

## مطالعه مورفولوژی و هیستوپاتولوژی نماتد *Pratylenchus pseudocoffeae* روی گل داوودی در شهرستان محلات

عزت اله صداقت فر\*، عضو هیأت علمی گروه گیاهپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی اراک  
عباس محمددیمی، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی واحد علوم و تحقیقات تهران

### چکیده

به منظور شناسایی نماتدهای انگل گیاه گل داوودی از گلخانه ها و زمینهای زیر کشت در منطقه محلات در استان مرکزی، طی سالهای ۱۳۸۶ و ۱۳۸۷ تعداد ۶۷ نمونه خاک و ریشه جمع آوری گردید. عملیات استخراج نماتدها، ثابت کردن و انتقال آنها به گلیسرین انجام شد. پس از بررسی های میکروسکوپی، اندازه گیری و ترسیم تصاویر نماتدها، شناسایی آنها با توجه به خصوصیات مورفولوژیک و مرفومتریک انجام شد. یکی از مهمترین نماتدهای شناسایی شده، نماتد مولد زخم ریشه گونه *Pratylenchus pseudocoffeae* بود. بافتهای ریشه توسط نماتدها مورد حمله قرار گرفته بودند به طوریکه سبب ایجاد لکه های نکروز مشخص و پوسیدگی های بزرگ در بافت پارانثیم پوست ریشه شده بود. همه مراحل رشدی نماتد در داخل بافت ریشه مشاهده گردید. این نماتد دارای خصوصیات مرفومتریکی به شرح ذیل است: ناحیه سر دارای سه حلقه، شکاف تناسلی در ۷۹ تا ۸۲ درصدی از طول بدن قرار گرفته است، کیسه عقبی رحم کشیده و متمای، دم در نماتد ماده نیمه کروی یا در انتها پهن و گرد، انتهای دم صاف و فاقد شیار و دارای نماتد نر با کیسه ذخیره اسپرم بیضوی شکل بود، این گونه به واسطه موقعیت قرارگیری شکاف تناسلی در بدن؛ شکل و نوع دم و شکل سر از گونه های مشابه *P. coffeae*، *P. penetrans* و گونه *P. gutierrezii* متمایز می شود. این اولین گزارش آلودگی به این نماتد در ایران و سومین گزارش این نماتد بعد از شرح اصلی در دنیا می باشد.

واژه های کلیدی: نماتد زخم ریشه، *Pratylenchus pseudocoffeae*، ریخت شناسی، گل داوودی، ایران

## مقدمه

نماتد مولد زخم ریشه از جنس *Pratylenchus* می باشد که در حال حاضر شامل ۶۸ گونه است (۳). نماتدهای این جنس از مخرب ترین آفات اغلب گیاهان می باشد. همه گونه های این جنس انگل داخلی مهاجر بوده و از بافت پارانشیم پوست ریشه تغذیه می کنند و سبب وارد آوردن خسارت به ریشه گیاهان مختلف از جمله گل های زینتی می شود. اثرات متقابل نماتدهای مولد زخم ریشه با سایر عوامل بیماری زای خاکزاد و نقش موثر آنها در سهولت ورود و حمله این عوامل به ریشه گیاهان اهمیت این دسته از موجودات انگل را مضاعف ساخته است. بدین سبب مطالعات گسترده ای بر روی گونه های مختلف جنس *Pratylenchus* صورت گرفته است (۱۱). منطقه محلات علی رغم اهمیتی که از نظر کشاورزی، تنوع آب و هوایی، سطح زیر کشت و تولید گل دارد، کمتر مورد مطالعه و توجه محققین کشاورزی قرار گرفته است و به خصوص در زمینه نماتد شناسی به عنوان یکی از عوامل بیماری زا کار چندانی صورت نگرفته است. حسنی مهربان و تنها معافی (۱۳۷۹) نماتد مولد غده ریشه گونه *Meloidogyne javanica* را از گلخانه های پرورش میخک محلات گزارش نمودند (۱). همچنین تنها معافی و همکاران (۲۰۰۳) نماتد سیست *Cactodera cacti* را از گلخانه های کاکتوس محلات جداسازی و شناسایی نمودند. مهدیخانی و همکاران (۱۳۸۲) نماتد مولد غده ریشه، گونه *Meloidogyne cruciani* را از گلخانه های میخک محلات گزارش کردند. نماتد مورد مطالعه از خاک و ریشه گل داوودی (*Dendrothema grandiflorum* Kitam cv. Puja) با جمعیت زیادی در گلخانه ها و زمین های زیر کشت گل داوودی در منطقه محلات واقع در استان مرکزی مشاهده گردید. اهداف مطالعه حاضر ریخت شناسی و مرفومتری نماتد زخم ریشه موجود در ریشه گل داوودی و مطالعه رابطه گیاه میزبان با نماتد (هیستوپاتولوژی) می باشد.

