# مسح حقلي لعزل وتشخيص سبورات فطريات المايكورايزا مظهريا واستخدام تقنية PCR في مواقع مختلفة من جامعة تكريت

**صلاح الدين حمادي[1]* وحميد مجيد جاسم** وعبد الكريم عريبي سبع***

* كلية الزراعة/ جامعة تكريت ** كلية التقنيات الحيوية التطبيقية/ جامعة النهرين

## الخلاصــة

اجريت دراسة مسحية في محافظة صلاح الدين – جامعة تكريت لعزل وتشخيص سبورات فطريات المايكورايزا من ستة مواقع تربتها مختلفة من حيث النسجة والصفات الكيميائية و الفيزيائية والخصوبية في كلية الزراعة للعام 2014 ، جمعت العينات النباتية بشكل عشوائي ، اشتملت على (10) نباتات من عوائل نباتية مختلفة وكان العدد الكلي للعينات (25) عينة جذور نبات مع التربة المحيطة بها ، عزلت الأجناس والأنواع الآتية من مواقع المسح كافة نوعين للجنس *Glomus* sp. وهما *G.mossea* و*Glomus intradeces* وثلاث عزلات أخرى للاجناس *Gigaspora sp.* والجنس *Entrophospora* sp. والجنس *Acoulospora sp.* وبينت نتائج المسح الحقلي الاتي : إن الجنس *Glomus* هو الأكثر تكراراً في جميع مواقع الدراسة ، يليه جنس *Entrophospora sp.* ، و يليه جنس *Acoulospora sp.* ، في حين كان الجنس *Gigaspora* هو الأقل تكراراً ، أثبتت نتائج الترحيل الكهربائي الى ان طريقة الأستخلاص المستعملة في الدراسة الحالية تعد ملائمة في الحصول على تركيز ونقاوة مناسبة لأستعمال الـ DNA الناتج كقالب (template) في تضخيم هذه الجينات بتقنية الـ PCR ، تشير نتائج الترحيل الكهربائي لنواتج التضخيم على هلام الأكاروز (2%) باستخدام البادئ النكليوتيدي AML1 الى انه قد تم الحصول على حزم DNA بحجم 800 زوج قاعدي تمثل حجم المنطقة التي ضخمت بأستخدام هذا البادئ وعن طريق الاختلاف في هذه المنطقة يتم التعرف على أجناس الفطر، اذ تظهر تغاير فيما بين الاجناس المختلفة لفطريات المايكورايزا بنسبة كبيرة .

**الكلمات المفتاحية :**
عزل و تشخيص، سبورات ، فطريات المايكورايزا، مواقع مختلفة، تقنية PCR ، الجنس *Glomus* .

**للمراسلة:**
**صلاح الدين حمادي**
قسم علوم التربة والموارد المائية– كلية الزراعة– جامعة تكريت– **العراق.**

# Field Survey to Isolation and Morphological Identification of Mycorrhizal Fungi Spores and Use PCR Technique from Different Location in Tikrit University

**Salahuldeen H. Altai*, Hameed M. J.** and Abedulkareem E. Alkurtany***

*College of Agric.- Tikrit Univ. ** College of Applied Biotechnology- Al-Nahrain Univ.

## ABSTRACT

A field survey was conducted in Tikrit University - Salah Al-din governorate to Isolate and Identify Mycorrhizal Fungi spores from 6 Location different in Soil Texture , Chemical , physical and Fertility Characteristics , in College of Agriculture in 2014, included (10) different plants families, the total number of samples was (25) contained plant root and there surrounding soil (Rhizosphere) the Genera and Species of mycorrhizal fungi Isolated from all studied regions were (*Glomus mossea* , *G. intradeces* , *Gigaspora sp.* , *Entrophospora sp.*, *Acoulospora sp.)* The results shown:- That *Glomus* genus was the most common in all of the studied regions and the second Genus *Entrophospora sp.* and thence *Acoulospora sp.*, while *Gigaspora* sp. was the less common, The maximum spores account of mycorrhizal fungi in sandy loam soil surrounding Onion plants , and then Sand Soil (less and high gypsiferous) surrounding Corn plants , while the minimum spores recorded in the Loamy sand Soil surrounding Alfalfa plants ,The result of gel electrophoreses proved that the Extraction DNA method was very appropriate to get the concentration and purity for amplification gene with PCR technique, The result of gel electrophoreses with primer AML1 showed that we can differential between Mycorrhizal fungi Genera by PCR technique.

**Keywords:**
Field survey, isolation, morphological identification, Mycorrhizal fungi spores, PCR technique.

**Correspondence:**
**Salahudeen H. Altai**
Soil & Water Resources Sciences Dept.- College of Agric.- Tikrit Univ.- **IRAQ**.

[1] البحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الاول

**المقدمة:**

مصطلح المايكورايزا يطلق على العلاقة التكافلية بين مجموعة معينة من الفطريات و جذور كثير من النباتات الوعائية تحت الظروف الطبيعية وهي علاقة تكافلية غير مرضية يستجيب لها النبات العائل فيتحسن نموه و صفاته الفسلجية و تزداد مقاومته للأمراض و كثير من العوامل البيئية كالانجماد و الجفاف و الملوحة و حالة التعايش هذه تبقى قائمة طوال حياة النبات فحالة الإصابة بالمايكورايزا هي حالة طبيعية و ليست شاذة (مرضية )Mosse ( 1977) إذ يشير Trappe (1962) الى ان حوالي 95% من النباتات الوعائية يمكن ان تصاب بفطريات المايكورايزا في البيئة التي تعاني من نقص الفسفور الجاهز ،وهناك أنواع كثيرة من المايكورايزا وهي المايكورايزا الخارجية Ectomycorrhiza التي تسببها فطريات تعود إلى صنف الفطريات البازيدية Basidiomycetes و الكيسية Ascomycetes والتي تصيب أشجار الغابات ومنها نباتات الصنوبر Pine والبلوط Oak ويوكالبتوس Eucalyptus ، Peterson وجماعته (2004) والنوع الثاني هي المايكورايزا الداخلية Endomycorrhiza وتضم المايكورايزا الحويصلية الشجيرية Vesicular Arbuscular Mycorrhiza التي تسببها فطريات تعود إلى صنف الفطريات اللاقحية Zygomycetes والتي تصيب معظم محاصيل الخضر والحبوب والحشائش وتضم رتبة Glomales وتتألف من العوائل الآتية Glomaceae ومن اهم اجناسها ( *Glomus* ، *Sclerocystis* ) و Acaulosporacea و اشهر اجناسها ( *Acaulospora* و *Entrophospora* ) و Gigasporaceae وتضم هذه العائلة عدة اجناس منها ( *Gigaspora* و *Scutellospora*) Dodd ( 2000 ) ، و تتكاثر فطريات المايكورايزا بعدة طرائق منها انتاج السبورات spores و هي وحدات تكاثرية دقيقة ذات أشكال وألوان وأحجام مختلفة يتراوح أقطارها بين (10–100 مايكرون ) Kucey وجماعته (2015) ، وتنتشر السبورات بوساطة الرياح او الغبار او الماء أو الحشرات أو حيوانات أخرى وتكون عاملا لتوطين الفطريات في مواطن جديدة Arul, و Nelson (2016) ، وخلال دورة حياة الفطر تنتج عادة سبورات لاجنسية وبأعداد كبيرة ولهذه السبورات المقدرة على الإنبات في الحال عند وجود العائل والظروف المناسبة و وقد عزلت اجناس من فطريات المايكورايزا في المناطق الجافة و شبه الجافة و لها دور مهم في زيادة مقاومة النباتات للجفاف De Souzaa وجماعته (2016) ، تختلف أحجامها و أشكالها حسب جنس و نوع الفطر المكون للسبور .

