host plants in Romania. Romanian Biotechnological Letters, 23(6), 14097.

**Bouyoucos, G. J. (1962).** Hydrometer method improved for making particle size analyses of soils 1. Agronomy journal, 54(5): 464-465.

**Bozbuga, R., Dasgan, H. Y., Akhoundnejad, Y., Imren, M., Günay, O. C., & Toktay, H. (2020).** Effect of Mi Gene and Nematode Resistance on Tomato Genotypes Using Molecular and Screening Assay. Cytology and Genetics, 54:154-164.

**Brito, J. A., Stanley, J. D., Kaur, R., Cetintas, R., Di Vito, M., Thies, J. A., & Dickson, D. W. (2007).** Effects of the Mi-1, N and Tabasco genes on infection and reproduction of *Meloidogyne mayaguensis* on tomato and pepper genotypes. Journal of Nematology, 39(4), 327.

**Byrd DP, Kirkpatrick T, Jr, Barker KR.(1983).** An improved technique for clearing and staining plant tissues for detecting of nematodes. Journal of Nematology15:142–143.

**Calvo, P., Watts, D. B., Kloepper, J. W., & Torbert, H. A. (2017).** Effect of microbial-based inoculants on nutrient concentrations and early root morphology of corn (*Zea mays*). Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 180(1): 56-70.

**Cap, G. B., Roberts, P. A., & Thomason, I. J. (1993).** Inheritance of heat-stable resistance to *Meloidogyne incognita* in *Lycopersicon peruvianum* and its relationship to the Mi gene. Theoretical and Applied Genetics, 85(6-7):777-783.

**Carillo, P., Woo, S. L., Comite, E., El-Nakhel, C., Rouphael, Y., Fusco, G. M., ... & Vinale, F. (2020).** Application of *Trichoderma*

*harzianum*, 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone and plant biopolymer formulations modulate plant metabolism and fruit quality of plum tomatoes. *Plants*, 9(6): 771.

**Carneiro, R. M. D. G., de Oliveira Lima, F. S., & Correia, V. R. (2017).** Methods and tools currently used for the identification of plant parasitic nematodes. *Nematology-Concepts, Diagnosis and Control*, 19.

**Carneiro, R. M. D. G., Monteiro, J. M. S., Silva, U. C., & Gomes, G. (2016).** Gênero *Meloidogyne*: diagnose através de eletroforese de isoenzimas e marcadores SCAR. *Diagnose de fitonematoides*, 47-72.

**Castagnone-Sereno P., Danchin, E.G., Perfus-Barbeoch, L. & Abad, P. (2013).** Diversity and evolution of root-knot nematodes, genus *Meloidogyne*: new insights from the genomic era. *Annual Review of Phytopathology* 51: 203-220.

**Castagnone-Sereno, P., & Danchin, E. G. J. (2014).** Parasitic success without sex—the nematode experience. *Journal of Evolutionary Biology*, 27(7): 1323-1333.

**Chakraborty, I., & Sukul, A. (2013).** Potentized Cina reduces root-knot nematode in infestation of cucumber and the antinematode effect is transmitted through water. *International Journal of High Dilution Research-ISSN 1982-6206*, 12(44): 133-134.

**Chaudhary, S., Sarkar, N., & Kaushik, M. (2021).** Recent advances in nanotechnology for accomplishing sustainable agriculture. *Water Conservation in the Era of Global Climate Change*, 147-166.

- Chen, Q., Brown, D. J. F., Curtis, R. H. C., & Jones, J. T. (2003).** Development of the magnetic capture system for recovery of *Xiphinema americanum*. *Annals of applied biology*, 143(3): 283-389.
- Chenniappan, C., Narayanasamy, M., Daniel, G. M., Ramaraj, G. B., Ponnusamy, P., Sekar, J., & Ramalingam, P. V. (2019).** Biocontrol efficiency of native plant growth promoting rhizobacteria against rhizome rot disease of turmeric. *Biological Control*, 129: 55-64.
- Chiquito-Contreras, R. G., Reyes-Pérez, J. J., Chiquito-Contreras, C. J., Vidal-Hernández, L., & Hernández-Montiel, L. G. (2020).** Effect of rhizobacteria and reduced doses of synthetic fertilizers on the morpho-productive expression of tomato in greenhouse. *ITEA*, 116(1): 19-29.
- Christoforou, M., Orford, M., & Tsaltas, D. (2017).** Molecular diagnostic tools for nematodes. *Nematology-concepts, diagnosis and control*, 37.
- Clark, D. P., & Pazdernik, N. J. (2013).** Manipulation of nucleic acids. *Molecular Biology*, 125-161.
- Colagiero, M., Rosso, L. C., & Ciancio, A. (2018).** Diversity and biocontrol potential of bacterial consortia associated to root-knot nematodes. *Biological Control*, 120:11-16.
- Cortada, L., Mantelin, S., Verdejo-Lucas, S., & Kaloshian, I. (2012).** Marker analysis for detection of the Mi-1.2 resistance gene in tomato hybrid rootstocks and cultivars. *Nematology*, 14(5): 631-642.

- Coyne, D. L. (2007).** Practical plant nematology: a field and laboratory guide. IITA.
- Coyne, D. L., Tchabi, A., Baimey, H., Labuschagne, N., & Rotifa, I. (2006).** Distribution and prevalence of nematodes (*Scutellonema bradys* and *Meloidogyne* spp.) on marketed yam (*Dioscorea* spp.) in West Africa. *Field Crops Research*, 96(1): 142-150.
- Crow , W.T & R.A. Dunn (2005) .** Introduction to Plant Nematology . Institute of Food and Agricultural Sciences, Univ. of Florida, Gainesville, 32611.
- Cunha, T. G. D., Visôto, L. E., Lopes, E. A., Oliveira, C. M. G., & God, P. I. V. G. (2018).** Diagnostic methods for identification of root-knot nematodes species from Brazil. *Ciência Rural*, 48(2).
- Dababat, A.A. and R.A. Sikora. 2007.** Use *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* for the Biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 3: 297-309.
- Dahlin, P., Eder, R., Consoli, E., Krauss, J., & Kiewnick, S. (2019).** Integrated control of *Meloidogyne incognita* in tomatoes using fluopyram and *Purpureocillium lilacinum* strain 251. *Crop Protection*, 124, 104874.
- Danso, Y., Akromah, R., & Osei, K. (2011).** Molecular marker screening of tomato, (*solanum lycopersicum* L.) Germplasm for root-knot nematodes (*Meloidogyne* species) resistance. *African Journal of Biotechnology*, 10(9): 1511-1515.
- De Carvalho, L. M., Benda, N. D., Vaughan, M. M., Cabrera, A. R., Hung, K., Cox, T., ... & Teal, P. E. (2015).** Mi-1-mediated

nematode resistance in tomatoes is broken by short-term heat stress but recovers over time. *Journal of nematology*, 47(2): 133.

**De Harduya, O. M., Moore, A. E., & Kaloshian, I. (2001).** The tomato Rme1 locus is required for Mi-1-mediated resistance to root-knot nematodes and the potato aphid. *The Plant Journal*, 27(5): 417-425.

**De Waele, D., & Elsen, A. (2007).** Challenges in tropical plant nematology. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 45: 457-485.

**Deka, H., Deka, S., & Baruah, C. K. (2015).** Plant growth promoting rhizobacteria for value addition: mechanism of action. In *Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants* (pp. 305-321). Springer, Cham.

**Devran, Z., & Elekcioglu, I. H. (2004).** The screening of F<sub>2</sub> plants for the root-knot nematode resistance gene, Mi by PCR in tomato. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 28(4): 253-257.

**Díez, M. J., & Nuez, F. (2008).** Tomato. In *Vegetables II* (pp. 249-323). Springer, New York, NY.

**Dixit, S., Kuttan, K. A., & Shrivastava, R. (2017).** Isolation and characterization of phosphorus solubilizing bacteria from manganese mining area of Balaghat and Chhindwara. *Current Science*, 500-504.

**Du, C., Shen, F., Li, Y., Zhao, Z., Xu, X., Jiang, J., & Li, J. (2021).** Effects of salicylic acid, jasmonic acid and reactive oxygen species on the resistance of *Solanum peruvianum* to *Meloidogyne incognita*. *Scientia Horticulturae*, 275, 109649.