## مواد و روش ها

**الف) جمع آوری نمونه:** طی سال های ۱۳۸۶ و ۱۳۸۷ در مجموع ۶۷ نمونه خاک و ریشه از مناطق مختلف کاشت گل داوودی در منطقه محلات جمع آوری گردید. نمونه های خاک و ریشه از گیاهانی که دارای علائم خاصی از بیماری نظیر کاهش رشد، زردی عمومی و پژمردگی بودند و از اعماق مختلف (سطح خاک تا عمق ۲۵ سانتی متری) جمع آوری شدند.

**ب) جداسازی نماتد از خاک:** پس از نمونه برداری خاک از نقاط کشت شده گل داوودی در منطقه محلات، به منظور استخراج نماتدها از خاک از روش جنکینز (۱۹۶۴) استفاده شد (۹).

**ج) جداسازی نماتد از ریشه:** برای استخراج نماتد از بافت ریشه از روش کولن و دهرد (۱۹۷۲) استفاده شد.

د) تهیه اسلاید دائمی: پس از استخراج نماتدها، جهت شناسایی نماتدها عملیاتی در جهت کشتن، ثابت کردن و انتقال آنها به گلیسرین خالص با استفاده از روش دگریسه انجام شد. سپس از نمادهای تثبیت شده در گلیسرین، اسلایدهای میکروسکوپی دائمی تهیه شد.

ه) مطالعه ریخت شناسی و مرفومتری: برای اندازه گیری و رسم تصاویر قسمت های مختلف بدن نماتد، از میکروسکوپ دو چشمی Carl-zeiss که مجهز به لوله ترسیم بود، استفاده گردید. تعداد افراد اندازه گیری شده، بسته به فراوانی جمعیت های جمع آوری شده متغیر بود. ابعاد بر حسب واحد میکرومتر اندازه گیری شد، پس از اندازه گیری ویژگی ها و تشخیص گونه به کمک کلیدهای شناسایی، ابتدا اشکال مقدماتی نماتدها به صورت خام توسط لوله ترسیم روی کاغذ معمولی ترسیم گردید. سپس جهت تکمیل و نشان دادن جزئیات، شکل های ترسیمی روی ورق کالک منتقل شد. پس از پایان ترسیم، مقیاس (Scale) اشکال ترسیم شده در بزرگنمایی مربوط به هر شکل، تعیین و ترسیم گردید. سپس شکل های ترسیم شده به کمک دستگاه Scanner، اسکن گردید و به کمک نرم افزار کامپیوتری (Corel Draw) به شکل های حاضر تبدیل گردید.

و) هیستوپاتولوژی: مطابق روش جنسن ابتدا ریشه های آلوده به تکه های پنج میلی متری تقسیم شده سپس ریشه ها با محلول فرمالدئید-اسید استیک-الکل (FAA) تثبیت شد، از تکه های ریشه به کمک غلظت های مختلف (۲۵، ۵۰، ۷۵، ۹۵ و ۱۰۰) الکل، آزدایی گردید و تکه های ریشه آزدایی شده در پارافین مایع فرو برده شد، پارافین همراه ریشه به کمک دستگاه میکروتوم به تکه های ۱۵ تا ۱۷ میکرومتری برش داده شد. بافت های ریشه برش داده شده به کمک محلول سافرانین و Fast green رنگ آمیزی گردید و بافت ها در رزین زایلن قرار گرفت (۱۰). و سپس برش های رنگ آمیزی در زیر میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت.

## نتایج و بحث

پس از استفاده از کلیدهای موجود و مقایسه با شرح اصلی نمادهای جمع آوری شده از خاک و ریشه گیاه گل داوودی از مزارع و گلخانه های منطقه محلات، گونه *Pratylenchus pseudocoffeae* تشخیص داده شد.

مشخصات گونه مورد مطالعه: *Pratylenchus pseudocoffeae* Mizukubo, 1992

مشخصات مرفومتری ۱۴ نماتد ماده و ۱۰ نماتد نر در جدول ۱ آورده شده است.