استهدفت الدراسة :

1. عزل وتشخيص سبورات المايكورايزا الحويصلية الشجيرية VAM من ستة مواقع مختلفة في كلية الزراعة جامعة تكريت
2. تحديد الجنس الاكثر سيادة في مواقع الدراسة .
3. تشخيص اجناس فطريات المايكورايزا بتقنية (PCR)

**المواد وطرائق العمل:**

اجريت الدراسة المسحية في محافظة صلاح الدين – جامعة تكريت وتقع ضمن خط طول 07″41′43° شرق وعرض 14″63′34° شمالا للعام 2014.

جمعت العينات النباتية بشكل عشوائي من خمس مواقع وهي عبارة عن جذور نباتات مختلفة وادغال، مع التربة المحيطة بها (من منطقة الرايزوسفير) .

اشتملت الدراسة على (10) نباتات من عوائل نباتية مختلفة ( الذرة الصفراء *Zea mays* والشعير *Hordeum vulgare* والحنطة *Triticum aestivum* و البصل *Allium cepa* و الباقلاء *Vicia faba* و بزاليا *Lathyrus odoratus*L. والحمص *Cicer Linnaeus* و الجت *Medicago truncatula* و الحندقوق *Melilotus officinalis* والحبة السوداء *Nigella sativa* ) وكان العدد الكلي للعينات (25) عينة جذور نبات مع التربة المحيطة بها ، وجمعت العينات في ثلاثة أشهر هي شباط وآذار ونيسان، حفظت عينات الجذور بمحلول Formalin Aceto Alcohol(FAA)، ثم حفظت عينات التربة

في أكياس بلاستيكية نظيفة ودونت عليها المعلومات الخاصة بكل عينة (اسم العينة و المكان الذي أخذت منه العينة و وقت اخذ العينة) ، يوضح الجدول (1) بعض الصفات الفيزيائية والكيمائية لتربة مناطق المسح المدروسة.

**جدول (1) : بعض الصفات الفيزيائية و الكيميائية للتربة في مناطق المسح المدروسة**

| نوع التربة | pH | EC (Dcmns/m) | $CaSO_4$ (g/Kg) | النسجة (Texture) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | رمل Sand | غرين loam | طين Clay |
| رملية طينية غرينية | 7,01 | 2.77 | 22 | 61.2 | 15.5 | 23.3 |
| رملية غرينية | 6,81 | 1.26 | 18 | 58.8 | 22.8 | 18.4 |
| رملية غرينية | 7.38 | 2.24 | 35 | 53.3 | 28.4 | 18.3 |
| غرينية رملية | 7.23 | 2.86 | 35 | 28.9 | 44.8 | 26.3 |
| رملية | 7,46 | 2,71 | 50 | 72.5 | 7.4 | 2.20 |
| رملية طينية | 7,81 | 2.25 | 210 | 61.4 | 9.2 | 29.4 |

**التشخيص المظهري لفطريات المايكورايزا الحويصلية الشجيرية:**

**عزل سبورات فطريات المايكورايزا ( VAM ) من التربة :**

أجريت عملية عزل سبورات فطريات المايكورايزا الحويصلية الشجيرية ( VAM) حسب طريقة النخل الرطب والتصفية Wet sieving and decanting الموصوفة من قبل Gerdemann و Nicolson ( 1963 ) وكما يأتي :-

1- وزن 100 غرام من التربة ووضعت في بيكر يحتوي 500 مل ماء مقطر ورجت جيدا وتركت لتستقر لمدة 20 دقيقة.

2- مرر العالق عبر مجموعة من المناخل 38و45و 75 و 106 و 125 و 250مايكرون .

3- غسلت المناخل (38 و 45 و 75 و106 و 125 مايكرون) و جمع ماء الغسل في انبوبة اختبار

4- وضعت انابيب الاختبار في جهاز النبذ المركزي لمدة 10 دقائق. سكب الراشح واخذ الجزء المترسب اسفل انبوبة الاختبار.

5- اضيف محلول الكليسرول 50% بديلا عن السكروز وذلك لتلافي التاثير الضار للضغط الازموزي للسكروز على السبورات مما يؤدي الى تكسرها وتقليل فعاليتها ,Furlan وجماعته (1980) ، رجت الانابيب باليد و وضعت في جهاز النبذ المركزي لمدة 10 دقائق.

6- أهمل الراسب واخذ المعلق ورشح على ورقة ترشيح مع اضافة الماء المقطر لغسل السبورات .

7- فحصت ورقة الترشيح بالمجهر التشريحي واستخدم المجهر الضوئي للتعرف على الصفات المظهرية للسبورات لغرض تشخيصها.

**انتاج لقاح المايكورايزا:**

حضر لقاح المايكورايزا بطريقة trap cultures الموصوفة في Stutz و Morton (1996) وفق الخطوات الاتية:

1- **تحضير التربة:** اخذت تربة مزيجية ونخلت بمنخل قطر فتحاته 2 ملم، وعقمت بالمؤصدة (Autoclave) بدرجة 121م وضغط 15 باوند / انج$^2$ و لمدة ساعة و نصف وكررت عملية التعقيم مرتين ، ووضعت في اصص بلاستيكية سعة 5 كغم.