- Dubey VK. (2018).** Proteomics and Genomics. Lecture 37: Polymerase Chain Reaction. Available from: [http://nptel.ac.in/courses/102103017/module37/lec37\\_slide1.htm](http://nptel.ac.in/courses/102103017/module37/lec37_slide1.htm) -Accessed .
- Duddington, C. L. (1951).** *Dactylella lobata*, predacious on nematodes. Transactions of the British Mycological Society, 34(4): 489-491.
- Egamberdiyeva, D. (2005).** Plant-growth-promoting rhizobacteria isolated from a Calcisol in a semi-arid region of Uzbekistan: biochemical characterization and effectiveness. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 168(1): 94-99.
- Eisenback, J. D., & Hunt, D. J. (2009).** General morphology. Root-knot nematodes, 18-54.
- Eisenback, J. D., Hrischmann, H., Sasser, J. N., & Triantaphyllou, A. C. (1981).** A guide to the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.), with a pictorial key (p. 48). State University, Depto. of Plant Pathology.
- Elling, A. A. (2013).** Major emerging problems with minor *Meloidogyne* species. Phytopathology, 103(11): 1092-1102.
- El-Sappah, A. H., MM, I., H El-Awady, H., Yan, S., Qi, S., Liu, J., ... & Liang, Y. (2019).** Tomato Natural Resistance Genes in Controlling the Root-Knot Nematode. Genes, 10(11): 925.
- El-Sherif, A. G., Gad, S. B., Megahed, A. A., & Sergany, M. I. (2019).** Induction of tomato plants resistance to *Meloidogyne incognita* infection by mineral and nano-fertilizer. Journal of Entomology and Nematology, 11(2): 21-26.

- Erlich, H. A. (1989).** PCR technology (Vol. 246). New York: Stockton press.
- Escobar Escobar, D. F., & Cardoso, V. J. (2015).** Germinación y latencia de semillas de *Miconia chartacea* (Melastomataceae), en respuesta a luz, temperatura hormonas vegetales. *Revista Biología Tropical*, 63(4):1169-1184.
- Expósito, A., García, S., Giné, A., Escudero, N., & Sorribas, F. J. (2019).** *Cucumis metuliferus* reduces *Meloidogyne incognita* virulence against the Mi1. 2 resistance gene in a tomato–melon rotation sequence. *Pest management science*, 75(7): 1902-1910.
- Faizan, M., Faraz, A., Yusuf, M., Khan, S. T., & Hayat, S. (2018).** Zinc oxide nanoparticle-mediated changes in photosynthetic efficiency and antioxidant system of tomato plants. *Photosynthetica*, 56(2):678-686.
- FAO. FAOSTAT Crops. (2017)** . In FAO Statistics Division; Food Agricultural Organization of the United Nations: Rome, Italy.
- Faraj, N. M., & Qadir, R. A. (2018).** Evaluation of Four Tomato Genotypes Resistance to Root-Knot Nematode. *Kurdistan Journal of Applied Research*, 3(1): 53-57.
- Faske, T. R., & Hurd, K. (2015).** Sensitivity of *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis* to fluopyram. *Journal of nematology*, 47(4): 316.
- Fatima, T., & Arora, N. K. (2019).** Plant Growth-Promoting Rhizospheric Microbes for Remediation of Saline Soils. In *Phyto and Rhizo Remediation* (pp. 121-146). Springer, Singapore.

- Feregrino-Perez, A. A., Magaña-López, E., Guzmán, C., & Esquivel, K. (2018).** A general overview of the benefits and possible negative effects of the nanotechnology in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 238: 126-137.
- Flor, H. H. (1971).** Current status of the gene-for-gene concept. *Annual review of phytopathology*, 9(1), 275-296.
- Fraceto, L. F., Grillo, R., de Medeiros, G. A., Scognamiglio, V., Rea, G., & Bartolucci, C. (2016).** Nanotechnology in agriculture: which innovation potential does it have?. *Frontiers in Environmental Science*, 4: 20.
- Gabriel, M., Kulczynski, S. M., Muniz, M. F., Boiteux, L. S., & Carneiro, R. M. (2020).** Reaction of a heterozygous tomato hybrid bearing the Mi-1.2 gene to 15 *Meloidogyne* species. *Plant Pathology*, 69(5): 944-952.
- Ghormade, V., Deshpande, M. V., & Paknikar, K. M. (2011).** Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants. *Biotechnology advances*, 29(6): 792-803.
- Gibbs, R. A. (1990).** DNA amplification by the polymerase chain reaction. *Analytical chemistry*, 62(13): 1202-1214.
- Giebel, J. (1970).** Phenolic content in roots of some Solanaceae and its influence on IAA-oxidase activity as an indicator of resistance to *Heterodera rostochiensis*. *Nematologica*, 16(1): 22-32.
- Glick, B. R. (2012).** Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012.

- Guerrieri, M. C., Fanfoni, E., Fiorini, A., Trevisan, M., & Puglisi, E. (2020).** Isolation and screening of extracellular PGPR from the rhizosphere of tomato plants after long-term reduced tillage and cover crops. *Plants*, 9(5): 668.
- Gupta, P., Kumar, V., Usmani, Z., Rani, R., Chandra, A., & Gupta, V. K. (2020).** Implications of plant growth promoting *Klebsiella* sp. CPSB4 and *Enterobacter* sp. CPSB49 in luxuriant growth of tomato plants under chromium stress. *Chemosphere*, 240, 124944.
- Gupta, S., Kushwah, T., Vishwakarma, A., & Yadav, S. (2015).** Optimization of ZnO-Nano-particles to investigate their safe application by assessing their effect on soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *Nanoscale Res Lett*, 10: 303.
- Guzmán-Plazola, R. A., Navas, J. D. D. J., Caswell-Chen, E., Zavaleta-Mejía, E., & del Prado-Vera, I. C. (2006).** Spatial distribution of *Meloidogyne* species and races in the tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) producing region of Morelos, Mexico. *Nematropica*: 215-230.
- Hajihassani, A., Davis, R. F., & Timper, P. (2019).** Evaluation of selected nonfumigant nematicides on increasing inoculation densities of *Meloidogyne incognita* on cucumber. *Plant Disease*, 103(12): 3161-3165.
- Hasan, S. T., & Abood, I. D. (2018).** Identification of *Meloidogyne* spp. According to Morphological characteristics, PCR-SCAR Marker and 18S rDNA region in Iraq. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS)*, 11: 50-56.
- Hasan, S. T., Abood, I. D., & Rasoul, A. M. A. (2020).** Diagnostic of new species of root knot nematode (*Meloidogyne cruciani*) associated

with egg plant in babylon governorate/Iraq based on morphological characters and molecular methods.

- Hassan, M. I., & Mahmoud, A. F. (2021).** Evaluation of some Tomato Genotypes for Nematode Resistance and Detection of the Mi-1.2 Resistance Gene. *Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 12(1): 5-10.
- Hawk, T. (2019).** The Effects of Seed-Applied Fluopyram on Root Penetration and Development of *Meloidogyne incognita* on Cotton and Soybean.
- He, Y., Pantigoso, H. A., Wu, Z., & Vivanco, J. M. (2019).** Co-inoculation of *Bacillus* sp. and *Pseudomonas putida* at different development stages acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of tomato. *Journal of applied microbiology*, 127(1): 196-207.
- Heath, M. C. (2000).** Hypersensitive response-related death. In *Programmed cell death in higher plants* (pp. 77-90). Springer, Dordrecht.
- Heiken, J. A. (2017).** The Effects of Fluopyram on Nematodes. (Under the direction of Charles Opperman).
- Hesling, J. J. (1952).** An improved method of separating eelworm cysts from debris. *Journal of Helminthology*, 26(2-3): 69-70.
- Hillis, D. M., & Dixon, M. T. (1991).** Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly review of biology*, 66(4): 411-453.
- Ho, J. Y., Weide, R., Ma, H. M., van Wordragen, M. F., Lambert, K. N., Koornneef, M., ... & Williamson, V. M. (1992).** The root-knot

nematode resistance gene (Mi) in tomato: construction of a molecular linkage map and identification of dominant cDNA markers in resistant genotypes. *The Plant Journal*, 2(6): 971-982.

**Hofmann, J., Kolev, P., Kolev, N., Daxböck-Horvath, S., & Grundler, F. M. (2009).** The *Arabidopsis thaliana* Sucrose Transporter Gene AtSUC4 is Expressed in *Meloidogyne incognita*-induced Root Galls. *Journal of phytopathology*, 157(4): 256-261.