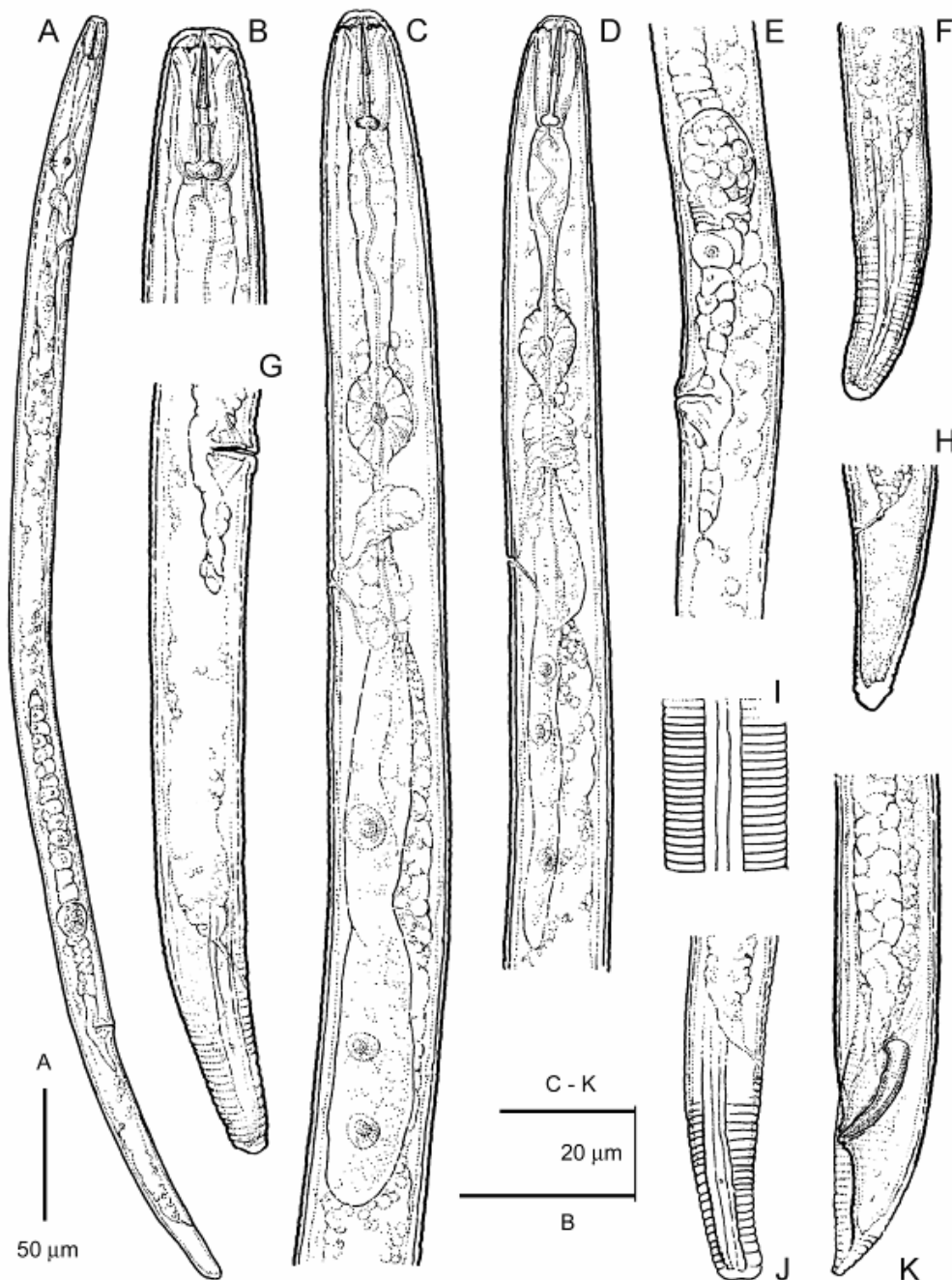
ماده: نمادهای کشته شده اغلب صاف، با بدن مستقیم و قسمت انتهایی بدن به طرف شکم برگشته است، عرض شیارهای عرضی در وسط بدن به طور میانگین ۱/۴ میکرومتر، ناحیه لب ها نسبتاً کوتاه و قسمت جلو مسطح شده، ارتفاع ناحیه لب ها دو تا سه میکرومتر و عرض ناحیه لب ها هفت تا هشت

میکرومتر، ناحیه لب ها دارای دو شیار عرضی می باشد. در زیر میکروسکوپ نوری دومین حلقه کمی بلندتر و عریض تر از حلقه اول به نظر می رسد و در ۷۵٪ نمونه ها از نمونه های مورد مطالعه به نظر می رسد که حلقه دوم از طرف شکمی دو قسمت شده و در بقیه (۲۵٪ نمونه ها) از هر دو طرف دو حلقه دیده می شود. معمولا در این شرایط ناحیه لب ها را به صورت ترکیبی از سه حلقه در نظر می گیرند. سطوح جانبی دارای چهار شیار طولی می باشد. میانگین عرض سطوح جانبی پنج میکرومتر، طول استایلت به طور میانگین ۱۵/۷ میکرومتر و گره های استایلت عریض و ارتفاع آن ۱/۸ تا ۲/۵ میکرومتر و عرض گره ها ۳ تا ۵/۳ میکرومتر و به شکل های مختلف اما اغلب گرد یا از جلو مسطح می باشد. حباب میانی مری بیضوی به طول ۱۲ تا ۱۷ میکرومتر، فاصله حباب انتهایی مری تا ابتدای بدن ۱۱۹ تا ۱۶۷ میکرومتر می باشد. ناحیه مری با قسمت روده ۷۰ تا ۸۵ میکرومتر همپوشانی دارد. فاصله منفذ دفعی ترشچی تا ابتدای بدن ۷۰ تا ۸۵ میکرومتر، همیزونید مسطح به طول دو تا سه حلقه و همسطح یا جلوتر از منفذ دفعی ترشچی می باشد، تخمدان مستقیم و طول آن ۱۲۸ تا ۱۹۲ میکرومتر، کیسه ذخیره اسپرم کشیده به طول ۱۱ تا ۲۲ میکرومتر، عرض ۹ تا ۱۴ میکرومتر و پر از اسپرم می باشد. کیسه عقبی رحم معمولا کمتر از دو برابر عرض بدن در ناحیه شکاف تناسلی است. دم اغلب استوانه ای و به سمت انتها باریک می شود. انتهای دم اغلب نیمه کروی و دارای تنوع می باشد به طوری که در نمونه های مورد مطالعه دم گرد و به ندرت با انتهای چهارگوش و گاهی نوک تیز است (شکل H-۱ و J). انتهای دم صاف و فاقد شیار و به ندرت دارای چروک است، فاسمید در وسط حلقه های سطوح جانبی قرار دارد.