2-**أضافة اللقاح:** أضيف الى الأصص عالق سبورات المعزولة لكل جنس على حدة مع ترك أصص أخرى بدون تلقيح (Control) للمقارنة .

3–**العائل النباتي:** زرع نبات البصل *Allium cepa* كعائل نباتي، ثم وضعت في الظلة الخشبية لمدة ثلاثة أشهر مع إجراء الخدمة المستمرة لها.

4–**تشخيص الاصابة الفطرية:** فحصت جذور النباتات للتأكد من الإصابة بالمايكورايزا الحويصلية الشجيريةبطريقة Ink and Vinegar الموصوفة في Vierheiligوجماعته (1998).

5– **التحري عن سبورات فطريات المايكورايزا:** فحصت التربة المحيطة بالجذور للتأكد من وجود سبورات فطريات المايكورايزا واعدادها بطريقة النخل الرطب والتصفية (Wetsieving and decanting) بحسب ما ذكره Gerdemann و Nicolson (1963) ، وحسبت اعداد السبورات بعد عزلها في اطباق بترية ، فقد أشترط Liu و Luo (1994) ان يكون اللقاح الفطري حاويا على 4–5 سبور/غم من التربة ليكون اللقاح فعالا ، لضمان حصول اصابة نموذجية لجذور النبات العائل .

6–**حفظ اللقاح:** بعد التأكد من خلو اللقاح من المسببات المرضية والاحياء الاخرى غير المرغوب فيها، قطع الجزء الخضري للنباتات و قشطت الطبقة السطحية للتربة ، واخذ الجزء الجذري للنباتات الملقحة وغير الملقحة وقطعت الجذور إلى قطع صغيرة وخلطت مع التربة الخاصة بكل أصيص ثم وضعت في أكياس بلاستيكية نظيفة ومعقمة وسجلت المعلومات الخاصة بكل نموذج والتي تتضمن نوع المعاملة (جنس او نوع فطر المايكورايزا او المعاملة غير الملقحة)، ووقت اخذ العينة وحفظت العينات في الثلاجة لحين تنفيذ التجربة الحقلية.

**التشخيص المظهري:**

شخصت الأجناس (Genus) والأنواع (Species) التابعة لفطريات المايكورايزا الحويصلية الشجيرية حسب المفتاح التصنيفي المذكور من قبل Oehl وجماعته (2011)، وشخصت الاجناس على أساس لون السبورات و شكلها وحجمها وطبيعة ارتباط السبور بالهايفا وعدد جدران السبور وسمكها.

**التشخيص الجزيئي لفطريات المايكورايزا:**

شخصت الجذور النباتية المصابة وغير المصابة بفطريات المايكورايزا جزيئيا بتقنية الـNESTED PCR Polymerase Chain Reaction وذلك بالتحري عن جين rDNA18S للفطر في جذور النباتات، عن طريق أستخلاص وتنقية الحامض النووي (DNA) للجذور والكشف عن وجود الحامض النووي للفطر وفقا للطريقة الموصوفة من قبل Van Tuinen وجماعته (1998، المعدلة من قبل Lee و جماعته، 2008)

**تقدير نقاوة وتركيز الدنا (Maniatis وجماعته ، 2001 ):**

تم تقدير التركيز والنقاوة للـDNA المستخلص باستعمال جهاز الـ(Nanodrop Spectrophotometer) وذلك بأخذ 1 مايكروليتر من عينات الدنا (DNAStock solution) بعد ان نبذ المزيج مركزيا لمدة خمس ثواني لضمان نزول قطرات السائل الموجودة على جدار الانبوبة، ثم وضعها في المكان المخصص في الجهاز وأخذ قراءة التركيز والنقاوة.

**الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز:**

حضر هلام الاكاروز اولا بأذابة 0.5 غرام من مسحوق الاكاروز في 50 مل من محلول TBE الدارئ (1X) في دورق زجاجي، (Dretzen وجماعته ، 1981) .

أجريت عملية الترحيل الكهربائي بتحميل نماذج الدنا في حفر الهلام، ووضع في احدى حفر الهلام الدليل الحجمي (DNA ladder marker) بعد مزجه مع صبغة التحميل،ثم وضع طبق الهلام لتكون الحفر المملوءة بالحامض النووي قريبة من القطب السالب (cathode) ، ثم اجريت عملية الترحيل بفولتية مقدارها 70 فولت ولمدة ساعة. وقد اجري الكشف عن حركة حزم الدنا على الهلام بتعريض الهلام الى الاشعة فوق البنفسجية باستخدام جهاز UV-Transiluminator.

**تضخيم جينrDNA18S للكشف عن الإصابة بفطريات المايكورايزا في جذور النباتات (Van Tuinen وجماعته ،1998):**

أجريت عملية تضخيم جينrDNA18Sبتقنية الـ NESTED PCR بأستخدام بادئين نكليوتيدية متخصصة لهذا الجين ، وقد تم الحصول عليها بهيئة مجففة (lyophilized form ) ليتم اذابتها في الماء المقطر المعقم لأعطاء تركيز نهائي مقداره 10 بيكومول/مايكروليتر .

تتضمن عملية تضخيم جينrDNA18S خطوتين الاولى بالتضخيم مع البادىء NS1 و الخطوة الثانية مع البادىء AML1 باستخدام ناتج تضخيم البادئ الاول .

ملاحظة: عند عدم حصول التضخيم مع البادىء الاول لا يمكن حصول التضخيم مع البادىء الثاني (Winn و Koneman، 2006) .

**البادئ الاول:**

Eukaryotic nuclear primer NS1 and NS4 (White *et al*.,1990)

الامامي NS1:5´-GTA GTC ATA TCG TTG TCTC-3´

الخلفي NS4 : 5´-CTT CCG TCAA TTCC TTT AAG-3´

تم الحصول عليه من مختبرات Prizma-Turkey

**مكونات مزيج التفاعل لتضخيم جينrDNA18Sللمايكورايزا مع البادىء الاول NS1 :**

الحجم الكلي لمزيج تفاعل PCR (20 مايكرولتر) المتكون من :-

10 مايكرولتر من محلول البفر (2X phire plant PCR buffer)

8.0 مايكرولتر ماء مقطر (double distilled -nucleas free- water)

0.8 مايكرولتر من محلول البادىء NS1 بتركيز 10 مايكرومول

0.8 مايكرولتر من محلول البادىء NS4 بتركيز 10 مايكرومول

0.4 مايكرولتر من انزيم البلمرة (phire Hot start II DNA polymerase)

تضاف هذه المكونات الى 4.0 مايكرولتر من DNA المادة النباتية المستخلصة.