**Hofmann, T., Lowry, G. V., Ghoshal, S., Tufenkji, N., Brambilla, D., Dutcher, J. R., ... & Wilkinson, K. J. (2020).** Technology readiness and overcoming barriers to sustainably implement nanotechnology-enabled plant agriculture. *Nature Food*, 1(7): 416-425.

**Hooper, D. J. (1961).** A method for attaching the funnel to the flask for use in the Seinhorst two-Erlenmeyer-flask soil extraction technique. *Nematologica*, 6(4): 336-336.

**Hou, J., Wu, Y., Li, X., Wei, B., Li, S., & Wang, X. (2018).** Toxic effects of different types of zinc oxide nanoparticles on algae, plants, invertebrates, vertebrates and microorganisms. *Chemosphere*, 193: 852-860.

**Hu, M. X., Zhuo, K., & Liao, J. L. (2011).** Multiplex PCR for the simultaneous identification and detection of *Meloidogyne incognita*, *M. enterolobii*, and *M. javanica* using DNA extracted directly from individual galls. *Phytopathology*, 101(11): 1270-1277.

**Hunt, D. J., & Handoo, Z. A. (2009).** Taxonomy, identification and principal species. *Root-knot nematodes*, 1: 55-88.

- Husain, S. I., & Masood, A. (1975).** Nematicidal action of plant extracts on plant parasitic nematodes. *Geobios*, 2: 74-76.
- Hussey, R.S. and K.R. Barker. (1973).** A comparison of methods of collecting inoculum of *Meloidogyne* spp., including a new technique *Plant Disease*. 57: 1025\_8.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., & White, T. J. (Eds.). (2012).** PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic press.
- Ismael, J. H. S., & Mahmood, A. A. (2020).** Intergrated management of root-knot nematode ( *Meloidogyne* spp.) in cucumber (*Cucumis sativus* L.) and its effect on nematode population density , plant growth and yield in sulaimani governorate ,Kurdistan , Iraq .*applied ecology and environmental research*, 18(3): 4709-4741.
- Jablonska, B., Ammiraju, J. S., Bhattarai, K. K., Mantelin, S., de Iharduya, O. M., Roberts, P. A., & Kaloshian, I. (2007).** The Mi-9 gene from *Solanum arcanum* conferring heat-stable resistance to root-knot nematodes is a homolog of Mi-1. *Plant physiology*, 143(2): 1044-1054.
- Jaiteh, F., Kwoseh, C., & Akromah, R. (2012).** Evaluation of tomato genotypes for resistance to root-knot nematodes. *African Crop Science Journal*, 20(1).
- Janati, S., Houari, A., Wifaya, A., Essarioui, A., Mimouni, A., Hormatallah, A., ... & Mokrini, F. (2018).** Occurrence of the root-knot nematode species in vegetable crops in Souss region of Morocco. *The Plant Pathology Journal*, 34(4): 308.

- Janssen, T., Karssen, G., Verhaeven, M., Coyne, D., & Bert, W. (2016).** Mitochondrial coding genome analysis of tropical root-knot nematodes (*Meloidogyne*) supports haplotype based diagnostics and reveals evidence of recent reticulate evolution. *Scientific reports*, 6(1): 1-13.
- Jemison, J. and Williams, M. (2006).** Potato-Grain Study Project Report. Water Quality Office, University of Maine, Cooperation Extension . <http://www.umext.maine.edu> .
- Jepson, S. B. (1987).** Identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species).
- Ji, X., Li, J., Dong, B., Zhang, H., Zhang, S., & Qiao, K. (2019).** Evaluation of fluopyram for southern root-knot nematode management in tomato production in China. *Crop Protection*, 122: 84-89.
- Jisha, V. N., Smitha, R. B., & Benjamin, S. (2013).** An overview on the crystal toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Advances in Microbiology*, 3(05): 462.
- Jones, J.T., Haegeman, A., Danchin, E.G.J., Gaur, H.S., Helder, J., Jones, M.G.K., Kikuchi, T., Manzanilla-Lopez, R., Palomares-Rius, J., Wesemael, W.M.L. & Perry, R.N. (2013).** Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 14: 946-961.
- Joshi, M., & Deshpande, J. D. (2010).** Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research*, 2(1): 81-97.

- Jun, Y., Zhenfeng, M., & Guihua, L. (2010).** Potassium Nutrition on Photosynthesis and Chlorophyll Fluorescence in Nai-plum Leaves [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin: 20.
- Kanchiswamy, C. N., Malnoy, M., & Maffei, M. E. (2015).** Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Frontiers in plant science*, 6: 151.
- Karajeh, M. R., & Salameh, N. M. (2015).** Evaluation of okra landraces and accessions response to the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 11(3): 735-745.
- Karssen, G., & Van Aelst, A. (2001).** Root-knot nematode perineal pattern development: a reconsideration. *Nematology*, 3(2): 95-111.
- Karssen, G., Wesemael, W., & Moens, M. (2013).** Root-knot nematodes. *Plant nematology*, (Ed. 2): 73-108.
- Keren-Zur, M., Antonov, J., Bercovitz, A., Feldman, K., Husid, A., Kenan, G., ... & Rebhun, M. (2000).** *Bacillus firmus* formulations for the safe control of root-knot nematodes. In *The BCPC Conference: Pests and diseases, Volume 1. Proceedings of an international conference held at the Brighton Hilton Metropole Hotel, Brighton, UK, 13-16 November 2000* (pp. 47-52). British Crop Protection Council.
- Khan, B. A., Warner, P., and Wang, H. (2014).** Antibacterial properties of hemp and other natural fibre plants: a review. *BioResources*, 9(2): 3642-3659.
- Khan, M. R., & Siddiqui, Z. A. (2020).** Role of zinc oxide nanoparticles in the management of disease complex of beetroot (*Beta vulgaris* L.) caused by *Pectobacterium betavasculorum*, *Meloidogyne*

*incognita* and *Rhizoctonia solani*. Horticulture, Environment, and Biotechnology: 1-17.

**Khan, M., & Siddiqui, Z. A. (2018).** Zinc oxide nanoparticles for the management of *Ralstonia solanacearum*, *Phomopsis vexans* and *Meloidogyne incognita* incited disease complex of eggplant. *Indian Phytopathology*, 71(3): 355-364.

**Khattak, B. 2008.** Biological management of Root Knot Nematode *Meloidogyne incognita* with *Trichoderma harzianum* Rifai in tomato. Adapted from a thesis submitted for the degree of doctor of Philosophy at the Faculty of crop protection sciences, NWEP Agriculture University Peshawar, Pakistan, 157 pp.

**Kiewnick, S., Dessimoz, M., and Franck, L. (2009).** Effects of the Mi-1 and the N root-knot nematode-resistance gene on infection and reproduction of *Meloidogyne enterolobii* on tomato and pepper cultivars. *Journal of Nematology*, 41(2): 134.

**Kim, T. Y., Jang, J. Y., Yu, N. H., Chi, W. J., Bae, C. H., Yeo, J. H., ... & Kim, J. C. (2018).** Nematicidal activity of grammicin produced by *Xylaria grammica* KCTC 13121BP against *Meloidogyne incognita*. *Pest management science*, 74(2): 384-391.

**Kokalis-Burelle, N., Roskopf, E. N., Butler, D. M., Fennimore, S. A., & Holzinger, J. (2016).** Evaluation of steam and soil solarization for *Meloidogyne arenaria* control in Florida floriculture crops. *Journal of nematology*, 48(3): 183.

**Koulagi, R., & Sirohi, A. (2015).** Gene stacking through *Agrobacterium* mediated co-transformation in tomato to engineer resistance

against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* and tomato leaf curl virus. Indian Journal of Nematology, 45(2): 161-168.

**Kumar, A., Kapoor, A., & Walia, R. K. (2016).** Nematotoxins of microbial origin: Their identification, characterization and development as bio-nematicides ii. Effect of growth conditions on the nematotoxicity of bacterial isolates. Indian Journal of Nematology, 46(2): 116-125.

**Kumari, B., Mallick, M. A., Solanki, M. K., Solanki, A. C., Hora, A., & Guo, W. (2019).** Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): modern prospects for sustainable agriculture. In Plant health under biotic stress (pp. 109-127). Springer, Singapore.

**Kwok, S., Kellogg, D. E., McKinney, N., Spasic, D., Goda, L., Levenson, C., & Sninsky, J. J. (1990).** Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. Nucleic acids research, 18(4): 999-1005.