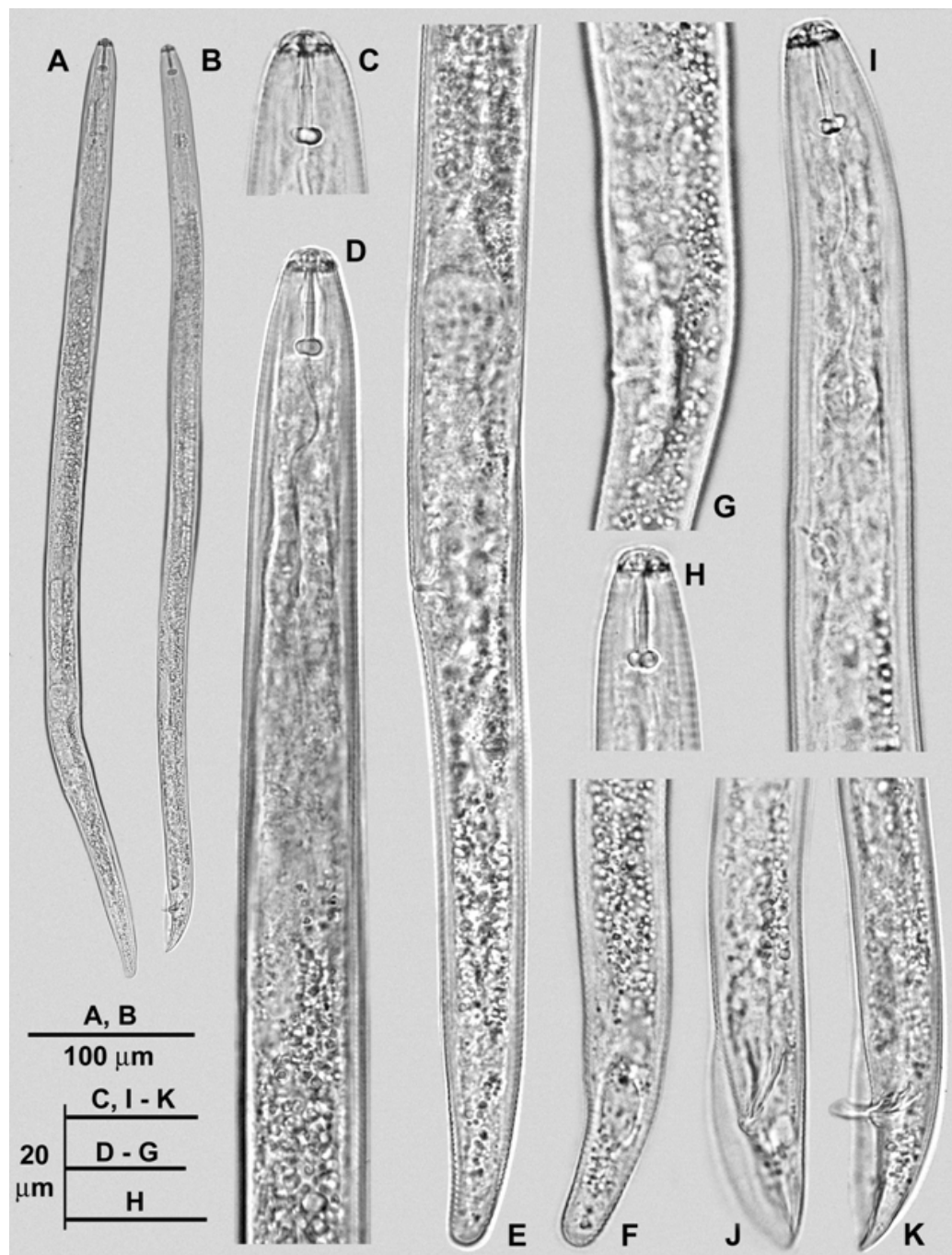
نو: به هنگام کشتن، بدن به صورت مستقیم دیده می شود، طول استایلت کوتاه تر از طول استایلت در نماتد ماده و گره ها کوچکتر از گره های موجود در استایلت نماتد ماده است، ارتفاع گره ۲ تا ۲/۵ میکرومتر و عرض گره ها ۲/۷ تا ۳/۷ میکرومتر، بیضه کشیده و اسپرماتوگونیا به صورت دو ردیفه و به طول ۱۵۶ تا ۲۲۰ میکرومتر می باشد، اسپیکول منحنی شکل و گوبرناکولوم ساده و مشخص، و میانگین طول آن ۴/۵ میکرومتر، طول پرده بورسا ۳۲ تا ۴۰ میکرومتر می باشد. *Pratylenchus pseudocoffeae* اولین بار از روی گیاهان خانواده Compositae (از روی گل داوودی و آرتیمیزیا) از ژاپن در سال ۱۹۹۲ گزارش گردید (۱۲). اینسرا و همکاران در سال ۱۹۹۸ در میان گروه های جمعیتی که بیشتر به صورت *P. coffeae* گزارش شده بودند جمعیت جدیدی از *P. pseudocoffeae* را از فلوریدا توصیف نمودند که مطالعات تفصیلی روی چندین جمعیت *P. coffeae* و *P. gutierrezii* از مکان ها و میزبان های مختلف توسط گلدن، لویزو ویلچز در سال ۱۹۹۲ را به دنبال داشت، در این مطالعه نشان داده شد که این گونه ها از نظر مرفولوژیکی بسیار به هم شبیه هستند، همچنین به طور جداگانه طول کل مری و طول همپوشانی مری تنها مشخصات مرفومتريکی بودند که برای شناسایی نماتدهای ماده زخم ریشه ارزش