**جدول (2): البرنامج المستخدم تضخيم قطعة الدنا للمايكورايزا**

| الخطوة | | درجة الحرارة(م°) | الوقت(دقيقة) | عدد الدورات |
|---|---|---|---|---|
| المسخ الابتدائي | Denaturation Initial | 95 | 5 | 1 |
| المسخ | Denaturation | 94 | 1 | 40 |
| الالتئام | Annealing | 56 | 1 | |
| الاستطالة | Extension | 72 | 1 | |
| التعليق | Hold | 72 | 5 | |

بعد انتهاء عملية تفاعل سلسلة البوليميريز تم التحري عن نواتج التضخيم بالترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز المحضر مسبقاً بتركيز 1% وبفولتية 70 فولت لمدة 30 دقيقة ثم الكشف عن حزم الدنا على الهلام تحت الاشعة فوق البنفسجية باستخدام جهاز UV-Transiluminator .

**البادئ الثاني:**

Mycorrhizal fungi nuclear primer AML1 and AML2 (Lee *et al*.,2008)

الامامي AML1:5´-ATC AAC TTT CGA TGG TAG GAT AGA -3´

الخلفي AML2 : 5´-GAA CCC AAA CAC TTT GGT TTC-3´

تم الحصول عليه من مختبرات Prizma-Turkey

الحجم الكلي لمزيج تفاعل PCR (20 مايكرولتر) المتكون من :-

10 مايكرولتر من محلول البفر (2X phire plant PCR buffer)

7.0 مايكرولتر ماء مقطر (double distilled -nucleas free- water)

0.8 مايكرولتر من محلول البادىء AML1 بتركيز 10 مايكرومول

0.8 مايكرولتر من محلول البادىء AML2 بتركيز 10 مايكرومول

0.4 مايكرولتر من انزيم البلمرة (phire Hot start II DNA polymerase)

1.0 مايكرولتر من ناتج التضخيم الاول (PCR product as DNA template)

التفاعل السلسلي الثاني مع ناتج التضخيم الاول و اجري بمزج المحتويات باستخدام المازج الكهربائي (Vortex) لمدة عشر ثواني ، ثم نبذت المحتويات مركزيا لجمع القطرات الملتصقة على الجدران في قعر الانبوبة ، بعدها نقلت الانابيب الى جهاز الدوار الحراري (Thermalcycler). وقد اجري تفاعل التضخيم وفق البرنامج الحراري المبين في الجدول (2)

بعد انتهاء عملية تفاعل سلسلة البوليميريز تم التحري عن نواتج التضخيم بالترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز المحضر مسبقاً بتركيز 1% وبفولتية 70 فولت لمدة 30 دقيقة ثم الكشف عن حزم الدنا على الهلام تحت الاشعة فوق البنفسجية باستخدام جهاز UV-Transiluminator .

**النتائج المناقشة:**

**عدد السبورات و نسبة الإصابة بفطريات المايكورايزا V A M خلال المسح الحقلي لمواقع مختلفة من جامعة تكريت :**

يبين الجدول (3 ) عدد سبورات فطريات المايكورايزا VAM المعزولة من منطقة الجذور للنباتات المزروعة و الادغال في مواقع مختلفة من جامعة تكريت ، و يظهر بان اكبر عدد سبورات فطريات المايكورايزا وجد في التربة ذات النسجة الرملية الغرينية المحيطة بجذور نبات البصل فكان 60 سبور. $10^{-1}$ غرام و4 سبور. $10^{-1}$ غرام تربة، للتربتين (الرملية قليلة الجبس و الرملية عالية الجبس) المحيطة بنبات الذرة الصفراء، و30 سبور. $10^{-1}$ غرام تربة، للتربتين (الرملية الغرينية والغرينية رملية ) المحيطة بنبات البزاليا و الشعير ، في حين كان اقل عدد سبورات سجل في التربة الغرينية الرملية المحيطة بنبات الجت فبلغت 20 سبور. $10^{-1}$ غرام تربة، وهذا يتماشى مع ما ذكره البهادلي (1994) بان سبورات فطريات المايكورايزا تنتشر في مناطق وسط و جنوب العراق لملائمة صفات التربة و الظروف الجوية لنموها.

**جدول (3) عدد سبورات فطريات المايكورايزا VAM المعزولة من منطقة الجذور للنباتات المزروعة و الادغال في مواقع مختلفة من جامعة تكريت .**

| النسجة (Texture) | الاجناس Genus | عدد السبورات في 10 غم تربة |
|---|---|---|
| رملية غرينية | *Glomus sp. , Gigaspora sp.* | 60 |
| رملية طينية غرينية | *Glomus sp.* | 30 |
| رملية غرينية | *Glomus sp. , Entrophospora sp.* | 30 |
| غرينية رملية | *Glomus sp. , Entrophospora sp.* | 20 |
| رملية قليلة الجبس | *Glomus sp. , Entrophospora sp.* | 40 |
| رملية طينية عالية الجبس | *Glomus sp.* *Entrophospora sp Acoulospora sp.* | 40 |