**Le, H. T. T., Padgham, J. L., Hagemann, M. H., Sikora, R. A., & Schouten, A. (2016).** Developmental and behavioural effects of the endophytic *Fusarium moniliforme* Fe14 towards *Meloidogyne graminicola* in rice. Annals of Applied Biology, 169(1): 134-143.

**Leonetti, P., & Molinari, S. (2020).** Epigenetic and metabolic changes in root-knot nematode-plant interactions. International journal of molecular sciences, 21(20), 7759.

**Ley, P. D., & Decraemer, W. (2006).** Summary of present knowledge and research addressing the ecology and taxonomy of freshwater nematodes. Freshwater nematodes: ecology and taxonomy: 3-30.

- Li, X., Hu, H. J., Li, J. Y., Wang, C., Chen, S. L., & Yan, S. Z. (2019).** Effects of the Endophytic Bacteria *Bacillus cereus* BCM2 on Tomato Root Exudates and *Meloidogyne incognita* Infection. *Plant disease*, 103(7): 1551-1558.
- Liharska, T. B. (1998).** Genetic and molecular analysis of the tomato root-knot nematode resistance locus Mi-1.
- Linford, M. B., Yap, F., & Oliveira, J. M. (1938).** Reduction of soil populations of the root-knot nematode during decomposition of organic matter. *Soil Science*, 45(2): 127-142.
- Loubser, J.T., Meyer, A.J. (1987)** Resistance of grapevine rootstocks to *Meloidogyne incognita* under field conditions. *South African Journal of Enology and Viticulture* 8 (2): 70-74.
- Luc, M., Bridge, J., & Sikora, R. A. (2005).** Reflections on nematology in subtropical and tropical agriculture. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*, (Ed. 2): 1-10.
- MacFaddin, J. F. (2000).** *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*, Williams and Wilkins. Philadelphia, PA, 113.
- Mahfouze, S. A., Mahfouze, H. A., & Esmail, R. M. (2015).** Detection of the Mi-1.2 gene from tomato confers resistance against whitefly (*Bemisia tabaci*). *Wulfenia*, 22: 136-146.
- Mai, W.F. and Abawi, G. S. (1987).** Inter-reactions among root-knot nematodes and *Fusarium* wilt fungi on host plants. *Annual Review of Phytopathol.* 25:317-338 .
- Maleita, C. M., dos Santos, M. C. V., Curtis, R. H., Powers, S. J., & Isabel, M. D. O. (2011).** Effect of the Mi gene on reproduction of

*Meloidogyne hispanica* on tomato genotypes. *Nematology*, 13(8): 939-949.

**Maniatis T, Frisch and, Sambrook J .(1982).** *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor, NY, 545 pp.

**Martin, G. B., Bogdanove, A. J., and Sessa, G. (2003).** Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual review of plant biology*, 54(1): 23-61.

**Martinuz A., Schouten A.,and Sikora R. A. (2013).** Post-infection development of *Meloidogyne incognita* on tomato treated with the endophytes *Fusarium oxysporum* strain Fo162 and *Rhizobium etli* strain G12. *BioControl* 58, 95–104. 10.1007/s10526-012-9471-1

**Mckinney, H. H. 1923.** Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedling by *Helminthosporium sativum*. *J. Agric. Res.* 26: 195-217.

**Medina-Canales M. G., Terroba-Escalante P., Manzanilla-López R. H.,and Tovar-Soto A. (2019).** Assessment of three strategies for the management of *Meloidogyne arenaria* on carrot in Mexico using *Pochonia chlamydosporia* var. mexicana under greenhouse conditions. *Biocontrol Sci. Technol.* 29, 671–685. 10.1080/09583157.2019.1582267.

**Melillo, M. T., Leonetti, P., Bongiovanni, M., Castagnone-Sereno, P., & Bleve-Zacheo, T. (2006).** Modulation of reactive oxygen species activities and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation during compatible and incompatible tomato–root-knot nematode interactions. *New Phytologist*, 170(3): 501-512.

- Mena, J., Pimentel, E., Hernández, A. T., Veloz, L., Vázquez, R. P., León, L., ... & Borroto, C. (2002).** Mechanism of action of *Corynebacterium pauronetabolum* strain C-924 on nematodes. *Nematology*, 4(2): 287.
- Mengel, K. (2007).** Potassium Pp. 91–120 in Barker AV, editor; and Pilbeam DJ, editor., eds. *Handbook of plant nutrition*. CRC.
- Michalakis, S., Schön, C., Becirovic, E., & Biel, M. (2017).** Gene therapy for achromatopsia. *The journal of gene medicine*, 19(3), e2944.
- Milligan, S. B., Bodeau, J., Yaghoobi, J., Kaloshian, I., Zabel, P., & Williamson, V. M. (1998).** The root knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *The Plant Cell*, 10(8): 1307-1319.
- Minotti, P. L., Halseth, D. E., & Siczka, J. B. (1994).** Field chlorophyll measurements to assess the nitrogen status of potato varieties. *HortScience*, 29(12): 1497-1500.
- Moens, M., Perry, R. N., & Starr, J. L. (2009).** *Meloidogyne* species—a diverse group of novel and important plant parasites. *Root-knot nematodes*, 1: 483.
- Mohiddin, F. A., & Khan, M. R. (2014).** Root-knot nematode: Ignored soil borne plant pathogen causing root diseases of chickpea. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, 2(1): 04-10.
- Molinari, S., & Loffredo, E. (2006).** The role of salicylic acid in defense response of tomato to root-knot nematodes. *Physiological and molecular plant pathology*, 68(1-3): 69-78.

- Molinari, S., Fanelli, E., & Leonetti, P. (2014).** Expression of tomato salicylic acid (SA)-responsive pathogenesis-related genes in Mi-1-mediated and SA-induced resistance to root-knot nematodes. *Molecular plant pathology*, 15(3): 255-264.
- Morikawa, M., Izawa, Y., Rashid, N., Hoaki, T., & Imanaka, T. (1994).** Purification and characterization of a thermostable thiol protease from a newly isolated hyperthermophilic *Pyrococcus* sp. *Applied and environmental microbiology*, 60(12): 4559-4566.
- Mukhtar, T., Hussain, M. A., Kayani, M. Z., & Aslam, M. N. (2014).** Evaluation of resistance to root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in okra cultivars. *Crop Protection*, 56: 25-30.
- Naderi, M. R., & Abedi, A. (2012).** Application of nanotechnology in agriculture and refinement of environmental pollutants. *J Nanotechnol*, 11(1): 18-26.
- Navyashree, B., Dharmashekar, C., Shivamallu, C., Balasubramanian, S., & Prasad, S. K. (2020).** Plant induced resistance in *Solanacearum lycopersicum* species against root knot nematodes.
- Newton, C.A. and Graham, G.A. (1997).** PCR. 2nd edn. Springer-Verlag, New York, pp. 192.
- Nguyen, C. N., Perfus-Barbeoch, L., Quentin, M., Zhao, J., Magliano, M., Marteu, N., ... & Favery, B. (2018).** A root-knot nematode small glycine and cysteine-rich secreted effector, MiSGCR1, is involved in plant parasitism. *New Phytologist*, 217(2): 687-699.
- Noling, J. W. (2014).** Nematode management in tomatoes, peppers, and eggplant (No. RESEARCH).

- Noling, J.W. (2010).** Nematode management in tomatoes, peppers, and eggplant. U.S. Department of Agriculture, UF/IFAS Extension Service, University of Florida. [www.http://edis.ifas.ufl.edu/ng032](http://edis.ifas.ufl.edu/ng032) (Accessed 13th April, 2015).
- Oka, Y., & Saroya, Y. (2019).** Effect of fluensulfone and fluopyram on the mobility and infection of second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. *Pest management science*, 75(8): 2095-2106.
- Oliveira, C. M. G. D., Monteiro, A. R., & Blok, V. C. (2011).** Morphological and molecular diagnostics for plant-parasitic nematodes: working together to get the identification done. *Tropical Plant Pathology*, 36(2): 65-73.
- Olson, S. K., Greenan, G., Desai, A., Müller-Reichert, T., & Oegema, K. (2012).** Hierarchical assembly of the eggshell and permeability barrier in *C. elegans*. *Journal of Cell Biology*, 198(4): 731-748.
- Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R. (1982).** *Methods of Soil Analysis, Part 2, 2nd Edition. Agronomy Monograph, Vol. 9. American Society of Agronomy. Madison, WI, 1142pp.*
- Palomares-Rius, J. E., Escobar, C., Cabrera, J., Vovlas, A., & Castillo, P. (2017).** Anatomical alterations in plant tissues induced by plant-parasitic nematodes. *Frontiers in plant science*, 8, 1987.
- Pandey, A. C., S. Sanjay, S., & S. Yadav, R. (2010).** Application of ZnO nanoparticles in influencing the growth rate of *Cicer arietinum*. *Journal of Experimental nanoscience*, 5(6): 488-497.
- Pandey, R., & Kalra, A. (2003).** Root-knot disease of ashwagandha *Withania somnifera* and its eco-friendly cost effective

management. Journal of Mycology and Plant Pathology (India):240-245.