تشخیصی داشتند. این گونه به وضوح از سایر گونه های مشابه متمایز شده است (جدول ۲). اندازه های مرفومتربیک جمعیت جدا شده از بافت ریشه گل داوودی با اندازه های ارابه شده توسط میزوکوبو (۱۹۹۲)، اینسرا و همکاران (۱۹۹۸) در تمام موارد به جز طول بدن، طول ابتدای سر تا منفذ دفعی ترشچی، فاصله فرج تا مخرج تطابق کامل داشت. به طوریکه میانگین طول بدن در نمونه محلات ۴۶۵ میکرومتر (در نمونه فلوریدا ۵۵۷/۷ میکرومتر و در نمونه ژاپن ۵۵۴ میکرومتر)، میانگین طول ابتدای سر تا منفذ دفعی ترشچی در نمونه محلات ۷۸ میکرومتر (در نمونه فلوریدا ۸۴/۹ میکرومتر و در نمونه ژاپن ۸۸ میکرومتر) و فاصله فرج تا مخرج در نمونه محلات ۶۶ میکرومتر (در نمونه فلوریدا ۸۲/۹ میکرومتر و در نمونه ژاپن ۸۰ میکرومتر) بود. بافت های آلوده ریشه گل داوودی علائم مشخص نکروز را در سطح نشان می دهند، تعداد ۱۸۰ تا ۲۸۵ نماتد از یک گرم بافت ریشه جداسازی شد، که نشان می دهد نکروز موجود در سطح ریشه نتیجه فعالیت ماده ها، نرها و لاروهای *P. pseudocoffeae* می باشد. زخم های قرمز قابل رویت در سطح ریشه توسط نماتدهای مهاجر فعال در سلول های پوست ایجاد می شود. نتیجه این تغذیه فعال؛ نکروز گسترده دیواره سلولی، ایجاد حفرات و زخم قابل مشاهده می باشد (شکل ۵- C، D و H). بررسی هیستوپاتولوژی برش های طولی و عرضی نشان می دهند که این نماتدها به اپیدرم و پوست ریشه حمله می کنند. مهاجرت و تغذیه نماتد، دیواره سلولی را پاره نموده و به صورت حفرات بزرگی گسترش می یابد و سبب ایجاد نواحی نکروزه به سمت پارانشیم پوست می گردد، که در جهت حمله نماتد پیش می رود ولی در سلول های مجاور، سیتوپلاسم گرانوله شده و هسته ها حجیم می گردند (شکل ۵- G تا I). علائم مشاهده شده در اندام های هوایی گیاه شامل؛ کوتولگی، زردی و علائمی مشابه گیاهان در معرض کمبود آب و مواد غذایی می باشد و واکنش ریشه گیاه گل داوودی به آلودگی با *P. pseudocoffeae* مشابه گزارش آلودگی ریشه باقلا به *P. penetrans* می باشد (۱۴).