**التشخيص المظهري لفطريات المايكورايزا :**

شخصت فطريات المايكورايزا بعد عزل سبوراتها من عينات التربة الماخوذة من مواقع مختلفة في جامعة تكريت كلية الزراعة واعتمد المفتاح التصنيفي المذكور في Oehl وجماعته ( 2011) و تبين من خلال التشخيص المظهري لسبورات فطريات المايكورايزا المعزولة بانها تعود الى 4 اجناس من فطريات المايكورايزا هي الاكثر تكراراً في عينات التربة الماخوذة من المواقع التابعة لجامعة تكريت بعد مطابقة صفاتها مع المفتاح و الذي يعتمد على لون السبور و حجمه و عدد جدران السبور و سمك الجدران و الشكل الخارجي للسبور و محتويات السبور و منطقة التقاء الحامل السبوري بالسبور و شكل الحامل السبوري و تجمع السبورات في التربة شكل الاصابة بالجذر ، و الاجناس هي (*Glomus* sp. و *Gigaspora sp.* و *Entrophospora sp.* و *Acoulospora sp* ) ويلاحظ من الجدول (4) بان الجنس الاكثر تكراراً هو *Glomus* sp. في جميع مواقع الدراسة فقد عزل من التربة المحيطة بنبات البصل و الذرة الصفراء و الحمص و البزاليا و الباقلاء و الجت و الحندقوق ، و كان عدد السبورات (60 سبور . $100^{-1}$ غرام تربة) وسجل اعلى نسبة تواجد في موقع الدراسة فكانت (40%) ويليه الجنس *Entrophospora sp.* عدد سبورات (60 سبور . $10^{-1}$ غرام تربة) الذي عزل من التربة المحيطة بنبات الذرة الصفراء والبصل و الحنطة و الشعير ، و سجل نسبة تواجد (26,6%) ومن ثم الجنس *Acoulospora sp* عدد سبوراته (40 سبور . $10^{-1}$ غرام تربة) الذي عزل من التربة المحيطة بنبات الذرة الصفراء والشعير والحمص و كانت نسبة تواجده (30%) ، في حين ان اقل عدد سبورات في التربة هو الجنس *Gigaspora sp.* (30 سبور . $10^{-1}$ غرام تربة) وقد عزل من التربة المحيطة بنبات الحبة السوداء فقط و سجل اقل نسبة تواجد في مواقع الدراسة فكانت (13,3%). و هذه النتائج تتفق مع الطائي (2010) و الكرطاني وجماعته (2012) .

ان سبورات فطريات المايكورايزا تنتشر في كثير من الترب ولكن هناك اختلاف في اعداد السبورات يعود الى نوع النبات العائل ( Akbar وجماعته ،2007) و جنس الفطر نفسه و خواص التربة الفيزيائية و الكيميائية و الخصوبية Lynch (2011)،

**جدول (4) عدد سبورات و نسبة الإصابة بفطريات المايكورايزا VAM للنباتات المزروعة و الادغال في مواقع مختلفة من جامعة تكريت .**

| ت | الأجناس Genus | النبات العائل Host plant | نسبة الإصابة بالمايكورايزا % | عدد السبورات في 100 غم تربة | نسبة تواجد الفطر % |
|---|---|---|---|---|---|
| .1 | *Glomus* sp. | البصل و الذرة الصفراء و الحمص والبزاليا والباقلاء والجت والحندقوق | 80 | 60 | 40 |
| .2 | *Entrophospora sp.* | الذرة الصفراء والبصل و الحنطة والشعير | 60 | 40 | 26.6 |
| .3 | *Acoulospora sp* | الذرة الصفراء والشعير والحمص | 55 | 30 | 20 |
| .4 | *Gigaspora sp.* | الحبة السوداء | 35 | 20 | 13.3 |
| .5 | | | | 150 | |

**1- جنس Genus : *Glomus mossea*:**

يبين الشكل (1) سبور فطر المايكورايزا جنس ***Glomus mossea*** و يظهر بان لون السبور كان اصفر فاتح ، كروي الشكل ذو سطح أملس شبكي و عند فحصه بالمجهر الضوئي تحت قوة التكبير 40x تبين بان قطر السبور 60 مايكرون ، وكان قطر منطقة اتصال السبور بالخيط الفطري 10 مايكرون مفصولة عن محتويات السبور بحاجز Septum ، له جدار واحد سمكه 4 مايكرون ، سمك جدار الخيط الفطري في منطقة الاتصال 2 مايكرون ، ووجد السبور بشكل مفرد في التربة .

**شكل (1) سبور فطر المايكورايزا جنس *Glomus mossea* تحت قوة التكبير 40x**

**2- جنس Genus : *Glomus intradecs*:**

من الشكل (2) الذي يبين سبور فطر المايكورايزا جنس ***Glomus intradecs*** تحت قوة التكبير 20x ، يظهر بان لون السبور اصفر داكن ، كروي الشكل ، سطح السبور خشن ، وعند فحصه بالمجهر الضوئي تحت قوة التكبير 40x تبين بان قطر السبور 60 مايكرون، وكان اتصال السبور بالخيط الفطري جانبي ، مع وجود مفصل بين الحامل السبوري و الخيط الفطري ، له 3 جدار الاول سمكه 2,5 مايكرون يتكون منه الحامل السبوري ، والثاني اسمك من الاول 3 مايكرون ، و الثالث رقيق جدا شفاف . وجد السبور بشكل مفرد في التربة .

**شكل (2) سبور فطر المايكورايزا جنس*Glomus intradecs* تحت قوة التكبير 20x**

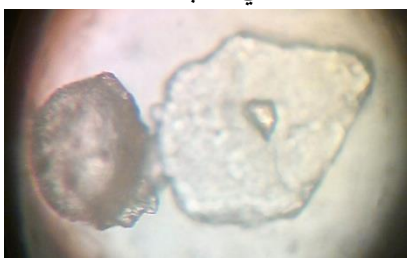
**3- جنس *Gigaspora sp.*:**

يوضح اشكل (3) سبور فطر المايكورايزا جنس *Gigaspora sp.* تحت قوة التكبير 40x ، و يظهر بان لون السبور ابيض شفاف ، كروي الشكل ، يتميز بانتفاخ في منطقة اتصال السبور بالحامل السبوري bulbous ، سطح السبور املس ، قطر السبور 40 مايكرون ، انبوب الانبات يمتد مباشرة من الجدار الخارجي قرب قاعدة السبور له جدار واحد رقيق و شفاف، وجد السبور بشكل مفرد في التربة ٠