**Panpatte, D. G., Shelat, H. N., Jhala, Y. K., & Vyas, R. V. (2021).** Fortified bacterial consortium—A novel approach to control root knot nematode in cucumber (*cucumis sativum*). Biological Control, 155, 104528.

**Panyuta, O., Belava, V., Fomaidi, S., Kalinichenko, O., Volkogon, M., & Taran, N. (2016).** The effect of pre-sowing seed treatment with metal nanoparticles on the formation of the defensive reaction of wheat seedlings infected with the eyespot causal agent. Nanoscale Research Letters, 11(1): 92.

**Papadopoulou, E. S., Lagos, S., Spentza, F., Vidiadakis, E., Karas, P. A., Klitsinaris, T., & Karpouzas, D. G. (2016).** The dissipation of fipronil, chlorpyrifos, fosthiazate and ethoprophos in soils from potato monoculture areas: first evidence for the enhanced biodegradation of fosthiazate. Pest management science, 72(5): 1040-1050.

**Paulson, R. E., & Webster, J. M. (1972).** Ultrastructure of the hypersensitive reaction in roots of tomato, *Lycopersicon esculentum* L., to infection by the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. Physiological Plant Pathology, 2(3): 227-234.

**Pendse, M. A., Karwande, P. P., & Limaye, M. N. (2013).** Past, present and future of nematophagous fungi as bioagent to control plant parasitic nematodes. The Journal of Plant Protection Sciences, 5(1): 1-9.

- Peng, C., Zhang, W., Gao, H., Li, Y., Tong, X., Li, K., ... & Chen, Y. (2017).** Behavior and potential impacts of metal-based engineered nanoparticles in aquatic environments. *Nanomaterials*, 7(1): 21.
- Pérez Velasco, E. A., Betancourt Galindo, R., Valdez Aguilar, L. A., González Fuentes, J. A., Puente Urbina, B. A., Lozano Morales, S. A., & Sánchez Valdés, S. (2020).** Effects of the Morphology, Surface Modification and Application Methods of ZnO-NPs on the Growth and Biomass of Tomato Plants. *Molecules*, 25(6):1282.
- Pérez-Flores, P., Valencia-Cantero, E., Altamirano-Hernández, J., Pelagio-Flores, R., López-Bucio, J., García-Juárez, P., & Macías-Rodríguez, L. (2017).** *Bacillus methylotrophicus* M4-96 isolated from maize (*Zea mays*) rhizosphere increases growth and auxin content in *Arabidopsis thaliana* via emission of volatiles. *Protoplasma*, 254(6): 2201-2213.
- Perez-Lopez, O. W., Senger, A., Marcilio, N. R., & Lansarin, M. A. (2006).** Effect of composition and thermal pretreatment on properties of Ni–Mg–Al catalysts for CO<sub>2</sub> reforming of methane. *Applied Catalysis A: General*, 303(2): 234-244.
- Pocurull, M., Fullana, A. M., Ferro, M., Valero, P., Escudero, N., Saus, E., ... & Sorribas, F. J. (2020).** Commercial formulations of *Trichoderma induce* systemic plant resistance to *Meloidogyne incognita* in tomato and the effect is additive to that of the Mi-1.2 resistance gene. *Frontiers in microbiology*, 10, 3042.
- Pontier, D., Gan, S., Amasino, R. M., Roby, D., & Lam, E. (1999).** Markers for hypersensitive response and senescence show distinct patterns of expression. *Plant molecular biology*, 39(6): 1243-1255.

- Pullagurala, V. L. R., Adisa, I. O., Rawat, S., Kalagara, S., Hernandez-Viezcas, J. A., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2018).** ZnO nanoparticles increase photosynthetic pigments and decrease lipid peroxidation in soil grown cilantro (*Coriandrum sativum*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 132: 120-127.
- Qessaoui, R., Bouharroud, R., Furze, J. N., El Aalaoui, M., Akroud, H., Amarraque, A., ... & Chebli, B. (2019).** Applications of new rhizobacteria *Pseudomonas* isolates in agroecology via fundamental processes complementing plant growth. *Scientific reports*, 9(1): 1-10.
- Qiao, K., Zhang, H., Duan, H., Wang, H., Xia, X., Wang, D., & Wang, K. (2013).** Managing *Meloidogyne incognita* with calcium phosphide as an alternative to methyl bromide in tomato crops. *Scientia Horticulturae*, 150: 54-58.
- Radwan, M. A., Abu-Elamayem, M. M., Kassem, S. M., & El-Maadawy, E. K. (2004).** Management of *Meloidogyne incognita* root-knot nematode by integration of *Bacillus thuringiensis* with either organic amendments or carbofuran. *Pakistan Journal of Nematology*, 22(2): 135.
- Rahman, L. (2003).** Root knot disease and its control. *AGFACTS*. [(accessed on 18 December 2018)]: 1-10.
- Rai, M., Ingle, A. P., Paralikar, P., Anasane, N., Gade, R., & Ingle, P. (2018).** Effective management of soft rot of ginger caused by *Pythium* spp. and *Fusarium* spp.: emerging role of nanotechnology. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(16): 6827-6839.

- Rajalakshmi, S. (2017).** Different types of PCR techniques and its APPLICATIONS. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences*, 7(3): 285-292.
- Rakha, M. T., Scott, J. W., Hutton, S. F., & Smith, H. (2011).** Identification of trichomes, loci and chemical compounds derived from *Solanum habrochaites* accession LA1777 that are associated with resistance to the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* in tomato, *S. lycopersicum*. 43 *Tomato Breeders Roundtable Abstracts*, Ithaca.
- Raliya, R., Nair, R., Chavalmane, S., Wang, W. N., & Biswas, P. (2015).** Mechanistic evaluation of translocation and physiological impact of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles on the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plant. *Metallomics*, 7(12): 1584-1594.
- Ralmi, N. H. A. A., Khandaker, M. M., & Mat, N. (2016).** Occurrence and control of root knot nematode in crops: a review. *Australian Journal of Crop Science*, 11(12): 1649.
- Redman R. S., Kim Y. O., Woodward C. J. D. A., Greer C., Espino L., Doty S. L., et al. (2011).** Increased fitness of rice plants to abiotic stress via habitat adapted symbiosis: A strategy for mitigating impacts of climate change. *PLoS One* 6, 1–10. 10.1371/journal.pone.0014823.
- Reyes-Castillo, A., Gerding, M., Oyarzúa, P., Zagal, E., Gerding, J., & Fischer, S. (2019).** Plant growth-promoting rhizobacteria able to improve NPK availability: selection, identification and effects on tomato growth. *Chilean journal of agricultural research*, 79(3): 473-485.

- Richards, L. A. (1954).** Diagnosis and improvement of saline and alkali soils 78 (2) : 154 .
- Rizwan, M., Ali, S., Ali, B., Adrees, M., Arshad, M., Hussain, A., ... & Waris, A. A. (2019).** Zinc and iron oxide nanoparticles improved the plant growth and reduced the oxidative stress and cadmium concentration in wheat. *Chemosphere*, 214: 269-277.
- Roberts, D., Oliveira, C. M. G., Neilson, R., & Blok, V. (2016).** Diagnose molecular de nematoides parasitos de plantas. Oliveira, cmg ; santos, ma ; castro, lhs Diagnose de fitonematoides. Campinas: Millennium: 281-324.
- Roberts, P. A., & Thomason, I. J. (1989).** Review of variability in four *Meloidogyne* spp. measured by reproduction on several hosts including *Lycopersicon*. *Agricultural Zoology Reviews*.
- Rodriguez R. J., White J. F., Arnold A. E., Redman R. S. (2009).** Fungal endophytes: Diversity and functional roles: Tansley review. *New Phytol.* 182, 314–330. 10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x.
- Rossi, M., Goggin, F. L., Milligan, S. B., Kaloshian, I., Ullman, D. E., & Williamson, V. M. (1998).** The nematode resistance gene Mi of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(17): 9750-9754.
- Rusinque, L., Nóbrega, F., Cordeiro, L., Serra, C., & Inácio, M. L. (2021).** First Detection of *Meloidogyne luci* (Nematoda: Meloidogynidae) Parasitizing Potato in the Azores, Portugal. *Plants*, 10(1): 99.
- Saad, A. S. A., Radwan, M. A., Mesbah, H. A., Ibrahim, H. S., & Khalil, M. S. (2017).** Evaluation of some non-fumigant nematicides and

the biocide avermectin for managing *Meloidogyne incognita* in tomatoes. Pakistan Journal of Nematology, 35(1): 85-92.