پراکنش جغرافیایی این نماتد توسط میزوکوبو در ۱۹۹۲ میلادی در Touganji، Takachiho و Miyazaki در ژاپن در خاک های اطراف ریشه *Chrysanthemum morifolium* Ram. و *Artemisia feddei* Lev. et Van. و همچنین در سال ۱۹۹۸ در فلوریدای آمریکا از گل مینا (*Aster elliotii* Toor.) گزارش شده است (۸). در این مقاله این گونه نماتد برای اولین بار از ایران از روی گل داوودی از منطقه محلات گزارش می شود.



شکل ۱- ترسیم شماتیک بخش های مختلف بدن نماتد *Pratylenchus pseudocoffeae* (ماده= A-C و E-J و نر= D و K). A) بدن نماتد ماده، B) سر نماتد ماده، C) قسمت جلویی بدن نماتد ماده، D) قسمت جلویی بدن نماتد نر، E و G) دستگاه تولید مثلی نماتد ماده، F، J و H) دم نماتد ماده، I) شیارهای جانبی و K) دم نماتد نر (تصاویر از نگارنده).

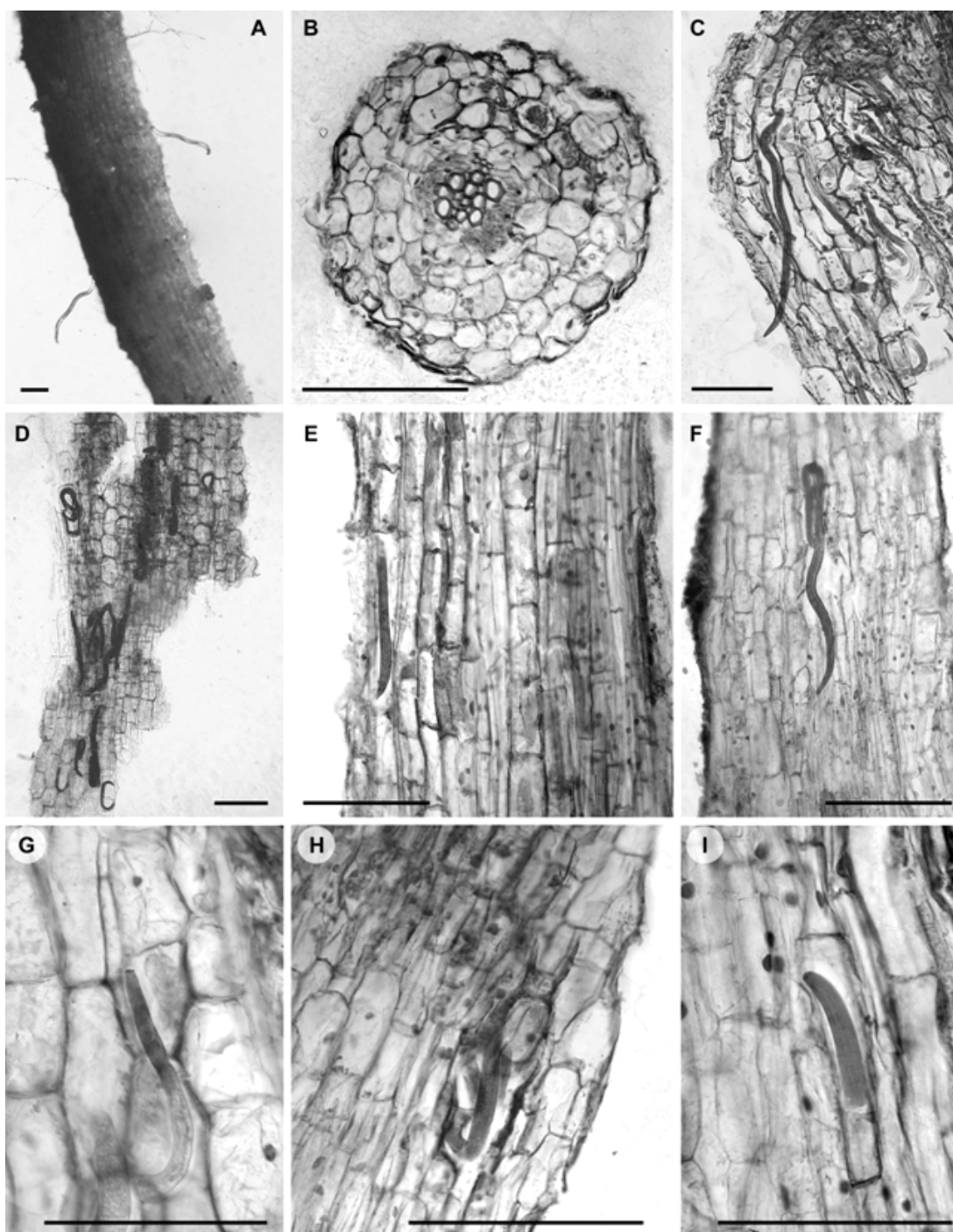


شکل ۲- تصویر میکروسکوپ نوری بخش های مختلف بدن نماتد (*Pratylenchus pseudocoffeae* A) بدن نماتد ماده، (B) بدن نماتد نر، (C) قسمت ابتدایی بدن نماتد ماده (سر و استایلت)، (D) قسمت جلویی بدن نماتد ماده، (E) قسمت انتهایی بدن نماتد ماده، (F) دم نماتد ماده، (G) شکاف تناسلی، (I) قسمت جلویی بدن نماتد نر، (H) قسمت ابتدایی بدن نماتد نر (سر و استایلت)، (J و K) دم نماتد نر (تصاویر از نگارنده).