**شكل (3) سبور فطر المايكورايزا جنس *Gigaspora sp.* تحت قوة التكبير 40x**

**4- الجنس *Entrophospora sp.*:**

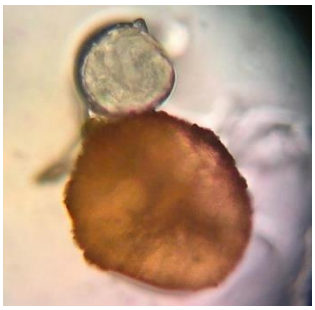
يظهر الشكل (4) سبور فطر المايكورايزا جنس *Entrophospora sp* تحت قوة التكبير 20x ، وكان لون السبور بني ، شكله كروي غير منتظم ، سطح السبور خشن لاحتواء السطح الخارجي من جدار السبور على نتوءات دقيقة ، قطر السبور 50 مايكرون ، أهم ميزات هذا الجنس هو اتصال السبور بجدار حويصلي كبير ، يمتلك جدار السبور طبقتين ، طبقة خارجية سميكة وطبقة داخلية غشائية ،و يوجد السبور بشكل مفرد في التربة ٠



**شكل (4)سبور فطر المايكورايزا جنس *Entrophospora sp* تحت قوة التكبير 20x**

**5- الجنس *Acoulospora sp*:**

يبين الشكل (5)سبور فطر المايكورايزا جنس *Acoulospora sp* تحت قوة التكبير 40x ، ويظهر بان لون السبور بني غامق ، وكان ارتباط السبور عمودي على الهايفا و الحامل السبوي قصير جدا ، مع وجود شكل كروي جانبي اسفل السبور في منطقة التقاء السبور بالهايفا ، ويكون السطح الخارجي من طبقة الجدار مزخرفة أو تحتوي على نتؤات أو مسامات ، قطر السبور 50 مايكرون ، انبوب الانبات يمتد مباشرة من الجدار الخارجي قرب قاعدة السبور ، و يمتلك جدار السبور طبقتين ، طبقة خارجية سميكة وطبقة داخلية غشائية ، و يوجد السبور بشكل مفرد في التربة.



**شكل (5)سبور فطر المايكورايزا جنس *Acoulospora sp* تحت قوة التكبير 40x**

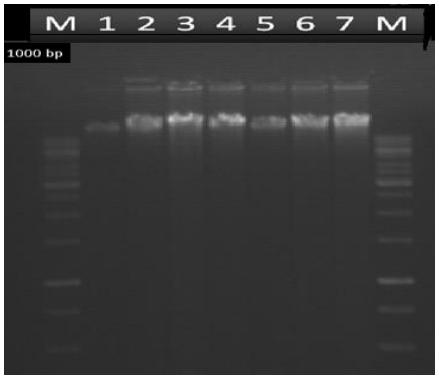
**التشخيص الجزيئي لفطر المايكورايزا:**

**أستخلاص الدنا المجيني من جذور نبات الذرة:**

أستخلص الدنا المجيني (Genomic DNA) لفطريات المايكورايزا من الجذور النباتية لعدد من نباتات الذرة الصفراء المصابة والمشمولة بالدراسة. اذ تراوح تركيز الدنا المستخلص بين 200 – 300 مايكروغرام/غرام من جذور النبات، وبنقاوة عالية تراوحت بين 1.7– 2 . بعد ذلك اجريت عملية الترحيل الكهربائي لعينات الدنا المستخلصة على هلام الاكاروز (1%) . يلاحظ من خلال النتائج المبينة في الشكل (6) الحصول على حزم دنا واضحة تشير إلى كفاءة طريقة الاستخلاص.

أثبتت نتائج الترحيل الى ان طريقة الأستخلاص المستعملة في الدراسة الحالية تعد ملائمة في الحصول على تركيز ونقاوة مناسبة لأستعمال الـ DNA الناتج كقالب (template) في تضخيم الجينات بتقنية الـ NESTED PCR .

ولغرض التهيئه لتفاعل تضخيم جين 18S rDNA لفطر المايكورايزا فقد تم ضبط تركيز الدنا النهائي ليصبح مقداره 25 مايكروغرام/مل والذي يعد مناسبا لاجراء تفاعل البلمرة بتقنية الـ NESTED PCR.




**الشكل (6): الترحيل الكهربائي للدنا المجيني لفطريات المايكورايزا المستخلص من جذور نبات الذرة الصفراء على هلام الاكاروز بتركيز 1% لمدة ساعة بفولتية مقدارها 70 فولت. اذ ان:**

المسار (M): دليل دنا حجمي (1000 زوج قاعدي) ، المسار (1): معاملة مقارنة خالي من DNA ، المسار (7–2): عينات الدنا (DNA) المستخلص من جذور نباتات الذرة الصفراء

**تضخيم جين 18S rDNA**

استكمالا للتشخيص المظهري والكيموحيوي لفطر المايكورايزا المصاحب لاصابة جذور نبات الذرة الصفراء ، فقد تم التحري عن جين 18S rDNA للتشخيص الجزيئي للفطر بتضخيم الجين باستخدام زوجين من البادئات النكليوتيدية المتخصصة وتحديد حجم الجين وكما يأتي:

**التضخيم بأستخدام البادیء NS1:**

تشير نتائج الترحيل الكهربائي لنواتج التضخيم على هلام الأكاروز (1%) باستخدام البادئ النكليوتيدي NS1 الى انه قد تم الحصول على حزم DNA بحجم 550 زوج قاعدي تمثل حجم المنطقة التي تم تضخيمها باستخدام هذا البادیء وكما مبين في الشكل (7). يعد حجم هذه المنطقة المضخمة مميزا لفطريات المايكورايزا من الانواع *Glomus mossea* و *G. intradeces* و *Gigaspora sp.* و *Entrophospora sp.* و *Acoulospora sp* .

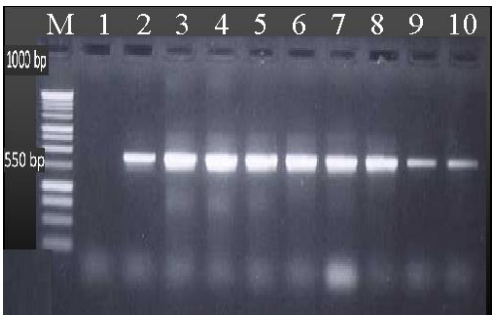
من خلال هذه النتائج فان البادیء النكليوتيدي NS1 يعد دقيق جدا في تشخيص الاصابة بفطريات المايكورايزا في جذور نباتات الذرة وعلى اساسها يمكن تمييز جذور النباتات المصابة بالفطر عن غير المصابة .