**Sabir, S., Arshad, M., & Chaudhari, S. K. (2014).** Zinc oxide nanoparticles for revolutionizing agriculture: synthesis and applications. TheScientificWorldJournal, <https://doi.org/10.1155/2014/925494> .

**Saghafi, D., Ghorbanpour, M., Ajirloo, H. S., & Lajayer, B. A. (2019).** Enhancement of growth and salt tolerance in Brassica napus L. seedlings by halotolerant Rhizobium strains containing ACC-deaminase activity. Plant Physiology Reports, 24(2): 225-235.

**Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985).** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, 230(4732): 1350-1354.

**Sambrook, J. (1989).** Gel electrophoresis of DNA. Molecular cloning a laboratory manual, 6:36-45.

**Sárosi, I., Gerald, E., & Girish, V. N. (1992).** Polymerase chain reaction and its application. Orvosi hetilap, 133: 16-21.

**SAS. (2012).** Statistical Analysis System, User's Guide. Statistical. Version 9.1<sup>th</sup> ed. SAS. Institute Incorporated Cary. N.C. USA.

**Sasser, J. N., & Carter, C. C. (1985).** An advanced treatise on *Meloidogyne*. V. 1. Biology and control. V. 2. Methodology (No. 632.6182 A244). North Carolina State University, Raleigh, NC (EUA). Dept. of Plant Pathology AID, Raleigh, NC (EUA).

**Sávoly, Z., Hrács, K., Pemmer, B., Strelí, C., Záray, G., & Nagy, P. I. (2016).** Uptake and toxicity of nano-ZnO in the plant-feeding

nematode, *Xiphinema vuittenezi*: the role of dissolved zinc and nanoparticle-specific effects. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(10): 9669-9678.

**Schouteden, N., De Waele, D., Panis, B., & Vos, C. M. (2015).** Arbuscular mycorrhizal fungi for the biocontrol of plant-parasitic nematodes: a review of the mechanisms involved. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1280.

**Seah, S., Telleen, A. C., & Williamson, V. M. (2007).** Introgressed and endogenous Mi-1 gene clusters in tomato differ by complex rearrangements in flanking sequences and show sequence exchange and diversifying selection among homologues. *Theoretical and Applied Genetics*, 114(7): 1289-1302.

**Seah, S., Williamson, V. M., Garcia, B. E., Mejia, L., Salus, M. S., Martin, C. T., & Maxwell, D. P. (2007).** Evaluation of a co-dominant SCAR marker for detection of the Mi-1 locus for resistance to root-knot nematode in tomato germplasm. *Report of the Tomato Genetics Cooperative*, 57: 37-40.

**Seebold, K.W. (2014) .** Root-Knot Nematode in Commercial & Residential Crops; Plant Pathology Fact Sheet; Plant Pathology Extension; College of Agriculture, University of Kentucky: Lexington, KY, USA; PPFS-GEN-10.

**Seenivasan, N., David, P. M. M., Vivekanandan, P., & Samiyappan, R. (2012).** Biological control of rice root-knot nematode, *Meloidogyne graminicola* through mixture of *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biocontrol Science and Technology*, 22(6): 611-632.

- Seid, A., Fininsa, C., Mekete, T. M., Decraemer, W., & Wesemael, W. M. L. (2017).** Resistance screening of breeding lines and commercial tomato cultivars for *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* populations (Nematoda) from Ethiopia. *Euphytica*, 213(4): 97.
- Seid, A., Fininsa, C., Mekete, T., Decraemer, W., & Wesemael, W. M. (2015).** Tomato (*Solanum lycopersicum*) and root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.)—a century-old battle. *Nematology*, 17(9): 995-1009.
- Sekhon, B. S. (2014).** Nanotechnology in agri-food production: an overview. *Nanotechnology, science and applications*, 7, 31.
- Shaheen Shahzad, M. A., Sikandar, S., & Afzal, I. (2020).** Polymerase Chain Reaction. *Genetic Engineering: A Glimpse of Techniques and Applications*: 13.
- Shameer, S., & Prasad, T. N. V. K. V. (2018).** Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable agricultural practices with special reference to biotic and abiotic stresses. *Plant Growth Regulation*, 84(3): 603-615.
- Sharma, P., Thakur, S., and Negi, R. (2019).** Recent advances in breeding of tomato—a review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8: 1275-1283.
- Shirazi, M. U., Asif, S. M., Khanzada, B., Khan, M. A., & Mohammad, A. (2001).** Growth and ion accumulation in some wheat genotypes under NaCl stress. *Pak J Biol Sci*, 4: 388-391.
- Shukla, N., Yadav, R., Kaur, P., Rasmussen, S., Goel, S., Agarwal, M., ... & Kumar, A. (2018).** Transcriptome analysis of root-knot

nematode (*Meloidogyne incognita*)-infected tomato (*Solanum lycopersicum*) roots reveals complex gene expression profiles and metabolic networks of both host and nematode during susceptible and resistance responses. *Molecular plant pathology*, 19(3): 615-633.

**Siddiqui, M. H., Al-Whaibi, M. H., Firoz, M., & Al-Khaishany, M. Y. (2015).** Role of nanoparticles in plants. *Nanotechnology and plant sciences*: 19-35.

**Siddiqui, Z. A. and Mahmood, I. 1999.** Role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes: A review. *Bioresource Technology*, 69: 167-179.

**Siddiqui, Z. A., Parveen, A., Ahmad, L., & Hashem, A. (2019).** Effects of graphene oxide and zinc oxide nanoparticles on growth, chlorophyll, carotenoids, proline contents and diseases of carrot. *Scientia Horticulturae*, 249: 374-382.

**Sikder, M. M., & Vestergård, M. (2020).** Impacts of root metabolites on soil nematodes. *Frontiers in plant science*, 10, 1792.

**Sikora, R. A., & Fernandez, E. (2005).** Nematode parasites of vegetables. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*, 2: 319-392.

**Silva, S. D., Carneiro, R. M., Faria, M., Souza, D. A., Monnerat, R. G., & Lopes, R. B. (2017).** Evaluation of *Pochonia chlamydosporia* and *Purpureocillium lilacinum* for suppression of *Meloidogyne enterolobii* on tomato and banana. *Journal of nematology*, 49(1): 77.

- Singh, S., Vishwakarma, K., Singh, S., Sharma, S., Dubey, N. K., Singh, V. K., ... & Chauhan, D. K. (2017).** Understanding the plant and nanoparticle interface at transcriptomic and proteomic level: a concentric overview. *Plant Gene*, 11: 265-272.
- Singh, V. K., Singh, A. K., & Kumar, A. (2017).** Disease management of tomato through PGPB: current trends and future perspective. *3 Biotech*, 7(4): 255.
- Smith, P. G. (1944).** Embryo culture of a tomato species hybrid. In *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci* ( 44): 413-416.
- Soliman, G. M., Ameen, H. H., Abdel-Aziz, S. M., & El-Sayed, G. M. (2019).** In vitro evaluation of some isolated bacteria against the plant parasite nematode *Meloidogyne incognita*. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1): 1-7.
- Stephan, Z.A.(1997).** Plant nematode problems and their control in the Near East region. *FAO Plant Production and Protection Papers* . 9978 : 1020 - 0339 .
- Stephan,Z.A. (1980).** *Meloidogyne hapla* and certain environmental factors. M.Sc. Thesis. Maodonald College, Mecnill University Montreal, Canada.
- Strajnar, P., and Sirca, S. (2011).** The effect of some insecticides, natural compounds and tomato cv. Venezia with Mi gene on the nematode *Meloidogyne ethiopica* (Nematoda) reproduction. *Acta Agriculturae Slovenica*, 97(1): 5.
- Sun, L., Wang, Y., Wang, R., Wang, R., Zhang, P., Ju, Q., & Xu, J. (2020).** Physiological, transcriptomic, and metabolomic analyses

reveal zinc oxide nanoparticles modulate plant growth in tomato. *Environmental Science: Nano*, 7(11): 3587-3604.