جدول ۱- خصوصیات مرفومتريک جمعیت های ماده و نر *Pratylenchus pseudocoffeae* روی گل داوودی از منطقه محلات و مقایسه با هلوتیپ اصلی (اندازه ها به میکرومتر)

مشخصات مرفومتريک جمعیت ژاپنی (هلوتیپ)		مشخصات مرفومتريک جمعیت ایرانی (محلات)		خصوصیات
ماده	نر	ماده	نر	
۱	۱	۱۴	۱۰	n
۵۷۸	۴۳۰	۴۶۵ ± ۲۹/۴ (۴۲۵-۵۳۱)	۴۴۸ ± ۳۳/۶ (۳۹۴ - ۴۹۹)	L
۳۰/۲	۲۸/۳	۲۶/۷ ± ۲/۸ (۲۱/۹ - ۳۳)	۲۹/۳ ± ۳ (۲۶/۲ - ۳۴/۶)	a
۷/۱	۵/۱	۶ ± ۰/۶ (۵/۴ - ۷/۹)	۵/۷ ± ۰/۴ (۵ - ۶/۲)	b
۳/۳	۳	۳/۴ ± ۰/۴ (۲/۷ - ۳/۹)	۳/۶ ± ۰/۳ (۳/۲ - ۴)	b'
۱۹	۱۷/۶	۱۸/۴ ± ۱ (۱۵/۴ - ۱۹/۶)	۱۸/۸ ± ۱/۹ (۱۶ - ۲۲/۴)	c
۲/۳	۲/۴۱	۲/۴ ± ۰/۲ (۲ - ۳)	۲/۴ ± ۰/۴ (۱/۹ - ۳)	c'
۱۶/۵	۱۵/۲	۱۵/۷ ± ۰/۶ (۱۴/۷ - ۱۶/۷)	۱۴/۵ ± ۰/۶ (۱۴ - ۱۵/۵)	Stylet
۲	۲	۲/۳ ± ۰/۷ (۱/۳ - ۳/۳)	۳ ± ۰/۴ (۲/۷ - ۳/۷)	D.G.O.
-	-	۱۴/۶ ± ۴/۶ (۸ - ۲۱/۷)	۱۳/۹ ± ۱/۶ (۱۱/۱ - ۱۷/۱)	o
-	-	۵۴ ± ۲/۷ (۴۹ - ۵۷)	۵۲/۵ ± ۲/۴ (۵۰ - ۵۷)	ابتدای بدن تا حباب میانی مری
-	-	۷۸/۵ ± ۷/۱ (۵۶/۵ - ۸۶/۵)	۷۸/۵ ± ۲/۹ (۷۴/۵ - ۸۳/۵)	ابتدای بدن تا کاردیا
۸۲	۸۵	۱۴۰ ± ۱۴/۷ (۱۱۹ - ۱۶۷)	۱۲۵/۵ ± ۶/۵ (۱۱۹ - ۱۳۹)	Oesophagus
۹۰/۴	۸۱/۸	۷۸ ± ۴/۶ (۷۰ - ۸۵)	۷۷/۵ ± ۴/۲ (۷۳ - ۸۸)	ابتدای بدن تا منفذ دفعی ترشچی
-	-	۱۷/۶ ± ۱/۵ (۱۴/۳ - ۲۰/۷)	۱۵/۵ ± ۱/۱ (۱۳/۵ - ۱۷/۵)	بزرگترین عرض بدن
-	-	۱۰/۶ ± ۰/۸ (۹/۷ - ۱۲/۶)	۱۰ ± ۰/۶ (۹/۵ - ۱۱/۵)	عرض بدن در ناحیه مخرج
۹۴	-	۶۶ ± ۴/۹ (۵۴ - ۷۴)	-	فاصله فرج تا مخرج
۷۸/۵	۳۵/۳	۸۰ ± ۱/۱ (۷۹ - ۸۲)	۴۳ ± ۵/۲ (۳۳ - ۴۹)	T یا V
۲۶	-	۱۶/۹ ± ۲/۸ (۱۲/۷ - ۲۲)	-	P.U.S.
۳۰	۲۴	۲۵/۴ ± ۲/۶ (۲۲/۳ - ۳۲)	۲۴ ± ۳/۲ (۱۸ - ۲۹/۵)	Tail
-	۱۶/۵	-	۱۷ ± ۰/۷ (۱۶ - ۱۸/۵)	Spicul.
-	۵	-	۴/۵ ± ۰/۵ (۴ - ۵)	Guber.