إن نجاح البادئ NS1 المتخصص المستعمل في كشف وتضخيم الـ DNA لفطريات المايكورايزا يعود الى إن هذا البادئ مصمم لتضخيم تسلسلات مترادفة توجد بشكل خاص في منطقة جينات الرايبوسومات في شريط DNA وكما هو مبين من قبل ( Lee وجماعته ،2008) وبذلك يمكن التعرف على وجود الدنا لفطريات المايكورايزا ضمن الدنا المجيني المستخلص من النباتات المصابة بفطريات المايكورايزا.

**التشخيص الجزيئي لعزلات المسح الحقلي :**

تمت عملية التشخيص الجزيئي لفطر المايكورايزا المعزول من عينات المسح الحقلي شملت جذور نباتات الذرة الصفراء و البصل والشعير والحنطة والباقلاء والبزاليا والحمص والحبة السوداء والجت المبينة في الجدول (3) والتي أخذت من مواقع زراعية مختلفة في جامعة تكريت .

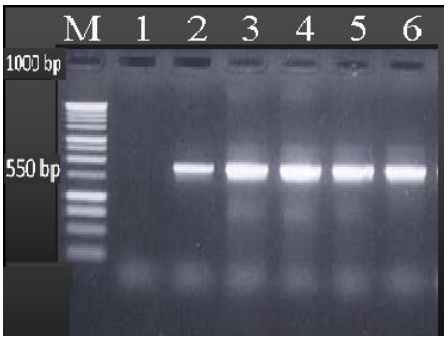
تشير نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز (1%) لنواتج تضخيم جين الـ 18S rDNA باستخدام البادئ NS1 للعينات المدروسة والمبينة في الشكل (7) الى ظهور حزمة دنا بحجم جزيئي مقداره 550 زوج قاعدي تمثل حجم جين 18S rDNA لفطر المايكورايزا.




**الشكل (7): الترحيل الكهربائي لنواتج تضخيم جين الـ 18S rDNA لفطريات المايكورايزا المستخلص من جذور نباتات** المسح الحقلي **على هلام الاكاروز بتركيز 1% لمدة ساعة بفولتية مقدارها 70 فولت باستخدام البادئ NS1. اذ ان:**

المسار (M): دليل دنا حجمي (1000 زوج قاعدي) ، المسار (1): نواتج تضخيم لدنا مستخلص من جذور نباتية غير ملقحة بفطريات المايكورايزا (مقارنة)، المسار ( 2– 10 ): نواتج تضخيم لدنا مستخلص من جذور نباتية مصابة بفطريات المايكورايزا هي الذرة الصفراء ،البصل، الشعير ، الحنطة ، الباقلاء ، البزاليا ، الحمص ، الحبة سوداء ، الجت.

من ناحية أخرى تشير نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز (1%) لنواتج تضخيم جين الـ 18S rDNA باستخدام البادئ NS1 المبينة في الشكل (8) لعينات جذور نباتية الى ظهور حزمة دنا بحجم جزيئي مقداره 550 زوج قاعدي تمثل حجم جين 18S rDNA الخاص بفطر المايكورايزا. وبذلك تتطابق نتائج التشخيص الجزيئي لفطر المايكورايزا مع نتائج التشخيص المظهري بالطريقة التقليدية (طريقة تصبيغ الجذور).

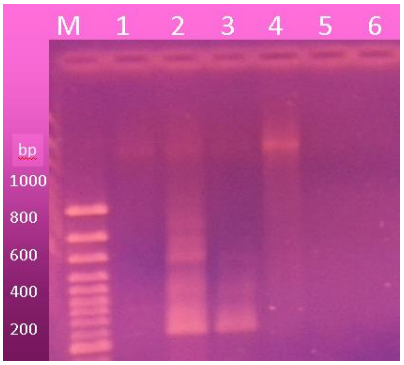



**الشكل (8): الترحيل الكهربائي لنواتج تضخيم الدنا المجيني لفطريات المايكورايزا المستخلص من جذور نبات الذرة على هلام الاكاروز بتركيز 1% لمدة ساعة بفولتية مقدارها 70 فولت باستخدام البادئ NS1. اذ ان:**

المسار (M): دليل دنا حجمي (1000 زوج قاعدي) ، المسار (1): نواتج تضخيم الدنا مستخلص من جذور نباتية غير ملقحة بفطريات المايكورايزا (مقارنة) ، المسار (6–2): نواتج تضخيم الدنا مستخلص من جذور نباتية مصابة بفطريات المايكورايزا .

**التضخيم باستخدام البادیء AML1 :**

استعمل البادئ AML1 لتضخيم جين 18S rDNA الخاص بتشخيص فطريات المايكورايزا العائدة لجنس *Glomus spp* الاكثر سيادة في التربة باستخدام نواتج التفاعل الاول مع البادیء NS1 بطريقة Nested PCR و وفقا لما هو موصوف من قبل( Lee وجماعته ،2008) . وعلى أساس التعاقب النكليوتيدي لهذا الجين المشفر للحامض النووي rRNA الداخل في تركيب الوحدة الفرعية الصغيرة للرايبوسوم 18S، يتم التعرف على أجناس الفطر، اذ تظهر هذه المنطقة تغاير فيما بين الاجناس المختلفة لفطريات المايكورايزا بنسبة كبيرة ( Stockinger وجماعته ،2010) ، و تشير نتائج الترحيل الكهربائي لنواتج التضخيم على هلام الأكاروز (1%) باستخدام البادئ النكليوتيدي AML1 الى انه قد تم الحصول على حزم DNA بحجم 200 زوج قاعدي تمثل حجم المنطقة التي تم تضخيمها بأستخدام هذا البادیء وكما مبين في الشكل (9).




**الشكل (9): الترحيل الكهربائي لنواتج تضخيم الدنا المجيني لفطريات المايكورايزا (ناتج تضخيم البادیء الاول NS1 ) مع البادئ الثاني AML1 بطريقة Nested PCR ، على هلام الاكاروز بتركيز 1% لمدة ساعة بفولتية مقدارها 70 فولت.**

**اذ ان:** المسار (M): دليل دنا حجمي (1000 زوج قاعدي) ، المسار (1): ناتج تضخيم الدنا لجذور نباتية غير ملقحة بفطريات المايكورايزا (مقارنة)، المسار ( 2 و 6 ): نواتج تضخيم الدنا لجذور نباتية مصابة بفطريات المايكورايزا .