**Taylor, A. L., Sasser, J. N., & Nelson, L. A. (1982).** Relationship of climate and soil characteristics to geographical distribution of *Meloidogyne* species in agricultural soils. Relationship of climate and soil characteristics to geographical distribution of *Meloidogyne* species in agricultural soils.

**Taylor, A.L. and J.N. Sasser (1978).** Biology, Identification and control of rootknot nematodes (*Meloidogyne* species). Dep. Of plant pathol N.C. State. Univ. Raleigh, NC. 27650, USA.111 pp .

**Taylor, D. P., & Netscher, C. (1974).** An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. *Nematologica*, 20(2): 268-269.

**Tedford, E. C., & Fortnum, B. A. (1988).** Weed hosts of *Meloidogyne arenaria* and *M. incognita* common in tobacco fields in South Carolina. *Journal of nematology*, 20(Annals 2), 102.

**Thakur, R. K., Dhirta, B., & Shirkot, P. (2018).** Studies on effect of gold nanoparticles on *Meloidogyne incognita* and tomato plants growth and development. *BioRxiv*, 428144

**Thor, K. (2019).** Calcium—Nutrient and messenger. *Frontiers in plant science*, 10: 440.

**Tian, B., Yang, J., & Zhang, K. Q. (2007).** Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future prospects. *FEMS microbiology ecology*, 61(2): 197-213.

- Tong-Jian, X. I. A. O., Fang, C. H. E. N., Chao, G. A. O., Qing-Yun, Z. H. A. O., Qi-Rong, S. H. E. N., & Wei, R. A. N. (2013).** *Bacillus cereus* X5 enhanced bio-organic fertilizers effectively control root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Pedosphere*, 23(2): 160-168.
- Trudgill, D. L., & Blok, V. C. (2001).** Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annual review of phytopathology*, 39(1): 53-77.
- Tuna, A., C. Kaya, M. Diklitas and D. Higgs. (2008).** The combined effects of gibberellic acid and salinity on some antioxidant enzyme activities, plant growth parameters and nutritional status in maize plants. *Environmental and Experimental Botany*.62:1–9.
- Tzortzakakis, E. A., Trudgill, D. L., & Phillips, M. S. (1998).** Evidence for a dosage effect of the Mi gene on partially virulent isolates of *Meloidogyne javanica*. *Journal of nematology*, 30(1): 76.
- Van Bezooijen, J. (2006).** *Methods and techniques for nematology* (p. 20). Wageningen: Wageningen University.
- van Loon L. C., Bakker P. A. H. M., Pieterse C. M. J. (1998).** Systemic resistance induced By rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36: 453–483.
- Veloukas, T., & Karaoglanidis, G. S. (2012).** Biological activity of the succinate dehydrogenase inhibitor fluopyram against *Botrytis cinerea* and fungal baseline sensitivity. *Pest Management Science*, 68(6): 858-864.
- Verdejo-Lucas, S., Sorribas, F. J., Ornat, C., & Galeano, M. (2003).** Evaluating *Pochonia chlamydosporia* in a double-cropping system

of lettuce and tomato in plastic houses infested with *Meloidogyne javanica*. Plant Pathology, 52(4): 521-528.

**Veronico, P., Paciolla, C., Sasanelli, N., De Leonardis, S., & Melillo, M. T. (2017).** Ozonated water reduces susceptibility in tomato plants to *Meloidogyne incognita* by the modulation of the antioxidant system. Molecular plant pathology, 18(4): 529-539.

**Vierstraete, A. (1999).** Principle of the PCR. University of Ghent, Belgium.

**Vigila, V., Subramanian, S., & Devrajan, K. (2019).** PGPR induced systemic resistance in tomato plants against root knot nematode, *Meloidogyne incognita*. J Pharmacogn Phytochem, 8(2S): 749-752.

**Vikalov, H., Hassibi, B., & Hassibi, A. (2006).** On joint maximum-likelihood estimation of PCR efficiency and initial amount of target. In 2006 IEEE International Workshop on Genomic Signal Processing and Statistics (pp. 47-48). IEEE.

**Viljoen, J. J., Labuschagne, N., Fourie, H., & Sikora, R. A. (2019).** Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomatoes and carrots by plant growth-promoting rhizobacteria. Tropical Plant Pathology, 44(3): 284-291.

**Vitale, A., Panebianco, A., & Polizzi, G. (2016).** Baseline sensitivity and efficacy of fluopyram against *Botrytis cinerea* from table grape in Italy. Annals of Applied Biology, 169(1): 36-45.

**Wagh, D., Kulkarni, M., Hanagal, D., & Mhase, N. (2015).** Effect of Soil pH on *Meloidogyne* Species in Piper betel by Path Analysis Study. Indian Journal of Nematology, 45(1): 71-80.

- Walkley, A., & Black, I. A. (1934).** An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil science*, 37(1): 29-38.
- Wang, K. H., Hooks, C., & Ploeg, A. (2007).** Protecting crops from nematode pests: using marigold as an alternative to chemical nematicides. *Cooperrative Extension Service* , 35 .
- Wang, R., Zheng, X., Liu, Y., Wang, Y., Zhao, Q., Zhang, Y., & Sun, Z. (2017).** The study on the control effect of composite application of BR on *Meloidogyne* spp. in tomato. *Journal of Henan Agricultural University*, 01.
- Wann, S. B., Borah, B., Ahmed, R., Gogoi, B., Phukon, P., Baruah, J., ... & Bhau, B. S. (2016).** Isolation, characterization of nematode-controlling bacteria and fungi from nature. In *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity* (pp. 271-295). Springer, New Delhi.
- Weber, R. W., Entrop, A. P., Goertz, A., & Mehl, A. (2015).** Status of sensitivity of Northern German Botrytis populations to the new SDHI fungicide fluopyram prior to its release as a commercial fungicide. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 122(2): 81-90.
- Williamson, V. M. (1998).** Root-knot nematode resistance genes in tomato and their potential for future use. *Annual review of phytopathology*, 36(1): 277-293.
- Williamson, V. M., & Hussey, R. S. (1996).** Nematode pathogenesis and resistance in plants. *The Plant Cell*, 8(10), 1735.

- Williamson, V. M., Ho, J. Y., Wu, F. F., Miller, N., & Kaloshian, I. (1994).** A PCR-based marker tightly linked to the nematode resistance gene, Mi, in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 87(7): 757-763.
- Williamson, V. M., Roberts, P. A., & Perry, R. (2009).** 13. Mechanisms and genetics of resistance. *Root-knot nematodes*, 301.
- Wright, T. M. (2020).** Interactive response of cotton varieties to Velum® Total in fields infested with *Rotylenchulus reniformis* (Doctoral dissertation).
- Wubie, M., & Temesgen, Z. (2019).** Resistance Mechanisms of Tomato (*Solanum lycopersicum*) to Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* species). *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 11(2): 33-40.
- Xiang, N., Lawrence, K. S., & Donald, P. A. (2018).** Biological control potential of plant growth-promoting rhizobacteria suppression of *Meloidogyne incognita* on cotton and *Heterodera glycines* on soybean: A review. *Journal of Phytopathology*, 166(7-8): 449-458.
- Xiang, N., Lawrence, K. S., Kloepper, J. W., Donald, P. A., McInroy, J. A., & Lawrence, G. W. (2017).** Biological control of *Meloidogyne incognita* by spore-forming plant growth-promoting rhizobacteria on cotton. *Plant Disease*, 101(5): 774-784.
- Yagmur, B., & Gunes, A. (2021).** Evaluation of the Effects of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on Yield and Quality Parameters of Tomato Plants in Organic Agriculture by Principal Component Analysis (PCA). *Gesunde Pflanzen*: 1-10.