شکل ۵- تغییرات هیستوپاتولوژی ایجاد شده بر اثر تغذیه و مهاجرت *Pratylenchus pseudocoffeae* در ریشه گل داوودی. A-F: نماتدهای مهاجم در لایه های پارانشیم پوستی. G-I: برش طولی ریشه های گل داوودی نشان دهنده آلودگی نماتد در پارانشیم پوستی، دیواره سلولی ضخیم شده، هسته های حجیم و سیتوپلاسم گرانوله در سلولهای مجاور به نماتد می باشد. مقیاس برابر با یکصد میکرومتر.

جدول ۲- مقایسه *Pratylenchus pseudocoffeae* با گونه های مشابه جنس *Pratylenchus*.

وجود تعداد حلقه	طول استایلت (μm)	شکل کیسه ذخیره اسپرم	T یا V	P.U.S (μm)	شکل دم ماده	تعداد سطوح جانبی	شکل سطوح جانبی	<i>Pratylenchus spp.</i>
۲	۱۳-۱۵/۹	گرد	-۸۲/۷ ۷۷/۹	-۳۲ ۲۵/۴	نیمه کروی	۴،۵،۶	صاف	<i>P. coffeae</i>
۲	۱۵/۹-۱۷/۶	گرد	۷۴-۸۳	-۳۳ ۱۷/۵	نیمه کروی	۴	صاف	<i>P. gutierrezii</i>
۳	۱۵-۱۷	چهارگوش	۷۵-۸۴	۱۸-۲۴	نیمه کروی	۴	صاف	<i>P. penetrans</i>
۳	۱۴/۷-۱۶/۴	گرد	۷۹-۸۲	۱۲/۷-۲۲	نیمه کروی	۴	صاف	<i>P. pseudocoffeae</i>

## منابع

- ۱- حسینی مهربان، ا. و تنهامعافی، ز. ۱۳۷۹. وجود نماتد ریشه گرهی در گلخانه های پرورش میخک محلات خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاه پزشکی ایران. صفحه ۳۵۷.
- ۲- مهدیخانی مقدم، ع.، خیری، ا. و محمدی، م. ۱۳۸۲. معرفی سه گونه جدید از جنس *Meloidogyne* برای ایران، مجله بیماری های گیاهی، جلد ۱۸۹، صفحه ۲۳۹-۲۱۱.
- 3- Castillo, P. and Volvas, N. 2007. *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae): Diagnosis, Biology, Pathogenicity and Management. Brill Academic Publishers, Leiden, Netherlands, 555 pp.
- 4- Coolen, W. A. and D'Hereld, C. J. 1972. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. 9220 Merelbek Belgium, 77 pp.
- 5- Corbett, D. C. M. 1973. *Pratylenchus penetrans*. C.I.H Descriptions of Plant Parasitic Nematodes Set.2 No 25 Farnham Royal, UK: CAB, 3pp.
- 6- Corbett, D. C. M. and Clark, S. 1983. Surface structures in the taxonomy of *Pratylenchus* species. *Revue de Nématology* 6: 85-98.
- 7- De Grisse, A. T. 1969. Redescription ou modification de quelques techniques dans L'étude des nematodes phytoparasitaires. *Mede. Rijks. Fak. LandbWet Gent*, 34: 351-369.
- 8- Inserra, R. N., Duncan, L. W., Dunn, D., Kaplan, D. T. and Porazinska, D. 1998. *Pratylenchus pseudocoffeae* from Florida and its relationship with *P. gutierrezii* and *P. coffeae*. *Nematologica* 44: 683-712.
- 9- Jenkins, W. R. 1964. A rapid centrifugal flotation technique for separating nematodes from soil. *PL. Dis. Repr.* 48(9): 692.
- 10- Johansen, D. A. 1940. *Plant Microtechnique*. New York, USA: McGraw-Hill, 523 pp.
- 11- Lee, J. K., Choi, D. R., Park, B. Y. and Kim, D. G. 2006. Occurrence of root lesion nematodes *Pratylenchus* spp. from chrysanthemum in Korea. *Journal of Nematology* 38, 279 (abstract).
- 12- Mizukubo, T. 1992. *Pratylenchus pseudocoffeae* n.sp. (Nematoda: Pratylenchidae) from compositae plants in Japan. *Applied Entomology and Zoology* 27: 437-444.
- 13- Tanha Maafi, Z., Sturhan, D., Kheiri, A., Geraert, E., Subbotin, S. A. and Moens, M. 2003. Morphology of some cyst-forming nematodes from Iran. *Russian Journal of Nematology* 11: 59-78.
- 14- Vovlas, N. and Troccoli, A. 1990. Histopathology of broad bean roots infected by the lesion nematode *Pratylenchus penetrans*. *Nematologia Mediterranea* 18: 239-242.