تتفق هذه النتائج مع نتائج التشخيص المظهري وذلك لان المعاملات 2 و3 ملقحة بفطري *Glomus mossea* و *Glomus intradeces* على التتابع ، كما أشارت النتائج المبينة في الشكل(9) الى عدم حصول تفاعل البلمرة باستخدام هذا البادیء للمعاملات 4 و 5 و 6 وذلك لانها ملقحة بفطر *Gigaspora spp* التابعة لعائلة Gigasporaceae في حين لم تبدي المعاملتين 5 و 6 اي استجابة وذلك لان المعاملتين ملقحة بفطري *Entrophospora sp* و *Acoulospora sp* التابعة

لعائلة Acoulosporaceae و هذا يوضح بان البادیء AML1 متخصص جدا في تشخيص فطريات المايكورايزا العائدة لجنس *Glomus spp*، اما المعاملة 1 هي معاملة المقارنة (غير ملقحة بفطريات المايكورايزا ) فيلاحظ عدم وجود اي استجابة للبادیء AML1 وهذا يتفق مع ما ذكره (Winn و Koneman، 2006) بانه لا يمكن حصول التضخيم مع البادیء الثاني عند عدم حصول التضخيم مع البادیء الاول .

**المصادر :**

البهادلي ، ميثم علي . 1994 . مسح حقلي للفطريات الجذرية الداخلية في وسط العراق وتداخلها مع بعض المسببات المرضية واختيار افضل العوائل التكثيرية . رسالة ماجستير . جامعة بغداد .

الطائي ، نور صلاح رجب .(2010) : عزل وتشخيص فطر المايكورايزا من مواقع بيئية مختلفة في محافظة صلاح الدين وانتخاب لقاح فعال في نمو وحاصل فول الصويا *Glycine max*. رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة تكريت.

الكرطاني، عبد الكريم عريبي سبع و عبد الله عبد الكريم حسن و نور صلاح رجب (2012) : عزل و تشخيص فطريات المايكورايزا الحويصلية الشجيرية المرافقة لعوائل نباتية مختلفة في بيئات مختلفة في محافظة صلاح الدين . مجلة تكريت للعلوم الصرفة ،18 (1) :103 – 109

Akbar, A. ,Sinegani S. & Sharifi Z. 2007. The Abundance of Arbuscular Mycorrhizal fungi spores in Rhizospheres of different crops . Turk.J. Biol.181-185.

Arul, A. and R. Nelson.2016. Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in the cement dust polluted sites of Ariyalur District, in Biol Sci 2016 Int. J. Adv. Res. Biol. Sci. 3(1): 215-219.

De Souzaa, A.F. ; Susana R.E. ; Leonaldo A. andHelena F. .2016. Arbuscular mycorrhizal fungi in Mimosa tenuiflora (Willd.) Poir from Brazilian semi-arid .brazilian j . microbil . 4 7 : 359–366.

Dodd, J.C., C.L. Boddington, A. Rodriguez, C. Gonzalez-Chavez, and I. Mansur. 2000. Mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from different genera. Form. function and detection. Plant and Soil 226:131-151

Dretzen G.M.; Bellard p. ; Sassone-Corsi, and Chambon p. 1981. A reliable method for therec0very of DNA fragments from agarose and acrylamide gels .Anal.Biochem.112:295-298.

Furlan, V., Bärtschi, H., and Fortin, J.A. 1980. Media for density gradient extraction of endomycorrhizal spores. Trans. Br.Mycol. Soc. 75: 336–338.

Gerdmann , J.W. and Nicolson,T.H. 1963. Spores of mycorrhizal Endogene species extracted from soil by wet-sieving and decating. Trans. Brit. Mycol. Soc, 46 : 234-244.

Kucey, R.M. and McCready R.G.L.Canadian jo.2015. Isolation of vescular arbuscular mycorrhizal spores , a rapid method for the removal of organic detritus from wet – sieved soil samples .microbiol.28: (3) 363-365.

Lee ,J. , Lee S. , Peter J.,Young W.2008.Improved PCR Primers for the detection and Identification of Arbuscular Mycorrhizal Fungi.FEMS Microbial Ecol.UK.(65) 339-349.

Lee J.;Lee S.;Peter J. & Young W.2008.Improved PCR Primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi.FEMS Microbiol.Ecol.65:339-349.

Liu, R.J. and X.S. Luo, 1994. A new method to quantify the inoculum potential of arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol., 128: 89-l2.

Lynch JP. 2011. Root phenes for enhanced soil exploration and phosphorus acquisition: tools for future crops. *Plant Physiol* 156: 1041–1049

Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook.2001. Molecular cloning, a laboratory manual.in. 1982 Cold Spring Harbor Laboratory Publ., New York.

Mosse, B. 1977. Theories' of mycorrhiza in legume nutrition on marginal Soils, (whitney , A. S. and Bose , J . Eds. ) univ. of Hawaii , College Tropical Agriculture Mist. Publ. no 145. P. 147.

Oehl F. , Sieverding E. and Palenzuela J. , Ineichen K., da Silva G. A., 2011.Advances in Glomeromycota Taxonomy and Classification .IMA Fungus.(2) 191-199.

Peterson, R. L., Massicote, H. and Melville, L. H., 2004. Mycorrhias: Anatomy and Cell. Biology. CABI, Wallingford UK.

Stockinger H. , Kruger M. and Schüßler,A.2010.DNA barcoding of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. New Phytologist.Germany.187:461-474.

stutz J. C., Morton J. B. 1996. successive pot cultures reveal high species richness of arbuscular mycor rhizal fungi in arid ecosystems. Can. J. Bot. 74: 1883–1889.

Trappe , J. M . 1962 . Fungus associated of ectotrophic mycorrhiza .Bot Rev . 28: 538- 606 .

Van Tuinen D. , Jacquot E. , Zhao B. , Gollotte A. & Gianinazzi-pearson V. 1998. Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of Arbuscular Mycorrhizal Fungi using Rdna-targeted nested PCR.Molec.Ecol.7:879-887.

Vierheilig H, Coughlan AP, Wyss U, Piche,Y. 1998. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. Applied and Environmental Microbiology 64, 5004–5007.

White T.J.; Bruns T.; Lee S.&Taylor J.1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. & White T.J. (eds.), PCR protocols, a guide to methods and applications, Ac. Pr., San Diego, pp. 315–322.

Winn, W. C.& Koneman, C. W. 2006. *Koneman's colour atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 6th ed. Lippincott Wilkins, Baltimore. pp. 1151-1243.