- Yao Y.-R., Tian X.-L., Shen B.-M., Mao Z.-C., Chen G., Xie B.-Y. (2015).** Transformation of the endophytic fungus *Acremonium implicatum* with GFP and evaluation of its biocontrol effect against *Meloidogyne incognita* . World J. Microbiol. Biotechnol. 31, 549–556. 10.1007/s11274-014-1781-2.
- Yasmin, J., Lohumi, S., Ahmed, M. R., Kandpal, L. M., Faqeerzada, M. A., Kim, M. S., & Cho, B. K. (2020).** Improvement in purity of healthy tomato seeds using an image-based one-class classification method. Sensors, 20(9), 2690. <https://doi.org/10.3390/s20092690> .
- Yassein, H. S., & Jabbar, B. A. (2017).** The use of ssr techniques in determining the responsible gene of knot nematode disease in tomato crop . Iraq journal of agriculture,22(8)
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., and Madden, T. L. (2012).** Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC bioinformatics, 13(1): 1-11.
- Ye, W., Zeng, Y., & Kerns, J. (2015).** Molecular characterisation and diagnosis of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) from turfgrasses in North Carolina, USA. PLoS One, 10(11), e0143556.
- Yerasu, S. R., Sellaperumal, C., Gowda, M. T., Mishara, P., Tiwari, S. K., Pandey, C. D., and Pandey, S. (2019).** Characterization of Tomato Germplasm for Root-Knot Nematode Resistance with the Help of Mi23 Marker. Indian Journal of Nematology, 49(2): 131-138.
- Zádor E. (2011).** The polymerase chain reaction. Theoretical course: Basic biochemical methods and ischemic heart models. Supported by:

HURO/0901/069/2.3.1 HU-RODOCS. 2011. Available from: [https://www.academia.edu/35361310/The\\_polymerase\\_chain\\_reaction\\_Theoretical\\_course\\_Basic\\_biochemical\\_methods\\_and\\_ischemic\\_heart\\_models\\_Supported\\_by\\_HURO\\_0901\\_069\\_2\\_3\\_1\\_HURO\\_DOCS](https://www.academia.edu/35361310/The_polymerase_chain_reaction_Theoretical_course_Basic_biochemical_methods_and_ischemic_heart_models_Supported_by_HURO_0901_069_2_3_1_HURO_DOCS) .

**Zijlstra, C. (2000).** Identification of *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla* based on SCAR-PCR: a powerful way of enabling reliable identification of populations or individuals that share common traits. *European Journal of Plant Pathology*, 106(3): 283-290.

**Zijlstra, C. Donkers-Venne, D. T., Fargette, M. (2000).** Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterised amplified region (SCAR) based PCR assays. *Nematology*, 2(8): 847-853.

**Zuckerman, B. M., & Jansson, H. B. (1984).** Nematode chemotaxis and possible mechanisms of host/prey recognition. *Annual Review of Phytopathology*, 22(1): 95-113.

ملحق (1) بيانات تسجيل عزلة النيما تودا *Meloidogyne incognita* isolate L88  
في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI) ضمن بيانات GenBank

NCBI Resources How To

*Meloidogyne incognita* isolate L88 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence  
GenBank: **MZ314042.1**  
[FASTA Graphics](#)  
[Go to:](#)  
LOCUS MZ314042 695 bp DNA linear INV 03-JUN-2021  
DEFINITION *Meloidogyne incognita* isolate L88 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence.  
ACCESSION MZ314042  
VERSION MZ314042.1  
KEYWORDS .  
SOURCE *Meloidogyne incognita* (southern root-knot nematode)  
ORGANISM [Meloidogyne incognita](#)  
Eukaryota; Metazoa; Ecdysozoa; Nematoda; Chromadorea; Rhabditida;  
Tylenchina; Tylenchomorpha; Tylenchoidea; Meloidogynidae;  
Meloidogyninae; Meloidogyne; *Meloidogyne incognita* group.  
REFERENCE 1 (bases 1 to 695)  
AUTHORS **Mohammed,L.H. and AbedAlreda,E.M.**  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (29-MAY-2021) Department of Plant protection, University of Kerbala, College of Agriculture, Kerbala, Kerbala, Iraq,0096 56001  
COMMENT ##Assembly-Data-START##  
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing  
##Assembly-Data-END##  
FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..695  
/organism="Meloidogyne incognita"  
/mol\_type="genomic DNA"  
/isolate="L88"  
/isolation\_source="Karbala province (Root of Tamato)"  
/db\_xref="taxon:6306"  
/country="Iraq"  
/collection\_date="01-Apr-2020"  
/collected\_by="Liqaa H. Mohammed & Estabraq M. AbedAlreda"  
[rRNA](#) <1..>695  
/product="small subunit ribosomal RNA"  
ORIGIN  
1 gccgatggaa attatattgc cttggtgggg agcttcccg caacgaaagt cttccggttc  
61 cgggggaagt atggttgcaa agctgaaact taaaggaatt gacggaaggg caccaccagg  
121 agtggagcct gcggottaat ttgactcaac acggggaac tcaccggcc cggacactgt  
181 gaggattgac agattgatag ctttttcattg attcagtggg tgggtggtgca tggccgttct  
241 tagttcgtgg agtgatttgt ctggtttatt cggataacga gcgagactct cacctaactaa  
301 atagttggtg cactactctta gtgtatactg cttcttagag ggatttgccg cgttcagccg  
361 aaagaaattg agcaataaca ggtotgtgat gcccttagat gtccggggct gcacgcgcgc  
421 tacactggca aaatcaactg gcttgcctca cctgaaagg ggcgggtaaa ccattgaaaa  
481 tttgccgtga ttgggatcgg aaattgcaat tttttccgt gaacgaggaa ttccaagtaa  
541 gtgcgagtc tcaactcgcg ttgattacgt cctgcccctt tgtacacacc gcccgctcgt  
601 gccccggact gagccatttc gagaaatttg gggaccgttg atttaatttt tctaaattac  
661 tttgatggaa accaatttaa tcgcatgggc ttgaa

## **Abstract :-**

This research was conducted on the percentage and intensity of checking and identifying the types of root knot worms that infect tomato plants in Karbala governorate. And phenotypic and molecular diagnosis of the most frequent type, and testing the sensitivity of ten tomato varieties to infection with root-knot worms with testing the effect of concentrations of the biocidal Verox, ZnO-NPs and velum prime on root-knot worms RKN in laboratory and field conditions. the letter 1, 72.72% on the other hand, no injuries were recorded in the Ibrahimiya area, Khan al-Rub' farms, al-Hur sub-district and al-Abbas's threshold and Al-Ataba farms. Based on the morphological identification that includes female perineal patterns, two type species of RKN (*Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne javanica*) were identified in the specimens of the studied area. Which, *M. incognita* was the predominant species. Furthermore, the polymerase chain reaction (PCR) sequence of *M. incognita* shared identities of 99.28% with two isolates from the US and Pakistan. In addition, tomato plant varieties (Maysaloun, Sura, and Samar) showed high resistance to *Meloidogyne* spp., whereas, varieties of (Narcen-8, Sunagri, and Rock star) showed high sensitivity to *Meloidogyne* spp.

In the second part of this study, the concentrations of Biopesticide Verox and Nano-zinc oxide ZnO-NPs, were evaluated for their effect on root-knot nematode in the laboratory and field conditions. In the laboratory, the concentrations 2000ppm of Verox and the concentrations 4000ppm of ZnO-NPs significantly reduced ( $p < 0.05$ ) the nematode egg hatching 94.6

and 87.3% respectively, as well as juvenile J<sub>2</sub> mortality 94.3 and 88.3% over the untreated control. The application of 2000ppm, 4000ppm, and 400ppm of Verox , ZnO-NPs , and the Nematicide Velum prime respectively, on the tomato plant varieties (Maysaloun, Meyameya , and Samar) significantly reduced galls formation and nematode infestation level over the untreated control. However, The Maysaloun was the best among the other varieties with the lowest gall 0.14 formation and incidence rate of 0.09. In addition, the application of 2000ppm and 4000ppm of Verox and ZnO-NPs respectively, on (Maysaloun, Meyameya, and Samar) varieties, significantly improved the growth biomarkers of tomato plants in terms of fresh and dry weights of vegetative and root system as compared to untreated control plants in sterilized .

The Republic of Iraq

Ministry of Higher Education and Scientific Research

Karbala University

College of Agriculture

Plant Protection Department



**Diagnosis of root-knot nematodes *Meloidogyne*  
spp. On tomato in some areas of Karbala  
province and evaluation of some biological and  
non-biological control factors**

Provided by

**Liqaa Hussein Mohammed**

To the Council of the College of Agriculture - University of Karbala It is part  
of the requirements for obtaining a Master of Science degree in Agriculture  
- Plant Protection

Supervised by

**Ass.Dr. Istabraq Mohammed AbedalReda**

**2021 A.D**

**1442 A. H**